(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 33 644 T2** 2005.02.17

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 739 353 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 33 644.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE95/00034**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 907 175.4**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/019374**
(86) PCT-Anmeldetag: **16.01.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **20.07.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.10.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **13.10.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.02.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C07K 14/705**
C07K 14/735, C12N 15/00

(30) Unionspriorität:
9400088 **14.01.1994** **SE**

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

(73) Patentinhaber:
Biovitrum AB, Stockholm, SE

(74) Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, 80538 München

(72) Erfinder:
NILSSON, Björn, S-191 73 Sollentuna, SE;
NYGREN, Per-Ake, S-128 32 Skarpnäck, SE;
UHLEN, Mathias, S-752 39 Uppsala, SE

(54) Bezeichnung: **REZEPTORSTRUKTUREN AUS BAKTERIEN**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue bakterielle Rezeptorstrukturen, die aus natürlichen bakteriellen Rezeptorstrukturen stammen, die in Bezug auf Aminosäurereste modifiziert wurden, welche an der ursprünglichen Interaktionsfunktion beteiligt sind, wodurch die ursprüngliche Interaktionsfunktion wesentlich gehemmt oder durch eine modifizierte, auf einen gewünschten Interaktionspartner gerichtete Interaktionsfunktion ersetzt wurde.

[0002] Verschiedene Bakterien, von denen bekannt ist, dass sie Säuger befallen, haben Oberflächenproteine gebildet, die in der Lage sind, an eine Reihe von Substanzen zu binden, einschließlich wirtsspezifischer Kohlenhydrate und Proteine. Mehrere solche Rezeptoren aus grampositiven bakteriellen Krankheitserregern wurden isoliert und ausführlich charakterisiert, wie nachstehend gezeigt wird. Am besten Charakterisiert sind die Fc-Rezeptoren, die nach der Fähigkeit benannt sind, an den konstanten Fc-Teil von IgG zu binden. Die Fc-Rezeptoren wurden aufgrund von Bindungsexperimenten mit IgG, das aus verschiedenen Säugern stammte, und Subklassen davon in die sechs Typen I bis VI eingeteilt. Der Rezeptor aus S. aureus, Protein A [SPA], der den Typ-I-Rezeptor definiert, wurde in zahlreichen Studien untersucht.

[0003] SPA bindet an IgG aus den meisten Säugerarten, einschließlich Mensch. Von den vier Subklassen des menschlichen IgG bindet SPA an IgG1 und IgG4, zeigt jedoch eine sehr geringe Wechselwirkung mit IgG3 [Eliasson, M., et al., 1989, J. Biol. Chem. 9: 4323–4327]. Diese Pseudoimmunreaktion wurde mehr als 20 Jahre zum Herstellen und Nachweisen von Antikörpern in diagnostischen, Forschungs- und therapeutischen Anwendungen eingesetzt. Durch Clonieren, Sequenzieren und Exprimieren in E. coli von definierten Fragmenten des SPA-Gens wurde eine hoch-repetitive Organisation aufgedeckt, mit fünf IgG-bindenden Domänen [E-D-A-B-C], einer Zellwand-überspannenden Region und einer Membranankersequenz [XM] [Uhlen, M., et al., 1984, J. Biol. Chem. 259: 1695–1702; Moks, T., et al., 1986, Eur. J. Biochem. 156: 637–643]. Eine ungeheuer große Zahl von Plasmidvektoren wurde konstruiert, die Genfusionen mit verschiedenen Fragmenten des Gens möglich machen, so dass in verschiedenen Wirten Fusionsproteine hergestellt werden können [Nilsson, B., und Abrahmsen, L., 1990, Meth. Enz. 185: 144–161] (**Fig.** 2a).

[0004] Die Struktur eines Komplexes zwischen menschlichem Fc [IgG1] und einer einzelnen Domäne [B] von SPA wurde durch Röntgenkristallographie bei einer Auflösung von 2,8 Å bestimmt [Deisenhofer, J., et al., 1981, Biochemistry 20: 2361–2370]. Aufgrund dieser Struktur und weiterer Informationen aus NMR-Experimenten kann die B-Domäne als eine kompakte Struktur angesehen werden, die aus drei antiparallelen α-Helices besteht, welche mit Schleifen verbunden sind. An der Fc-Bindung, die sowohl elektrostatischer als auch hydrophober Natur ist, sind nur Seitenketten von Resten aus den Helices 1 und 2 beteiligt, während die dritte Helix nicht zur Bindung beiträgt. Basierend auf dieser Domäne B wurde eine synthetische IgG-bindende Domäne [Z] konstruiert [Nilsson, B., et al., 1987, Prot. Eng. 1: 107–113], die als Fusionspartner zum Herstellen von rekombinanten Proteinen geeignet ist, wodurch eine Reinigung durch IgG-Affinitätschromatographie möglich wird. Die hohe Löslichkeit und die stabile Struktur der Domäne Z wurden zum Herstellen, Reinigen und Renaturieren einer großen Zahl von rekombinanten Proteinen genutzt [Josephsson, S., und Bishop, R., Trends Biotechnol. 6: 218–224; Samuelsson, E., et al., 1991, Bio. Technol. 9: 363–366].

[0005] Streptococcus-Stämme der serologischen Gruppen C und G zeigen ein Bindungsrepertoire für Säuger-IgGs, einschließlich des menschlichen IgG3, das sogar noch breiter ist als für den Typ-I-Rezeptor. Für diesen Typ-III-Rezeptor aus Streptococcus der Gruppe G wurde der Name Protein G vorgeschlagen. Im Jahr 1986 berichteten Olsson und Mitarbeiter über das Clonieren und Sequenzieren des Gens aus Streptococcus der serologischen Gruppe G [G148] [Guss, B., et al., 1987, EMBO J. 5: 1567–1575; Olsson, A., et al., 1987, Eur. J. Biochem. 168: 319–324]. In Analogie mit SPA ist SPG ein repetitiv angeordnetes Molekül, das eine IgG-bindende Region aus drei homologen Domänen [C1, C2, C3] umfasst, zwischen denen kleinere D-Regionen liegen (**Fig.** 2A). SPG zeigt im Vergleich zu SPA ein anderes Bindungsspektrum für Immunglobuline aus unterschiedlichen Arten und Subklassen davon. Die IgG-bindenden Domänen von Protein G werden nun verbreitet als ein immunologisches Hilfsmittel eingesetzt, d. h. in der Affinitätsreinigung von monoclonalen Antikörpern. Durch das Herstellen von durch DNA-Technologie konstruierten Subfragmenten wurde gezeigt, dass eine einzelne C-Region für die vollständige IgG-Bindung ausreicht. Kürzlich wurde die Struktur für einen Komplex zwischen der C1-Domäne aus SPG und menschlichem Fc durch Röntgenkristallographie bestimmt (**Fig.** 2B). Hierdurch wird gezeigt, dass SPG an die CH2-CH3-Grenzfläche bindet, jedoch im Vergleich zu SPA an einer anderen Stelle. Die Bindung ist hauptsächlich elektrostatischer Natur, dies steht im Gegensatz zu der starken Beteiligung von hydrophoben Kräften, die bei der SPA-Fc-Interaktion zu sehen sind. Außerdem unterscheidet sich die 3-D-Struktur von C1 von der Röntgenstruktur darin, dass sie aus zwei β-Faltblättern besteht, die mit einer α-Helix verbunden sind [ββ-α-ββ]. Die Reste von C1, die gemäß der Struktur an der Bindung be-

teiligt sind, entsprechen der α-Helix, der Schleife und dem folgenden β-Faltblatt.

[0006] Eine weitere Aktivität von SPG besteht in der Fähigkeit, Serumalbumin zu binden. Die Bindungsstärke ist von der Art abhängig, wobei SPG unter den getesteten Proben am stärksten an das Serumalbumin aus Ratte, Mensch und Maus bindet. Durch Herstellen und Bindungsstudien von Subfragmenten von SPG kann gezeigt werden, dass die zwei Bindungsaktivitäten strukturell getrennt sind und dass die Serumalbuminbindende Funktion an der repetitiven A-B-Region liegt [Nygren et al., 1990, Eur. J. Biochem. 193: 143–148]. Diese Region wurde für verschiedene biotechnologische Zwecke verwendet. Rekombinante Proteine wurden als Fusionen mit einer Region hergestellt, die eine Reinigung durch Affinitätschromatographie möglich macht, wobei am häufigsten menschliches Serumalbumin als immobilisierter Ligand verwendet wurde. Proteine, die sich als proteolytisch empfindlich erwiesen, wurden als „doppelte Affinitäts-Fusionen" hergestellt, worin sie von zwei verschiedenen Affinitäts-Schwänzen flankiert sind, die von SPA bzw. SPG stammen. Somit sind Reinigungsschemata möglich, bei denen sowohl der N- als auch der C-Terminus eingesetzt wird, wodurch sichergestellt wird, dass ein intaktes Zielprotein gewonnen wird [Hammarberg et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sciences USA 86: 4367–4371]. Die starke und spezifische Bindung an Serumalbumin wurde auch eingesetzt, um therapeutische Proteine in vivo zu stabilisieren.

[0007] Durch das Herstellen eines Komplexes mit dem langlebigen Serumalbumin verbleibt der Rezeptor im Kreislauf (Macaque-Affen), und zwar mit einer Halbwertszeit, die in der Nähe der Halbwertszeit für Serumalbumin selbst liegt. Studien an Mäusen mit dem für die HIV/AIDS-Therapie interessanten, jedoch schnell ausgeschiedenen T-Zell-Rezeptor CD4 zeigten, dass er im Vergleich zu einem nicht-fusionierten Kontrollprotein wesentlich stabilisiert war, wenn er mit der Serumalbumin-bindenden Region fusioniert war [Nygren et al., 1971, Vaccines 91, Cold Spring Harbor Press, 363–368]. Die langsame Clearance kann möglicherweise durch das Bilden eines Komplexes mit Serumalbumin erklärt werden, wodurch die Eliminierung durch die Leber und die Ausscheidung in der Niere umgangen werden.

[0008] Um die minimale Ausdehnung zu bestimmen, die erforderlich ist, um die Bindung an Serumalbumin aufrechtzuerhalten, wurden verschiedene kleinere Fragmente der A-B-Region hergestellt und analysiert. Das bisher kleinste Fragment mit einer Serumalbumin-bindenden Aktivität ist ein aus 46 Resten bestehendes Fragment [„B2A3"], das die Region A3 umfasst, flankiert von 13 bzw. 9 Resten, die aus den Regionen B2 und S stammen.

[0009] Aufgrund von Homologie- und Bindungsstudien von anderen partiellen Fragmenten wird SPG hinsichtlich der Bindung an Serumalbumin als dreiwertig angesehen. Ähnlich wie die einwertigen IgG-bindenden Domänen Z und C1 ist B2A3 relativ klein und zeigt eine hohe Löslichkeit und Stabilität, weshalb es ein geeigneter Kandidat für eine Modifikation ist.

Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Der Hauptzweck der vorliegenden Erfindung besteht darin, neue bakterielle Rezeptorstrukturen bereitzustellen, indem natürliche bakterielle Rezeptoren hinsichtlich ihrer ursprünglichen Interaktionsfunktionen modifiziert werden, so dass neue Strukturen entstehen, die modifizierte Interaktionsfunktionen aufweisen.

[0011] Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, künstliche bakterielle Rezeptorstrukturen bereitzustellen, die stabil und resistenter gegenüber verschiedenen Bedingungen, z. B. erhöhten Temperaturen, sind.

[0012] Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, künstliche bakterielle Rezeptorstrukturen bereitzustellen, deren Interaktionsfunktionen so modifiziert wurden, dass sie zu anderen gewünschten Interaktionspartnern geleitet werden.

[0013] Mit diesen und anderen Aufgaben, die aus der folgenden Beschreibung ersichtlich sind, stellt die vorliegende Erfindung neue Proteine bereit, die durch Mutagenese von Oberflächen-exponierten Aminosäuren von Domänen natürlicher bakterieller Rezeptoren dieser Proteine erhalten werden können, wobei sie ohne wesentlichen Verlust der Grundstruktur und Stabilität der natürlichen bakteriellen Rezeptoren hergestellt werden. Diese Proteine wurden vorzugsweise aus einer Proteinbank selektiert, die ein Repertoire dieser neuen Proteine darstellt. In solchen neuen bakteriellen Rezeptorstrukturen wurde mindestens ein Aminosäurerest, der an der Interaktionsfunktion des ursprünglichen bakteriellen Rezeptors beteiligt ist, einer Substitution durch einen anderen Aminosäurerest unterworfen, so dass als Folge ein wesentlicher Verlust der ursprünglichen Interaktionskapazität auftritt und eine modifizierte Interaktionskapazität entsteht, wobei die Substitution ohne wesentlichen Verlust der Grundstruktur und Stabilität des ursprünglichen bakteriellen Rezeptors durchgeführt wird.

[0014] Der bakterielle Rezeptor, der als Ausgangsmaterial für die Modifikation der Interaktionsfunktion bakterieller Rezeptorstrukturen eingesetzt wird, stammt aus dem Protein A von Staphylococcus.

[0015] Um die Stabilität und die Eigenschaften der ursprünglichen bakteriellen Rezeptorstruktur aufrechtzuerhalten, ist es gemäß der vorliegenden Erfindung bevorzugt, dass die Substitution, die Aminosäurereste einschließt, die an der Interaktionsfunktion des ursprünglichen bakteriellen Rezeptors beteiligt sind, nicht mehr als etwa 50% der Aminosäurereste des ursprünglichen bakteriellen Rezeptors umfasst. Es ist besonders bevorzugt, dass nicht mehr als etwa 25% der Aminosäurereste des ursprünglichen bakteriellen Rezeptors einer Substitution unterworfen werden.

[0016] Hinsichtlich der ursprünglichen bakteriellen Rezeptorstrukturen, die für eine Modifikation ihrer Interaktionsfunktionen ausgewählt werden, ist es besonders bevorzugt, Rezeptoren zu verwenden, die aus der IgG-bindenen Domäne Z stammen.

[0017] Um die Stabilität und Eigenschaften der ursprünglichen Rezeptorstruktur, die einer Modifikation gemäß der vorliegenden Erfindung unterworfen wird, so weit wie möglich aufrechtzuerhalten, ist es bevorzugt, dass eine Substitution davon nicht mehr als im Wesentlichen alle der Aminosäurereste umfasst, die an der Interaktionsfunktion des ursprünglichen bakteriellen Rezeptors beteiligt sind.

[0018] Um hinsichtlich der Stabilität und Resistenz gegenüber verschiedenen Bedingungen günstige Eigenschaften zu erhalten, ist es bevorzugt, dass der bakterielle Rezeptor gemäß der vorliegenden Erfindung aus nicht mehr als etwa 100 Aminosäureresten besteht. Aus wissenschaftlichen Berichten ist bekannt, dass Proteine mit einer relativ kleinen Größe ziemlich resistent sind gegenüber erhöhten Temperaturen und auch gegenüber einem niedrigen pH-Wert und bestimmten Chemikalien. Einzelheiten zur Temperaturresistenz finden sich im Artikel von Alexander et al., 1992, Biochemistry 31: 3597–3603.

[0019] Hinsichtlich der Modifikation der natürlichen bakteriellen Rezeptorstruktur ist es bevorzugt, die Substitution davon anhand eines gentechnischen Verfahrens durchzuführen, z. B. durch postitionsgerichtete Mutagenese.

[0020] Hinsichtlich des Interaktionspartners des modifizierten natürlichen bakteriellen Rezeptors ist eine Vielzahl von Substanzen denkbar, z. B. Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und anorganische Substanzen. Beispiele von Kohlenhydraten sind Blutgruppen-Determinanten und Krankheitserreger-spezifische Oligosaccharide.

[0021] Hinsichtlich von Proteinen sind denkbare Interaktionspartner IGF-1, IGF-II, hGH, Faktor VIII, Insulin und Apolipoprotein und ihre entsprechenden Rezeptoren als Interaktionspartner. Außerdem können durch Selektieren neuer Rezeptorvarianten mit einer Spezifität für andere Faltungsformen von Proteinen Affinitätsharze oder analytische Hilfsmittel hergestellt werden, wodurch das Isolieren von korrekt gefalteten Molekülen erleichtert wird. Weitere Beispiele sind virale Hüllproteine, bakterielle Antigene, Biotin und Zellmarker, z. B. CD34 und CD4.

[0022] Obwohl die vorliegende Erfindung bei ganz verschiedenen natürlichen bakteriellen Rezeptoren angewendet werden kann, betrifft die folgende ausführlichere Erläuterung der Erfindung die Verwendung der IgG-bindenden Domäne Z. Das Konzept der vorliegenden Erfindung, das auf der Verwendung von künstlichen bakteriellen Rezeptoren beruht, die auf den natürlichen Strukturen von natürlich vorkommenden bakteriellen Rezeptoren basieren, bringt mehrere Vorteile mit sich. So macht es die Erfindung möglich, robuste und stabile, hoch-lösliche und Sekretions-kompetente Rezeptoren zu verwenden. Dies steht im Gegensatz zu früheren Techniken, die auf der Verwendung von Polyclonalen und Monoclonalen, z. B. für diagnostische Zwecke, beruhen, die im Zusammenhang mit Lagerung, variierenden Bedingungen, etwa variierenden Temperaturen usw., nicht sehr stabil sind. Außerdem macht es die Erfindung möglich, natürliche bakterielle Rezeptoren zu modifizieren, so dass gewünschte Interaktionskapazitäten für spezifische Zwecke erhalten werden.

[0023] Zum Selektieren solcher funktionellen Varianten in einem großen Repertoire muss ein leistungsfähiges Selektionssystem verwendet werden. Neuentwicklungen auf diesem Fachgebiet bieten alternative Verfahren. Eines der wichtigsten Hilfsmittel des Protein-Engineering, das in den letzten Jahren entwickelt wurde, ist das Phagen-Display von Proteinen. Durch DNA-Rekombinations-Techniken können einzelne Phagenpartikel hergestellt werden, die auf ihrer Oberfläche ein Protein tragen, das mit einem Phagen-Hüllprotein fusioniert ist. Durch Panning aus einem großen Pool von Phagen, die unterschiedliche Proteine oder Varianten eines spezifischen Proteins tragen, können spezifische Phagenclone aussortiert werden, die ein bestimmtes Bindungsmerkmal präsentieren [WO92/20791 an Winter et al.]. Da das Phagenpartikel gepackte DNA enthält, welche

die Phagen-Proteinkomponenten codiert, lässt sich ein Rückschluss von der spezifischen Variante des präsentierten Proteins auf die entsprechende genetische Information herstellen. Unter Verwendung dieser Technik können typischerweise 10^9 Phagenclone gleichzeitig erzeugt und einem Panning zum Screenen nach gewünschten Merkmalen unterworfen werden. Die Phagen-Display-Technik kann zum Selektieren sowohl von kleinen Peptiden als auch von komplizierteren Proteinen, z. B. Antikörpern, Rezeptoren und Hormonen, eingesetzt werden. Zum Selektieren von Proteinen, die nicht sekretiert werden können, wobei es sich um eine Voraussetzung für das Phagen-Display handelt, wurden intrazelluläre Systeme entwickelt, bei denen die Proteine der Bank mit einem Repressorprotein mit Affinität für eine spezifische, vom Plasmid stammende Operatorregion fusioniert werden, wodurch sich ein Rückschluss von der spezifischen Proteinvariante auf das Plasmid, das sie codiert, herstellen lässt. Als Alternative zu den Phagen als Träger von Proteinbanken könnten auch bakterielle Zellen verwendet werden. Kürzlich wurde das Präsentieren („Display") von rekombinanten Proteinen auf der Oberfläche von Staphylococcus xylosus gezeigt, das auf Fusionen mit der Zellwand-Ankerdomäne basierte, wobei die Möglichkeit eröffnet wird, Repertoires von Proteinen für eine Affinitätsselektion spezifischer Varianten zu präsentieren [Hansson, M., et al., 1992, J. Bacteriology 174: 4239–4245]. Außerdem können Bindung und Funktion von veränderten Varianten eines Proteins vor dem Konstruieren des Gens, welches das Protein codiert, theoretisch vorausgesagt werden, indem die Struktur anhand graphischer Computersimulationen modelliert wird.

[0024] Wie vorstehend angegeben beschreibt die vorliegende Erfindung das Konstruieren neuer Proteine, basierend auf der Mutagenese von Oberflächen-exponierten Aminosäuren von Domänen, die von bakteriellen Rezeptoren stammen. Diese künstlichen bakteriellen Rezeptoren können für verschiedene Anwendungen unter Verwendung eines Phagen-Display-Systems ausgewählt werden. Es gibt mehrere Vorteile bei der Verwendung bakterieller Rezeptoren als strukturelle Gerüste. Sie wurden entwickelt, um eine Bindungsfunktion zu exprimieren, ohne die Gesamtstruktur zu zerstören. Sie sind von Natur aus hoch-löslich, robust gegenüber unphysiologischen Bedingungen, z. B. pH-Wert und Hitze, Faltungs-effizient, und sie sind außerdem Sekretions-kompetent.

[0025] Die Erfindung kann auf mehreren verschiedenen Gebieten eingesetzt werden.

[0026] Die Einleitung des vorstehend angegebenen Patentbeschreibung WO92/20791 gibt einen ausgezeichneten Überblick über Antikörper und ihre Strukturen. Besonders wird auf die Seite 1 davon Bezug genommen.

[0027] Der bakterielle Rezeptor SPA wurde verbreitet in der Antikörper-Technologie zum Nachweisen und Reinigen von Antikörpern eingesetzt, z. B. aus Hybridomüberständen und Aszitesflüssigkeiten. Jedoch werden nicht alle Antikörper durch diese Rezeptoren erkannt, die von der Art und der Subklasse abhängig sind. Für die kleineren Subfragmente von Antikörpern (**Fig.** 4) zeigen SPA und SPG eine begrenzte Bindung, und effiziente Hilfsmittel für allgemeine Reinigungsschemata fehlen. Jedoch können aus einem Repertoire von mutierten Rezeptoren, umfassend SPA, möglicherweise Formen selektiert werden, die eine breitere Affinität für Antikörper und Subfragmente davon aufweisen.

[0028] Die komplexe strukturelle Organisation von Antikörpern hat eine Reihe von Folgen für ihre Verwendung in verschiedenen Anwendungen und auch für die Herstellung rekombinanter Derivate. Bei der Verwendung in Immunosorbentien kann die Anordnung von Untereinheiten, die durch Disulfidbindungen verbunden sind, zu einem Auslaufen von freigesetzten schweren und leichten Ketten aus Säulen führen. Die Notwendigkeit eines erfolgreichen Andockens der zwei zur Antigenbindungsstelle beitragenden Untereinheiten macht es schwierig, kleine Subfragmente mit einer schwachen Assoziation in Bakterien herzustellen. Die Faltung des Antikörpers ist von der Bildung von intra- und inter-kettigen Disulfidbindungen abhängig, die sich in der intrazellulären Umgebung bakterieller Zellen nicht bilden können. Systeme für eine starke intrazelluläre Expression von rekombinanten Antikörpern führen zur Bildung von Einschlusskörpern, die erst renaturiert werden müssen, um die biologische Aktivität herzustellen. Aufgrund dieser Einschränkungen lohnt ist es sich, nach Alternativen für die Verwendung als Proteindomänen zu suchen, die zu einer spezifischen Bindung in der Lage sind, um in einer großen Zahl von Anwendungen die Antikörper hierdurch ersetzen zu können.

[0029] Die CDR-Regionen, welche den Antigen-bindenden Teil eines Antikörpers darstellen, bilden eine für das Antigen verfügbare Gesamtoberfläche von etwa 800 $Å^2$ mit typischerweise 10 bis 20 Resten aus dem Antikörper, die an der Bindung beteiligt sind. Unter Verwendung der durch Röntgenkristallographie bestimmten Struktur des Komplexes zwischen einer einzelnen Domäne B von SPA und menschlichem fc[IgG1] als Ausgangspunkt können etwa 15 Aminosäuren der Domäne bestimmt oder postuliert werden, die an dieser Bindung beteiligt sind. Die Bindungsoberfläche von etwa 600 $Å^2$ liegt in der gleichen Größenordnung wie der Be-

reich zwischen einem Antikörper und seinem Antigen. Durch eine willkürliche in vitro-Mutagenese dieser Positionen wird gleichzeitig eine große Bank von Z-Varianten mit modifizierten Funktionseigenschaften erhalten. Angesichts der Tatsache, dass die Regionen der Z-Domäne, welche das sehr stabile sogenannte Drei-Helix-Bündel ausmachen, in ihrer nativen Form beibehalten werden, werden Spektren von Proteinen erzeugt, die als „künstliche Antikörper" angesehen werden können und die die erwartete hohe Löslichkeit und die erwarteten ausgezeichneten Faltungseigenschaften aufweisen, so dass sie in der Lage sind, an eine große Zahl von neuen Liganden zu binden. Fusionen dieser künstlichen Rezeptoren mit konstanten Regionen können konstruiert werden, um bestimmte Effektorfunktionen zu erreichen, z. B. die Komplementbindung oder das Auslösen einer ADCC (Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität).

[0030] Es gibt mehrere mögliche Vorteile, wenn die SPA-Struktur [Z] als Ausgangspunkt für solche „künstlichen Antikörper" oder künstlichen bakteriellen Rezeptoren verwendet wird. Im Zeitraum von etwa zehn Jahren wurde eine große Zahl von Proteinen als Fusionen mit SPA hergestellt, wobei man die einmaligen Eigenschaften des Fusionspartners in der Expression, Umfaltung und Reinigung nutzte. Bei diesen Anwendungen wurde gefunden, dass die Z-Domäne extrem löslich, stabil gegen Proteasen, leicht in großen Mengen herzustellen und zu einer korrekten Struktur faltbar ist, und zwar auch intrazellulär in E. coli (keine Cysteine). Immunglobuline (Ig:s) sind im Wesentlichen Tetramere, die aus sogenannten β-Faltblattstrukturen bestehen, welche die Orientierung der Antigen-bindenden Schleifen stabilisieren, die ihrerseits aus fortlaufenden Peptidsequenzen bestehen. Dies muss mit der monomeren Z-Domäne verglichen werden, die aus einem sogenannten Drei-Helix-Bündel gebildet wird, das aus drei eng gepackten α-Helix-Strukturen besteht, wobei gefunden wurde, dass die Fc-bindenden Aminosäuren in der Sequenz unzusammenhängend vorliegen, im gefalteten Protein jedoch auf ein und derselben Bindungsoberfläche positioniert sind. Dieser Unterschied hinsichtlich der Strukturelemente, die an der Bildung der Bindungsoberfläche beteiligt sind, macht neue mögliche Konformationen realisierbar, die in natürlichen Antikörpern nicht erhalten werden können. Die Fähigkeit von Z, auch unter den im Zytoplasma vorherrschenden Bedingungen zu der nativen Struktur gefaltet zu werden, eröffnet die Möglichkeit, Derivat davon auch klinisch einzusetzen. Gene, die künstliche Antikörper mit z. B. einer Virus-neutralisierenden Fähigkeit codieren, können mit Hilfe einer sogenannten Gentherapie auf Zellen verteilt werden, dies führt dazu, dass die Infektion in einem frühen Stadium unterbrochen wird.

[0031] Beim Herstellen von rekombinanten Proteinen ist die Reinigung des Produkts meist ein Hauptproblem. Indem man das Zielprotein als eine Fusion mit einem sogenannten Affinitätsschwanz exprimiert, kann das Hybridprodukt effektiv und selektiv aus dem Zelllysat oder in bestimmten Fällen aus dem Kulturmedium durch Passage über eine Säule entfernt werden, die einen immobilisierten Liganden enthält. Verschiedene solche Genfusionssysteme wurden beschrieben, die auf der Interaktion eines bestimmten Proteins mit einem Liganden beruhen. Für gewerbliche Anwendungen ist es häufig wünschenswert, die Säulen zwischen den Läufen effektiv zu reinigen, um die Vorschriften zu erfüllen, die von den Behörden an die Reinheit gestellt werden. Abhängig von der Natur der Proteine können die häufig für chemische oder physikalische Matrizen, z. B. bei der Ionenaustausch-Chromatographie und Gelfiltration, verwendeten relativ strengen Bedingungen (NaOH, Säuren, Hitze) normalerweise nicht eingesetzt werden. Hier ist die Verwendung neuer Liganden von großer Wichtigkeit, die auf stabilen Strukturen beruhen, die aus bakteriellen Rezeptoren stammen. In diesem Zusammenhang ist die Z-Domäne von SPA ein ausgezeichnetes Beispiel, da diese Domäne solchen schwierigen Bedingungen unterworfen werden kann, z. B. einem pH-Wert von 1 oder einem Erhitzen auf 80°C, ohne dass eine nicht-reversible Denaturierung erfolgt (vgl. das nachstehende Beispiel 2). Aus der Bank von z. B. Z-Varianten können interessante Proteinprodukte selektiert werden, die zum Immobilisieren auf einer Festphase für die Affinitätschromatographie verwendet werden können. Diese Proteinliganden sind resistent gegenüber effektiven Reinigungsbedingungen und können somit wiederholt in einem großen Maßstab eingesetzt werden. Bei der herkömmlichen Immun-Affinitätchromatographie, wobei immobilisierte monoclonale Antikörper für die selektive Reinigung eines bestimmten Produkts verwendet werden, gibt es Probleme mit dem Auslaufen von Untereinheiten (schweren und leichten Ketten) des Antikörpers aus der Säule, da er aus vier Polypeptidketten besteht, die durch Cysteinbrücken verbunden sind. Da die künstlichen bakteriellen Rezeptoren nur aus einer Polypeptidkette bestehen, wird dieses Problem hiermit vermieden. Ein bestimmter Interessenbereich ist die Selektion für eine Bindung an Kohlenhydrate. Für Lektine, die Binder der Natur für diese große und wichtige Gruppe von Biomolekülen, wurde gefunden, dass sie schwierig zu reinigen sind und eine begrenzte Stabilität aufweisen. Da sich die Herstellung von Antikörpern gegen Kohlenhydrate als ziemlich kompliziert erwiesen hat, wird die Selektion neuer künstlicher Lektine von großer Wichtigkeit für die Forschung, Diagnostika und Therapie sein.

[0032] Beim Herstellen von rekombinanten Proteinen in bakteriellen Wirten werden häufig Niederschläge des Genprodukts, die sogenannten Einschlusskörper, gebildet. Um eine native Struktur des Proteins zu erhalten, muss es in vitro umgefaltet werden. Eine Einschränkung, mit der man bei diesem Prozess konfrontiert wird, ist

die Tatsache, dass bei diesem Verfahren ein großer Teil des Materials ausfällt, so dass die Ausbeuten gering sind. Wenn man dagegen das Protein mit einer Verlängerung in Form von entweder einem kurzen hydrophilen Peptid oder einer leicht löslichen vollständigen Domäne erzeugt [Samuelsson, E., et al., 1991, Bio/Technol. 9: 363–366], werden wesentlich höhere Konzentrationen des Proteins erhalten, ohne dass beim Renaturieren Niederschläge ausfallen. Z. B. macht es die hohe Löslichkeit der Domäne möglich, dass die erhöhte Löslichkeit von Proteinen entweder beim Umfalten aus Einschlusskörpern oder beim sogenannten „Reshuffling" von Disulfidbrücken genutzt wird. Aus Banken künstlicher Rezeptoren können neue Formen selektiert werden, die verbesserte Eigenschaften aufweisen, so dass das Umfalten rekombinanter Proteine erleichtert oder erst möglich gemacht wird (cis-wirkende Chaperone).

[0033] Kürzlich wurde ein neues Einheitsverfahren für das Reinigen von rekombinanten Proteinen beschrieben, das auf einer Ionenaustausch-Chromatographie in einem sogenannten expandierten Bett beruhte [Hansson, M., et al., 1994, Bio/Technol., im Druck]. In diesem Zusammenhang wird ein Unterschied im isoelektrischen Punkt zwischen dem Zielprotein und den Proteinen der Wirtszelle für eine selektive Anreicherung auf einer positiv geladenen Ionenaustauschermatrix genutzt. Durch die Fusion mit der sauren Z-Domäne (pI 4,7) kann der Ionenaustausch-Schritt bei einem pH-Wert erfolgen, bei dem die Mehrheit der Verunreinigungen im Vergleich zum Fusionsprotein die entgegengesetzte Ladung aufweist. Durch das Konstruieren von Banken bakterieller Rezeptoren, bei denen eine Auswahl von Aminosäuren durch die sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat ersetzt wurde, können auch sehr saure und die Löslichkeit steigernde Domänen hergestellt werden, die beim Herstellen von rekombinanten Proteinen als Fusionspartner eingesetzt werden können.

[0034] Wie vorher angemerkt sind Affinitätssysteme, die auf Proteinliganden basieren, aufgrund der strengen Bedingungen, die zum Reinigen von Säulen erforderlich sind, für gewerbliche Zwecke nicht ideal geeignet. Deshalb braucht man Fusionspartner, die eine spezifische Affinität für einfache und billige organische Liganden besitzen. Durch ein Panning von Pagen-Display-Banken von unterschiedlichen bakteriellen Rezeptoren auf solche Liganden werden neue Affinitätsschwänze bereitgestellt, die für die Verwendung als Fusionspartner zum Herstellen und Reinigen von rekombinanten Proteinen geeignet sind.

[0035] Die vorliegende Erfindung stellt Mittel zum Herstellen und Selektieren von Proteinen mit neuen Funktionen bereit. Gemäß der Erfindung wird dies durch eine umfangreiche Mutation von definierten Resten von stabilen Domänen in bakteriellen Rezeptoren erreicht. Aufgrund der neuen Funktionen der künstlichen bakteriellen Rezeptoren können diese als spezifische Binder in der Therapie, Diagnose, Biotechnologie oder Forschung eingesetzt werden.

[0036] Die vorliegende Erfindung wird nun durch spezifische Beispiele mit Bezug auf die beiliegenden Zeichnungen noch ausführlicher beschrieben. In den Zeichnungen wird Folgendes dargestellt:

[0037] Fig. 1: A. Schematische Darstellung von Protein A von Staphylococcus, die das Signalpeptid (S), fünf IgG-bindende Regionen [E-D-A-B-C], gefolgt von der Zellwand-Ankerregion [X-M], zeigt.

[0038] B. Graphische Computerdarstellung des Komplexes zwischen der Domäne B aus SPA und menschlichem Fc1, bestimmt durch Röntgenkristallographie. Es ist zu beachten, dass die dritte Helix von SPA in dieser Figur nicht zu sehen ist.

[0039] Fig. 2: A. Schematische Darstellung von Protein G von Streptococcus aus dem Stamm G148, die das Signalpeptid (Ss), die Region E (E), die repetitive Serumalbumin-bindende A-B-Region, die Abstandhalter-Region („Spacer", S), gefolgt von den IgG-bindenden Domänen C1 bis C3, zwischen denen die D-Regionen liegen, und schließlich die Zellwand-Ankerregion W zeigt.

[0040] B. Graphische Computerdarstellung des Komplexes zwischen der Domäne C1 von SPG und menschlichem Fc1, bestimmt durch Röntgenkristallographie.

[0041] Fig. 3: Schematische Darstellung der Drei-Helix-Bündel-Struktur des aus 58 Resten bestehenden SPA-Analogons Z. Bezeichnet sind einige der Seitenketten, für die vorgeschlagen wird, dass sie an der Bindung an Fc beteiligt sind, mit Ausnahme von F30, das die Helix-Helix-Anordnung stabilisiert.

[0042] Fig. 4: Struktur des IgG-Antikörpers, die die verschiedenen Subfragmente Fab, Fd, Fc sowie scFv zeigt, zusammengesetzt aus VH und VL, die durch einen kurzen Linker (aus etwa 15 Aminosäuren) verbunden sind.

[0043] Fig. 5: A. Allgemeines Konzept für die Strategie zum Genzusammenbau, die zum Herstellen der Z-Genbanken verwendet wurde. Zum Konstruieren der Bank von sauren Z-Derivaten wurden nur die Reste 9, 11, 14, 27 und 35 verändert, indem die degenerierten Oligonucleotide ACID-1 und ACID-2 verwendet wurden. Die PCR-Primer, die zum Amplifizieren der zusammengebauten Bank verwendet wurden, waren ZLIB-3 (PCR-Primer 5') und ZLIB-5 (PCR-Primer 3').

[0044] B. Die PCR-Produkte aus der Amplifikation der zusammengebauten Bank, die 46 der 58 Reste der Z-Domäne codieren, können in Phagemid-DNA cloniert werden, welche den restlichen C-terminalen Teil von Z enthält. Dieses Gen wird im Raster mit dem Gen für Protein III der M13-Familie von E. coli-Bakteriophagen fusioniert. Hierdurch wird es möglich, dass das Repertoire von sauren Z-Varianten auf der Phagenoberfläche präsentiert wird.

[0045] Fig. 6: Oligonucleotide, die zum Konstruieren von Z-Banken verwendet wurden. Für die Bank von sauren Z-Varianten, wie in Beispiel 2 beschrieben, wurden nur die Oligonucleotide ZLIB-1, 2, 3, 4, 5, LONG-BRIDGE, ACID-1 und ACID-2 verwendet.

[0046] Fig. 7: DNA-Sequenzen von Clonen, hergeleitet von der saure Z-Protein-Bank. Die hervorgehobenen Ziffern zeigen Aminosäurepositionen in der Z-Domäne. Zur Verdeutlichung sind die Positionen der Restriktionsstellen Acc I und Nhe I angegeben.

[0047] Fig. 8: Ergebnis der Analyse der Temperaturstabilität einer einzelnen Z-Domäne bei einem pH-Wert von 2,9. Der Gehalt an α-Helizität in der Probe wurde überwacht, indem die Elliptizität bei s222 nm während einer Themperaturaufzeichnung gemessen wurde.

[0048] Fig. 9: Phagemidvektor pKN1. Die Bank der PCR-Produkte, welche die variierten Helices 1 und 2 codierte (sowohl die saure als auch die umfangreiche Bank), wurde in den Phagemidvektor pKN1 subcloniert, der das Gen für die Reste 44 bis 58 der Wildtyp-Z-Domäne enthielt (im Wesentlichen die Helix 3), gefolgt von dem Gen für eine aus 46 Resten bestehende Serumalbumin-bindende Region (ABP), die vom Protein G von Streptococcus stammt, verbunden im Raster mit einer verkürzten Version des Gens des Hüllproteins 3 des Phagen M13. Das Phagemid enthält den Replikationsursprung, der vom Plasmid pBR322 stammt, und außerdem den intergenischen Bereich (fl ori), der zum Verpacken in die Phagenpartikel erforderlich ist.

[0049] Fig. 10: SDS-PAGE. HSA-Affinitäts-gereinigte Proteine aus dem Periplasma von Escherichia coli-Zellen, die die Wildtyp-Z-Domäne produzieren, und zwei verschiedene saure Z-Varianten als ABP-Fusionsproteine, codiert durch ihre entsprechenden Phagemidvektoren, wurden durch SDS/PAGE analysiert. M, Molekulargewicht-Marker; Bahn 1, Wildtyp-Z-Domäne; Bahn 2, Clon 10, Bahn 3, Clon 12.

[0050] Fig. 11: CD-Ergebnisse. Überlagerte Kurven von CD-Spektren, die von der Wildtyp-Z-Domäne und zwei Varianten der Z-Protein-Bank stammen. Die Signale der Proteine wurden erhalten, nachdem der Beitrag des CD-Signals des ABP-Schwanzes subtrahiert worden war, der während der Analyse vorlag.

[0051] Fig. 12: Ionenaustausch-Chromatographie. Die zwei sauren Z-Varianten-Proteine Nr. 10 und Nr. 12 zusammen mit der Wildtyp-Z-Domäne (hergestellt als ABP-Fusionsproteine) wurden jeweils einer Analyse bei pH 5,5 unterworfen, wobei eine Anionenaustausch-Chromatographie-Säule verwendet wurde. Die Elution der Proteine aus der Säule erfolgte durch einen NaCl-Gradienten. Oben: saure Z-Variante Nr. 12; Mitte: saure Z-Variante Nr. 10; unten: Z (Wildtyp). Es ist zu beachten, dass das Wildtyp-Z-Protein bei diesem pH-Wert nicht auf der Säule zurückgehalten wurde.

[0052] Fig. 13: Struktur der Z-Domäne. Darstellung des Verlaufs der Hauptkette als Modell der Struktur der nativen Z-Domäne. Die Strukturen der Helices 1 und 2 stammen aus der gemeinsamen Kristallstruktur zwischen der Domäne B von SPA und Fc (Deisenhofer, 1981, Biochemistry 20: 2361–2370). Die dritte Helix wurde aufgrund der Sekundärstruktur-Parameter aus der NMR-Spektroskopie gebaut (Gouda et al., 1992, Biochemistry 31: 9665–9672). Nicht-Wasserstoff-Atome von Seitenketten der Reste, die beim Konstruieren der kombinatorischen Bank mutiert wurden, sind als Kugel-Stab-Modelle dargestellt. Die Darstellung wurde durch das Programm MOLSCRIPT erstellt (Kraulis, 1991, J. Appl. Cryst. 24: 946–950).

[0053] Fig. 14: Aminosäuresequenzen. Ergebnis der DNA-Sequenzierung von 31 zufällig ausgewählten Z-Varianten aus der Bank. Die Reste, die der Mutagenese unterworfen wurden, sind von einem Kästchen umgeben. Die horizontalen Linien zeigen die identischen Nucleotide wie in der oben dargestellten Wildtyp-Z-Sequenz. Angegeben sind die Clone, die als Fusionsproteine mit dem ABP-Schwanz exprimiert und charakteri-

siert wurden.

[0054] **Fig.** 15: Aminosäureverteilung. Ergebnis der statistischen Analyse der hergeleiteten Aminosäuren an den mutierten Positionen. Insgesamt wurden 13 Reste aus 31 Clonen (403 Codons) in die Berechnung aufgenommen. Die Verhältnisse zwischen den festgestellten und den erwarteten Häufigkeiten sind für alle 20 Aminosäuren angegeben, und außerdem für das einzige Terminationssignal (TAG), das im NNG/T-Degenerationsprofil enthalten war.

[0055] **Fig.** 16: SDS-PAGE-Analyse. HSA-Affinitäts-gereinigte Proteine aus dem Periplasma von E. coli-Zellen, die die Wildtyp-Z-Domäne produzieren, und vier verschiedene Z-Varianten als ABP-Fusionsproteine, codiert aus ihren entsprechenden Phagemidvektoren, wurden durch SDS/PAGE analysiert. Bahnen 1 bis 5: reduzierte Bedingungen; Bahnen 6 und 7: Nicht-reduzierte Bedingungen; Bahn 1, Wildtyp-Z-Domäne; Bahn 2, Clon 16; Bahn 3, Clon 21; Bahn 4, Clon 22; Bahn 5, Clon 24; M, Molekulargewicht-Marker; Bahn 6, Clon 16; und Bahn 7, Clon 22.

[0056] **Fig.** 17: CD-Ergebnisse. Überlagerte Kurven von CD-Spektren, erhalten aus der Wildtyp-Z-Domäne und vier Varianten der α-helikalen Protein-Oberflächen-Bank. Die Signale der Varianten wurden erhalten, nachdem der Beitrag des CD-Signals des ABP-Schwanzes subtrahiert worden war, der während der Analyse vorlag.

[0057] **Fig.** 18: Biosensor-Test. Überlagerte Kurven von Sensogrammen, erhalten aus der BIA-core™-Analyse der Wildtyp-Z-Domäne und von vier verschiedenen Varianten (Nr. 16, 21, 22, 24; **Fig.** 4), fusioniert mit dem ABP-Schwanz. Die IgG-bindenden Aktivitäten der unterschiedlichen Proteine wurden analysiert, indem ein Sensor-Chip, beschichtet mit etwa 5000 RU menschlichem polyclonalem IgG, und Injektionen von 45-µl-Pulsen bei 2 µl/Min. von 1500 nM Lösungen der verschiedenen Proteine verwendet wurden. Es ist zu beachten, dass die Unterschiede in den Plateau-Signalwerten während der Injektionen der Varianten Nr. 16, 21, 22 und 24 auf abweichenden, mit Laufpuffer erfolgten Verdünnungen beruhen.

[0058] Alle Reagenzien und DNA-Konstruktionen sind beim Department for Biochemistry and Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, Schweden, verfügbar.

Material

[0059] Die Oligonucleotide (**Fig.** 6) wurden von Scanadinavian Gene Synthesis (Schweden) bezogen und phosphoryliert wie angegeben in [Maniatis et al. (1988), Molecular Cloning; A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press]. ZLIB1 war am 5'-Ende biotinyliert, wodurch eine Immobilisierung an die paramagnetischen Perlen M-280 Streptavidin möglich war, die von Dynal A/S (Norwegen) bezogen wurden. Wasch/Bindungspuffer war 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure). Der Anelierungs/Ligierungspuffer war 30 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 0,2 mM ATP, 1 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT). DNA-Ligase stammte von Boehringer Mannheim, Deutschland. 10 × PCR-Puffer enthielt 20 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTPs, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1% Tween 20. Taq-DNA-Polymerase stammte von Cetus Inc., USA. Der thermische Zykler war ein Perkin-Elmer 9600. Für die Temperatur/Stabilitätsaufzeichnung wurde ein Spektropolarimeter J-720 (JASCO, Japan) verwendet. Der Escherichia coli-Stamm RR1ΔM15 [Rüther, U., 1982, Nucl. Acids Res. 10: 5765–5772], der so hergestellt wurde, dass er kompetent war (Maniatis et al., (1988), Molecular Cloning; A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press], wurde als Wirt für die Transformation eingesetzt. Agarplatten enthielten 100 µg/ml Ampicillin.

Beispiel 1

Konstruieren einer sauren Z-Bank

[0060] Das synthetische, aus 58 Resten bestehende SPA-Analogon Z [Nilsson et al., Prot. Eng.] wurde einer Mutagenese unterworfen, um neue Varianten mit einem veränderten pI-Wert herzustellen, so dass Fusionspartner für rekombinante Proteine produziert werden konnten, die dann durch Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt werden konnten. Aufgrund der Kristallstruktur des Komplexes zwischen der B-Domäne von SPA und menschlichem Fc1 [Deisenhofer, J., et al., 1981, Biochemistry 20: 2361–2370] wurden fünf an der Bindung beteiligte Reste aus der B-Domäne als Ziele für die Mutagenese ausgewählt. Diese fünf Codons, die den Z-Resten Nr. 9, 11, 14, 27 und 35 entsprechen, welche in den Helices 1 und 2 liegen, wurden gleichzeitig unter Verwendung degenerierter Oligonucleotide mit der Triplettsequenz G(C/A)(C/A) an diesen Positionen verändert, wodurch die Codons für die Aminosäuren Alanin (50%), Asparaginsäure (25%) bzw. Glutaminsäure

(25%) zustande kamen. Unter Verwendung einer Festphasen-Genzusammenbau-Strategie [Stahl et al., Biotechniques 14: 424–434] wurde eine Bank von Genen erzeugt, die 3^5 (243) saure Varianten der synthetischen IgG-bindenden Z-Domäne codierten (**Fig.** 5). 20 Mikroliter (200 µg) von paramagnetischen, mit Streptavidin beschichteten Perlen wurden mit Wasch/Bindungspuffer gewaschen und mit 15 pMol der vorhydridisierten Oligonucleotide ZLIB-1 (biotinyliert) und ZLIB-2 15 Minuten bei RT in einem Endvolumen des Wasch/Bindungspuffers von 40 µl inkubiert. Nach dem Ligieren und Waschen wurden jeweils etwa 15 pMol der Oligonucleotide ACID-1 (degeneriert), LONGBRIDGE und ACID-2 (degeneriert) sowie des voranelierten Linkerpaars ZLIB-4/ZLIB-5 wiederholt, mit dazwischen liegenden Waschschritten, gemäß Stahl et al. zugegeben [Biotechniques 14: 424–434]. Nach dem vollständig abgelaufenen Zusammenfügen wurden die verschiedenen Fragmente 15 Minuten bei 37°C ligiert. Um die für die Z(saure)-Bank codierende Menge DNA zu amplifizieren, die noch an den Perlen immobilisiert war, wurde eine Fraktion entnommen und einer PCR unterworfen. Das PCR-Gemisch (50 µl) enthielt jeweils 1 pMol der PCR-Primer ZLIB-3 und ZLIB-5, jeweils 5 µl des Ligierungsgemisches, des 10 × PCR-Puffers und 10 × CHASE, 1 Einheit Taq-Polymerase und steriles Wasser auf 50 µl. Das Temperatur-Zyklusprogramm war wie folgt: 96°C, 1 Min., 60°C, 1 Min., und 72°C, 2 Min., wiederholt in 35 Zyklen. Die Analyse durch 1% Agarose-Gel-Elektrophorese zeigte eine Bande der erwarteten Größe von 179 bp, dies macht deutlich, dass das Konzept zum Zusammenbau gut geeignet ist. Die 179-bp-Bande aus der PCR der Z(sauren)-Bank wurde aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt (Geneclean™, Bio 101, Inc., USA), anschließend erfolgte die Insertion in einen Plasmidvektor (TA-cloning™ Kit, Invitrogen, Inc., USA), der für eine Festphasen-DNA-Sequenzierung geeignet ist [Hultman et al., 1988]. Nach der Transformation und dem Ausstreichen auf Ampicillin-enthaltenden Agarplatten wurden zwei Kolonien für die Analyse der erhaltenen Sequenzen ausgewählt. Die Ergebnisse (**Fig.** 6) zeigen, dass die erwartete Degeneration an den gewünschten Stellen festgestellt wurde.

Beispiel 2

Messen der Temperaturstabilität der Z-Konformation

[0061] Die Temperaturstabilität der Z-Konformation wurde bestimmt, indem die Elliptizität bei 222 nm durch Cirkulardichroismus-(CD-)Spektroskopie in einer Temperaturaufzeichnung verfolgt wurde. Anhand dieser Wellenlänge wird das Vorliegen einer α-Helizität von Z überwacht [Cedergren et al., 1993, Prot. Eng. 6: 441–448]. Das Experiment wurde bei einem ziemlich niedrigen pH-Wert (etwa 2,9) durchgeführt, um das Molekül zu destabilisieren, da der Mittelpunkt der Temperaturdenaturierung (Tm) bei neutralem pH-Wert bei ca. 95°C liegt (Daten nicht dargestellt), dieser Wert jedoch außerhalb des Bereichs liegt, der durch eine komplette Aufzeichnung über den Übergang hinweg unter normalem Luftdruck bestimmt werden kann. Das Experiment zeigt (**Fig.** 4), dass der Tm-Wert (definiert durch den Wendepunkt der Temperaturaufzeichnung) der Z-Domäne bei pH 2,9 noch hoch ist und bei 71°C liegt. Dies macht die extreme Temperaturstabilität der α-Helices des Z-Moleküls deutlich.

[0062] Das Experiment wurde in einem Spektropolarimeter J-720 (JASCO, Japan) durchgeführt, wobei die Temperatur kontrolliert wurde, indem Wasser aus einem NESLAB-Wasserbad durch den Küvettenhalter zirkuliert wurde. Die Temperatur in der Küvette wurde durch eine Mikrosensorvorrichtung überwacht (JASCO, Japan). Der Puffer war 50 mM Essigsäure, pH 2,9. Das Protein war die Domäne Z [Cedergren et al., 1993, Prot. Eng. 6: 441–448] bei einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml, und die Weglänge der Küvettenzelle betrug 1 cm. Die Geschwindigkeit der Temperaturaufzeichnung betrug im Experiment 50°C pro Stunde.

Beispiel 3

Charakterisieren von Proteinen, die aus der sauren Z-Bank stammen

[0063] Zwei Proteinvarianten, die aus der sauren Z-Bank stammen, wurden in Escherichia coli exprimiert, gereinigt und charakterisiert, wobei SDS-PAGE, Cirkulardichroismus und Ionenaustausch-Chromatographie eingesetzt wurden. Die PCR-Produkte aus einem Festphasen-Genzusammenbau (vgl. Beispiel 1) wurden mit 45 U Esp 3I (Labassco AB, Schweden) und 50 U Nhe I (Pharmacia, Schweden) in 200 µl Puffer gespalten (33 mM Tris-Acetat, pH 7,9, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat, 0,5 mM DTT und 0,1 mg/ml BSA). Das Gemisch wurde mit Mineralöl überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gespaltenen Fragmente (etwa 5 µg) wurden durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion gereinigt, worauf ein weiteres Waschen mit Chloroform und später eine Ethanol-Fällung folgten, bevor eine Ligierung bei 15°C über Nacht mit dem mit Mlu I-Nhe I gespaltenen Vektor pKN1 (1 µg) (vgl. nachstehend) unter Verwendung von 13,5 Weiss-Einheiten T4-DNA-Ligase durchgeführt wurde. Das Ligierungsgemisch wurde 20 Minuten bei 70°C hitzebehandelt, mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, anschließend mit Chloroform gewaschen, mit Ethanol gefällt und

in 20 µl sterilem Wasser wieder gelöst.

[0064] Der Phagemidvektor pKN1 (**Fig.** 9) wurde in mehreren Schritten wie folgt konstruiert. Ein doppelsträngiger Linker, der die unveränderlichen Reste 44 bis 58 der Z-Domäne codiert, wurde aus den Oligonucleotiden ZLIB-6 und ZLIB-7 hergestellt und als Mlu I-Xho I-Fragment in das Phagemid pKP986 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Lars Abrahmsen, Pharmacia BioScience Center, Schweden) cloniert, wodurch pKN entstand. Das Plasmid pKP986 codiert das Leaderpeptid Omp A von E. coli, gefolgt von den Resten 249 bis 406 des Hüllproteins 3 des filamentösen Phagen fd (Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832–10844), unter der Kontrolle eines lac-Promotors. Ein Genfragment, das eine einwertige Serumalbumin-Bindungsregion codiert, hergeleitet vom Protein G von Streptococcus, wurde durch PCR aus dem Plasmid pB2T (Eliasson et al., Molecular Immunol. 28: 1055–1061) amplifiziert, wobei die Primer ABP-1 und ABP-2 verwendet wurden (die Xho I bzw. Sal I-Restriktionsstellen enthalten), und in das mit Xho I gespaltene Plasmid pKN cloniert, wodurch pKN1 erhalten wurde. Dieser Phagemidvektor codiert somit das Omp-A-Signalpeptid, die dritte Helix der Wildtyp-Z-Domäne, gefolgt von einem aus 46 Resten bestehenden Albumin-bindenden Protein (ABP), gekoppelt an die Reste 249 bis 406 des fd-Phagenproteins III, und ist für die Insertion von Esp 3I/Nhe I-gespaltenen PCR-Produkten geeignet, welche die variierten Helices 1 und 2 der Z-Domäne codieren.

[0065] Gefrier-kompetente E. coli-Zellen RR1ΔM15 (supE44, lacY1 lacZ ara-14 galK2 xyl-5 mtl-1 leuB6 proA2 Δ(mrcC-mrr) recA$^+$ rpsL20 thi-1 lambda$^-$ F$^-$ [lac1^q lacZΔM15]) (Rüther, 1982, Nucleic Acids Research 10: 5765–5772) wurden mit dem Ligierungsgemisch gemäß Maniatis und Mitarbeitern transformiert (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning; A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press) und auf Agarplatten plattiert, die 100 µg/ml Ampicillin (Sigma, USA) und 1% Glucose enthielten. Eine kleine Menge der Zellen aus zufällig herausgegriffenen Kolonien wurde getrennt zweistufigen PCR-Amplifikationen (30 Zyklen; 96°C, 15 Sek.; 72°C, 2 Min.) auf einem GeneAmp PCR-System 9600 (Perkin Elmer, USA) unterworfen, unter Verwendung von 5 pMol der Primer RIT-27 und NOKA-2 (biotinyliert) in 20 mM TAPS (pH 9,3), 2 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,1% Tween 20, 0,2 mM der Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) und 1,0 U Taq-DNA-Polymerase (Perkin-Elmer). Die Festphasen-DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung der FITC-markierten Sequenzierungsprimer NOKA-3 (für den immobilisierten Strang) und ABP-2 (für den eluierten Strang) auf einer Roboter-Arbeitsstation (Biomek™ 1000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) und einem Automated Laser Fluorescent (ALF) DNA Sequencer™ (Pharmacia Biotech, Schweden), wie von Hultman und Mitarbeitern beschrieben (Hultman et al., 1989, Nucleic Acids Research 17: 4937–4946).

[0066] Zwei Clone mit unterschiedlichen codierten sauren Aminosäure-Substitutionen (fette Schrift) an den Positionen 9, 11, 14, 27 und 35 in der Z-Domäne gemäß Tabelle 1 wurden für die weitere Analyse ausgewählt. Die Wildtyp-Z-Domäne und die zwei unterschiedlichen sauren Z-Varianten-Proteine (Clone Nr. 10 und 12) wurden aus ihren entsprechenden Phagemidvektoren als Fusionen mit dem Serumalbumin-bindenden Schwanz (ABP) exprimiert und durch eine Affinitätschromatographie mit menschlichem Serumalbumin gereinigt.

Tabelle 1
Aminosäuresubstitutionen für ausgewählte Clone in der sauren Z-Bank[a]

Clon Nr.	Codierte Aminosäure an Position Nr.				
	9	11	14	27	35
Wt	Gln	Asn	Tyr	Arg	Lys
10	Glu	Asp	Asp	Ala	Glu
12	Glu	Asp	Asp	Ala	Ala

[a]Buchstaben in fetter Schrift zeigen die sauren Aminosäuren an

[0067] Kolonien von E. coli RR1ΔM15-Zellen, die die entsprechenden Phagemidvektoren enthielten, wurden zum Beimpfen von 100 ml tryptischer Soyabrühe (Difco), unter Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml), verwendet. Die Kulturen wurden bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} = 1 gezüchtet, anschließend folgten die Induktion mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG und die Inkubation bei 30°C über Nacht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei etwa 5000 × g, 10 Minuten, geerntet und die periplasmatischen Proteine durch osmotischen Schock freigesetzt. Der Periplasmainhalt aus den Zellen wurde einer Affinitätschromatographie auf HSA-Sepharose unterworfen, wie von Nygren und Mitarbeitern beschrieben (Nygren et al., 1988, J. Mol. Recognit. 1: 69–74), und durch SDS/PAGE auf einem homogenen 12% Plattengel analysiert (BioRad Inc., USA), das mit Coomas-

sie Brilliant Blue R-250 gefärbt wurde. 1,5 bis 2,5 mg/l Kultur konnten gewonnen werden, dies zeigt, dass bei den Varianten und der Wildtypdomäne ähnliche Produktions- und Sekretionseffizienzen vorliegen. Außerdem legen die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse (**Fig.** 10) der gereinigten Proteine nahe, dass die analysierten sauren Z-Varianten in E. coli stabil exprimiert werden.

[0068] Um zu untersuchen, ob der Sekundärstruktur-Gehalt der Derivate nach der Oberflächenmutagenese beibehalten wurde, wurde eine subtraktive Cirkulardichroismus-Analyse durchgeführt. Die durch IgG- oder HSA-Affinitätschromatographie gereinigten Proteine Z, Z-ABP, die sauren Derivate Nr. 10 und 12, fusioniert mit dem ABP-Schwanz, und außerdem der ABP-Schwanz selbst wurden bei 250 bis 184 nm (langes UV-Licht) einer Cirkulardichroismus-Analyse bei Raumtemperatur unterworfen, wobei ein Spektropolarimeter J-720 (JASCO, Japan) verwendet wurde. Die Abtastgeschwindigkeit betrug 10 nm/Min.. Die Weglänge der Zelle betrug 1 mm. Lösungen (etwa 0,1 mg/ml) der verschiedenen Proteine wurden in 20 mM Phosphatpuffer, pH 6,5, angereichert mit 0,05% Tween 20 (Kebo AB, Schweden), hergestellt. Die genauen Proteinkonzentrationen wurden durch Aminosäureanalyse auf einem Aminosäureanalysator 6300 von Beckman bestimmt, der mit einem Datenverarbeitungssystem „System Gold" ausgestattet war. Die CD-Signale für die Derivate wurden erhalten, indem das für den ABP-Schwanz erhaltene Signal subtrahiert wurde, nachdem die Unterschiede in den Proteinkonzentrationen abgeglichen worden waren, gefolgt von einer Standardisierung auf den Aminosäuregehalt.

[0069] Ein Vergleich der bei 250 bis 184 nm erhaltenen Signale für die Wildtyp-Z-Domäne und für die sauren Varianten, fusioniert mit dem ABP-Schwanz, erfolgte, nachdem der Beitrag des ABP-Schwanzes selbst subtrahiert worden war. Das Ergebnis zeigt, dass für die zwei sauren Z-Derivate Spektren erhalten wurden, die dem der Wildtyp-Z-Domäne ähnlich waren, mit einem charakteristischen Minimum bei 208 nm und einem Wendepunkt bei 222 nm (Johnson, 1990) (**Fig.** 11). Dies legt nahe, dass das Drei-Helix-Bündel-Gerüst in diesen Mutanten aufrechterhalten bleibt.

[0070] Die zwei Z-Varianten Nr. 10 und 12 enthalten im Vergleich zu der nativen Z-Domäne vier bzw. drei eingeführte saure Aminosäuren. Um zu untersuchen, ob sich die eingeführte Acidität als Unterschied in den isoelektrischen Punkten widerspiegelte, wurden sie einer Gradientenelution aus einer Ionenaustauscher-Säule unterworfen. Die Proteine Z (Wildtyp) und die sauren Varianten Nr. 10 und Nr. 12 (alle als ABP-Fusionproteine produziert) wurden jeweils (5 µg) in 300 µl 20 mM Piperazinpuffer (pH 5,5) gelöst und getrennt mit 100 µl/Min. auf eine MonoQ. PC 1.6/5-Säule (Pharmacia, Schweden) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte, indem ein NaCl-Gradient in Piperazinpuffer (pH 5,5) (Sigma, USA) im Bereich von 0 bis 50% NaCl in 20 Minuten angelegt wurde. Die Ergebnisse der Analyse (**Fig.** 12) zeigen, dass die zwei sauren Z-Variantenproteine bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen eluiert wurden, dies legt klare Unterschiede in den isoelektrischen Punkten nahe. Im Gegensatz dazu interagierte die Wildtyp-Z-Domäne bei dem während des Experiments gewählten pH-Wert nicht mit dem Harz und war deshalb im Durchfluss zu sehen.

[0071] Somit zeigt die mit den zwei sauren Z-Variantenproteinen durchgeführte Reihe von Experimenten, dass das Expressionsverhalten, die proteolytische Stabilität und der Sekundärstruktur-Gehalt der Varianten im Vergleich zu der nativen Z-Domäne unverändert waren. Außerdem wurden neue Funktionen in die zwei Z-Varianten eingeführt, indem an der Oberfläche gelegene Positionen durch saure Aminosäuren substituiert wurden. Die zwei sauren Varianten können z. B. als Fusionspartner eingesetzt werden, um die Reinigung von rekombinanten Proteinen durch Ionenaustausch-Chromotographie bei einem niedrigen pH-Wert zu erleichtern. Somit wird gezeigt, dass aus den Mitgliedern der sauren Z-Bank Varianten mit neuen Funktionen isoliert werden können.

Beispiel 4

Konstruieren und Charakterisieren einer kombinatorischen Bank von Z-Varianten

[0072] Eine Bank von Z-Varianten wurde zusammengebaut, indem eine Festphasen-Genzusammenbau-Strategie verwendet wurde (vgl. Beispiel 1). Für die meisten der Aminosäurereste, von denen angenommen wurde, dass sie an der Bindung an Fc beteiligt sind (Deisenhofer, 1981, Biochemistry 20: 2361–2370), wurde gefunden, dass sie an der Oberfläche des Moleküls vorliegen (Q9, Q10, N11, F13, Y14, L17, N28, Q32 und K35), und sie wurden deshalb in die Mutagenese aufgenommen. Außerdem wurden noch andere Reste (H18, E24, E25 und R27) aufgrund ihrer Lage an der Oberfläche aufgenommen. Insgesamt wurden auf diese Weise 13 Reste im Z-Gerüst für eine gleichzeitige und zufällige Mutagenese ausgewählt. Ein Satz von Oligonucleotiden (**Fig.** 6) wurde zum Konstruieren der Bank von Oberflächenmutanten der aus 58 Aminosäuren bestehenden einwertigen, IgG-bindenden, mit Z bezeichneten Domäne synthetisiert. In dieser Bank wurden die Codons für Q9, Q10, N11, F13, Y14, L17 und H18, die in der ersten α-Helix lagen, und E24, E25, R27, N28,

Q32 und K35 in der zweiten α-Helix der Z-Domäne (**Fig.** 13) durch degenerierte NNK-Codons (K = G oder T) substituiert, indem eine Festphasenstrategie eingesetzt wurde, bei der die einzelsträngigen degenerierten Oligonucleotide für den Zusammenbau verwendet wurden. Die gewählte NNK-Degeneration umfasst 32 Codons, die alle 20 Aminosäuren abdecken, umfassend das TAG-Terminationssignal (amber).

[0073] Das Oligonucleotid ZLIB-1 wurde mit einer 5'-Biotingruppe synthetisiert, um eine robuste Verankerung an den mit Streptavidin beschichteten paramagnetischen Perlen zu ermöglichen, die beim Genzusammenbau als Feststoffträger verwendet wurden. Dieses Oligonucleotid ZLIB-1 codiert zusammen mit seiner komplementären Sequenz (ZLIB-2) die Reste 1 bis 8 der Z-Domäne, vor denen die ersten sechs Reste der Region E von Protein A liegen, die zugefügt wurden, um die Sekretion der Z-Varianten bei E. coli zu erleichtern (Abrahamsen et al., 1986, EMBO J. 4: 3901–3906). Die Oligonucleotide DEGEN-1 bzw. DEGEN-2 (Tabelle 1) codieren die zwei mutierten Helices der Z-Domäne, die normalerweise an der Fc-Bindung beteiligt sind. Theoretisch würde eine vollständige und gleichzeitige NNK-Degeneration an den 13 gewählten Positionen eine kombinatorische Bank von etwa $8 \cdot 10^{16}$ Proteinvarianten ergeben, die durch $3{,}7 \cdot 10^{19}$ unterschiedliche DNA-Sequenzen codiert sind. Jedoch wurde hier der Zusammenbau der Bank durch die Immobilisierung von etwa 15 pMol der vorhybridisierten Oligonucleotide ZLIB-1 und ZLIB-2 (**Fig.** 6) initiiert, wodurch die theoretische Größe der Z-Bank auf etwa $0{,}9 \cdot 10^{13}$ verschiedene DNA-Sequenzen beschränkt ist, die etwa $2 \cdot 10^{10}$ Z-Varianten codieren. Der Zusammenbau wurde fortgesetzt, indem ein vorher gebildetes Konstrukt zugegeben und ligiert wurde, das nach Ligieren von äquimolaren Mengen der Oligonucleotide DEGEN-1 und DEGEN-2 erhalten wurde, erleichtert durch das verbindende Oligonucleotid BRIDGE (**Fig.** 6).

[0074] Um den Zusammenbau zu vervollständigen, wurde ein Fragment, das aus den vorhybridisierten Oligonucleotiden ZLIB-4 und ZLIB-5 bestand, zu den Perlen für die Ligierung zugegeben. Dieses Fragment codiert die zweite Schleife und die ersten sechs Reste der unveränderten dritten Helix der Z-Domäne. Nachdem der Zusammenbau vollständig abgelaufen war, wurden die Oligonucleotide ZLIB-3 und ZLIB-5, die die Erkennungssequenzen für die Endonucleasen Esp 3I bzw. Nhe I enthalten, als Primer für die PCR-Amplifikation der zusammengebauten Konstrukte eingesetzt, wobei 1/10 der an Perlen immobilisierten ssDNA als Matrize verwendet wurde (dies entspricht theoretisch $3 \cdot 10^9$ Proteinvarianten). Um unerwünschte Störungen während der Amplifikation zu vermeiden, wurden die Oligonucleotide ZLIB-2, BRIDGE und ZLIB-5 zuerst mit Alkali eluiert. Das resultierende PCR-Produkt wurde durch Agarose-Gel-Elektrophorese analysiert, wobei gefunden wurde, dass es homogen war und die erwartete Größe von 179 bp aufwies.

[0075] Das PCR-Produkt wurde in den Phagemidvektor pKN1 subcloniert, welcher das Gen für die Reste 44 bis 58 der Wildtyp-Z-Domäne im Raster mit einer verkürzten Version des Gens für das fd-Phagen-Hüllprotein 3 enthielt, zum Präsentieren auf der Oberfläche von Phagenpartikeln, und zwar anhand einer Helferphagen-Superinfektion der mit dem Phagemid transformierten E. coli-Zellen (Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832–10844) (**Fig.** 9). Außerdem enthält der Phagemidvektor eine dazwischen im Raster liegende Kassette, die eine 5 kDa (46 Aminosäuren) große Serumalbuminbindende Region codiert (als ABP bezeichnet), die vom Protein G von Streptococcus hergeleitet ist (Nygren et al., 1988, J. Mol. Recognit. 1: 69–74; Nilsson et al., 1994, Eur. J. Biochem. 224: 103–108), wodurch eine effiziente Affinitätsreinigung der produzierten Z-Varianten ermöglicht wird, denen ihre native Fc-bindende Aktivität fehlt. Außerdem kann die Serumalbumin-bindende Aktivität möglicherweise für eine Vorselektion von Phagenpartikeln eingesetzt werden, welche rekombinante Moleküle enthalten, und zwar vor dem Panning nach Z-Varianten mit neuen Bindungsfunktionen, wodurch der Hintergrund herabgesetzt werden kann, der durch die unspezifisch gebundenen, nicht-rekombinanten Phagenpartikeln zustande kommt.

[0076] Nach der Transformation zeigte das PCR-Screening (unter Verwendung der Oligonucleotide RIT-27 und NOKA-2) von 25 Clonen, dass mehr als 95% (24/25) der Clone ein Insert der erwarteten Länge enthielten, dies legt nahe, dass die Prozedur des Genzusammenbaus mit einer hohen Effizienz durchgeführt wurde. 45 Transformanten wurden zufällig selektiert und einer direkten Festphasen-DNA-Sequenzierung unterworfen (vgl. Beispiel 3), um die Qualität und Heterogenität der Bank noch weiter zu analysieren. Etwa 69% der Clone waren korrekt, wobei sie Wildtyp- und degenerierte Codons an den entsprechenden Positionen enthielten. Die restlichen Clone wiesen falsche Abweichungen auf, die zum Teil auf die Oligonucleotidsynthese oder auf Fehler zurückgeführt werden können, die während der PCR eingeführt wurden. Die korrekten Clone (31 Clone) (**Fig.** 14) wurden noch weiter daraufhin analysiert, welche Codons sie an den 13 degenerierten Positionen zeigten. Die Verteilung der insgesamt 403 resultierenden hergeleiteten Aminosäuren unter den 32 Codons, die im NNK-Degenerationsprofil enthalten waren, zeigt eine nahe Korrelation mit den erwarteten Häufigkeiten für diese noch unselektierten Clone (**Fig.** 15). Um die Expression und Stabilität der Z-Varianten zu untersuchen, wurden vier Clone (Nr. 16, 21, 22, 24; **Fig.** 14) mit unterschiedlichen Substitutionsgraden und außerdem die Wildtyp-Z-Domäne als ABP-Fusionen hergestellt, die durch ihre entsprechenden Phagemidvektoren codiert

wurden. Lösliche Proteine aus dem Periplasma von IPTG-induzierten Kulturen wurden einer HSA-Affinitätschromatographie unterworfen, wobei der ABP-Schwanz für eine allgemeine und effiziente Gewinnung genutzt wurde (Nygren et al., 1988, J. Mol. Recognit. 1: 69–77). Für alle Proteine konnten etwa 1,5 bis 2,5 mg/l Kultur gewonnen werden, wobei für die Varianten und für die Wildtypdomäne ähnliche Herstellungs- und Sekretionseffizienzen erhalten werden. Die Ergebnisse einer SDS-PAGE-Analyse (**Fig.** 16) der gereinigten Proteine legt nahe, dass die vier analysierten Z-Varianten in E. coli stabil exprimiert werden. Die kleinere Bande mit einer HSA-bindenden Aktivität, die mit unterschiedlichen Intensitäten auftritt, entspricht mit größter Wahrscheinlichkeit dem ABP-Schwanz selbst (5 kDa) und ist die Folge einer proteolytischen Spaltung zwischen der Z-Variante und dem ABP-Schwanz. Interessanterweise bildeten die beiden Z-Varianten (Nr. 16 und 22) mit eingeführten Cysteinresten Dimere, die unter nicht-reduzierenden Bedingungen während der SDS-PAGE festgestellt werden konnten (**Fig.** 13; Bahnen 6 und 7).

[0077] Um zu untersuchen, ob der Sekundärstruktur-Gehalt der Derivate nach der umfangreichen Oberflächenmutagenese aufrechterhalten blieb, wurde eine subtraktive Cirkulardichroismus-Analyse durchgeführt (vgl. Beispiel 3). Ein Vergleich der bei 250 bis 184 nm erhaltenen Signale für die Wildtyp-Z-Domäne und die vier mit dem ABP-Schwanz fusionierten Varianten wurde durchgeführt, nachdem der Beitrag des ABP-Schwanzes selbst subtrahiert worden war. Das Ergebnis zeigte, dass bei drei der vier Derivate Spektren erhalten wurden, die dem der Wildtyp-Z-Domäne ähnlich waren, mit einem charakteristischen Minimum bei 208 nm und einem Wendepunkt bei 222 nm (Johnson, 1990, Prot. Struct. Funct. Genet. 7: 205–224) (**Fig.** 17). Dies legt nahe, dass das Drei-Helix-Bündel-Gerüst in diesen Mutanten möglicherweise aufrechterhalten bleibt. Beim vierten Derivat (Nr. 24) wurde jedoch ein Spektrum erhalten, das Spektren gleicht, die bei Zufallsknäueln zu sehen sind, wodurch ein geringer Gehalt an Sekundärstruktur-Elementen angezeigt wird (Johnson, 1990). Dieses Derivat enthält eine Substitution von Glutamin zu Prolin an der Position 32 in Helix 2, dies legt eine Destabilisierung nahe, die zu einem Zusammenbrechen des Helix-Bündel-Gerüsts führt.

[0078] Um die vier Z-Varianten noch weiter zu untersuchen, wurde die Wechselwirkung mit polyclonalem menschlichem IgG (hIgG) (Pharmacia AP) für Wildtyp-Z und für vier verschiedene Z-Variantenclone (Nr. 16, 21, 22, 24; **Fig.** 14), fusioniert mit dem ABP-Schwanz, unter Verwendung der Biosensor-Technologie verglichen (BIAcore™, Pharmacia Biosensor AB, Schweden). Die carboxylierte Dextranschicht eines CM-5-Sensorchips wurde aktiviert, indem N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-Ethyl-N'-[3-diethylaminopropyl]-carbodiimid (EDC) gemäß den Anweisungen der Hersteller verwendet wurden. Für die Immobilisierung von hIgG wurden 20 µl einer 500 nM hIgG-Lösung in 50 mM Acetat, pH 4, mit einer Fließrate von 5 µl/Min. über die aktivierte Oberfläche injiziert, wodurch es zur Immobilisierung von etwa 5000 Resonanzeinheiten (RU) kam. 45-µl-Proben der fünf Fusionsproteine, gelöst in den ungefähren Konzentrationen von 1500 nM in NaCl/Hepes (10 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,5% grenzflächenaktives Mittel P-20), wurden in getrennten Experimenten mit einer Fließrate von 2 µl/Min. injiziert. Nach jeder Probeninjektion wurde die hIgG-Oberfläche mit 30 mM HCl regeneriert. Wie erwartet zeigte nur die Wildtyp-Z-Domäne eine nachweisbare Fc-Bindungsaktivität (**Fig.** 18).

[0079] Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine Bank von SPA-Varianten mit einer substituierten Oberfläche konstruiert werden kann, die aus 13 Resten besteht, die in den α-Helices liegen. Der hohe Konservierungsgrad des Gesamtgerüsts der nativen Z-Domäne legt nahe, dass Derivate mit neuen Funktionen, transplantiert auf eine stabile und lösliche Gerüstregion, für die Verwendung als künstliche Antikörper in der Biochemie, Immunologie und Biotechnologie isoliert werden können.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Identifizieren und/oder Herstellen einer künstlichen bakteriellen Rezeptorstruktur, umfassend die Schritte:
a) Bereitstellen eines Repertoires unterschiedlicher Proteine, wobei das Repertoire einen Satz unterschiedlicher künstlicher bakterieller Rezeptorstrukturen darstellt, in denen jeweils die Aminosäuresequenz der künstlichen bakteriellen Rezeptorstruktur der eines natürlichen bakteriellen Rezeptors entspricht, bei der mindestens ein Oberflächen-exponierter Aminosäurerest durch einen anderen Aminosäurerest substituiert ist, wobei der natürliche bakterielle Rezeptor die Z-Domäne darstellt, die vom Protein A von Staphylococcus aureus stammt;
b) Unterwerfen des Repertoires einem Selektionsverfahren, das auf einer gewünschten Interaktionsfunktion beruht, zum Selektieren künstlicher bakterieller Rezeptorstrukturen, in denen die Substitution so ist, dass die Grundstruktur und -stabilität des natürlichen bakteriellen Rezeptors nicht verloren gegangen ist, in denen der künstlichen bakteriellen Rezeptorstruktur eine Interaktionskapazität des natürlichen bakteriellen Rezeptors fehlt und in denen die künstliche bakterielle Rezeptorstruktur an einen Interaktionspartner bindet, an den der

natürliche bakterielle Rezeptor nicht bindet; und
c) Isolieren der selektierten Rezeptorstruktur.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die künstliche bakterielle Rezeptorstruktur mindestens eine Substitution an einer Aminosäureposition aufweist, die aus den Positionen 9, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 24, 25, 27, 28, 32 und 35 der Z-Domänensequenz ausgewählt ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die künstliche bakterielle Rezeptorstruktur Substitutionen an den Aminosäurepositionen 9, 11, 14, 27 und 35 der Z-Domänensequenz aufweist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die künstliche bakterielle Rezeptorstruktur auch Substitutionen an den Aminosäurepositionen 10, 13, 17, 18, 24, 25, 28 und 32 der Z-Domänensequenz aufweist.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die künstliche bakterielle Rezeptorstruktur mit einem Phagen-Hüllprotein fusioniert ist.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Substitution durch positionsgerichtete Mutagenese erhalten wurde.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Interaktionspartner, an den der natürliche bakterielle Rezeptor nicht bindet, aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und anorganischen Substanzen besteht.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Interaktionspartner ein Kohlenhydrat ist, z. B. eine Blutgruppen-Determinante oder ein Pathogen-spezifisches Oligosaccharid.

9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Interaktionspartner aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus IGF-I, IGF-II, hGH, Faktor VIII, Insulin, Apolipoprotein und ihren entsprechenden Rezeptoren besteht.

10. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Interaktionspartner aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Virus-Hüllprotein, einem bakteriellen Antigen, Biotin und einem Zellmarker, z. B. CD34 oder CD4, besteht.

11. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Interaktionspartner ein Antikörperfragment, z. B. Fv, scFv, Fab oder Fc, ist.

12. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Interaktionspartner ein organischer Ligand ist.

13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, umfassend die Schritte:
a1) Herstellen von Phagenpartikeln durch DNA-Rekombinations-Techniken, die auf ihren entsprechenden Oberflächen Proteine aus dem Repertoire tragen, die mit Phagen-Hüllproteinen fusioniert sind;
a2) Panning aus einem Pool von Phagenpartikeln, die von Schritt a1) stammen, um spezifische Phagenclone zu selektieren, die gewünschte Bindungseigenschaften zeigen; und
b) Isolieren der spezifischen Phagenclone unter Verwendung von Interaktionen, die mit den Bindungseigenschaften assoziiert sind.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und 6 bis 12, umfassend die Schritte:
a) Herstellen von Fusionsproteinen durch DNA-Rekombinations-Techniken, wobei die Proteine des Repertoires mit einem Repressorprotein mit Affinität für eine spezifische, vom Plasmid stammende Operatorregion fusioniert sind, wodurch eine Interaktion zwischen einer spezifischen Proteinvariante und einem Plasmid, das diese codiert, zustande kommt; und
b) Isolieren selektierter Proteine unter Verwendung der Interaktion.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und 6 bis 12, umfassend die Schritte:
a1) Herstellen von Bakterienzellen durch DNA-Rekombinations-Techniken, die auf ihren entsprechenden Oberflächen Proteine aus dem Repertoire tragen, die mit Zellwand-verankernden Domänen fusioniert sind, die in den Bakterienzellen funktionell sind;
a2) Panning aus einem Pool von Bakterienzellen, die von Schritt a1) stammen, um spezifische Bakterienclone zu selektieren, die gewünschte Bindungseigenschaften zeigen; und
b) Isolieren der spezifischen Clone unter Verwendung von Interaktionen, die mit den Bindungseigenschaften

assoziiert sind.

Es folgen 18 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Fig. 1A

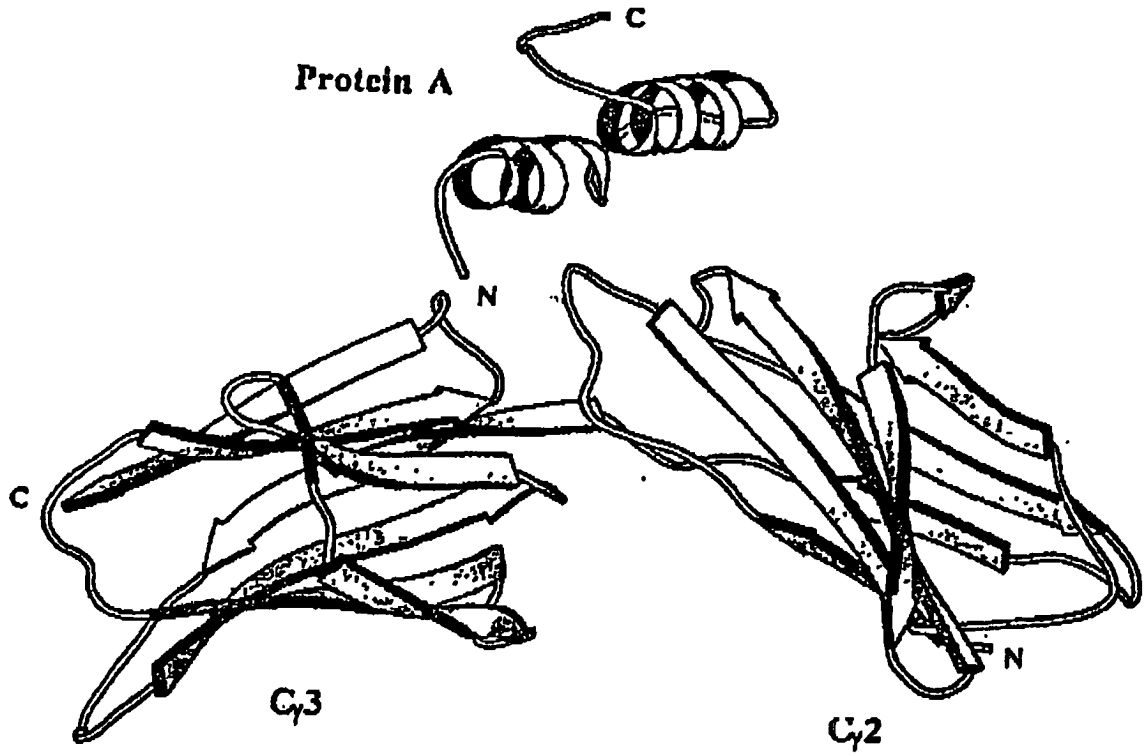

Fig. 1B

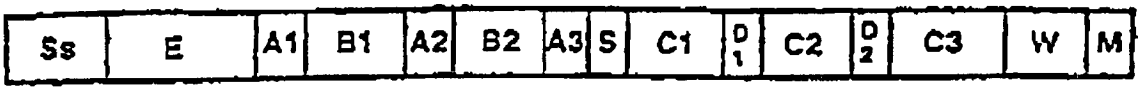

Fig. 2A

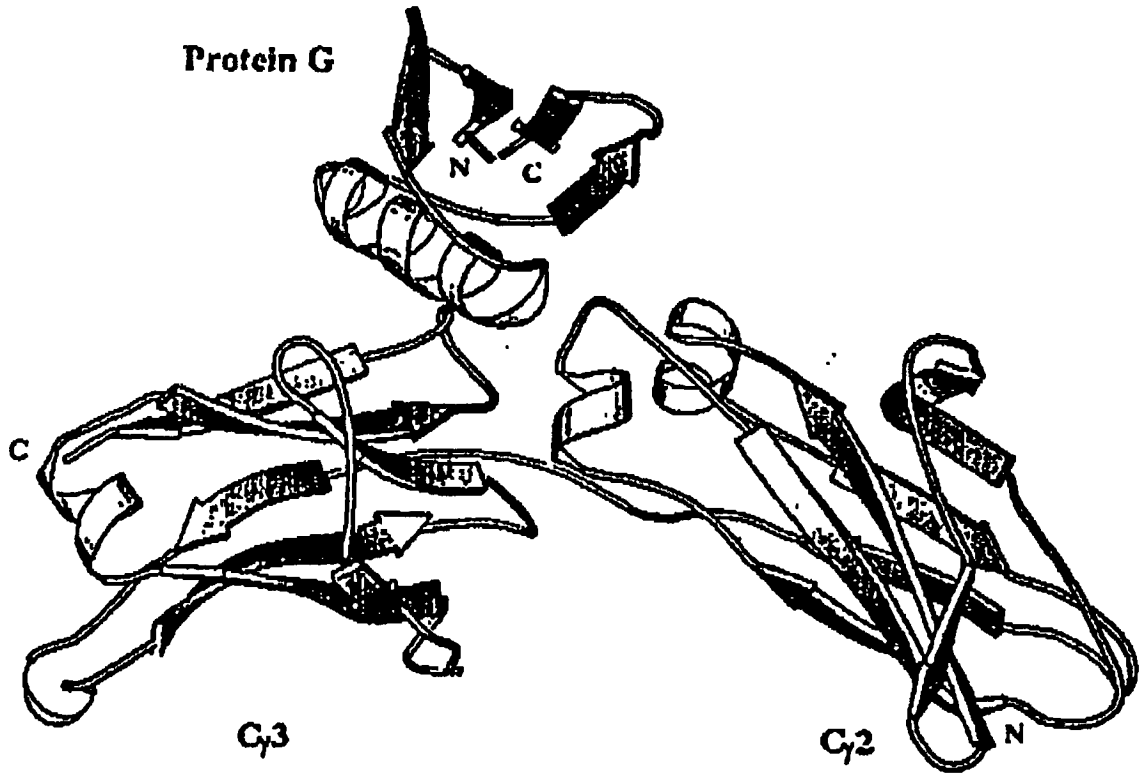

Fig. 2B

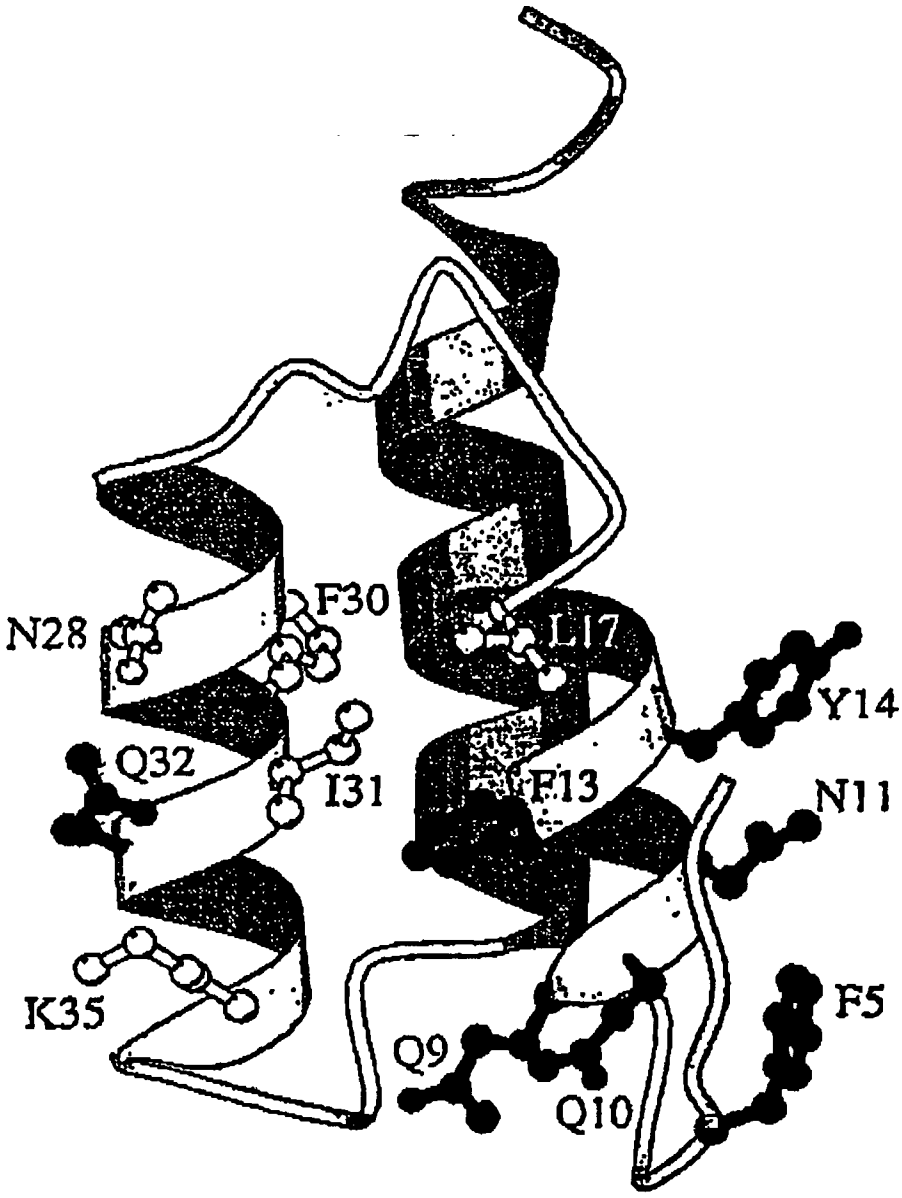

Fig. 3

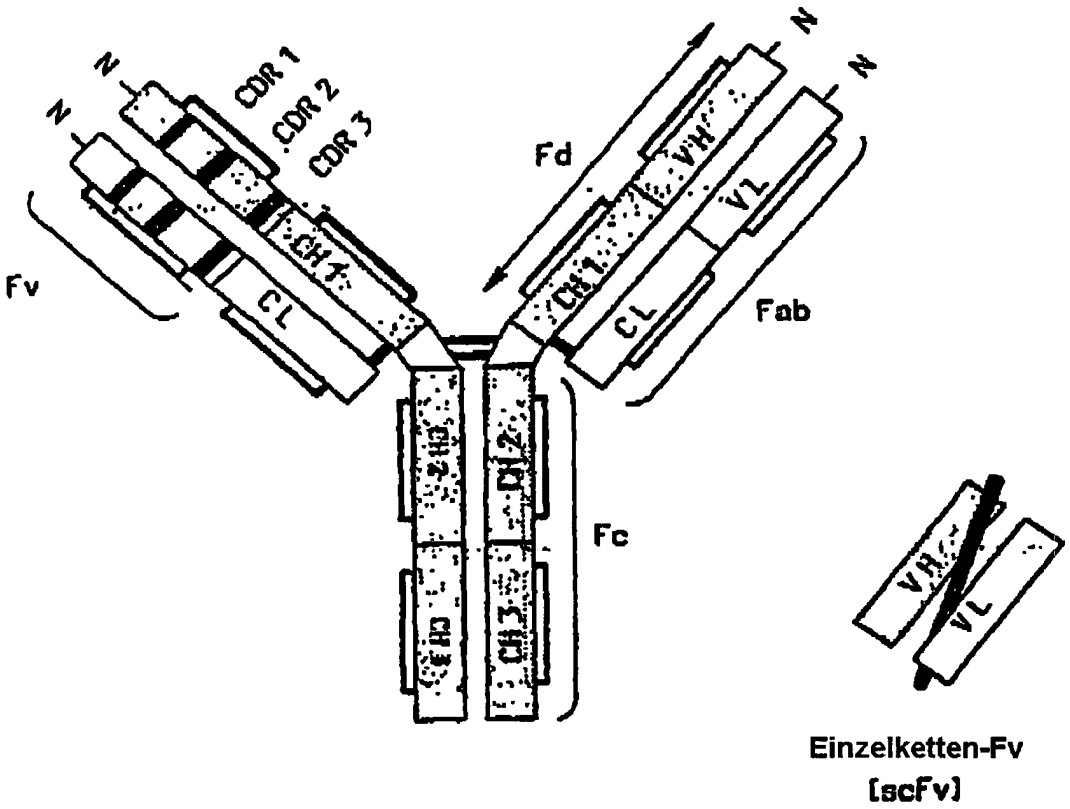
N
N
N
CDR 1
CDR 2
CDR 3
Fv
CH1
CL
Fd
VH
VL
CH1
CL
N
N
Fab
CH2
CH3
Fc
VH
VL
Einzelketten-Fv
[scFv]

Fig. 4

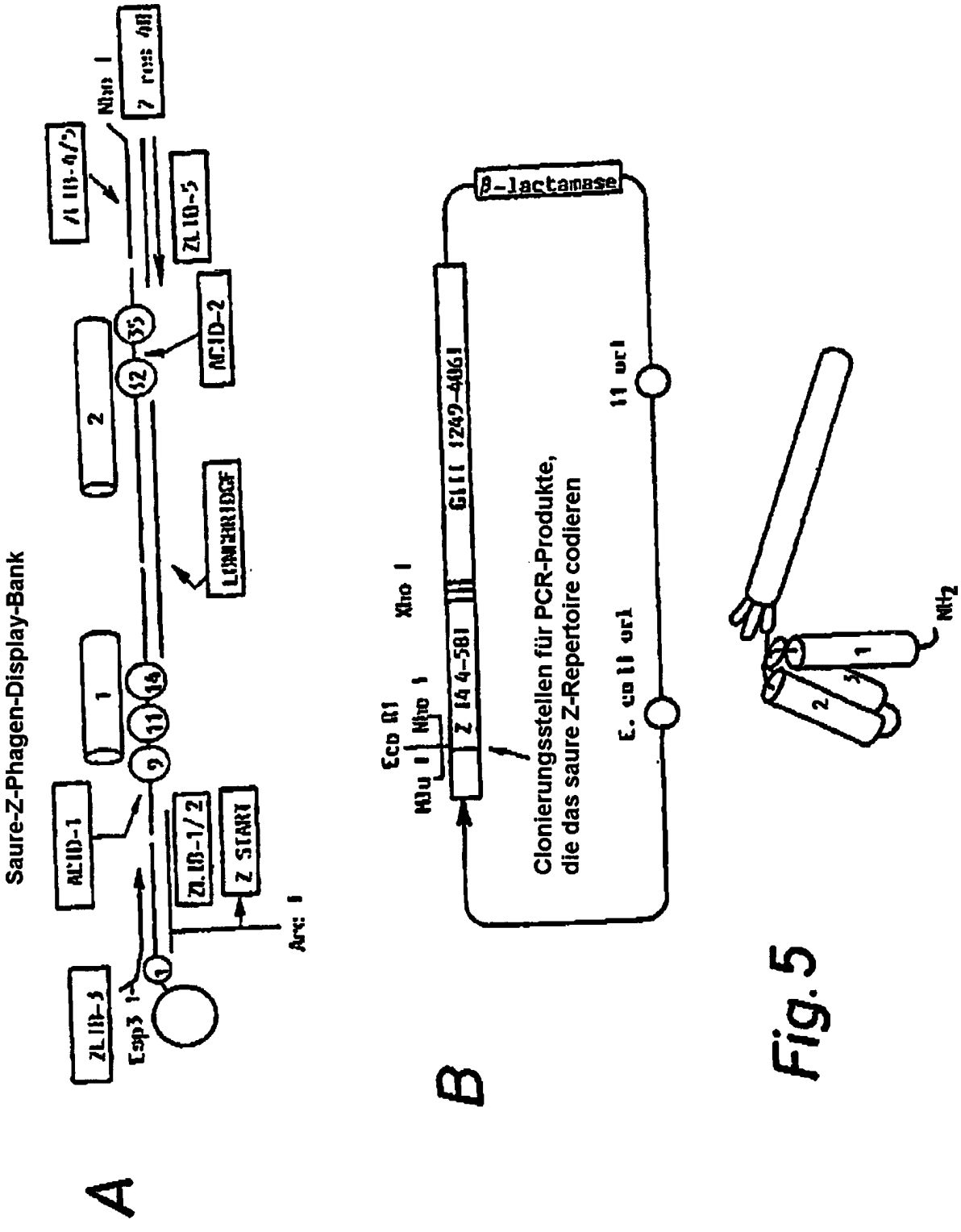
A
Saure-Z-Phagen-Display-Bank
ZLIB-3
Esp3 I
ACID-1
ZLIB-1/2
Z START
Arc I
1
2
9
11
14
12
35
ACID-2
ZLIB-5
Nho I
7 ros 48
B
β-lactamase
Z 14 4-581
Xho I
Eco RI
Nhu I
Nho I
Clonierungsstellen für PCR-Produkte,
die das saure Z-Repertoire codieren
E. coli ori
11 ori
NH2

Fig. 5

ZLIB-1	Biotin - 5' - GCG CAA CAC GAT GAA GCC GTA GAC AAC AAA TTC AA - 3'
ZLIB-2	5' - TTC TT GTT GAA TTT GTT GTC TAC GGC TTC ATC GTG TTG CGC - 3'
ZLIB-3	5' - CG CGC GCG TCT CAC GCG GCG CAA CAC GAT GAA GCC GTA - 3'
ZLIB-4	5' - A AGC CAA AGC GCT AAC TTG CTA GCA GGG - 3'
ZLIB-5	5' - CCC CCC TGC TAG CAA GTT AGC GCT TTG GCT TGG GTC ATC - 3'
ZLIB-6	5' - C GCG TGA ATT CTG CTA GCA GAA GCT AAA AAG CTA AAT GAT CGT CAG GCG CCG AAA AGC - 3'
ZLIB-7	5' - T CGA GCT TTT CGG CGC CTG AGC ATC ATT TAG CTT TTT AGC TTC TGC TAG CAG AAT TCA - 3'
LONG BRIDGE	5' - TTG TTC TTC GTT TAA GTT AGG TAA ATG TAA GAT CTC - 3'
ACID-1	5' - C AAA GAA G^{CA}_{AC} CAA G^{CA}_{AC} GCG TTC G^{CA}_{AC} GAG ATC TTA CAT TTA CCT A - 3'
ACID-2	5' - AC TTA AAC GAA GAA CAA G^{CA}_{AC} AAC GCC TTC ATC CAA AGT TTA G^{CA}_{AC} GAT GAC CC - 3'
DEGEN-2	5' - AC TTA AAC NN^{G}_{T} NN^{G}_{T} CAA NN^{G}_{T} NN^{G}_{T} GCC TTC ATC NN^{G}_{T} AGT TTA NN^{G}_{T} GAT GAC CC - 3'
DEGEN-1	5' - C AAA GAA NN^{G}_{T} NN^{G}_{T} NN^{G}_{T} GCG NN^{G}_{T} NN^{G}_{T} GAG ATC NN^{G}_{T} NN^{G}_{T} TTA CCT A - 3'
BRIDGE	5' - GTT TAA GTT AGG TAA - 3'

Fig. 6

DE 695 33 644 T2 2005.02.17

```
1                   9                  11                  14
GTA GAC AAC AAA TTC AAC AAA GAA GAC CAA GCA GCG TTC GAC NAG ATC TTA CAT TTA CCT AAC TTA AAC
GTA GAC AAC AAA TTC AAC AAA GAA GAC CAA GAC GCG TTC GAC GAG ATC TTA CAT TTA CCT AAC TTA AAC
Acc I

                  27                  35
GAA GAA CAA GAC AAC GCC TTC ATC CAA AGT TTA GCA GAT GAC CCA AGC CAA AGC GCT AAC TTG CTA GC
GAA GAA CAA GAA AAC GCC TTC ATC CAA AGT TTA GCA GAT GAC CCA AGC CAA AGC GCT AAC TTG CTA GC
                                                                              Nhe I
```

Fig. 7

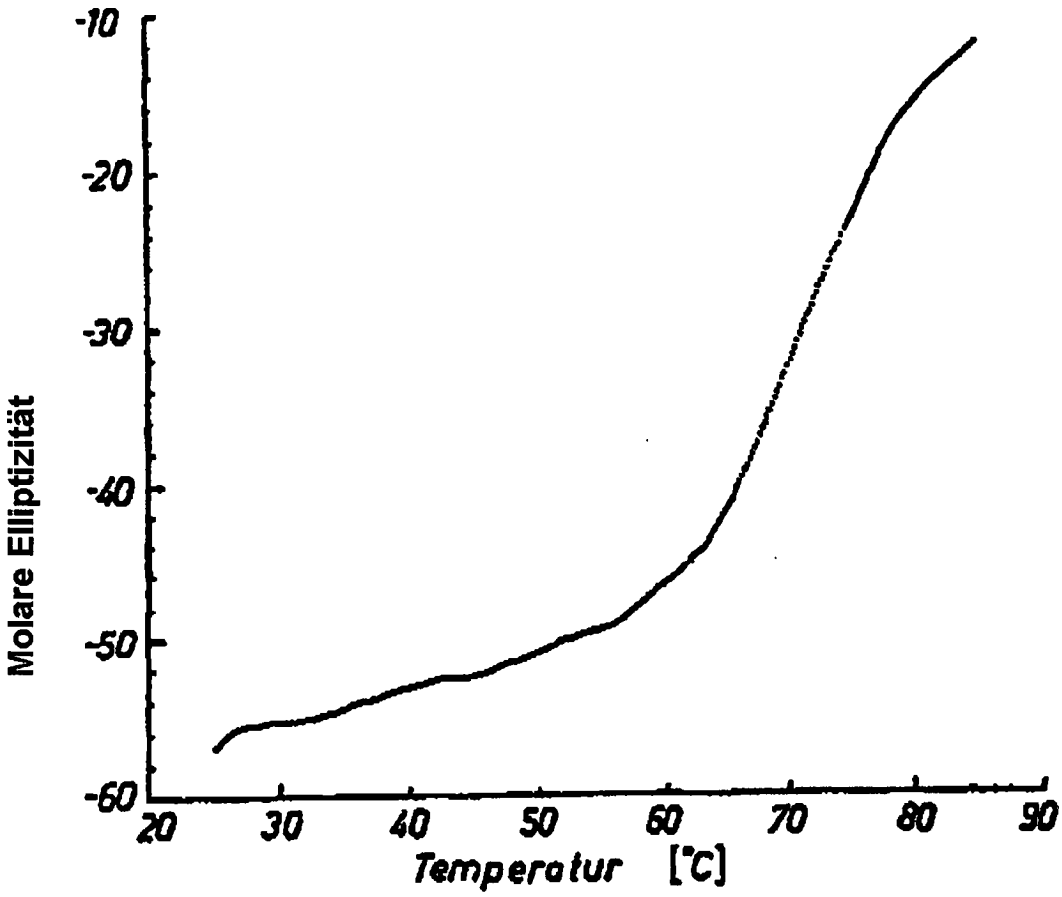
-10
-20
-30
-40
-50
-60
Molare Elliptizität
20
30
40
50
60
70
80
90
Temperatur [°C]

Fig. 8

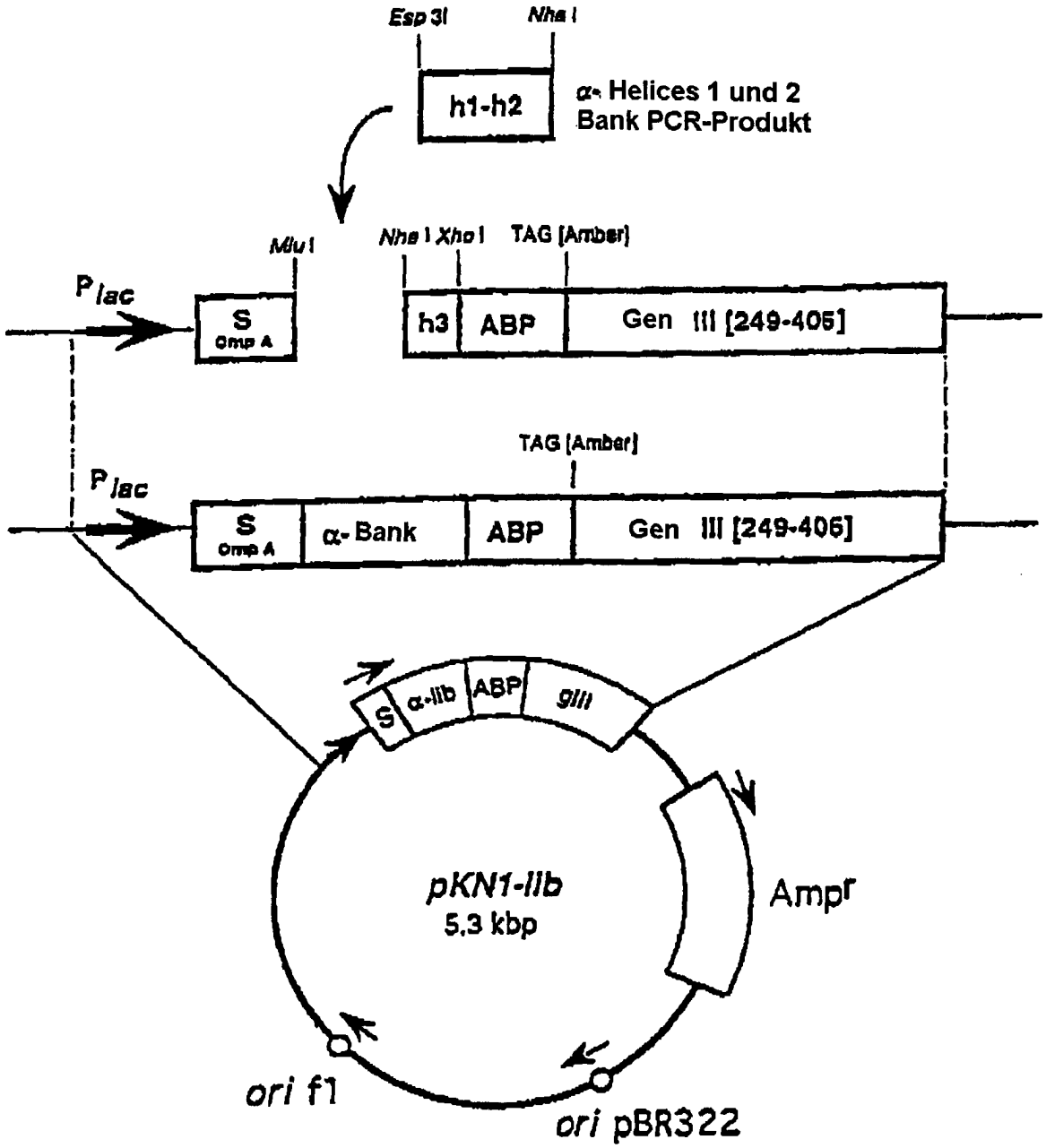
Esp 3I
Nhe I
h1-h2
α- Helices 1 und 2
Bank PCR-Produkt
Mlu I
Nhe I Xho I
TAG [Amber]
P lac
S
Omp A
h3
ABP
Gen III [249-405]
TAG [Amber]
P lac
S
Omp A
α- Bank
ABP
Gen III [249-406]
S
α-IIb
ABP
gIII
pKN1-IIb
5.3 kbp
Ampr
ori f1
ori pBR322

Fig. 9

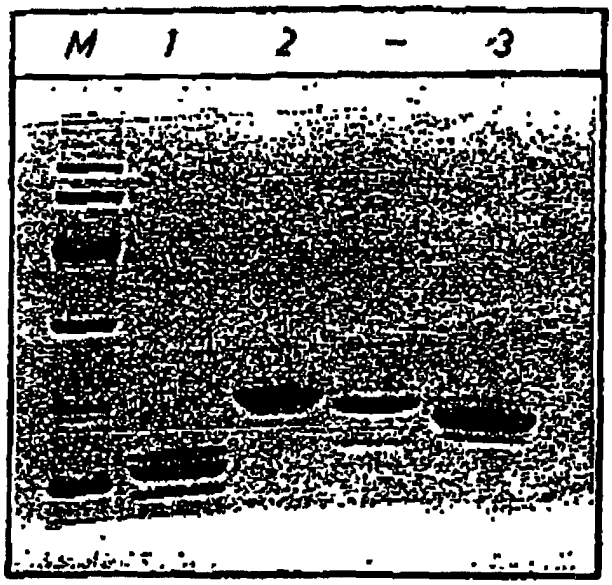

Fig. 10

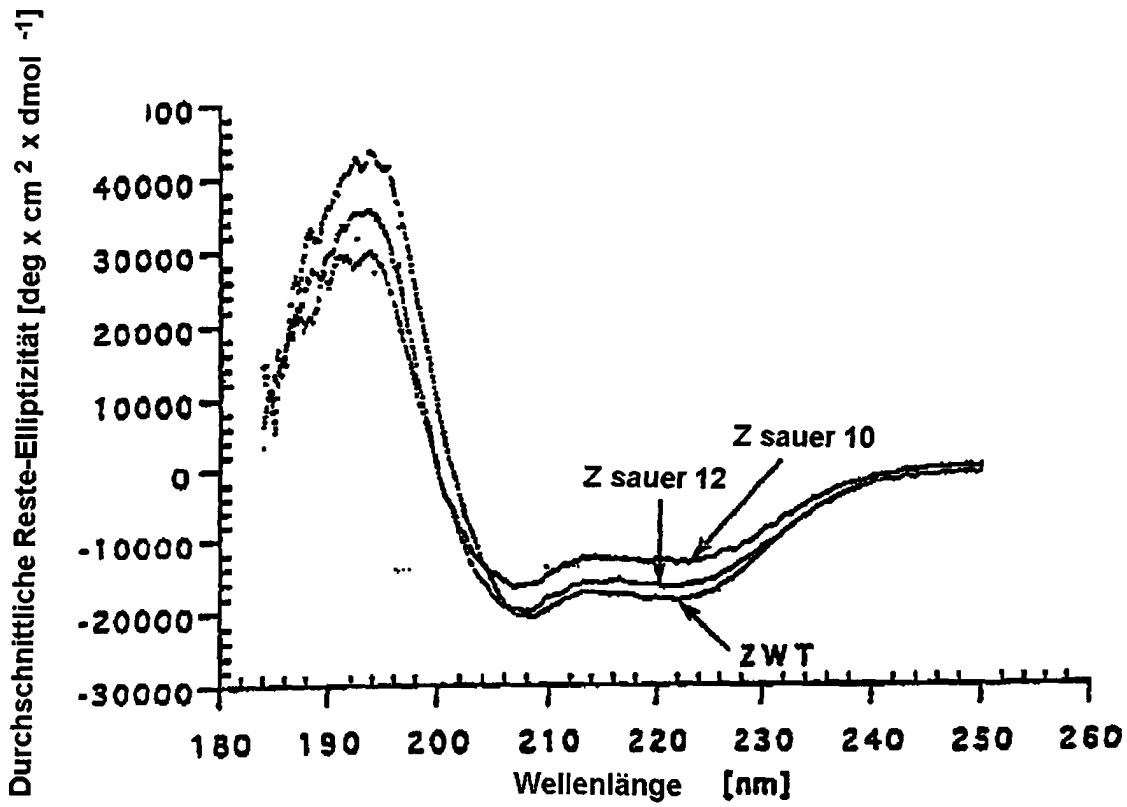
Durchschnittliche Reste-Elliptizität [deg x cm 2 x dmol -1]
100
40000
30000
20000
10000
0
-10000
-20000
-30000
180
190
200
210
220
230
240
250
260
Wellenlänge [nm]
Z sauer 10
Z sauer 12
ZWT

Fig. 11

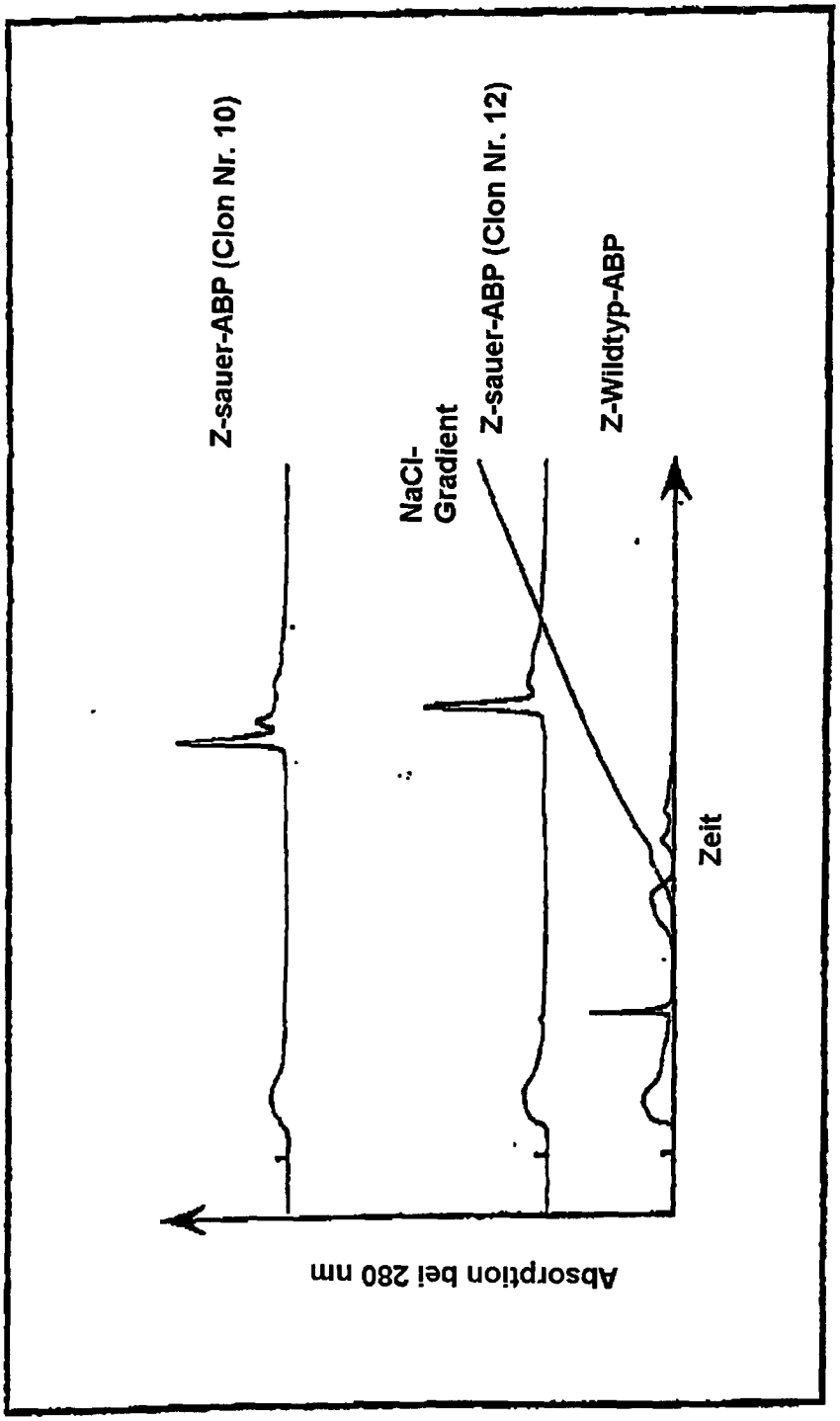
Z-sauer-ABP (Clon Nr. 10)
NaCl-Gradient
Z-sauer-ABP (Clon Nr. 12)
Z-Wildtyp-ABP
Zeit
Absorption bei 280 nm

Fig. 12

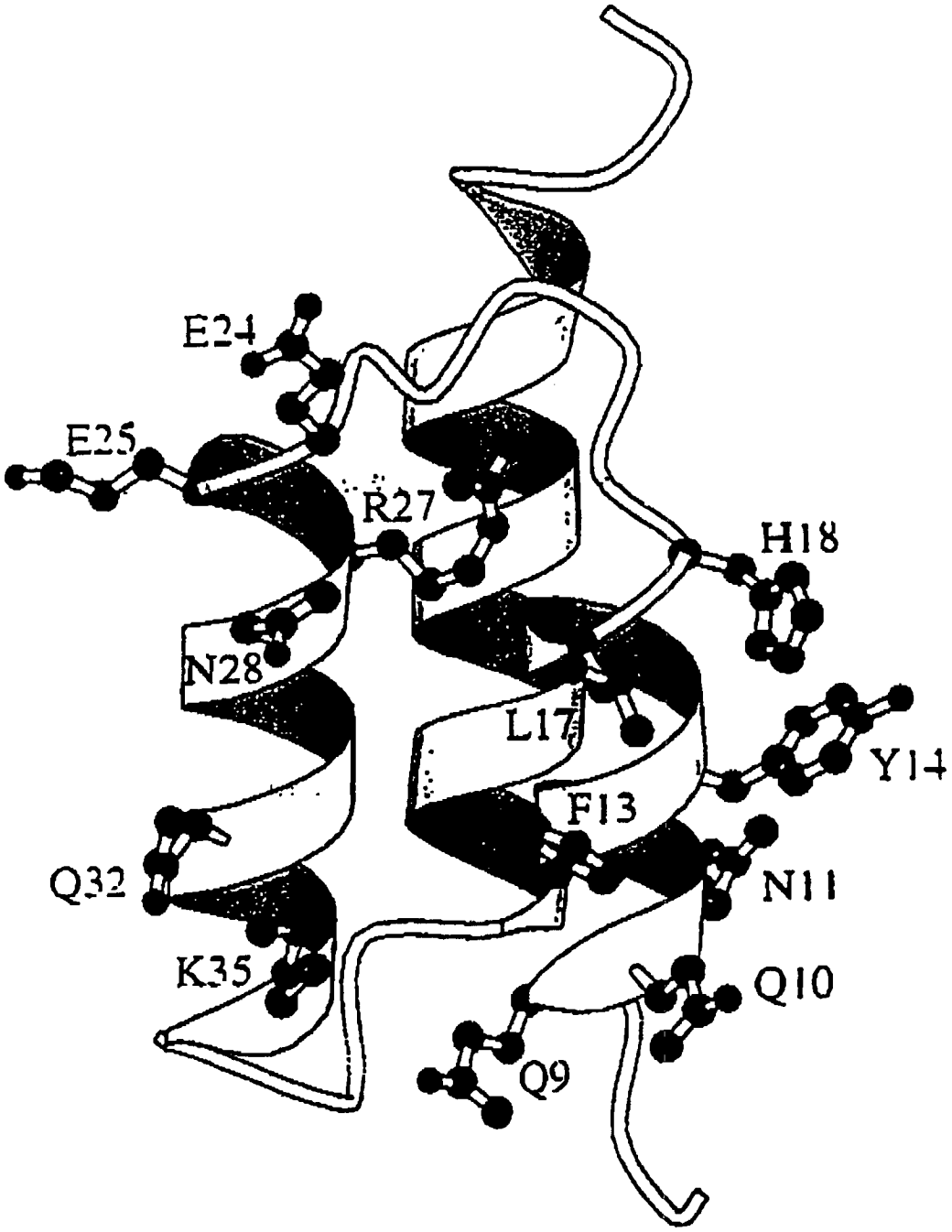

Fig. 13

```
                    10                  20                  30                  40        50
Z:  VDHKFNKE  QQN  A  FY  EI  LH  LPNLN  EE  Q  RN  AFI  Q  SL  K  DDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK
1:  --------  AGI  -  IS  --  WA  -----  CS  -  QM  ---  H  --  H  ----------------------
2:  --------  MTA  -  GL  --  WV  -----  RT  -  TM  ---  A  --  I  ----------------------
3:  --------  TVB  -  DS  --  TR  -----  RW  -  VE  ---  M  --  S  ----------------------
4:  --------  A-A  -  RP  --  VG  -----  DL  -  SP  ---  S  --  L  ----------------------
5:  --------  -MG  -  RR  --  VL  -----  NG  -  AR  ---  G  --  H  ----------------------
6:  --------  ESC  -  VQ  --  GE  -----  A-  -  GA  ---  F  --  Q  ----------------------
7:  --------  -AA  -  RR  --  HL  -----  VQ  -  MG  ---  I  --  R  ----------------------
8:  --------  AGR  -  L-  --  -D  -----  -N  -  QG  ---  N  --  -  ----------------------
9:  --------  MGI  -  QS  --  VY  -----  VR  -  GF  ---  S  --  L  ----------------------
10: --------  LB-  -  LF  --  -E  -----  KT  -  -F  ---  R  --  R  ----------------------
11: --------  VRY  -  RL  --  GP  -----  WT  -  PY  ---  W  --  D  ----------------------
12: --------  TWM  -  CQ  --  AV  -----  KT  -  HL  ---  M  --  S  ----------------------
13: --------  APF  -  GR  --  QR  -----  PM  -  -Q  ---  M  --  S  ----------------------
14: --------  PFD  -  -L  --  QF  -----  LN  -  MR  ---  R  --  G  ----------------------
15: --------  H-G  -  HD  --  PR  -----  AY  -  AI  ---  V  --  E  ----------------------
16: --------  KRI  -  GC  --  AC  -----  AR  -  SA  ---  L  --  V  ----------------------
17: --------  EMB  -  HE  --  BK  -----  KT  -  WG  ---  V  --  P  ----------------------
18: --------  -BD  -  PS  --  D-  -----  FL  -  CG  ---  T  --  A  ----------------------
19: --------  TLR  -  QT  --  ES  -----  MG  -  ML  ---  V  --  S  ----------------------
20: --------  G-A  -  SA  --  GW  -----  WC  -  DB  ---  A  --  T  ----------------------
21: --------  PYV  -  Q-  --  MV  -----  KL  -  -G  ---  A  --  R  ----------------------
22: --------  CAV  -  VL  --  VQ  -----  AL  -  AM  ---  N  --  W  ----------------------
23: --------  BRI  -  SL  --  YK  -----  QC  -  A-  ---  G  --  H  ----------------------
24: --------  LTW  -  TA  --  RD  -----  QV  -  DS  ---  P  --  V  ----------------------
25: --------  KAV  -  -A  --  F-  -----  LK  -  VF  ---  R  --  N  ----------------------
26: --------  SKP  -  -R  --  RP  -----  QL  -  LF  ---  W  --  A  ----------------------
27: --------  AHR  -  RN  --  GV  -----  RK  -  -E  ---  G  --  A  ----------------------
28: --------  BRG  -  DT  --  IV  -----  SI  -  LR  ---  G  --  S  ----------------------
29: --------  TVL  -  VQ  --  RV  -----  GL  -  KL  ---  W  --  L  ----------------------
30: --------  LGV  -  LN  --  AI  -----  CC  -  TV  ---  D  --  F  ----------------------
31: --------  BSL  -  LE  --  PN  -----  QA  -  SP  ---  L  --  V  ----------------------
```

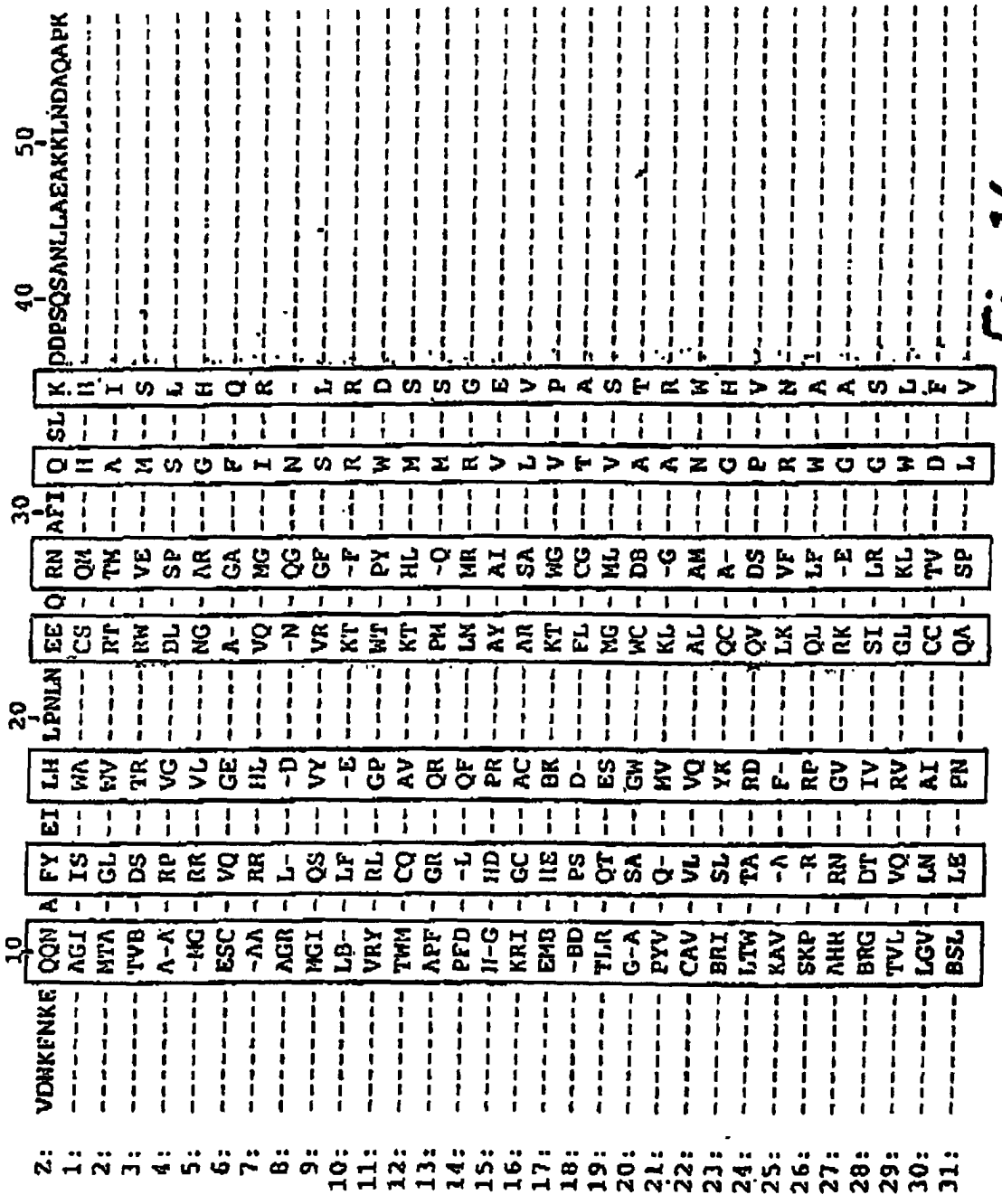

Fig. 14

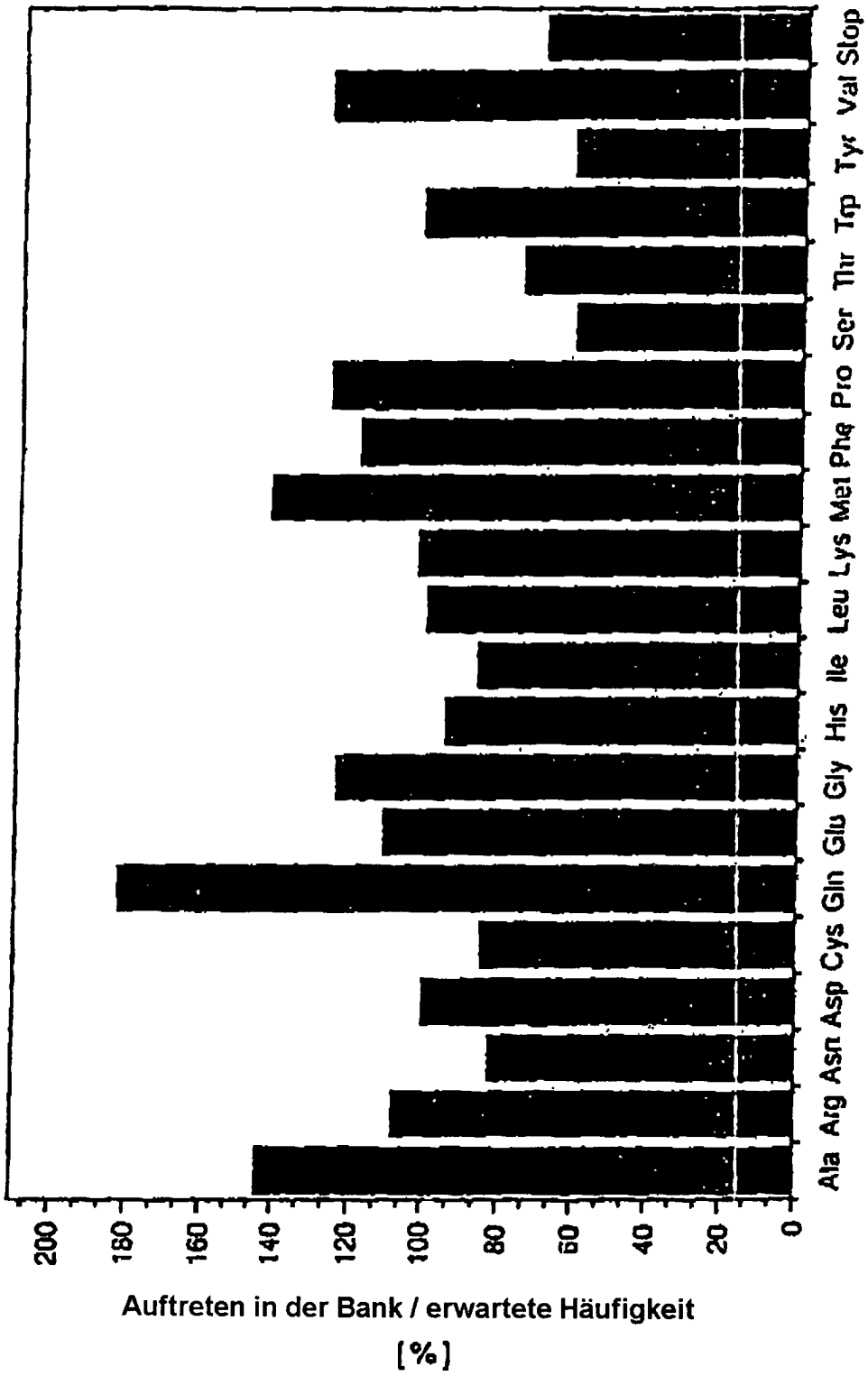
Ala Arg Asn Asp Cys Gln Glu Gly His Ile Leu Lys Met Phe Pro Ser Thr Trp Tyr Val Stop
Aminosäure
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200
Auftreten in der Bank / erwartete Häufigkeit
[%]

Fig. 15

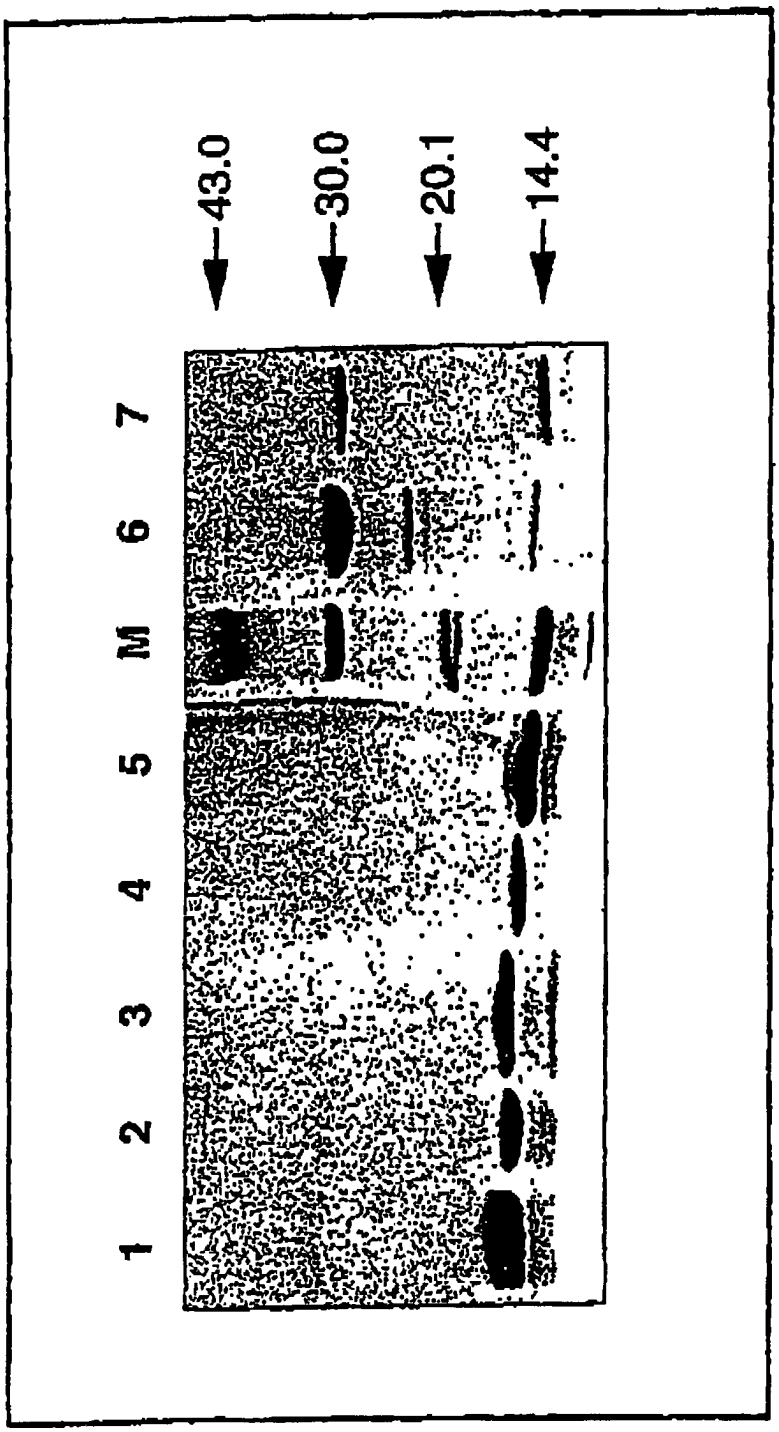

Fig. 16

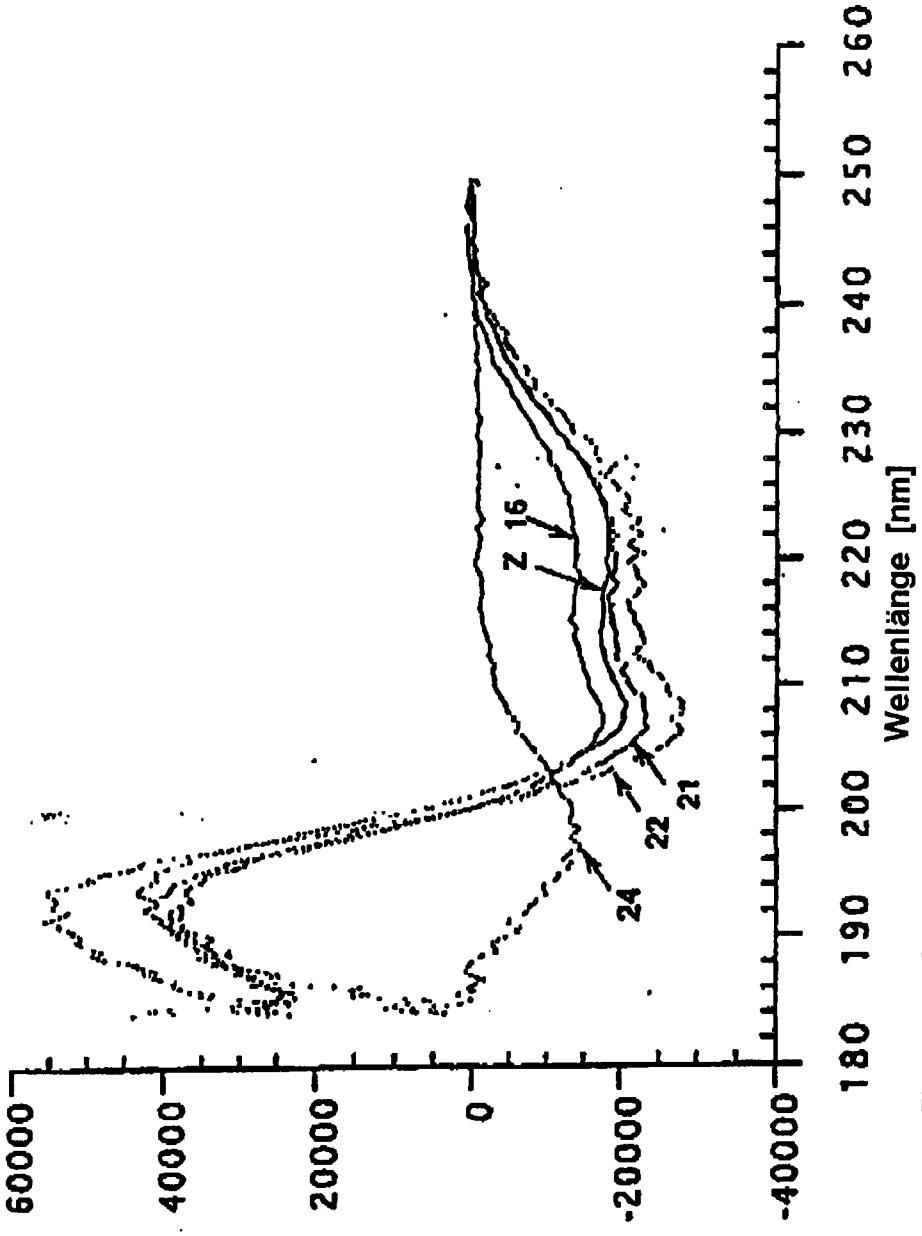
60000
40000
20000
0
-20000
-40000
180
190
200
210
220
230
240
250
260
Wellenlänge [nm]
16
21
22
24
Durchschnittl. Reste-Elliptizität [deg x cm² x dmol⁻¹]

Fig. 17

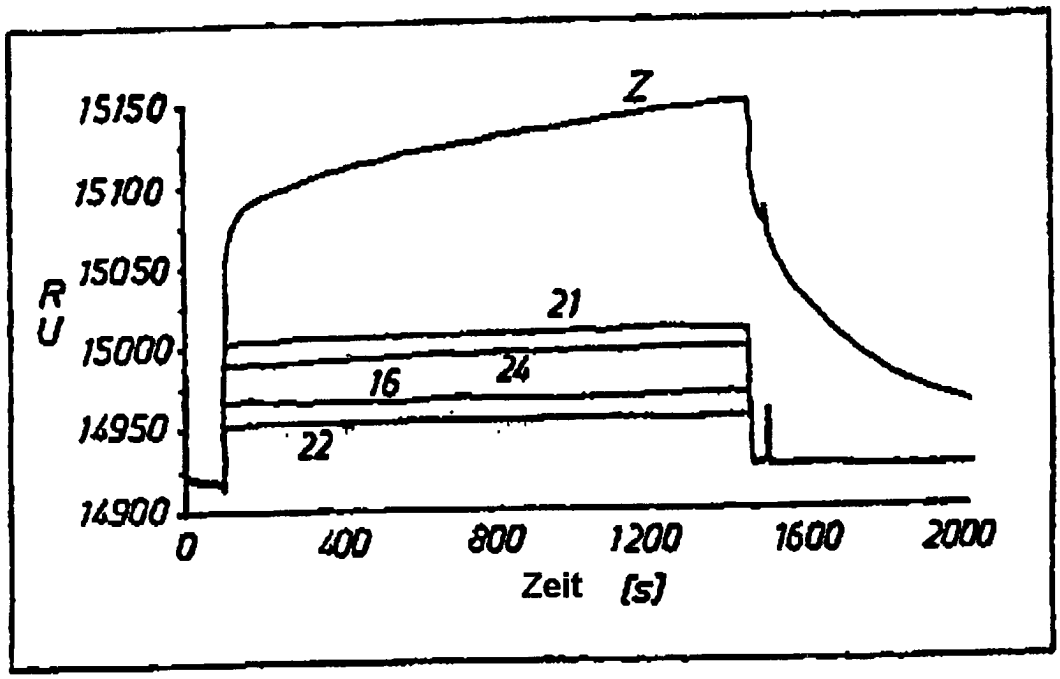
15150
15100
15050
15000
14950
14900
RU
Z
21
16
24
22
0
400
800
1200
1600
2000
Zeit (s)

Fig. 18