

(19)



österreichisches  
patentamt

(10)

AT 503 902 A1 2008-01-15

(12)

## Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer: **A 1145/2006**

(22) Anmeldetag: **05.07.2006**

(43) Veröffentlicht am: **15.01.2008**

(51) Int. Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/62** (2006.01),  
**C07K 16/00** (2006.01)

(73) Patentanmelder:

F-STAR BIOTECHNOLOGISCHE  
FORSCHUNGS- UND  
ENTWICKLUNGSGES.M.B.H.  
A-1190 WIEN (AT)

(72) Erfinder:

HIMMLER GOTTFRIED DIPL.ING. DR.  
WIEN (AT)

### (54) VERFAHREN ZUR MANIPULATION VON IMMUNGLOBULINEN

- (57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Manipulation eines Immunglobulins, das mindestens eine Veränderung in jeder von mindestens zwei Strukturschleifenregionen in einer variablen Domäne des Immunglobulins umfasst und zur Bestimmung der Bindung des Immunglobulins an ein Epitop eines Antigens, wobei das unveränderte Immunglobulin im wesentlichen nicht an das Epitop bindet, welches die Schritte umfasst:
- Bereitstellung einer Nukleinsäure, die für ein Immunglobulin kodiert, welches mindestens zwei Strukturschleifenregionen umfasst,
  - Veränderung mindestens eines Nukleotidrests jedes der mindestens zwei Strukturschleifenregionen,
  - Übertragung der veränderten Nukleinsäure in ein Expressionssystem,
  - Expression des veränderten Immunglobulins,
  - Kontaktierung des exprimierten veränderten Immunglobulins mit einem Epitop und
  - Bestimmung, ob das veränderte Immunglobulin an das Epitop bindet.

Die Erfindung betrifft weiter Bibliotheken, die solche veränderten Immunglobuline enthalten.

AT 503 902 A1 2008-01-15

## Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Manipulation eines Immunglobulins, das mindestens eine Veränderung in jeder von mindestens zwei Strukturschleifenregionen in einer variablen Domäne des Immunglobulins umfasst und zur Bestimmung der Bindung des Immunglobulins an ein Epitop eines Antigens, wobei das unveränderte Immunglobulin im wesentlichen nicht an das Epitop bindet, welches die Schritte umfasst:

- Bereitstellung einer Nukleinsäure, die für ein Immunglobulin kodiert, welches mindestens zwei Strukturschleifenregionen umfasst,
- Veränderung mindestens eines Nukleotidrests jedes der mindestens zwei Strukturschleifenregionen,
- Übertragung der veränderten Nukleinsäure in ein Expressionssystem,
- Expression des veränderten Immunglobulins,
- Kontaktierung des exprimierten veränderten Immunglobulins mit einem Epitop und
- Bestimmung, ob das veränderte Immunglobulin an das Epitop bindet.

Die Erfindung betrifft weiter Bibliotheken, die solche veränderten Immunglobuline enthalten.

010590

## VERFAHREN ZUR MANIPULATION VON IMMUNGLOBULINEN

### Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Manipulation und Herstellung eines Moleküls, das ein Polypeptid einer modifizierten variablen Domäne eines Immunglobulins umfasst.

Das allgemeine Gebiet ist die Manipulation von Proteinen mit dem Ziel, diesen spezifische Bindungseigenschaften zu verleihen. Besonders bevorzugt handelt es sich bei den hier relevanten manipulierten Proteinen um Immunglobuline (Antikörper) und insbesondere einzelne variable Domänen oder Paare oder Kombinationen von einzelnen variablen Domänen von Immunglobulinen oder Kombinationen mit anderen Immunglobulindomänen. Die besonderen Bindungseigenschaften von Immunglobulinen sind bedeutende Merkmale, da sie die Wechselwirkung mit anderen Molekülen wie etwa Antigenen kontrollieren und Immunglobuline für diagnostische und therapeutische Anwendungen nützlich machen.

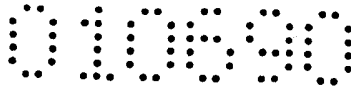
### Stand der Technik

#### Struktur von Antikörpern

Die Grundstruktur von Antikörpern ist bei zahlreichen Antikörperklassen und zahlreichen Spezies ähnlich und wird hier unter Verwendung des Beispiels eines intakten IgG1 Immunglobulins erläutert.

Zwei identische schwere (H) und zwei identische leichte (L) Ketten verbinden sich zur Bildung des Y-formigen Antikörpermoleküls. Die schweren Ketten haben jeweils vier Domänen. Die aminoterminalen variablen Domänen (VH) bilden die Spitzen des Y. Darauf folgen drei konstante Domänen:

**NACHGEREICHT**



- 2 -

CH1, CH2, und die carboxyterminale CH3 Domäne an der Basis des Y-Stamms. Ein kurzer Bereich, die Wechselregion, verbindet die variablen und konstanten Regionen der schweren Kette. Die Gelenkregion verbindet CH2 und CH3 (das Fc Fragment) mit dem Rest des Antikörpers (den Fab Fragmenten). Durch proteolytische Spaltung der Gelenkregion in einem intakten Antikörpermolekül können ein Fc und zwei identische Fab Fragmente gebildet werden. Die leichten Ketten bauen sich aus zwei Domänen, variabel (VL) und konstant (CL) auf, die durch eine Wechselregion getrennt sind.

Disulfidbrücken in der Gelenkregion verbinden die beiden schweren Ketten. Die leichten Ketten sind durch zusätzliche Disulfidbrücken an die schweren Ketten gekoppelt.

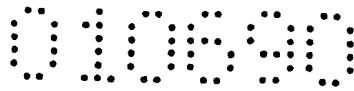
Die variablen Regionen sowohl der schweren als auch der leichten Ketten (VH) und (VL) befinden sich an den Spitzen des Y, wo sie zur Reaktion mit dem Antigen positioniert sind. Diese Spitze des Moleküls stellt die Seite dar, an der sich die N-Termini der Aminosäuresequenzen befinden.

Der Stamm des Y ragt gewissermaßen heraus zur wirksamen Vermittlung von Effektorfunktionen, wie etwa der Komplementaktivierung und der Wechselwirkung mit Fc Rezeptoren, oder ADCC und ADCP. Seine CH2 und CH3 Domänen beulen sich aus, um eine Wechselwirkung mit Effektormolekülen zu erleichtern. Der C-Terminus der Aminosäuresequenz befindet sich an der gegenüberliegenden Seite der Spitze, der als "Basis" des Y bezeichnet werden kann.

#### Variable Domänen (V Domänen) des Immunglobulins

Jede Domäne in einem Antikörpermolekül weist eine ähnliche Struktur von zwei Beta-Faltblättern auf, welche dicht gegeneinander in einem komprimierten antiparallelen Beta-Fass gepackt sind. Diese konservierte Struktur wird

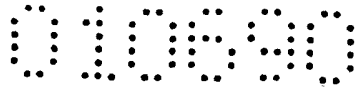
**NACHGEREICHT**



Immunglobulinfaltung genannt. Als Querverweis siehe Bork et al. (1994) J Mol Biol. 242: 309-320; Halaby et al. (1999) Protein Engineering 12: 563-571; Immunobiology 5. Auflage, Janeway, Charles A.; Travers, Paul; Walport, Mark; Shlomchik, Mark. New York und London: Garland Publishing; 2001.

Die Faltung der variablen Domänen weist 9 Beta-Stränge auf, die in zwei Faltblättern zu 4 und 5 Strängen angeordnet sind. Das 5-strängige Faltblatt ist zu dem 3-strängigen Faltblatt der konstanten Domänen homolog, enthält jedoch die zusätzlichen Stränge C' und C''. Die übrigen Stränge (A, B, C, D, E, F, G) weisen dieselbe Topologie und eine ähnliche Struktur auf, wie ihre Gegenspieler in den Immunglobulinfaltungen der konstanten Domäne. Eine Disulfidbrücke verbindet die Stränge B und F in gegenüberliegenden Faltblättern, wie in den konstanten Domänen. Die variablen Domänen sowohl der leichten als auch der schweren Immunglobulinketten enthalten drei hypervariable Schleifen, oder Antikörperbindungsstellen (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 Immunglobulinfaltung miteinander verbinden. Die Reste in den CDRs variieren von einem Immunglobulinmolekül zum nächsten, wodurch jedem Antikörper eine Antigenpezifität verliehen wird.

Die VL und VH Domänen an den Spitzen des Antikörpermoleküls sind dicht gepackt, so dass die 6 CDRs (3 auf jeder Domäne) zur Bildung einer Oberfläche (oder eines Hohlraums) zur antigenspezifischen Bindung zusammenwirken. Die natürliche Antigenbindungsstelle eines Antikörpers setzt sich somit aus den Schleifen, welche die Stränge B-C, C'-C'' und F-G der variablen Domäne der leichten Kette und den Strängen B-C, C'-C'' und F-G der variablen Domäne schweren Kette verbinden, zusammen.



### Gerüste für die Proteinmanipulation

Unter Verwendung der 3D Struktur eines Proteins als Hilfe für den Entwurf, wurden Aminosäurereste, die sich auf der Oberfläche vieler Proteine befinden randomisiert, wobei die Kernstruktur des Proteins als Gerüst verwendet wurde. Beispiele für diese Strategie werden in den folgenden Querverweisen beschrieben oder besprochen und hierin als Querverweis einbezogen: Nygren PA, Uhlen M., Curr Opin Struct Biol. (1997) 7: 463-9; Binz HK, Amstutz P, Kohl A, Stumpp MT, Briand C, Forrer P, Grutter MG, Plückthun A. Nat Biotechnol. (2004) 22: 575-82; Vogt M, Skerra A. Chembiochem. (2004) 5: 191-9; US 6,562,617; Hufton et al. FEBS Letters (2000) 475: 225; Binz et al. Nat Biotechnol. (2005) 23: 1257-68; Hosse et al. Protein Sci. (2006) 15: 14-27.

Das Grundprinzip dieser Technik beruht auf der Beobachtung, dass viele Proteine einen stabilen Kern aufweisen, der durch eine spezifische Anordnung von sekundären Strukturelementen wie etwa Beta-Faltblättern oder Alpha-Helices gebildet wird, die durch Strukturen wie etwa Schleifen, Windungen oder Zufallsknäuel miteinander verbunden sind. Typischerweise sind letztere drei Strukturelemente weniger bedeutend für die Gesamtstruktur des Proteins und Aminosäurereste in diesen strukturellen Elementen können oft ausgetauscht werden, ohne dass die allgemeine Faltung des Proteins zerstört wird. Natürlicherweise vorkommende Beispiele für dieses Entwurfsprinzip sind die CDRs von Immunglobulin-ähnlichen Domänen, wie sie in Antikörpern, T-Zellrezeptoren und weiteren Molekülen der Immunglobulin Superfamilie angetroffen werden. Künstliche Beispiele umfassen Lipocaline, Ankyrine, Kunitz-Domäne-Hemmer, Knottin und weitere Proteingerüste.

### Manipulation der CDR-Schleifen variabler Domänen von Immunglobulinen

Eine Vielzahl von Dokumenten im Stand der Technik zeigt, dass das Immunglobulin-ähnliche Gerüst zum Zweck der Manipulation der bestehenden Antigen- oder Liganden-Bindungsstelle verwendet wurde, wodurch neue Bindungseigenschaften eingeführt werden. Genauer wurden hauptsächlich die CDR Regionen zur Antigenbindung manipuliert, mit anderen Worten wurde im Fall der Immunglobulinfaltung die natürliche Antigen-Bindungsstelle verändert, um deren Bindungsaffinität oder -spezifität zu ändern. Es besteht eine Unmenge von Literatur, die unterschiedliche Formate solcher manipulierter Immunglobuline beschreibt, die regelmäßig in Form vollständiger Antikörper, von Fusionsprodukten und/oder Fragmenten wie etwa Einzelstrang Fv Fragmenten (scFv), Diabodies, Minibodies, Einzeldomänen oder Fab Fragmenten und ähnlichen exprimiert werden, entweder auf der Oberfläche von Phagenpartikeln oder anderer Viren und Zellen präsentiert oder löslich in zahlreichen prokaryotischen oder eukaryotischen Expressionssystemen exprimiert. Die Techniken werden zusammengefasst z.B. in Holliger & Hudson, Nat Biotechnol. (2005) 23: 1126-36 und Hoogenboom, Nat Biotechnol. (2005) 23: 1105-16.

### Gerüst- oder nicht-CDR-Regionen variabler Domänen von Immunglobulinen

Die CDR-Schleifen einer variablen Domäne eines Immunglobulins bestimmen die Antigenspezifität. Der Rest des Moleküls wird Gerüst ("framework", FR) genannt. Diese Gerüstregionen sind jedoch aus Beta-Strang- und Schleifenstrukturen zusammengesetzt.

Die Schleifen, die in einer nativen variablen Domäne eines

Immunglobulins nicht CDR-Domänen sind, weisen keine Antigen-bindende oder Epitop-bindende Spezifität auf, sondern tragen zur korrekten Gesamtfaltung der Immunglobulindomäne und somit auch zur korrekten Positionierung der CDRs und der Wechselwirkung zwischen den Domänen bei. Zum Zwecke dieser Erfindung werden diese Schleifen Strukturschleifen genannt.

Variable Domänen von Antikörpern im allgemeinen wurden aus sehr vielen verschiedenen Gründen manipuliert, wie etwa die Bildung verschiedener Antikörperformate, CDR Pfropfung (d.h. Pfropfung der Spezifität eines besonderen Antikörpers auf ein anderes Gerüst; z.B. Jones et al. Nature (1986) 321: 522-525; Kashmiri et al. Methods (2005) 36: 25-34), Veränderung der Oberfläche variabler Domänen, um diese löslicher und stabiler zu machen (z.B. Ewert et al. Methods (2004) 34: 184-99; Conrath et al. J Mol Biol. (2005) 350: 112-125), um diese in Monomere zu überführen (z.B. Dottorini et al. Biochemistry (2004) 43: 622-28) oder um die Wechselwirkung zwischen variablen Domänen zu studieren (z.B. Masuda et al. FEBS J. (2006) 273: 2184-94). Viele dieser Manipulationen umfassten Veränderungen in der Gerüstregion des Moleküls; einige Aminosäuremutationen wurden innerhalb der Strukturschleifen der variablen Domäne durchgeführt.

Der Einfluss entfernt liegender Gerüstregionen auf die CDR-Schleifen Positionierung wird aus Pfropfungsergebnissen offenbar, welche zeigen, dass eine Mutation der Gerüstregion häufig erforderlich ist, um nach dem Pfropfen von einem Gerüst auf ein anderes die Antigenbindung wieder zu erlangen (z.B. Foote & Winter (1992) J Mol Biol. 224: 487-499; Kettleborough et al. Protein Eng. (1991) 4: 773-783; Wu et al. J Mol Biol. (1999) 294: 151-162).

Simon & Rajwesky (Protein Sci. (1992) 5: 229-234) haben die

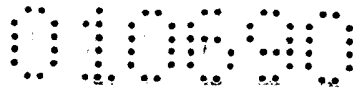


Auswirkungen einer 4 Reste langen Insertion in die FR3 Schleife der variablen Region der schweren Kette aus dem anti-NP Antikörper B1-8 studiert. Die Insertionsmutante wurde als sekretierter Antikörper ohne größere Defekte in der Biosynthese erhalten, was darauf hinweist, dass variable Domänen von Antikörpern Längenveränderungen nicht nur in Komplementarität-bestimmenden Regionen (CDRs) sondern auch in Schleifen der Gerüstregion (FR) ausgleichen können. In diesem Fall wurde die ursprüngliche, durch die CDR-Schleifen gebildete Antigen-Bindungsstelle von der Modifikation in einer benachbarten Strukturschleife nicht beeinträchtigt.

#### Pfropfung von CDR-Schleifen auf strukturelle Schleifenregionen

EP0640130B1 beschreibt chimäre Proteineanaloga (chi-Proteine) der Immunglobulin-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 Immunglobulin-Superfamilie von Molekülen stehen, einschließlich Immunglobuline, 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 gespleist ist.

Jede Ligandenbindungsstelle des chi-Proteins umfasst somit eine CDR-ähnliche Region, die sich von Molekülen der Immunglobulinsuperfamilie herleitet. Beispielsweise umfasst die Ligandenbindungsstelle die CDRs, die sich von einem



Immunglobulinmolekül herleiten, dessen Ligand ein Antigen ist.

EP0640130B1 lehrt somit, wie CDR-ähnliche Regionen mit einer gegebenen Spezifität aus einem Molekül der Immunglobulin-Superfamilie in die Strukturschleifen einer variablen Domäne gespleist werden. Es wird beansprucht, dass funktionsfähige bispezifische Antikörper durch diese Technik hergestellt werden können. Diese Technik erfordert, 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-Azobenzol arsonat) 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.

#### Pfropfung von Peptiden in die Strukturschleifenregion

WO0244215A2 beschreibt Bindungsmoleküle, die eine spezifische Zielbindungsstelle und ein Fc Effektorpeptid umfassen. Das Fc Effektorpeptid ist ein Peptid von bis zu 100 Aminosäuren, welches mit Effektormolekülen in Wechselwirkung tritt. Das Effektorpeptid kann z.B. in die Schleifenregionen eines Antikörpers eingefügt werden, vorausgesetzt, dass die Fähigkeit ein Antigen zu binden nicht nachteilig beeinträchtigt wird. Die Einführung eines Effektorpeptids in eine nicht-CDR-Schleife einer CH1-Domäne eines Immunglobulinfragments wird veranschaulicht. Dieselbe Insertion wird nicht für eine variable Domäne beschrieben. Jedes Peptid, welches in eine nicht-CDR-Schleife gemäß dieser Offenbarung gepfropft wird, hat eine hohe Chance inaktiv zu sein, auf Grund der unterschiedlichen strukturellen Umgebung, in welche es eingesetzt wurde. Zusätzlich kann es schwierig sein, die CDR-Schleifenkonformation beizubehalten, wenn ein Peptid in die Strukturschleife einer variablen Domäne gepfropft wird. Folgerichtig wird nicht beschrieben, dass ein Effektorpeptid ohne Verlust entweder der Antigenbindung oder der Effektormolekülbindung in eine variable Domäne gepfropft werden kann.

Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung Immunglobuline und variable Immunglobulindomänen mit verbesserten Antigenbindungseigenschaften bereit zu stellen sowie Verfahren zur Manipulation und Herstellung von Immunglobulinen mit den verbesserten variablen Domänen.

### Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Manipulation eines Immunglobulins, das mindestens eine Veränderung in jeder von mindestens zwei Strukturschleifenregionen in einer variablen Domäne des Immunglobulins umfasst und die Bestimmung der Bindung des Immunglobulins an ein Epitop eines Antigens, wobei das unveränderte Immunglobulin im wesentlichen nicht an das Epitop bindet, welches die Schritte umfasst:

- Bereitstellung einer Nukleinsäure, die für ein Immunglobulin kodiert, welches mindestens zwei Strukturschleifenregionen umfasst,
- Veränderung mindestens eines Nukleotidrests jedes der mindestens zwei Strukturschleifenregionen,
- Übertragung der veränderten Nukleinsäure in ein Expressionssystem,
- Expression des veränderten Immunglobulins,
- Kontaktierung des exprimierten veränderten Immunglobulins mit einem Epitop und
- Bestimmung, ob das veränderte Immunglobulin an das Epitop bindet.

Um die Defizite des Standes der Technik, wie in WO0244215A2 und EP0640130B1 beschrieben, bei der Manipulation einer Bindungsstelle in eine Strukturschleifenregion einer variablen Domäne eines Antikörpers zu überwinden, stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zur Auswahl der spezifischen Bindung eines Polypeptids (d.h. ein Peptid einer variablen Domäne, das veränderte Strukturschleifenregionen umfasst) in dessen natürlichem Umgebung (d.h. einer variablen Domäne eines Antikörpers) bereit. Um die Anzahl der potentiellen Strukturen von Varianten von Immunglobulindomänen zu erhöhen, die zur Antigenbindung ausgewählt werden können, werden er-

findungsgemäß mindestens zwei Strukturschleifenregionen verändert. Es ist somit möglich mit minimaler Störung der gesamten Domänenstruktur viele verschiedene Veränderungen einzuführen und auf diese zu selektieren. Ein weiterer Vorteil der Veränderung von mindestens zwei Schleifenregionen ist der vergrößerte Oberflächenbereich, der potentiell in der Lage ist, mit einem spezifischen Bindungspartner in Wechselwirkung zu treten. Die auf diese Weise veränderten variablen Domänen von Immunglobulinen werden auf spezifische Funktionen oder Bindung selektiert. Die Erfindung ermöglicht es, eine veränderte variable Domäne eines Immunglobulins und ein verändertes Immunglobulin auszuführen, das mit dessen veränderten Strukturschleifenregionen durch Hochaffinitätsbindung und/oder mit hoher Spezifität an einen Bindungspartner bindet. Das Verfahren gestattet die Auswahl spezifischer Bindungsmoleküle mit minimalen Veränderungen und ohne Zerstörung der Gesamtstruktur der variablen Domäne des Immunglobulins.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Manipulation einer variablen Domäne eines Immunglobulins sowie eines Immunglobulins, das eine solche Domäne enthält, welches spezifisch an ein Epitop eines Antigens bindet.

Speziell umfasst das erfindungsgemäße Verfahren die Schritte:

- Bereitstellung einer Nukleinsäure, welche für ein Immunglobulin kodiert, das spezifisch an mindestens ein erstes Epitop bindet und mindestens zwei Strukturschleifenregionen umfasst,
- Veränderung mindestens eines Nukleotidrests jedes der mindestens zwei Strukturschleifenregionen, die von der Nukleinsäure kodiert werden,
- Übertragung der veränderten Nukleinsäure in ein Expressionssystem,
- Expression des veränderten Immunglobulins,

- Kontaktierung der exprimierten veränderten variablen Domäne des Immunglobulins mit dem mindestens einen zweiten Epitop und
- Bestimmung, ob die veränderte variable Domäne des Immunglobulins spezifisch an das zweite Epitop bindet.

Dieses Verfahren ist vorzugsweise bei Peptiden variabler Domänen von Immunglobulinen anwendbar. Besonders bevorzugt betrifft das Verfahren gemäß dieser Ausführungsform der Erfindung Immunglobuline, die an das erste Epitop mit ihren CDR-Regionen binden.

Das erfindungsgemäße Verfahren bezieht sich ferner auf mindestens eine Veränderung in jeder von mindestens zwei Strukturschleifenregionen der variablen Domäne des Immunglobulins und auf die Bestimmung der spezifischen Bindung der mindestens zwei Strukturschleifenregionen an mindestens ein Antigen, wobei die variable Domäne des Immunglobulins, welche eine unveränderte Strukturschleifenregion enthält, nicht spezifisch an ein solches Antigen bindet.

Die Bezeichnung "Immunglobulin" wie hierin verwendet umfasst Immunglobuline oder Teile oder Fragmente von Immunglobulinen. Er umfasst somit ein "Peptid einer variablen Domäne eines Immunglobulins", das erfindungsgemäß verändert werden soll (wie hierin verwendet sind die Bezeichnung Immunglobulin und Antikörper austauschbar) sowie variable Domänen von Immunglobulinen oder Teile davon, die eine Strukturschleife enthalten, sowie Strukturschleifen solcher Domänen. Die Immunglobuline können als isolierte Peptide oder als Kombinationsmoleküle mit anderen Peptiden verwendet werden. In einigen Fällen ist es vorzuziehen, eine definierte veränderte Strukturschleife oder eine Strukturschleifenregion oder Teile davon als isolierte Moleküle für Bindungs- oder Kombinationsabsichten zu verwenden. Die "variable Domäne

eines Immunglobulins" wie hierin definiert enthält solche Peptide oder Polypeptide der variablen Domäne eines Immunglobulins, welche nach Veränderung und Manipulation spezifische Bindungseigenschaften aufweisen können. Die Peptide sind zu Sequenzen von variablen Domänen eines Immunglobulins homolog und sind vorzugsweise mindestens 5 Aminosäuren lang, besonders bevorzugt mindestens 10 oder sogar mindestens 50 oder 100 Aminosäuren lang und bilden mindestens teilweise die Strukturschleifenregion oder die nicht-CDR-Region der variablen Domäne. Vorzugsweise schließen die Peptide solche Insertionen aus, die als nicht funktionsfähige Aminosäuren angesehen werden, hybride oder chimäre CDR-Regionen oder CDR-ähnliche Regionen und/oder kanonische Strukturen von CDR-Regionen. Die Bindungseigenschaften beziehen sich auf spezifische Epitopbindung, Affinität und Avidität.

Das erfindungsgemäß manipulierte Immunglobulin kann mon- oder multispezifische oder mono- oder multivalente Bindungseigenschaften zeigen, mindestens zwei, vorzugsweise mindestens drei spezifische Bindungsstellen für Epitope von biologischen oder künstlichen Molekülen, z.B. Antigenen. Die Bindung der erfindungsgemäßen Immunglobuline erfolgt entweder durch CDR-Regionen, wenn das Immunglobulin solch eine CDR-Region enthält, oder durch eine Bindungsstelle, die durch Veränderung mindestens zweier Strukturschleifen gebildet wird. Diese Strukturschleifen befinden sich entweder auf einer oder mindestens zwei variablen Domänen, die ein oder mehrere veränderte Strukturschleifen aufweisen. Somit enthält ein erfindungsgemäßes Immunglobulin mindestens zwei Veränderungen in den Strukturschleifen der variablen Domänen entweder durch mindestens eine Veränderung mindestens zweier variabler Domänen oder mindestens zwei Veränderungen mindestens einer variablen Domäne. Das bevorzugte veränderte Immunglobulin weist somit eine Bindungsstelle entweder durch Veränderung der Primärstruktur des Proteins oder durch Veränderung der

Tertiärstruktur auf, um eine konformationsspezifische Bindungsstelle zu erhalten.

Erfindungsgemäße Immunglobuline oder variable Domänen von Immunglobulinen können vollständige Antikörpermoleküle oder Teile von Antikörpern wie etwa IgG, IgA, IgM, IgD, IgE und ähnliches sein. Bei den Immunglobulinen oder den variablen Domänen von Immunglobulinen der Erfindung kann es sich auch um ein funktionsfähiges Antikörperfragment handeln, wie etwa Fab, Fab<sub>2</sub>, scFv, Fv oder Teile davon oder weitere Derivate oder Kombinationen der Immunglobuline wie etwa Minibodies, Domänen der schweren und leichten Ketten der variablen Region (wie etwa Fd, VL, einschließlich Vlambda, Vkappa, VH, VHH) sowie Minidomänen, die aus zwei Beta-Strängen einer Immunglobulindomäne bestehen, die durch mindestens zwei Strukturschleifen verbunden sind (siehe beispielsweise Laffly et al. (2005) Hum Antibodies 2005 14: 33-55), als isolierte Domänen oder im Zusammenhang mit natürlicherweise verbundenen Molekülen.

Das erfindungsgemäß veränderte Immunglobulin ist möglicherweise ferner mit einem oder mehreren veränderten Immunglobulinen oder mit unveränderten Immunglobulinen oder Teilen davon kombiniert, um ein KombinationsImmunglobulin zu erhalten. Kombinationen werden vorzugsweise durch Rekombinationstechniken erhalten, aber auch durch Verbindung durch Adsorption, elektrostatische Wechselwirkungen oder ähnliche oder weiterhin durch chemische Bindung mit oder ohne einen Linker. Die bevorzugte Linkersequenz ist entweder eine natürliche Linkersequenz oder eine funktionell geeignete künstliche Sequenz.

Es versteht sich dass die Bezeichnung "Immunglobulin", "Peptid der variablen Domäne eines Immunglobulins" sowie "variable Domäne eines Immunglobulins" ebenso Derivate umfasst. Ein Derivat ist ein beliebiger Anteil oder eine



Kombination von einem oder mehreren Immunglobulinen und/oder ein Fusionsprotein, bei dem jede beliebige Domäne oder Minidomäne des erfindungsgemäß erhaltenen Immunglobulins an jeder beliebigen Position mit einem oder mehreren Peptiden oder Proteinen (einschließlich aber nicht beschränkt auf weitere Immunglobuline, Immunglobulindomänen, Fc Anteile, Liganden, Gerüstproteine, Enzyme, Toxine, Serumproteine und ähnliche) kombiniert oder fusioniert sein kann. Ein Derivat des Immunglobulins der Erfindung kann auch durch Bindung des unveränderten oder veränderten Immunglobulins oder der variablen Domäne des Immunglobulins der Erfindung mit anderen Substanzen durch verschiedene chemische Techniken wie etwa kovalente Kopplung, elektrostatische Wechselwirkung, Disulfidbindung etc. erhalten werden. Die anderen an das Immunglobulin oder die variable Domäne des Immunglobulins 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 Immunglobulin oder eine variable Domäne eines Immunglobulins 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, typischerweise vor oder nach der Veränderung auf solche Weise fusioniert, dass sie Teile von größeren Antikörperstrukturen oder vollständigen Antikörpermolekülen oder Teilen davon sind. Erfindungsgemäße Immunglobuline umfassen somit auch Fab Fragmente, Fv Fragmente, einzelkettige Antikörper, insbesondere einzelkettige Fv Fragmente, bi- oder multispezifische scFv, Diabodies, Multibodies, Multivalente oder Multimere von Immunglobulindomänen und weitere. Es ist möglich die manipulierten Proteine zur Herstellung von Molekülen zu

verwenden, die monospezifisch, bispezifisch, trispezifisch sind und die sogar mehr Spezifitäten tragen können. Es wird durch die Erfindung ermöglicht, gleichzeitig die Valenz der Bindung zu kontrollieren und vorauszuwählen, gemäß den Anforderungen der geplanten Verwendung dieser Moleküle.

Erfindungsgemäß können eine oder mehrere Bindungsregionen an Antigene oder Antigenbindungsstellen an ein oder mehrere Antigene in die Strukturschleifenregion einer gegebenen Struktur einer variablen Domäne eines Antikörpers eingeführt werden. Die Antigene können natürlicherweise vorkommende Moleküle oder chemisch synthetisierte Moleküle oder rekombinante Moleküle sein, entweder in Lösung oder in Suspension, z.B. auf oder in Partikeln wie etwa Festphasen, auf oder in Zellen oder auf viralen Oberflächen befindlich. Erfindungsgemäß wurde in überraschender Weise die Bindung eines Immunglobulins an ein Antigen erzielt, selbst wenn das Antigen noch an Moleküle oder Strukturen geheftet oder gebunden ist, welche seine Bindung behindern würden. Durch Verwendung des Zielantigens in dessen ausgewähltem oder natürlichen Zusammenhang und Struktur zur Auswahl des veränderten und entworfenen Immunglobulins ist es möglich, solche veränderten Immunglobuline zu erkennen und zu erhalten, die am besten zur diagnostischen und therapeutischen Verwendung geeignet sind.

Die Bezeichnung "Antigen" wie hierin verwendet umfasst Moleküle ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Allergenen, tumor-assoziierten Antigenen, Selbstantigenen einschließlich Zelloberflächenrezeptoren, Enzymen, Fc-Rezeptoren, Proteinen des Komplementsystems, Serum-molekülen, bakteriellen Antigenen, pilzlichen Antigenen, Einzellerantigenen und viralen Antigenen, auch Molekülen der übertragbaren spongiformen Enzephalitis (BSE) wie etwa Prionen, infektiös oder nicht sowie Markern oder Molekülen, die in Verbindung zur Alzheimer Krankheit stehen. Antigene können durch die erfindungsgemäß manipulierten

Immunglobuline oder variablen Domänen der Immunglobuline durch mindestens einen Teil einer veränderten Strukturschleife angesteuert und gebunden werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform bindet das Immunglobulin mit dessen veränderten Strukturschleifen spezifisch an mindestens zwei solcher Epitope, die identisch oder voneinander verschieden sind, entweder desselben Antigens oder verschiedener Antigene.

Beispielsweise nimmt das erfindungsgemäße Verfahren Bezug auf die Manipulation eines Immunglobulins oder einer variablen Domäne eines Immunglobulins, welche spezifisch an mindestens ein erstes Epitop bindet und mindestens eine Veränderung in jeder von mindestens zwei Strukturschleifenregionen des Immunglobulins umfasst und die Bestimmung der spezifischen Bindung der mindestens zwei Schleifenregionen an mindestens ein zweites Epitop, wobei das Epitop ausgewählt ist aus der Gruppe der oben erwähnten Antigene, wobei die unveränderte Strukturschleifenregion (nicht-CDR Region) nicht spezifisch an das mindestens eine zweite Epitop bindet.

Die erfindungsgemäß verwendete Bezeichnung Antigen soll insbesondere sämtliche Antigene und Zielmoleküle umfassen, die von einer Bindungsstelle eines Immunglobulins oder einer Antikörperstruktur als gesamtes Zielmolekül oder als Fragment eines solchen Moleküls (besonders Unterstrukturen von Zielmolekülen, im allgemeinen als "Epitope" bezeichnet) erkannt werden können.

Bevorzugte von den erfindungsgemäßen Immunglobulinen angesteuerte Antigene sind solche Antigene oder Moleküle, die bereits nachweislich immunogen sind oder immunogen sein können, von Faktoren der Immunantwort gebunden oder anderweitig immunologisch oder therapeutisch relevant sind, besonders solche, für die eine klinische Wirksamkeit

getestet wurde.

Die Bezeichnung "Epitop" wie hierin erfindungsgemäß verwendet bedeutet eine molekulare Struktur, die einen spezifischen Bindungspartner vollständig bilden kann oder ein Teil eines spezifischen Bindungspartners an eine Bindungsstelle eines Immunglobulins der vorliegenden Erfindung sein kann. Die Bezeichnung Epitop kann sich auch auf Haptene beziehen. Chemisch kann ein Epitop entweder aus einem Kohlenhydrat, einem Peptid, einer Fettsäure, einer organischen, biochemischen oder anorganischen Substanz oder Derivaten davon oder jeglicher 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 der Länge des Peptids, das beinahe die volle Länge der Polypeptidsequenz eines Proteins 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 wurden und die Aminosäuren grenzen nicht notwendigerweise aneinander in der linearen Sequenz 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 Anteil von therapeutisch relevanten Molekülen sein, d.h. Moleküle, die von der spezifischen Bindungsdomäne angesteuert werden können, was den Verlauf der Krankheit

ändert.

Neben den Antigenbindungsstellen des erfindungsgemäß manipulierten Immunglobulins können weitere Bindungsfähigkeiten neben den oder in die Strukturschleifenregionen variabler Domänen eingeführt werden, z. B. Bindungsfähigkeiten für weitere Antigene, kleine Moleküle, für Medikamente oder Enzyme, katalytische Stellen von Enzymen oder Enzymsubstraten oder die Bindung an ein Analoges eines Übergangszustandes eines Enzymsubstrats.

Vorzugsweise ist die neue Antigenbindungsstelle in den Strukturschleifen der unveränderten variablen Domäne des Immunglobulins fremd. Somit sind fremde Zielmoleküle wie Effektormoleküle, Serumproteine oder Fc-Rezeptoren oder Zelloberflächenrezeptoren als Antigene oder Bindungsmoleküle der Spezifität der erfindungsgemäßen Immunglobuline 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 die variable Domäne des spezifizierten Antikörpers somit an dessen besonderes "Zielmolekül" und bindet nicht in maßgeblicher Menge an andere in einer Probe vorhandenen Moleküle. Die spezifische Bindung bedeutet, dass die Bindung selektiv hinsichtlich der Zielidentität, nach Wahl hoher, mittlerer oder niedriger Bindungsaffinität oder -avidität ist. Eine selektive Bindung wird für gewöhnlich erzielt, wenn die Bindungskonstante oder die Bindungsdynamik mindestens 10 fach unterschiedlich sind.

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.

Eine erfindungsgemäße "Strukturschleife" oder "nicht CDR-Schleife" muss auf folgende Weise verstanden werden: Immunglobuline 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 im wesentlichen zur Spezifität des Antikörpers bei, d.h. der Bindung an ein Antigen. Diese Schleifen werden CDR-Schleifen genannt. Alle weiteren Schleifen von variablen Domänen eines Antikörpers 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.

Sämtliche Nummerierungen der Aminosäuresequenzen der Immunglobuline erfolgen gemäß des IMGT Nummerierungsschemas (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system@imgt.cines.fr; <http://imgt.cines.fr>; Lefranc et al., 1999, Nucleic Acids Res. 27: 209-212; Ruiz et al., 2000, Nucleic Acids Res. 28: 219-221; Lefranc et al., 2001, Nucleic Acids Res. 29: 207-209; Lefranc et al., 2003, Nucleic Acids Res. 31: 307-310; Lefranc et al., 2005, Dev Comp Immunol. 29: 185-203).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stammt die variable Domäne des Immunglobulins aus

010890

- 21 -

Mensch, Kamel, Kaninchen, Huhn, Ratte, Hund, Pferd, Schaf oder Maus.

Da das veränderte Immunglobulin zu unterschiedlichen Zwecken verwendet werden kann, insbesondere in pharmazeutischen Zusammensetzungen, stammt das Immunglobulin vorzugsweise aus Mensch, Kamel oder Maus. Selbstverständlich kann das veränderte Immunglobulin auch ein humanisiertes oder chimäres Immunglobulin sein. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stammt die veränderte variable Domäne aus dem Menschen oder ist eine humanisierte Version einer variablen Domäne einer beliebigen Art.

Eine humanisierte variable Domäne eines Immunglobulins weist mindestens etwa 50 % Identität der Aminosäuresequenz, vorzugsweise mindestens etwa 55 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 60 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 65 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 70 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 75 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 80 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 85 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 90 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 95 % Identität der Aminosäuresequenz mit der Sequenz einer variablen Domäne eines nativen menschlichen Antikörpers auf.

Eine humanisierte variable Domäne eines Immunglobulins weist ferner mindestens etwa 50 % Identität der Aminosäuresequenz, vorzugsweise mindestens etwa 55 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 60 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 65 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 70 % Identität der

NACHGEREICHT

Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 75 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 80 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 85 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 90 % Identität der Aminosäuresequenz, insbesondere mindestens etwa 95 % Identität der Aminosäuresequenz auf, wenn sämtliche an der Oberfläche zugänglichen Aminosäuren mit den an der Oberfläche zugänglichen Aminosäuren einer Sequenz einer variablen Domäne eines nativen menschlichen Antikörpers verglichen werden.

Die bevorzugte Homologie oder die Sequenzidentitäten beziehen sich speziell auf die Sequenzen der Gerüstregion.

Die bevorzugte erfindungsgemäße variable Domäne ist ausgewählt aus der Gruppe von VH, VL, einschließlich V $\kappa$  und V $\lambda$ , VHH und Kombinationen davon. Es zeigte sich, dass diese Veränderungen von Vorteil sind, wenn sie in die Schleifenregion einer VH, einer V $\kappa$ , einer V $\lambda$  oder einer VHH eingeführt werden, und die veränderten Schleifenregionen mindestens eine Veränderung in den Aminosäuren 7 bis 21, Aminosäuren 25 bis 39, Aminosäuren 41 bis 81, Aminosäuren 83 bis 85, Aminosäuren 89 bis 103 oder Aminosäuren 106 bis 117 enthalten.

Die erfindungsgemäß veränderten Strukturschleifenregionen des Immunglobulins oder der variablen Domäne des Immunglobulins menschlichen oder humanisierten Ursprungs werden vorzugsweise ausgewählt aus den Strukturschleifen, welche die Aminosäuren 8 bis 20, Aminosäuren 44 bis 50, Aminosäuren 67 bis 76 und Aminosäuren 89 bis 101, insbesondere die Aminosäurepositionen 12 bis 17, Aminosäurepositionen 45 bis 50, Aminosäurepositionen 69 bis 75 und Aminosäurepositionen 93 bis 98 umfassen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird eine



Veränderung in der Strukturschleifenregion, welche die Aminosäuren 93 bis 98 umfasst, mit einer Veränderung in der Strukturschleifenregion, welche die Aminosäuren 8 bis 20 umfasst, kombiniert.

Die oben angegebenen Aminosäureregionen der jeweiligen Immunglobuline, umfassen zu verändernde Schleifenregionen.

Vorzugsweise wird eine Veränderung in der Strukturschleifenregion, welche die Aminosäuren 93 bis 98 umfasst, mit einer Veränderung in einer oder mehreren der anderen Strukturschleifen kombiniert.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Veränderung in der Strukturschleifenregion, welche die Aminosäuren 93 bis 98 umfasst, mit einer Veränderung in der Strukturschleifenregion, welche die Aminosäuren 69 bis 75 umfasst, kombiniert.

Am meisten bevorzugt enthält jede der Strukturschleifenregionen, welche die Aminosäuren 93 bis 98, Aminosäuren 69 bis 75 und Aminosäuren 8 bis 20 umfassen, mindestens eine Aminosäurenveränderung.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält jede der Strukturschleifenregionen, welche die Aminosäuren 93 bis 98, Aminosäuren 69 bis 75, Aminosäuren 44 bis 50 und Aminosäuren 8 bis 20 umfassen, mindestens eine Aminosäurenveränderung.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen die Strukturschleifenregionen eines Immunglobulins oder die variable Domäne des Immunglobulins aus der Maus, z.B. ein VH, die Aminosäuren 6 bis 20, Aminosäuren 44 bis 52, Aminosäuren 67 bis 76 und Aminosäuren 92 bis 101.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen die Strukturschleifenregionen eines Immunglobulins oder die variable Domäne des Immunglobulins aus dem Kamel, z.B. ein VHH, die Aminosäuren 7 bis 18, Aminosäuren 43 bis 55, Aminosäuren 68 bis 75 und Aminosäuren 91 bis 101.

Die variablen Domänen aus dem Kamel oder humanisierte Varianten aus dem Kamel weisen den Vorteil auf, dass sie in einfacher Weise mit anderen variablen Domänen, beispielsweise mit anderen VHH aus dem Kamel, verändert oder nativ, kombiniert werden könnten. Die mögliche Kombination von VHH aus dem Kamel bildet die Grundlage für multivalente Immunglobuline. Somit sind erfindungsgemäß spezifisch veränderte variable Domänen aus dem Kamel multivalente Kombinationen, vorzugsweise mit mindestens 3, insbesondere mit mindestens 4 oder 5 Valenzen oder VHHs.

Vorzugsweise werden die neuen Antigen-Bindungsstellen in den Strukturschleifen in das durch die ausgewählte Nukleinsäure kodierte Immunglobulin durch Substitution, Deletion und/oder Insertion mindestens einer Nukleinsäure eingeführt.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung resultiert die Veränderung mindestens eines Nukleotids in jeder von mindestens zwei Strukturschleifenregionen in einer Substitution, Deletion und/oder Insertion im Immunglobulin oder in der variablen Domäne des Immunglobulins, welche durch die Nukleinsäure kodiert wird.

Die Veränderung der mindestens zwei Schleifenregionen der variablen Domäne eines Immunglobulins oder Antikörpers kann in einer Substitution, Deletion und/oder Insertion von 2 oder mehreren Aminosäuren, vorzugsweise Punktmutationen, der Veränderung von Aminosäuren gesamter Schleifen, besonders bevorzugt der Veränderung von mindestens 2, 3, 4,

5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 bis zu 30 Aminosäuren resultieren. Die maximale Anzahl von Aminosäuren, die in die Strukturschleifenregion eines Immunglobulins oder einer variablen Domäne eines Immunglobulins eingesetzt wird sollte jedoch in besonderen Fällen die Anzahl von 30, vorzugsweise 25, besonders bevorzugt 20 Aminosäuren nicht überschreiten.

Ein bevorzugtes Verfahren zur Einführung von Veränderungen ist die ortsgerichtete Zufallsmutation. Durch dieses Verfahren werden zwei oder mehrere spezifische Aminosäurereste der Schleifen ausgetauscht oder eingeführt unter Verwendung von zufällig erzeugten Insertionen in diese Strukturschleifen. Alternativ wird die Verwendung von kombinatorischen Ansätzen bevorzugt.

Die mindestens zwei Schleifenregionen werden vorzugsweise mutiert oder verändert durch Zufalls-, Semi-Zufalls- oder insbesondere ortsgerichtete Zufallsmutageneseverfahren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden mindestens drei Strukturschleifenregionen eines Immunglobulins oder einer variablen Domäne eines Immunglobulins durch Zufalls-, Semi-Zufalls- oder insbesondere ortsgerichtete Zufallsmutageneseverfahren mutiert oder verändert.

Diese Verfahren können zur Ausführung von Veränderungen an gewünschten Stellen des Immunglobulins oder der variablen Domäne eines Immunglobulins der vorliegenden Erfindung verwendet werden. In diesen Fällen werden die Stellen zufällig gewählt oder es werden Aminosäureänderungen unter Verwendung von bestimmten Regeln ausgeführt. Beispielsweise können bestimmte Reste zu beliebigen Aminosäuren mutiert werden, wohingegen andere Reste zu einem begrenzten Satz von Aminosäuren mutiert werden können. Dies kann durch schrittweises Vorgehen in alternierenden Zyklen von

Mutation und Selektion oder gleichzeitig erreicht werden.

Ein erfindungsgemäß bevorzugtes Verfahren betrifft ein zufällig verändertes Nukleinsäuremolekül, das für ein Immunglobulin, eine variable Domäne eines Immunglobulins oder eines Teils davon kodiert, welches mindestens eine Nukleotidwiederholungseinheit innerhalb einer Strukturschleifenregion umfaßt, 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 einer beliebigen 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 Proteinsequenzen variabler Domänen von Antikörpern eingeschätzt werden und durch Analogie oder Homologie für solche Aminosäuren, für die keine experi-

mentell bestimmte Struktur erhältlich ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfassen die in die mindestens zwei Strukturschleifen eingeführten Veränderungen mindestens 1, 2, 3, 4, 5, 6 fremde Aminosäuren oder Aminosäuren, die nicht natürlicherweise an der jeweiligen Stelle der Strukturschleife des nicht veränderten Immunglobulins oder der variablen Domäne des Immunglobulins 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-Conquuy 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).

Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wird ein mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliches Immunglobulin zur Herstellung einer Proteinbibliothek von Immunglobulinen verwendet.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Bibliothek von Proteinvarianten, die Immunglobuline oder variable Domänen von Immunglobulinen der Erfindung umfasst, als Selektionspool verwendet, wobei die Veränderungen mindestens eine, besonders bevorzugt mindestens zwei Aminosäuren pro veränderter Strukturschleife aus der Gruppe der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Histidin, Isoleucin, Serin, Methionin, Alanin und Asparagin enthalten oder einführen.

Es zeigte sich, dass erfindungsgemäß eine Polypeptidvariante einer variablen Domäne mit spezifischen Mutationen

bereitgestellt werden kann, die für die nativen Polypeptide fremd sind. Keine der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Histidin, Isoleucin, Serin, Methionin, Alanin und Asparagin ist in den Strukturschleifen menschlicher nativer Immunglobuline vorhanden, womit sie als "fremd" angesehen werden. Eine erfindungsgemäße Polypeptidvariante kann mindestens zwei der fremden Aminosäuren in den Strukturschleifen enthalten, durch Veränderung mindestens einer Strukturschleife und zur Bildung einer Bindungsstelle.

Wenn das veränderte Immunglobulin oder die variable Domäne des Immunglobulins aus dem Menschen stammt oder eine humanisierte variable Domäne eines Immunglobulins ist, sind bevorzugte Veränderungen die Aufnahme mindestens eines Tyrosins in eine der Positionen 12 bis 17, 45 bis 50, 69 bis 75 und 93 bis 98 und/oder mindestens eines Tryptophans in eine der Positionen 12 bis 17, 45 bis 50, 69, 71 bis 75, 93 bis 94 und 96 bis 98 und/oder mindestens eines Histidins in eine der Positionen 12 bis 17, 46, 47, 49, 50, 69 bis 74 und 93 bis 98 und/oder mindestens eines Asparagins in eine der Positionen 12 bis 17, 45 bis 47, 49, 50, 70 bis 73, 75, 94 bis 96 und 98 und/oder mindestens eines Methionins in eine der Positionen 12 bis 17, 46 bis 50, 69 bis 71, 73 bis 75, 93, 95, 96 und 98 und/oder mindestens eines Serins in eine der Positionen 13, 71, 75, 95, 95 und 98 und/oder mindestens eines Isoleucins in eine der Positionen 12, 14 bis 17, 45 bis 50, 69, 70, 72 bis 75 93 und 96 bis 98 und/oder mindestens eines Phenylalanins in eine der Positionen 15, 46, 48, 70 bis 73, 75, 93, 95 und 98.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden mindestens zwei Aminosäurereste an den Positionen 15 bis 17, 29 bis 34, 85.4 bis 85.3, 92 bis 94, 97 bis 98 und/oder 108 bis 110 eines menschlichen oder humanisierten Einzeldomänenantikörpers verändert.

Die Nukleinsäuremoleküle, welche für die veränderten Immunglobuline oder variablen Domänen der Immunglobuline kodieren (wobei davon über die gesamte Beschreibung umfasst sind: Immunglobuline und Immunglobulinfragmente, die eine veränderte variable Domäne eines Immunglobulins umfassen), können in Wirtszellen kloniert, exprimiert und auf ihre Bindungsspezifitäten hin getestet werden. 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, welche für die veränderten Immunglobuline oder variablen Domänen von Immunglobulinen der vorliegenden Erfindung kodieren, können in einen Expressionsvektor eingeführt werden, um die Immunglobuline zu exprimieren. Expressionsvektoren umfassen typischerweise ein Immunglobulin, 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 Immunglobuline der vorliegenden Erfindung können durch Kultivierung einer mit einer Nukleinsäure, vorzugsweise einem Expressionsvektor, der eine Nukleinsäure enthält, die für die veränderten Immunglobuline kodiert, transformierten Wirtszelle unter den geeigneten Bedingungen zur Induktion oder Hervorrufung der Expression des veränderten Immunglobulins 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 Immunglobuline eingesetzt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die veränderten Immunglobuline nach der Expression aufgereinigt oder isoliert. Veränderte Immunglobuline 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 Antikörper unter Verwendung eines Glutathionharzes aufgereinigt werden, wenn eine GST-Fusion eingesetzt wird, einer  $\text{Ni}^{2+}$ -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 die erfindungsgemäßen veränderten Immunglobuline 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 Immunglobuline 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 fluoreszenten oder kalorimetrischen Farbstoff oder einem luminogenen Molekül.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die funktionellen und/oder biophysikalischen Eigenschaften der Immunglobuline in einem in vitro Nachweisverfahren gescreent. In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Antikörper 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 Immunglobulindomänen 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, fluorezierende, luminiszierende oder isotopische Markierungen.

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 zur Herstellung und zum

Screening von Antikörpervarianten sind im Stand der Technik hinlänglich bekannt. Allgemeine Verfahren der Molekularbiologie, Expression, Aufreinigung und des Screenings von Antikörpern werden in Antibody Engineering, herausgegeben von Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001 sowie Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol. 5: 683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng. 2: 339-76 beschrieben.

Wie im Stand der Technik bekannt, selektieren einige Screeningverfahren auf vorteilhafte Mitglieder einer Bibliothek. Die Verfahren werden hierin als "Selektionsverfahren" bezeichnet, und diese Verfahren finden in der vorliegenden Erfindung zum Screening veränderter Immunglobuline Verwendung. Wenn Bibliotheken von Varianten variabler Domänen von Immunglobulinen 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 das Screening 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 Immunglobulins mit dessen Genotyp verbinden, das heißt die Funktion eines Antikörpers 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 werden). Auf diese

Weise selektiert oder isoliert die Selektion oder Isolation veränderter Immunglobuline, welche einige Kriterien erfüllen, beispielsweise die Bindungsaffinität gegenüber dem Zielmolekül des Immunglobulins, ebenso die Nukleinsäure, welche für diese kodiert. Einmal isoliert können das Gen oder die Gene, welche für die veränderten Immunglobuline kodieren, amplifiziert werden. Dieses Verfahren der Isolierung und Amplifikation, als Panning bezeichnet, kann wiederholt werden, wobei die Anreicherung von vorteilhaften Varianten variabler Domänen von Antikörpern 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 Immunglobulinen oder variabler Domänen von Immunglobulinen Anwendung finden können. Diese umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Phagenpräsentation (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 (Malmberg 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), mRNS 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 Immunglobulin-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 Antikörpers 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 gescreeenten Sequenzen erhöhen. Im Stand der Technik sind eine Anzahl gerichteter Evolutionsverfahren bekannt, welche in der vorliegenden Erfindung zur Erzeugung und zum Screening von Varianten variabler Domänen von Antikörpern Anwendung finden können, einschließlich aber nicht beschränkt auf DNA-Shuffling (PCT WO00/42561; PCT WO01/70947), Exon-Shuffling (Kolkmann & Stemmer, 2001, Nat Biotechnol. 19: 423-428), Familien-Shuffling (Crameri 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.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Immunglobuline

oder Varianten variabler Domänen von Antikörpern unter Verwendung von einem oder mehreren auf Zellen basierenden oder in vivo Nachweisverfahren gescreent. Bei solchen Nachweisverfahren werden typischerweise aufgereinigte oder nicht-aufgereinigte veränderte Immunglobuline oder veränderte variable Domänen von Immunglobulinen von außen zugegeben, so dass Zellen individuellen Immunglobulinen oder veränderten variablen Domänen von Immunglobulinen oder Pools von veränderten variablen Domänen von Immunglobulinen, die zu einer Bibliothek gehören, ausgesetzt sind. Diese Nachweisverfahren beruhen typischerweise, aber nicht immer, auf der gewünschten Funktion des Immunglobulins oder der variablen Domäne des Immunglobulins, das heisst, der Fähigkeit des erfindungsgemäß veränderten Antikörpers oder der variablen Domäne des Antikörpers, an sein Zielmolekül zu binden und ein biochemisches Ereignis zu vermitteln, beispielsweise eine Effektorfunktion, Liganden/Rezeptor Bindungshemmung, Apoptose und ähnliche. Solche Nachweisverfahren umfassen oftmals die Überwachung der Zellantwort auf die variable Domäne des Antikörpers, 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 beispielsweise die Fähigkeit von Varianten variabler Domänen eines Antikörpers 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. Immunglobuline 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 Überwachung von Zelltod oder -lebensfähigkeit sind im Stand der Technik bekannt und umfassen die Verwendung von Farbstoffen, immunochemischen, 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, den Zelltod oder die Zellaktivierung zu überwachen.

Alternativ können tote oder beschädigte Zellen durch Messung der Freisetzung eines 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 variabler Domänen von Immunglobulinen umfassen. Die Zelltypen für solche Nachweisverfahren können prokaryotisch oder eukaryotisch sein, und es kann eine Anzahl von 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 variabler Domänen von Immunglobulinen kodieren. In diesem Fall werden die Varianten variabler Domänen von Antikörpern den Zellen nicht von aussen zugegeben (z.B. 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 variabler Domänen von Immunglobulinen auf der Oberfläche von Zellen ermöglicht (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol. 12: 395-399).

In einer bevorzugten Ausführungsform kann die Immunogenität der veränderten Immunglobuline geändert und 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 native T-Zellen von passenden Spendern mit einem Peptid oder einem ganzen Antikörper oder Immunglobulin 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 Tritiummarkiertem 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 (Schmittel et al., 2000, J Immunol Meth., 24: 17-24).

Die biologischen oder funktionellen Eigenschaften der veränderten Immunglobuline oder variablen Domänen von Immunglobulinen der vorliegenden Erfindung können in Zell-, Gewebs- und Gesamtorganismusexperimenten charakterisiert



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 Immunglobuline der vorliegenden Erfindung zu testen. Das Testen von Medikamentenanwärtern an Menschen ist am häufigsten zur Bestätigung als Therapeutika erforderlich, und somit werden diese Experimente selbstverständlich in Betracht gezogen. Die veränderten Immunglobuline oder variablen Domänen von Immunglobulinen 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 Immunglobuline oder variablen Domänen von Immunglobulinen der vorliegenden Erfindung können in einem weiten Bereich von Antikörperprodukten Anwendung finden. In einer Ausführungsform wird die Antikörpervariante der

vorliegenden Erfindung zur Therapie oder Prophylaxe, zur präparativen oder analytischen Verwendung, als Diagnostikum, industrielle Verbindung oder als Forschungsreagens, vorzugsweise als Therapeutikum verwendet. Die Antikörpervariante kann in einer Antikörperzusammensetzung Anwendung finden, die monoklonal, oligoklonal oder polyklonal ist. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die veränderten Immunglobuline oder variablen Domänen von Immunglobulinen der vorliegenden Erfindung verwendet, um Zielzellen zu töten, welche das Zielantigen tragen, beispielsweise Krebszellen. In einer alternativen Ausführungsform werden die veränderten Immunglobuline 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 Immunglobuline 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 Immunglobuline 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 Immunglobuline 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 variablen Domänen von Immunglobulinen der vorliegenden Erfindung verwendet, um infektiöse Agenzien, wie etwa Viren, kleine Viren, Prionen, Bakterien oder Pilze zu neutralisieren.

Die veränderten Immunglobuline oder variablen Domänen von Immunglobulinen der vorliegenden Erfindung können für zahlreiche therapeutische Zwecke verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Antikörper, welcher das veränderte Immunglobulin oder die variable Domäne des Immunglobulins 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 Immunglobulin oder eine variable Domäne eines Immunglobulins der vorliegenden Erfindung umfasst, gelindert werden kann.

In einer Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes verändertes Immunglobulin oder eine variable Domäne eines Immunglobulins das einzige therapeutisch aktive Agens, das dem Patienten verabreicht wird. Alternativ wird das erfindungsgemäße veränderte Immunglobulin oder die variable Domäne eines Immunglobulins 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 Immunglobulin oder die variable Domäne des Immunglobulins kann gleichzeitig mit einem oder mehreren therapeutischen Diäten verabreicht werden. Beispielsweise kann eine Antikörpervariante der vorliegenden Erfindung gemeinsam mit Chemotherapie, Strahlungstherapie oder sowohl Chemotherapie als auch Strahlungstherapie formuliert und dem Patienten verabreicht werden. In einer Ausführungsform kann das veränderte

Immunglobulin oder die variable Domäne eines Immunglobulins der vorliegenden Erfindung in Verbindung mit einem oder mehreren Antikörpern verabreicht werden, welche eine Antikörpervariante der vorliegenden Erfindung umfassen können oder nicht. Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können das veränderte Immunglobulin oder die variable Domäne eines Immunglobulins 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 die Antikörper 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 Immunglobulinen der vorliegenden Erfindung Verwendung finden. In einer Ausführungsform wird das veränderte Immunglobulin 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 Immunglobulin 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

Immunglobulin 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 Immunglobuline 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 Immunglobuline 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 Immunglobulins oder der variablen Domäne eines Immunglobulins 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 Immunglobuline und weitere hierin offenbarte therapeutisch aktive Agenzien können ebenso als Immunliposomen und/oder in Mikrokapseln eingeschlossen formuliert werden.

Die Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung, die ein verändertes Immunglobulin oder eine variable Domäne eines Immunglobulins 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 Expressionsvektor zu diesem Zweck geeigneterweise verwendet werden.

Das veränderte Immunglobulin 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. Ferner können ebenso Pflanzen und Tiere als Wirte zur Expression des erfindungsgemäßen Immunglobulins 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-Proteinexpressionsplattformen, 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 Immunglobulin oder eine variable Domäne eines Immunglobulins oder ein pharmazeutisches Präparat dessen umfasst, das mindestens eine Veränderung in jeder von zwei strukturellen Schleifenregionen des Immunglobulins oder der variablen Domäne des Immunglobulins 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 eine variable Domäne eines Immunglobulins kodiert, welche mindestens zwei strukturelle Schleifenregionen umfasst,
- Veränderung mindestens eines Nukleotidrests in jeder der mindestens zwei strukturellen Schleifenregionen,
- Übertragung der veränderten Nukleinsäure in ein Expressionssystem,
- Expression des veränderten Immunglobulins,
- Kontaktierung des exprimierten veränderten Immunglobulins mit einem Epitop,
- Bestimmung, ob das veränderte Immunglobulin an das Epitop bindet sowie
- Bereitstellung des veränderten Immunglobulins, welches an das Epitop bindet und seine wahlweise Konfektionierung zu einem pharmazeutischen Präparat.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines multi-spezifischen Moleküls, welches in spezifischer Weise an mindestens ein erstes Molekül bindet oder ein pharmazeutischen Präparat davon, das mindestens eine Veränderung in jeder von mindestens zwei strukturellen Schleifenregionen eines Immunglobulins oder einer variablen Domäne eines Immunglobulins aufweist sowie zur Bestimmung der spezifischen Bindung der mindestens zwei Schleifenregionen an mindestens ein zweites, aus Antigenen ausgewähltes Molekül. Das Immunglobulin oder die variable Domäne des Immunglobulins, welche eine unveränderte strukturelle Schleifenregion enthält, bindet nicht in spezifischer Weise an das mindestens eine zweite Molekül.

Speziell umfasst das Verfahren die Schritte:

- Bereitstellung einer Nukleinsäure, welche für ein Immunglobulin kodiert, das spezifisch an mindestens ein erstes Molekül bindet, welches mindestens eine strukturelle Schleifenregion 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 Immunglobulins,
- Kontaktierung des exprimierten veränderten Immunglobulins mit dem mindestens einen zweiten Molekül und
- Bestimmung, ob das veränderte Immunglobulin spezifisch an das zweite Molekül bindet sowie
- Bereitstellung des veränderten Immunglobulins, welches spezifisch an das mindestens eine zweite Molekül bindet und wahlweise Konfektionierung dessen zu einem pharmazeutischen Präparat.

Die Manipulation von mehr als einer Spezifität in einem



Mitglied eines bestimmten Bindungspaares wird bevorzugt (Kufer et al. (2004) Trends in Biotechnology vol. 22 pages 238-244).

Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, um multispezifische, z.B. bispezifische, monoklonale Antikörper oder Antikörperfragmente herzustellen. Ein Problem bei der Herstellung von bispezifischen Antikörpern, die sich aus zwei verschiedenen Polypeptidketten aufbauen (schwere und leichte Kette), besteht in der Notwendigkeit, vier verschiedene Ketten (zwei schwere und zwei leichte Ketten) in einer Zelle zu exprimieren, was eine Anzahl verschiedener Kombinationen von Molekülen zur Folge hat, welche von dem gewünschten bispezifischen Molekül im Gemisch getrennt werden müssen. Auf Grund ihrer Ähnlichkeit ist die Trennung dieser Moleküle schwierig und teuer. Eine Anzahl von Techniken wurden eingesetzt, um das Auftreten solcher unerwünschter Paarungen zu minimieren (Carter (2001) Journal of Immunological Methods, vol 248, pages 7-15).

Eine Lösung für dieses Problem ist die Herstellung einer Polypeptidkette mit zwei Spezifitäten, wie z.B. zweier miteinander verbundener scFvs oder die Herstellung sogenannter Diabodies. Es wurde gezeigt, dass solche Moleküle von der Faltung natürlicher Moleküle weit entfernt sind und offenkundig schwierig herzustellen sind (LeGall et al. (2004) Protein Engineering, Design & Selection vol. 17 pages 357-366).

Ein weiteres Problem des derzeitigen Entwurfs bispezifischer Antikörper liegt in der Tatsache, dass selbst wenn die Elternantikörper bivalent an ihre jeweilige Bindungspartner (z.B. IgG) binden, der resultierende bispezifische Antikörper für jeden der jeweiligen Bindungspartner monovalent ist.

Die bevorzugten multi-spezifischen Moleküle der vorliegenden Erfindung lösen diese Probleme:

Die Expression eines bispezifischen Moleküls als eine Polypeptidkette ist möglich (eine veränderte variable Domäne eines Immunglobulins mit zwei Bindungsspezifitäten, siehe Abschnitt Beispiele), was leichter zu erfüllen ist, als die Expression zweier Antikörperpolypeptidketten (Cabilly et al., Proc Natl Acad Sci. USA 81: 3273-3277 (1984)).

Es kann ebenso als Antikörper-ähnliches Molekül (d.h. aus 2 Polypeptidketten aufgebaut) hergestellt werden. Auf Grund der Tatsache, dass sich die zweite Spezifität auf dem nicht-CDR Anteil der variablen Domänen befindet, besteht kein Bedarf für zwei verschiedene schwere Ketten oder verschiedene leichte Ketten. Folglich gibt es keine Möglichkeit der Fehlpaarung der beiden Ketten.

Ein Antikörper der vorliegenden Erfindung kann aus einer schweren Kette und einer leichten Kette bestehen, die zusammen eine variable Region bilden, welche an einen spezifischen Bindungspartner bindet, und die zweite Spezifität kann durch veränderte strukturelle Schleifen entweder der variablen Domäne der schweren Kette oder der leichten Kette gebildet werden. Die Bindungsstelle kann ebenfalls aus mindestens einer oder mehr als einer nicht-CDR Schleifen auf zwei variablen Domänen gebildet werden (z.B. einer variablen Domäne einer schweren Kette und einer variablen Domäne einer leichten Kette, die strukturell benachbart sein können).

Der veränderte Antikörper oder das Derivat kann ein vollständiger Antikörper oder ein Antikörperfragment (z.B. Fab, scFv, Fv, Minibody, dAB) sein, der mindestens eine veränderte variable Domäne eines Immunglobulins umfasst.

Er kann mono- oder multivalent an Bindungspartner binden oder sogar mit unterschiedlichen Valenzen für die verschiedenen Bindungspartner, in Abhängigkeit vom Entwurf. Es kann beispielsweise ein Fab Fragment oder gleichwertig ein scFv auf solche Weise ausgeführt werden, dass die Strukturschleifen der VH und der VL Domänen getrennt voneinander manipuliert werden, um an dasselbe Epitop zu binden wie die von den CDRs gebildete Bindungsstelle, was zu einem trivalenten Fab Fragment beziehungsweise scFv führt. In einer weiteren Ausführungsform bindet ein vollständiges Immunglobulin, das dieselben manipulierten VH und VL Domänen enthält, hexavalent an sein Zielepitop. Wenn beispielsweise die von den CDRs gebildete natürliche Bindungsstelle ein unterschiedliches Zielepitop erkennt als die manipulierten Vh und VL Domänen, dann bindet das resultierende Fab Fragment oder scFv monovalent an das erste Zielmolekül und bivalent an das zweite Zielmolekül, welches in unabhängiger Weise durch die veränderten Strukturschleifen der VH beziehungsweise VL Domäne gebunden wird. Dieses bausteinförmige Entwurfsprinzip kann auf zahlreiche verschiedene Weisen angewandt werden, was für den Fachmann offensichtlich ist.

Da es eine Anzahl unterschiedlicher Strukturschleifen gibt, die zur Selektion und zum Entwurf einer spezifischen Bindungsstelle in den nicht-CDR Regionen von schweren und leichten Domänen verfügbar sind, ist es möglich, Antikörperderivate mit sogar mehr als zwei Spezifitäten zu entwerfen. Beispielsweise können VH und VL Domänen, die ein erstes Zielmolekül mit ihren CDRs erkennen, getrennt voneinander manipuliert werden, um spezifisch an unterschiedliche (zweite und dritte) Zielmoleküle zu binden, durch Wechselwirkungen, die von den veränderten Strukturschleifen vermittelt werden. Folglich kann ein trispezifisches Fab Fragment oder scFv, das monovalent an jedes seiner Zielmoleküle bindet, erzeugt werden. Wenn die veränderten variablen Domänen dieses Fab Fragments in Form

eines Volllängen-IgG ausgeführt werden, wird ein manipuliertes IgG erzeugt, welches trispezifisch ist und an jede seiner drei Spezifitäten bivalent bindet.

Die spezifischen Bindungsdomänen innerhalb einer Polypeptidkette können mit oder ohne einen Peptidlinker verbunden sein.

Einige Antikörperklassen können als natürlicherweise multispezifisch, insbesondere bispezifisch, angesehen werden: Sie binden an ein Antigen (das typischerweise z.B. entweder eine fremdartige Struktur oder eine krebsassoziierte Struktur ist) mit der variablen Region und sie binden an Fc-Effektormoleküle mit dem Fc-Anteil (z.B. Fc Rezeptoren auf zahlreichen Immunzellen oder Komplementprotein), wodurch Effekte wie etwa ADCC, ADCP oder CDC bewirkt werden.

Die Fc-Effektormoleküle werden durch den Fc-Anteil eines Immunglobulinmoleküls (bei IgG1 besteht es aus den Domänen CH2 und CH3) gebunden, und es wurde eine Anzahl von Methoden beschrieben, um die Effektorfunktion durch Verbesserung der Bindung des Fc-Anteils eines Antikörpermoleküls zu optimieren, entweder durch Glycomanipulationstechniken (US 6,602,684) oder durch Proteinmanipulation entweder direkt an der Fc (US 2005/0054832) oder indirekt durch Manipulation ausserhalb der Fc (US 2005/02444403). Sowohl die Bindung der Fc-Region an einen Fc-Rezeptor und/oder die Bindung an Komplementproteine wie etwa Cq1 wurde durch solche Techniken verändert. Gemeinhin wird versucht, die Bindungsaffinität zu solchen Fc-Effektormolekülen zu verbessern, da dies mit verbesserten Effektorfunktionen einhergeht.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, einen Antikörper zu entwerfen, der an Fc-Effektormoleküle

ausserhalb der natürlichen Fc-Bindungsregion bindet. Veränderte Schleifen in variablen Domänen von Antikörpern, die nicht den Schleifen entsprechen, die an der "natürlichen" Bindung von Fc-Effektormolekülen beteiligt sind, können aus einer Bibliothek veränderter Schleifenstrukturen gewählt werden oder entworfen werden, um an ein oder mehrere Fc-Effektormoleküle zu binden. Ein Antikörper mit solchen zusätzlichen Bindungsstellen für Fc-Effektormoleküle hätte entweder eine stärkere Avidität gegenüber einem bestimmten Fc-Effektormolekül oder einer Effektorzelle, die ein Fc-Effektormolekül präsentiert und kann daher eine noch stärkere Wirkung entfalten, als glycomanipulierte Antikörper oder anderweitig verbesserte Fc-Regionen.

Antikörperfragmente weisen im Vergleich zu vollständigen Antikörpern bestimmte Vorteile auf. Fragmente besitzen gemeinhin gute Bioverteilungseigenschaften und können leichter hergestellt werden. Jedoch fehlen den meisten Entwürfen von Antikörperfragmenten Effektorfunktionen, und sie besitzen eine kurze in vivo Halbwertszeit (Holliger P. et al., Nat Biotechnol. (2005) 23: 1126-36).

Weder CH1 noch C $\kappa$  oder C $\lambda$  Domänen vermitteln Effektorfunktionen, was der Grund dafür ist, dass Fabs keine ADCC, ADCP oder CDC zeigen. WO 02/44215 beschreibt Bindungsmoleküle, die aus der Antigenbindungsstelle eines Antikörpers und einem Peptid bestehen, welches Fc-Effektormoleküle bindet. Auf solche Weise kann ein Antikörperfragment konstruiert werden, dass Effektorfunktionen zeigt. Das Peptid wird in das Bindungsmolekül an einer Position eingebaut, die weder die Bindung des Antigens noch die Fähigkeit des Peptids zerstört, an ein Fc-Effektormolekül zu binden.

Erfindungsgemäß kann die Bindung an Fc-Effektormoleküle jedoch mit veränderten Immunglobulinen oder variablen

Domänen von Immunglobulinen ausgeführt werden, die auf Bindung von Fc-Effektormolekülen aus Bibliotheken von zwei, drei oder vier randomisierten Strukturschleifensequenzen innerhalb eines festen Gerüsts eines Immunglobulins oder einer variablen Domäne eines Immunglobulins selektiert wurden. Es ist daher möglich, auf spezifische Schleifensequenzen zu selektieren, die nicht an Fc-Effektormoleküle binden würden, wenn sie von dem Ig-Domänengerüst getrennt würden. Die aus der vorliegenden Erfindung hervorgehenden Polypeptide können daher vorzugsweise aus mehr als 100 Aminosäuren bestehen und können eine oder mehrere variable Domänen von Immunglobulinen umfassen.

Um auf potentielle Effektorfunktionen solcher erfindungsgemäßer variabler Domänen zu selektieren, können Bibliotheken von Antikörpern oder Antikörperfragmenten, die mutierte variable Domänen umfassen, 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 variable Domänen von Immunglobulinen verwendet werden, die spezifisch an den Hochaffinitäts-IgG-Rezeptor FcgammaRI binden (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 variablen Domänen von Immunglobulinen 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 variabler Domänen von Immunglobulinen, die spezifisch an den Komplementfaktor Clq 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 zu erhöhen, das aus einer solchen variablen Domäne besteht oder eine solche enthält, kann auf die Bindung an FcRn oder Serumalbumin mit Bibliotheken erfindungsgemäßer mutierter variabler Domänen selektiert werden. Solche Strukturschleifen, die für die Verlängerung der Halbwertszeit eines Moleküls durch dessen Bindung an Serumproteine oder Komplementproteine verantwortlich sind, können als isolierte Strukturschleifen oder im Zusammenhang mit einem Immunglobulin oder Teilen davon zur Kombination mit solchen Molekülen verwendet werden, die als Moleküle mit erhöhter Halbwertszeit in vivo entworfen werden sollen.

FcRn Rezeptoren oder andere Zellrezeptoren 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 variable Domänen (oder Moleküle, die solche mutierte variable Domänen umfassen) selektieren, die ferner in vitro getestet und überdies in FACS Experimenten durch Bindung an Zellen, die einen FcRn Rezeptor exprimieren, charakterisiert 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 charakterisiert werden, z.B. mit Oberflächen-Plasmonresonanztechniken (z.B. wie in Dall' Acqua et al., Journal of Immunology, 2002, 169: 5171-5180).

Das erfindungsgemäße veränderte Immunglobulin kann eine schwere und/oder leichte Kette oder Teile davon sowie mindestens eine variable Domäne umfassen.

Das erfindungsgemäße Immunglobulin umfasst vorzugsweise mindestens eine konstante und/oder mindestens eine variable Domäne eines Immunglobulins oder eines Teils davon.

Eine variable Domäne wird für gewöhnlich als eine Immunglobulin-Faltungseinheit des variablen Anteils eines Immunglobulins betrachtet, auch als Domäne der variablen Region bezeichnet (z.B. VH, Vk, VL, Vd).

Ein weiteres bevorzugtes erfindungsgemäßes Immunglobulin besteht aus einer variablen Domäne einer schweren oder leichten Kette oder einem Teil davon mit mindestens zwei Strukturschleifenregionen und ist dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens zwei Strukturschleifenregionen mindestens zwei Aminosäureveränderungen umfassen, die mindestens zwei veränderte Strukturschleifenregionen bilden, wobei die mindestens zwei veränderten Strukturschleifenregionen spezifisch an mindestens ein Epitop eines Antigens binden. Bei solch einem bevorzugten erfindungsgemäßen Immunglobulin können die mindestens zwei Aminosäureveränderungen in einer oder zwei Strukturschleifenregionen liegen oder in einer oder zwei Strukturschleifen, um auf diese Weise eine Bindungsstelle für ein Antigen zu bilden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die spezifische Bindung des veränderten



Polypeptids an ein Molekül durch ein Bindungsnachweisverfahren 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, Gewebebinbindungsnachweisverfahren, Lebendzellbindungsnachweisverfahren und Zellextraktnachweisverfahren.

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.

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

Das veränderte Immunglobulin 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 variable Domäne einer leichten oder schweren Kette 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 eine veränderte variable Domäne eines Antikörpers (= die 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 eine weitere veränderte Antikörperdomäne sein kann.

Das weitere Bindungsmolekül, das mit der mindestens einen veränderten variablen Domäne eines Antikörpers der Erfindung kombiniert ist, wird ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus proteinartigen Molekülen, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten.

Die Strukturschleifenregionen der veränderten variablen Domänen des Immunglobulins können spezifisch an jede Art von Bindungsmolekül binden, insbesondere an proteinartige Moleküle, Proteine, Peptide, Polypeptide, Nukleinsäuren, Glykane, Kohlenhydrate, Lipide, kleine und große organische

Moleküle, anorganische Moleküle. Selbstverständlich kann die veränderte variable Domäne des Immunglobulins 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 Struktur-schleifenregion bindende Antigen oder 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 Cytokeratin-tumorassoziiertem Antigen, bakteriellen Antigenen, viralen Antigenen, Allergenen, Allergie-bezogenen Molekülen IgE, cKIT und Fc-Epsilon-Rezeptor I, Irp60, IL-5 Rezeptor, CCR3, rotem Blutzellrezeptor (CR1), 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, 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 betal, 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) 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, RSVE 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 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 Encephalitisvirus-, Denguevirus-, Zecken Encephalitisvirus-, 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-, 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 Immunglobulin kann vorzugsweise an eines der oben offenbarten Moleküle binden. Diese Moleküle umfassen ferner Allergene und Haptene.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines erfindungsgemäßen oder eines mit einem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Immunglobulins oder einer variablen Domäne eines Immunglobulins zur Herstellung eines Impfstoffs zur aktiven Immunisierung. Dabei wird das Immunglobulin entweder als antigene Medikamentensubstanz zur Formulierung eines Impfstoffs verwendet oder zum Herausfischen oder Abfangen antigenen 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 Immunglobulins zur Herstellung einer Proteinbibliothek von Polypeptiden, welche veränderte variable Domänen von Immunglobulinen umfasst.

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

- In Kontakt bringen eines Moleküls, welches ein erfindungsgemäßes verändertes Immunglobulin oder eine variable Domäne eines Immunglobulins umfasst oder ein Molekül, das eine nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliche veränderte variable Domäne eines Immunglobulins umfasst mit einer Testprobe, welche das Zielmolekül enthält oder in Verdacht ist, es zu enthalten und wahlweise
- Nachweis der potentiellen Bildung eines spezifischen Immunglobulin/Molekül-Komplexes oder eines Komplexes aus der variablen Domäne eines Immunglobulins und dem Molekül.

Ein bevorzugtes erfindungsgemäßes Verfahren dient der spezifischen Bindung und/oder dem Nachweis eines Moleküls, das die Schritte umfasst:

- In Kontakt bringen einer Bibliothek erfindungsgemäßer Immunglobuline oder eines veränderten Immunglobulins mit einer Testprobe, welche das Molekül enthält und wahlweise
- Nachweis der potentiellen Bildung eines spezifischen Immunglobulin/Molekül-Komplexes.

Testproben können menschliche oder tierische Proben sein, wie etwa Blutproben oder andere Körperflüssigkeiten und Zellsuspensionen, die möglicherweise ein Zielmolekül

erhalten, das zum Abfangen und/oder Nachweis durch Immunglobuline spezifisch ist.

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

- In Kontakt bringen eines Moleküls, welches ein erfindungsgemäßes verändertes Immunglobulin oder eine variable Domäne eines Immunglobulins umfasst oder ein Molekül, das eine nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliche veränderte variable Domäne eines Immunglobulins umfasst mit einer Probe, welche das Zielmolekül enthält,
- Abtrennung des gebildeten spezifischen Komplexes aus der variablen Domäne eines Immunglobulins und dem Zielmolekül sowie
- wahlweise Isolierung des Zielmoleküls aus dem Komplex.

Ein bevorzugtes erfindungsgemäßes Verfahren dient der spezifischen Isolierung eines veränderten Immunglobulins, das an ein Molekül bindet, welches die Schritte umfasst:

- In Kontakt bringen einer Bibliothek erfindungsgemäßer Immunglobuline mit einer Probe, welche das Molekül enthält,
- Abtrennung des gebildeten spezifischen Komplexes aus verändertem Immunglobulin und dem Molekül sowie
- wahlweise Isolierung des veränderten Immunglobulins aus dem Komplex.

Diese Proben werden für gewöhnlich als Quellen zur präparativen Isoierung dieser Moleküle betrachtet, beispielsweise komplexe natürliche Quellen, wie tierische, menschliche oder pflanzliche Quellen oder mikrobiell abgeleitete Quellen oder Zellsuspensionen und -kulturen.

Die erfindungsgemäßen Immunoglobuline oder variablen Domänen von Immunglobulinen können zur spezifischen Isolierung von Molekülen aus einer Probe verwendet werden. Wenn multispezifische Immunglobuline oder variable Domänen von Immunglobulinen verwendet werden, kann mehr als ein Zielmolekül aus einer Probe isoliert werden. Es ist besonders vorteilhaft Immunglobuline oder veränderte variable Domänen von Immunglobulinen in solchen Verfahren zu verwenden, weil dadurch z.B. eine Matrix erzeugt werden kann, die eine homogene Oberfläche mit definierten Mengen von darauf immobilisierten Bindungspartnern (d.h. veränderte variable Domänen von Immunglobulinen) aufweist, welche dazu in der Lage sind, die zu isolierenden Zielmoleküle zu binden. Im Gegensatz dazu kann, wenn monospezifische Bindungspartner verwendet werden, keine homogene Matrix erzeugt werden, da die einzelnen Bindungspartner nicht mit derselben Wirksamkeit 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:

- In Kontakt bringen eines Moleküls, das eine erfindungsgemäße veränderte variable Domäne eines Immunglobulins umfasst oder eines Moleküls, das eine mit einem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliche veränderte variable Domäne eines Immunglobulins umfasst, das in der Lage ist, spezifisch an die Verbindung zu binden,
- Hinleiten des Moleküls, das einen Komplex aus der variablen Domäne eines Immunglobulins und der Verbindung umfasst, zu dem Zielmolekül.

Erfindungsgemäße veränderte Immunglobuline oder variable Domänen von Immunglobulinen können zum Hinleiten mindestens einer Verbindung, die an die CDRs und/oder veränderten



Strukturschleifenregionen gebunden ist, zu dem Zielmolekül verwendet werden. Solche Immunglobuline können dazu verwendet werden, therapeutische Substanzen in zielgerichteter Weise zu einem bevorzugten Wirkungsort im Laufe der Behandlung von Krankheiten zu leiten.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Molekülbibliothek, die ein erfindungsgemäßes oder mit einem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliches Immunglobulin oder eine variable Domäne eines Immunglobulins umfasst.

Die bevorzugte Bibliothek von erfindungsgemäßen Immunglobulinen oder variablen Domänen von Immunglobulinen umfasst mindestens 10 Immunglobuline oder variable Domänen von Immunglobulinen, vorzugsweise 100, besonders bevorzugt 1 000, besonders bevorzugt 10 000, besonders bevorzugt 100 000, insbesondere mehr als 1 000 000 Varianten von Immunglobulinen oder variablen Domänen, mit einer Veränderung in mindestens zwei Strukturschleifenregionen. Es zeigte sich, dass die am meisten bevorzugten Mitglieder einer Bibliothek Mutationen von mindestens 4 oder sogar mindestens 5 oder 6 Aminosäurepositionen in mindestens zwei Strukturschleifenregionen aufweisen. Folglich bestehen die besonders bevorzugten erfindungsgemäßen Bibliotheken aus Mitgliedern, die Mutationen von mindestens 2, 3 oder 4 Aminosäurepositionen in mindestens zwei Strukturschleifenregionen aufweisen.

Eine erfindungsgemäße Bibliothek kann ferner aus einer oder einem Gemisch von variablen Domänen von Immunglobulinen bestehen oder diese umfassen, die ausgewählt sind aus der Gruppe von VH, Vkappa, Vlamba und VHH, nach Eignung zum Zweck der Bestimmung von Bindungspartnern aus kommerziellen Gründen.

Bevorzugte Verfahren zur Herstellung der Bibliothek können

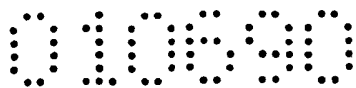
im obigen und in den Beispielen gefunden werden. Die erfindungsgemäße Bibliothek kann zur Identifizierung von Immunglobulinen oder von variablen Domänen von Immunglobulinen verwendet werden, die an ein individuelles Molekül binden.

Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung einer Proteinbibliothek von Polypeptiden, welche ein erfindungsgemäßes oder mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliches Immunglobulin oder eine variable Domäne eines Immunglobulins umfasst, zum Entwurf von Immunglobulinderivaten. Ein bestehendes Immunglobulin kann verändert werden, um Antigenbindungsstellen in ein Immunglobulin oder eine variable Domäne eines Immunglobulins einzuführen, unter Verwendung einer Proteinbibliothek des betreffenden Immunglobulins oder der variablen Domäne von mindestens 10, vorzugsweise 100, besonders bevorzugt 1 000, besonders bevorzugt 10 000, besonders bevorzugt 100 000, insbesondere mehr als 1 000 000 Immunglobulinen oder variablen Domänvarianten, wobei jede mindestens zwei veränderte Strukturschleifenregionen aufweist. Die Bibliothek wird daraufhin auf Bindung an das spezifische Antigen gescreent. Nach molekularer Charakterisierung auf die gewünschten Eigenschaften wird das ausgewählte Immunglobulin oder die variable Domäne durch gentechnische Verfahren in das ursprüngliche Immunglobulin kloniert, so dass es die Wildtypregion ersetzt. Alternativ kann nur die DNS, welche für die veränderten Schleifen kodiert oder für die mutierten Aminosäuren kodiert ausgetauscht werden, zum Erhalt eines Immunglobulins mit der zusätzlichen Bindungsstelle für das spezifische Antigen. Alternativ kann die Veränderung in den Strukturschleifen der variablen Domänen mit der variablen Domäne in deren natürlichem Zusammenhang ausgeführt werden, z.B. in Form eines Fab, scFv oder vollständigen Immunglobulinmoleküls.

Die Wahl der Stelle der mutierten, antigen-spezifischen Strukturschleife ist abhängig von der Struktur des ursprünglichen Immunglobulins und vom Zweck der zusätzlichen Bindungsstelle. Wenn, beispielsweise, das ursprüngliche Immunglobulin ein Fab oder scFv ist, ist eine Veränderung von zwei Strukturschleifen in den variablen Domänen der leichten Kette und/oder der schweren Kette möglich.

Zur Erzeugung einer Bibliothek können Bibliotheken von mutierten ursprünglichen Molekülen hergestellt werden, die Mutationen in zwei oder mehreren Strukturschleifen einer oder mehrerer variabler Domänen 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 scFv ist, die Bibliothek von mutierten ursprünglichen scFv 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 Rettung von Klonen erlauben, die während eines schrittweisen Selektionsverfahrens verloren gingen, wenn die Bindung an das Antigen von der Bindung an das erste Antigen beeinflusst wird.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist eine Bibliothek von Varianten variabler Domänen von Immunglobulinen mit mindestens einer Aminosäurepositionsvariante in jeder von mindestens zwei der Struktur-



schleifen. Die Bibliothek kann Immunglobulindomänen der schweren und der leichten Kette oder Gemische und molekulare Kombinationen davon umfassen.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform ist eine Bibliothek von VHH Domänen oder humanisierte Formen solcher Kameldomänen mit mindestens einer Aminosäurenpositionsvariante in jeder von mindestens zwei Strukturschleifen.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist eine Bibliothek mit einzelkettigen Antikörpern, wie etwa eine scFv Bibliothek mit mindestens einer Aminosäurenpositionsvariante in jeder von mindestens zwei der Strukturschleifen jeder beliebigen der variablen Domänen des einzelkettigen Antikörpers oder scFv.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist eine Diabody-Bibliothek mit mindestens einer Aminosäurenpositionsvariante in jeder von mindestens zwei der Strukturschleifen jeder beliebigen der variablen Domänen des Diabodies.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist eine Minibody-Bibliothek mit mindestens einer Aminosäurenpositionsvariante in jeder von mindestens zwei der Strukturschleifen jeder beliebigen der variablen Domänen des Minibodies.

Noch eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist eine Fab-Bibliothek mit mindestens einer Aminosäurenpositionsvariante in jeder von mindestens zwei der Strukturschleifen jeder beliebigen der variablen Domänen des Fabs.

Noch eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist eine Antikörper- oder IgG-Bibliothek, vorzugsweise eine

menschliche Antikörperbibliothek, mit mindestens einer Aminosäurenpositionsvariante in jeder von mindestens zwei der Strukturschleifen jeder beliebigen der variablen Domänen der Antikörper- oder IgG-Domänen.

Die Größenanforderungen (d.h. die Anzahl von Proteinvarianten) einer Proteinbibliothek, die verschiedenartig mutierte Immunglobuline oder variable Domänen von Immunglobulinen oder Fusionsmoleküle mutierter variabler Antikörperdomänen 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 die Veränderung der Feinspezifität gegenüber dem Antigen).

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenso eine Polypeptidbibliothek oder eine Nukleinsäurebibliothek, die mehrere Polypeptide umfasst, welche Immunglobuline oder variable Domänen von Immunglobulinen oder mindestens zwei in einer Minidomäne enthaltene Strukturschleifenregionen umfassen, oder dafür kodierende Nukleinsäuremoleküle. Die Bibliothek enthält Mitglieder mit unterschiedlichen Veränderungen, wobei die Vielzahl durch die Veränderungen in den mindestens zwei Strukturschleifenregionen bestimmt wird. Die Nukleinsäurebibliothek umfasst vorzugsweise mindestens 10 verschiedene Mitglieder (mit mindestens zwei 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 Immunglobuline oder variabler Domänen von Immunglobulinen, die aus mindestens zwei erfindungsgemäßen Bibliotheken ausgewählt sind, um multispezifische Immunglobuline zu erzeugen. Diese ausgewählten spezifischen variablen Domänen von Immunglobulinen 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 erfindungsgemäße veränderte Immunglobuline oder variable Domänen von Immunglobulinen 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 Immunglobuline oder variable Domänen von Immunglobulinen oder Derivate davon.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist ein Bindungsmolekül für ein Antigen (Antigen-bindendes Molekül), das mindestens ein Immunglobulin oder eine variable Domäne eines Immunglobulins sowie mindestens zwei Strukturschleifenregionen umfasst, die erfindungsgemäß zur Bindung an das Antigen verändert wurden, wobei das Bindungsmolekül keine relevante und/oder spezifische Bindungsaktivität mit seinen CDR-Schleifen aufweist. Es kann weitere Anteile umfassen, die für Antikörperaktivitäten nützlich sind (z.B. wie etwa natürliche oder veränderte Effektorregionen (Sequenzen)), es fehlt ihm jedoch die "natürliche" Bindungsregion für Antikörper, d.h. aktive CDR-Schleifen in ihrer

natürlicherweise auftretenden Position. Diese erfindungsgemäßen Antigen-bindenden Moleküle weisen die im obigen für die vorliegenden Moleküle beschriebenen Vorteile auf, aber ohne die spezifische Bindungsaktivität von Antikörpern; jedoch 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 ein verändertes Immunglobulin, das eine Antigenbindungsstelle aufweist, die dem unveränderten Immunglobulin fremd ist und in eine, zwei, drei oder mehrere Strukturschleifen der variablen Domäne eingesetzt ist. Die Bezeichnung "fremd" bedeutet, dass die Antigenbindungsstelle nicht natürlicherweise durch die spezifischen Strukturschleifenregionen der variablen Domäne des Immunglobulins gebildet wird.

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

Bevorzugte erfindungsgemäße Immunglobuline oder variable Domänen von Immunglobulinen 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 Immunglobulin oder die variable Domäne eines Immunglobulins 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 Immunglobuline oder variablen Domänen von Immunglobulinen 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 das erfindungsgemäße Immunglobulin aus mindestens zwei Immunglobulindomänen oder einem Anteil davon, einschließlich einer Minidomäne, zusammen, und jede Domäne enthält mindestens eine Antigenbindungsstelle.

Ebenfalls wird ein erfindungsgemäßes Immunglobulin bevorzugt, das mindestens eine Domäne der variablen Region eines Immunglobulins und mindestens eine Domäne der konstanten Region eines Immunglobulins umfasst; beispielsweise eine variable Domäne, die in mindestens zwei mit einer CH1 Domäne verbundenen Strukturschleifen verändert ist.

Das erfindungsgemäß bevorzugte Immunglobulin 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 Immunglobulindomäne" bezeichnet eine erfindungsgemäße Immunglobulindomäne, die mindestens 50 % Identität der Aminosäuresequenz hinsichtlich einer nativen Volllänge-sequenz einer Immunglobulindomäne aufweist oder jeder beliebigen anderen Volllänge-sequenz einer Immunglobulindomäne wie hierin offenbart. Vorzugsweise weist eine homologe Immunglobulindomäne 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 Immunglobulindomäne auf oder mit jedem beliebigen anderen spezifisch definierten Fragment einer Volllänge-sequenz einer Immunglobulindomäne wie hierin offenbart.

Die "Prozentuale (%) Identität der Aminosäuresequenz" ist in Hinsicht auf die hierin bezeichneten Immunglobulinsequenzen als Prozentsatz der Aminosäurereste in einer Anwärtersequenz definiert, der mit den

Aminosäureresten in der spezifischen Sequenz der variablen Domäne eines Immunglobulins 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 beliebigen Algorithmen, die zum Erhalt der maximalen Sequenzübereinstimmung über die gesamte Länge der verglichenen Sequenzen benötigt werden.

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, Überlappungsfraction=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 variablen Domäne eines Immunglobulins, das eine Sequenz aufweist, die von der nativen variablen Domäne des Immunglobulins abgeleitet ist, und der zu vergleichenden interessierenden Aminosäuresequenz (d.h. die Sequenz, mit der die interessierende variable Domäne des Immunglobulins verglichen wird, wobei es sich um die

unveränderte variable Domäne des Immunglobulins handeln kann), wie mit WU-BLAST-2 bestimmt, durch (b) die gesamte Anzahl von Aminosäureresten der nicht-randomisierten Anteile der interessierenden variablen Domäne des Immunglobulins. 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 variablen Domäne des Immunglobulins.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Polypeptid ein bispezifischer Antikörper oder ein bispezifischer einzelkettiger Antikörper oder ein bispezifisches Fab oder ein bispezifischer sdAb. Es wird ferner bevorzugt, dass das Polypeptid eine bispezifische Domäne oder einen Teil davon umfasst.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann für einen beliebigen im Stand der Technik für 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); zur präparativen und analytischen Anwendung und zur diagnostischen Anwendung.

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

- ein Polypeptid, das eine veränderte variable Domäne eines Immunglobulins umfasst, das eine Antigenbindungsstelle aufweist, die in zwei oder mehr Strukturschleifen eingesetzt ist sowie
- ein Bindungsmolekül, das ein Epitop des Antigens

enthält.

Vorzugsweise enthält ein erfindungsgemäßer Kit von Bindungspartnern

- eine Bibliothek von erfindungsgemäß veränderten Immunglobulinen und
- ein Bindungsmolekül, das ein Epitop eines Antigens enthält.

Ein solches Bindungsmolekül des erfindungsgemäßen Kits kann zur Selektion und Unterscheidung eines nativen oder erfindungsgemäß veränderten Immunglobulins in einer Probe oder aus einer Bibliothek verwendet werden. Es kann ferner zur Identifizierung der Bindungsspezifität von Polypeptiden verwendet werden, die ein erfindungsgemäßes verändertes Immunglobulin oder eine variable Domäne eines Immunglobulins umfassen. Durch Verwendung des Bindungsmoleküls des erfindungsgemäßen Kits kann die Potenz des erfindungsgemäßen veränderten Polypeptids 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 Immunglobulin oder eine variable Domäne eines Immunglobulins 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 Immunglobulins oder der variablen Domänen des Immunglobulins in Bereichen stattfindet, die normalerweise nicht an der Antigenbindung beteiligt sind, mit anderen Worten, in anderen Bereichen als den CDRs einer variablen Domäne eines Antikörpers. Es wurde beobachtet, dass die spezifische Faltung von Immunglobulindomänen 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 Immunglobulinfalte verbinden. Diese Strukturschleifenregionen können, wie in der vorliegenden Erfindung beschrieben, mutiert werden, ohne die Bindung der variablen Domänen des Immunglobulins 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 Antikörpers gebildeten Bindungsoberfläche oder Bindungstasche ähnelt. Da die Strukturschleifen auch durch Einsetzen zusätzlicher Aminosäuren ausgedehnt werden können, kann die Architektur der neu erzeugten Bindungsstelle freiwillig 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 die Beta-Stränge A-B, C'-D und E-F verbindenden Schleifen einer menschlichen oder humanisierten variablen Domäne einer schweren Kette, mutierte Domänen selektiert werden können, die spezifisch an entweder menschliches Serumalbumin oder an den Fcgamma Rezeptor III binden, welche normalerweise nicht von variablen Domänen menschlicher oder humanisierter Immunglobuline 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. Folglich werden erfindungsgemäß bevorzugt veränderte Immunglobuline bereitgestellt, die nach den oben beschriebenen Verfahren erhältlich sind und hergestellt werden und die eine Bindungsstelle aufweisen, welche für ein Antigen spezifisch ist, besonders spezifisch für Serumalbumin, Zellrezeptoren und Komplementfaktoren, insbesondere menschliches Serumalbumin und Fc-Rezeptoren.

In analoger Weise sind die variablen Domänen von Immunglobulinen aus jeder beliebigen Klasse von Immunglobulinen und von Immunglobulinen 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 variablen Domänen von Immunglobulinen verbindet, auf dieselbe Weise manipuliert werden.

Manipulierte Immunglobuline oder variable Domänen von Immunglobulinen aus jedem beliebigen Organismus und aus jeder beliebigen Immunglobulinklasse können erfindungsgemäß entweder als solche (als Einzeldomänen) oder als Teil eines größeren Moleküls verwendet werden. Beispielsweise können

sie Teil eines intakten Immunglobulins sein, was dementsprechend seine "normale", durch die 6 CDRs gebildete Antigenbindungsregion sowie die neue, manipulierte Antigenbindungsregion aufwies. Auf diese Weise könnte ein multispezifisches, z.B. bispezifisches Immunglobulin erzeugt werden. Die manipulierten Immunglobulindomänen können auch Teil eines beliebigen Fusionsproteins sein. Die Verwendung dieser manipulierten Immunglobuline oder Immunglobulindomänen liegt im allgemeinen Gebiet der Verwendung von Immunglobulinen.

#### **Beispiel 1:** Entwurf der VHH Bibliothek

Die Kristallstruktur der Kamel VHH Domäne D2-L24 im Komplex mit Hühnereiweiß-Lysozym, die in der Brookhaven Datenbank als Eintrag 1ZVH.pdb veröffentlicht ist, wurde verwendet, um den Entwurf der mutierten VHH Domäne zu unterstützen. Die Sequenz der Kette A der Strukturakte 1ZVH.pdb ist in SEQ ID No. 1 angeführt.

Die Sequenz, welche als Grundlage zum Aufbau der VHH Bibliothek verwendet wurde, ist die Sequenz der anti-TNF-alpha VHH Domäne aus der Patentschrift WO04041862A2<sup>1</sup>, Klon 3E und ist in SEQ ID No. 2 angeführt. Ein Sequenzvergleich von SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 2 ist in Figur 1 angeführt.

1

Nach ausführlicher Analyse der Struktur von 1ZVH.pdb und durch visuelle Überprüfung der Reste, welche die die Beta-Stränge verbindenden Schleifen bilden, wurde entschieden, die Reste 13, 15 (d.h. in der Schleife zwischen den Beta-Strängen A und B) 89, 90, 92 und 93 (d.h. in der Schleife zwischen den Beta-Strängen E und F) von SEQ ID No. 2 zur

Erzeugung der Bibliothek zu randomisieren. Zusätzlich wurde entschieden, drei randomisierte Positionen zwischen die Reste 14 und 15 einzusetzen, und es wurde entschieden, drei randomisierte Positionen zwischen die Reste 92 und 93 von SEQ ID No. 2 einzusetzen.

**Beispiel 2:** Bildung der VHH Bibliothek

Das für die VHH Sequenz kodierende manipulierte Gen wird in Form eines synthetischen Gens durch PCR Aufbau hergestellt. Die Sequenz und ihre Übersetzung sind in Figur 2 dargestellt. Die zur Bibliotheksbildung zu randomisierenden Aminosäurereste sind unterstrichen. Restriktionsschnittstellen für die Klonierung sind wie folgt umfasst und sind in der in Figur 2 gezeigten Nukleotidsequenz unterstrichen: NcoI, BglII und NotI.

Die von dem synthetischen Gen kodierte Aminosäuresequenz ist in SEQ ID No. 3 angeführt. Die ersten beiden Reste und die letzten beiden Reste werden durch die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen verursacht.

Die für SEQ ID No. 3 kodierende Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 4 angeführt. Die ersten beiden Codons und die letzten beiden Codons werden durch die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen verursacht.

Die Oligonukleotide für den PCR Aufbau des synthetischen Gens werden unter Verwendung des öffentlich erhältlichen Softwarewerkzeugs DNAWorks 3.1<sup>2</sup> entworfen und werden durch PCR nach Standardprotokollen aus den 18 Oligos aufgebaut, die in Tabelle 1 und als SEQ ID No. 5 bis SEQ ID No.22<sup>3</sup> dargestellt sind.

1. CCATGGCAAGTTCAGCTGCAGGAAAGCGGTGGCGGCCTG (SEQ ID No. 5)
2. AGACGCAGGCTGCCGCCAGGCTGGACCAGGCCGCCACCGC (SEQ ID No. 6)



3. CGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGTGCGGCCAGCGCCGTACC (SEQ ID No. 7)
4. AGGTGTAGCCGCTATGGTCGCTAAAGGTACGGCCGCTGGC (SEQ ID No. 8)
5. ACCATAGCGGCTACACCTATACCATTGGCTGGTTTCGTCA (SEQ ID No. 9)
6. TCACGTTCTTTTCCTGGCGCCTGACGAAACCAGCCAATGG (SEQ ID No. 10)
7. CGCCAGGAAAAGAACGTGAATTTGTGGCGCGTATTTACTG (SEQ ID No. 11)
8. ATAGGTATTGCCGCTGCTCCAGTAAATACGCGCCACAAAT (SEQ ID No. 12)
9. GAGCAGCGGCAATACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGC (SEQ ID No. 13)
10. TGTCGCGGCTAATCGCGAAACGGCCTTTCACGCTATCCGC (SEQ ID No. 14)
11. GCGATTAGCCGCGACATTGCCAAGAACACGGTAGATCTTA (SEQ ID No. 15)
12. GGCTCCAGGTTGTTTCATCGTAAGATCTACCGTGTTCTTGGC (SEQ ID No. 16)
13. CGATGAACAACCTGGAGCCCGAAGACACAGCCGTGTATTA (SEQ ID No. 17)
14. GCCATCCCGAGCCGCGCAATAATACACGGCTGTGTCTTCG (SEQ ID No. 18)
15. GCGGCTCGGGATGGCATTCCGACCAGCCGTAGCGTGGAAG (SEQ ID No. 19)
16. CCCTGGCCCCAGTAATTGTAGCTTTCACGCTACGGCTGG (SEQ ID No. 20)
17. CAATTACTGGGGCCAGGGCACCCAGGTGACCGTCAGCTCT (SEQ ID No. 21)
18. GCGGCCGCGAGAGCTGACGGTCACCTG (SEQ ID No. 22)

Tabelle 1: Oligonukleotide, die zum Aufbau des synthetischen Gens verwendet werden, das für das manipulierte VHH Gen kodiert.

2

Kurzgefasst werden gleiche Volumina von Oligonukleotidlösungen (jede zu einer Konzentration von ~1 mg/ml) zusammengemischt und mit Wasser auf eine Endkonzentration von ~1 ng/µl für jedes Oligonukleotid verdünnt. Das Oligonukleotidgemisch wird 5-fach mit PCR Lösung verdünnt. Die Endkonzentrationen der Bestandteile betragen 0,2 ng/µl für jedes Oligonukleotid, 20 mM für Tris-HCl (pH 8,8), 10

<sup>2</sup> <http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>

<sup>3</sup> Hoover DM, Lubkowski J.

DNAWorks: an automated method für designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis

Nucleic Acids Re. 2002 May 15; 30(10): e43

mM für KCl, 10 mM für  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6 mM für  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 % (v/v) für Triton X-100, 0,1 mg/ml für Rinderserumalbumin, 0,2 mM für jedes dNTP und 2,5 U für Pfu Polymerase. Das PCR Protokoll für den Genaufbau beginnt mit einem 5 minütigen Denaturierungsschritt bei 95 °C währenddessen die Polymerase zugegeben wird, um einen möglichen Fehlstart zu vermeiden ("Heißstart PCR"). Dieser Schritt wird gefolgt von 25 Zyklen bei einer Denaturierungstemperatur von 95 °C für 30 s, einer Anlagerungstemperatur von 55 °C für 30 s und einer Verlängerungstemperatur von 72 °C für 1,5 min. Der letzte Schritt bei diesem Protokoll ist ein Inkubationszyklus bei 72 °C für 10 min. Zur Genamplifikation wird 1 µl des aus der Genaufbaureaktion resultierenden Gemischs als Vorlage verwendet, wobei die äußersten Oligonukleotide (SEQ ID No. 5 und SEQ ID No. 22) als Starter verwendet werden. Das PCR Protokoll zur Genamplifikation ist im wesentlichen dasselbe wie das zum Genaufbau. Das aufgebaute synthetische VHH Gen wird daraufhin über die NcoI und NotI Restriktionsschnittstellen in den Vektor pET27b (Novagen)<sup>4</sup> kloniert und die Sequenz wird durch DNS Sequenzierung bestätigt.

3

PCR wird dann zur Bildung der randomisierten Bibliothek verwendet. Die Vorlage für die ersten 2 PCR Reaktionen ist das klonierte synthetische VHH Gen wie oben beschrieben.

---

<sup>4</sup><http://www.merckbiosciences.co.uk/product/69863;>

<http://www.novagen.com>

Die Starterpaare für die ersten zwei PCR Reaktionen sind die folgenden: 3esynmu1 (SEQ ID No. 23) und 3esynmu2 (SEQ ID No. 24); 3esynmu3 (SEQ ID No. 25) und 3esyn2 (SEQ ID No. 26). Die resultierenden PCR Produkte werden mit BglII verdaut, ligiert und das Ligationsprodukt wird als Vorlage für eine PCR Reaktion mit den Startern 3esyn1 (SEQ ID No. 27) und 3esyn2 (SEQ ID No. 26) verwendet. Die NNS Codons in den Startern 3esynmu1 (SEQ ID No. 23) und 3esynmu3 (SEQ ID No. 25) führen die randomisierten Positionen in die Sequenz ein. Das Codon NNS (IUPAC Code, worin S C oder G bedeutet) wird ausgewählt, das für alle 20 natürlicherweise vorkommenden Aminosäuren kodiert, welches jedoch 2 von 3 Stopcodons vermeidet. Figur 3 zeigt das Schema der PCR Reaktionen und des Ligationsverfahrens. Horizontale Pfeile geben die Positionen und die Richtungen der PCR Starter an, senkrechte Linien geben die Positionen der NcoI, BglII beziehungsweise NotI Stellen an (von links nach rechts).

Dieses randomisierte PCR Produkt wird daraufhin in den Phagemid Klonierungsvektor pHEN1<sup>5</sup> im Leserahmen mit dem pelB Sekretionssignal über die NcoI Restriktionsschnittstelle kloniert. Die NotI Restriktionsschnittstelle am 3' Ende des Gens setzt die VHH Bibliothek im Leserahmen mit dem für das kleine Hüllprotein (Protein III) des filamentösen Phagen fd kodierenden Gen, welches in dem Vektor pHEN1 enthalten ist, ein.

4

Die manipulierte Sequenz der randomisierten VHH-Bibliotheksinsertion ist als Nukleotidsequenz in SEQ ID No. 28 und translatiert als eine Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 29 angeführt. Der Buchstabe X in SEQ ID No. 29 bezeichnet

---

<sup>5</sup> Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Nucleic Acids Res. 1991 Aug 11; 19(15): 4133-7.

die randomisierten Aminosäurereste.

Das Ligationsprodukt wird dann in *Escherichia coli* TG1 transformiert, die Anzahl der erhaltenen Kolonien wird bestimmt und eine Anzahl ausgewählter Klone wird durch Restriktionsanalyse und durch DNS Sequenzierung kontrolliert. Die folgenden Schritte der Phagenpräparation zur Oberflächenpräsentation werden nach Standardprotokollen ausgeführt. Kurzgefasst wird das Ligationsgemisch in *E. coli* TG1 Zellen durch Elektroporation transformiert. Anschließend werden Phagenpartikel aus *E. coli* TG1 Zellen mit dem Helferphagen M13-K07 befreit. Die Phagenpartikel werden dann aus dem Kulturüberstand mit PEG/NaCl in 2 Schritten gefällt, in Wasser gelöst und zur Selektion durch Panning verwendet, oder sie werden alternativ bei minus 80 °C aufbewahrt.

**Beispiel 3:** Panning der VHH Bibliothek auf menschlichem Serumalbumin

3 Panning-Runden werden nach Standardprotokollen ausgeführt. (z.B. Phage display of peptides and antibodies: a laboratory manual, Kay et al., 1996, Academic Press, San Diego, Calif.). Kurzgefasst wird das folgende Verfahren angewandt. Maxisorp Platten mit 96 Vertiefungen (Nunc) werden mit HSA beschichtet. 200 µl der folgenden Lösung werden pro Vertiefung zugegeben: 0,1 M Na-carbonatpuffer, pH 9,6, mit den folgenden Konzentrationen an HSA: 1. Panning-Runde: 2 mg/ml HSA; 2. Panning-Runde: 1 mg/ml HSA; 3. Panning-Runde: 1 mg/ml HSA. Die Inkubation erfolgt für 1 Stunde bei 37 °C, gefolgt durch ein Blocken mit 2 % Trockenmilch (M-PBS) mit 200 µl pro Vertiefung eine Stunde lang bei Raumtemperatur. Die Oberflächenpräsentations-Phagenbibliothek wird daraufhin mit dem gebundenen HSA durch Zugabe von 100 µl Phagensuspension und 100 µl 4 % Trockenmilch (M-PBS) reagieren gelassen, gefolgt von einer

Inkubation für 45 Minuten unter Schütteln und für 90 Minuten ohne Schütteln bei Raumtemperatur.

Ungebundene Phagenpartikel werden wie folgt abgewaschen.

Nach der 1. Panning-Runde: 10 x 300 µl T-PBS, 5 x 300 µl PBS; nach der 2. Panning-Runde: 15 x 300 µl T-PBS; 10 x 300 µl PBS; nach der 3. Panning-Runde: 20 x 300 µl T-PBS, 20 x 300 µl PBS.

Die Eluierung gebundener Phagenpartikel wird durch Zugabe von 200 µl 0,1 M Glycin, pH 2,2 pro Vertiefung und Inkubation unter Schütteln 30 Minuten lang bei Raumtemperatur durchgeführt. Daraufhin wird die Phagensuspension durch Zugabe von 60 µl 2 M Tris-Base neutralisiert, gefolgt von einer Infektion von E. coli TG1 Zellen durch Mischen von 10 ml einer exponentiell wachsenden Kultur mit 0,5 ml eluierten Phagen und einer Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C. Schließlich werden die infizierten Bakterien auf TYE Medium mit 1 % Glukose und 100 µg /ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert.

**Beispiel 4:** Klonierung ausgewählter, gegen HSA selektierter Klone von VHH Mutanten zur löslichen Expression

Phagemid DNS aus dem durch die 3 Panning-Runden ausgewählten Phagen wird mit einer Midi-Prep isoliert. DNS, welche für die mutierten VHH Domänenregionen kodiert, wird in einem Ansatz mit PCR amplifiziert und über NcoI-NotI in den Vektor pNOTBAD/Myc-His kloniert, wobei es sich um den E. coli Expressionsvektor pBAD/Myc-His (Invitrogen) mit einer eingefügten NotI Restriktionsschnittstelle zur leichteren Klonierung handelt. Die ligierten Konstrukte werden in E. coli LMG194 Zellen (Invitrogen) durch Elektroporation transformiert und über Nacht bei 30 °C auf TYE Medium mit 1 % Glukose und Ampicillin angezogen. Ausgewählte Klone werden in 200 µl 2xYT Medium mit

Ampicillin inokuliert, über Nacht bei 30 °C angezogen und durch Zugabe von L-Arabinose zu einer Endkonzentration von 0,1 % induziert. Nach einer Expression bei 16 °C über Nacht werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mit 100 µl Na-boratpuffer, pH 8,0 bei 4 °C über Nacht zur Herstellung periplasmatischer Extrakte behandelt. 50 µl der periplasmatischen Extrakte werden in einem ELISA verwendet (siehe unten).

**Beispiel 5:** ELISA von gegen HSA selektierten VHH Mutanten

Die periplasmatischen Extrakte der auf Bindung an menschliches Serumalbumin selektierten VHH Mutanten werden in einem ELISA nach dem folgenden Protokoll getestet:

Beschichtung: Mikrotiterplatte (Nunc, Maxisorp), 100 µl pro Vertiefung, 100 µg HSA /ml in PBS, über Nacht bei 4 °C.

Waschen: 3 x 200 µl PBS

Blocken: 1 % Blocker Casein in PBS (Pierce), 1h bei RT

Waschen: 3 x 200 µl PBS

Bindung des periplasmatischen Extrakts: 50 µl periplasmatisches Extrakt (Beispiel 4), 50 µl PBS 0,05 % Tween 20, bei Raumtemperatur über Nacht

Waschen: 3 x 200 µl PBS

Erster Antikörper: Anti-His4 (Quiagen), 1:1000 in PBS 0,05 % Tween 20, 90 min bei RT, 100 µl pro Vertiefung

Waschen: 3 x 200 µl PBS

Zweiter Antikörper: Ziegen Anti-Maus\*HRP (SIGMA), 1:1000 in PBS 0,05 % Tween 20, 90 min bei RT (Raumtemperatur), 100 µl pro Vertiefung

Waschen: 3 x 200 µl PBS

Nachweis: 3 mg/ml OPD in Na-citrat/phosphatpuffer, pH 4,5, 0,4 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Stoppen bevor der Hintergrund zu stark wird: 100 µl 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Gemessene Absorption: 492/620 nm

**Beispiel 6:** Beispiel einer Bibliothek, in der nur eine Schleife randomisiert ist: die C''D Schleife

Das synthetische Gen, das für das manipulierte VHH Gen wie oben beschrieben in Beispiel 2 kodiert, wird als Vorlage für zwei PCR Reaktionen verwendet, bei denen die folgenden Starterpaare verwendet werden: SEQ ID No. 30 (esynmu4) zusammen mit SEQ ID No. 26 (3esyn2) sowie SEQ ID No. 31 (3esynmu5) zusammen mit SEQ ID No. 27 (3esyn1). Die resultierenden PCR Produkte werden mit XhoI verdaut, ligiert, und das Ligationsprodukt wird als Vorlage für die PCR Reaktion mit den Startern 3esyn1 (SEQ ID No. 27) und 3esyn2 (SEQ ID No. 26) verwendet. Die NNS Codons in den Startern 3esynmu4 (SEQ ID No. 30) und 3esynmu5 (SEQ ID No. 31) führen die randomisierten Positionen in die Sequenz ein, ähnlich wie in Beispiel 2 beschrieben. Figur 4 zeigt das Schema der PCR Reaktionen und des Ligationsverfahrens. Horizontale Pfeile geben die Positionen und die Richtungen der PCR Starter an, senkrechte Linien geben die Positionen der NcoI, XhoI beziehungsweise NotI Stellen an (von links nach rechts).

Dieses randomisierte PCR Produkt wird daraufhin in den Phagemid Klonierungsvektor pHEN1<sup>6</sup> im Leserahmen mit dem pelB Sekretionssignal und dem kleinen Hüllprotein (Protein III) des filamentösen Phagen fd, welches in dem Vektor pHEN1 enthalten ist, wie in Beispiel 2 beschrieben kloniert. Die manipulierte Sequenz der randomisierten VHH-Bibliotheksinserion ist als eine Nukleotidsequenz in SEQ ID No. 32 und translatiert als eine Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 33 angeführt. Der Buchstabe X in SEQ ID No. 33 bezeichnet die randomisierten Aminosäurereste.

Das Ligationsprodukt wird dann in Escherichia coli TG1 transformiert, die Anzahl der erhaltenen Kolonien wird

bestimmt und eine Anzahl ausgewählter Klone wird durch Restriktionsanalyse und durch DNS Sequenzierung kontrolliert. Die folgenden Schritte der Phagenpräparation zur Oberflächenpräsentation werden nach Standardprotokollen ausgeführt, wie in Beispiel 2 beschrieben. Die Schritte des Pannings, der Selektion und der Charakterisierung spezifisch bindender Klone werden im wesentlichen wie in den Beispielen 3, 4 und 5 beschrieben durchgeführt.

5

**Beispiel 7:** Beispiel einer Bibliothek in der drei Schleifen randomisiert sind: die AB, die EF und die C''D Schleife

Die Bibliothek mit den randomisierten Resten in der AB Schleife und in der EF Schleife wie in Beispiel 2 beschrieben wird als Vorlage für eine PCR verwendet, bei der dieselben Starter wie in Beispiel 6 verwendet werden: SEQ ID No. 30 (esynmu4) zusammen mit SEQ ID No. 26 (3esyn2) sowie SEQ ID No. 31 (3esynmu5) zusammen mit SEQ ID No. 27 (3esyn1). Die folgenden Schritte der Herstellung der Bibliothek, Klonierung, "Panning", Selektion und Charakterisierung der spezifisch bindenden Klone werden im wesentlichen wie in den Beispielen 2, 3, 4 und 5 beschrieben ausgeführt.

**Beispiel 8:** Vergleich von Bibliotheken variabler Domänen mit randomisierten Aminosäurepositionen in einer, zwei und drei Strukturschleifen

Die Bibliotheken werden zum Panning mit zahlreichen

---

<sup>6</sup> Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Nucleic Acids Res. 1991 Aug 11; 19(15): 4133-7.



Antigenen verwendet.

Hühnerei-Lysozym als Antigen:

Es werden drei Panning-Runden durchgeführt. Maxisorp Platten mit 96 Vertiefungen (Nunc) werden mit Hühnerei-Lysozym durch Zugabe der folgenden Lösung pro Vertiefung beschichtet:

PBS mit den folgenden Konzentrationen an gelöstem Hühnerei-Lysozym (HEL):

1. Panning-Runde: 2 mg/ml HEL
2. Panning-Runde: 1 mg/ml HEL
3. Panning-Runde: 1 mg/ml HEL

Die Inkubation erfolgt für 1 Stunde bei 37 °C, gefolgt durch ein Blocken mit 2 % Trockenmilch (M-PBS) mit 200 µl pro Vertiefung eine Stunde lang bei Raumtemperatur.

Die Oberflächenpräsentations-Phagenbibliothek wird daraufhin mit dem gebundenen Hühnerei-Lysozym durch Zugabe von 100 µl Phagensuspension und 100 µl 4 % Trockenmilch (M-PBS) reagieren gelassen, gefolgt von einer Inkubation für 45 Minuten unter Schütteln und für 90 Minuten ohne Schütteln bei Raumtemperatur.

Ungebundene Phagenpartikel wurden wie folgt abgewaschen.

1. Panning-Runde: 10 x 300 µl T-PBS, 5 x 300 µl PBS
2. Panning-Runde: 15 x 300 µl T-PBS; 10 x 300 µl PBS
3. Panning-Runde: 20 x 300 µl T-PBS, 20 x 300 µl PBS.

Die Eluierung gebundener Phagenpartikel wird durch Zugabe von 200 µl 0,1 M Glycin, pH 2.2 pro Vertiefung und Inkubation unter Schütteln 30 Minuten lang bei Raumtemperatur durchgeführt. Daraufhin wird die Phagensuspension durch Zugabe von 60 µl 2 M Tris-Base neutralisiert, gefolgt von einer Infektion von E. coli TG1 Zellen durch Mischen von 10 ml einer exponentiell wachsenden Kultur mit 0,5 ml eluierten Phagen und einer

Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C. Schließlich werden die infizierten Bakterien auf TYE Medium mit 1 % Glukose und 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert.

#### Menschliches Serumalbumin als Antigen:

Die Bibliotheken der Beispiele 2, 6 und 7 werden in Panning-Runden wie oben beschrieben verwendet. Speziell werden die Phagenbibliotheken in Bindungspuffer (PBS, 1 % Ovalbumin, 0,005 % Tween 20) suspendiert und gegen direkt auf Maxisorp Platten immobilisiertes menschliches Serumalbumin "gepannt" (10 Mikrogramm/ml in PBS, über Nacht bei 4 °C; die Platten werden mit Blocker Casein (Pierce) geblockt). Nach 2 Stunden werden ungebundene Phagen durch wiederholtes Waschen (PBS, 0,05 % Tween 20) entfernt und gebundene Phagen werden mit 500 mM KCL, 10 mM HCl, pH 2 eluiert.

Nach jeder HSA-spezifischen Panning-Runde werden die resultierenden Klone selektiert oder auf Bindung an TNF-alpha getestet. Die Selektion und der Test auf TNF-alpha Spezifität werden wie in Beispiel 1 von WO2004/041862 beschrieben durchgeführt.

#### FcRn als Antigen:

Das Panning wird wie in WO2060919, Beispiel 6.2 beschrieben durchgeführt. Kurzgefasst werden Phagenbibliotheken in 5 ml 20 mM MES, pH 6,0/5 % Magermilch/0,05 % Tween 20 resuspendiert und zu 20 Vertiefungen einer Maxisorp Immunoplatte (Nunc), die zuvor mit 1 Mikrogramm Mäuse FcRn beschichtet und mit 5 % Magermilch geblockt wurde, zugegeben (100 Mikroliter von  $5 \times 10^{12}$  PFU/ml/Vertiefung). Nach Inkubation für zwei 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 Mikrolitern PBS, pH 7,4/Vertiefung 30 min lang bei 37 °C eluiert. Die Phagen werden dazu verwendet, exponentiell wachsende E. coli TG1 wie in Beispiel 3 beschrieben wieder zu infizieren.

Nach jeder Panning-Runde auf FcRn werden die resultierenden Klone selektiert oder auf Bindung an TNF-alpha wie oben beschrieben getestet.

Fc-gamma Rezeptoren als Antigene:

Das Panning gegen rekombinante Fusionsproteine von Fc-gammaRI, Fc-gammaRIIA und Fc-gammaRIIA wird wie in Berntzen et al. (2006) Proetin Eng des Sel. 19: 121-128 beschrieben durchgeführt. Nach jeder Panning-Runde auf einen Fc-Rezeptor werden die resultierenden Klone selektiert oder auf Bindung an TNF-alpha wie oben beschrieben getestet.

#### **Beispiel 9:**

Dieses Beispiel zeigt die Möglichkeit, neue Funktionen oder zusätzliche Bindungseigenschaften in ein Antikörperfragment einzuführen. Das als Ausgangspunkt für die Veränderung verwendete Molekül ist das einzelkettige Antikörperfragment sFv 26-10 aus der Maus (Huston et al. (1998) Proc Natl Acad Sci. USA 85: 5879-5883).

Es werden fünf verschiedene Bibliotheken hergestellt, um unterschiedliche Strukturschleifensequenzen durch zufällige Aminosäuresequenzen zu verändern:

Bibliothek 26-10-1:

EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKSSGYIFTDFYMNWVRQSHGKSLDYIGYISPYSQVTVG  
YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAGSSGNKWAMDYWGHGASVTVS  
SGGGGSGGGGSGGGGSDVVMVTQTPLSLPVSLGDAQISCRSSQSLVHSNGNTYLNWYLQ  
KAGQSPKLLIYKVSNRFSGXXXXFSGSGSGTDFTLKISXXXXXXXXXGIYFCSQTTHVPPT  
FGGGTKLEIKR

## Bibliothek 26-10-2:

EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKSSGYIFTDFYMNWVRQSHGKSLDYIGYISPYSGVTG  
YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAGSSGNKWAMDYWGHGASVTVS  
SGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPXXXXXQASISCRSSQSLVHSNGNTYLNWYLQ  
KAGQSPKLLIYKVSNRFSGXGXXFSGSGSGTDFTLKISXXXXXXXXGIYFCSQTTHVPPT  
FGGGTKLEIKR

## Bibliothek 26-10-3:

EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKSSGYIFTDFYMNWVRQSHGKSLDYIGYISPYSGVTG  
YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAGSSGNKWAMDYWGHGASVTVS  
SGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPXXXXXQASISCRSSQSLVHSNGNTYLNWYLQ  
KAGQSPKLLIYKVSNRFSGXVPDRFSGSGSGTDFTLKISXXXXXXXXGIYFCSQTTHVPP  
TFGGGTKLEIKR

## Bibliothek 26-10-4:

EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKSSGYIFTDFYMNWVRQSHGKSLDYIGYISPYSGVTG  
YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAGSSGNKWAMDYWGHGASVTVS  
SGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLNWYLQ  
KAGQSPKLLIYKVSNRFSGXGXXXXXFSGSGSGTDFTLKISXXXXXXXXGIYFCSQTTHV  
PPTFGGGTKLEIKR

## Bibliothek 26-10-5:

EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKSSGYIFTDFYMNWVRQXXXXXXDYIGYISPYSGVTG  
YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAGSSGNKWAMDYWGHGASVTVS  
SGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLNWYLQ  
XXXXXXXXKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQTTHVPPT  
FGGGTKLEIKR

Die Bibliotheken werden durch reverse Translation der Sequenzen hergestellt, wobei die randomisierten Aminosäurepositionen durch das Nukleotidtriplett NNK kodiert werden.

## Bibliothek 26-10-1 Gen:

GAAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGTCCGGAAGTGGTTAAACCGGGTGCTTCTGTTCGTAT  
GTCTTGCAAATCTTCTGGTTACATCTTCACCGACTTCTACATGAACTGGGTTCGTCAGT

CTCACGGTAAATCTCTGGACTACATCGGTTACATCTCTCCGTACTCTGGTGTTACCGGT  
TACAACCAGAAATTCAAAGGTAAAGCTACCCTGACCGTTGACAAATCTTCTTCTACCGC  
TTACATGGAAGTGC GTTCTCTGACCTCTGAAGACTCTGCTGTTTACTACTGCGCTGGTT  
CTTCTGGTAACAAATGGGCTATGGACTACTGGGGTCACGGTGCTTCTGTTACCGTTTCT  
TCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGACGTTGTTAT  
GACCCAGACCCCGCTGTCTCTGCCGTTTCTCTGGGTGACCAGGCTTCTATCTCTTGCC  
GTTCTTCTCAGTCTCTGGTTCACCTCTAACGGTAACACCTACCTGAACTGGTACCTGCAG  
AAAGCTGGTCAGTCTCCGAAACTGCTGATCTACAAAGTTTCTAACCGTTTCTCTGGTNN  
KNNKNNKNNKTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGTACCGACTTCACCCTGAAAATCTCTNNKN  
NKNKNNKNNKNNKNNKNNKGGTATCTACTTCTGCTCTCAGACCACCCACGTTCCGCCGACC  
TTCGGTGGTGGTACCAAACCTGGAAATCAAACGT

Bibliothek 26-10-2 Gen:

GAAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGTCCGGAACCTGGTTAAACCGGGTGCTTCTGTTTCGTAT  
GTCTTGCAAATCTTCTGGTTACATCTTCACCGACTTCTACATGAACTGGGTTCGTCAGT  
CTCACGGTAAATCTCTGGACTACATCGGTTACATCTCTCCGTACTCTGGTGTTACCGGT  
TACAACCAGAAATTCAAAGGTAAAGCTACCCTGACCGTTGACAAATCTTCTTCTACCGC  
TTACATGGAAGTGC GTTCTCTGACCTCTGAAGACTCTGCTGTTTACTACTGCGCTGGTT  
CTTCTGGTAACAAATGGGCTATGGACTACTGGGGTCACGGTGCTTCTGTTACCGTTTCT  
TCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGACGTTGTTAT  
GACCCAGACCCCGCTGTCTCTGCCGNNKNNKNNKNNKNNKNCAGGCTTCTATCTCTTGCC  
GTTCTTCTCAGTCTCTGGTTCACCTCTAACGGTAACACCTACCTGAACTGGTACCTGCAG  
AAAGCTGGTCAGTCTCCGAAACTGCTGATCTACAAAGTTTCTAACCGTTTCTCTGGTNN  
KNNKNNKNNKTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGTACCGACTTCACCCTGAAAATCTCTNNKN  
NKNKNNKNNKNNKNNKNNKGGTATCTACTTCTGCTCTCAGACCACCCACGTTCCGCCGACC  
TTCGGTGGTGGTACCAAACCTGGAAATCAAACGT

Bibliothek 26-10-3 Gen:

GAAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGTCCGGAACCTGGTTAAACCGGGTGCTTCTGTTTCGTAT  
GTCTTGCAAATCTTCTGGTTACATCTTCACCGACTTCTACATGAACTGGGTTCGTCAGT  
CTCACGGTAAATCTCTGGACTACATCGGTTACATCTCTCCGTACTCTGGTGTTACCGGT  
TACAACCAGAAATTCAAAGGTAAAGCTACCCTGACCGTTGACAAATCTTCTTCTACCGC  
TTACATGGAAGTGC GTTCTCTGACCTCTGAAGACTCTGCTGTTTACTACTGCGCTGGTT  
CTTCTGGTAACAAATGGGCTATGGACTACTGGGGTCACGGTGCTTCTGTTACCGTTTCT  
TCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGACGTTGTTAT  
GACCCAGACCCCGCTGTCTCTGCCGNNKNNKNNKNNKNNKNCAGGCTTCTATCTCTTGCC  
GTTCTTCTCAGTCTCTGGTTCACCTCTAACGGTAACACCTACCTGAACTGGTACCTGCAG

AAAGCTGGTCAGTCTCCGAACTGCTGATCTACAAAGTTTCTAACCGTTTCTCTGGTGT  
TCCGGACCGTTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGTACCGACTTCACCCTGAAAATCTCTNNKN  
NKNKNKNKNKNKNKNKGGTATCTACTTCTGCTCTCAGACCACCCACGTTCCGCCGACC  
TTCGGTGGTGGTACCAAACCTGGAAATCAAACGT

Bibliothek 26-10-4 Gen:

GAAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGTCCGGAACCTGGTTAAACCGGGTGCTTCTGTTTCGTAT  
GTCTTGCAAATCTTCTGGTTACATCTTCACCGACTTCTACATGAACTGGGTTCGTCAGT  
CTCACGGTAAATCTCTGGACTACATCGGTTACATCTCTCCGTACTCTGGTGTTACCGGT  
TACAACCAGAAATTCAAAGGTAAAGCTACCCTGACCGTTGACAAATCTTCTTCTACCGC  
TTACATGGAACCTGCGTTCTCTGACCTCTGAAGACTCTGCTGTTTACTACTGCGCTGGTT  
CTTCTGGTAACAAATGGGCTATGGACTACTGGGGTCACGGTGCTTCTGTTACCGTTTCT  
TCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGACGTTGTTAT  
GACCCAGACCCCGCTGTCTCTGCCGGTTTCTCTGGGTGACCAGGCTTCTATCTCTTGCC  
GTTCTTCTCAGTCTCTGGTTCACCTCTAACGGTAACACCTACCTGAACTGGTACCTGCAG  
AAAGCTGGTCAGTCTCCGAACTGCTGATCTACAAAGTTTCTAACCGTTTCTCTGGTNN  
KNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGTACCGACTTCACCCTGAAAA  
TCTCTNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKGGTATCTACTTCTGCTCTCAGACCACCCACGTT  
CCGCCGACCTTCGGTGGTGGTACCAAACCTGGAAATCAAACGT

Bibliothek 26-10-5 Gen:

GAAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGTCCGGAACCTGGTTAAACCGGGTGCTTCTGTTTCGTAT  
GTCTTGCAAATCTTCTGGTTACATCTTCACCGACTTCTACATGAACTGGGTTCGTCAGN  
NKNKNKNKNKNKNKNKNKGACTACATCGGTTACATCTCTCCGTACTCTGGTGTTACCGGT  
TACAACCAGAAATTCAAAGGTAAAGCTACCCTGACCGTTGACAAATCTTCTTCTACCGC  
TTACATGGAACCTGCGTTCTCTGACCTCTGAAGACTCTGCTGTTTACTACTGCGCTGGTT  
CTTCTGGTAACAAATGGGCTATGGACTACTGGGGTCACGGTGCTTCTGTTACCGTTTCT  
TCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGACGTTGTTAT  
GACCCAGACCCCGCTGTCTCTGCCGGTTTCTCTGGGTGACCAGGCTTCTATCTCTTGCC  
GTTCTTCTCAGTCTCTGGTTCACCTCTAACGGTAACACCTACCTGAACTGGTACCTGCAG  
NNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKAAACTGCTGATCTACAAAGTTTCTAACCGTTTCTCTGGTGT  
TCCGGACCGTTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGTACCGACTTCACCCTGAAAATCTCTCGTG  
TTGAAGCTGAAGACCTGGGTATCTACTTCTGCTCTCAGACCACCCACGTTCCGCCGACC  
TTCGGTGGTGGTACCAAACCTGGAAATCAAACGT

Die jeweiligen Gene werden mit chemisch synthetisierten

Oligonukleotiden aufgebaut und in einen Phagenpräsentationsvektor zur Phagenoberflächenpräsentation wie oben beschrieben kloniert, mit allen erforderlichen Anpassungen, um eine Translation im Leserahmen eines Leader-Peptids, der scFv-Variante und des Hüllproteins III des Phagen zu erhalten.

Die phagenpräsentierten Bibliotheken werden wie in Beispiel 8 beschrieben auf Bindung an menschliches Serumalbumin, Lysozym, FcRn und Fc-gamma Rezeptoren selektiert.

Alternativ werden die Gene mit dem Vektor pRDV analog des in Binz et al. (2005) Nat Biotechnol. 22: 575-582 beschriebenen Verfahrens ligiert und auf menschliches Serumalbumin, Fc-Rezeptoren und Lysozym gemäß der in Schaffitzel et al. (1999) J Immunol Methods 231: 119-135 beschriebenen Verfahrensweise "gepannt".

#### **Beispiel 10:**

Ein menschlicher Antikörper, 2F5, der spezifisch für das HIV-Peptid ELDKWA ist, wird als Gerüst zur Randomisierung von Strukturschleifen verwendet und als scFv exprimiert. Die Expression und die Konstruktion des Phagenpräsentationsvektors wird wie in Beispiel 9 beschrieben durchgeführt. Die Phagenselektion wird entsprechend durchgeführt.

Die Wildtyp-scFv Sequenz und die betreffenden Bibliotheken sind in den Figuren 5 bis 8 dargestellt.

**Beschreibung der Figuren**

Figur 1: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen von SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 2.

Figur 2: Nukleotidesequenz, welche für das synthetische Gen kodiert, das für die Anti-TNF-alpha Kamel-VHH-Domäne kodiert, sowie die Übersetzung in den einstelligen Aminosäuren-Code. Die zur Klonierung verwendeten Restriktionschnittstellen sind in der Nukleotidsequenz unterstrichen. Die in der Bibliothek zu randomisierenden Aminosäurenreste sind in der Aminosäuresequenz unterstrichen. (Eingeführte Aminosäuren sind in dieser Sequenz nicht angeführt.)

Figur 3 zeigt das Schema der PCR Reaktionen und des Ligationsverfahrens. Horizontale Pfeile geben die Positionen und Richtungen der PCR Starter an, senkrechte Pfeile geben die Positionen der NcoI, BglII beziehungsweise NotI Stellen an (von links nach rechts).

Figur 4: Schema der PCR Reaktionen, die zum Aufbau der in Beispiel 6 beschriebenen Bibliothek verwendet werden.

Figur 5: scFv 2F5 wt synthetische Genbibliothek 1 (VH-Linker-VL) und Übersetzung, zwei randomisierte Strukturschleifen

Figur 6: scFv 2F5 wt synthetische Genbibliothek 2 (VH-Linker-VL) und Übersetzung, zwei randomisierte Strukturschleifen

Figur 7: scFv 2F5 wt synthetische Genbibliothek 3 (VH-Linker-VL) und Übersetzung, drei randomisierte Strukturschleifen

Figur 8: scFv 2F5 Wildtyp synthetisches Gen mit Übersetzung



010690

- 95 -

(VH-Linker-VL)

NACHGEREICHT

010690

ANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Manipulation eines Immunglobulins, das mindestens eine Veränderung in jeder von mindestens zwei Strukturschleifenregionen in einer variablen Domäne des Immunglobulins umfasst und zur Bestimmung der Bindung des Immunglobulins an ein Epitop eines Antigens, wobei das unveränderte Immunglobulin im wesentlichen nicht an das Epitop bindet, welches die Schritte umfasst:
  - Bereitstellung einer Nukleinsäure, die für ein Immunglobulin kodiert, welches mindestens zwei Strukturschleifenregionen umfasst,
  - Veränderung mindestens eines Nukleotidrests jedes der mindestens zwei Strukturschleifenregionen,
  - Übertragung der veränderten Nukleinsäure in ein Expressionssystem,
  - Expression des veränderten Immunglobulins,
  - Kontaktierung des exprimierten veränderten Immunglobulins mit einem Epitop und
  - Bestimmung, ob das veränderte Immunglobulin an das Epitop bindet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Immunglobulin spezifisch an mindestens zwei unterschiedliche Epitope bindet.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Immunglobulin aus dem Menschen, dem Kamel oder der Maus stammt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die variable Domäne ausgewählt ist aus der Gruppe von VH, Vkappa, Vlamba, VHH und Kombinationen davon.

**NACHGEREICHT**

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die veränderten Schleifenregionen einer VH, einer Vkappa, einer Vlamba oder einer VHH mindestens eine Veränderung in den Aminosäuren 7 bis 21, Aminosäuren 25 bis 39, Aminosäuren 41 bis 81, Aminosäuren 83 bis 85, Aminosäuren 89 bis 103 oder Aminosäuren 106 bis 117 umfassen, wobei die Nummerierung der Aminosäurepositionen der Domänen der IMGT entspricht.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Schleifenregionen von VH oder Vkappa oder Vlamba aus dem Menschen mindestens eine Veränderung in den Aminosäuren 8 bis 20, Aminosäuren 44 bis 50, Aminosäuren 67 bis 76 und Aminosäuren 89 bis 101 umfassen, insbesondere den Aminosäurenpositionen 12 bis 17, Aminosäurepositionen 45 bis 50, Aminosäurepositionen 69 bis 75 und Aminosäurepositionen 93 bis 98, wobei die Nummerierung der Aminosäurepositionen der Domänen der IMGT entspricht.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Schleifenregionen von VH aus der Maus mindestens eine Veränderung in den Aminosäuren 6 bis 20, Aminosäuren 44 bis 52, Aminosäuren 67 bis 76 und Aminosäuren 92 bis 101 umfassen, wobei die Nummerierung der Aminosäurepositionen der Domänen der IMGT entspricht.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die veränderten Schleifenregionen einer VHH aus dem Kamel mindestens eine Veränderung in den Aminosäuren 7 bis 18, Aminosäuren 43 bis 55, Aminosäuren 68 bis 75 und Aminosäuren 91 bis 101 umfassen, wobei die Nummerierung der Aminosäurepositionen der Domänen der IMGT entspricht.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das veränderte Immunglobulin ferner mit einem oder mehreren veränderten Immunglobulinen oder mit unveränderten Immunglobulinen oder Teilen davon kombiniert ist, um ein KombinationsImmunglobulin zu erhalten.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Immunglobuline durch Rekombinationstechniken kombiniert sind.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Veränderung mindestens eines Nukleotids einer Nukleinsäure zu einer Substitution, Deletion und/oder Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren des durch die Nukleinsäure kodierten Immunglobulins führt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Aminosäure jeder von mindestens zwei Strukturschleifenregionen durch ortsgerichtete Zufallsmutation verändert wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das zufällig veränderte Nukleinsäuremolekül mindestens eine Nukleotid-Wiederholungseinheit umfasst, welche die Sequenz 5' -NNS- 3', 5' -NNN- 3' oder 5' -NNK- 3' aufweist.
14. Verwendung eines durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13 erhältlichen Immunglobulins zur Herstellung einer Proteinbibliothek von Immunglobulinen.
15. Bibliothek, die mindestens 10 durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13 erhältliche

010690

- 4 -

Immunglobuline mit einer Veränderung in mindestens zwei Strukturschleifenregionen umfasst.

16. Bibliothek nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass sie Immunglobuline mit Mutationen von mindestens 4 Aminosäurepositionen in mindestens zwei Strukturschleifenregionen enthält.
17. Bibliothek nach einem der Ansprüche 15 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens 10 variable Domänen von Immunglobulinen mit Veränderungen in den Strukturschleifenregionen enthält.
18. Bibliothek nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass sie Immunglobuline enthält, die mindestens zwei veränderte variable Domänen mit mindestens einer Veränderung in den Strukturschleifenregionen jeder Domäne aufweist.
19. Bibliothek nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass sie Immunglobuline mit mindestens 4 Veränderungen in mindestens zwei Strukturschleifenregionen enthält.
20. Bibliothek nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens 10 veränderte einzelkettige Immunglobuline mit mindestens zwei Veränderungen in den Strukturschleifenregionen jedes einzelkettigen Immungglobulins enthält.
21. Bibliothek nach einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens 10 veränderte VHH Domänen mit mindestens zwei Veränderungen in den Strukturschleifenregionen jeder VHH Domäne enthält.
22. Bibliothek nach einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens 10 veränderte

NACHGEZUGT

010590

- 5 -

menschliche Antikörper mit mindestens zwei Veränderungen in den Strukturschleifenregionen jedes menschlichen Antikörpers enthält.

23. Bibliothek nach einem der Ansprüche 15 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens 10 veränderte Fab Fragmente mit mindestens zwei Veränderungen in den Strukturschleifenregionen jedes Fab Fragments enthält.
24. Bibliothek nach einem der Ansprüche 15 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass sie Immunglobuline ausgewählt aus der Gruppe von VH, Vkappa, Vlamba und VHH umfasst.
25. Verändertes Immunglobulin erhältlich nach dem Verfahren eines der Ansprüche 1 bis 13, das eine Bindungsstelle aufweist, welche durch mindestens zwei Veränderungen in den Strukturschleifenregionen spezifisch für ein Antigen ist.
26. Verändertes Immunglobulin nach Anspruch 25, wobei das Antigen menschliches Serumalbumin ist.
27. Verändertes Immunglobulin nach Anspruch 25, wobei das Antigen ein Fc-Rezeptor ist.
28. Verfahren zur spezifischen Bindung und/oder zum Nachweis eines Moleküls, welches die Schritte umfasst:
  - In Kontakt bringen einer Bibliothek veränderter Immunglobuline nach einem der Ansprüche 15 bis 24 oder eines Immunglobulins, das durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13 erhältlich ist, mit einer Testprobe, welche das Molekül enthält und wahlweise
  - Nachweis der potentiellen Bildung eines spezifischen Immunglobulin/Molekül-Komplexes.

NACHGEFERTIGT

29. Verfahren zur spezifischen Isolierung eines veränderten Immunglobulins, das an ein Molekül bindet, welches die Schritte umfasst:
- In Kontakt bringen einer Bibliothek veränderter Immunglobuline nach einem der Ansprüche 15 bis 24 oder eines veränderten Immunglobulins, das durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13 erhältlich ist, mit einer Probe, welche das Molekül enthält,
  - Abtrennung des gebildeten spezifischen Komplexes aus verändertem Immunglobulin und dem Molekül sowie
  - wahlweise Isolierung des veränderten Immunglobulins aus dem Komplex.
30. Kit von Bindungspartnern, welcher enthält
- eine Bibliothek veränderter Immunglobuline nach einem der Ansprüche 15 bis 24 oder ein verändertes Immunglobulin, das durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13 erhalten wurde sowie
  - ein Bindungsmolekül, das ein Epitop eines Antigens enthält.
31. Verwendung eines Bindungsmoleküls eines Kits nach Anspruch 30 zur Selektion eines veränderten Immunglobulins aus einer Bibliothek nach einem der Ansprüche 15 bis 24.
32. Polypeptidvariante einer variablen Domäne, die mindestens zwei veränderte Strukturschleifen umfasst, wobei mindestens eine Aminosäure jeder veränderten Strukturschleife ausgewählt ist aus der Gruppe der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Histidin, Isoleucin, Serin, Methionin, Alanin und Asparagin.

33. Polypeptidvariante einer variablen Domäne nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine veränderte Strukturschleife mindestens zwei dieser Aminosäuren enthält.
34. Polypeptidvariante einer variablen Domäne nach einem der Ansprüche 32 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass sie vom Menschen stammt oder eine humanisierte Polypeptidvariante einer variablen Domäne ist und dass sie mindestens ein Tyrosin in einer der Positionen 12 bis 17, 45 bis 50, 69 bis 75 und 93 bis 98 und/oder mindestens ein Tryptophan in einer der Positionen 12 bis 17, 45 bis 50, 69, 71 bis 75, 93 bis 94 und 96 bis 98 und/oder mindestens ein Histidin in einer der Positionen 12 bis 17, 46, 47, 49, 50, 69 bis 74 und 93 bis 98 und/oder mindestens ein Asparagin in einer der Positionen 12 bis 17, 45 bis 47, 49, 50, 70 bis 73, 75, 94 bis 96 und 98 und/oder mindestens ein Methionin in einer der Positionen 12 bis 17, 46 bis 50, 69 bis 71, 73 bis 75, 93, 95, 96 und 98 und/oder mindestens ein Serin in einer der Positionen 13, 71, 75, 94, 95 und 98 und/oder mindestens ein Isoleucin in einer der Positionen 12, 14 bis 17, 45 bis 50, 69, 70, 72 bis 75, 93 und 96 bis 98 und/oder mindestens ein Phenylalanin in einer der Positionen 15, 46, 48, 70 bis 73, 75, 93, 95 und 98 umfasst.



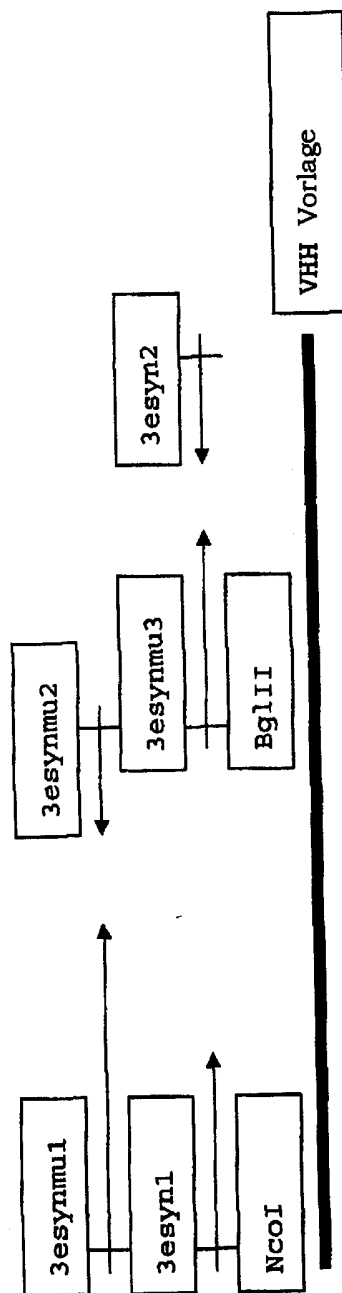
|         |     |   |     |
|---------|-----|---|-----|
| Anfrage | 2   | VQLQESGGCLVQPGGSLRLSCAASGRFTSDHSGYTYTICWFRQAPGKEREFVARIYWSSG  | 61  |
|         |     | VQL ESGGG VQ GGSLRLSCAASG S + +GWFRQAPGKERE VA + + G          |     |
| Sbjkt   | 2   | VQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYIASINY-----LGWFRQAPGKEREGVAAVSPAGG  | 56  |
| Anfrage | 62  | NTYYADSVKGRFPAISRDIAKNTVDLTMMNLEPEDTAVYYC-AARDGIPTSRSVESYNYWG | 120 |
|         |     | YYADSVKGRP +S D A+NTV L MN+L+PEDTA+YYC AAR G + YNYWG          |     |
| Sbjkt   | 57  | TPYYADSVKGRFTVSLDNAENTVYLQMNSLKPEDTALYYCAAAARQGWYIPLNSYGYNYWG | 116 |
| Anfrage | 121 | QGTQVTVSS   | 129 |
|         |     | QGTQVTVSS   |     |
| Sbjkt   | 117 | QGTQVTVSS   | 125 |

Figur 1

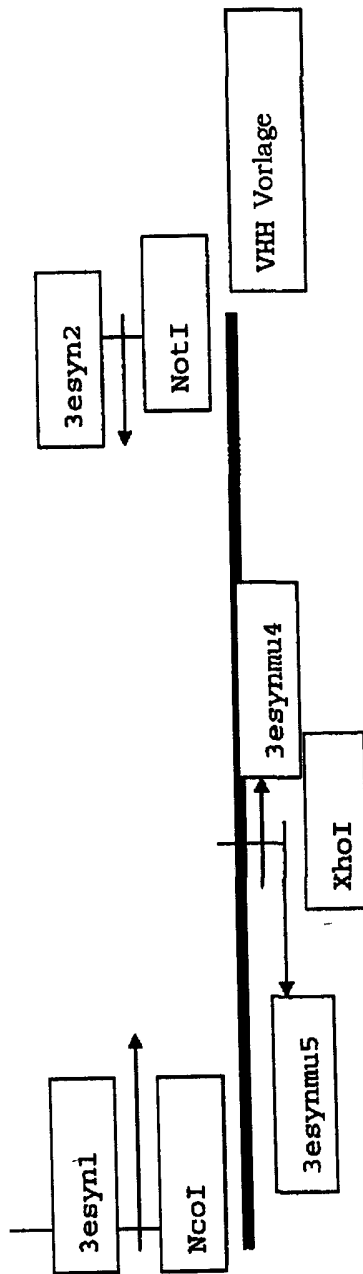
|     |   |                     |
|-----|---|---------------------|
| +3  | P M Q V O L Q E S G G S L R L S C A A S G R T F S D               |                     |
| 1   | CEATGTCAG TTACAGTCA GGAAGATCG CCGCTCTCG TCGTGCAGC                 | CGCGCTACG TTATACGCG |
|     | HSALGTCG AAGTCAGTC CTTTTCGCC                                      | CGCGCTACG TTATACGCG |
| +3  | H S L S G Y CACITATAC ATTGCTGCT TTGCTGACG GCGAGGAMA               | CGCGCTACG TTATACGCG |
| 101 | ATACGAGCTTA TATGCTATG TATGCTATG TATGCTATG TATGCTATG               | CGCGCTACG TTATACGCG |
|     | TATGCGCAT GTGATATG TATGCTATG TATGCTATG TATGCTATG                  | CGCGCTACG TTATACGCG |
| +3  | A D S V K G R F A I S R D I A K N T V D L T M N M L E P E D T A V |                     |
| 701 | TCGCTATGCG GTGAGAGCC TATGCTATG TATGCTATG TATGCTATG                | CGCGCTACG TTATACGCG |
|     | AGCGCTATG CACTTTCGCG CAATGCTATG TATGCTATG TATGCTATG               | CGCGCTACG TTATACGCG |
| +3  | Y Y C A A R D C I P T S R S V E S Y M Y M G Q G T V S S A A       |                     |
| 301 | TATATATGCG CGGCTGCGCA TCGCTATGCG TCGCTATGCG TCGCTATGCG            | CGCGCTACG TTATACGCG |
|     | ATATATACG CGCGAGCTCT NCGGTATGCG TCGCTATGCG TCGCTATGCG             | CGCGCTACG TTATACGCG |
| +3  |   |                     |
| 401 | C   |                     |

## Figur 2

0000000000



Figur 3



Figur 4

+3 P W R I T L K F S C P P L V K P T Q T L T L T C S F S G F S L S D  
 1 CCATGGCGGA TCACCTGAA AGAGATGGA CCCCCCTGG TGAACCTAC CCAGACCTG ACTCTGACTT GCTCATTTAG CGGCTTTAGC CTGAGCGATT  
 GGTACCGCCT AGTGGACTT TCTCTACCT GGGGGGACC ACTTGGATG GGTCTGGAC TGAGACTGAA CGATGTAATC GCCGAATCG GACTCGCTAA  
 +3 F C V G V G W I R Q P P G K A L E W L A I I Y S D D D K R Y S P X X  
 101 TTGGCTCGG CGITGGTGG ATTGCGCAGC CTCGCGGAA AGCCTTGAA AGCTTACTC CATCTGACA AGCTGTATA GCCCCNNNN  
 AACCGCACCC GCACCAACC TAAGCGTCG GAGCGCGCTT TCGGGACCTT ACCGACCGT AGTAGTAG GCTACTACTG TTGCGAATAT CGGGAGCGGA  
 +3 X X X L T I T K D T S K N Q V V L V M X X V S P V D T A T Y F C A  
 201 SNNNNNNNS CTGACCATCA CCAAGATAC GAGCAAGAAC CAGCTGGTGT TGTAAATGNN SNNSGTGAGC CCCTCGACA CGCGACTTA TTCTGTGCGC  
 CTTATGGCCA GACTGGTAGT GGTTCCTATG CTCGTTCTTG GTCCACCAA ACCATTACTG GGCACACTCG GGCAGCTGT GCGCTGAAT AAGACACGG  
 +3 H R R G P T T L F G V P I A R G P V N A M D V W G Q G I T V T I S  
 301 CAYGCTGCTG GTCCGACCAC CCTGTTTGT GTGCGATTG CACGGGTCC CGTGAATGCG ATGNTGTGT GGGGGCAGGG GATTACGCTG ACCATTTCAT  
 GTAGCAGCAC CAGGCTGGTG GGACAAACCA CACGGCTAAC GTGGCGCAGG GCATTTAGC TACCTACACA CCCCCTGCC CTAATGGCAC TGGTAAAGTA  
 +3 S G G G S G G G G G S G G G S A L Q L T Q S P S S L S A S V G D R  
 401 CCGGTGGAG TGGTAGTGA GGGGTGGT CAGCGGTGG CGCTCCGCC TTACAAGTGA CGCAGAGCCC GTCTAGTTTG AGCGCAAGCG TGGGGATCG  
 GGCACCTCC ACCATCACT CCCCACCCA GTCCGCCACC GCGAGGCGG AATGTGACT GCCTCTCGG CAGATCAAC TCGGCTGCC ACCCGTAGC  
 +3 I T I T C R A S Q G V T S A L A W Y R Q K P G S P P Q I L I Y D A  
 501 TATTACAATT ACCTGCGGG CGAGCCAGG TGTACTCTCC CCCTGGCTT GGTATCTCA GAAACCGGG AGCCCGCCAC AGTTGTGTG CTACGATCGG  
 ATAAATGTTAA TGGACAGCCC GCTCGGTTCC ACAATGGAG GCGACCCGGA CCATAGCAGT CTTTGGGCCC TCGGGCCGCTG TCACACTA GATGTACGC  
 +3 S S L E S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S T L R P E D F A  
 601 TCCTCACTG NATCAGGGGT CCTAGCCGC TTTTCGGGT CCGGAGCGG CACGGAATTT ACATGACCA TAAGCACCTT GCCTCCGAA GATTTGCCA  
 ACCAGTGACC TTAGTCCCCA GGGATCGGC AAAGGCCCA GCGCTGCG CCGCTTAAA TGTAACTGGT ATTCTGGGA CCGAGGCTT CTAAACCGT  
 +3 T Y Y C Q Q L H F Y P H T F G G G T R V D V R R T V A A A A  
 701 CCTATATG CCAACAGCTG CACTTTATC CCCATACCTT CGGTGGGGG AGCGGGTGG ACCTGCTGG TACCTAGCT GCTGGGCGG C  
 GGNATATAAC GGTGTGCGAC GTGAATATG GGTATGGAA GCCACCCCC TCGGCCCAAC TGCACGCAGC ATGGCATCGA CGACGCGGC G

Figur 5

+3 P W R I T L K E S G P P X X X P X X X L T L T C S F S G F S L S D  
 1 CCATGGCGA TCACCTGAA AGAGAGTGA CCCCCNNNNN NNNSCCNNN NNNSNBSCTG ACTCTGACTT GCTCATTAG CGGCTTTAGC CTGAGCGATT  
 GGTACCGCCT AGTGGGACTT TCTCTCACT GGGGGGACC ACTTTGGATG GGTCTGGAC TGAGACTGAA CGAGTAATC GCGAATATG GACTCGCTAA  
  
 +3 F G V G V G W I R Q P P G K A L E W L A I I Y S D D D K R Y S P S L  
 101 TTGGGCTGG CGTTGGTGG ATTCCGACG CTCGCGGAA AGCCTGGAA TGGCTGGCA TCATCTACTC CGATGACTAG AGCGTTATA GCGCTCGCT  
 NAACCGAGCC GCACCAACC TAAGCGTGG GAGGCGCTT TCGGACCTT ACCGACCGT AGTAGATGAG GCTACTACTT TCGCAATAT CGGGAGCGA  
  
 +3 N T R L T I T K D T S K N Q V V L V M X X V S P V D T A T Y F C A  
 201 GAATACCCCT CTGACCATCA CCAAGATAC GAGCAAGAC CAGGTGGTCTT TGGTAATCNI SNNSGTGAGC CCGCTGCACA CCGGACTTA TTCTGTGCC  
 CTTATGGGCA GACTGTACT GGTTCCTAG CTCCTCTTG GTCCACCAA ACCATTACTG GGCACACTCG GGGCAGCTGT GGGCTGAT AAAGACACGG  
  
 +3 H R R G P T T L F C V P I A R G P V N A M D V W G Q G I T V T I S  
 301 CATCGTCGT GTCCGACCA CCGTGTGCT GTCCGATTC CACGCGTCC CGTGAATCGG ATGGATGTGT GGGGCGAGG GATTACCGTG ACCATTTCAT  
 GTAGCAGCAC CAGGCTGCTG GCACAAACCA CACGGCTAAC GTCCGCGAGG GCACCTACGC TACCTACACA CCCCCGTCCC CTATGGCAC TGTAAAGTA  
  
 +3 S G G G S G C G C G S G G G S A L Q L T Q S P S S L S A S V G D R  
 401 CGGCTGGAG TGGTAGTGA GGGGTGGGT CAGGCGGTG CGGCTCCGCC TTACAACTGA CGCAGAGCC CTCTAGTTTG AGGCAAGCG TGGCGCATCG  
 GCGCACCTCC ACCATCACT CCCCCACCA GTCCGCCACC GCGGAGCGG AATGTGACT GCGCTCGGG CAGATCAAAC TCGGCTTCG ACCCGTAGC  
  
 +3 I T I T C R A S Q G V T S A L A W Y R Q K P G S P P Q L L I Y D A  
 501 TATTACAAT ACCTGTCGG CGAGCCAAG TGTACTCTC GCGCTGGCT GTATCTGTA GAACCCGCGG AGCCGCGCAC AGTTGTGT CTACGATCG  
 ATAATGTTAA TGGACAGCC GCTCGGTTCC ACATGGAG CGGACCGA CCATAGCAGT CTTTGGGCC TCGGCGGTG TCAACACTA GATGCTACGC  
  
 +3 S S L E S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S T L R P E D F A  
 601 TCCTACTGG AATCAGGGT CCTAGCCG CTTTCGGGT CGGCGAGCG CACGGAATTT ACATTGACCA TAAGCACCTT CGGTCGGA GATTTGCCA  
 AGGAGTGACC TTAGTCCCA GGGATCGCG AAAGGCCCA GCGGCTGCC GTGCTTAA TGTACTGCT ATTCGTGGA CCGAGGCTT CTAAACGGT  
  
 +3 T Y Y C Q Q L R F Y P H T F G G G T R V D V R R T V A A A A  
 701 CCTATTATT CCAACAGCTG CACTTTATC CCAATACCTT CGGTGGGGG AGCGGGTGG AGGTGCTCG TACCTAGCT GCTGCGCGC C  
 GGATATATAC GGTGTGAC GTGAATATG GGTATGGA GGCACCCCC TCGGCCAAC TGCACCCAGC ATGGCATGA CGACGCGCG G

Figur 6

[illegible]

## Figur 7



+3 P W R I T L K E S G P P L V K P T Q T L T L T C S F S G F S L S D  
1 CCATGCCGA TCACCTGAA AGAGAGTGA CCCCCCTGG TGAACCTTAC CCAGACCTTG ACTTGACTT GCTCATTTAG CGCCTTTAGC CTGAGCGATT  
GGTACCGCCT AGTGGACTT TCTTCACCT GGGGGGACC ACTTTGGATG GGTCTGGGAC TGAGACTGAA CAGTAAATC GCGAAATCG GACTCGCTAA

+3 F G V G V G W I R Q P P G K A L E W L A I I Y S D D D K R Y S P S L  
101 TTGGGTGG CGTTGGTTGG ATTGCCAGC CTCCTGGGAA AGCCCTGGAA TGGCTGGCA TCATCTACTC CGATGATGAC AAGCGTTATA GCGCCTCGCT  
AACCAGCC GCAACCAACC TAAAGCGTGG GAGGCCGTT TCGGACCTT ACCGACCGT AGTAGTAGG GCTACTACTG TTGCGAATAT CCGGAGCGA

+3 N T R L T I T K D T S K N Q V V L V M T R V S P V D T A T Y F C A  
201 GAATACCGT CTGACCATCA CCAAGATAC GAGCAAGAC CAGTGGTTT TGTATGAC CCGTGTGACC CCGCTGGCA CCGCGACTTA TTCTGTGCC  
CTTATGGGA GACTGGTACT GGTTCCTATG CTGTTCTATG GTCCACCAAA ACCATTACTG GGCACACTCG GGGCAGCTGT GGCCTGAT AAGACACGG

+3 H R R G P T T L F G V P I A R G P V N A M D V W G Q G I T V T I S  
301 CATCGTCTG GTCCGACCAC CTTGTTGGT GTCCGATTG CAGCGGTC CCGTGAATGG ATGGATGT GTGGGACGG GATTACCGTG ACCATTTTCAT  
GTAGCAGAC CAGGCTGGTG GACAAACCA CAGGCTAAC GTGCGCAGG GCATTACGC TACCTACACA CCCCCGTCC CTAATGGCAC TCGTAAGTA

+3 S G G G S G G G G S G G S A L Q L T Q S P S S L S A S V G D R  
401 CCGGTGAGG TGTATGGA GGGGTGGT CAGCGGTGG CCGCTCGCC TTACAATGA CCGAGAGCC GTCTAGTTG AGCGAAGG TGGGCGATCG  
GGCCACCTCC ACCATCACCT CCCCCACCA GTCCGCCACC GCGAGGCG ATGTTGACT GGTCTCGG CAGATCAAC TCGCGTTGC ACCCGTACG

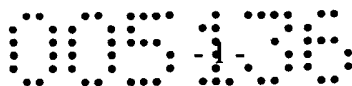
+3 I T I T C R A S Q G V T S A L A W Y R Q K P G S P P Q L L I Y D A  
501 TATTACAATT ACCTGTCGG CGAGCCAGG TGTACCTCC GCCTGGCT GGTATGCTA GAACCCGG AGCCCGCCAC AGTTGTGAT CTACGATCG  
ATATGTTAA TGGACAGCC GTCGGTTCC ACAATGGAG CCGGACCGA CCATGACGT CTTTGGCCC TCGGCGGTG TCAACACTA GATGCTACG

+3 S S L E S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S T L R P E D F A  
601 TCCTCACTG ANTCAGGGT CCTAGCCGC TTTCGGGT CCGCACCG CACGGAATT ACATTGACCA TAAGCACCT GCGTCCGGA GATTTGCCA  
AGGATGACC TTATGCCCA GGGATCGCG AAGAGCCCA GCGGCTGCC GTGCTTAA TGTACTGTT ATTCGTGGA CCGAGGCTT CTAACCGT

+3 T Y Y C Q Q L H F Y P H T F G G G T R V D V R R T V A A A  
701 CCTATTATG CCAACAGCTG CACTTTATC GCCATACCT CCGTGGGGT ACCTGCTCG TACCTAGCT GTGCGGCG C  
GGATAATAC GGTGTGNC GTGAATAG GCCACCCCC TCGCCCAAC TGACGACG ATGCCATCGA CGACGCGG C

Figur 8





Neue Anspruchsfassung vom 30.4. 2007

### ANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Herstellung [Manipulation] eines Immunglobulins, das eine CDR-Schleifen-Konformation und mindestens eine Veränderung in jeder von mindestens zwei Strukturschleifenregionen in einer variablen Domäne des Immunglobulins umfasst und zur Bestimmung der Bindung des Immunglobulins an ein Epitop eines Antigens, wobei das unveränderte Immunglobulin im wesentlichen nicht an das Epitop bindet, welches die Schritte umfasst:
  - Bereitstellung einer Nukleinsäure, die für ein Immunglobulin kodiert, welches mindestens zwei Strukturschleifenregionen umfasst,
  - Veränderung mindestens eines Nukleotidrests jedes der mindestens zwei Strukturschleifenregionen,
  - Übertragung der veränderten Nukleinsäure in ein Expressionssystem,
  - Expression des veränderten Immunglobulins,
  - Kontaktierung des exprimierten veränderten Immunglobulins mit einem Epitop und
  - Bestimmung, ob das veränderte Immunglobulin an das Epitop bindet.
1. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Immunglobulin spezifisch an mindestens zwei Epitope bindet, die diesselden oder unterschiedliche Epitope sind [bindet].
2. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Immunglobulin aus dem Menschen, dem Kamel oder der Maus stammt.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2 [3], dadurch gekennzeichnet, dass die variable Domäne ausgewählt ist aus der Gruppe von VH, Vkappa, Vlamba, VHH und Kombinationen davon.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die veränderten Schleifenregionen einer VH, einer Vkappa, einer Vlamba oder einer VHH mindestens eine Veränderung in den Aminosäuren 7 bis 21, Aminosäuren 25 bis 39, Aminosäuren 41 bis 81, Aminosäuren 83 bis 85, Aminosäuren 89 bis 103 oder Aminosäuren 106 bis 117 umfassen, wobei die Nummerierung der Aminosäurepositionen der Domänen der IMGT entspricht.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Schleifenregionen von VH oder Vkappa oder Vlamba aus dem Menschen mindestens eine Veränderung in den Aminosäuren 8 bis 20, Aminosäuren 44 bis 50, Aminosäuren 67 bis 76 und Aminosäuren 89 bis 101 umfassen, insbesondere den Aminosäurepositionen 12 bis 17, Aminosäurepositionen 45 bis 50, Aminosäurepositionen 69 bis 75 und Aminosäurepositionen 93 bis 98, wobei die Nummerierung der Aminosäurepositionen der Domänen der IMGT entspricht.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Schleifenregionen von VH aus der Maus mindestens eine Veränderung in den Aminosäuren 6 bis 20, Aminosäuren 44 bis 52, Aminosäuren 67 bis 76 und Aminosäuren 92 bis 101 umfassen, wobei die Nummerierung der Aminosäurepositionen der Domänen der IMGT entspricht.

**NACHGEREICHT**

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die veränderten Schleifenregionen einer VHH aus dem Kamel mindestens eine Veränderung in den Aminosäuren 7 bis 18, Aminosäuren 43 bis 55, Aminosäuren 68 bis 75 und Aminosäuren 91 bis 101 umfassen, wobei die Nummerierung der Aminosäurepositionen der Domänen der IMGT entspricht.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das veränderte Immunglobulin ferner mit einem oder mehreren veränderten Immunglobulinen oder mit unveränderten Immunglobulinen oder Teilen davon durch Rekombinationstechniken oder durch Verbindung kombiniert ist, um ein Kombinationsimmunglobulin zu erhalten.
- 10.[Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Immunglobuline durch Rekombinationstechniken kombiniert sind.]

Die Nummerierung der nachfolgenden Ansprüche wurde entsprechend angepasst.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 [10], dadurch gekennzeichnet, dass die Veränderung mindestens eines Nukleotids einer Nukleinsäure zu einer Substitution, Deletion und/oder Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren des durch die Nukleinsäure kodierten Immunglobulins führt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10 [11], dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Aminosäure jeder von mindestens zwei Strukturschleifenregionen durch ortsgerichtete Zufallsmutation verändert wird.
11. Verfahren nach Anspruch 11 [12], dadurch gekennzeichnet, dass das zufällig veränderte Nukleinsäuremolekül mindestens eine Nukleotid-Wiederholungseinheit umfasst, welche die Sequenz 5' -NNS- 3', 5' -NNN- 3' oder 5' -NNK- 3' aufweist.
12. Verwendung eines durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12[13] erhältlichen Immunglobulins zur Herstellung einer Proteinbibliothek von Immunglobulinen.
13. Bibliothek, die mindestens 10 durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12[13] erhältliche Immunglobuline mit einer Veränderung in mindestens zwei Strukturschleifenregionen umfasst.
14. Bibliothek nach Anspruch 14[15], dadurch gekennzeichnet, dass sie Immunglobuline mit Mutationen von mindestens 4 Aminosäurepositionen in mindestens zwei Strukturschleifenregionen enthält.
15. Bibliothek nach einem der Ansprüche 14[15] bis 15[16], dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens 10 variable Domänen von Immunglobulinen mit Veränderungen in den Strukturschleifenregionen enthält.
16. Bibliothek nach einem der Ansprüche 14[15] bis 16[17], dadurch gekennzeichnet, dass sie Immunglobuline enthält, die mindestens zwei veränderte variable Domänen mit mindestens einer Veränderung in den Strukturschleifenregionen jeder Domäne aufweist.

17. Bibliothek nach einem der Ansprüche 14[15] bis 17[18], dadurch gekennzeichnet, dass sie Immunglobuline mit mindestens 4 Veränderungen in mindestens zwei Strukturschleifenregionen enthält.
18. Bibliothek nach einem der Ansprüche 14[15] bis 18[19], dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens 10 veränderte einzelkettige Immunglobuline mit mindestens zwei Veränderungen in den Strukturschleifenregionen jedes einzelkettigen Immunglobulins enthält.
19. Bibliothek nach einem der Ansprüche 14[15] bis 19[20], dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens 10 veränderte VHH Domänen mit mindestens zwei Veränderungen in den Strukturschleifenregionen jeder VHH Domäne enthält.
20. Bibliothek nach einem der Ansprüche 14[15] bis 20[21], dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens 10 veränderte menschliche Antikörper mit mindestens zwei Veränderungen in den Strukturschleifenregionen jedes menschlichen Antikörpers enthält.
21. Bibliothek nach einem der Ansprüche 14[15] bis 21[22], dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens 10 veränderte Fab Fragmente mit mindestens zwei Veränderungen in den Strukturschleifenregionen jedes Fab Fragments enthält.
22. Bibliothek nach einem der Ansprüche 14[15] bis 22[23], dadurch gekennzeichnet, dass sie Immunglobuline ausgewählt aus der Gruppe von VH, Vkappa, Vlamba und VHH umfasst.
23. Verändertes Immunglobulin erhältlich nach dem Verfahren eines der Ansprüche 1 bis 12[13], das eine Bindungsstelle aufweist, welche durch mindestens zwei Veränderungen in den Strukturschleifenregionen spezifisch für ein Antigen ist.
24. Verändertes Immunglobulin nach Anspruch 24[25], wobei das Antigen menschliches Serumalbumin ist.
25. Verändertes Immunglobulin nach Anspruch 24[25], wobei das Antigen ein Fc-Rezeptor ist.
26. Verfahren zur spezifischen Bindung und/oder zum Nachweis eines Moleküls, welches die Schritte umfasst:
  - In Kontakt bringen einer Bibliothek veränderter Immunglobuline nach einem der Ansprüche 14[15] bis 23[24] oder eines Immunglobulins, das durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12[13] erhältlich ist, mit einer Testprobe, welche das Molekül enthält und wahlweise
  - Nachweis der potentiellen Bildung eines spezifischen Immunglobulin/Molekül-Komplexes.

28. Verfahren zur spezifischen Isolierung eines veränderten Immunglobulins, das an ein Molekül bindet, welches die Schritte umfasst:
- In Kontakt bringen einer Bibliothek veränderter Immunglobuline nach einem der Ansprüche 14[15] bis 23[24] oder eines veränderten Immunglobulins, das durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 [13] erhältlich ist, mit einer Probe, welche das Molekül enthält,
  - Abtrennung des gebildeten spezifischen Komplexes aus verändertem Immunglobulin und dem Molekül sowie
  - wahlweise Isolierung des veränderten Immunglobulins aus dem Komplex.
29. Kit von Bindungspartnern, welcher enthält
- eine Bibliothek veränderter Immunglobuline nach einem der Ansprüche 14[15] bis 23[24] oder ein verändertes Immunglobulin, das durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12[13] erhalten wurde sowie
  - ein Bindungsmolekül, das ein Epitop eines Antigens enthält.
30. Verwendung eines Bindungsmoleküls eines Kits nach Anspruch 29[30] zur Selektion eines veränderten Immunglobulins aus einer Bibliothek nach einem der Ansprüche 14[15] bis 23[24].
31. Polypeptidvariante einer variablen Domäne, die eine CDR-Schleifen-Konformation und mindestens zwei veränderte Strukturschleifen umfasst, wobei mindestens eine Aminosäure jeder veränderten Strukturschleife ausgewählt ist aus der Gruppe der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Histidin, Isoleucin, Serin, Methionin, Alanin und Asparagin.
32. Polypeptidvariante einer variablen Domäne nach Anspruch 31[32], dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine veränderte Strukturschleife mindestens zwei dieser Aminosäuren enthält.
33. Polypeptidvariante einer variablen Domäne nach einem der Ansprüche 31[32] bis 32[33], dadurch gekennzeichnet, dass sie vom Menschen stammt oder eine humanisierte Polypeptidvariante einer variablen Domäne ist und dass sie mindestens ein Tyrosin in einer der Positionen 12 bis 17, 45 bis 50, 69 bis 75 und 93 bis 98 und/oder mindestens ein Tryptophan in einer der Positionen 12 bis 17, 45 bis 50, 69, 71 bis 75, 93 bis 94 und 96 bis 98 und/oder mindestens ein Histidin in einer der Positionen 12 bis 17, 46, 47, 49, 50, 69 bis 74 und 93 bis 98 und/oder mindestens ein Asparagin in einer der Positionen 12 bis 17, 45 bis 47, 49, 50, 70 bis 73, 75, 94 bis 96 und 98 und/oder mindestens ein Methionin in einer der Positionen 12 bis 17, 46 bis 50, 69 bis 71, 73 bis 75, 93, 95, 96 und 98 und/oder mindestens ein Serin in einer der Positionen 13, 71, 75, 94, 95 und 98 und/oder mindestens ein Isoleucin in einer der Positionen 12, 14 bis 17, 45 bis 50, 69, 70, 72 bis 75, 93 und 96 bis 98 und/oder mindestens ein Phenylalanin in einer der Positionen 15, 46, 48, 70 bis 73, 75, 93, 95 und 98 umfasst.



| Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC <sup>8</sup> :<br><b>C12N 15/62 (2006.01); C07K 16/00 (2006.01)</b>  |  |   |
|---|--|---|
| Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA:<br><b>C12N15/62, C07K16/00</b>   |  |   |
| Recherchierte Prüfstoff (Klassifikation):   |  |   |
| Konsultierte Online-Datenbank:<br><b>WPI, EPODOC, FullText</b>  |  |   |
| Dieser Recherchenbericht wurde zu den am <b>5. Juli 2006</b> eingereichten Ansprüchen <b>1-34</b> erstellt.   |  |   |
| Kategorie <sup>1)</sup>   | Bezeichnung der Veröffentlichung:<br>Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum,<br>Textstelle oder Figur soweit erforderlich | Betreffend Anspruch                                   |
| X   | EP1752471 A1 (F-STAR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNGS- UND ENTWICKLUNGSGES.M.B.H) 14. Februar 2007 (14.02.2007)<br><i>gesamtes Dokument</i>                                | 1-25, 27-33   |
|   | --   |   |
| A   | WO 1996/022377 A1 (ARMITAGE ET AL.) 25. Juli 1996 (25.07.1996)<br><i>gesamtes Dokument</i>   | 1-34  |
|   | --   |   |
| A   | WO 2001/088159 A2 (EURO CELTIQUE SA) 22. November 2001 (22.11.2001)<br><i>gesamtes Dokument</i>  | 1-34  |
|   | ----   |   |
| Datum der Beendigung der Recherche:<br><b>23. Februar 2007</b>  |  | <input type="checkbox"/> Fortsetzung siehe Folgeblatt |
|   |  | Prüfer(in):<br><b>Dr. ETZ</b>                         |
| <sup>1)</sup> <b>Kategorien der angeführten Dokumente:</b><br><b>X</b> Veröffentlichung von <b>besonderer Bedeutung</b> : der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.<br><b>Y</b> Veröffentlichung von <b>Bedeutung</b> : der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese <b>Verbindung für einen Fachmann naheliegend</b> ist.<br><b>A</b> Veröffentlichung, die den <b>allgemeinen Stand der Technik</b> definiert.<br><b>P</b> Dokument, das <b>von Bedeutung</b> ist (Kategorien X oder Y), jedoch <b>nach dem Prioritätstag</b> der Anmeldung veröffentlicht wurde.<br><b>E</b> Dokument, das <b>von besonderer Bedeutung</b> ist (Kategorie X), aus dem ein <b>älteres Recht</b> hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen).<br><b>&amp;</b> Veröffentlichung, die Mitglied der selben <b>Patentfamilie</b> ist. |  |   |