



## (12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) EP 1 341 909 B2

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 10 926.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/EP01/14744

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 98 5402.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2002/048351

(86) PCT-Anmeldetag: 12.12.2001

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: 20.06.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 10.09.2003

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 18.05.2005

(97) Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents beim EPA: 11.04.2012

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 14.06.2012

(51) Int Cl.:

**C12N 15/10 (2006.01)**

C12Q 1/68 (2006.01)

### Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

0030252                    12.12.2000            GB  
734801                    12.12.2000            US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR

(73) Patentinhaber:

Alligator Bioscience AB, Lund, SE

(72) Erfinder:

CARLSSON, Roland, S-226 54 Lund, SE;  
FUREBRING, Christina, S-224 72 Lund, SE;  
MALMBORG HAGER, Ann-Christin, S-252 50  
Helsingborg, SE; BORREBAECK, Carl, S-245 62  
Hjarup, SE

(74) Vertreter:

Rehberg Hüppe + Partner, 37073, Göttingen, DE

(54) Bezeichnung: EINE METHODE ZUR IN VITRO MOLEKULAREN EVOLUTION DER PROTEINFUNKTION

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur molekularen Evolution von Proteinfunktion in vitro, insbesondere durch Umsetzen von Einzelstrang-DNS-Segmenten, die unter Verwendung einer Nuklease erhalten werden.

**[0002]** Proteinfunktion kann in vitro durch eine Vielzahl von Verfahren modifiziert und verbessert werden, die platzgerichtete Mutationserzeugung (Alber et al., *Nature*, 5; 330 (6143): 41–46, 1987), kombinatorisches Klonieren (Huse et al., *Science*, 246: 1275–1281, 1989; Marks et al., *Biotechnology*, 10: 779–783, 1992) und zufällige Mutationserzeugung kombiniert mit einem geeigneten Selektionssystem (Barbas et al., *PNAS USA*, 89: 4457–4461, 1992) umfassen.

**[0003]** Das Verfahren der zufälligen Mutationserzeugung zusammen mit Selektion ist in einer Anzahl von Fällen verwendet worden, um Proteinfunktion zu verbessern, und zwei unterschiedliche Strategien existieren: zuerst die Zufallsverteilung der gesamten Gensequenz in Kombination mit der Auswahl einer Proteinvariante (eines Proteinmutanten) mit den gewünschten Eigenschaften, gefolgt von einer neuen Runde der zufälligen Mutationserzeugung und Selektion. Dieses Verfahren kann dann wiederholt werden, bis eine Proteinvariante gefunden ist, die als optimal angesehen wird (Schier R. et al., *J. Mol. Biol.* 1996 263 (4): 551–567). Hierbei ist die traditionelle Route, Mutationen einzuführen, die zu Fehlern neigende PKR (Leung et al., *Technique*, 1: 11–15, 1989) mit einer Mutationsrate von ungefähr 0,7%. Als zweites können definierte Regionen des Gens mit degenerierten Primern mit Mutationen versehen werden, was Mutationsraten von bis zu 100% erlaubt (Griffiths et al., *EMBO J.*, 13: 3245–3260, 1994; Yang et al., *J. Mol. Biol.* 254: 392–403, 1995). Je höher die verwendete Mutationsrate ist, desto beschränkter ist die Region des Gens, das den Mutationen unterworfen werden kann.

**[0004]** Zufällige Mutation ist umfangreich auf dem Gebiet des Antikörperengineering eingesetzt worden. In vivo gebildete Antikörnergene können in vitro kloniert werden (Larrick et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 1250–1256, 1989), und zufällige Kombinationen dieser Gene, die variable schwere und leichte Gene codieren, können einer Selektion unterworfen werden (Marks et al., *Biotechnology*, 10: 779–783, 1992). Funktionelle Antikörperfragmente, die ausgewählt wurden, können unter Anwendung von zufälliger Mutationserzeugung und zusätzlichen Selektionsrunden (Schier R. et al., *J. Mol. Biol.* 1996 263 (4): 551–567) weiter verbessert werden.

**[0005]** Der Strategie der zufälligen Mutationserzeugung folgt die Selektion. Varianten mit interessanten Eigenschaften können selektiert werden, und die mutierten DNS-Regionen von unterschiedlichen Varianten, jede mit interessierenden Eigenschaften, werden in eine codierende Sequenz kombiniert (Yang et al., *J. Mol. Biol.* 254: 392–403, 1995). Dies ist ein mehrschrittiger sequentieller Prozess, und potentielle synergistische Effekte von unterschiedlichen Mutationen in unterschiedlichen Regionen können verloren gehen, da sie nicht in Kombination Gegenstand der Selektion sind. Daher umfassen diese beiden Strategien nicht die simultane Mutationserzeugung von definierten Regionen und die Selektion einer Kombination dieser Regionen. Ein anderer Prozess umfasst das kombinatorische Paaren von Genen, die verwendet werden können, um z. B. Antikörperaffinität zu verbessern (Marks et al., *Biotechnology*, 10: 779–783, 1992). Hierbei sind die drei CDR-Regionen bei jedem variablen Gen fest, und diese Technologie erlaubt es nicht, einzelne Gensegmente bei den Genen für die variable Domain, z. B. einschließlich der CDR-Regionen, zwischen den Klonen umzusetzen.

**[0006]** Das Konzept des DNS-Umsetzens (Stemmer, *Nature* 370: 389–391, 1994) verwendet zufällige Fragmentierung von DNS und Zusammenbau von Fragmenten zu einer funktionierenden codierenden Sequenz. Bei diesem Prozess ist es möglich, chemisch synthetisierte DNS-Sequenzen und auf diese Weise Zielvariationen an bestimmten Plätzen in dem Gen, deren DNS-Sequenz bekannt ist, einzuführen (Crameri et al., *Biotechniques*, 18: 194–196, 1995). Stemmer und Mitarbeiter entwickelten dieses in vitro-Verfahren, das den normalerweise auftretenden Evolutionsprozess des Proteins in der Natur nachbildet. Die DNS-Umsetzung erzeugt Diversität durch Rekombination, wodurch nützliche Mutationen von einzelnen Genen kombiniert werden. Sie ist erfolgreich für die künstliche Evolution von unterschiedlichen Proteinen, z. B. Enzymen und Cytokinen (Chang et al. *Nature Biotech.* 17, 793–797, 1999; Zhang et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4504–4509, 1997; Christians et al. *Nature Biotech.* 17, 259–264, 1999), eingesetzt worden. Diese Gene werden unter Verwendung von DNase I zufällig fragmentiert und werden dann durch Rekombination miteinander wieder zusammengebaut. Das Ausgangsmaterial kann entweder ein (zuerst zufällig unter Verwendung von zu Fehlern neigender PKR mutiertes) einzelnes Gen oder natürlich auftretende homologe Sequenzen sein, so genannte Familienumsetzung. DNase I hydrolysiert DNS vorzugsweise an Plätzen benachbart zu Pyrimidinnukleotiden, deshalb ist sie eine geeignete Wahl für die zufällige Fragmentierung von DNS. Jedoch ist die Aktivität abhängig von Mg- oder Mn-Ionen, Mg-Ionen beschränken die Fragmentgröße auf 50 Basenpaare, während die Mn-Ionen Fragment-

größen von weniger als 50 Basenpaaren ergeben. Deshalb müssen die fraglichen Gene, um alle möglichen Größen für die Kombination aufzuweisen, mindestens zweimal mit DNase I in der Anwesenheit von jeweils einem der beiden unterschiedlichen Ionen behandelt werden, gefolgt von einer Entfernung eben dieser Ionen.

**[0007]** In der Theorie ist es möglich, DNS zwischen jeglichen Klonen umzusetzen. Wenn jedoch das resultierende umgesetzte Gen bezüglich Expression und Aktivität funktionell sein soll, müssen die umgesetzten Klone vorzugsweise relevant oder sogar identisch mit der Ausnahme eines niedrigen Niveaus an zufälligen Mutationen sein. DNS-Umsetzung zwischen genetisch unterschiedlichen Klonen wird im Allgemeinen nichtfunktionelle Gene erzeugen. Es ist jedoch durch die Methodik von ITCHY nachgewiesen worden, dass Bibliotheken von Interspeziesfusionen zwischen Fragmenten des E. coli-Gens und des humanen Glyzinamidribonukleotid-transformylasegens erzeugt werden können, die nur eine 50%ige Identität auf dem DNS-Niveau aufweisen (Ostermeier et al., Nat. Biotechnol. 17, 1205–9, 1999).

**[0008]** Eine erfolgreiche Rekombination von zwei unterschiedlichen Genen erfordert die Formation eines Hetero-Duplex-Maleküls. In einigen Fällen bildet die Familienumsetzung nahezu ausschließlich Homo-Duplexe, was in eine niedrige Rekombinationsfrequenz resultiert. Diesem Problem ist durch Verwendung von DNase I-aufgeschlossener Einzelstrang-DNS begegnet worden (Kikuchi et al. Gene 243, 133–137, 2000).

**[0009]** Einzelstrang-DNS kann im Wesentlichen auf zwei unterschiedlichen Wegen erhalten werden. Als erstes durch die Verwendung von biotinylierten Primern bei den PKR-Reaktionen in Kombination mit z. B. Dynabeads (Dynal, Norwegen) oder AffiniTip Streptavidin Capture Micro-Säulen (Genosys Biotechnologies Inc., The Woodlands, USA). Als zweites durch Verwendung von Bakteriophagen, die in der Lage sind, Einzelstrang-DNS zu packen (Viruses and Related Entities in Modern Microbiology, Principles and Applications, Seiten 171–192, Herausgeber E. A. Birge, Wm. C. Brown Publishers 1992; Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

**[0010]** Die Selektion von Enzymen mit geänderten und verbesserten Eigenschaften basiert oft auf der tatsächlichen Funktion des Enzyms. Z. B. kann eine erhöhte Thermostabilität eines Enzyms selektiert werden, indem transformierte Kolonien bei Temperaturen inkubiert werden, die die Inaktivierung des Enzyms vom Wildtyp verursachen, und verbesserte  $\beta$ -Glukosidaseaktivität kann unter Verwenden von PNPG als Substrat identifiziert werden (Arrizubieta et al., J. Biol. Chem., 27. Juni 2000).

**[0011]** Die Selektion von funktionellen Proteinen aus Molekularbibliotheken ist durch die Entwicklung der Phagenanzeigetechnologie revolutioniert worden (Parmley et al., Gene, 73: 305–391, 1988; McCafferty et al., Nature, 348: 552–554, 1990; Barbas et al., PNAS. USA, 88: 7978–7982, 1991). Hier wird der Photyp (Protein) direkt mit seinem entsprechenden Genotyp (DNS) verknüpft, und dies erlaubt das direkte Klonieren des genetischen Materials, das dann weiteren Modifikationen unterworfen werden kann, um die Proteinfunktion zu verbessern. Phagenanzeige ist verwendet worden, um funktionale Binder aus einer Vielzahl von Molekularbibliotheken mit bis zu  $10^{11}$  Transformanten Größe zu klonieren (Griffiths et al., EMBO. J. 13: 3245–3260, 1994). So kann Phagenanzeige verwendet werden, um direkt funktionelle Binder aus Molekularbibliotheken zu klonieren, und sie kann auch verwendet werden, um die ursprünglich ausgewählten Klone weiter zu verbessern. Andere Typen von Viren, die für die Oberflächenexpression von Proteinbibliotheken und die Selektionen daraus verwendet worden sind, sind Baculovirus (Boublik et al., Biotechnol. 13: 1079–1084, 1995; Mottershead et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 238: 717–722, 1997; Grabherr et al., Biotechniques 22: 730–735, 1997) und Retrovirus (Buchholz et al., Nature Biotechnol. 16: 951–954, 1998).

**[0012]** Die Auswahl von funktionalen Proteinen aus Moleküldatenbanken kann auch durch Zelloberflächenanzeige durchgeführt werden. Auch hier ist der Photyp direkt mit dem entsprechenden Genotyp verknüpft. Bakterielle Zelloberflächenanzeige ist z. B. zum Screenen von verbesserten Varianten von Carboxymethylcelulase (CMCase) verwendet worden (Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 66: 788–93, 2000). Andere Zellen, die für diesen Zweck verwendet werden können, sind Hefezellen (Boder und Wittrup, Nat. Biotechnol. 15: 553–557, 1997), COS-Zellen (Higuchi et al., J. Immunol. Meth. 202: 193–204, 1997) und Insektenzellen (Granzerio et al., J. Immunol. Meth. 203: 131–139, 1997; Ernst et al., Nucleic Acids Res. 26: 1718–1823, 1998).

**[0013]** Die zufällige Kombination von DNS aus unterschiedlich mutierten Klonen in Kombination mit der Selektion von gewünschter Funktion ist ein effizienterer Weg, den Sequenzraum zu durchsuchen, verglichen mit der sequentiellen Selektion und Kombination von selektierten Klonen.

**[0014]** Diese Erfindung strebt danach, verbesserte Verfahren für die Proteinevolution in vitro bereitzustellen. Insbesondere zielt die Erfindung darauf ab, effizientere Rekombinations- und Umsetzungsverfahren bereitzu-

stellen, die einen Anstieg bei starker veränderten Molekülen ergeben und deshalb die Möglichkeit verbessern, Moleküle mit wünschenswerten Eigenschaften zu finden.

**[0015]** Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Erzeugen einer Polynukleotidsequenz oder Population von Polynukleotidsequenzen von Einzelstrangausgangspolynukleotidsequenzen, die ein oder mehrere Proteinmotive codieren, aufgezeigt, das die Schritte aufweist:

- a) Bereitstellen von Einzelstrang-DNS, die Plus- und Minusstränge von Ausgangspolynukleotidsequenzen ausbildet;
- b) Aufschließen der Einzelstrangpolynukleatidsequenzen mit einer Exonuklease, um Populationen von Einzelstrangfragmenten zu erzeugen;
- c) Kontaktieren der Fragmente, die aus den Plussträngen erzeugt wurden, mit Fragmenten, die aus den Minussträngen erzeugt wurden, und optionales Hinzugeben von Primersequenzen, die sich unter Anlassbedingungen an die 3'- und 5'-Enden mindestens eines der Ausgangspolynukleotide anlassen;
- d) Verstärkung von Segmenten, die sich aneinander anlassen, um mindestens eine Polynukleotidsequenz zu erzeugen, die ein oder mehrere Proteinmotiv(e) codiert, das/die verglichen mit dem einen oder den mehreren Proteinmotiv(en), welche(s) durch die Ausgangspolynukleotide codiert wird/werden, geänderte Eigenschaften aufweist/ausweisen.

**[0016]** Deshalb wird typischerweise ein Verfahren zum Kombinieren von Polynukleotidfrequenzen bereitgestellt, um eine Polynukleotidsequenz oder eine Population von Polynukleotidsequenzen mit gewünschten Eigenschaften zu erzeugen, wobei das Verfahren die Schritte aufweist:

- a) Aufschließen eines linearen Einzelstrangausgangspolynukleotids, das ein oder mehrere Proteinmotive codiert, mit einer anderen Nuclease als DNase I, um eine Population von Einzelstrangfragmenten variierender Längen zu erzeugen;
- b) Zusammenbauen einer Polynukleotidsequenz aus den Sequenzen, die aus dem Schritt a) erhalten werden.

**[0017]** Vorzugsweise weist das Verfahren weiterhin den Schritt (c) des Exprimierens des resultierenden Proteins, das durch die zusammengebaute Polynukleotidsequenz codiert wird, und den Schritt (d) des Screenens des Proteins auf gewünschte Eigenschaften auf.

**[0018]** Durch Steuern der Reaktionszeit der Nuklease kann die Größe der Polynukleotidfragmente gesteuert werden. Das Bestimmen der Länge der Polynukleotidfragmente auf diese Weise vermeidet die Notwendigkeit, einen weiteren Schritt bereitzustellen zu müssen, wie beispielsweise das Reinigen der Fragmente von gewünschter Länge von einem Gel.

**[0019]** Um eine Polynukleotidsequenz von gewünschten Eigenschaften zu erzeugen, kann das Ausgangspolynukleotid, das ein oder mehrere Proteinmotive codiert, einer Mutationserzeugung unterworfen werden, um daraus eine Vielzahl von unterschiedlich mutierten Derivaten zu erzeugen. In gleicher Weise kann ein Ausgangspolynukleotid erhalten werden, das bereits eine Vielzahl von Proteinmotivvarianten von unbekannter Sequenz codiert.

**[0020]** Zufällige Mutation kann durch jegliches konventionelles Verfahren bewirkt werden, wie es oben beschrieben wurde, aber ein geeignetes Verfahren ist zu Fehlern neigende PKR.

**[0021]** Es ist bevorzugt, PKR-Technologie zu verwenden, um die Einzelstrangpolynukleotidfragmente zu einer Doppelstrangpolynukleotidsequenz zusammenzubauen.

**[0022]** Die Polynukleotidsequenz ist vorzugsweise DNS, obwohl RNS verwendet werden kann. Zur Vereinfachung wird der Begriff Polynukleotid jetzt in dem folgenden Text in Bezug auf DNS verwendet werden, aber es wird vorausgesetzt, dass die vorliegende Erfindung sowohl auf RNS als auch auf DNS anwendbar ist.

**[0023]** Vorzugsweise kann jede Exonuklease, die Polynukleotide von dem 5'-Primende zu dem 3'-Primende, von dem 3'- zu dem 5'-Ende oder von sowohl dem 3'- als auch dem 5'-Ende aufschließt, verwendet werden. Beispiele für eine geeignete Exonuklease, die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, umfassen BAL31, Exonuklease VII und Exonuklease Rec J<sub>f</sub>.

**[0024]** Vorzugsweise ist die Exonuklease BAL31.

**[0025]** Die Anwendung von BAL31-Nuklease bei dem DNS-Umsetzungsprozess der Erfindung stellt ein schnelles, einfaches und kontrollierbares System bereit. Dieses System kann alle Größen von Genfragmenten ergeben, und die Aktivität des Enzyms kann einfach durch das Stoppen des Aufschlusses zu verschiedenen Zeitpunkten kontrolliert werden. BAL31 ist vornehmlich eine 3'-Ende-Exonuklease, die Mononukleotide von beiden 3'-Termini der zwei Strände einer linearen DNS entfernt. BAL31 ist auch eine Endonuklease; somit wird die Einzelstrang-DNS, die von der 3'-Ende-Exonukleaseaktivität erzeugt wird, durch die Endonuklease abgebaut. Die 3'-Ende-Exonukleaseaktivität des Enzyms arbeitet etwa 20-fach effizienter als die Endonuklease. Die Enzymkonzentrationen sind deshalb wichtig für die enthaltenen DNS-Fragmente. Höhere Konzentration an Enzym favorisiert stumpf endende DNS, während bei niedrigen Konzentrationen die Einzelstrang-DNS-Termini sehr lang sein können. BAL31 besteht aus zwei kinetisch unterschiedlichen Formen des Enzyms, einer schnellen (F fast) und einer langsamen (S = slow) Form. Die S-Form ist ein protheolytisches Abbauprodukt der F-Form. Weiterhin arbeitet BAL31 asynchron, wobei eine Population von DNS-Molekülen erzeugt wird, deren Termini in unterschiedlichem Umfang abgeschnitten sind, und deren Einzelstrangschwänze in der Länge variieren. Beide Formen wirken auch in stark verarbeitender Weise exonukleolytisch auf ssDNA ein. Der direkte Angriff erfolgt im Gegensatz zu dem Aufschlussmodus bei Duplex-DNS von dem 5'-Ende her. Es ist vorgeschlagen worden, dass die Nukleasemoleküle anfänglich unproduktiv entfernt von den 5'-Enden gebunden sind und eine erleichterte Diffusion durchlaufen, um produktive (terminal gebundene) Enzym-Substratkomplexe zu bilden (Lu T und Gray jr. HB Biochimica et Biophysica Acta 1995, Band 1251, Seiten 125–138). Das Enzym verwendet  $\text{Ca}^{2+}$  als Cofaktor, der in Komplexen mit EGTA (Ethylenglykol-bis-( $\beta$ -aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) gebunden werden kann. Lineare DNS-Sequenzen werden mit BAL31 aufgeschlossen, und die Reaktion kann zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe von EGTA gestoppt werden.

**[0026]** Die individuell aufgeschlossenen Fragmente werden gereinigt, gemischt und durch PKR-Technologie wieder zusammengebaut. Die zusammengebauten (rekonstituierten) Gene können dann in einen Expressionsvektor für die Exprimierung des Proteins kloniert werden. Das Protein kann dann in Bezug auf verbesserte Eigenschaften analysiert werden.

**[0027]** Das Verfahren der vorliegenden Erfindung stellt verschiedene Vorteile gegenüber bekannten Umsetzungstechniken bereit, einschließlich erhöhter Raten an Rekombination und Steuerung der Fragmentgröße.

**[0028]** Das Verfahren der vorliegenden Erfindung erzeugt einen Satz von progressiv gekürzten DNS-Fragmenten für jeden Zeitpunkt, zu dem eine DNS-Probe aus der BAL31-Behandlung entnommen wird. Die DNS-Proben können gesammelt und zusammengefasst werden, oder optional können einzelne Proben ausgewählt und bei dem Verfahren verwendet werden. So erlaubt die vorliegende Erfindung eine Selektion, welche DNS-Proben in dem Rekombinationssystem verwendet werden, und stellt deshalb einen weiteren Grad der Kontrolle bereit.

**[0029]** Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann an jeglichem Polynukleotid ausgeführt werden, das ein bestimmtes Produkt codiert, z. B. an jeglichem Protein, das Bindungs- oder katalytische Eigenschaften aufweist, z. B. Antikörper oder Teile von Antikörpern, Enzymen oder Rezeptoren. Weiterhin kann jegliches Molekül, das eine Funktion hat, die geändert werden kann, z. B. katalytische RNA, gemäß der vorliegenden Erfindung, umgesetzt werden. Es ist bevorzugt, dass das Ausgangspolynukleotid, das ein oder mehrere Proteineinheiten codiert, mindestens 12 Nukleotide lang ist, vorzugsweise mindestens 20 Nukleotide lang, noch mehr bevorzugt mehr als 50 Nukleotide lang. Polynukleotide, die mindestens 100 Nukleotide lang sind oder sogar mindestens 200 Nukleotide lang, können verwendet werden. Wenn Ausgangspolynukleotide verwendet werden, die große Proteine codieren, wie beispielsweise Enzyme oder Antikörper, können diese viele hundert oder tausend Basen lang sein. Die vorliegende Erfindung kann bei Ausgangspolynukleotiden jeglicher Größe ausgeführt werden.

**[0030]** Die vorliegende Erfindung stellt auch Polynukleotidsequenzen bereit, die durch das oben beschriebene Verfahren erzeugt werden und die gewünschte Eigenschaften aufweisen. Diese Sequenzen können für das Erzeugen von Gentherapievektoren und replikationsdefekte Gentherapiekonstrukte oder Impfvektoren oder DNS-basierte Impfungen verwendet werden. Weiterhin können die Polynukleotidsequenzen als Forschungswerkzeuge verwendet werden.

**[0031]** Die vorliegende Erfindung stellt auch eine Polynukleotidbibliothek von Sequenzen bereit, die durch das oben beschriebene Verfahren erzeugt wurden, wobei aus der Polynukleotidbibliothek ein Polynukleotid ausgewählt werden kann, das ein Protein mit den gewünschten Eigenschaften codiert. Es ist bevorzugt, dass die Polynukleotidbibliothek eine DNS- oder cDNA-Bibliothek ist.

**[0032]** Die vorliegende Erfindung stellt auch Proteine bereit, wie beispielsweise Enzyme, Antikörper und Rezeptoren, die andere Eigenschaften als der Wildtyp aufweisen, und die durch das oben beschriebene Verfahren produziert wurden. Diese Proteine können einzeln oder innerhalb von pharmazeutisch akzeptablen Trägern als Impfstoffe oder Medikamente für die Therapie, z. B. als eine Immunreaktion erzeugende Gene, Antigene oder anderweitig beim Erhalten spezifischer Antikörper verwendet werden. Sie können auch als Forschungswerzeuge verwendet werden.

**[0033]** Die gewünschten Eigenschaften eines Polynukleotids, das durch die vorliegende Erfindung erzeugt wurde, oder eines Proteins, das von einem Polynukleotid codiert wird, das durch die vorliegende Erfindung erzeugt wurde, können jegliche Variation oder Veränderung bei der normalen Aktivität des (Ausgangs-)Polynukleotids vom Wildtyp oder des Polypeptids, Proteins oder Proteinmotivs, das es codiert, sein. Z. B. kann es wünschenswert sein, die katalytische Aktivität eines Enzyms zu reduzieren oder zu erhöhen, oder die Bindungsspezifität eines Antikörpers zu verbessern oder zu reduzieren. Weiterhin kann es, falls das Protein oder das Polynukleotid ein eine Immunreaktion erzeugendes Gen ist, wünschenswert sein, seine Fähigkeit, spezifische Antikörper, die gegen es gerichtet sind, zu erhalten, zu reduzieren oder zu erhöhen. Das Ausgangspolynukleotid codiert vorzugsweise ein oder mehrere Proteinmotive. Diese sind definiert durch Regionen von Polynukleotidsequenz, die Polynukleotidsequenz codiert, welche charakteristische Proteinfunktion hat oder potentiell hat. Z. B. kann ein Proteinmotiv einen Bereich eines gesamten Proteins definieren, d. h. ein Epitop oder einen Spaltungsplatz oder einen katalytischen Platz usw. Jedoch muss ein exprimiertes Proteinmotiv innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung keine Aktivität zeigen oder "korrekt" gefaltet sein.

**[0034]** Es mag wünschenswert sein, ein Protein zu modifizieren, um die Konformation eines bestimmten Epitops zu ändern, um dadurch seine Antigenizität zu verbessern und/oder Kreuzreakтивität zu reduzieren. Z. B. kann die Modifikation jegliche Kreuzreaktion von gezogenen Antikörpern mit ähnlichen Proteinen reduzieren, sollte solch ein Protein als Antigen verwendet werden.

**[0035]** Obwohl der Begriff "Enzym" verwendet wird, ist dies so zu interpretieren, als dass er auch jegliches Polypeptid umfasst, das enzymartige Aktivität aufweist, d. h. eine katalytische Funktion. Z. B. können Polypeptide, die Teil eines Enzyms sind, immer noch katalytische Funktion aufweisen. Weiterhin sind Proteine, wie beispielsweise Interferone und Zytokine, eingeschlossen. Gleicherweise sollte der Begriff "Antikörper" so ausgelegt werden, dass er jegliche bindende Substanz abdeckt, die eine bindende Domain mit der erforderlichen Spezifität aufweist. Dies umfasst Antikörperfragmente, Derivate, funktionale Äquivalente und Homologe von Antikörpern, einschließlich von synthetischen Molekülen und Molekülen, deren Gestalt diejenige von Antikörpern nachbildet, was es ihnen ermöglicht, an ein Antigen oder Epitop anzubinden. Beispiele von Antikörperfragmenten, die in der Lage sind, an ein Antigen oder andere Bindungspartner anzubinden, sind das Fab-Fragment, das aus den VL-, VH-, CL- und CH1-Domänen besteht, das Fd-Fragment, das aus den VH- und CH1-Domänen besteht; das Fv-Fragment, das aus den VL- und VH-Domänen eines einzelnen Arms eines Antikörpers besteht; das dAb-Fragment, das aus einer VH-Domäne besteht; isolierte CDR-Regionen und F(ab')2-Fragmente, d. h. bivalente Fragmente, die zwei Fab-Fragmente umfassen, die durch eine Disulphidbrücke in dem Übergangsbereich verknüpft sind. Einzelketten-Fv-Fragmente sind ebenfalls eingeschlossen.

**[0036]** Um Expression der erzeugten Polynukleotidsequenz zu erhalten, kann die Sequenz in einen Vektor eingebaut werden, der Steuersequenzen aufweist, die funktionell an die Polynukleotidsequenz angehängt sind, um seine Expression zu steuern. Die Vektoren können andere Sequenzen, wie beispielsweise Promotoren und Förderer, um die Expression der eingesetzten Polynukleotidsequenz zu treiben, weitere Polynukleotidsequenzen, so dass das Protein, das durch das Polynukleotid codiert wird, als eine Fusion produziert wird, und/oder Nukleinsäure, die Sekretionssignale codiert, so dass das in der Wirtszelle produzierte Protein von der Zelle sekretiert wird, umfassen. Das Protein, das durch die Polynukleotidsequenz codiert wird, kann dann durch Transformieren des Vektors in Wirtszellen, in denen der Vektor funktionell ist, Kultivieren der Wirtszellen, so dass das Protein produziert wird, und Bergen des Proteins von den Wirtszellen oder aus dem umgebenden Medium erhalten werden. Prokaryotische und eukaryotische Zellen werden für diesen Zweck im Stand der Technik verwendet, einschließlich Stämmen von *E. coli*, Hefe und eukaryotischen Zellen, wie beispielsweise COS- oder CHO-Zellen. Die Auswahl der Wirtszelle kann verwendet werden, um die Eigenschaften des in diesen Zellen exprimierten Proteins zu steuern, z. B. um zu steuern, wo das Protein in der Wirtszelle abgelagert wird, oder um Eigenschaften wie beispielsweise seine Glykosylierung zu beeinflussen.

**[0037]** Das durch die Polynukleotidsequenz codierte Protein kann durch im Stand der Technik gut bekannte Verfahren expressiviert werden. Bequemerweise kann die Expression durch Ziehen einer Wirtszelle in Kultur, die solch einen Vektor enthält, unter geeigneten Bedingungen, die die Expression des Proteins verursachen oder erlauben, erreicht werden.

**[0038]** Systeme für das Klonieren und die Expression eines Proteins in einer Vielzahl von unterschiedlichen Wirtszellen sind gut bekannt. Geeignete Wirtszellen umfassen Bakterien, eukaryotische Zellen, wie beispielsweise Säugetierzellen und Hefezellen, und Baculovirussysteme. Außerdem ist das Retrovirussystem eine gute Alternative für das Klonieren und die Expression, da dieser Virus zusammen mit einer Anzahl von Zelltypen verwendet werden kann. Säugetierzelllinien, die im Stand der Technik für die Expression eines heterologen Polypeptids verfügbar sind, umfassen Eierstockzellen des chinesischen Hamsters, HeLa-Zellen, Babyhamsterembryonzellen, COS-Zellen und viele andere. Ein üblicher, bevorzugter bakterieller Wert ist *E. coli*.

**[0039]** Geeignete Vektoren können ausgewählt oder konstruiert werden, wobei sie, so wie es geeignet ist, geeignete Regelsequenzen, einschließlich Promotorsequenzen, Terminatorfragmente, Polyadenylierungssequenzen, Förderersequenzen, Markierungsgene und andere Sequenzen enthalten. Vektoren können, so wie es geeignet ist, Plasmide, Virusvektoren, z. B. Phagenvektoren, oder Phagemidvektoren sein. Bezuglich weiterer Details siehe z. B. Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2. Auflage, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Viele bekannte Techniken und Protokolle für die Manipulation von Polynukleotidsequenzen, z. B. bei der Präparation von Polynukleotidkonstrukten, Mutationserzeugung, Sequenzierung, Einführung von DNS in Zellen und Genexpression und Analyse von Proteinen sind im Detail in Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., Hrgs., John Wiley&Sons, 1992, beschrieben.

**[0040]** Das System kann für die Erzeugung von DNS-Bibliotheken verwendet werden, die variable Sequenzen aufweisen, welche nach der gewünschten Proteinfunktion in einer Anzahl von Weisen gescreent werden können. Nach Enzymfunktion kann mit Verfahren gescreent werden, die spezifisch für die konkrete Enzymfunktion sind, z. B. CMCase-Aktivität, β-Glukosidase-Aktivität oder auch Thermostabilität. Weiterhin können Phagenanzeige und Zelloberflächenanzeige für das Screenen nach Enzymfunktion verwendet werden (Crameri A. et al., Nature 1998 15; 391 (6664): 288–291; Zhang J. H. et al., PNAS. USA 1997 94 (9): 4504–4509; Warren M. S. et al., Biochemistry 1996, 9; 35 (27): 8855–8862; Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 66: 788–93, 2000) sowie auf geänderte Bindungseigenschaften von z. B. Antikörpern (Griffith et al., EMBO J. 113: 3245–3260, 1994).

**[0041]** Ein Protein, das durch die vorliegende Erfindung bereitgestellt wird, kann beim Screenen nach Molekülen verwendet werden, die seine Aktivität oder Funktion beeinflussen oder modulieren. Solche Moleküle können in einem therapeutischen (möglicherweise einschließlich eines prophylaktischen) Zusammenhangs nützlich sein.

**[0042]** Die vorliegende Erfindung stellt auch Vektoren bereit, die Polynukleotidsequenzen aufweisen und durch das oben beschriebene Verfahren erzeugt wurden.

**[0043]** Die vorliegende Erfindung stellt auch Zusammensetzungen bereit, die entweder Polynukleotidsequenzen, Vektoren, die die Polynukleotidsequenzen aufweisen, oder Proteine, die durch das oben beschriebene Verfahren erzeugt wurden, und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder einen Träger, der für Forschungszwecke geeignet ist, aufweisen.

**[0044]** Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren bereit, dass nach der Identifikation des Polynukleotids oder Polypeptids mit den gewünschten Charakteristika durch das oben beschriebene Verfahren die Herstellung des Polypeptids oder des Polynukleotids als Ganzes oder teilweise, optional im Zusammenschluss mit zusätzlichen Polypeptiden oder Polynukleotiden aufweist.

**[0045]** Nach der Identifikation eines Polynukleotids oder Polypeptids mit gewünschten Charakteristika, können diese dann durch gut bekannte Techniken, wie beispielsweise PKR, Klonieren oder Expression innerhalb einer Wirtszelle hergestellt werden, um größere Stückzahlen bereitzustellen.

**[0046]** Die resultierenden Polypeptide oder Polynukleotide können bei der Herstellung von industriellen Enzymen verwendet werden, beispielsweise bei Waschdetergenzenzymen, bei denen eine erhöhte Aktivität bei niedrigeren Temperaturen bevorzugt ist. Alternativ kann das hergestellte Polynukleotid oder Polypeptid als Forschungswerkzeug verwendet werden, d. h. Antikörper können in Immuntests verwendet werden, und Polynukleotide können als Hybridisierungssonden oder -primer verwendet werden. Alternativ können die resultierenden Polypeptide oder Polynukleotide bei der Herstellung von Medikamenten für diagnostische Zwecke, pharmazeutische Zwecke, die Therapie usw. verwendet werden, wie im folgenden diskutiert werden wird.

**[0047]** Die Polypeptide oder Polynukleotide, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erzeugt werden und als wünschenswerte Charakteristika aufweisend identifiziert wurden, können in pharmazeutische Zusammensetzungen formuliert werden. Diese Zusammensetzungen können zusätzlich zu einer der obigen Substanzen

ein pharmazeutisch akzeptables Verdünnungsmittel, einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, Puffer, Stabilisator oder andere Materialien aufweisen, die den Fachleuten gut bekannt sind. Solche Materialien sollten nicht toxisch sein und sollten nicht den Wirkungsgrad des aktiven Inhaltstoffs stören. Die präzise Natur des Trägers oder der anderen Materialien kann von der Verabreichungsroute abhängen, z. B. der oralen, intravenösen, kutanen oder subkutanen, nasalen, intramuskulären, intraperitonealen Route.

**[0048]** Pharmazeutische Zusammensetzungen für die orale Verabreichung können in Tabletten-, Kapsel-, Pulver- oder flüssiger Form vorliegen. Eine Tablette kann einen festen Träger, wie beispielsweise Gelatine oder ein Adjuvanz umfassen. Flüssige pharmazeutische Zusammensetzungen umfassen allgemein einen flüssigen Träger, wie beispielsweise Wasser, Petroleum, tierische oder pflanzliche Öle, Mineralöl oder synthetisches Öl. Physiologische Salzlösung, Dextrose oder andere Sacharidlösungen oder Glykole, wie beispielsweise Ethylenglykol, Propylenglykol oder Polyethylenglykol können eingeschlossen werden.

**[0049]** Für intravenöse, kutane oder subkutane Injektion oder Injektion in den Ort des Leidens wird der aktive Inhaltsstoff in der Form einer parenteral akzeptablen wässrigen Lösung vorliegen, die pyrogenfrei ist und einen geeigneten pH-Wert, geeignete Isotonizität und Stabilität aufweist. Die Fachleute sind gut in der Lage, unter Verwendung von beispielsweise isotonischen Vehikeln, wie beispielsweise Natriumchloridinjektionslösung, Ringer-Injektionslösung, mit Laktat versehene Ringer-Injektionslösung geeignete Lösungen zuzubereiten. Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Puffer, Antioxidationsmittel und andere Zusatzstoffe können nach Bedarf eingeschlossen werden.

**[0050]** Unabhängig davon, ob es sich um ein Polypeptid, z. B. einen Antikörper oder ein Fragment davon, ein Enzym, ein Polynukleotid oder Nukleinsäuremolekül, der/das gemäß der vorliegenden Erfindung nach der Erzeugung identifiziert wurde und an ein Individuum zu verabreichen ist, handelt, erfolgt die Verabreichung vorzugsweise in einer "prophylaktisch wirksamen Menge" oder in einer "therapeutisch wirksamen Menge" (je nach Einzelfall, obwohl Prophylaxe als Therapie betrachtet werden kann), die ausreichend ist, um Vorteile für das Individuum zu ergeben. Die aktuelle Menge, die verabreicht wird, und die Rate und der Zeaverlauf der Verabreichung werden von der Art und Ernsthaftigkeit dessen abhängen, was behandelt wird. Die Verschreibung der Behandlung, d. h. die Entscheidungen bezüglich der Dosis usw., liegt innerhalb der Verantwortung des Allgemeinmediziners oder anderer medizinischer Doktoren und berücksichtigt typischerweise die zu behandelnde Störung, den Zustand des individuellen Patienten, den Ort der Ausbringung, das Verfahren der Verabreichung und andere Faktoren, die dem Mediziner bekannt sind. Beispiele der erwähnten Techniken und Protokolle können in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, Osol, A. (Hrsg.), 1980, gefunden werden.

**[0051]** Alternativ können zielgerichtete Therapien verwendet werden, um das aktive Mittel unter Verwendung von Zielsystemen, wie beispielsweise von Antikörpern oder zellspezifische Liganden, spezifischer an einen bestimmten Zelltyp auszubringen. Zielrichtung kann aus einer Vielzahl von Gründen wünschenswert sein, z. B. wenn das Mittel unakzeptabel toxisch ist oder wenn es anderenfalls eine zu hohe Dosierung erfordern würde oder wenn es anderenfalls nicht in der Lage wäre, in die Zielzellen einzutreten.

**[0052]** Anstelle diese Mittel direkt zu verabreichen, könnten sie durch Expression von einem codierendem Gen, das in die Zellen eingeführt wird, beispielsweise in einem Virusvektor, in den Zielzellen produziert werden (eine Variante der VDEPT-Technik, d. h. das aktivierende Mittel, z. B. ein Enzym, wird in einem Vektor durch Expression von codierender DNS in einem Virusvektor erzeugt). Der Vektor könnte auf die bestimmten Zellen, die zu behandeln sind, zielgerichtet werden, oder er könnte regulatorische Elemente enthalten, die mehr oder weniger selektiv von den Zielzellen eingeschaltet werden.

**[0053]** Alternativ könnte das Mittel für die Umwandlung in die aktive Form durch ein aktivierendes Mittel, das in den zu behandelnden Zellen produziert wird oder auf diese zielgerichtet wird, in einer Vorform verabreicht werden. Dieser Ansatztyp ist manchmal als ADEPT oder VDEPT bekannt, wobei der erste die Zielrichtung des aktiven Mittels auf die Zellen durch Konjugation mit einem zellspezifischen Antikörper umfasst, während der letztere das Produzieren des aktiven Mittels, d. h. eines Enzyms, in einem Vektor durch Expression von codierender DNS in einem Virusvektor umfasst (siehe z. B. EP-A-415731 und WO 90/07936).

**[0054]** Eine Zusammensetzung kann abhängig von dem zu behandelnden Zustand allein oder in Kombination mit anderen Behandlungen verabreicht werden, entweder gleichzeitig oder aufeinander folgend.

**[0055]** Als eine weitere Alternative könnte das Polynukleotid, das nach der Erzeugung durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung als wünschenswerte Charakteristika aufweisend identifiziert wurde, in einem Gentherapieverfahren verwendet werden, um einen Patienten zu behandeln, der nicht in der Lage ist, das aktive

Polypeptid zu synthetisieren, das durch das Polynukleotid codiert wird, oder der nicht in der Lage ist, es auf einem normalen Niveau zu synthetisieren, wodurch die Wirkung bereitgestellt wird, die von dem entsprechenden Protein vom Wildtyp bereitgestellt wird.

**[0056]** Vektoren, wie beispielsweise Virusvektoren, sind im Stand der Technik verwendet worden, um Polynukleotide in eine große Vielzahl von unterschiedlichen Zielzellen einzuführen. Typischerweise werden die Zielzellen so gegenüber den Vektoren ausgesetzt, dass Transfektionen bei einem ausreichendem Anteil der Zellen erfolgen können, um einen sinnvollen therapeutischen oder prophylaktischen Effekt durch die Expression des gewünschten Polypeptids bereitzustellen. Die transizierte Nukleinsäure kann dauerhaft in das Genom jeder der Zieltumorzellen eingebaut werden, wodurch lang anhaltende Wirkung bereitgestellt wird, oder alternativ kann die Behandlung periodisch zu wiederholen sein.

**[0057]** Eine Vielzahl von Vektoren, sowohl von Virusvektoren als auch Plasmidvektoren, sind im Stand der Technik bekannt, siehe das US-Patent Nummer 5,252,479 und die WO 93/07282. Insbesondere ist eine Anzahl von Viren als Gentransfervektoren verwendet worden, einschließlich Papovaviren, wie beispielsweise SV40, Vacciniaivirus, Herpesviren, einschließlich HSV und EBV, und Retroviren. Viele Gentherapieprotokolle im Stand der Technik haben behinderte Mausretroviren verwendet.

**[0058]** Als Alternative zur Verwendung von Virusvektoren umfassen andere bekannte Verfahren der Einführung von Nukleinsäure in Zellen Elektroporation, Kalziumphosphatkopräzipitation, mechanische Techniken, wie beispielsweise Mikroinjektion, Transfer vermittelt durch Liposome und direkte DNS-Aufnahme und rezeptorvermittelten DNS-Transfer.

**[0059]** Wie oben erwähnt wurde, ist das Ziel von Gentherapie unter Verwendung von Nukleinsäure, die ein Polypeptid oder einen aktiven Teil davon codiert, die Menge des Expressionsprodukts der Nukleinsäure in einer Zelle zu erhöhen, in der das Niveau des Wildtyppolypeptids fehlt oder nur auf einem reduzierten Niveau vorliegt. Solch eine Behandlung kann therapeutisch bei der Behandlung von Zellen sein, die bereits krebsartig sind, oder prophylaktisch bei der Behandlung von Individuen, von denen durch Screenen bekannt ist, dass sie ein Anfälligkeitssallel und damit eine Prädisposition beispielsweise in Bezug auf Krebs aufweisen.

**[0060]** Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Set zum Erzeugen einer Polynukleotidsequenz oder einer Population von Sequenzen mit gewünschten Charakteristika auf, das ein Reagenz für ssDNS-Präparation, eine Exonuklease und Komponenten für das Ausführen einer PKR-Technik, zum Beispiel thermostabile DNS (Nukleotide) und ein Abbruchmittel, beispielsweise EGTA, aufweist.

**[0061]** Wie oben dargelegt wurde, bewirkt die vorliegende Erfindung in einfacher Weise die Erzeugung von mutierten Enzymsequenzen und deren zufällige Kombination zu funktionellen Enzymen mit wünschenswerten Eigenschaften. Als ein Beispiel für diesen Aspekt der Erfindung werden Enzymgene durch zu Fehlern neigende PKR mutiert, die in eine Mutationsrate von ungefähr 0,7% resultiert. Der resultierende Pool von mutierten Enzymgenen wird dann mit einer Exonuklease aufgeschlossen, vorzugsweise BAL31, und die Reaktion wird durch Zugabe von EGTA zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterbrochen, was in einen Satz von DNS-Fragmenten von unterschiedlichen Größen resultiert. Diese können dann einem PKR-basierten Wiederzusammenbau, wie er oben beschrieben wurde, unterworfen werden. Die resultierenden wieder zusammengebauten DNS-Fragmente werden dann kloniert, und eine Genbibliothek wird aufgebaut. Aus dieser Bibliothek können dann Klone ausgewählt und sequenziert werden.

**[0062]** Eine weitere Anwendung dieser Technologie ist die Erzeugung einer Population von variablen DNS-Sequenzen, die für weitere Selektionen und Analysen ausgewählt werden können. Neben codierenden größeren Proteinen, z. B. Antikörperfragmenten und Enzymen, kann die DNS Peptide codieren, bei denen die funktionalen Charakteristika der Moleküle für die Entwicklung von unterschiedlichen Selektionssystemen verwendet werden können. Selektion von rekombinierten DNS-Sequenzen, die Peptide codieren, ist kürzlich beschrieben worden (Fisch et al., PNAS. USA 1996, 23. Juli; 93 (15): 7761–7760). Zusätzlich kann die variable DNS-Population verwendet werden, um eine Population von RNS-Molekülen mit beispielsweise katalytischen Aktivitäten herzustellen. Vaish et al., (PNAS. USA 1998, 3. März; 95 (5): 2158–2162) demonstrierte die Entwicklung eines funktionellen Systems für die Selektion von katalytischer RNS, und Eckstein F (Ciba Found. Symp. 1997; 209; 207–212) hat die Anwendung von katalytischer RNS durch spezifische Einführung von katalytischer RNS in Zellen dargelegt. Das System kann verwendet werden, um den Sequenzraum bei der Selektion von funktionellen Peptiden/Molekülen mit katalytischen Aktivitäten basierend auf rekombinierten DNS-Sequenzen weiter zu durchsuchen.

[0063] Aspekte und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden jetzt anhand von Beispielen unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen illustriert werden. Weitere Aspekte und Ausführungsformen werden den Fachleuten aufscheinen.

#### KURZBESCHEIBUNG DER ZEICHNUNGEN

- [0064] [Fig. 1](#) zeigt das Prinzip des Verfahrens von dem Matrizenmolekül bis zu dem verbesserten Molekül.
- [0065] [Fig. 2](#) zeigt die prinzipiellen Schritte bei der Herstellung von Einzelstrang-DNS unter Verwendung von Biotin.
- [0066] [Fig. 3](#) zeigt die prinzipiellen Schritte bei der Herstellung von Einzelstrang DNS unter Verwendung von Phagen.
- [0067] [Fig. 4](#) zeigt die prinzipiellen Schritte beim Erzeugen von Einzelstrang DNS unter Anwendung von Exonukleasebehandlung.
- [0068] [Fig. 5](#) zeigt die prinzipiellen Schritte für den Zusammenbau von Einzelstrang-DNS-Fragmenten unter Verwendung von PKR.
- [0069] [Fig. 6](#) zeigt den Prozentsatz von gebildeten Rekombinanten mit einer Überkreuzung nach Aufschluss von dsDNS mit 20/ml BAL31 für unterschiedliche Zeiträume.
- [0070] [Fig. 7](#) zeigt den Prozentsatz an Rekombinanten mit zwei Überkreuzungen, der nach Aufschluss von dsDNS mit 20 U/ml BAL31 für unterschiedliche Zeiträume gebildet wird.
- [0071] [Fig. 8](#) zeigt den Prozentsatz an Rekombinanten mit einer Überkreuzung, der nach Aufschluss von ssDNS mit 1,25 U/ml BAL31 für unterschiedliche Zeiträume gebildet wird.
- [0072] [Fig. 9](#) zeigt den Prozentsatz an Rekombinanten mit zwei Überkreuzungen, der nach Aufschluss von ssDNS mit 1,25 U/ml BAL31 für unterschiedliche Zeiträume gebildet wird.
- [0073] [Fig. 10](#) zeigt den Prozentsatz an Rekombinanten mit einer Überkreuzung, der nach Aufschluss von ssDNS mit 11 U/ml BAL31 für unterschiedliche Zeiträume gebildet wird.
- [0074] [Fig. 11](#) zeigt den Prozentsatz an Rekombinanten mit zwei Überkreuzungen, der nach Aufschluss von ssDNS mit 11 U/ml BAL31 für unterschiedliche Zeiträume gebildet wird.
- [0075] [Fig. 12](#) zeigt ein Agaroseelektrophoresegelbild von Fragmenten, die nach Aufschluss von 300 ng ssDNS mit BAL31 für 50 Minuten (Lane 1), 30 Minuten (Lane 2) und 10 Minuten (Lane 3) erzeugt wurden. Unbehandelte ssDNS ist in Lane 4 gezeigt. Molekulargewichtsmarker sind in Lane 5 gezeigt.
- [0076] [Fig. 13](#) zeigt die entsprechenden Gelchromatogramme für Lane 4 in [Fig. 12](#).
- [0077] [Fig. 14](#) zeigt die entsprechenden Gelchromatogramme für Lane 3 in [Fig. 12](#).
- [0078] [Fig. 15](#) zeigt die entsprechenden Gelchromatogramme für Lane 2 in [Fig. 12](#).
- [0079] [Fig. 16](#) zeigt ein Agaroseelektrophoresegelbild von Fragmenten, die nach Aufschluss von 300 ng DNS mit Exonuklease VII für 10 Minuten (Lane 3), 20 Minuten (Lane 4) und 30 Minuten (Lane 5) erzeugt wurden. Unbehandelte ssDNS ist in Lane 2 gezeigt. Molekulargewichtsmarker sind in Lane 1 gezeigt.
- [0080] [Fig. 17](#) zeigt ein Agaroseelektrophoresegelbild von Fragmenten, die nach Aufschluss von 300 ng DNS mit Exonuklease Rec J<sub>f</sub> (9 U/mg ssDNS) für 10 Minuten (Lane 2), 20 Minuten (Lane 3) und 30 Minuten (Lane 4) erzeugt wurden. Unbehandelte ssDNS ist in Lane 1 gezeigt. Molekulargewichtsmarker sind in Lane 5 gezeigt.
- [0081] [Fig. 18](#) zeigt ein Agaroseelektrophoresegelbild von Fragmenten, die nach Aufschluss von 300 ng DNS mit Exonuklease Rec J<sub>f</sub> (36 U/mg ssDNS) für 10 Minuten (Lane 3), 20 Minuten (Lane 4) und 30 Minuten (Lane 5) erzeugt wurden. Unbehandelte ssDNS ist in Lane 2 gezeigt. Molekulargewichtsmarker sind in Lane 1 und Lane 6 gezeigt.

[0082] [Fig. 19](#) zeigt ein Agaroseelektrophoresegelbild von Fragmenten, die nach Aufschluss von 300 ng DNS mit DNase I (0,15 U Enzym/mg DNS) erzeugt wurden. Die Proben in den Bahnen (Lanes) waren wie folgt:

Lane 1:	Molekulargewichtsmarker
Lane 2:	Unbehandelte ssDNS in Mg-Puffer
Lane 3:	ssDNS fragmentiert mit DNase I in Mg-Puffer
Lane 4:	Unbehandelte ssDNS in Mn-Puffer
Lane 5:	ssDNS fragmentiert mit DNase I in Mn-Puffer
Lane 6:	(leer)
Lane 7:	(leer)

[0083] [Fig. 20](#) zeigt ein Agaroseelektrophoresegelbild von Fragmenten, die nach Aufschluss von 300 ng DNS mit DNase I erzeugt wurden. Die Proben in den Bahnen (Lanes) waren wie folgt:

Lane 1:	Molekulargewichtsmarker
Lane 2:	Unbehandelte dsDNS in Mg-Puffer
Lane 3:	Unbehandelte dsDNS in Mg-Puffer
Lane 4:	Unbehandelte ssDNS (Vorwärtsstrang) in Mg-Puffer
Lane 5:	Unbehandelte ssDNS (Vorwärtsstrang) in Mg-Puffer
Lane 6:	Unbehandelte ssDNS (Rückwärtsstrang) in Mg-Puffer
Lane 7:	Unbehandelte ssDNS (Rückwärtsstrang) in Mg-Puffer
Lane 8:	dsDNS fragmentiert mit DNase I (0,24 U Enzym/μg DNS) in Mg-Puffer
Lane 9:	dsDNS fragmentiert mit DNase I (1,3 U Enzym/μg DNS) in Mg-Puffer
Lane 10:	ssDNS (Vorwärtsstrang) fragmentiert mit DNase I (0,24 U Enzym/μg DNS) in Mg-Puffer
Lane 11:	ssDNS (Vorwärtsstrang) fragmentiert mit DNase I (1,3 U Enzym/μg DNS) in Mg-Puffer
Lane 12:	ssDNS (Rückwärtsstrang) fragmentiert mit DNase I (0,24 U Enzym/μg DNS) in Mg-Puffer
Lane 13:	ssDNS (Rückwärtsstrang) fragmentiert mit DNase I (1,3 U Enzym/μg DNS) in Mg-Puffer

[0084] [Fig. 21](#) zeigt die entsprechenden Gelchromatogramme für Lane 6 in [Fig. 20](#).

[0085] [Fig. 21](#) zeigt die entsprechenden Gelchromatogramme für Lane 6 in [Fig. 20](#).

[0086] [Fig. 22](#) zeigt die entsprechenden Gelchromatogramme für Lane 12 in [Fig. 20](#).

[0087] [Fig. 23](#) zeigt die entsprechenden Gelchromatogramme für Lane 13 in [Fig. 20](#).

[0088] [Fig. 24](#) zeigt ein Agaroseelektrophoresegelbild von Fragmenten, die nach Aufschluss von 300 ng DNS mit Mungobohnennuklease erzeugt wurden. Die Proben in den Bahnen (Lanes) waren wie folgt:

Lane 1:	Unbehandelte ssDNS in Mg-Puffer
Lane 2:	ssDNS fragmentiert mit Mungobohnennuklease für 10 Minuten
Lane 3:	Molekulargewichtsmarker

#### BEISPIELE

[0089] Die DNS-Umsetzprozedur kann durch die in den [Fig. 1](#) bis [Fig. 5](#) gezeigten Schritte illustriert werden. Das Gen, das das interessierende Protein (X) bei dem Plasmid pFab5chis codiert, wird in diesem Beispiel verwendet. Zufällige Mutationen werden durch zu Fehlern neigende PKR eingeführt. Dann wird Einzelstrang-

DNS präpariert. Dies kann, wie oben diskutiert wurde, entweder durch biotinylierte Primer oder die Verwendung von Phagen, die in der Lage sind, Einzelstrang-DNS zu packen, durchgeführt werden. Die codierenden und die nicht codierenden ssDNS-Stränge werden in unterschiedlichen Reaktionen präpariert (A und B). Die ssDNS-Stränge von beiden Reaktionen werden getrennten enzymatischen Behandlungen unter Verwendung von beispielsweise BAL31 unterworfen. Durch Mischen der zwei Poole von Einzelstrang-DNS-Fragmenten in equimolaren Mengen kann das Gen in einer umgesetzten Weise und in vielen Versionen durch Anwendung von zwei aufeinander folgenden PKR-Reaktionen wieder zusammengebaut werden, wobei die erste Reaktion keinen Primer enthält. Nach dem Klonieren dieser Bibliothek von wieder zusammengebauten Genen in pY können Selektionen durchgeführt werden, um das interessierende verbesserte Molekül zu erzielen.

**[0090]** Eine detailliertere Beschreibung der Beispiele der vorliegenden Erfindung wird unten gegeben.

#### Beispiel 1

##### Reagenzien

**[0091]** AmpliTaq®-polymerase wurde von Perkin-Elmer Corp., dNTP wurde von Boehringer Mannheim Biochemica (Mannheim, Deutschland) und BAL31-Nuklease wurde von New England Biolabs Inc. (Beverly, USA) gekauft. Alle Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs Inc. (Beverly, USA) gekauft. Ethidiumbromid wurde von Bio-Rad Laboratories (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) gekauft. T4 DNS-Ligase wurde von New England Biolabs Inc. (Beverly, USA) gekauft. EDTA und EGTA wurden von Kebo Lab (Schweden) gekauft.

**[0092]** Alle Primer wurden im Labor entwickelt und von Life Technologies (Täby, Schweden) und SGS-DNS (Köping, Schweden) erhalten.

##### PKR

**[0093]** Alle Polymerasekettenreaktionen (PKR) wurden in einem automatischen Thermocycler (Perking-Elmer Cetus 480, Norwalk, CT, USA) durchgeführt. PKR-Techniken für die Verstärkung von Nukleinsäure sind in dem US-Patent Nummer 4,683,195 beschrieben. Literaturangaben für die allgemeine Verwendung von PKR-Techniken umfassen Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Bio., 51: 263, (1987), Ehrlich (Hrsg.) PCR-Technology, Stockton Press, New York, 1989, Ehrlich et al., Science, 252: 1643–1650, (1991), "PCR protocols; A Guide to Methods and Applications", Hrsg. Innis et al., Academic Press, New York, (1990).

##### Sequenzieren

**[0094]** Alle Konstrukte wurden durch Verwendung des BigDye Terminator Cycle Sequencing Sets (Perkin-Elmer, Elmerill, Kalifornien, USA) sequenziert. Das Sequenzieren wurde auf einem ABI Prism 377 DNA Sequencer durchgeführt.

##### Agaroseelektrophorese

**[0095]** Agaroseelektrophorese von DNS wurde mit 2% Agarosegelen (AGAROSE (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA)) mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid in Tris-Azetatpuffer (TAE-Puffer 0,04 M Tris-Azetat, 0,001M EDTA) durchgeführt. Proben für die Elektrophorese wurden mit einem sterilen gefilterten Ladepuffer gemischt, der aus 25% Ficoll und Bromphenolblau bestand, und in die Vertiefungen des 2% Agarosegels geladen. Die Elektrophorese lief bei 90 V für 45 Minuten soweit nichts anderes angegeben ist in Tris-Azetatpuffer mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid. Bänder von geeigneter Größe wurden bei Bedarf unter Verwendung des Quiaquick Gelextraction Kit (Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland) gelgereinigt. Als Molekulargewichtsstandard wurde DNS-Molekulargewichtsmarker-1 kb Leiter (Gibco BRL) verwendet. Die DNS-Konzentration der extrahierten Gelprodukte wurde unter Verwendung eines Spektrophotometers abgeschätzt.

##### Bakterienstamme

**[0096]** Der Escherichia coli-stamm TOP10F' wurde als bakterieller Wirt für Transformationen verwendet. Chemosynthetische Zellen dieses Stamms wurden hergestellt, wie grundsätzlich von Hanahan, D. 1983, Studies on Transformation of Escherichia coli with plasmids, J. Mol. Biol. 166: 557–580, beschrieben ist. Elektrokompetente Zellen dieses Bakterienstamms wurden erzeugt (Dower, W. J., F. F. Miller und C. W. Ragsdale, 1988: High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. Nucleic Acids. Res. 16: 6127).

## Plasmide

**[0097]** Alle genetischen Manipulationen wurden bei pFab5chis gemäß Molecular Cloning; A Laboratory Manual (zweite Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) durchgeführt. Dieser Vektor wurde entwickelt, um jegliche scFv-Gene aufzunehmen, die zwischen den Sfil und NotI-Plätzen eingesetzt werden. Der Sfil-Platz ist in der pelB-Führerregion angeordnet, und der NotI-Platz ist kurz nach der VL-Region angeordnet, so dass VH-Linker-VL eingesetzt ist. In diesem Fall wurde ein gegen CD40 gerichteter Antikörper verwendet.

## Primer

**[0098]** Zwei biotinylierte Primer, die das Antikörpergen von pFab5chis umgeben, wurden mit der folgenden Sequenz, die die vorgesehenen einmaligen Restriktionsplätze umfasst, entwickelt:

1736 Sfil-Vorwärtsprimer:

5'-ATT ACT CGC GGC CCA GCC GGC CAT GGC CCA CAG GTC AAG CTC GA

und

1735 NotI-Rückwärtsprimer:

5'-TTA GAG CCT GCG GCC GCC TTG TCA TCG TCG TCC TT

**[0099]** Zwei nicht biotinylierte Primer, die das Antikörpergen von pFab5chis umgeben, wurden mit der folgenden Sequenz, die die beabsichtigten einmaligen Restriktionsplätze umfasste, entwickelt:

1664 Sfil-Vorwärtsprimer:

5'-ATT ACT CGC GGC CCA GCC GGC CAT GGC CCA CAG GTC AAG CTC GA

und

1635 NotI-Rückwärtsprimer:

5'-TTA GAG CCT GCG GCC GCC TTG TCA TCG TCG TCC TT

## Standard-PKR

**[0100]** Standard-PKR-Reaktionen wurden mit 25 Zyklen laufen gelassen, die aus dem folgenden Profil bestanden: Denaturierung (94°C, 1 Minute), Primeranlassen (55°C, 1 Minute) und Ausweitung (72°C, 3 Minuten). Jede PKR-Reaktion enthielt 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTP, 1 μM Vorwärtsprimer, 1 μM Rückwärtsprimer, 1,25 U AmpliTaq® thermostabile DNS-Polymerase (Perkin-Elmer Corp.) und 50 ng Matrize in einem Endvolumen von 100 μl.

## Zu Fehlern neigende PKR

**[0101]** Die zu Fehlern neigenden PKR-Reaktionen wurden in einem 10× Puffer durchgeführt, der 500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μg Gelatine enthielt (nach Kuipers et al., Nucleic Acids Res. 1991, 15. August; 19 (16): 4558, aber mit von 2 mM auf 5 mM erhöhter MgCl<sub>2</sub>-Konzentration).

**[0102]** Für jede 100 μl Reaktion wurde die folgenden Substanzen gemischt:

dATP 5 mM	5 μl
dGTP 5 mM	5 μl
dTTP 10 mM	10 μl
dCTP 10 mM	10 μl
20 μM 3'-Primer	1,5 μl

20 µM 5'-Primer	1,5 µl
10× Kuijpers-Puffer	10 µl
Steriles mp-H <sub>2</sub> O	46,3 µl

**[0103]** Die Matrize im pFab5chis-Vektor wurde in einer Menge von 50 ng zugegeben. 10 µl 10 mM MnCl<sub>2</sub> wurden zugegeben, und das Rohr wurde daraufhin überprüft, dass kein Niederschlag von MnO<sub>2</sub> erfolgte. Mindestens 5 Einheiten Taq-Enzym wurden zugegeben. Die zu Fehlern neigende PKR wurde bei den folgenden Temperaturen für 25 Zyklen ohne einen heißen Start laufen gelassen: 94°C 1', 45°C 1', 72°C 1, +72°C für 7 Minuten. Das resultierende Produkt war eine zu Fehlern neigende Einsetzung über das Protein von ungefähr 750 Basenpaaren. Diese Einsetzung wurde vor weiterer Behandlung mit dem Gibco-PKR-Reinigungsset gereinigt.

#### Erzeugung von Einzelstrang-DNS durch biotinylierte Primer

**[0104]** Ein interessierendes Fragment wurde durch zwei getrennte PKR-Reaktionen verstärkt. Diese Reaktionen können Standard-PKR, wie sie oben beschrieben wurde, oder zu Fehlern neigende PKR, wie sie ebenfalls oben beschrieben wurde, sein. Die Primer sollten so ausgelegt werden, dass in der einen Reaktion der Vorwärtsprimer biotinyliert ist und in der anderen Reaktion der Rückwärtsprimer biotinyliert ist. Zum Beispiel wurden PKR-Reaktionen mit A) Primern 1736 und 1635 und B) Primern 1664 und 1735 mit dem oben erwähnten Profil für 25 Zyklen mit pFab5chis-Antikörper als Matrize durchgeführt. Dies ergab PKR-Produkte von ungefähr 750 bp, wobei bei A der obere Strang biotinyliert war und bei B der untere Strang biotinyliert war.

**[0105]** Die nicht-biotinylierten Stränge wurden durch Reinigung unter Verwendung einer festen Matrix beschichtet mit Streptavidin, zum Beispiel Dynabeads, erhalten. Die magnetischen Perlen werden gewaschen und mit PBS/1% BSA und B&W-Puffer, der 5 mM Tris pH 7,5, 1 M NaCl und 0,5 mM EGTA enthält, equilibriert. 100 µl von jedem PKR-Produkt werden mit 100 µl Perlen aufgelöst in 2× B&W-Puffer vermischt und bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter Rotation inkubiert. Ungebundene PKR-Produkte werden durch vorsichtiges zweimaliges Waschen mit B&W entfernt. Der nicht-biotinylierte Strang der eingefangenen DNS wird durch alkalische Denaturierung eluiert, indem die DNS für 10 Minuten mit 25 µl 0,1 M NaOH bei Raumtemperatur inkubiert wird. Die Lösung wird von den Perlen getrennt und mit 7,5 µl 0,33 M HCl und 2,5 µl 1 M Tris pH 8 neutralisiert.

#### Erzeugung von Einzelstrang-DNS unter Verwendung von Phagen

**[0106]** Das interessierende Fragment wurde unter Verwendung von PstI/HindIII-Restriktionsenzymen in Bakteriophagen-M13-Vektoren M13mp18 und M13mp19 kloniert. Die Bakteriophagen wurden unter Verwendung des Escherichia coli-Stamms TOP10F' gemäß konventionellen Verfahren propagiert. Einzelstrang-DNS für den oberen Strang wurde von dem Bakteriophagenvektor M13mp18 präpariert, und Einzelstrang-DNS für den unteren Strang wurde von dem Bakteriophagenvektor M13mp19 präpariert. Kurz gesagt wurden 1,5 ml einer infizierten Bakterienkultur bei 12000 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 200 µl 20% PEG8000/2,5 M NaCl präzipitiert. Die pelletierten Bakteriophagen wurden in 100 µl TE resuspendiert. 50 µl Phenol equilibriert mit Tris-Cl (pH 8.0) wurden zugegeben, und die Probe wurde durchgewirbelt. Nach Zentrifugieren bei 12000 g für 1 Minute bei Raumtemperatur wurde die obere Phase, die die DNS enthielt, transferiert und mit Ethanol präzipitiert. Das DNS-Pellet wurde in 50 µl TE (pH 8,0) aufgelöst und bei 20°C gelagert. (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Kapitel 4). Einzelstrang-DNS, die von Phagen präpariert wird, ist ringförmig und muss vor der BAL31-Behandlung geöffnet werden. Dies kann mit einer Endonuklease bewirkt werden, die in der Lage ist, Einzelstrang-DNS zu spalten.

#### Erzeugung von fragmentierter Einzelstrang-DNS unter Verwendung von BAL31

**[0107]** Die ssDNS-Stränge von allen Reaktionen (die obere bzw. untere Stränge enthielten) wurden einer separaten enzymatischen Behandlung unter Verwendung von beispielsweise BAL31 unterworfen. Jede Aufschlussreaktion enthielt 0,02 µg/µl ssDNS, 600 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA pH 8,0 und BAL31 in verschiedenen Enzymkonzentrationen, die von 0,1 bis 5 U/ml reichten. Die Reaktionen wurden bei 30°C inkubiert, und Fraktionen von aufgeschlossener ssDNA wurden nacheinander bei 10, 30, 60 und 120 Sekunden oder mehr gesammelt. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von EDTA und Wärmebehandlung bei 65°C für 10 Minuten gestoppt. Die ssDNA Fragmente wurden durch Phenol-/Chloroformextraktion gereinigt und mit Ethanol präzipitiert. Die ssDNA wird in 10 mM Tris pH 8,0 resuspendiert.

[0108] Das Aufschlussmuster wurde durch 1% Agarosegelektrophorese ausgewertet.

Reinigung von durch Aufschluss erzeugten Fragmenten:

[0109] Aufgeschlossene DNS-Fragmente wurden durch Phenol-(Chloroform-/Isoamylalkoholextraktion gereinigt. 50 µl von gepuffertem Phenol wurden zu jedem Rohr mit 100 µl Probe zusammen mit 50 µl einer Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) hinzu gegeben. Die Röhrchen wurden für 30 Sekunden verwirbelt, und dann für 1 Minute in einer Mikrofuge bei 14000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die obere Phase wurde dann gesammelt und mit 2,5 Volumen 99,5% Ethanol (1/10 war 3 M Natriumazetat, pH 5,2) gemischt. Die DNS wurde für eine Stunde bei -80°C präzipitiert. Die DNS wurde dann durch Zentrifugieren für 30 Minuten in einer Mikrofuge bei 14000 Umdrehungen pro Minute pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen und dann in 10 µl steriles Wasser wieder aufgelöst.

Analyse der durch Aufschluss hergestellten gereinigten Fragmente auf Agarosegel

[0110] 5 µl des aufgelösten Pellets von jedem Zeitpunkt und von der Leerprobe wurden mit 2,5 µl Ladepuffer (25% Ficoll und Bromphenolblau) gemischt und in Vertiefungen in einem 2% Agarosegel geladen. Die Elektrophorese der unterschiedlichen Zeitpunkte wurde wie oben durchgeführt.

Wiederzusammenbau von Fragmenten voller Länge

[0111] Der Wiederzusammenbau der ssDNS-Fragmente wird durch zwei aufeinander folgende PKR-Reaktionen erreicht. Die erste PKR-Reaktion sollte 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 0,3 U Taq-Polymerase und 2 µl BAL31-behandelte Probe enthalten, alles in einem Endvolumen von 25 µl, und 5 Zyklen mit dem folgenden Profil unterworfen werden: 94°C für 1 Minute, 50°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten +72°C für 5 Minuten. Die zweite PKR-Reaktion sollte 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 0,6 U Taq-Polymerase, 1 µM Vorwärtsprimer, 1 µM Rückwärtsprimer und 5 µM Probe von der ersten PKR-Reaktion enthalten, alles in einem Endvolumen von 5 µl, und 15 Zyklen mit dem folgenden Profil unterworfen werden: 94°C für 1 Minute, 55°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten +72°C für 7 Minuten. Die resultierenden Produkte können durch Agarosegelektrophorese ausgewertet werden.

Restriktionsaufschluss von wieder zusammengebautem Fragment und Plasmid mit Sfil und NotI

[0112] Das wieder zusammengebaute Fragment und das Plasmid pFab5chis wurden zuerst mit Sfil unter Verwendung von NEB-Puffer 2, der BSA und 11 U Enzym/µg DNS enthielt, gespalten. Die Reaktion wurde für 4 Stunden bei 50°C durchgeführt. Danach wurde die DNS mit NotI durch Hinzufügen von Konversionspuffer und 6 U Enzym/µg DNS gespalten. Diese Reaktion wurde bei 37°C über Nacht durchgeführt.

Gelreinigung von restriktionsaufgeschlossenem Vektor und restriktionsaufgeschlossenen wieder zusammengebautem Fragment

[0113] Die Spaltungsreaktionen wurden auf einem 1% Agarosegel analysiert. Die restriktionsaufgeschlossene Einsetzung zeigte ein Spaltungsprodukt von ungefähr 750 bp. Dies entspricht gut der erwarteten Größe. Das Band von gespaltener Einsetzung und Plasmid wurde ausgeschnitten und gelextrahiert, wie zuvor beschrieben wurde.

Ligation von wieder zusammengebautem restriktionsaufgeschlossenen Fragment mit restriktionsaufgeschlossenem pFab5chis

[0114] Gereinigtes gespaltenes pFab5chis wurde mit gereinigtem wieder zusammengebauten restriktionsaufgeschlossenen Fragment bei 12°C Wasserbad für 16 Stunden ligiert. 50 µl des Vektors wurden mit 50 µl der Einsetzung und 15 µl 10× Puffer (versetzt mit dem Enzym), 7,5 µl Ligase (5 U/µl) und steriles Wasser bis auf ein Endvolumen von 150 µl gemischt. Eine Ligation des restriktionsaufgeschlossenen pFab5chis ohne jegliche Einsetzung wurde ebenfalls in derselben Weise durchgeführt.

Transformation von chemisch kompetentem E. coli-TOP10F' mit der ligatierten wieder zusammengebauten Einsetzung und pFab5chis

[0115] Die Ligationsreaktion wurde durch Phenol-/Chloroformextraktion gereinigt, wie oben beschrieben wurde. Die obere Phase der Extraktion wurde gesammelt und mit 2,5 Volumen 99,5% Ethanol gemischt (1/10 war

3 M Natriumazetat, pH 5,2). Die DNS wurde für 1 Stunde bei –80°C präzipitiert. Die DNS wurde dann durch Zentrifugieren für 30 Minuten in einer Mikrofuge bei 14000 Umdrehungen pro Minute pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen und dann in 10 µl sterilem Wasser wieder aufgelöst. 5 µl von jeder Ligation wurden separat mit 95 µl chemisch kompetentem E. coli-TOP10F' gemischt, für eine Stunde auf Eis inkubiert und dann transformiert (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, zweite Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Nach einer Stunde Wachstum wurden die Bakterien von den beiden Transformationen auf Ampicillin enthaltenden Agarplatten (100 µg/ml) ausgebreitet. Die Platten wurden kopfüber für 14 Stunden in einem 37°C Inkubator gezogen.

#### Beispiel 2 – Rekombinationsfrequenzen; Vergleich von dsDNS und ssDNS

**[0116]** In weiteren Vergleichsexperimenten wurden drei scF $\mu$ -Antikörperfragmente in Rekombinationsexperimenten verwendet, entweder als dsDNS oder als ssDNS.

##### dsDNS

**[0117]** Die drei scFv-Gene wurden jeweils durch PKR unter Verwendung von Vorwärts- und Rückwärtsprimern und Standard-PKR-Prozedur verstärkt. Die Größe der Bänder wurde durch Agaroseelektrophorese bestätigt, und der Rest des verstärkten PKR-Produkts wurde unter Verwendung des Concert-PKR-Reinigungssets (Gibco) gereinigt. Die dsDNS von den drei scFv wurde in äquivalaren Mengen gemischt und mit BAL31 behandelt. Jede Aufschlussreaktion enthielt dsDNS in einer Konzentration von 0,02 µg/µl Reaktionsvolumen, 600 mmol NaCl, 20 mmol Tris-HCl, 12 mmol CaCl<sub>2</sub>, 12 mmol MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol EDTA pH 8,0 und BAL31 in verschiedenen Enzymkonzentrationen (unter Verwendung von 4, 20 oder 100 U Enzym/ml Reaktionsvolumen). Die Reaktionen wurden bei 30°C inkubiert, und Fraktionen der aufgeschlossenen dsDNS wurden nacheinander bei 10, 30 und 50 min gesammelt. Die Reaktionen wurden mit EDTA und Hitzebehandlung gestoppt (alternativ kann ein EDTA-freies Hitzeaktivierungsprotokoll verwendet werden, s. u.) und unter Verwendung von Phenol-/Chloroformextraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt. Die dsDNS-Proben wurden in 10 mmol Tris pH 8,0 resuspendiert.

**[0118]** Unter Getrennthaltung jedes Zeitpunkts wurden die Proben Wiederzusammenbau-PKR (zu diesem Zusammenbau werden 60 ng DNS verwendet) und Verstärkungs-PKR gemäß dem Protokoll unterworfen und in pGEM (Produktnummer A362A, Promega, Madison, USA) kloniert. 18 Klone Von jedem Zeitpunkt wurden sequenziert, und die Anzahl und Frequenz der Rekombinationen wurden bestimmt.

##### Hitzeaktivierung von Exonukleaseaufschlüssen

**[0119]** Ein Protokoll zum Stoppen der BAL31-Reaktion ohne Verwendung von EDTA ist etabliert worden. Dieses Hitzeaktivierungsprotokoll vermeidet die Verwendung von Phenol-/Chloroformextraktion, die gesundheitsgefährlich ist, und außerdem einen Verlust an Material verursacht.

**[0120]** Kurz gesagt wird die Probe für 10 min bei 95°C inkubiert und dann direkt auf Eis gegeben, um die enzymatische Reaktion zu beenden. Danach kann diese Probe direkt unter Verwendung Von Ethanol präzipitiert werden.

##### ssDNS

**[0121]** Die drei scFv-Gene wurden jeweils in zwei PKR-Reaktionen unter Verwendung von Primerpaaren vorwärts/rückwärts-Biotin und vorwärts-Biotin/rückwärts unter Anwendung von Standard-PKR-Prozedur verstärkt. Die Größe der Bänder wurde durch Agaroseelektrophorese bestätigt, und der Rest des verstärkten PKR-Produkts wurde unter Verwendung des Concert-PKR-Reinigungssets (Gibco) gereinigt. Einzelstrang-DNS wurde unter Verwendung von magnetischen Perlen gemäß dem Protokoll erhalten, wobei drei Sense-Stränge und drei Antisense-Stränge erreicht wurden. Die Sense-Stränge bzw. die Antisense-Stränge von den drei scFv wurden in äquimolaren Mengen gemischt und mit BAL31 gemäß dem Protokoll behandelt (unter Verwendung von 1, 25 oder 11 U Enzym/ml Reaktionsvolumen und ssDNS in einer Konzentration von 0,015 µg/µl Reaktionsvolumen), und Proben wurden bei null (d. h. nicht aufgeschlossen) 10, 30 und 50 min entnommen. Die Reaktionen wurden mit EDTA und Hitzebehandlung gestoppt und unter Verwendung von Phenol-Chloroformextraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt. Unter Getrennthaltung jedes Zeitpunkts aber unter Mischen von Sense- und Antisense-Strängen wurden die Proben Wiederzusammenbau-PKR (für diesen Zusammenbau wurden 60 ng DNS verwendet) und Verstärkungs-PKR gemäß dem Protokoll unterworfen und in pGEM kloniert. 18 Klone von jedem Zeitpunkt wurden sequenziert und die Anzahl und Frequenz von Rekombinationen wurde bestimmt.

## Resultate

**[0122]** Die höchste Frequenz von Kombinationen von dsDNS wurde bei Verwendung von 20 U Enzym/ml Reaktionsvolumen (0,02 µg/µl DNS enthaltend) und Behandeln für 10 min erreicht. Dies ergab 39% der Klone mit einer Überkreuzung ([Fig. 6](#)) und 17% der Klone mit zwei Überkreuzungen ([Fig. 7](#)). Die Verwendung von 4 U Enzym/ml ergab keine Überkreuzung unabhängig von dem Zeitpunkt der Fragmentierung, und 100 U Enzym/ml resultierten in eine vollständige Fragmentierung in sehr kleine Fragmente, wie durch den Fehler beim Wiedergewinnen des Gens voller Länge während des Wiederzusammenbaus angezeigt wird.

**[0123]** Die Resultate von den Experimenten unter Verwendung von ssDNS sind in den [Fig. 8](#) bis [Fig. 10](#) gezeigt. [Fig. 8](#) zeigt 1,25 U/ml BAL31 und Klone mit einer Überkreuzung, [Fig. 9](#) zeigt 1,25 U/ml BAL31 und Klone mit zwei Überkreuzungen. [Fig. 10](#) zeigt 11 U/ml BAL31 und Klone mit einer Überkreuzung, und [Fig. 11](#) zeigt 11 U/ml BAL31 und Klone mit zwei Überkreuzungen.

**[0124]** Die höchste Frequenz von Rekombinationen, die eine Überkreuzung unter Verwendung von ssDNS ergeben, wurde bei Verwendung von 11 U Enzym/ml und Behandeln für 10 min erreicht ([Fig. 10](#)). 59% der Klone hatten eine Überkreuzung. Die höchste Frequenz an Rekombinationen, die zwei Überkreuzungen unter Verwendung von ssDNS ergeben, wurde unter Verwendung von 1,25 U Enzym/ml und Behandeln für 30 min erreicht ([Fig. 9](#)). 20% der Klone hatten zwei Überkreuzungen.

## Schlussfolgerungen und Kommentare

**[0125]** Diese Daten zeigen deutlich, dass eine höhere Frequenz an Rekombinationen unter Verwendung von ssDNS erreicht wird. Die drei verwendeten scFv haben dieselben Rahmensequenzen, was darauf hinweist, dass die berichtete Anzahl von Überkreuzungen aufgrund von Überkreuzungen in Regionen, in denen kein Sequenzunterschied resultiert, höher sein kann. Diese Experimente, die ssDNS verwenden, wurden in einer nicht optimalen Weise durchgeführt, um maximale Rekombination zu zeigen, da alle Stränge von allen drei Molekülen gemischt wurden. Mischen des Sense-Strangs von einem scFv mit dem Antisense-Strang eines anderen scFv würde höhere Frequenzen an Überkreuzungen erzeugen, s. Beispiel 3, unten. Außerdem wurde hier jeder Zeitpunkt getrennt gehalten, und es wäre logisch, die Frequenz von Überkreuzungen als ansteigend abzuschätzen, falls unterschiedliche Zeitpunkte, d. h. unterschiedliche Fragmentgrößen gemischt werden.

## Beispiel 3 – Rekombinationsfrequenzen; Homologieabhängigkeit unter Verwendung von ssDNS

**[0126]** Um die Homologie zu untersuchen, die erforderlich ist, um Überkreuzungen zu erreichen, haben wir Experimente angelegt, um vier scFv (bezeichnet als SMUC159, CT17, AE11 und MO152) zu rekombinieren, was drei Paare mit unterschiedlichen Homologien wie folgt ergibt:

SMUC159-CT17	92%
SMUC159-AE11	70%
SMUC159-M0152	60%

**[0127]** Die vier scFv-Gene wurden jeweils in zwei PKR-Reaktionen unter Verwendung von Primerpaaren vorwärts/rückwärts-Biotin und vorwärts-Biotin/rückwärts unter Anwendung von Standard-PKR-Prozedur verstärkt. Die Größe der Bänder wurde durch Agaroseelektrophorese bestätigt, und der Rest des verstärkten PKR-Produkts wurde unter Verwendung des Concert-PKR-Reinigungsset (Gibco) gereinigt. Einzelstrang-DNS wurde unter Verwendung von magnetischen Perlen gemäß dem Protokoll erhalten, was vier Sense-Stränge und vier Antisense-Stränge ergab. Jeder Strang wurde mit BAL31 gemäß dem Protokoll (unter Verwendung von 4,2 oder 12,5 U Enzym/ml) behandelt, und Proben wurden nach 0, 10, 30 und 50 min bzw. 0, 15, 30, 45 und 60 min entnommen. Die Reaktionen wurden mit EDTA und Wärmebehandlung gestoppt und unter Verwendung von Phenol-/Chloroformextraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt. Unter Getrennhaltung jedes Zeitpunkts aber unter Mischen von Sense- und Antisense-Strängen, wobei die oben angegebenen Paare gebildet wurden, wurden die Proben Wiederzusammenbau-PKR und Verstärkungs-PKR gemäß dem Protokoll unterworfen und in PGEM kloniert. 15 Klone von jedem Zeitpunkt wurden sequenziert und die Anzahl und Frequenz der Rekombinationen wurden bestimmt.

## Resultate

**[0128]** Überkreuzungen wurden in allen Kombinationen von scFv identifiziert, was darauf hinweist, dass eine so niedrige wie 60%ige Homologie ausreichend ist, um Rekombinationen zu erreichen.

Beispiel 4 – Verbesserte Steuerung der Fragmentgröße unter Verwendung von Exonukleasen

## (A) Exonukleasen

**[0129]** Wir verwenden Exonukleasen, z. B. BAL31, Exonuklease I, Exonuklease V, Exonuklease VII und Exonuklease Rec J<sub>f</sub> für die Fragmentation bei den Verfahren der vorliegenden Erfindung. Diese Enzyme spalten zu jedem Zeitpunkt ein Nukleotid ab, entweder von dem 5'-Ende oder von dem 3'-Ende oder von beiden Enden. Die Reaktion kann abhängig von den verwendeten Enzymen unter Verwendung von EDTA oder Hitzeinaktivierung gestoppt werden (s. o.). Dies bedeutet, dass Fragmente von allen möglichen Größen, die sich nur um ein Nukleotid unterscheiden, erhalten werden können.

**[0130]** Die folgenden Beispiele zeigen, wie Exonukleaseaufschluss abhängig von den angewandten Bedingungen die Erzeugung von Fragmenten unterschiedlicher und steuerbarer Größen erlaubt.

## BAL31

**[0131]** Einzelstrang-DNS wurde mit BAL31 gemäß dem Protokoll in Beispiel 1 aufgeschlossen, mit einer Enzymkonzentration von 4,2 U/ml Reaktionsvolumen und einer ssDNS-Konzentration von 0,008 µg/ml Reaktionsvolumen.

**[0132]** In einem typischen Experiment werden ungefähr 300 ng DNS zu jedem Zeitpunkt der BAL31-Behandlung isoliert. [Fig. 12](#) zeigt ein Agaroseelektrophoresegelbild von solch einem Experiment mit unbehandelter ssDNS in Lane 4 und ssDNS behandelt für 10 min in Lane 3, für 30 min in Lane 2 und für 50 min in Lane 1. Lane 5 ist der Molekulargewichts-(MW-)Standard.

**[0133]** [Fig. 13](#) bis [Fig. 15](#) zeigen die entsprechenden Gelchromatogramme der jeweiligen Bahnen (Lanes). [Fig. 13](#) ist das unbehandelte Material, und die vielen Peaks beziehen sich auch unterschiedliche Konformationen der ssDNS. [Fig. 14](#) entspricht Lane 3 und dem für 10 min behandelten Material. Das Material wurde hitzebehandelt, um die enzymatische Reaktion zu stoppen, und so wird unter Auflösung der unterschiedlichen Konformationen ein Peak von auffälliger Größe gezeigt. [Fig. 15](#) entspricht Lane 2 und dem für 30 min behandelten Material.

**[0134]** Hier ist es klar, dass der Peak, der den größeren Fragmenten entspricht, abnimmt, und ein Peak von kleineren DNS-Fragmenten entstanden ist.

## Exonuklease VII

**[0135]** Einzelstrang-DNS wurde mit Exonuklease VII unter Verwendung einer Enzymkonzentration von 7,7 U/ml Reaktionsvolumen und einer ssDNS-Konzentration von 0,008 µg/ml Reaktionsvolumen aufgeschlossen. Der Reaktionspuffer wies 67 mmol Kaliumphosphat (pH 7,9), 10 mmol Mercaptoethanol, 6,7 mmol mgCl<sub>2</sub> und 8,3 mmol EDTA auf.

**[0136]** Der Reaktion wurde es erlaubt, bei 37°C für 10, 20 und 30 min fortzuschreiten, bevor sie durch Hitzeinaktivierung (95°C für 5 min) gestoppt wurde.

**[0137]** In [Fig. 16](#) ist das Fragmentierungsmuster unter Verwendung von Exonuklease VII gezeigt. Lane 1 ist MW-Standard, Lane 2 ist unbehandelte ssDNA, Lane 3 ist ssDNA fragmentiert mit Exonuklease VII für 10 min, Lane 4 ist ssDNA fragmentiert mit Exonuklease VII für 20 min, und Lane 5 ist ssDNA fragmentiert mit Exonuklease VII für 30 min. Dies zeigt, dass die Fragmentgrößen mit der Zeit abnehmen.

Exonuklease Rec J<sub>f</sub>

**[0138]** Einzelstrang-DNS wurde mit Exonuklease Rec J<sub>f</sub> unter Verwendung einer Enzymkonzentration von entweder 2,5 U/ml Reaktionsvolumen oder 10 U/ml Reaktionsvolumen ssDNA in einer Konzentration von 0,

007 µg/µl Reaktionsvolumen behandelt, was 0,36 U/µl DNS bzw. 1,4 U entspricht. Der Reaktionspuffer weist 50 mmol NaCl, 10 mmol Tres-HCl, 10 mmol MgCl<sub>2</sub> und 1 mmol Dithiothreitol bei pH 7,9 auf.

**[0139]** Der Reaktion wurde es erlaubt, bei 37°C für 10, 20 und 30 fortzuschreiten, bevor sie durch Hitzeinaktivierung (95°C für 5 min) gestoppt wurde.

**[0140]** In [Fig. 17](#) ist das Fragmentierungsmuster unter Verwendung von Rec J<sub>f</sub> bei 0,36 U/µg ssDNS gezeigt. Lane 1 ist unbehandelte ssDNS, Lane 2 ist ssDNS fragmentiert mit Exonuklease Rec J<sub>f</sub> für 10 mm, Lane 3 ist ssDNS fragmentiert mit Exonuklease Rec J<sub>f</sub> für 20 min, und Lane 4 ist ssDNS fragmentiert mit Exonuklease Rec J<sub>f</sub> für 30 min. Dies zeigt, dass die Fragmentgrößen mit der Zeit abnehmen. In [Fig. 18](#) ist die Enzymkonzentration vierfach erhöht (1,4 U/µg ssDNS), und das Fragmentierungsmuster ist für 0 bis 30 min gezeigt, wobei ein höheres Maß an Fragmentierung verglichen mit [Fig. 17](#) zu sehen ist. Dies zeigt, dass sowohl die Zeit als auch die Enzymkonzentration verwendet werden kann, um die Fragmentierung zu steuern.

#### (B) Endonukleasen

**[0141]** Konventionelle DNS-Umsetzungsverfahren verwenden typischerweise DNase I für die Fragmentierung (s. z. B. Stemmer, 1994, Nature 370: 389–391). DNase I spaltet DNS in einer endonukleolytischen Weise in Plätzen benachbart zu Pyrimidinen. Entsprechenderweise können nicht alle möglichen Fragmentgrößen erhalten werden.

**[0142]** Darüberhinaus wird unter Verwendung von Magnesium in dem Reaktionspuffer eine homologe Mischung von Mono- und Oligomeren erhalten. D. h. unterschiedliche Verfahren, wie beispielsweise Gelagarose-elektrophoresereinigung oder Gelfiltration müssen verwendet werden, um Fragmente unterschiedlicher Größen zu isolieren. Oft sind Fragmente von kleiner Größe oder eine Mischung von kleinen und großen Fragmenten erwünscht, um die Rekombination zu optimieren. Diese Reinigungsverfahren führen jedoch Einzelstrangvarianten in die Doppelstrang-PKR-Produkte ein Fragmente von bestimmter Größe gereinigt auf einem Gel würden so aus dsDNA mit einer großen Anzahl von Einzelstrangsplittern bestehen, was bei der Denaturierung zu vielen kleineren Fragmenten führen würde. Dies bedeutet, dass viele der Einzelstrangfragmente, die bei der Denaturierung erzeugt werden, zu kurz sein würden, um als Primer während des Anlassens zu funktionieren, was in einen großen Verlust an Produkt resultieren würde.

**[0143]** Verwendung von Mangan in dem Reaktionspuffer erzeugt Fragmente von Größen kleiner als 50 bp, und keine Gelreinigung wird benötigt. Hier ist man jedoch auf die Verwendung nur kleiner Fragmente beschränkt, und diese können nicht mit größeren Fragmenten gemischt werden, etwas was die Rekombinationsfrequenz wahrscheinlich vergrößern würde.

**[0144]** Die Probleme, die mit der Verwendung von Endonukleasen verbunden sind, werden in den folgenden Experimenten demonstriert:

#### DNase I

**[0145]** DNS wurde für 5 min mit DNase I bei einer Konzentration von 0,015 U/µg DNS aufgeschlossen.

**[0146]** Magnesium- und Manganpuffer wurden beim Fragmentieren mit DNase I verglichen, und die Resultate sind in [Fig. 19](#) gezeigt. Lane 1 ist MW-Standard, Lane 2 ist unbehandelte ssDNS in Mg-Puffer, Lane 3 ist ssDNS fragmentiert mit DNase I in Mg-Puffer gemäß Stemmer, 1994, Nature 370: 389–391, Lane 4 ist unbehandelte ssDNS in Mn-Puffer und Lane 5 ist ssDNS fragmentiert mit DNase I in Mn-Puffer gemäß Kikuchi et al. (2000) Gene 243: 133–137. Es ist aus [Fig. 19](#) klar, dass dann, wenn Mg-Puffer und Bedingungen gemäß den Papern von Stemmer und Kikuchi verwendet werden, keine Fragmentierung auftritt. Darüberhinaus wird, wenn Mn-Puffer und Bedingungen gemäß den Papern von Stemmer und Kikuchi verwendet werden, alles Material vollständig binnen nur weniger Minuten fragmentiert.

**[0147]** Bei einem Versuch, Fragmente von unterschiedlichen Größen zu erhalten, entschieden wir uns, Mg-Puffer zu verwenden und erhöhten die Enzymkonzentration. [Fig. 20](#) zeigt ein Agaroseelektrophoresegelbild von solch einem Experiment unter Verwendung von DNase I. Lane 1 ist der MW-Standard, Lane 6 ist unbehandelte ssDNS, Lane 12 ist ssDNS behandelt gemäß den Papern von Stemmer und Kikuchi unter Verwendung von 0,15 U Enzym/µg DNS, und Lane 13 ist dasselbe Material behandelt mit 1 U Enzym/µg DNS (d. h. sechsmal mehr Enzym).

[0148] [Fig. 21](#) bis [Fig. 23](#) zeigen die entsprechenden Chromatogramme. Die unbehandelte ssDNS ist wärmebehandelt worden, deshalb erscheint nur 1 Peak in [Fig. 21](#) (angezeigt durch einen Pfeil). In [Fig. 22](#) wird deutlich, dass unter Verwendung der Menge an DNase I gemäß den Papern von Stemmern und Kikuchi der Peak für die unbehandelte ssDNS etwas reduziert ist (angezeigt durch einen Pfeil), aber kein unterscheidbarer Peak für die fragmentierte DNS zu sehen ist, nur eine Ausschmierung. Unter Verwendung von sechsmal mehr Enzym ist die unbehandelte ssDNS vollständig beseitigt, und auch hier gibt es keinen sichtbaren Peak der Fragmente.

#### Mungobohnennuklease

[0149] Einzelstrang-DNS wurde mit Mungobohnennuklease (Produktnummer MO250S, New England Biolabs) unter Verwendung einer Enzymkonzentration von 0,375 U/ml Reaktionsvolumen und ssDNS bei einer Konzentration von 0,007 µg/ml Reaktionsvolumen aufgeschlossen. Der Reaktionspuffer wies 50 mmol Natriumacetat, 30 mmol NaCl, 1 mmol ZnSO<sub>4</sub> bei pH 5,0 auf.

[0150] Der Reaktion wurde es erlaubt, bei 25°C für 10 min fortzuschreiten, bevor sie durch Hitzeinaktivierung (95°C für 5 min) gestoppt wurde.

[0151] [Fig. 24](#) zeigt Fragmentierung einer anderen Endonuklease, Mungobohnennuklease. Lane 1 ist die unbehandelte ssDNS, Lane 2 ist dasselbe Material behandelt für 10 min. Lane 3 ist der MW-Standard.

[0152] Die Resultate zeigen an, dass alle DNS vollständig nach nur 10 min Aufschluss mit Mungobohnennuklease fragmentiert war (s. Lane 2). Trotz Verwendung des Enzyms bei einer Konzentration niedriger als diejenige, die von dem Hersteller empfohlen wird.

#### Schlussfolgerungen und Kommentare

[0153] Die obigen Beispiele zeigen, wie die Fragmentgrößen unter Verwendung von Exonukleasen und Ändern der Reaktionsbedingungen, d. h. Zeit, Reaktionsvolumen, Enzymkonzentration, gesteuert werden können. Die unterschiedlichen Peaks werden unter Verwendung von Gelbildchromatogrammen visualisiert.

[0154] Im Gegensatz dazu ergibt die Verwendung von Endonukleasen, wie beispielsweise DNase I eine Reaktion, die schwer zu steuern ist. Unter Verwendung von Bedingungen, wie sie in der Literatur angegeben sind, ergibt die Verwendung von Mg- oder Mn-enthaltenden Puffern typischerweise eine Situation, bei der entweder alles oder nichts fragmentiert wird, s. [Fig. 20](#). Ein Experiment, das eine andere Nuklease (Mungobohnennuklease) verwendet, bestätigt diese Beobachtungen.

#### Patentansprüche

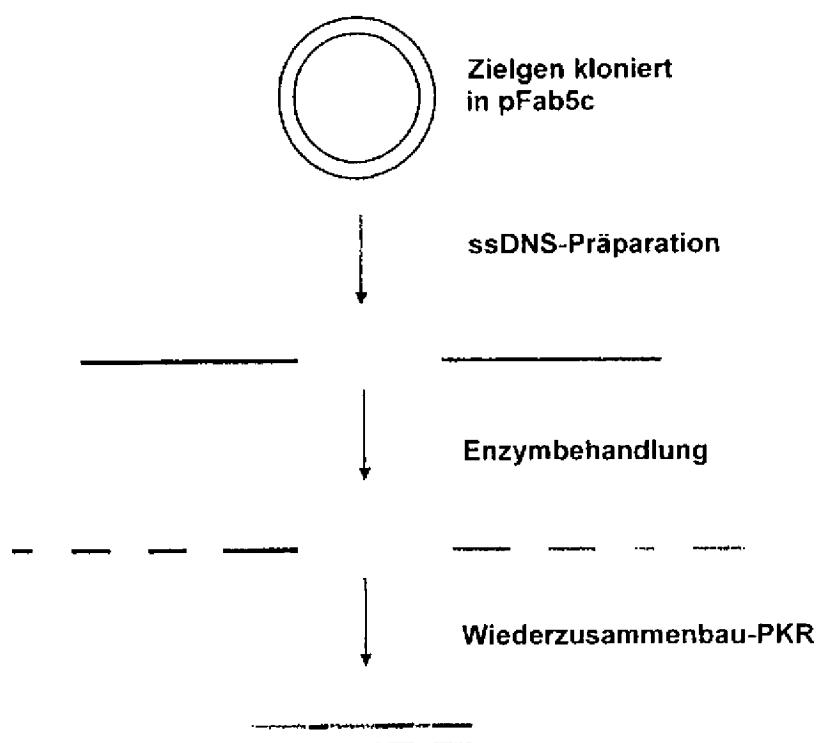
1. Verfahren zum Erzeugen einer Polynukleotidsequenz oder einer Population von Polynukleotidsequenzen aus einer Einzelstrangausgangspolynukleotidsequenz, die ein oder mehrere Proteinmotive codiert, mit den Schritten:
  - a) Bereitstellen von Einzelstrang-DNS, die Plus- und Minusstränge von Ausgangspolynukleotidsequenzen ausbildet;
  - b) Aufschließen der Einzelstrangpolynukleotidsequenzen mit einer Exonuklease, um Populationen von Einzelstrangfragmenten zu erzeugen;
  - c) Kontaktieren der Fragmente, die aus den Plussträngen erzeugt wurden, mit Fragmenten, die aus den Minussträngen erzeugt wurden, und optionales Hinzugeben von Primersequenzen, die sich an die 3'- und 5'-Enden mindestens eines der Ausgangspolynukleotide unter Anlassbedingungen anlassen;
  - d) Verstärkung von Segmenten, die sich aneinander anlassen, um mindestens eine Polynukleotidsequenz zu erzeugen, die ein oder mehrere Proteinmotiv(e) codiert, das/die verglichen mit dem einen oder den mehreren Proteinmotiv(en), welche(s) durch die Ausgangspolynukleotide codiert wird/werden, geänderte Eigenschaften aufweist/ausweisen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Exonuklease ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus BAL31, Exonuklease I, Exonuklease V, Exonuklease VII, und Exonuklease Rec J<sub>f</sub>.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Exonuklease BAL31 ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei eine Ausgangspolynukleotidsequenz oder Ausgangspolynukleotidsequenzen einer Mutationserzeugung unterworfen worden ist/sind.
5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Population von Fragmenten, die in Schritt b) erzeugt worden ist, einer Mutationserzeugung unterworfen wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei die Mutationserzeugung zu Fehlern neigende PKR ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei Schritt b) durchgeführt wird, um eine Population von Einzelstrangfragmenten von variierender Länge zu erzeugen.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei Schritt b) gesteuert wird, um eine Population von Einzelstrangfragmenten mit einer mittleren Länge von mehr als ungefähr 50 Nukleotiden zu erzeugen.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, das weiterhin den Schritt des Exprimierens mindestens einer Polynukleotidsequenz aufweist, die in dem Schritt d) erzeugt wurde, um das codierte Polypeptid zu produzieren.
10. Verfahren nach Anspruch 9, das weiterhin den Schritt des Testens des codierten Polypeptids auf gewünschte Eigenschaften aufweist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Ausgangspolynukleotidsequenz einen Antikörper oder ein Fragment davon codiert.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Ausgangspolynukleotidsequenz ein Enzym codiert.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Ausgangspolynukleotidsequenz ein Antigen codiert.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, das weiterhin den Schritt des Einbaus der mindestens einen Polynukleatidsequenz, die in dem Schritt d) erzeugt wurde, in einen Vektor aufweist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, das weiterhin den Schritt des Exprimierens in vitro der mindestens einen Polynukleotidsequenz, die in einen Vektor eingebaut wurde, aufweist, um das codierte Polypeptid zu produzieren.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, das weiterhin den Schritt des Formulierens der Polynukleotidsequenz oder von Vektoren, die das Polynukleotid aufweisen, oder des Polypeptids, das durch das Polynukleotid codiert wird, in eine pharmazeutisch akzeptable Zusammensetzung aufweist.

Es folgen 24 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig.1



**Fig. 2**

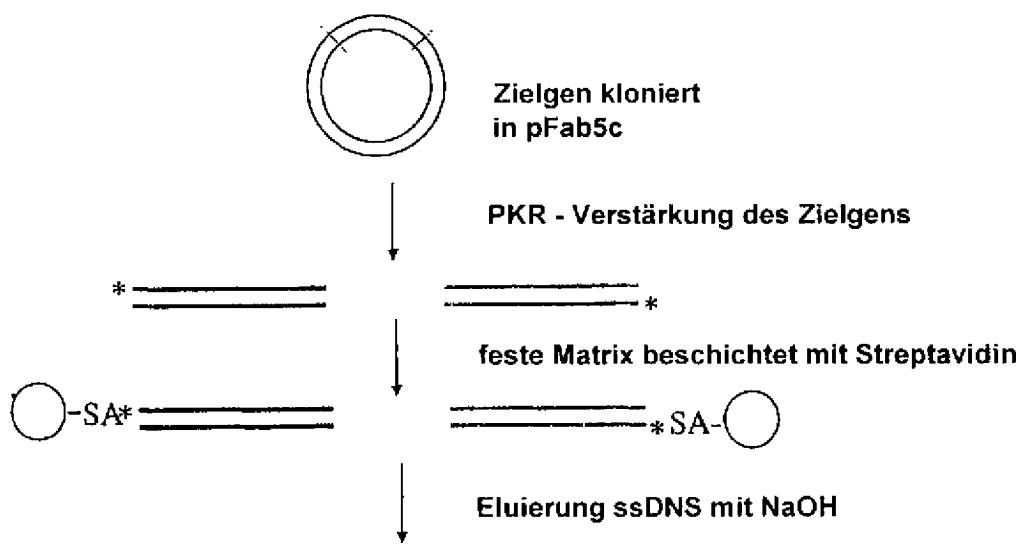


Fig. 3

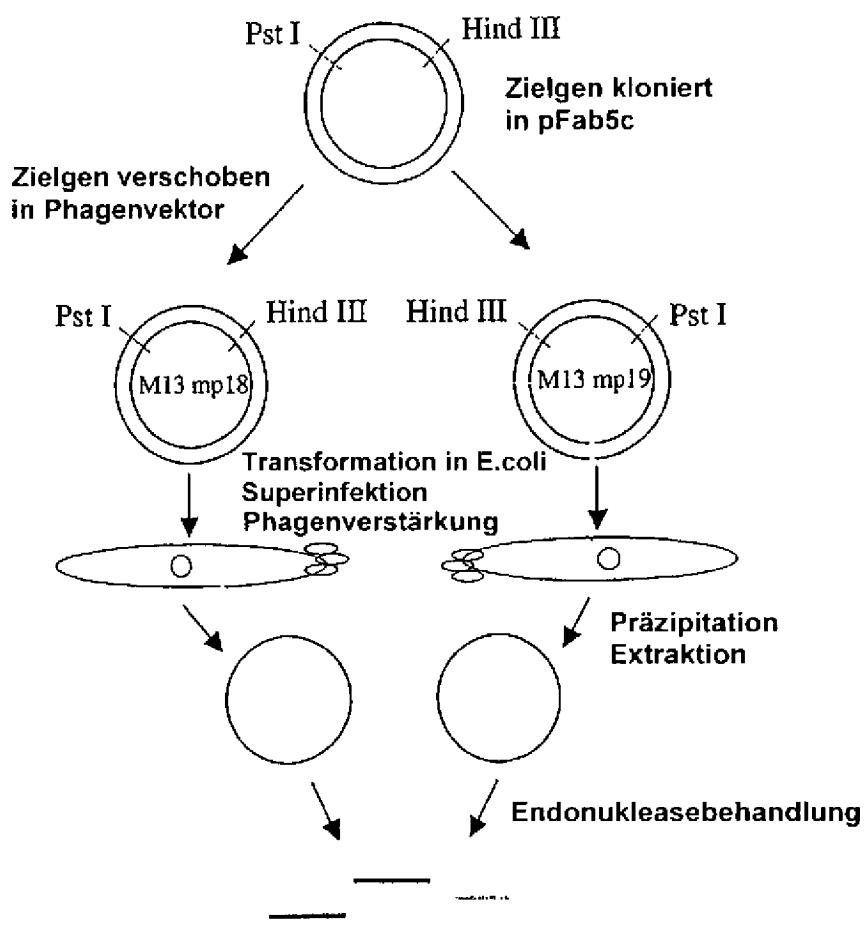
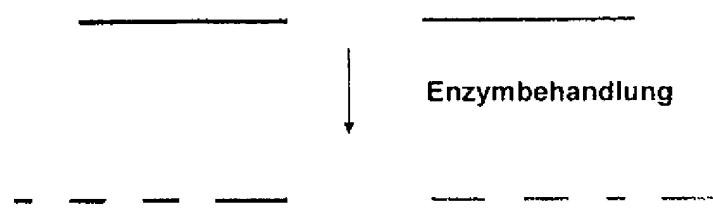
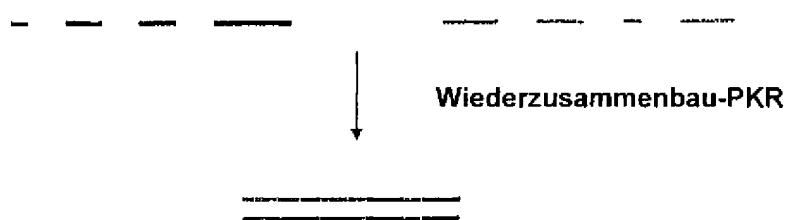


Fig. 4



**Fig. 5**



**Fig. 6**

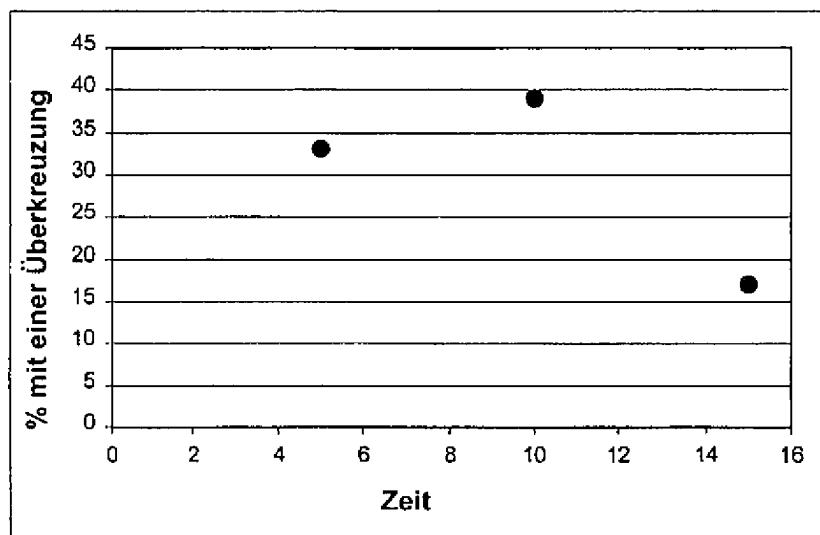
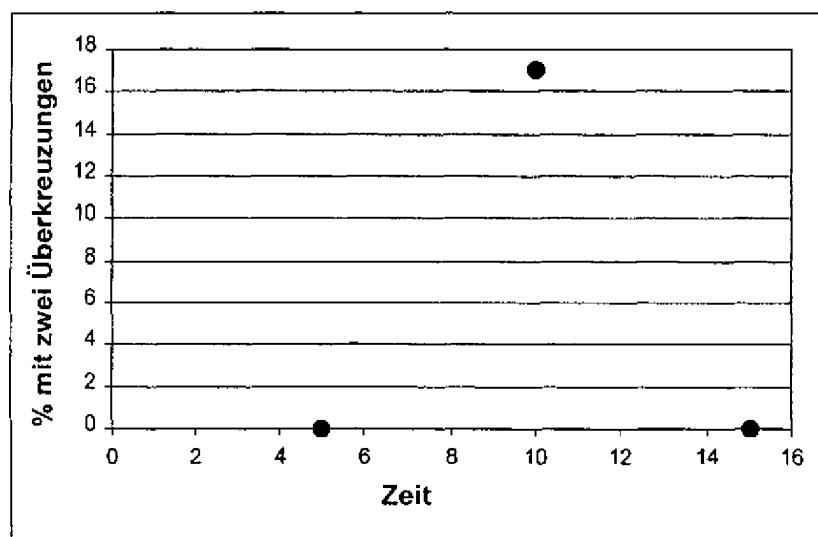


Fig. 7



**Fig. 8**

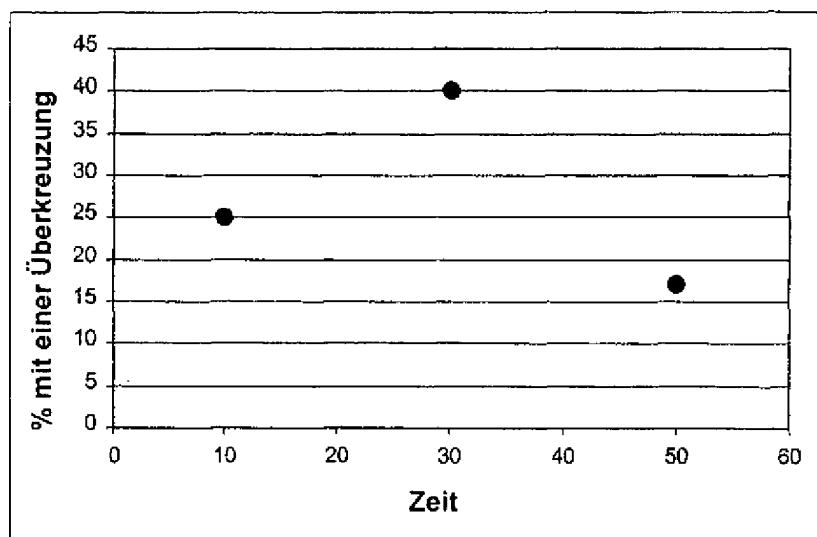
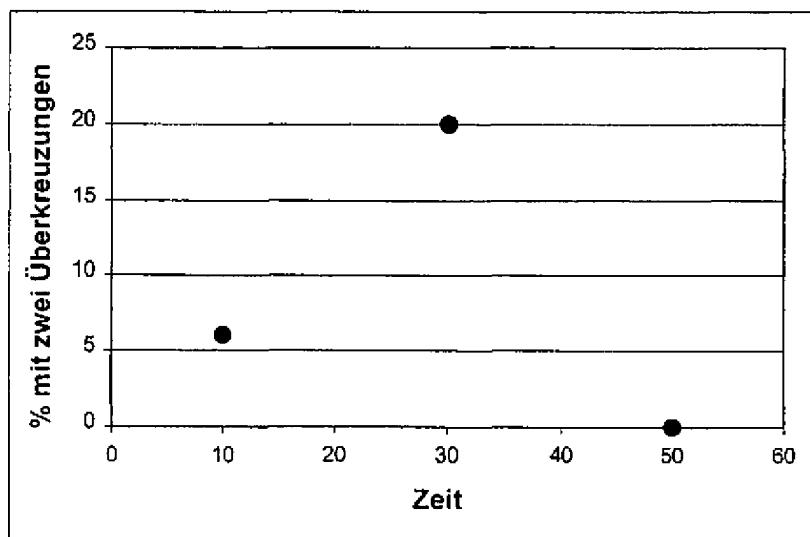
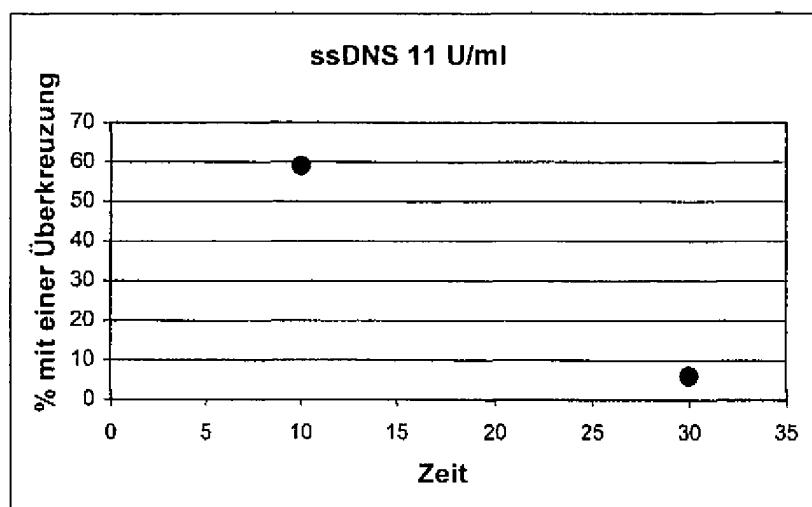


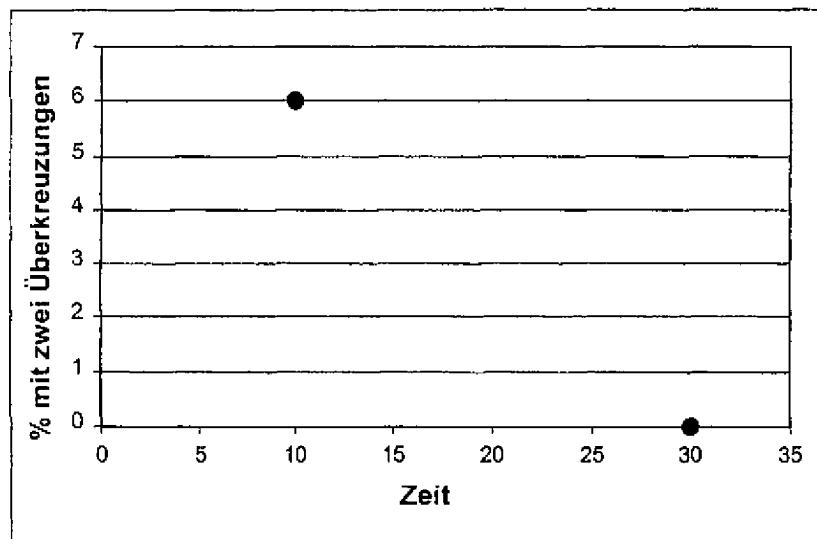
Fig. 9



**Fig. 10**



**Fig. 11**



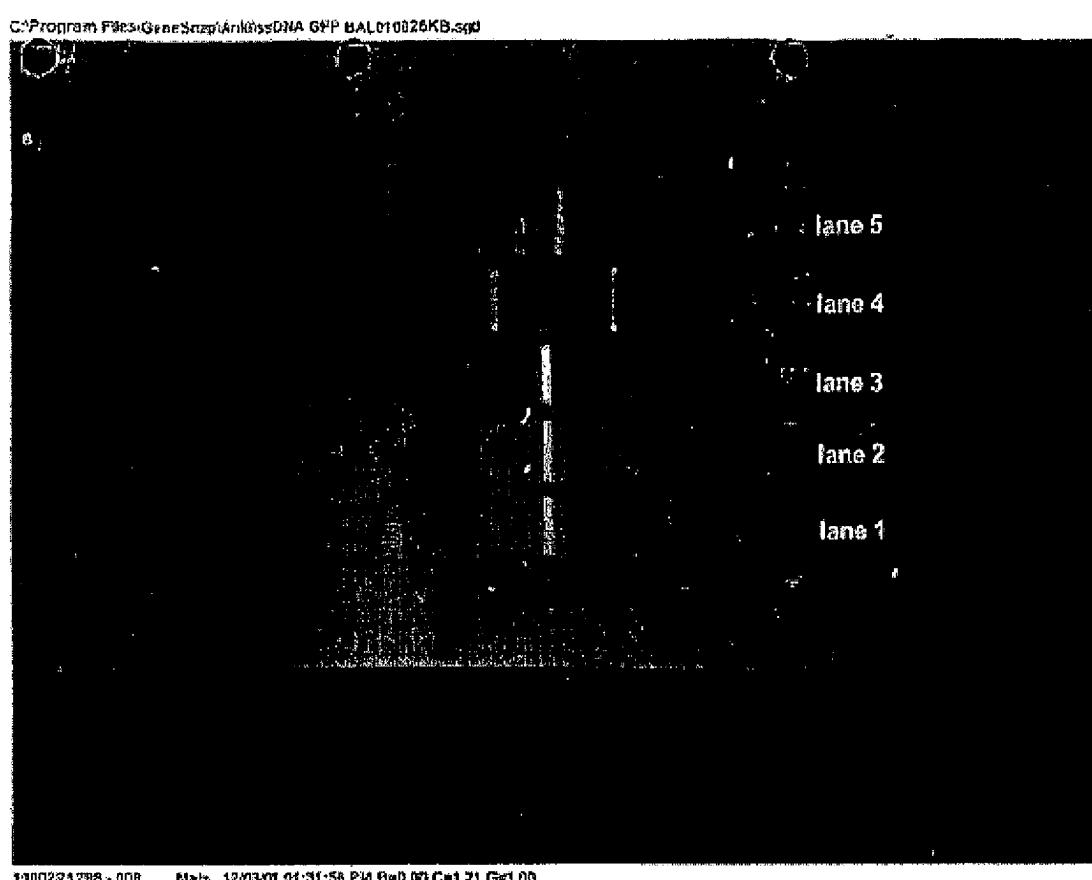


Fig. 12

**Fig. 13**

Spur 4

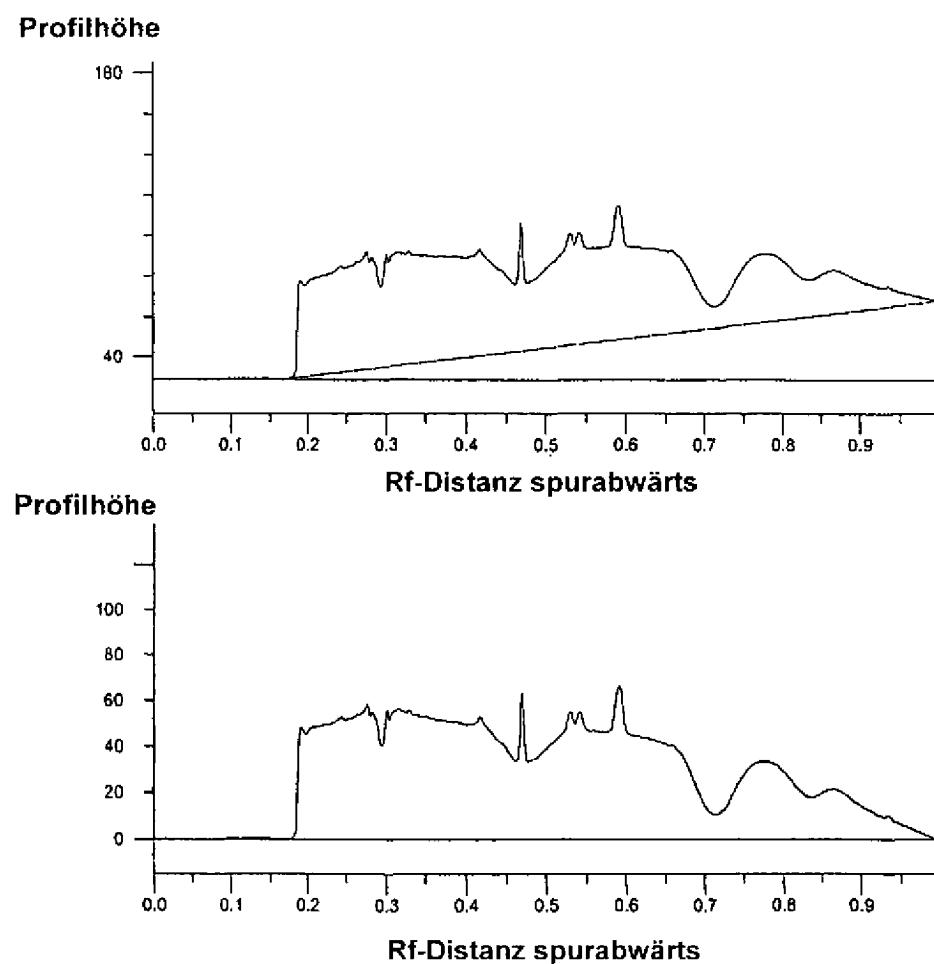
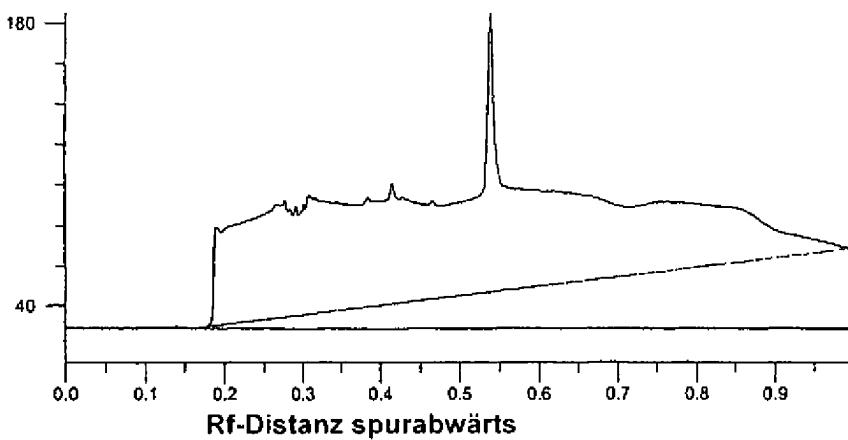


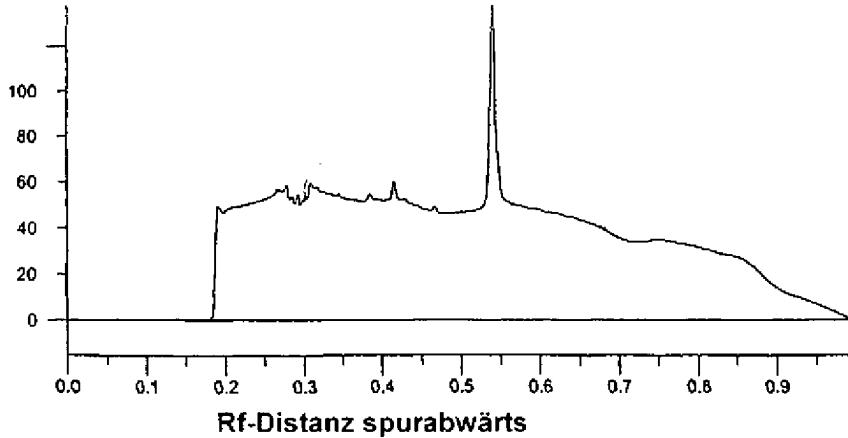
Fig. 14

Spur 3

Profilhöhe



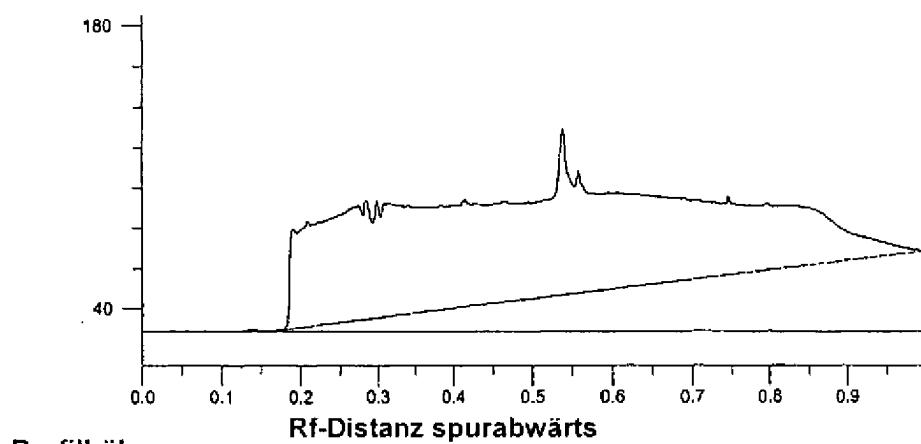
Profilhöhe



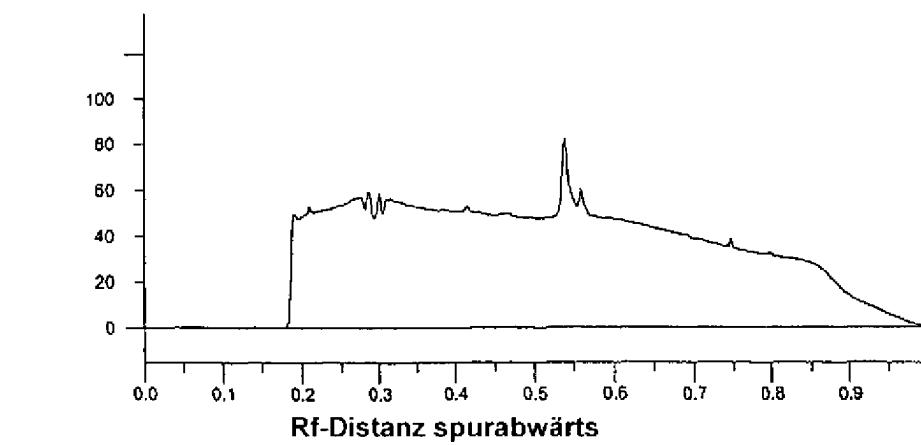
**Fig. 15**

**Spur 2**

**Profilhöhe**



**Profilhöhe**



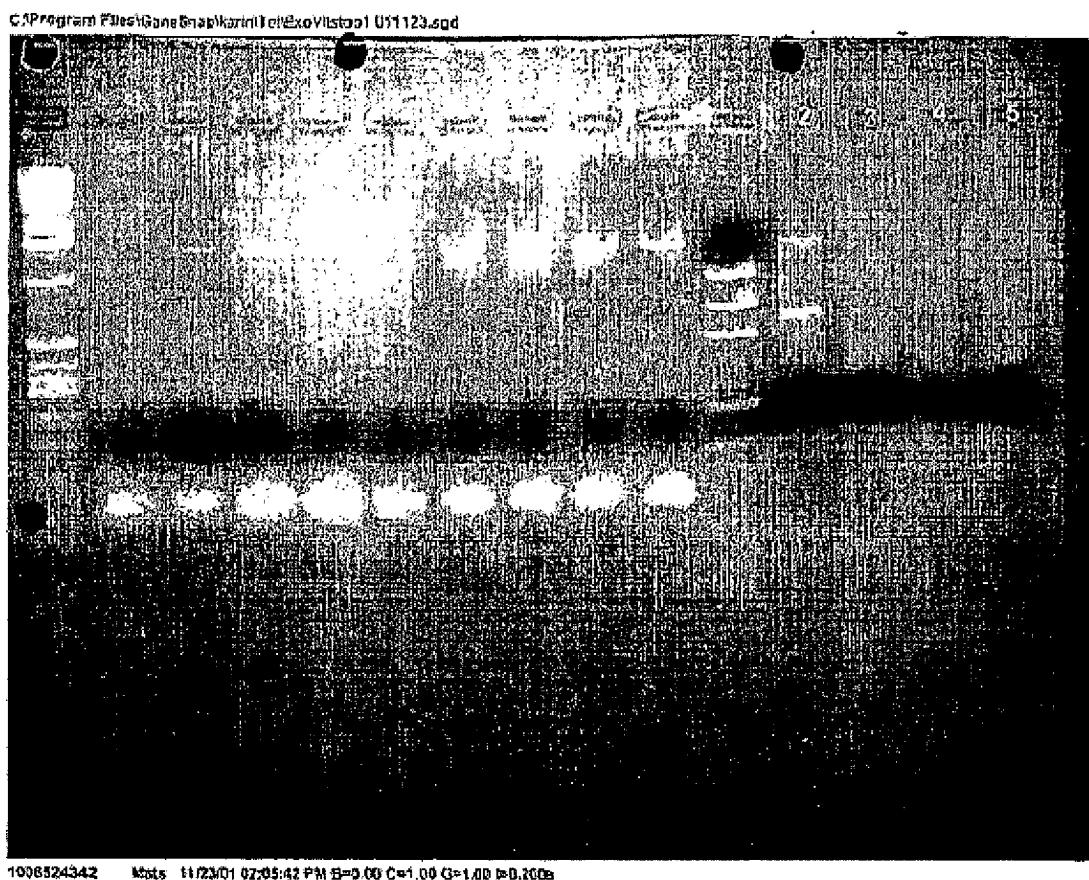


Fig. 16



Fig. 17



Fig. 18

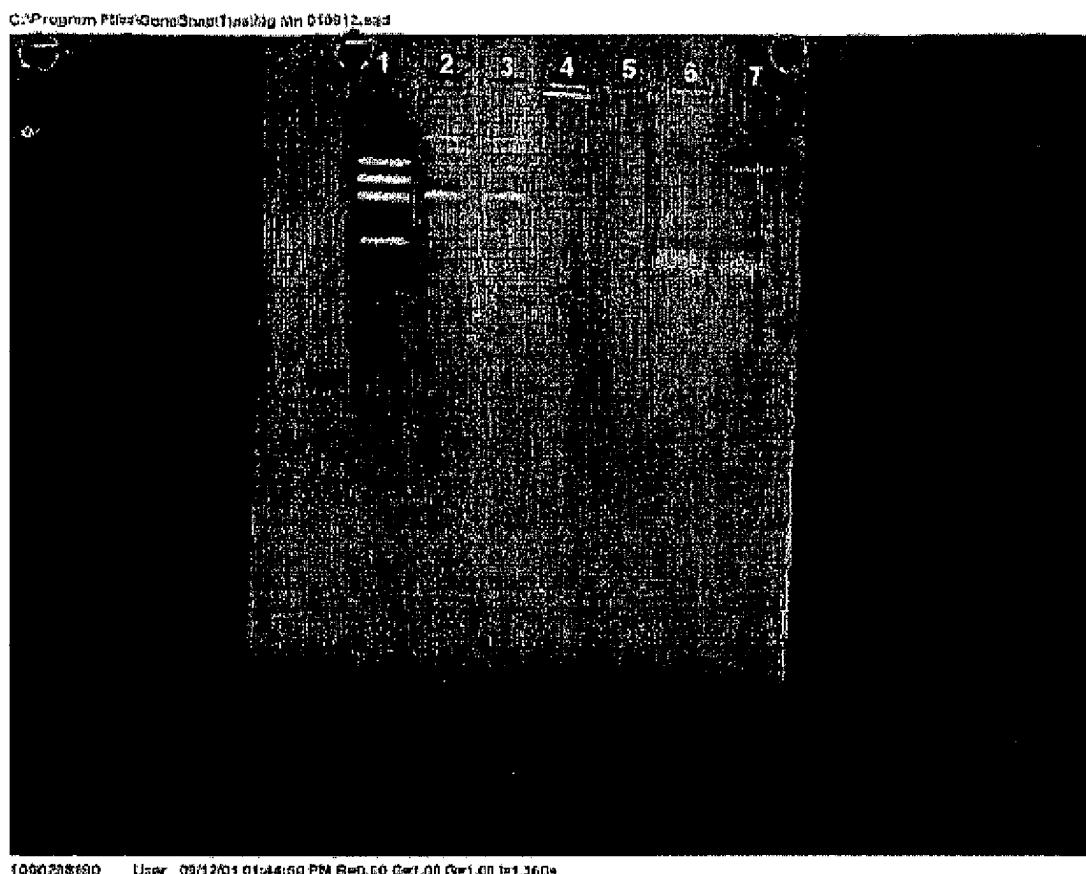
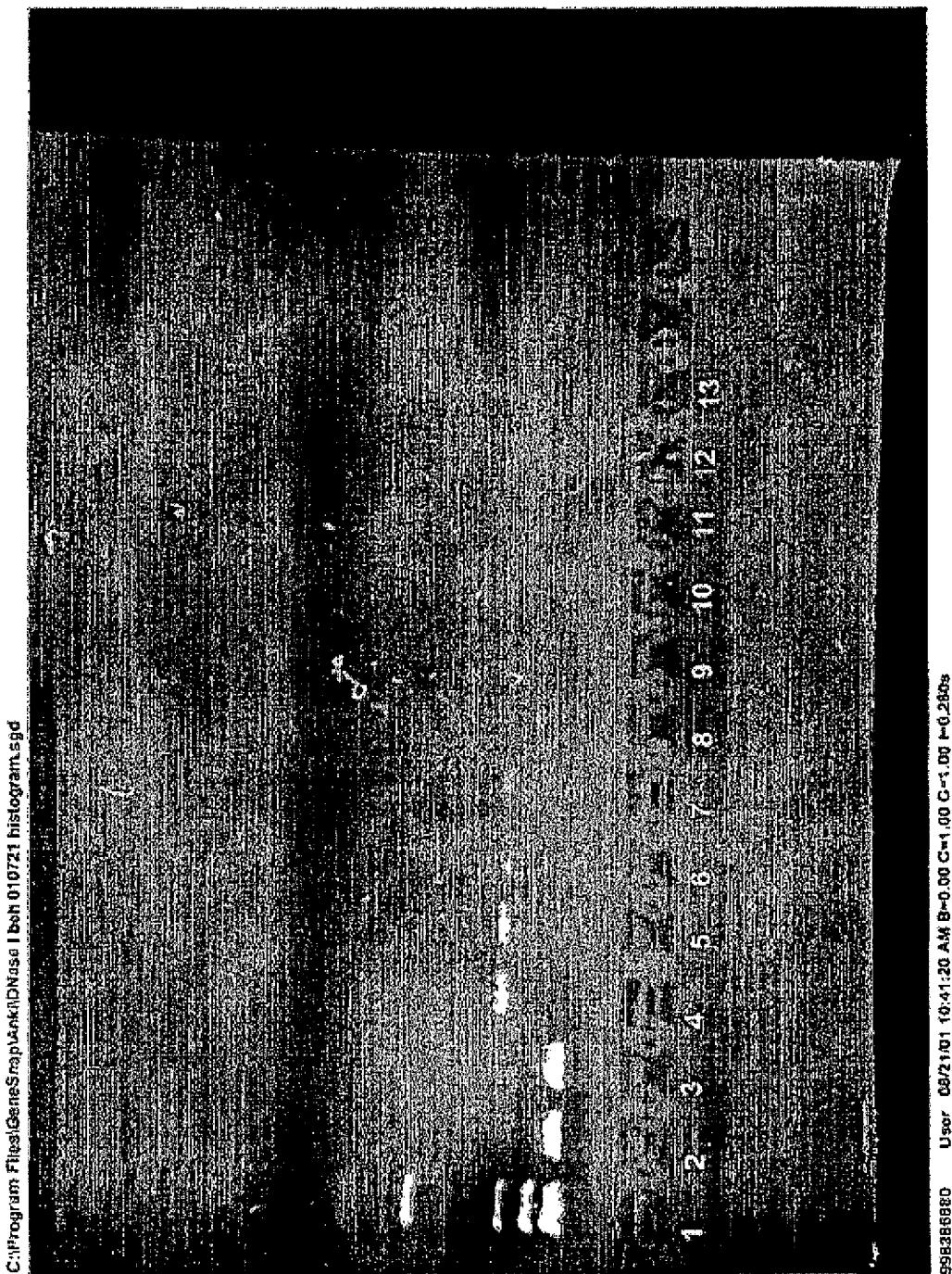
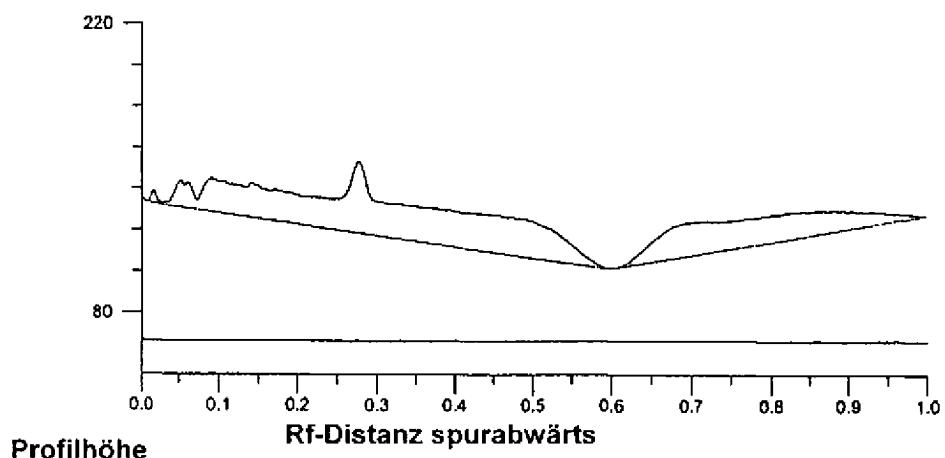
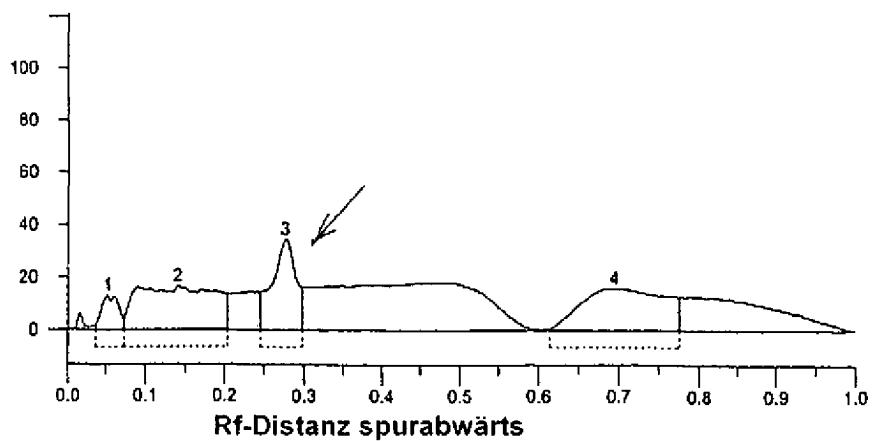


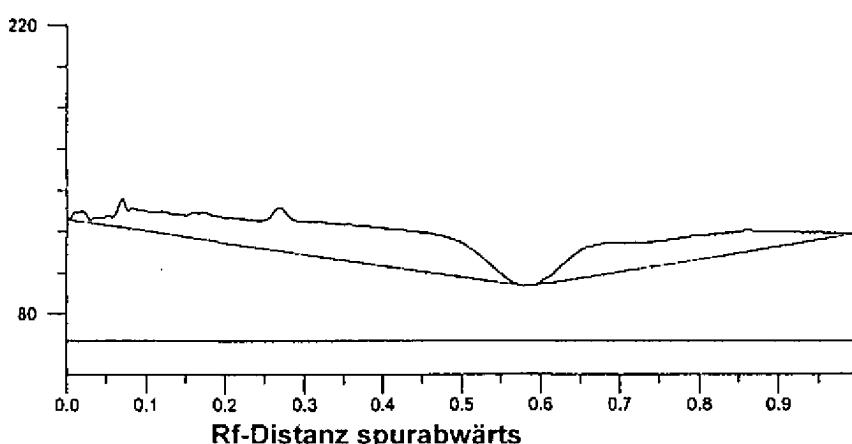
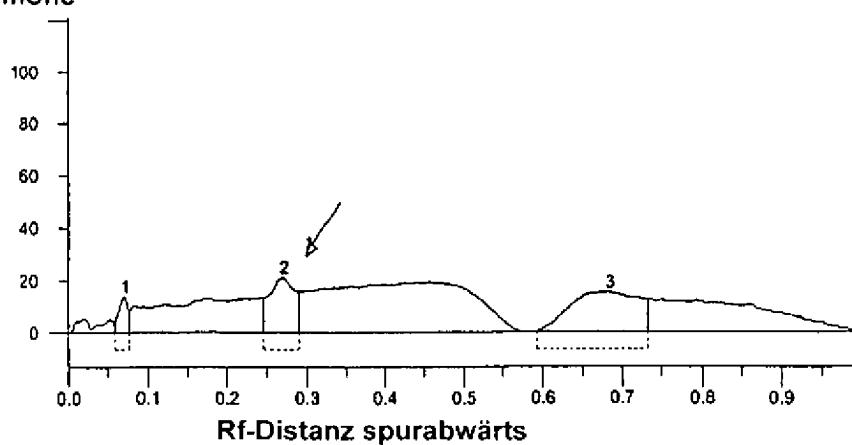
Fig. 19

Fig. 20

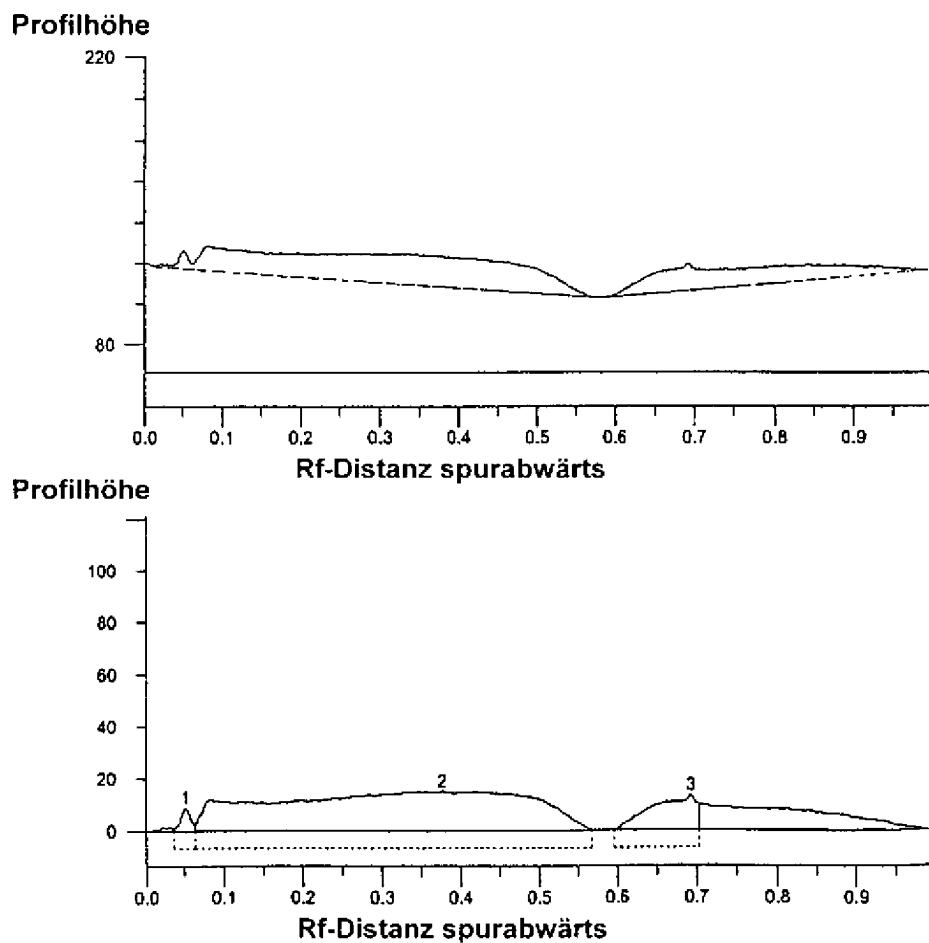


**Fig. 21****Spur 6****Profilhöhe****Profilhöhe**

Spur 6			
Nummer	Mol.-Gewicht	Höhe	Rohvol.
1	0.00	13.300	5305.14
2	0.00	16.665	30111.09
3	0.00	34.741	18767.46
4	0.00	16.002	31320.35

**Fig. 22****Spur 12****Profilhöhe****Profilhöhe**

Spur 12			
Nummer	Mol.-Gewicht	Höhe	Rohvol.
1	0.00	13.846	2872.55
2	0.00	20.893	12279.14
3	0.00	15.181	25217.71

**Fig. 23****Spur 13**

Spur 13			
Nummer	Mol.-Gewicht	Höhe	Rohvol.
1	0.00	9.094	2156.20
2	0.00	15.183	97844.64
3	0.00	13.462	14175.73

Fig. 24

