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

(10) **DE 692 33 367 T2** 2005.05.25

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 580 737 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **692 33 367.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US92/03091**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **92 910 558.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 92/018619**
(86) PCT-Anmeldetag: **10.04.1992**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **29.10.1992**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.02.1994**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **16.06.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.05.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 7/01**
C12N 15/10, C12N 15/62, C12N 15/70, C07K 14/705, C07K 16/00, G01N 33/68

(30) Unionspriorität:

683602	**10.04.1991**	**US**
826623	**27.01.1992**	**US**

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

(73) Patentinhaber:
The Scripps Research Institute, La Jolla, Calif., US

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

(72) Erfinder:
KANG, Angray, La Jolla, US; BARBAS, Carlos, La Jolla, US; LERNER, A., Richard, La Jolla, US

(54) Bezeichnung: **BIBLIOTHEKEN HETERODIMERER REZEPTOREN MITTELS PHAGEMIDEN**

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

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Klonierung von Vektoren und auf Verfahren zur Herstellung einer Bibliothek aus DNA-Molekülen, die in der Lage sind, ein Fusionspolypeptid auf der Oberfläche eines Partikels eines filamentösen Phagen zu exprimieren.

Hintergrund

[0002] Filamentöse Bakteriophagen stellen eine Gruppe miteinander verwandter Viren dar, die Bakterien infizieren. Sie werden filamentös genannt, da sie lange und dünne Partikel darstellen, die von einer verlängerten Kapsel umfasst werden, welche die Desoxyribonukleinsäure (DNA) einschließt, die das Genom des Bakteriophagen bildet. Der filamentöse Bakteriophage F pili (Ff-Phage) infiziert lediglich gram-negative Bakterien durch spezifische Adsorption an der Spitze von F pili, und schließt fd, f1 und M13 mit ein.

[0003] Die reife Kapsel eines Ff-Phagen umfasst eine Schicht von fünf von Phagen kodierten Genprodukten: cpVIII, das wesentliche Beschichtungsproteinprodukt des Gens VIII, welches die Hauptmasse der Kapsel bildet; und vier kleinere Beschichtungsproteine, cpIII und cpIV an einem Ende der Kapsel und cpVII und cpIX am anderen Ende der Kapsel. Die Länge der Kapsel wird durch 2500 bis 3000 Kopien von cpVIII in einer geordneten Helixanordnung gebildet, die die charakteristische Filamentstruktur bildet. Am Ende der Kapsel sind etwa fünf Kopien von jedem der kleineren Beschichtungsproteine vorhanden. Das vom Gen III-kodierte Protein (cpIII) ist typischerweise in 4 bis 6 Kopien an einem Ende der Kapsel vorhanden und dient als Rezeptor zur Bindung des Phagen an seinen bakteriellen Wirt in der Startphase der Infektion. Für einen genauen Überblick über die Ff-Phagentruktur siehe Rasched et al., Microbiol. Rev., 50: 401–427 (1986); und Model et al., in "The Bacteriophages, Volume 2", R. Calendar, Ed., Plenum Press, S. 375–456 (1988).

[0004] Die Anordnung eines Ff-Phagenpartikels schließt hochkomplexe Mechanismen mit ein. Kein Phagenpartikel wird innerhalb einer Wirtszelle angeordnet; sie werden eher während der Extrusion des Virengenoms durch die Membran der Wirtszelle angeordnet. Vor der Extrusion wird das große Beschichtungsprotein cpVIII und das kleinere Beschichtungsprotein cpIII synthetisiert und zur Membran der Wirtszelle transportiert. Sowohl cpVIII als auch cpIII werden in der Membran der Wirtszelle vor ihrem Einbau in den reifen Partikel verankert. Weiterhin wird das virale Genom erzeugt und mit cpV beschichtet. Während des Extrusionsverfahrens wird die mit cpV beschichtete genomische DNA von der cpV-Beschichtung abgelöst und gleichzeitig mit den reifen Beschichtungsproteinen erneut beschichtet. Der Mechanismus der Anordnung, der den Transfer dieser Proteine von der Membran zum Partikel kontrolliert, ist gegenwärtig nicht bekannt.

[0005] Sowohl cpIII- als auch cpVIII-Proteine schließen zwei Domänen mit ein, die Signale für die Anordnung des reifen Phagenpartikels bereitstellen. Die erste Domäne ist ein Sekretionssignal, das das neu synthetisierte Protein zur Membran der Wirtszelle leitet. Das Sekretionssignal ist am Aminoterminus des Polypeptids lokalisiert und führt das Polypeptid mindestens zur Zellmembran. Die zweite Domäne ist eine Membran-Ankerdomäne, welche Signale für die Anlagerung mit der Membran der Wirtszelle und für die Anlagerung mit dem Phagenpartikel während der Anordnung bereitstellt. Dieses zweite Signal für sowohl cpVIII wie auch cpIII umfasst mindestens eine hydrophobe Region, um die Membran zu umspannen.

[0006] cpVIII wurde extensiv als Membranmodellprotein untersucht, da es sich in zweilagige Peptidschichten, wie beispielsweise der Zellmembran, in einer asymmetrischen Orientierung mit dem sauren Aminoterminus in Richtung Außenseite und dem basischen Carboxyterminus in Richtung der Innenseite der Membran integrieren kann. Das reife Protein besitzt eine Länge von etwa 50 Aminosäureresten, von denen 11 Reste den Carboxyterminus ausmachen, 19 Reste die hydrophobe Transmembranregion ausmachen, und die verbleibenden Reste den Aminoterminus umfassen. Es wurden beachtliche Recherchen in Bezug auf die Region des Sekretionssignals von cpVIII durchgeführt, um die Untersuchung der Membranproteinsynthese und die Zielrichtung auf Membrane voranzubringen. Gleichwohl ist über die Änderungen, die in der Struktur der cpVIII-Membran-Ankerregion toleriert werden, wenig bekannt, was eine Anordnung von Phagenpartikeln erlauben würde.

[0007] Die Manipulation der Sequenz von cpIII zeigt, dass der C-terminate, 23 Aminosäurereste lange Bereich der hydrophoben Aminosäuren, der üblicherweise für die Funktion des Membran-Ankerproteins verantwortlich ist, in einer Vielzahl von Arten verändert werden kann und die Fähigkeit behält, sich an Membrane anzulagern. Gleichwohl verloren diese Anker-modifizierten cpIII-Proteine ihre Fähigkeit, genetisch Mutanten des Gens III zu komplementieren, was andeutet, dass die Erfordernisse eines Membran-Ankers für die funktionelle

Anordnung noch nicht aufgeklärt waren.

[0008] Es wurden Ff-Phagen-basierte Expressionsvektoren beschrieben, in welchen die gesamte Sequenz der cpIII-Aminosäurereste durch Insertion von kurzen Polypeptid "Epitopen" modifiziert wurde [Parmely et al., Gene, 73: 305–318 (1988); und Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378–6382 (1990)] oder durch eine Sequenz von Aminosäureresten, die die Domäne eines einzelkettigen Antikörpers definieren. McCafferty et al., Science, 348: 552–554 (1990). Diese Hybridproteine wurden synthetisiert und auf Phagenpartikeln in einer Größenordnung von etwa 5 Kopien pro Partikel angeordnet, eine Dichte, bei der normalerweise cpIII für gewöhnlich gefunden wird. Gleichwohl schließen diese exprimierten Fusionsproteine die gesamte Sequenz der cpIII Aminosäurereste mit ein und legt keine solchen Fusionsproteine nahe, die lediglich die carboxyterminale Membran-Ankerdomäne von cpIII verwenden.

[0009] Es wurde weiterhin kein Expressionssystem beschrieben, in welchem ein Phagenbeschichtungsprotein konstruiert wurde, um die Anordnung eines heterodimeren Moleküls zu ermöglichen, welches funktional ist und in der Lage ist, in die Beschichtung eines Phagenpartikels eingebaut zu werden.

Kurze Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Eine neue Oberflächen-Integrationstechnologie wurde zur Expression eines heterodimeren rekombinanten Genproduktes auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen entdeckt, der das rekombinante Gen enthält. Die Erfindung verwendet eine Membran-Ankerdomäne eines Beschichtungsproteins eines filamentösen Phagen als ein Mittel zur Verknüpfung des Genproduktes und des Gens während der Anordnungsphase der Replikation des filamentösen Phagen.

[0011] Dies bedeutet, dass sich während der Replikation des filamentösen Phagen Beschichtungsproteine in einer Matrix anordnen, welche das Phagengenom einkapselt. Es wurde nun entdeckt, dass (1) die Anordnung des Phagen nicht unterbrochen wird, wenn rekombinante Beschichtungsproteine eines filamentösen Phagen vorhanden sind, (2) rekombinante Beschichtungsproteine des filamentösen Phagen in die Anordnungsmatrix integriert werden können und (3) die Integration in die Matrix so gesteuert werden kann, dass sie in eine von der Oberfläche zugänglichen Orientierung stattfindet.

[0012] Die vorliegende Erfindung kann vorteilhafterweise auf die Herstellung eines heterodimeren Rezeptors einer vorbestimmten Spezifizität angewendet werden, z.B. kann sie zur Herstellung von Antikörpern, T-Zellrezeptoren und Ähnlichem verwendet werden, was einen vorgewählten Liganden bindet.

[0013] Die vorliegende Erfindung ermöglicht daher die Verknüpfung der Funktionen der Erkennung des heterodimeren Rezeptors und der Replikation des filamentösen Phagen in einem Verfahren zur Isolierung eines heterodimeren Rezeptors und des Gens, das diesen Rezeptor kodiert. Das Verfahren erzeugt einen filamentösen Phagen, umfassend eine Matrix aus Gen VIII-kodierten Proteinen, die ein rekombinantes Genom einkapseln. Das rekombinante Genom enthält Gene, die die heterodimeren Rezeptorpolypeptide kodieren. Der heterodimere Rezeptor wird an der Oberfläche in die einkapselnde Matrix über die Membran-Ankerdomäne der Beschichtungsproteine eines filamentösen Phagen integriert, welche mittels eines Peptides fusioniert wird, das während der Translation an eines der heterodimeren Rezeptorpolypeptide gebunden wurde. Die heterodimeren Rezeptorpolypeptide und die Gene, welche die Polypeptide kodieren, werden während der Anordnungsphase des Phagenreplikationszyklus miteinander physikalisch verknüpft. Die spezifische Bindung des Rezeptor-beschichteten Phagen auf einem festen Träger stellt vorteilhafterweise ein Mittel zur Isolierung eines rekombinanten Genoms zur Verfügung, welches einen gewünschten heterodimeren Rezeptor aus einer vielfältigen Bibliothek aus rekombinanten Genomen bereitstellt.

[0014] In einer Ausführungsform beschäftigt sich die vorliegende Erfindung eingehend mit einem Antikörpermolekül, das Polypeptide der schweren und der leichten Kette umfasst, wobei das Polypeptid der schweren Kette eine V_H-Domäne umfasst, die durch eine aminoterminale prokaryotische Sekretionssignaldomäne flankiert wird und durch eine carboxyterminale Membran-Ankerdomäne eines filamentösen Phagen, wobei das genannte Polypeptid mit der leichten Kette eine V_L-Domäne umfasst, die an eine aminoterminale prokaryotische Sekretionssignaldomäne fusioniert ist.

[0015] In einer anderen Ausführungsform beschäftigt sich die vorliegende Erfindung eingehend mit einem Vektor zur Expression eines Fusionspolypeptids, wobei der genannte Vektor stromaufwärts gelegene und stromabwärts gelegene translatierbare DNA-Sequenzen umfasst, die über eine Sequenz von Nukleotiden operativ miteinander verknüpft sind, welche für die direkte Ligation einer Insert-DNA angepasst wurden, wobei die

genannte stromaufwärts gelegene DNA-Sequenz ein prokaryotisches Sekretionssignal kodiert, und die genannte stromabwärts gelegene Sequenz ein Ankerprotein eines filamentösen Phagen kodiert, wobei die genannten translatierbaren DNA-Sequenzen operativ miteinander zu einem Set an DNA-Expressionssignalen zur Expression der genannten translatierbaren DNA-Sequenzen als Anteile der genannten Fusionspolypeptide verknüpft sind.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0016] Die Figuren bilden einen Teil dieser Beschreibung:

[0017] Fig. 1 stellt ein schematisches Diagramm des Immunglobulinmoleküls dar, welches die grundlegenden strukturellen Merkmale zeigt. Der eingekreiste Bereich auf der schweren Kette stellt die variable Region (V_H) dar, ein Polypeptid, welches einen biologisch aktiven (Liganden-bindenden) Anteil dieser Region enthält, und ein Gen, welches für dieses Polypeptid kodiert, welche durch ein Verfahren der vorliegenden Erfindung hergestellt werden.

[0018] Fig. 2A ist eine diagrammartige Skizze einer schweren Kette (H) von humanem IgG (IgG1-Unterklasse). Die Nummerierung verläuft vom N-Terminus auf der linken Seite zum C-Terminus auf der rechten Seite. Zu beachten ist die Anwesenheit von vier Domänen, wobei jede eine zwischen den Ketten gelegene Disulfidbindung (S–S) enthält, die etwa 60 Aminosäurereste umspannt. Das Symbol CHO steht für Kohlenwasserstoff. Die V-Region der schweren (H) Kette (V_H) ähnelt V_L darin, dass sie drei hypervariable CDR besitzt (nicht gezeigt).

[0019] Fig. 2B ist eine diagrammartige Skizze einer humanen leichten (Kappa) Kette (Feld 1). Die Nummerierung verläuft vom N-Terminus auf der linken Seite zum C-Terminus auf der rechten Seite. Zu beachten ist die zwischen den Ketten gelegene Disulfidbindung (S–S), die etwa die gleiche Anzahl an Aminosäureresten in den V_L- und C_L-Domänen umspannt. Feld 2 zeigt die Orte der komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR, complementaritydetermining regions) in der V_L-Domäne. Die Segmente außerhalb der CDR bilden Gerüstsegmente (FR, framework segments).

[0020] Fig. 3 beschreibt die Sequenz der in Lambda Zap insertierten doppelsträngigen synthetischen DNA zur Herstellung eines Lambda Hc2-Expressionsvektors. Die Herstellung des doppelsträngigen synthetischen DNA-Inserts wird in Beispiel 1a (ii) beschrieben. Die verschiedenen Merkmale, die für diesen Vektor erforderlich sind, um die V_H-kodierenden DNA-Homologe zu exprimieren, schließen die Shine-Dalgarno-Ribosomenbindungsstelle mit ein, eine Leitsequenz zur Übermittlung des exprimierten Proteins in das Periplasma, wie durch Mouva et al., J. Biol. Chem., 255: 27, 1980, beschrieben, sowie verschiedene Restriktionsenzymschnittstellen, die verwendet werden, um die V_H-Homologen mit dem Expressionsvektor operativ miteinander zu verknüpfen. Die Sequenz des V_H-Expressionsvektors enthält ebenfalls eine kurze Nukleinsäuresequenz, welche Aminosäuren kodiert, die typischerweise in variablen Regionen der schweren Kette (V_H-Rückgrat) gefunden werden. Dieses V_H-Rückgrat befindet sich genau stromaufwärts und in der richtigen Leserichtung wie die V_H-DNA-Homologe, welche operativ mit den Xho I- und Spe I-Klonierungsschnittstellen verknüpft sind. Die Sequenzen des oberen und des unteren Stranges des doppelsträngigen synthetischen DNA-Inserts werden als SEQ ID NO 1 bzw. SEQ ID NO 2 aufgelistet. Das synthetische DNA-Insert wird gerichtet in Lambda Zap II ligiert, welches mit den Restriktionsenzymen Not I und Xho I verdaut wurde, um den Lambda Hc2-Expressionsvektor zu bilden.

[0021] Fig. 4 beschreibt die Hauptmerkmale des bakteriellen Expressionsvektors Lambda Hc2(V_H-Expressionsvektor). Die synthetische DNA-Sequenz aus Fig. 3 wird an der Spitze zusammen mit dem Promotor der T_3-Polymerase aus Lambda Zap II gezeigt. Die Orientierung des Inserts in Lambda Zap II wird gezeigt. Die V_H-DNA-Homologen werden in die Xho I- und Spe I-Klonierungsschnittstellen insertiert. Das Lesen während der Transkription erzeugt das Dekapeptidepitop (tag), welches sich direkt 3' der Klonierungsstelle befindet.

[0022] Fig. 5 beschreibt die Sequenz der doppelsträngigen synthetischen DNA, welche in Lambda Zap insertiert wurde, um einen Lambda Lc2-Expressionsvektor zu erzeugen. Die verschiedenen Merkmale, die für diesen Vektor erforderlich sind, um die V_L-kodierenden DNA-Homologen zu exprimieren, werden in Fig. 3 beschrieben. Die V_L-kodierenden DNA-Homologen werden in mit der Lc2-Sequenz an den Sac I- und Xho I-Restriktionsschnittstellen operativ verknüpft. Die Sequenzen des oberen und des unteren Stranges des doppelsträngigen synthetischen DNA-Inserts werden als SEQ ID NO 3 bzw. als SEQ ID NO 4 aufgelistet. Das synthetische DNA-Insert wird gerichtet in Lambda Zap II ligiert, welches mit den Restriktionsenzymen Zap I und Not I verdaut wurde, um den Lambda Lc2-Expressionsvektor zu bilden.

[0023] Fig. 6 beschreibt die wesentlichen Merkmale des bakteriellen Expressionsvektors Lc2(V_L-Expressionsvektor). Die synthetische DNA-Sequenz aus Fig. 5 wird an der Spitze zusammen mit dem Promotor der T_3-Polymerase aus Lambda Zap II gezeigt. Die Orientierung des Inserts in Lambda Zap II wird gezeigt. Die V_L-DNA-Homologen werden in die Sac I- und Xho I-Klonierungsstellen insertiert.

[0024] Fig. 7 beschreibt den dicistronischen Expressionsvektor pComb in der Form eines Phagemid-Expressionsvektors. Um pComb herzustellen, werden Phagemiden zuerst aus den Expressionsvektoren Lambda Hc2 und Lambda Lc2 unter Verwendung eines in-vivo-Ausschneidungsprotokolls gemäß den Instruktionen des Herstellers ausgeschnitten (Stratagene, La Jolla, Kalifornien). Der pComb-Expressionsvektor wird aus Lambda Hc2 und Lambda Lc2 hergestellt, welche die V_H-kodierenden oder V_L-kodierenden DNA-Homologe nicht enthalten. Das in-vivo-Ausschneidungsprotokoll bringt das klonierte Insert aus den Lambda Hc2- und Lc2-Vektoren in ein Phagemidvektor. Die erhaltenen Phagemiden enthalten die gleichen Nukleotidsequenzen für die Klonierung und zur Expression von einem Antikörperfragment wie die ursprünglichen Vektoren. Die Phagemidexpressionsvektoren von Hc2 und Lc2 werden getrennt voneinander einem Restriktionsverdau mit Sca I und EcoR I unterzogen. Die linearisierten Phagemiden werden in die kohäsiven Sca I- und EcoR I-Enden ligiert, um den dicistronischen (kombinatorischen) Vektor pComb zu bilden.

[0025] Fig. 8 beschreibt ein schematisches Diagramm des Aufbaus des pCBAK-Phagemidvektors, den Weg zur Anordnung von Fab und den Einbau in die Phagenbeschichtung. Der Vektor trägt das Chloramphenicolacetyltransferase (CAT)-Markergen zusätzlich zu den Sequenzen der Nukleotidreste, die das Fd-cpVIII-Fusionspolypeptid und die kappa-Kette kodieren. Der Replikationsursprung des F1-Phagen erleichtert die Erzeugung eines einzelsträngigen Phagemids. Die mittels Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG) induzierte Expression einer dicistronischen Nachricht, die die Fd-cpVIII-Fusion (V_H, C_{H1}, cpVIII) und die leichte Kette (V_L, C_L) kodiert, führt zur Bildung von schweren und leichten Ketten. Jede Kette wird mittels der pelB-Targetsequenz zum periplasmischen Spalt übermittelt, welche im Anschluss gespalten wird. Die schwere Kette wird in der Membran durch die cpVIII-Fusion verankert, während die leichte Kette in das Periplasma sekretiert wird. Die schwere Kette sammelt sich in der Anwesenheit der leichten Kette, um Fab-Moleküle zu bilden. Die Fabs werden in Phagenpartikel über cpVIII eingebaut (schwarze Punkte).

[0026] Fig. 9 beschreibt die elektronenmikroskopische Lokalisierung von 5–7 nm großen kolloidalen Goldpartikeln, die mit NPN-BSA-Konjugat entlang der Oberfläche des filamentösen Phagen beschichtet wurden, und sowie die eines Phagen, der einer bakteriellen Zelle entstammt. Feld Fig. 9A zeigt einen filamentösen Phagen, der aus der Oberfläche der bakteriellen Zelle hervorkommt, die spezifisch mit den kolloidalen Goldpartikeln markiert sind, die mit dem BSA-NPN-Antigen beschichtet sind. Feld Fig. 9B zeigt einen Anteil eines reifen filamentösen Phagen, bei dem die Markierung von Antigenbindungsstellen der Länge nach auftritt.

[0027] Fig. 10 beschreibt die Ergebnisse eines zweiseitigen ELISA zur Festellung der Anwesenheit und der Funktion von Fab-Antikörpern, die sich an der Oberfläche der Bakteriophagenpartikel wie in Beispiel 4B angelagert haben. Zur Expression von Fab-Antikörper auf Phagenoberflächen werden XL1-Blue-Zellen mit dem Phagemidexpressionsvektor pCBAK8-2b transformiert. Das Induktionsmittel Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG) wurde der bakteriellen Suspension in einer Endkonzentration von 1 mM für eine Stunde beigemischt. Anschließend wurden der bakteriellen Suspension Helferphagen zugegeben, um die Erzeugung von Kopien des sense-Stranges der Phagemid-DNA zu initiieren. Nach einem Kultivierungszeitraum von zwei Stunden wurden die bakteriellen Überstände, welche die Bakteriophagenpartikel enthalten, für die Untersuchung ELISA gesammelt.

[0028] Es wurde eine spezifische titrierbare Bindung von NPN-Fab-exprimierenden Bakteriophagenpartikeln an NPN-beschichten Platten gezeigt. Mit Helferphagen allein wurde keine Bindung detektiert.

[0029] Fig. 11 beschreibt die Inhibition von NPN-Fab-exprimierenden Bakteriophagen an NPN-Antigen-beschichteten Platten unter der Zugabe von ansteigenden Mengen an freiem Hapten. Die Assays wurden wie in Fig. 10 beschrieben durchgeführt. Eine vollständige Inhibition der Bindung wurde mit 5 ng an zugegebenem freiem NPN-Hapten beobachtet.

[0030] Fig. 12 beschreibt schematisch das Verfahren der Mutagenisierung der CDR-Region eines Fragmentes der schweren Kette, welches zu einer Änderung der Bindungsspezifität führt. Die Oligonukleotidprimer werden durch schwarze Balken angedeutet. Das Verfahren wird in Beispiel 6 beschrieben.

[0031] Fig. 13 beschreibt die Aminosäuresequenzen und die korrespondierende SEQ ID NO der schweren Kette der CDR3-Region der anfänglichen und der ausgewählten Klone, und die Affinitäten der Klone für freies

Fluoreszein und FI-BSA. Die Sternchen deuten den ungefähren Kd an, wie er mittels kompetivem ELISA bestimmt wurde.

[0032] Fig. 14 beschreibt die Aminosäuresequenzen und die korrespondierende SEQ ID NO der leichten Kette der CDR3-Region der anfänglichen und der ausgewählten Klone und die Affinitäten der Klone für freies Fluoreszein und FI-BSA. Das Sternchen deutet den ungefähren Kd an, wie er mittels kompetitivem ELISA bestimmt wurde.

Genaue Beschreibung der Erfindung

A. Definitionen

Aminosäurereste:

[0033] Ein Aminosäurerest wird aufgrund eines chemischen Verdaus (Hydrolyse) eines Polypeptids an seinen Peptidverknüpfungen gebildet. Die hier beschriebenen Aminosäurereste liegen bevorzugt in der "L"-isomeren Form vor. Gleichwohl können Reste in der "D"-isomeren Form gegen jeden L-Aminosäurerest ausgetauscht werden, so lange die gewünschte funktionale Eigenschaft durch das Polypeptid beibehalten wird. NH_2 bezieht sich auf die freie Aminogruppe, die am Aminoterminus des Polypeptids vorhanden ist. COOH bezieht sich auf die freie Carboxygruppe, die am Carboxyterminus eines Polypeptids vorhanden ist. In Übereinstimmung mit der Standardnomenklatur für Polypeptide (beschrieben in J. Biol. Chem., 243: 3552–59 (1969) und durch 37 C.F.R. 1.822 (b) (2)) umgesetzt, werden die Abkürzungen für Aminosäurereste in der folgenden Korrespondenztabelle gezeigt:

KORRESPONDENZTABELLE

SYMBOL		AMINOSÄURE
1-Buchstabencode	3-Buchstabencode	
Y	Tyr	Tyrosin
G	Gly	Glyzin
F	Phe	Phenylalanin
M	Met	Methionin
A	Ala	Alanin
S	Ser	Serin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
P	Pro	Prolin
K	Lys	Lysin
H	His	Histidin
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure
Z	Glx	Glu und/oder Gln
W	Trp	Tryptophan
R	Arg	Arginin
D	Asp	Aparaginsäure
N	Asn	Asparagin
B	Asx	Asn und/oder Asp
C	Cys	Cystein
J	Xaa	Unbekannt oder Andere

[0034] Es sollte angemerkt werden, dass alle Sequenzen der Aminosäurereste, die hier über eine Formel dargestellt sind, eine Links-/Rechtsorientierung in der konventionellen Darstellungsweise vom Aminoterminus zum Carboxyterminus hin besitzen. Weiterhin ist der Ausdruck "Aminosäurerest" so breit definiert, dass Aminosäuren mit eingeschlossen sind, die in der Korrespondenztabelle aufgelistet sind, sowie modifizierte und unübliche Aminosäuren, wie solche, wie sie in 37 CFR 1.822 (b) (4) aufgelistet sind. Weiterhin sollte festgestellt werden, dass ein Bindestrich am Anfang oder am Ende einer Sequenz aus Aminosäureresten eine Peptidbindung einer anderen Sequenz aus einer oder mehreren Aminosäureresten oder eine kovalente Bindung an eine aminoterminale Gruppe, wie beispielsweise NH_2 oder Acetyl oder an eine carboxyterminale Gruppe, wie beispielsweise COOH andeutet.

Nukleotide:

[0035] Eine monomere Einheit aus DNA oder RNA, die aus einem Zuckerrest (Pentose), einem Phosphat und einer nitrogenen heterocyclischen Base besteht. Die Base ist mit dem Zuckerrest über den glycosidischen Kohlenstoff (1'-Kohlenstoff der Pentose) verknüpft und diese Kombination von Base und Zucker ist ein Nukleosid.

Wenn das Nukleosid eine Phosphatgruppe enthält, die an die 3'- oder 5'-Position der Pentose gebunden ist, wird dies als Nukleotid bezeichnet. Eine Sequenz operativ miteinander verknüpfter Nukleotide wird typischerweise hier als "Basensequenz" oder "Nukleotidsequenz" bezeichnet einschließlich ihrer grammatikalischen Äquivalente, und wird hier durch eine Formel repräsentiert, deren Links-/Rechtsorientierung in der konventionellen Richtung von 5'-Terminus zu 3'-Terminus ist.

Basenpaar (Bp):

[0036] Eine Partnerschaft von Adenin (A) mit Thymin (T), oder von Cytosin (C) mit Guanin (G) in einem doppelsträngigen DNA-Molekül. In RNA wird Uracil (U) gegen Thymin ausgetauscht.

Nukleinsäure:

[0037] Ein Polymer aus Nukleotiden, entweder einzel- oder doppelsträngig.

Polynukleotid:

[0038] Ein Polymer aus einzel- oder doppelsträngigen Nukleotiden. Wie hier verwendet, wird "Polynukleotid" und seine grammatikalischen Äquivalente das volle Spektrum der Nukleinsäuren mit einschließen. Ein Polynukleotid wird hier typischerweise als ein Nukleinsäuremolekül bezeichnet werden, das einen linearen Strang von zwei oder mehr Desoxyribonukleotiden und/oder Ribonukleotiden umfasst. Die genaue Größe wird von vielen Faktoren abhängig sein, welche wiederum von den ultimativen Verwendungsbedingungen abhängig sind, wie diese im Stand der Technik bekannt sind. Die Polynukleotide der vorliegenden Erfindung schließen Primer, Sonden, RNA/DNA-Segmente, OligoNukleotide oder "Oligos" (relativ kurze Polynukleotide), Gene, Vektoren, Plasmide und Ähnliches mit ein.

Gene:

[0039] Eine Nukleinsäure, deren Nukleotidsequenz für ein RNA oder Polypeptid kodiert. Ein Gen kann entweder eine RNA oder eine DNA sein.

Duplex-DNA:

[0040] Ein doppelsträngiges Nukleinsäuremolekül, welches zwei Stränge von im Wesentlichen komplementären Polynukleotiden umfasst, welche durch eine oder mehrere Wasserstoffbindungen zwischen jeder der komplementären Basen zusammengehalten werden, die in einem Basenpaar des Duplex vorhanden sind. Da Nukleotide, die ein Basenpaar bilden, entweder eine Ribonukleotidbase oder eine Desoxyribonukleotidbase sein können, bezieht sich die Phrase "Duplex-DNA" entweder auf einen DNA-DNA-Duplex, umfassend zwei DNA-Stränge (ds DNA), oder auf einen RNA-DNA-Duplex, umfassend einen DNA-Strang und einen RNA-Strang.

Komplementäre Basen:

[0041] Nukleotide, welche normalerweise miteinander paaren, wenn DNA oder RNA eine doppelsträngige Konfiguration annehmen.

Komplementäre Nukleotidsequenz:

[0042] Eine Sequenz aus Oligonukleotiden in einem einzelsträngigen Molekül aus DNA oder RNA, welches ausreichend komplementär zu der Sequenz auf einem anderen Einzelstrang ist, um spezifisch mit diesem unter Ausbildung einer konsequenten Wasserstoffbindung zu hybridisieren.

Konserviert:

[0043] Eine Nukleotidsequenz ist in Bezug auf eine vorbestimmte (Referenz-) Sequenz konserviert, falls diese in nicht zufälliger Weise an ein exaktes Komplement der vorgewählten Sequenz hybridisert.

Hybridisierung:

[0044] Das Paaren von im Wesentlichen komplementären Nukleotidsequenzen (Nukleinsäurestränge), um

einen Duplex oder Heteroduplex durch die Ausbildung von Wasserstoffbindungen zwischen komplementären Basenpaaren zu erzeugen. Dies ist eine spezifische, d.h. nicht zufällige Interaktion zwischen zwei komplementären Polynukleotiden, welche kompetitiv inhibiert werden kann.

Nukleotidanaloga:

[0045] Ein Purin- oder Pyrimidinnukleotid, das sich strukturell von A, T, G, C oder U unterscheidet, dazu jedoch ausreichend ähnlich ist, um das normale Nukleotid in einem Nukleinsäuremolekül zu ersetzen.

DNA-Homolog:

[0046] Eine Nukleinsäure, die eine vorgewählte, konservierte Nukleotidsequenz besitzt und eine Sequenz, die für einen Rezeptor kodiert, welcher in der Lage ist, einen vorgewählten Liganden zu binden.

Rekombinantes DNA- (rDNA) Molekül:

[0047] Ein DNA-Molekül, das durch die operative Verknüpfung zweier DNA-Segmente erzeugt wird. Ein rekombinantes DNA-Molekül ist daher ein Hybrid-DNA-Molekül, das mindestens zwei Nukleotidsequenzen umfasst, die normalerweise in der Natur nicht gemeinsam gefunden werden. rDNAs, welche keinen gemeinsamen biologischen Ursprung besitzen, d.h. evolutionär unterschiedlich sind, werden als "heterolog" bezeichnet.

Vektor:

[0048] Ein rDNA-Molekül, welches zur autonomen Replikation in einer Zelle in der Lage ist, und an welches ein DNA-Segment, z.B. ein Gen oder Polynukleotid, operativ so verknüpft werden kann, dass es zu einer Replikation des angefügten Segments führt. Vektoren, die in der Lage sind, die Expression von Genen zu steuern, welche eines oder mehrere Polypeptide kodieren, werden hier als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Besonders wichtige Vektoren erlauben die Klonierung von cDNA (komplementäre DNA) aus mRNA, welche unter Verwendung einer reversen Transkriptase erzeugt wurden.

Rezeptor:

[0049] Ein Rezeptor ist ein Molekül, wie beispielsweise ein Protein, Glycoprotein und Ähnliche, welche spezifisch (nicht zufällig) an ein anderes Molekül binden können.

Antikörper:

[0050] Der Begriff Antikörper in seinen verschiedenen grammatikalischen Formen wird hier verwendet, um Immunglobulinmoleküle und immunologisch aktive Anteile an Immunglobulinmolekülen zu bezeichnen, z.B. Molekülen, die eine Antikörperverknüpfungsstelle oder Paratop besitzen. Exemplarische Antikörpermoleküle sind intakte Immunglobulinmoleküle, im Wesentlichen Immunglobulinmoleküle und Teile eines Immunglobulinmoleküls, einschließlich solcher Teile, die im Stand der Technik als Fab, Fab', $F(ab')_2$ und F(v) bekannt sind.

Antikörperverknüpfungsstelle:

[0051] Eine Antikörperverknüpfungsstelle ist derjenige strukturelle Anteil eines Antikörpermoleküls, das die variablen und hypervariablen Regionen einer schweren und leichten Kette umfasst, welche spezifisch mit einem Antigen binden (eine Immunreaktion eingehen). Der Begriff Immunreaktion in seinen verschiedenen Formen erläutert die spezifische Bindung zwischen einem Molekül, das einen antigenen Determinanten enthält, und einem Molekül, das eine Antikörperverknüpfungsstelle enthält, wie beispielsweise ein ganzes Antikörpermolekül oder ein Teil davon.

Monoklonale Antikörper:

[0052] Der Ausdruck monoklonaler Antikörper in seinen verschiedenen grammatikalischen Formen bezieht sich auf eine Population an Antikörpermolekülen, welche lediglich eine Spezies einer Antikörperverknüpfungsstelle besitzt, die in der Lage ist, mit einem bestimmten Antigen eine Immunreaktion einzugehen. Ein monoklonaler Antikörper kann daher ein Antikörpermolekül enthalten, welches eine Vielzahl an Antikörperverknüpfungsstellen enthält, wobei jede für ein unterschiedliches Antigen immunspezifisch ist, z.B. ein bispezifischer monoklonaler Antikörper.

Fusionspolypeptid:

[0053] Ein Polypeptid, das mindestens zwei Polypeptide und eine Verknüpfungssequenz umfasst, um die beiden Polypeptide in ein kontinuierliches Polypeptid operativ miteinander zu verknüpfen. Die zwei in ein Fusionspolypeptid miteinander verknüpften Polypeptide werden typischerweise aus zwei unterschiedlichen Quellen abgeleitet, und ein Fusionspolypeptid umfasst daher zwei miteinander verknüpfte Polypeptide, die üblicherweise in der Natur nicht miteinander verknüpft vorgefunden werden.

Stromaufwärts:

[0054] In der Richtung entgegen der Richtung der DNA-Transkription, und daher 5' nach 3' auf dem nicht-kodierenden Strang, oder 3' nach 5' auf der mRNA.

Stromabwärts:

[0055] Weiter entlang an einer DNA-Sequenz in Richtung der Sequenztranskription oder der Leserichtung, die in einer 3'- nach 5'-Richtung entlang des nicht-kodierenden Stranges der DNA oder in 5'- nach 3'-Richtung entlang dem RNA-Transkript verläuft.

Cistron:

[0056] Sequenz aus Nukleotiden in einem DNA-Molekül, das für eine Sequenz aus Aminosäureresten kodiert und die stromaufwärts und stromabwärts gelegenen DNA-Expressionskontrollelemente mit einschließt.

Stoppkodon:

[0057] Jedes der drei Kodons, welche nicht für eine Aminosäure kodieren, jedoch stattdessen einen Abbruch der Proteinsynthese verursachen. Diese sind UAG, UAA und UGA und werden ebenfalls als Unsinns- oder Terminationskodons bezeichnet.

Leaderpolypeptid:

[0058] Eine kurze Länge einer Aminosäuresequenz am aminoterminalen Ende eines Polypeptids, welche das Polypeptid durch die innere Membran trägt oder leitet und so seine eventuelle Sekretion in den periplasmischen Raum und möglicherweise dahinter sicherstellt. Das Leitsequenzpeptid wird gewöhnlicherweise entfernt, bevor das Polypeptid aktiv wird.

Leserahmen:

[0059] Besondere Sequenz von aufeinanderfolgenden Nukleotidtripletts (Kodons), die in der Translation benötigt werden. Der Leserahmen hängt von der Stelle des die Translation initiierenden Kodons ab.

B. Filamentöser Phage

[0060] Die vorliegende Erfindung beschäftigt sich eingehend mit einem filamentösen Phagen, der eine Matrix aus Proteinen umfasst, die ein Genom einkapseln, das erste und zweite Polypeptide kodiert, welche in der Lage sind, einen heterodimeren Rezeptor zu bilden. Der Phage enthält weiterhin einen heterodimeren Rezeptor, umfasst von den ersten und zweiten Polypeptiden, welcher in die Matrix über eine Membran-Ankerdomäne eines filamentösen Phagen integriert wird, welche mindestens an die ersten oder zweiten Polypeptide fusioniert ist. Der heterodimere Rezeptor besitzt die Fähigkeit, Liganden zu binden und wird daher als Liganden-bindender heterodimerer Rezeptor bezeichnet. In einem Aspekt der Erfindung wird daher ein filamentöser Phage, wie in Anspruch 1 beansprucht, bereitgestellt.

[0061] Der heterodimere Rezeptor in einer bevorzugten Ausführungsform ist ein Epitopbindender Komplex. Dies ist ein Komplex aus ersten und zweiten Polypeptiden, die in der Lage sind, an ein Epitop zu binden. Die ersten und zweiten Polypeptide sind bevorzugt Polypeptide der schweren Kette und der leichten Kette eines Antikörpers.

[0062] Die ersten und zweiten Polypeptide sind in der Lage, sich in einen funktionellen Epitop-Bindungskomplex (heterodimerer Rezeptor) autogen anzuordnen, welche anschließend auf der äußeren Oberfläche des

Phagen in einer einem Liganden zugänglichen Weise exprimiert wird, d.h. sie werden in den Phagen auf der Oberfläche integriert. Ein Epitop-bindender Komplex ist daher typischerweise auf der Oberfläche eines Phagen dieser Erfindung vorhanden. Der Epitop-bindende Komplex wird typischerweise von einem verknüpfenden Polypeptid umfasst, welches eine Membran-Ankerdomäne eines filamentösen Phagen enthält, wie beispielsweise ein in Sektion C beschriebenes Polypeptid, und (ein) nicht-verknüpfende(s) Polypeptid(e).

[0063] Da der Rezeptor mit dem Phagen in einer von der Oberfläche zugänglichen Art verknüpft ist, kann der Phage vorteilhafterweise als Festphasenaffinitätssorbens verwendet werden. In Verfahren, die Verwendung von der vorliegenden Erfindung machen, kann der Phage an eine Feststoff(wässrig-unlösliche)-Matrix, wie beispielsweise Agarose, Cellulose, synthetische Harze, Polysaccharide und Ähnliches verknüpft werden, bevorzugt in einer solche Weise, dass er wieder entfernt werden kann. Beispielsweise können Transformanten, die den Phagen ausschütten, in eine Säule zugegeben und dort belassen werden und unter Bedingungen gehalten werden, die das Ausschütten des Phagen unterstützen. Eine wässrige Zusammensetzung, die einen Liganden enthält, welcher an den vom Phagen exprimierten Rezeptor bindet, wird anschließend durch die Säule unter einem vorbestimmten Verhältnis und unter Bedingungen für die Rezeptorbindung laufnen gelassen, um einen Festphasenrezeptor-Ligandenkomplex zu bilden. Die Säule wird anschließend gewaschen, um nicht gebundenes Material zu entfernen, wobei der Ligand an dem an der Festphase gebundenen Phagen belassen wird. Der Ligand kann anschließend entfernt und durch Waschen der Säule mit einem Puffer wiedergewonnen werden, der die Dissoziation des Rezeptor-Ligandenkomplexes fördert.

[0064] Alternativ kann der aufgereinigte Phage einer wässrigen Lösung zugegeben werden, die den Liganden für eine Affinitätsaufreinigung enthält. Die so gebildete Reaktionsmischung für die Rezeptor-Ligandenbindung wird für einen solchen Zeitraum unter Bindungsbedingungen gehalten, der ausreichend ist, um einen über einen Phagen verknüpften Rezeptor-Liganden-Komplex zu bilden. Der über einen Phagen gebundene Ligand (einen Liganden enthaltender Phage) wird anschließend abgetrennt und von den nicht-gebundenen Materialien beispielsweise durch Zentrifugation, Elektrophorese, Fällung und Ähnlichem gewonnen.

[0065] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls einen filamentösen Phagen zur Verfügung, wie in Anspruch 3 beansprucht. Der Phage dieser Erfindung kann für die Verwendung in einem diagnostischen Verfahren dieser Erfindung markiert werden. Bevorzugte Markierungen schließen radioaktiv markierte Nukleinsäuren mit ein, welche in das Phagengenom eingebaut werden, oder radioaktiv markierte Aminosäuren, welche in Proteinkomponenten des Phagenpartikels eingebaut werden. Die Herstellung eines markierten Phagen kann in routinemäßiger Weise durch Kultivieren des Phagen, wie hier beschrieben, durchgeführt werden, jedoch unter Einschluss von radiomarkierten Nukleotiden oder radiomarkierten Aminosäuren im Kulturmedium zum Einbau in Nukleinsäuren oder Polypeptide des Phagen. Beispielhafte Markierungen sind ^{3}H-Thymidin oder ^{35}S-Methionin. Andere isotope Markierungen und andere Nukleotide oder Aminosäurevorläufer sind für einen Fachmann leicht verfügbar. Der markierte Phage enthält bevorzugt ausreichend Markierung, um in einem Ligandenbindungsassay dieser Erfindung detektiert werden zu können, z.B. ist der Phage in einer detektierbaren Art und Weise markiert.

C. DNA-Expressionsvektoren

[0066] Ein Vektor der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinantes DNA (rDNA)-Molekül, das für die Aufnahme und Expression von translatierbaren DNA-Sequenzen in der Form eines Fusionspolypeptids angepasst worden ist, welches eine Membran-Ankerdomäne eines filamentösen Phagen und eine prokaryotische Sekretionssignaldomäne enthält. Der Vektor umfasst eine Kassette, welche stromaufwärts oder stromabwärts translatierbare DNA-Sequenzen miteinschließt, die für die gerichtete Ligation an eine Insert-DNA über eine Nukleotidsequenz operativ miteinander verknüpft sind. Die stromaufwärts gelegene translatierbare Sequenz kodiert das hier definierte Sekretionssignal. Die stromabwärts gelegene translatierbare Sequenz kodiert den hier definierten Membran-Anker des filamentösen Phagen. Die Kassette schließt bevorzugt DNA-Expressionskontrollsequenzen zur Expression des Fusionspolypeptides mit ein, welches dann erzeugt wird, wenn ein Insert einer translatierbaren DNA-Sequenz (Insert-DNA) gerichtet in die Kassette über eine Nukleotidsequenz insertiert wird, die für die gerichtete Ligation angepasst wurde.

[0067] Der DNA-Expressionsvektor stellt ein System zur unabhängigen Klonierung (Insertion) zweier translatierbarer DNA-Sequenzen in zwei voneinander getrennte im Vektor vorhandene Kassetten bereit, um zwei voneinander getrennte "Cistrone" (siehe unten) für die Expression von beiden Polypeptiden eines heterodimeren Rezeptors zu bilden, oder die Ligandenbindungsanteile der Polypeptide, die einen heterodimeren Rezeptor umfassen. Der DNA-Expressionsvektor zur Expression der zwei Cistrone wird als dicistronischer Expressionsvektor bezeichnet.

[0068] Der DNA-Expressionsvektor dieser Erfindung umfasst daher zusätzlich zu der oben beschriebenen Kassette eine zweite Kassette zur Expression eines zweiten Fusionspolypeptids. Die zweite Kassette schließt eine zweite translatierbare DNA-Sequenz mit ein, die ein Sekretionssignal kodiert, welches hier definiert ist und operativ mit seinem 3'-Terminus über eine Sequenz von Nukleotiden, die für die gerichtete Ligation adaptiert wurde, mit einer stromabwärts gelegenen DNA-Sequenz des Vektors verknüpft ist, der typischerweise mindestens ein Stoppkodon im Leserahmen der Kassette mitumfasst. Die zweite translatierbare DNA-Sequenz wird an ihrem 5'-Terminus mit den DNA-Expressionskontrollsequenzen unter Bildung der oben definierten 5'-Elemente operativ verknüpft. Die zweite Kassette ist in der Lage, nach Insertion einer translatierbaren DNA-Sequenz (Insert-DNA), das zweite Fusionspolypeptid zu exprimieren, das eine Fusion des Sekretionssignals zusammen mit einem Polypeptid umfasst, das durch die Insert-DNA kodiert wird.

[0069] Der Membran-Anker des filamentösen Phagen ist bevorzugt eine Domäne des cpIII- oder cpVIII-Beschichtungsproteins, das in der Lage ist, die Matrix aus Partikel eines filamentösen Phagen binden und dabei das Fusionspolypeptid auf der Phagenoberfläche einzubauen.

[0070] Ein Expressionsvektor wird dadurch charakterisiert, dass er in der Lage ist, in einem kompatiblen Wirt ein strukturelles Genprodukt zu exprimieren, wie beispielsweise ein Fusionspolypeptid der vorliegenden Erfindung.

[0071] Wie hier verwendet, bezeichnet der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das in der Lage ist, zwischen unterschiedlichen genetischen Umgebungen eine andere Nukleinsäure zu derjenigen zu transportieren, mit der sie operativ verknüpft wurde. Bevorzugte Vektoren sind solche, die zur autonomen Replikation sowie zur Expression von strukturellen Genprodukten in der Lage sind, die in den DNA-Segmenten vorhanden sind, mit denen diese operativ verknüpft wurden.

[0072] Der Begriff "operativ verknüpft", wie er hier verwendet wird, bedeutet in Bezug auf DNA-Sequenzen oder -Segmente, dass die Sequenzen oder Segmente kovalent, bevorzugt durch konventionelle Phosphodiesterbindungen in einem DNA-Strang entweder in einzel- oder doppelsträngiger Form miteinander vereinigt wurden.

[0073] Die Wahl des Vektors, in dem die Kassetten gemäß dieser Erfindung operativ miteinander verknüpft werden, hängt direkt von den gewünschten funktionalen Eigenschaften ab, die im Stand der Technik wohlbekannt ist, z.B. von der Vektorreplikation und Proteinexpression, und von der zu transformierenden Wirtszelle, wobei dies Beschränkungen darstellt, die inhärent im Stand der Technik bei der Konstruktion von rekombinanten DNA-Molekülen gegeben sind.

[0074] In bevorzugten Ausführungsformen schließt der verwendete Vektor ein prokaryotisches Replikon mit ein, z.B. eine DNA-Sequenz, die in der Lage ist, eine direkte autonome Replikation und die Aufrechterhaltung des rekombinanten DNA-Moleküls in extrachromosomaler Form in einer prokaryotischen Wirtszelle zu erzielen, wie beispielsweise einer bakteriellen damit transformierten Wirtszelle. Solche Replikons sind im Stand der Technik wohlbekannt. Zusätzlich schließen solche Ausführungsformen, welche ein prokaryotisches Replikon mit einschließen, ebenfalls ein Gen mit ein, dessen Expression einem damit transformierten bakteriellen Wirt einen selektiven Vorteil verschafft, wie beispielsweise eine Resistenz gegen Wirkstoffe. Typische bakterielle Resistenzgene gegen Wirkstoffe sind solche, die eine Resistenz gegen Ampicillin oder Tetracyclin verleihen. Vektoren enthalten ebenfalls üblicherweise geeignete Restriktionsschnittstellen zur Insertion von translatierbaren DNA-Sequenzen. Beispielhafte Vektoren sind die Plasmide pUC8, pUC9, pBR322 und pBR329, welche von BioRad Laboratories (Richmond, CA) erhältlich sind, und pPL und pKK223, die von Pharmacia erhältlich sind (Piscataway, NJ).

[0075] Eine für die gerichtete Ligation angepasste Nukleotidsequenz, z.B. ein Polylinker, ist eine Region des DNA-Expressionsvektors, der (1) die stromaufwärts und stromabwärts gelegenen translatierbaren DNA-Sequenzen für die Replikation und den Transport operativ verknüpft (2) eine Stelle oder ein Mittel für die gerichtete Ligation einer DNA-Sequenz in den Vektor bereitstellt. Typischerweise ist ein gerichteter Polylinker eine Sequenz aus Nukleotiden, welche zwei oder mehr Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, oder Restriktionsschnittstellen definiert. Nach Restriktionsspaltung ergeben die zwei Schnittstellen kohäsive Enden, an die eine translatierbare DNA-Sequenz zum DNA-Expressionsvektor ligiert werden kann. Bevorzugt stellen die zwei Restriktionsschnittstellen nach Restriktionsspaltung kohäsive Enden bereit, die nicht-komplementär sind und damit die gerichtete Insertion einer translatierbaren DNA-Sequenz in die Kassette ermöglichen. In einer Ausführungsform wird das gerichtete Ligationsmittel durch Nukleotide bereitgestellt, die in der stromaufwärts gelegenen translatierbaren DNA-Sequenz vorhanden sind, in der stromabwärts gelegenen

translatierbaren DNA-Sequenz, oder in beiden. In einer anderen Ausführungsform umfasst die für die gerichtete Ligation angepasste Nukleotidsequenz eine Nukleotidsequenz, die multiple gerichtete Klonierungsmittel definiert. Wo die für die gerichtete Ligation adaptierte Nukleotidsequenz eine Vielzahl aus Restriktionsschnittstellen definiert, wird sie als multiple Klonierungsstelle bezeichnet.

[0076] Eine translatierbare DNA-Sequenz ist eine lineare Serie aus Nukleotiden, die eine nicht unterbrochene Serie von mindestens 8 Kodons bereitstellt, die ein Polypeptid in einem Leserahmen kodieren.

[0077] Eine stromaufwärts gelegene translatierbare DNA-Sequenz kodiert ein prokaryotisches Sekretionssignal. Das Sekretionssignal ist die Leitpeptiddomäne eines Proteins, die das Protein zur periplasmatischen Membran von gram-negativen Bakterien führt.

[0078] Ein bevorzugtes Sekretionssignal ist ein pelB-Sekretionssignal. Die vorhergesagten Sequenzen aus Aminosäureresten der Sekretionssignaldomäne aus zwei pelB-Genproduktvarianten aus Erwinia carotova werden in Tabelle 1 gezeigt, wie durch Lei et al., Nature, 331: 543–546 (1988) beschrieben. Ein besonders bevorzugtes pelB-Sekretionssignal wird ebenfalls in Tabelle 1 gezeigt.

[0079] Die Leitsequenz des pelB-Proteins wurde ursprünglich als Sekretionssignal für Fusionsproteine verwendet. Better et al., Science, 240: 1041–1043 (1988); Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 5728–5732 (1989); und Mullinax et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (87: 8095–8099 (1990).

[0080] Sequenzen aus Aminosäureresten für andere in dieser Erfindung verwendbaren Sekretionssignalpolypeptiddomänen aus E. coli werden ebenfalls in Tabelle 1 aufgelistet. Oliver, In Neidhard, F.C. (Ed.), Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1: 56–69 (1987).

[0081] Die vorliegende Erfindung stellt daher einen Vektor bereit, wie in Anspruch 15 und Anspruch 16 definiert.

[0082] Eine translatierbare DNA-Sequenz, welche das pelB-Sekretionssignal kodiert, die die in SEQ ID NO 5 gezeigte Sequenz aus Aminosäureresten besitzt, ist eine bevorzugte DNA-Sequenz für die Aufnahme in einen DNA-Expressionsvektor dieser Erfindung.

[0083] Eine stromabwärts gelegene translatierbare DNA-Sequenz kodiert den Membran-Anker eines filamentösen Phagen. Bevorzugte Membran-Anker können aus den filamentösen Phagen M13, f1, fd und ähnlichen äquivalenten filamentösen Phagen erhalten werden. Bevorzugte Membran-Ankerdomänen werden in den durch Gen III und Gen VIII kodierten Beschichtungsproteinen gefunden. Eine stromabwärts gelegene translatierbare DNA-Sequenz kodiert daher eine Sequenz aus Aminosäureresten, die zur Membran-Ankerdomäne eines Beschichtungspolypeptids entweder von Gen III oder Gen VIII eines filamentösen Phagen korrespondiert und bevorzugt identisch dazu ist.

[0084] Die Membran-Ankerdomäne eines Beschichtungsproteins eines filamentösen Phagen ist ein Teil der carboxyterminalen Region des Beschichtungsproteins und schließt eine Region an hydrophoben Aminosäureresten mit ein, die eine zweischichtige Lipidmembran umfassen, und eine Region aus geladenen Aminosäureresten, die normalerweise auf der zytoplasmischen Oberfläche der Membran gefunden werden und von der Membran weggerichtet sind.

Tabelle 1

Leitsequenz

SEQ ID NO	TYP	SEQUENZ AUS AMINOSÄURERESTEN
(5)	PelB[1]	MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeu LeuLeuAlaAlaGlnProAlaMet
(6)	pelB[2]	MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeu LeuLeuAlaAlaGlnProAlaGlnProAlaMetAla
(7)	pelB[3]	MetLysSerLeuIleThrProIleAlaAlaGlyLeuLeu LeuAlaPheSerGlnTyrSerLeuAla
(8)	MalE[4]	MetLysIleLysThrGlyAlaArgIleLeuAlaLeuSer AlaLeuThrThrMetMetPheSerAlaSerAlaLeuAla LysIle
(9)	OmpF[4]	MetMetLysArgAsnIleLeuAlaValIleValProAla LeuLeuValAlaGlyThrAlaAsnAlaAlaGlu
(10)	PhoA[4]	MetLysGlnSerThrIleAlaLeuAlaLeuLeuProLeu LeuPheThrProValThrLysAlaArgThr
(11)	Bla[4]	MetSerIleGlnHisPheArgValAlaLeuIleProPhe PheAlaAlaPheCysLeuProValPheAlaHisPro
(12)	LamB[4]	MetMetIleThrLeuArgLysLeuProLeuAlaValAla ValAlaAlaGlyValMetSerAlaGlnAlaMetAlaVal Asp
(13)	Lpp[4]	MetLysAlaThrLysLeuValLeuGlyAlaValIleLeu GlySerThrLeuLeuAlaGlyCysSer
(14)	cpVIII[5]	MetLysLysSerLeuValLeuLysAlaSerValAlaVal AlaThrLeuValProMetLeuSerPheAla
(15)	cpIII[6]	MetLysLysLeuLeuPheAlaIleProLeuValValPro PheTyrSerHisSer

[1] in dieser Erfindung verwendetes pelB

[2] pelB aus dem Erwinia carotovora-Gen

[3] pelB aus dem Erwinia carotovora EC 16-Gen

[4] Leitsequenz aus E. coli

[5] Leitsequenz für cpVIII

[6] Leitsequenz für cpIII

[0085] Im Phagen f1 umfasst die Membran-umspannende Region des Beschichtungsproteins aus dem Gen VIII die Reste Trp-26 bis Lys-40, und die zytoplasmische Region umfasst die carboxyterminalen 11 Reste von 41 bis 52. Ohkawa et al., J. Biol. Chem., 256: 9951-9958 (1981). Ein beispielhafter Membran-Anker würde aus den Resten 26 bis 40 von cpVIII bestehen.

[0086] Die Sequenz aus Aminosäureresten einer bevorzugten Membran-Ankerdomäne wird daher vom Beschichtungsprotein aus dem Gen III des filamentösen Phagen M13 (hier ebenfalls cpIII genannt) abgeleitet.

Ein bevorzugter, aus cpIII abgeleiteter Membran-Anker besitzt die in SEQ ID NO 16 gezeigte Sequenz vom Rest 1 bis zum Rest 211. Das Beschichtungsprotein vom Gen III ist auf einem reifen filamentösen Phagen an einem Ende des Phagenpartikels mit typischerweise 4 bis 6 Kopien des Beschichtungsproteins vorhanden.

[0087] Die Sequenz aus Aminosäureresten einer anderen bevorzugten Membran-Ankerdomäne wird von Beschichtungsproteinen aus dem Gen VIII des filamentösen Phagen M13 abgeleitet (hier ebenfalls als cpVIII benannt). Ein bevorzugter, von cpVIII abgeleiteter Membran-Anker besitzt die in SEQ ID NO 17 von Rest 1 bis Rest 50 gezeigte Sequenz. Das Beschichtungsprotein aus dem Gen VIII ist auf einem filamentösen Phagen über einen Großteil des Phagenpartikels mit typischerweise etwa 2500 bis 3000 Kopien des Beschichtungsproteins vorhanden.

[0088] In einer anderen Ausführungsform besitzt der Membran-Anker die in SEQ ID NO 113 gezeigte Sequenz von der Base 28 bis zu der Base 663. Zu genauen Beschreibungen der Struktur der Partikel von filamentösen Phagen, ihren Beschichtungsproteinen und ihrer Partikelanordnung siehe den Überblick von Rached et al., Microbiol. Rev., 50: 401–427 (1986) und Model et al. in "The Bacteriophages: Vol. 2", R. Calendar, Ed., Plenum Publishing Co., S. 375–456, (1988).

[0089] Eine Kassette in einem DNA-Expressionsvektor dieser Erfindung ist diejenige Region des Vektors, die aufgrund der Insertion einer translatierbaren DNA-Sequenz (Insert-DNA) eine Sequenz aus Nukleotiden bildet, die in einem geeigneten Wirt in der Lage ist ein Fusionspolypeptid gemäß dieser Erfindung zu exprimieren. Die zur Expression fähige Sequenz aus Nukleotiden wird als Cistron bezeichnet. Die Kassette umfasst daher DNA-Expressionskontrollelemente, welche mit den stromaufwärts und stromabwärts gelegenen translatierbaren DNA-Sequenzen operativ miteinander verknüpft sind. Ein Cistron wird gebildet, wenn eine translatierbare DNA-Sequenz gerichtet zwischen die stromaufwärts gelegene und stromabwärtsgelegenen Sequenzen über die Sequenz aus Nukleotiden insertiert wird (gerichtet ligiert), die für diesen Zweck angepasst wurden. Die resultierenden drei translatierbaren DNA-Sequenzen, genauer die stromaufwärts gelegenen, die insertierten und die stromabwärts gelegenen Sequenzen, sind alle im gleichen Leserahmen miteinander operativ verknüpft.

[0090] DNA-Expressionskontrollsequenzen umfassen einen Satz an DNA-Expressionssignalen für die Expression eines strukturellen Genprodukts und schließen beiderseits 5'- und 3'-Elemente mit ein, die, wie gut bekannt ist, mit dem Cistron so operativ verknüpft sind, dass das Cistron in der Lage ist, ein strukturelles Genprodukt zu exprimieren. Die 5'-Kontrollsequenzen definieren einen Promotor zur Initiierung der Transkription sowie eine Ribosomenbindungsstelle, die operativ mit dem 5'-Terminus der stromaufwärts gelegenen translatierbaren DNA-Sequenz verknüpft wird.

[0091] Um hohe Werte für die Genexpression in E. coli zu erreichen, ist es notwendig, nicht nur starke Promotoren zu verwenden, um große Mengen an mRNA zu erzeugen, sondern ebenfalls Ribosomenbindungsstellen, um sicherzustellen, dass die mRNA effektiv translatiert wird. In E. coli schließt die Ribosomenbindungsstelle ein Startkodon (AUG) und eine Sequenz mit einer Länge von 3–9 Nukleotiden mit ein, die 3–11 Nukleotide stromaufwärts vom Startkodon lokalisiert sind [Shine et al., Nature, 254: 34 (1975)]. Die Sequenz AGGAGGU, die als Shine-Dalgarno(SD)-Sequenz bezeichnet wird, ist zum 3'-Ende der E. coli 16S mRNA komplementär. Die Bindung des Ribosoms an mRNA und die Sequenz am 3'-Ende der mRNA kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden.

(i) Der Grad der Komplementarität zwischen der SD-Sequenz und dem 3'-Ende der 16S tRNA.

(ii) Der Abstand und möglicherweise die zwischen der SD-Sequenz und dem AUG gelegene Sequenz [Roberts et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 760 (1979a); Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5596 (1979b); Guarente et al., Science, 209: 1428 (1980); und Guarente et al., Cell, 20: 543: 1428 (1980).]. Die Optimierung wird durch die Messung des Grades der Genexpression in Plasmiden erreicht, in welchen dieser Abstand systematisch verändert wird. Der Vergleich von verschiedenen mRNAs zeigt, dass es statistisch bevorzugte Sequenzen von Positionen –20 bis +13 gibt (wobei das A aus AUG Position 0 darstellt) [Gold et al., Annu. Rev. Microbiol., 35: 365 (1981)]. Von Leitsequenzen wurde gezeigt, dass sie die Translation dramatisch beeinflussen (Roberts et al., 1979 a, b supra).

(iii) Die auf AUG folgende Nukleotidsequenz, welche die Ribosomenbindung beeinflusst [Taniguchi et al., J. Mol. Biol., 118: 533 (1978)].

[0092] Nützliche Ribosomenbindungsstellen werden in Tabelle 2 unten gezeigt.

Tabelle 2

Ribosomenbindungsstellen*

	SEQ. ID. NO.		
1.	(18)	5'	AAUCUUGGAGGCUUUUUUAUGGUUCGUUCU
2.	(19)	5'	UAACUAAGGAUGAAAUGCAUGUCUAAGACA
3.	(20)	5'	UCCUAGGAGGUUUGACCUAUGCGAGCUUUU
4.	(21)	5'	AUGUACUAAGGAGGUUGUAUGGAACAACGC

* Unterstrichen sind Sequenzen der Startregionen für die Proteinsynthese in vier Phagen-mRNA-Molekülen.

AUG = Startkodon (doppelt unterstrichen)
1. = Phage ∅X174 Gen-A-Protein
2. = Phage Qβ-Replikase
3. = Phage R17 Gen-A-Protein
4. = Phage Lambda Gen-cro-Protein

[0093] Die 3'-Kontrollsequenzen definieren mindestens ein Terminations-(Stopp)-Kodon im Leserahmen mit und sind operativ mit einer stromabwärts gelegenen translatierbaren DNA-Sequenz verknüpft.

[0094] Ein DNA-Expressionsvektor gemäß dieser Erfindung stellt daher ein System zur Klonierung von translatierbaren DNA-Sequenzen in einen Teil der Kassette des Vektors zur Erzeugung von Cistronen bereit, die in der Lage sind, die Fusionspolypeptide dieser Erfindung zu exprimieren.

[0095] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein DNA-Expressionsvektor für eine geeignete Manipulation in der Form eines Partikels eines filamentösen Phagen entworfen, der ein Genom entsprechend der Lehre der vorliegenden Erfindung einkapselt. In dieser Ausführungsform enthält ein DNA-Expressionsvektor weiterhin eine Nukleotidsequenz, welche den Replikationsursprung eines filamentösen Phagen in einer solchen Weise enthält, dass der Vektor, nach Präsentation der geeigneten genetischen Komplementierung, als filamentöser Phage in einer einzelsträngigen replikativen Form replizieren kann und in Partikel eines filamentösen Phagen gepackt werden kann. Diese Merkmal stellt die Fähigkeit des DNA-Expressionsvektors bereit, für eine anschließende Abspaltung des Partikels und des darin enthaltenen Vektors in Phagenpartikel gepackt zu werden, abseits von anderen Partikeln, welche eine Population von Phagenpartikeln umfassen.

[0096] Der Replikationsursprung eines filamentösen Phagen ist eine Region des Phagengenoms, die, wie gut bekannt ist, Stellen zum Start der Replikation definiert, sowie zur Beendigung der Replikation und zum Packen der mit Hilfe der Replikation erzeugten replikativen Form. Siehe beispielsweise Rashed et al., Microbiol. Rev., 50: 401–427 (1986); und Horiuchi, J. Mol. Biol., 188: 215–223 (1986).

[0097] Ein Replikationsursprung eines bevorzugten filamentösen Phagen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist ein Replikationsursprung von M13-, f1- oder fd-Phagen. Insbesondere bevorzugt wird ein Replikationsursprung eines filamentösen Phagen, der die in SEQ ID NO 117 gezeigte und durch Short et al., Nucl. Acids Res., 16: 7583–7600 (1988) beschriebene Sequenz besitzt. Bevorzugte DNA-Expressionsvektoren sind die dicistronischen Expressionsvektoren pCOMB8, pCOMB2-8, pCOMB3, pCKAB3, pCOMB2-3 und pCOMB2-3', die in Beispiel 1 beschrieben sind.

[0098] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls ein in den Ansprüchen 20–22 beanspruchten Vektor zur Verfügung. Insoweit ein Vektor dieser Erfindung so manipuliert werden kann, dass dieser eine Insert-DNA enthält und dabei die Fähigkeit besitzt, ein Fusionspolypeptid zu exprimieren, betrifft eine Ausführungsform die kurz zuvor beschriebenen Vektoren, die eine Insert-DNA enthalten. Insbesondere bevorzugte Vektoren enthalten Antikörpergene, die in den Beispielen beschrieben sind.

D. Polypeptide

[0099] In einer anderen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Polypeptid zur Verfügung, wie in Anspruch 23 beansprucht.

[0100] Das Polypeptid ist ein Fusionspolypeptid, welches eine Rezeptordomäne besitzt, die eine Sequenz aus Aminosäureresten umfasst, welche die Liganden (Epitop)-Bindungsdomäne eines Rezeptorproteins definiert, die zur Membran-Ankerdomäne eines filamentösen Phagen benachbart ist. Dies bedeutet, dass die Insert-Domäne in dem Fusionspolypeptid die Ligandenbindungsdomäne eines Rezeptors ist und ebenfalls als Liganden-bindendes Rezeptorpolypeptid bezeichnet wird.

[0101] Insoweit das Polypeptid eine Rezeptordomäne besitzt, wird sie hier ebenfalls als Rezeptor bezeichnet. In anderen verwandten Polypeptiden kann das Polypeptid zusätzlich eine Sekretionssignaldomäne umfassen, bevorzugt ein wie hier beschriebenes pelB-Sekretionssignal.

[0102] In bevorzugten Ausführungsformen ist das Rezeptorprotein eine Polypeptidkette eines Liganden-bindenden heterodimeren Rezeptors. Noch bevorzugter ist der heterodimere Rezeptor ein Epitop-bindender Komplex.

[0103] Bevorzugte heterodimere Rezeptoren schließen Immunglobuline, große Histokompatibilitätsantigene (major histocompatibility antigens) der Klassen I oder II, Lymphozytenrezeptoren, Integrine und ähnliche heterodimere Rezeptoren mit ein.

[0104] Immunglobuline (Antikörpermoleküle) können in der Form von Fab- oder Fv-Fragmenten, oder von anderen Teilen eines Antikörpermoleküls vorliegen, der Regionen der variablen Domäne der schweren und leichten Ketten enthält.

[0105] Ein Polypeptidvorläufer dieser Erfindung kann eine Sequenz aus Aminosäuren besitzen, welche durch die in der Richtung von Amino- zu Carboxyterminus gelesene Formel dargestellt wird:

(F1) NH_2-O-$(U)_m$-V-$(X)_n$-Z-COOH,

wobei O eine Sequenz aus Aminosäureresten repräsentiert, die ein Sekretionssignal definiert, U ein erstes Spacer-Polypeptid repräsentiert, V eine Sequenz aus Aminosäureresten repräsentiert, die eine Rezeptordomäne definieren (ein Ligandenbindendes Rezeptorpolypeptid), X ein zweites Spacer-Polypeptid repräsentiert, und Z eine Sequenz aus Aminosäuren repräsentiert, die einen Membran-Anker eines Beschichtungsproteins eines filamentösen Phagen definiert, mit dem Ausschluss, dass m die ganze Zahl 0 oder 1 darstellt, so dass, wenn m gleich 0 ist, U nicht vorhanden ist, und wenn m 1 ist, U vorhanden ist, und n gleich 0 oder 1 ist, so dass, wenn n gleich 0 ist, X ist nicht vorhanden ist und wenn n gleich 1 ist, X vorhanden ist.

[0106] In der Formel (F1) sind das Sekretionssignal und der Membran-Anker des Beschichtungsproteins des filamentösen Phagen wie oben definiert. Einige solcher Polypeptide können ein von der variablen Kette einer Antikörperdomäne abgeleitetes Polypeptid umfassen, welches an seinem Aminoterminus mit dem Sekretionssignal operativ verknüpft ist, und an seinem Carboxyterminus mit dem Membran-Anker operativ verknüpft ist.

[0107] Ein bevorzugtes Polypeptid dieser Erfindung besteht als variable Domäne im Wesentlichen aus dem Polypeptid der schweren Kette eines Antikörpers. In diesem Zusammenhang bedeutet "besteht im Wesentlichen aus", dass das Polypeptid nicht das Polypeptid der leichten Kette des Antikörpers oder Teile davon beinhaltet. Beispielsweise kann ein solches Polypeptid ein Polypeptid gemäß der Formel (F1) sein, wobei Z den wie hier beschriebenen cpIII-Membran-Anker definiert.

[0108] Wie hier verwendet, bedeutet in Bezug auf Polypeptide der Ausdruck "operativ verknüpft", dass Polypeptidfragmente oder Proteindomänen, die durch Polypeptide repräsentiert werden, kovalent in ein einzelnes Polypeptidpolymer zusammengeführt wurden, bevorzugt durch konventionelle Amidbindungen zwischen den benachbarten Aminosäuren, die im Polypeptid miteinander verknüpft sind.

[0109] In einer möglichen Anordnung stellt V eine Sequenz aus Aminosäuren dar, die die Ligandenbindungsdomäne einer Kette eines heterodimeren Rezeptormoleküls definiert und bevorzugt ein Polypeptid der variablen Region eines Immunglobulins ist. Beispielsweise kann V kein V_H- oder V_L-Polypeptid sein. Die vorliegende Erfindung stellt ein wie in Anspruch 26 beanspruchtes Polypeptid zur Verfügung. In einer bevorzugten mögli-

chen Ausführungsform ist V ein V_H-Polypeptid eines Immunglobulins (Polypeptid der schweren Kette eines Antikörpers), und m und n sind beide null.

[0110] U oder X können eine proteolytische Spaltstelle definieren, wie beispielsweise die in einem Vorläuferprotein gefundene Sequenz aus Aminosäuren, wie etwa Prothrombin, Faktor X und Ähnliches, das die Spaltstelle des Polypeptids definiert. Ein Fusionspolypeptid, das eine Spaltstelle besitzt, stellt ein Mittel zur Aufreinigung des Polypeptids unabhängig von dem Phagenpartikel bereit, an den dieses gebunden ist.

[0111] Die Polypeptidspacer U und X können jeweils jede Sequenz aus Aminosäureresten mit einer Länge von etwa 1 bis 6 Aminosäureresten besitzen. Typischerweise sind die Spacerreste in einem Polypeptid vorhanden, um den kontinuierlichen Leserahmen anzupassen, welcher benötigt wird, wenn ein Polypeptid über die hier beschriebenen Verfahren unter Verwendung eines DNA-Expressionsvektors dieser Erfindung erzeugt wird.

[0112] Ein Rezeptor der vorliegenden Erfindung nimmt eine Konformation an, die eine Bindungsstelle besitzt, die für einen vorgewählten oder vorbestimmten Liganden spezifisch ist, wie beispielsweise ein Antigen, ein Hapten, ein enzymatisches Substrat oder Ähnliches, wie dies durch seine Fähigkeit bewiesen wurde, kompetitiv inhibiert zu werden. In einer möglichen Verwendung der vorliegenden Erfindung kann ein Rezeptor dieser Erfindung ein Liganden-bindendes Polypeptid sein, welches eine Antigenbindungsstelle bildet, die spezifisch an ein vorgewähltes Antigen zur Bildung eines Komplexes bindet, welche eine solche ausreichend starke Bindung zwischen dem Antigen und der Bindungsstelle besitzt, dass der Komplex isoliert werden kann. Ist der Rezeptor ein Antigen-bindendes Polypeptid, so ist seine Affinität oder Avidität grundsätzlich größer als 10^5 M^{-1}, noch eher größer als 10^6 und bevorzugt größer als 10^8 M^{-1}.

[0113] In einer anderen möglichen Verwendung der vorliegenden Erfindung kann ein Rezeptor dieser Erfindung ein Substrat binden und die Bildung eines Produkts aus dem Substrat katalysieren. Während die Topologie der Ligandenbindungsstelle eines katalytischen Rezeptors für seine vorgewählte Aktivität möglicherweise wichtiger ist als für seine Affinität (Assoziationskonstante oder pKa) in Bezug auf das Substrat, besitzen die vorliegenden katalytischen Rezeptoren eine Assoziationskonstante für das vorgewählte Substrat, die grundsätzlich größer ist als 10^3 M^{-1}, noch üblicher größer als 10^5 M^{-1} oder 10^6 M^{-1} und bevorzugt größer als 10^7 M^{-1}.

[0114] Bevorzugt ist der mittels der vorliegenden Erfindung erzeugte Rezeptor heterodimer und umfasst daher normalerweise zwei verschiedene Polypeptidketten, welche gemeinsam eine Konformation einnehmen, die eine Bindungsaffinität oder eine Assoziationskonstante für den vorgewählten Liganden besitzen, die unterschiedlich ist, und bevorzugt höher, als die Affinität oder Assoziationskonstante von jedem der alleinigen Polypeptide, z.B. der Monomere. Der heterodimere Rezeptor wird als Liganden-bindender heterodimerer Rezeptor bezeichnet, um seine Fähigkeit zu vermerken, Liganden zu binden.

[0115] Eine bevorzugte Ausführungsform stellt daher einen Liganden-bindenden heterodimeren Rezeptor bereit, der erste und zweite Polypeptide umfasst, wie in Anspruch 5 beansprucht. Das erste Polypeptid kann zusätzlich zu der carboxyterminalen Membran-Ankerdomäne eines filamentösen Phagen von einer aminoterminalen prokaryotischen Sekretionssignaldomäne flankiert werden. Das zweite Polypeptid kann an eine aminoterminale prokaryotische Sekretionssignaldomäne fusioniert sein. Ein insbesondere bevorzugter Liganden-bindender heterodimerer Rezeptor verwendet ein wie hier beschriebenes prokaryotisches Sekretionssignal.

[0116] Ein Liganden-bindender heterodimerer Rezeptor wird als Epitop-bindender Komplex bezeichnet, um festzuhalten, dass der Komplex eine Kapazität zur Bindung eines Epitops besitzt, der auf dem Liganden vorhanden ist, und um festzuhalten, dass der heterodimere Rezeptor durch Assoziation (Komplexierung) von zwei hier beschriebenen Polypeptiden gebildet wird. Die vorliegende Erfindung stellt daher einen wie in Anspruch 6 beanspruchten Rezeptor zur Verfügung.

[0117] Eine oder beide der verschiedenen Polypeptidketten werden bevorzugt von der variablen Region der leichten und schweren Ketten eines Immunglobulins abgeleitet. Polypeptide, die die leichten (V_L) und die schweren (V_H) variablen Regionen umfassen, werden typischerweise zur Bindung eines vorgewählten Liganden eingesetzt.

[0118] Eine Ausführungsform beschäftigt sich daher eingehend mit einem Liganden-bindenden heterodimeren Rezeptor, in welchem das erste Polypeptid ein Polypeptid einer schweren Kette eines Antikörpers ist und das zweite Polypeptid ein Polypeptid einer leichten Kette. Eine alternative Ausführungsform beschäftigt sich

eingehend mit einem Liganden-bindenden heterodimeren Rezeptor, in welchem das erste Polypeptid das Polypeptid der leichten Kette eines Antikörpers ist und das zweite das Polypeptid der schweren Kette eines Antikörpers. Die vorliegende Erfindung stellt daher einen wie in den Ansprüchen 7 und 8 beanspruchten Rezeptor zur Verfügung.

[0119] Ein mittels der vorliegenden Erfindung erzeugter Rezeptor kann in monomeren wie auch in multimeren Formen aktiv sein, entweder homomer oder heterodimer, bevorzugt heterodimer. Beispielsweise kann ein mittels der vorliegenden Erfindung erzeugtes V_H- und V_L-Liganden-bindendes Polypeptid vorteilhafterweise im Heterodimer kombiniert werden, um die Aktivität von beiden zu modulieren oder um eine für das Heterodimer einzigartige Aktivität zu erzeugen.

[0120] Während die individuellen Polypeptide der Liganden als V_H und V_L bezeichnet werden, kann das Heterodimer als Fv bezeichnet werden. Gleichwohl sollte verstanden werden, dass ein V_H zusätzlich zu V_H im Wesentlichen alle oder einen Teil der konstanten Region der schweren Kette enthalten kann. In ähnlicher Weise kann ein V_L zusätzlich zu V_L im Wesentlichen alles oder einen Teil der konstanten Region der leichten Kette enthalten. Ein Heterodimer, das von einem V_H umfasst wird, welches einen Teil der konstanten Region der schweren Kette enthält und ein V_L, welches alles oder die konstante Region der leichten Kette enthält, wird ein Fab-Fragment genannt. Die Herstellung von Fab kann in einigen Situationen vorteilhaft sein, da die in einem Fab enthaltenen zusätzlichen Sequenzen der konstanten Region im Vergleich zu einem Fv die V_H- und die V_L-Wechselwirkung stabilisieren kann. Solch eine Stabilisierung kann das Fab veranlassen, eine höhere Affinität für ein Antigen zu entwickeln. Zusätzlich wird Fab im Stand der Technik verwendet und es sind daher sind mehr kommerzielle Antikörper erhältlich, um ein Fab in Screeningverfahren spezifisch zu erkennen.

[0121] Die individuellen V_H- und V_L-Polypeptide können in Längen erzeugt werden, die zu ihren natürlicherweise vorkommenden Längen gleich oder im Wesentlichen gleich sind. Gleichwohl werden die V_H- und V_L-Polypeptide in bevorzugen Ausführungsformen grundsätzlich weniger als 125 Aminosäurereste besitzen, noch eher weniger als etwa 120 Aminosäurereste, während sie normalerweise mehr als 60 Aminosäurereste besitzen, gewöhnlich mehr als 95 Aminosäurereste und noch üblicher mehr als 100 Aminosäurereste. Bevorzugt wird V_H eine Länge in einem Bereich von etwa 110 bis etwa 230 Aminosäurereste besitzen, während V_L eine Länge von etwa 95 bis etwa 214 Aminosäureresten besitzen wird. Es werden V_H- und V_L-Ketten bevorzugt, die ausreichend lang sind, um Fabs zu bilden. Die vorliegende Erfindung stellt daher einen wie in den Ansprüchen 9–13 beanspruchten Rezeptor zur Verfügung.

[0122] Die Sequenzen der Aminosäurereste werden daher in Abhängigkeit der einzelnen darin involvierten Idiotypen stark variieren. Gewöhnlicherweise werden mindestens zwei Cysteine durch etwa 60 bis 70 Aminosäurereste voneinander getrennt und durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Die durch die vorliegenden Erfindung erzeugten Polypeptide werden normalerweise im Wesentlichen Kopien von Idiotypen der variablen Regionen der schweren und/oder leichten Ketten von Immunglobulinen sein, jedoch kann ein Polypeptid in manchen Situationen zufällige Mutationen in den Sequenzen der Aminosäurereste enthalten, um die gewünschte Aktivität auf vorteilhafte Weise zu verbessern.

[0123] In einigen Situationen ist es wünschenswert, eine kovalente Querverknüpfung der V_H- und V_L-Polypeptide bereitzustellen, welche durch die Bereitstellung von Cysteinresten am Carboxyterminus erreicht werden kann. Die Polypeptide werden üblicherweise frei von konstanten Regionen der Immunglobuline hergestellt, wobei gleichwohl ein kleiner Teil der J-Region als Ergebnis der vorteilhaften Selektion durch DNA-Syntheseprimer enthalten sein kann. Die D-Region wird üblicherweise im Transkript von V_H mit eingeschlossen sein.

[0124] Typischerweise wird die Region des C-Terminus der V_H- und V_L-Polypeptide eine größere Variation an Sequenzen besitzen als der N-Terminus und diese kann in Abhängigkeit der vorliegenden Strategie weiter modifiziert werden, um eine Variation der üblicherweise vorkommenden V_H- und V_L-Ketten zu ermöglichen. Es kann ein synthetisches Polynukleotid verwendet werden, um eine oder mehrere Aminosäuren in einer hypervariablen Region zu variieren.

E. Verfahren zur Herstellung einer Bibliothek

1. Allgemeine Grundprinzipien

[0125] Die vorliegende Erfindung kann ebenfalls in einem System für die gleichzeitige Klonierung und Screening von vorselektierten Liganden-bindenden Spezifitäten aus Genrepertoiren unter Verwendung eines einzelnen Vektorsystems nützlich sein. Dieses System kann eine Verknüpfung von Klonierungs- und Screeningver-

fahren bereitstellen und besitzt zwei Voraussetzungen. Erstens, dass die Expression der Polypeptidketten eines heterodimeren Rezeptors in einem in vitro Expressionswirt wie beispielsweise E. coli die Koexpression der zwei Polypeptidketten erfordert, so dass sich ein funktionaler heterodimerer Rezeptor anordnen kann, um einen Rezeptor zu erzeugen, der an einen Liganden bindet. Zweitens, dass das Screening von isolierten Bestandteilen der Bibliothek auf eine vorgewählte Liganden-bindende Kapazität ein Mittel erfordert, um (eine Verknüpfung) die Bindungskapazität eines exprimierten Rezeptormoleküls mit einem geeigneten Mittel zur Isolierung des Gens in Verbindung zu bringen, das diesen Bestandteil der Bibliothek kodiert.

[0126] Eine Verknüpfung von Expression und Screening wird durch die Kombination der Leitung eines Fusionspolypeptids in das Periplasma einer bakteriellen Zelle zur Ermöglichung der Anordnung eines funktionalen Rezeptors, und durch das Leiten eines Fusionspolypeptides auf die Beschichtung eines Partikels eines filamentösen Phagen während der Anordnung des Phagen ermöglicht, um ein geeignetes Screening desjenigen Bestandteils der Bibliothek zu ermöglichen, welches von Interesse ist. Die Leitung ins Periplasma wird durch die Anwesenheit einer Sekretionssignaldomäne in einem Fusionspolypeptid gemäß dieser Erfindung bereitgestellt. Die Leitung hin zu einem Phagenpartikel wird durch die Anwesenheit einer Membran-Ankerdomäne eines Beschichtungsproteins eines filamentösen Phagen (d.h. eine von cpIII- oder cpVIII-abgeleitete Membran-Ankerdomäne) in einem Fusionspolypeptid dieser Erfindung bereitgestellt.

[0127] Die vorliegende Erfindung stellt in einer Ausführungsform ein Verfahren zur Herstellung einer Bibliothek dicistronischer wie in Anspruch 31 beanspruchter DNA-Moleküle zur Verfügung.

[0128] In dieser Ausführungsform liegt das Repertoire der Polypeptid-kodierenden Gene in der Form von doppelsträngiger (ds) DNA vor und jedes Mitglied des Repertoires besitzt für die gerichtete Ligation adaptierte kohäsive Enden. Weiterhin sind der größte Teil der DNA-Expressionsvektoren jeweils lineare DNA-Moleküle, die stromaufwärts und stromabwärts gelegene kohäsive Enden besitzen, welche (a) für die gerichtete Aufnahme der Polypeptidgene in einem üblichen Leserahmen adaptiert wurden und (b) mit den stromaufwärts und stromabwärts gelegenen translatierbaren DNA-Sequenzen operativ verknüpft sind. Die stromaufwärts gelegene translatierbare DNA-Sequenz kodiert ein Sekretionssignal, bevorzugt ein pelB-Sekretionssignal, und die stromabwärts gelegene translatierbare DNA-Sequenz kodiert einen Membran-Anker eines Beschichtungsproteins eines filamentösen Phagen, wie hier für ein Polypeptid dieser Erfindung beschrieben. Die translatierbaren DNA-Sequenzen sind ebenfalls mit den jeweiligen stromaufwärts gelegenen und stromabwärts gelegenen DNA-Expressionskontrollsequenzen operativ verknüpft, wie für den hier beschriebenen DNA-Expressionsvektor definiert.

[0129] Die so erzeugte Bibliothek kann für die Expression und das Screening der Fusionspolypeptide verwendet werden, die durch die erhaltene Bibliothek aus Cistronen kodiert wird, die in der Bibliothek durch die hier beschriebenen Expressions- und Screeningsverfahren repräsentiert werden.

2. Herstellung von Genrepertoiren

[0130] Ein Genrepertoire ist eine Sammlung verschiedener Gene, bevorzugt von Polypeptidkodierenden Genen (Polypeptidgene), und kann aus natürlichen Quellen isoliert oder künstlich erzeugt werden. Bevorzugte Genrepertoire umfassen konservierte Gene. Insbesondere bevorzugte Genrepertoire umfassen eines oder beide Gene, die für die Mitglieder eines dimeren Rezeptormoleküls kodieren.

[0131] Ein für die Durchführung der vorliegenden Erfindung verwendbares Genrepertoire enthält mindestens 10^3, bevorzugt mindestens 10^4, noch bevorzugter mindestens 10^5 und am stärksten bevorzugt mindestens 10^7 verschiedene Gene. Verfahren zur Bewertung der Vielfalt eines Genrepertoires sind einem Fachmann gut bekannt.

[0132] In einer Ausführungsform beschäftigt sich die vorliegende Erfindung daher eingehend mit einem Verfahren zur Isolierung eines Genpaares, das für einen dimeren Rezeptor mit einer vorgewählten Aktivität kodiert, aus einem Repertoire aus konservierten Genen Weiterhin wird ebenfalls die Expression des klonierten Genpaares und die Isolierung des erhaltenen exprimierten dimeren Rezeptorproteins beschrieben. Der Rezeptor wird bevorzugt ein heterodimeres Polypeptid sein, das in der Lage ist, einen Liganden zu binden, wie beispielsweise ein Antikörpermolekül oder ein immunologisch aktiver Teil davon, ein zellulärer Rezeptor oder ein zelluläres Adhäsionsprotein, das durch eines der Mitglieder einer Familie an konservierten Genen kodiert wird, z.B. von Genen, die eine konservierte Nukleotidsequenz mit einer Länge von mindestens 10 Nukleotiden besitzen.

[0133] Beispielhaft konservierte Genfamilien, die verschiedene Polypeptidketten eines dimeren Rezeptors kodieren, sind solche, die für Immunglobuline, für Antigene des großen Histokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex antigens) der Klassen I oder II, für Lymphozytenrezeptor, für Integrine und Ähnliches kodieren.

[0134] Ein Gen kann unter Verwendung verschiedener Verfahren als zu einem Repertoire von konservierten Genen gehörend identifiziert werden. Beispielsweise kann ein isoliertes Gen als Hybridisierungssonde unter Bedingungen geringer Stringenz verwendet werden, um andere Mitglieder des Repertoires konservierter in genomischer DNA vorhandener Gene unter Verwendung der von Southern, J. Mol. Biol., 98: 503 (1975) beschriebenen Verfahren zu detektieren. Falls das Gen, welches als Hybridisierungssonde verwendet wurde, an multiple Restriktionsendonukleasefragmente des Genoms hybridisiert, ist das Gen das Mitglied eines Repertoires konservierter Genen.

Immunglobuline

[0135] Die Immunglobuline oder Antikörpermoleküle sind eine große Familie von Molekülen, welche verschiedene Arten von Molekülen, wie beispielsweise IgD, IgG, IgA, IgM und IgE, mit einschließen. Das Antikörpermolekül umfasst typischerweise zwei schwere (H) und leichte (L) Ketten mit jeweils einer variablen (V) und einer konstanten (C) Region, die, wie in **Fig. 1** gezeigt, in jeder Kette vorhanden sind. Schematische Diagramme der schweren Kette von humanem IgG und der humanen leichten (kappa) Kette werden in den **Fig. 2A** und **Fig. 2B** gezeigt. Verschiedene unterschiedliche Regionen eines Immunglobulins enthalten konservierte Sequenzen, die zur Isolierung eines Immunglobulinrepertoires nützlich sind. Von Kabat et al. wurden in Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 für Immunglobulinmoleküle ausgedehnte Sequenzdaten von Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzen zusammengestellt, die beispielhaft konservierte Sequenzen aufweisen.

[0136] Die C-Region der H-Kette definiert im den besonderen Immunglobulintyp. Eine Auswahl der hier definierten konservierten Sequenzen der C-Region der H-Kette führt daher zur Herstellung eines Repertoires an Immunglobulingenen, das Mitglieder des Immunglobulintyps der ausgewählten C-Region aufweist.

[0137] Die V-Region der H- oder L-Kette umfasst typischerweise vier Gerüstregionen (FR, framework regions), die jeweils verhältnismäßig geringere Anteile der Variabilität enthalten, welche Abschnitte von konservierten Sequenzen mit einschließen. Eine bevorzugte beispielhafte Ausführungsform stellt die Verwendung konservierter Sequenzen aus den FR1- und FR4- (J-Region) Regionen der V_H-Kette dar und wird hier in den Beispielen beschrieben. Gerüstregionen sind typischerweise über einige oder alle Immunglobulintypen konserviert und darin konservierte Sequenzen sind daher insbesondere zur Herstellung von Repertoiren geeignet, die verschiedene Immunglobulintypen aufweisen.

Major-Histocompatibility-Komplex

[0138] Der Major-Histocompatiblity-Komplex (MHC) ist ein großer genetischer Locus, der eine ausdehnte Familie aus Proteinen kodiert, die verschiedene Klassen an Molekülen mit einschließt, welche als Klasse I-, Klasse II- oder Klasse III-MHC-Molekül bezeichnet werden. Paul et al., in Fundamental Immunology, Raven Press, NY, S. 303–378 (1984).

[0139] Moleküle der MHC-Klasse I sind eine polymorphe Gruppe von Transplantationsantigenen, die eine konservierte Familie darstellen, in welcher das Antigen eine schwere Kette und eine nicht durch MHC kodierte leichte Kette umfasst. Die schwere Kette schließt verschiedene Regionen mit ein, die als die N, C1, C2, Membran und zytoplasmische Regionen bezeichnet werden. Konservierte Sequenzen, die in der vorliegenden Erfindung verwendbar sind, werden hauptsächlich in den N-, C1- und C2-Regionen gefunden und als kontinuierliche Sequenzen von "invarianten Resten" in Kabat et al., supra, identifiziert.

[0140] Moleküle der MHC-Klasse II umfassen eine konservierte Familie polymorpher Antigene, die an der Immunantwort teilhaben und eine alpha- und eine beta-Kette umfassen. Die für die alpha- und beta-Kette kodierenden Moleküle schließen verschiedene Regionen mit ein, die konservierte Sequenzen enthalten, welche für die Erzeugung von Repertoiren der alpha- oder der beta-Kette aus der MHC-Klasse II geeignet sind. Beispielhafte konservierte Nukleotidsequenzen schließen solche mit ein, die für Aminosäurereste 26–30 der A1-Region kodieren, sowie für die Reste 161–170 der A2-Region und die Reste 195–206 der Membran-Region, welche alle aus der alpha-Kette stammen. Konservierte Sequenzen sind ebenfalls in der B1-, B2- und den Membran-Regionen der beta-Kette bei Nukleotidsequenzen vorhanden, die für die Aminosäurereste 41–45, 150–162

und 200–209 kodieren.

Lymphozytrezeptoren und Zelloberflächenantigene

[0141] Lymphozyten enthalten auf ihren Zelloberflächen verschiedene Familien an Proteinen, einschließlich dem T-Zellrezeptor, dem Thy-1-Antigen und verschiedenen Zelloberflächenantigenen, einschließlich den durch die monoklonalen Antikörper OKT4 (leu3), OKT5/8 (leu2), OKT3, OKT1 (leu1), OKT 11 (leu5), OKT6 und OKT9 definierten Antigenen. Paul, supra, siehe S. 458–479.

[0142] Der T-Zellrezeptor ist ein Begriff, der für für eine Familie aus Antigen-bindenden Molekülen verwendet wird, die auf der Oberfläche von T-Zellen gefunden werden. Der T-Zellrezeptor als Familie zeigt eine polymorphe Bindungsspezifität, die in ihrer Artenvielfalt zu den Immunglobulinen ähnlich ist. Der reife T-Zellrezeptor umfasst alpha- und beta-Ketten, die jeweils eine variable (V) und eine konstante (C) Region besitzen. Die Ähnlichkeiten, die der T-Zellrezeptor zu Immunglobulin bei der genetischen Organisation und der Funktion besitzt, zeigt, dass der T-Zellrezeptor Regionen konservierter Sequenzen enthält. Lai et al., Nature, 331: 543–546 (1988).

[0143] Beispielhaft konservierte Sequenzen schließen solche mit ein, die für die Aminosäurereste 84–90 der alpha-Kette kodieren, sowie für die Aminosäurereste 107-115 der beta-Kette und für die Aminosäurereste 91–95 und 111–116 der gamma-Kette. Kabat et al., supra, S. 279.

Integrine und Adhäsionen

[0144] Adhäsive Proteine, die bei der Zellanlagerung beteiligt sind, sind Mitglieder einer großen Familie von miteinander verwandten Proteine, die Integrine genannt werden. Integrine sind Heterodimere, die eine beta- und eine alpha-Untereinheit umfassen. Mitglieder der Integrinfamilie schließen die Zelloberflächenglycoproteine wie den Thrombozytenrezeptor GpIIb-IIIa, den Vitronectinrezeptor (VnR), den Fibronectinrezeptor (FnR) und die Leukozytadhäsionsrezeptoren LFA-1, Mac-1, Mo-1 und 60.3 mit ein. Rouslahti et al., Science, 238: 491–497 (1987). Nukleinsäure- und Proteinsequenzdaten zeigen, dass Bereiche konservierter Sequenzen in den Mitgliedern dieser Familien auftreten, insbesondere zwischen der beta-Kette von GpIIb-IIIa, VnR und FnR, und zwischen der alpha-Untereinheit von VnR, Mac-1, LFA-1, FnR und GpIIb-IIIa. Suzuki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 8614–8618, 1986; Ginsberg et al., J. Biol. Chem., 262: 5437–5440, 1987.

[0145] Es können verschiedene gut bekannte Verfahren verwendet werden, um ein nützliches Genrepertoire herzustellen. Beispielsweise können V_H- und V_L-Genrepertoire durch Isolierung von V_H- und V_L-kodierender mRNA aus heterogenen Populationen von Antikörper erzeugten Zellen, z.B. B-Lymphozyten (B-Zellen) hergestellt werden, bevorzugt von neu angeordneten B-Zellen, wie solche, die im Blutkreislauf oder der Milz eines Vertebraten gefunden werden. Neu angeordnete B-Zellen sind solche, in welchen die Translokation des Immunglobulingens, z.B. durch Reorganisation, erfolgt ist, wie dies durch die Anwesenheit von mRNA mit dazu benachbart lokalisierten Transkripten der V-, D- und J-Region des Immunglobulingens gezeigt wurde. Typischerweise werden die B-Zellen in einer 1–100 ml-Blutprobe gesammelt, welche gewöhnlich 10^6 B-Zellen/ml enthält.

[0146] In einigen Fällen ist es wünschenswert, ein Repertoire in Bezug auf eine vorgewählte Aktivität zu beeinflussen, wie beispielsweise unter Verwendung einer Quelle aus Nukleinsäure enthaltenden Zellen (Ursprungszellen) aus Vertebraten in jeder der verschiedenen Altersstufen, der Gesundheit und der Immunantwort. Beispielsweise führt die wiederholte Immunisierung eines gesunden Tieres zur Sammlung neu angeordneter B-Zellen zu einem Repertoire, das mit genetischem Material angereichert ist, welches einen Rezeptor mit hoher Affinität erzeugt. Mullinax et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8095–8099 (1990). Umgekehrt führt die Sammlung von neu geordneten B-Zellen aus einem gesunden Tier, dessen Immunsystem kürzlich nicht beansprucht wurde (d.h. ein naives Immunsystem), zur Erzeugung eines Repertoires, das nicht in Bezug auf die Erzeugung von V_H- und/oder V_L-Polypeptiden mit hoher Affinität beeinflusst wurde.

[0147] Es sollte festgehalten werden, dass, je größer die genetische Heterogenität der Zellpopulationen sind, für die Nukleinsäuren erhalten werden, desto größer ist die Artenvielfalt des immunologischen Repertoires (umfassend V_H- und V_L-kodierende Gene), welche zum Screening nach einem Verfahrens der vorliegenden Erfindung zugänglich gemacht werden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden daher die Ursprungszellen aus einem Vertebraten erhalten, welcher mit einem antigenen Liganden (Antigen), gegen den eine Aktivität gesucht wird, z.B. ein vorselektiertes Antigen, immunisiert oder teilweise immunisiert wurde. Die Immunisierung kann auf konventionelle Art und Weise durchgeführt werden. Es kann der Antikörpertiter im Tier be-

obachtet werden, um das Stadium der gewünschten Immunisierung zu bestimmen, wobei das Stadium zur Menge der Anreicherung oder Beeinflussung des gewünschten Repertoires korrespondiert. Teilweise immunisierte Tiere erhalten üblicherweise nur eine Immunisierung und die Zellen werden auf diesen Tieren gesammelt, kurz nachdem eine Antwort detektiert wurde. Vollständig immunisierte Tiere zeigen einen Höchstwert im Titer, welcher durch eine oder mehrmalig wiederholte Injektionen des Antigens in das Wirtstier, gewöhnlicherweise in 2 bis 3 Wochenintervallen, erreicht wird. Gewöhnlicherweise wird drei bis fünf Tage nach der letzten Exposition die Milz entfernt und das genetische Repertoire der Splenozyten, von denen 90 % als neu angeordnete Zellen vorliegen, wird unter Verwendung von Standardverfahren isoliert. Siehe Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., Hrsg., John Wiley & Sons, NY. Die für die V_H- und V_L- Polypeptide kodierenden Nukleinsäuren können aus Zellen erhalten werden, die IgA, IgD, IgE, IgG oder IgM erzeugen, am stärksten bevorzugt aus Zellen, die IgM und IgG erzeugen.

[0148] Im Stand der Technik sind Verfahren zur Herstellung von Fragmenten genomischer DNA, aus welchen die Gene der variablen Region von Immunoglobulin als artenreiche Population kloniert werden können, gut bekannt. Siehe beispielsweise Herrmann et al., Methods In Enzymol., 152: 180–183, (1987); Frischauf, Methods In Enzymol., 152: 183-190 (1987); Frischauf, Methods In Enzymol., 152: 190–199 (1987); und DiLella et al., Methods In Enzymol., 152: 199–212 (1987).

[0149] Das gewünschte Genrepertoire kann entweder aus genomischem Material isoliert werden, das das Gen enthält, das die variable Region oder die Messenger-RNA (mRNA) exprimiert, die ein Transkript der variablen Region darstellt. Die Schwierigkeit bei der Verwendung einer anderen genomischen DNA als die von nichtneuangeordneten B-Lymphozyten, ist es die für die variable Region kodierenden Sequenzen nebeneinander zu positionieren, wobei die Sequenzen durch Introns getrennt werden. Die DNA-Fragmente, die die richtigen Exons enthalten, müssen isoliert werden, die Introns müssen ausgeschnitten werden, und die Exons müssen anschließend in der richtigen Reihenfolge und in der korrekten Orientierung einem Splicing unterworfen werden. In den meisten Fällen wird dies schwierig sein, so dass alternative Verfahrensweisen und Verwendung von neu angeordneten B-Zellen das Mittel der Wahl darstellen, da die V-, D- und J-Genregionen von Immunglobulin so verschoben wurden, dass sie nebeneinander liegen, und dass die Sequenz für die gesamten variablen Regionen kontinuierlich ist (frei von Introns).

[0150] Dort, wo mRNA verwendet wird, werden die Zellen unter RNAs-inhibierenden Bedingungen lysiert. In einer Ausführungsform ist der erste Schritt die Isolierung der gesamten zellulären mRNA. Poly A+ mRNA kann anschließend mittels Hybridisierung an Oligo-dT-Cellulosesäulen ausgewählt werden. Die Anwesenheit von mRNAs, die für Polypeptide der schweren und/oder der leichten Kette kodieren, können anschließend mittels Hybridisierung mit DNA-Einzelsträngen der geeigneten Gene getestet werden. Praktischerweise können die für die konstante Region von V_H- und V_L-kodierenden Sequenzen als Polynukleotidsonden verwendet werden, wobei die Sequenzen aus verfügbaren Quellen erhalten werden können. Siehe beispielsweise Early und Hood, Genetic Engineering, Setlow und Hollaender, Hrsg., Bd. 3, Plenum Publishing Corporation, NY, (1981), Seiten 157–188; und Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1987).

[0151] In bevorzugten Ausführungsformen wird die Präparation, die die gesamte zelluläre mRNA enthält, auf das Auftreten von V_H- und/oder V_L-kodierender mRNA hin angereichert. Die Anreicherung wird typischerweise durch die Durchführung einer Primerextension-Reaktion mit der Gesamt-RNA-Präparation oder dem daraus teilweise aufgereinigten mRNA-Produkt unter Verwendung eines hier beschriebenen Polynukleotidsyntheseprimers durchgeführt. Beispielhafte Verfahren zur Herstellung von V_H- und V_L-Genrepertoiren unter Verwendung von Polynukleotidsyntheseprimern werden in der PCT-Anmeldung Nr. PCT/US90/02836 (Internationale Anmeldung Nr. WO 90/14430) beschrieben. Insbesondere werden Verfahren zur Herstellung eines Genrepertoires bevorzugt, die auf der Verwendung vorselektierter Oligonukleotide als Primer in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Bildung von hier beschriebenen PCR-Reaktionsprodukten basieren.

[0152] In bevorzugten Ausführungsformen werden isolierte B-Zellen gegen ein vorgewähltes Antigen in vitro immunisiert. Eine in vitro Immunisierung wird als die klonale Expansion von Epitop-spezifischen B-Zellen in Kultur definiert (in Antwort auf die Antigenstimulierung). Das Endergebnis ist die Steigerung der Häufigkeit von Antigenspezifischen B-Zellen im Immunglobulinrepertoire, und dadurch bedingt die Abnahme an Klonen in einer Expressionsbibliothek, die auf die Identifikation eines Klones hin gesreent werden muß, der ein Antikörper der gewünschten Spezifität exprimiert. Der Vorteil einer in vitro Immunisierung liegt darin, dass humane monoklonale Antikörper gegen eine unbegrenzte Anzahl therapeutisch wertvoller Antigene erzeugt werden kann, einschließlich toxischer oder schwacher Immunogene. Beispielsweise können Antikörper erzeugt werden, die spezifisch für polymorphe Determinanten tumorassoziierte Antigene sind, sowie rheumatoide Faktoren, und

Histokompatibilitätsantigene, welche in immunisierten Tieren nicht erzeugt werden können. Zusätzlich könnte es möglich sein, Immunantworten zu generieren, die üblicherweise in vivo unterdrückt werden.

[0153] Eine in vitro Immunisierung kann verwendet werden, um entweder eine primäre oder eine sekundäre Immunantwort zu verursachen. Eine primäre Immunantwort, die aus der erstmaligen Exposition einer B-Zelle mit einem Antigen resultiert, führt zur klonalen Expansion Epitop-spezifischer Zellen und zur Sekretion von IgM-Antikörpern mit niedrigen bis moderaten scheinbaren Affinitätkonstanten (10^6–10^8 M^{-1}). Die primäre Immunisierung humaner Lymphozyten aus der Milz und den Mandeln in Kultur kann zur Erzeugung monoklonaler Antikörper gegen eine Vielzahl von Antigenen verwendet werden, einschließlich Zellen, Peptiden, Makromolekülen, Haptenen, und Tumorassoziierten Antigenen. Memory-B-Zellen aus immunisierten Spendern können ebenfalls in Kultur so stimuliert werden, dass sie zu einer sekundären Immunantwort führen, die durch eine klonale Expansion und durch die Erzeugung hochaffiner Antikörper (>10^9 M^{-1}) des IgG-Isotyps führen, insbesondere gegen virale Antigene durch die klonale Expansion sensitivierter Lymphozyten, die aus seropositiven Individuen stammen.

[0154] In einer Ausführungsform werden periphere Blutlymphozyten aus verschieden zytolytischen Zellen vermindert, die scheinbar die Antigen-spezifische B-Zellaktivierung herunter regulieren. Werden an Lysosomen reiche Subpopulationen (natürliche Killerzellen, zytotoxische und Supressor-T-Zellen, Monozyten) zuerst durch Behandlung mit dem lysosmotrophischen Methylester von Leucin entfernt, antworten die verbleibenden Zellen (einschließlich B-Zellen, T-Helferzellen, Nebenzellen) während der in vitro Immunisierung Antigen-spezifisch. Die lymphokinen Voraussetzungen für die Induktion einer Antikörperherstellung in Kultur werden von einem Kulturüberstand aus aktivierten, bestrahlten T-Zellen erfüllt.

[0155] Zusätzlich zur in vitro-Immunisierung kann ein Zell-Panning (Immunoaffinitätsabsorption) zum weiteren Anstieg in der Häufigkeit von Antigen-spezifischen B-Zellen verwendet werden. Verfahren zur Selektion von B-Zell-Subpopulationen über die Antigenbindung an der Festphase sind gut etabliert. Verfahren zum Schwenken können so optimiert werden, dass sie B-Zellen selektiv anreichern, welche mit hoher Affinität an eine Vielzahl von Antigenen binden, einschließlich Zelloberflächenproteine. Das Panning kann alleine oder in Kombination mit einer in vitro-Immunisierung verwendet werden, um die Häufigkeit von Antigen-spezifischen Zellen über solche Werte zu steigern, die mit jeder der beiden Techniken allein erhalten werden können. Immunglobulinexpressionsbibliotheken, die aus angereicherten B-Zellpopulationen konstruiert wurden, werden in Richtung Antigen-spezifischer Antikörperklone beeinflusst, und ermöglichen daher die Identifizierung von Klonen der gewünschten Spezifitäten aus kleineren, weniger komplexen Bibliotheken.

[0156] In einer Ausführungsform können periphere Blutlymphozyten (PBL) in streng miteinander kombinierte Immunodefizienz (SCID, severe combined immunodeficiency)-Mäuse transferiert werden und in den SCID-Mäusen anschließend verstärkt werden, um die Immunantwort vor der Ernte der die schwere und leichte Kette kodierenden Nukleinsäuren aus den B-Zellen der SCID-Mäuse zu steigern. Siehe beispielsweise Duchosal et al., Nature, 355: 258–262 (1992). In diesem Bericht wurden humane PBLs aus einem Spender verstärkt, der anti-Tetanus-toxoide (TT) Titer aufwies, während diese im SCID-Mauswirt waren. Die erhaltene Bibliothek aus 370000 Klonen führte zu 2 Phagenpartikeln, welche ein Oberflächen-Fab exprimierte, das in der Lage war, TT zu binden.

3. Herstellung von Polynukleotidprimern

[0157] Der Begriff "Polynukleotid", wie hier in Bezug auf Primer, Sonden und Nukleinsäurefragmente oder -segmente verwendet, die mittels Primerextension synthetisiert werden sollen, wird als Molekül definiert, das zwei oder mehr Desoxyribonukleotide oder Ribonukleotide umfasst, bevorzugt mehr als 3. Seine genaue Größe wird von vielen Faktoren abhängen, welche wiederum von den letztendlichen Verwendungsanforderungen abhängen.

[0158] Der Begriff "Primer", wie hier verwendet, bezieht sich auf ein entweder aus einem Nukleinsäurerestriktionsverdau aufgereinigtes oder auf ein Ssynthetisch erzeugtes Polynukleotid, welches in der Lage ist, als Startpunkt der Nukleinsäuresynthese zu agieren, wenn es solchen Bedingungen ausgesetzt wird, in welchen die Synthese eines Primerextensionproduktes induziert wird, das zu einem Nukleinsäurestrang komplementär ist, z.B. in Anwesenheit von Nukleotiden und einem Agens für die Polymerisation, wie beispielsweise einer DNA-Polymerase, einer reversen Transkriptase und Ähnlichem, sowie bei einer geeigneten Temperatur und einem geeignetem pH. Der Primer ist für die maximale Effektivität bevorzugt einzelsträngig, jedoch kann dieser alternativ in einer doppelsträngigen Form vorliegen. Falls er doppelsträngig ist, wird der Primer zuerst so behandelt, dass dieser von seinem komplementären Strang vor der Verwendung zur Herstellung von Extensions-

produkten abgetrennt wird. Bevorzugt ist der Primer ein Polydesoxyribonukleotid. Der Primer muss eine ausreichende Länge besitzen, um zur Synthese von Extensionsprodukten in der Anwesenheit der Polymerisationsagenzien zu dienen. Die genauen Längen der Primer werden von vielen Faktoren abhängen, einschließlich der Temperatur und der Herkunft der Primer. Beispielsweise wird in Abhängigkeit der Komplexität der Zielsequenz ein Polynukleotidprimer üblicherweise 15 bis 25 oder mehr Nukleotide enthalten, obwohl dieser weniger Nukleotide enthalten kann. Kurze Primermoleküle benötigen grundsätzlich kühlere Temperaturen, um ausreichend stabile Hybridkomplexe mit dem Template auszubilden.

[0159] Die hier verwendeten Primer werden so ausgewählt, dass sie zu den verschiedenen Strängen jeder zu synthetisierenden oder amplifizierenden spezifischen Sequenz "im Wesentlichen" komplementär sind. Dies bedeutet, dass der Primer ausreichend komplementär sein muss, um nicht in zufälliger Weise mit seinem jeweiligen Zielstrang zu hybridisieren. Die Primersequenz kann daher die genaue Sequenz des Ziels widerspiegeln oder auch nicht. Beispielsweise kann ein nicht-komplementäres Nukleotidfragment an das 5'-Ende des Primers angelagert werden, wobei der Rest der Primersequenz im Wesentlichen zum Strang komplementär ist. Solche nicht-komplementären Fragmente kodieren üblicherweise für eine Restriktionsschnittstelle einer Endonuklease. Alternativ können in den Primern nicht-komplementäre Basen oder längere Sequenzen unter der Voraussetzung mit eingebracht werden, dass die Primersequenz eine so ausreichende Komplementarität mit dem zu synthetisierenden oder zu amplifizierenden Strang besitzt, dass sie in nicht-zufälliger Weise damit hybridisiert und dabei unter Bedingungen der Polynukleotidsynthese ein Extensionsprodukt ausbildet.

[0160] Primer für die vorliegende Erfindung können ebenfalls eine DNA-abhängige RNA-Polymerasepromotorsequenz oder ihr Komplement enthalten. Siehe beispielsweise Krieg et al., Nucl. Acids Res., 12: 7057–70 (1984); Studier et al., J. Mol. Biol., 189: 113-130 (1986); und Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Maniatis et al., Hrsg., Cold Spring Harbor, NY (1989).

[0161] Wird ein Primer verwendet, der einen DNA-abhängigen RNA-Polymerasepromotor enthält, wird der Primer mit dem zu amplifizierenden Polynukleotidstrang hybridisiert und der zweite Polynukleotidstrang des DNA-abhängigen RNA-Polymerasepromotors wird unter Verwendung eines induzierenden Agens, wie beispielsweise E. coli-DNA-Polymerase I, oder Klenow-Fragment aus E. coli-DNA-Polymerase, vervollständigt. Das Startpolynukleotid wird durch den Wechsel zwischen der Herstellung eines RNA-Polynukleotids und eines DNA-Polynukleotids amplifiziert.

[0162] Primer können ebenfalls eine Zielsequenz oder eine Startstelle für die Replikation mittels einer RNA-gesteuerten RNA-Polymerase enthalten. Typische RNA-gesteuerte RNA-Polymerase schließt die von Lizardi et al., Biotechnology, 6: 1197–1202 (1988) beschriebene QB-Replikase mit ein. RNA-gesteuerte Polymerasen erzeugen eine große Anzahl an RNA-Strängen aus einer geringen Anzahl an Ziel-RNA-Strängen, die eine Zielsequenz oder eine Initiationsstelle für die Replikation enthalten. Diese Polymerasen ergeben typischerweise eine millionenfache Amplifikation des Zielstrangs, wie es durch Kramer et al., J. Mol. Biol., 89: 719–736 (1974) beschrieben wurde.

[0163] Die Polynukleotidprimer können unter Verwendung jedes geeigneten Verfahrens, wie beispielsweise Phosphotriester- oder Phosphodiesterverfahren hergestellt werden; siehe auch Narang et al., Meth. Enzymol., 58: 90, (1979); US-Patent Nr. 4,356,270; und Brown et al., Meth. Enzymol., 68: 109, (1979).

[0164] Die Wahl der Nukleotidsequenz des Primers hängt von Faktoren ab, wie beispielsweise der Entfernung der Nukleinsäure aus der Region, die für den gewünschten Rezeptor kodiert, von dessen Hybridisierungsstelle auf der Nukleinsäure im Verhältnis zu jedem zu verwendenden zweiten Primer, von der Anzahl der Gene im Repertoire, an die es zu hybridisieren ist, und Ähnlichem.

a. Primer zur Erzeugung eines Repertoires aus Immunglobulingenen

[0165] V_H- und V_L-Genrepertoire können vor ihrer Verwendung in der vorliegenden Erfindung getrennt voneinander hergestellt werden. Die Herstellung eines Repertoires wird typischerweise mittels Primerextension durchgeführt, bevorzugt mittels Primerextension im Rahmen einer Polymerasekettenreaktion (PCR).

[0166] Um ein Repertoire eines V_H-kodierenden DNA-Homologs mittels Primerextension herzustellen, wird die Nukleotidsequenz eines Primers so ausgewählt, dass sie mit einer Vielzahl von Genen der schweren Kette von Immunglobulin an einer Stelle hybridisiert, die im Wesentlichen zur V_H-kodierenden Region benachbart ist, so dass die für ein funktionelles (bindungsfähiges) Polypeptid kodierende Nukleotidsequenz erhalten wird. Um an eine Vielzahl verschiedener V_H-kodierender Nukleinsäurestränge zu hybridisieren, muss der Primer im We-

sentlichen ein Komplement einer Nukleotidsequenz sein, die unter den verschiedenen Strängen konserviert ist. Solche Stellen schließen Nukleotidsequenzen in der konstanten Region, in jeder der variablen Regionen der Gerüstregionen, bevorzugt der dritten Gerüstregion, in der Leitregion, der Promotorregion, der J-Region und Ähnlichem mit ein.

[0167] Falls die Repertoire an V_H-kodierenden und V_L-kodierenden DNA-Homologen mittels (PCR-) Amplifikation erzeugt werden sollen, müssen zwei Primer, d.h. ein PCR-Primerpaar, für jeden kodierenden Strang an einer zu amplifizierenden Nukleinsäure verwendet werden. Der erste Primer ist Bestandteil des Nonsense (Minus- oder Komplementär)-Stranges und hybridisiert an eine Nukleotidsequenz, die zwischen den V_H- (plus- oder kodierenden)-Strängen innerhalb des Repertoires konserviert ist. Um V_H-kodierende DNA-Homologe zu erzeugen, werden daher erste Primer so ausgewählt, dass sie mit konservierten Regionen innerhalb der J-Region, der CH1-Region, der Gelenksregion, der CH2-Region, oder der CH3-Region von Immunglobulingenen oder Ähnlichem hybridisieren. Um ein V_L-kodierendes DNA-Homolog zu erzeugen, werden erste Primer so ausgewählt, dass sie mit einer konservierten Region innerhalb der J-Region oder der konstanten Region von Genen der leichten Kette von Immunglobulin und Ähnlichem hybridisieren. Zweite Primer werden Bestandteil des kodierenden (Plus-) Stranges und hybridisieren an eine Nukleotidsequenz, die unter den Minussträngen konserviert ist. Um die V_H-kodierenden DNA-Homologe zu erzeugen, werden daher zweite Primer so ausgewählt, dass sie mit einer konservierten Nukleotidsequenz am 5'-Ende des V_H-kodierenden Immunglobulingens in einem Bereich hybridisieren, wie beispielsweise dem für die Leitsequenz kodierenden Bereiche oder dem Bereich der ersten Gerüstregion. Es sollte festgehalten werden, dass bei der Amplifikation von sowohl V_H- als auch V_L-kodierenden DNA-Homologen die konservierte 5'-Nukleotidsequenz des zweiten Primers zu einer Sequenz komplementär sein kann, die unter Verwendung einer terminalen Desoxynukleotidyltransferase exogen zugegeben wurde, wie beispielsweise durch Loh et al., Science, 243: 217–220 (1989) beschrieben. Eine oder beide der ersten oder zweiten Primer können eine Nukleotidsequenz enthalten, die eine Endonukleaseerkennungsstelle enthält. Diese Stelle kann zu dem zu amplifizierenden Immunglobulingen heterolog sein und erscheint typischerweise am oder nahe zum 5'-Ende des Primers.

[0168] Falls vorhanden, befindet sich der den Restriktionsstelle definierende Anteil typischerweise in einem 5'-terminalen nicht-primenden Anteil des Primers. Die durch den ersten Primer definierte Restriktionsstelle wird typischerweise so ausgewählt, dass sie durch ein Restriktionsenzym erkannt wird, welches nicht die Restriktionsstelle erkennt, die durch den zweiten Primer definiert wird, wobei es das Ziel ist, ein DNA-Molekül erzeugen zu können, das kohäsive Enden besitzt, welche zueinander nicht komplementär sind, und die daher gerichtete Insertion in einen Vektor ermöglichen.

[0169] In einer Ausführungsform verwendet die vorliegende Erfindung ein Set von Polynukleotiden, die Primer mit einer Priming-Region bilden, die am 3'-Ende des Primers angesiedelt ist. Die Priming-Regionen sind typischerweise die zum 3'-Ende gelegenen (3'-most, 3'-terminal) 15 bis 30 Nukleotidbasen. Der 3'-terminale Priming-Anteil jedes Primers ist in der Lage, als Primer bei der Katalyse der Nukleinsäuresynthese zu wirken, d.h. eine Primerextensionreaktion ausgehend von seinem 3'-Ende zu initiieren. Eine oder beide Primer können zusätzlich einen 5'-terminalen (5'-most) nicht-primenden Anteil enthalten, d.h., eine Region, die nicht an der Hybridisierung an ein Template aus dem Repertoire beteiligt ist.

[0170] In der PCR arbeitet jeder Primer in Kombination mit einem zweiten Primer zur Amplifikation einer Targetnukleinsäuresequenz. Die Wahl der Primerpaare für die Verwendung in der PCR wird durch die hier diskutierten Überlegungen zur Erzeugung von Genrepertoiren beeinflusst. Dies bedeutet, dass die Primer eine Nukleotidsequenz besitzen, die zu einer im Repertoire konservierten Sequenz komplementär sind. Nützliche V_H- und V_L-Primingsequenzen werden in den Tabellen 5 und 6 unten gezeigt.

4. Polymerasekettenreaktion zur Erzeugung von Genrepertoiren

[0171] Die verwendete Strategie zur Klonierung der V_H- und V_L-Gene, die innerhalb eines Repertoires enthalten sind, wird, wie im Stand der Technik wohlbekannt ist, von der Art, der Komplexität und der Reinheit der Nukleinsäuren abhängen, die das Repertoire ausmachen. Andere Faktoren schließen mit ein, ob die Gene in einem oder einer Vielzahl von Repertoiren enthalten sind oder nicht, und ob diese amplifiziert und/oder mutagenisiert werden sollen oder nicht.

[0172] Die V_H- und V_L-kodierenden Genrepertoire umfassen die kodierenden Stränge von Polynukleotiden, wie beispielsweise mRNA und/oder den Sensestrang genomischer DNA. Falls das Repertoire in der Form einer doppelsträngigen genomischen DNA vorliegt, wird diese gewöhnlicherweise zuerst denaturiert, üblicherweise durch Aufschmelzen in die Einzelstränge. Ein Repertoire wird einer PCR-Reaktion durch Behandlung

(Kontaktieren) des Repertoires mit einem Primerpaar unterworfen, wobei jedes Mitglied des Paares eine vorgewählte Nukleotidsequenz besitzt. Das PCR-Primerpaar ist in der Lage, die Primerextensionreaktion durch Hybridisierung an Nukleotidsequenzen zu starten, bevorzugt ist dieses mindestens etwa 10 Nukleotide lang und noch bevorzugter mindestens etwa 20 Nukleotide lang, und innerhalb des Repertoires konserviert. Der erste Primer eines PCR-Primerpaares wird hier manchmal als "sense-Primer" bezeichnet, da dieser mit dem kodierenden oder dem sense-Strang einer Nukleinsäure hybridisiert. Zusätzlich wird der zweite Primer eines PCR-Primerpaares manchmal hier als der "antisense-Primer" bezeichnet, da dieser mit einem nicht-kodierenden oder antisense-Strang einer Nukleinsäure kodiert, d.h. einem Strang, der zu einem kodierenden Strang komplementär ist.

[0173] Die PCR-Reaktion wird durch Mischung des PCR-Primerpaares, bevorzugt mit einer vorbestimmten Menge davon, mit den Nukleinsäuren des Repertoires, bevorzugt mit einer vorbestimmten Menge davon, in einem PCR-Puffer durchgeführt, um eine PCR-Reaktionsmischung zu bilden. Die Mischung wird unter Polynukleotidsynthesebedingungen für einen solchen Zeitraum gehalten, der üblicherweise festgelegt und für die Bildung eines PCR-Reaktionsproduktes ausreichend ist und dabei eine Vielzahl verschiedener V_H-kodierender und/oder V_L-kodierender DNA-Homologe erzeugt.

[0174] In jeder Amplifikation kann eine Vielzahl von ersten Primern und/oder eine Vielzahl von zweiten Primern verwendet werden, z.B. kann eine Spezies eines ersten Primers mit einer Anzahl verschiedener zweiter Primer zur Bildung von verschiedenen unterschiedlichen Primerpaaren gepaart werden. Alternativ kann ein individuelles Paar von ersten und zweiten Primern verwendet werden. In jedem Fall können die Amplifikationsprodukte von Amplifikationen, die die gleiche Kombination oder verschiedene Kombinationen von ersten und zweiten Primern verwenden, zur Steigerung der Artenvielfalt der Genbibliothek miteinander kombiniert werden.

[0175] Die Aufgabe in einer anderen Strategie ist die Klonierung von V_H- und/oder V_L-kodierenden Genen aus einem Repertoire durch Bereitstellung eines Polynukleotidkomplements aus dem Repertoire, wie beispielsweise dem antisense-Strang genomischer dsDNA oder dem durch die Durchführung einer reversen Transkriptasereaktion mit einer mRNA erzeugten Polynukleotid. Verfahren zur Erzeugung solcher Komplemente sind im Stand der Technik gut bekannt.

[0176] Die PCR-Reaktion wird unter Verwendung jedes geeigneten Verfahrens durchgeführt. Allgemein wird sie in einer gepufferten wässrigen Lösung durchgeführt, z.B. einem PCR-Puffer, bevorzugt bei einem pH von 7–9, noch bevorzugter bei etwa B. Bevorzugt wird ein molarer Überschuss (für genomische Nukleinsäure gewöhnlich etwa 10^6:1 Primer:Template) des Primers zu dem Puffer zugemischt, der den Template-Strang enthält. Ein großer molarer Überschuss wird bevorzugt, um die Effektivität des Verfahrens zu verbessern.

[0177] Der PCR-Puffer enthält ebenfalls die Desoxyribonukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP und eine Polymerase, typischerweise eine thermostabile, sowie alle in angemessenen Mengen für die Primerextensions(Polynukleotidsynthese)-Reaktion. Die resultierende Lösung (PCR-Mischung) wird auf etwa 90°C – 100°C für etwa 1 bis 10 Minuten erhitzt, bevorzugt für 1 bis 4 Minuten. Nach dem Zeitraum des Erhitzens lässt man die Lösung auf 54°C abkühlen, was für die Primerhybridisierung bevorzugt ist. Die Synthesereaktion kann bei Raumtemperatur bis zu einer Temperatur stattfinden, über der die Polymerase (induzierendes Agens) nicht länger effektiv arbeitet. Falls daher beispielsweise die DNA-Polymerase als induzierendes Agens verwendet wird, ist die Temperatur grundsätzlich nicht höher als etwa 40°C. Ein beispielhafter PCR-Puffer umfasst Folgendes: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; pH 8,3; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,001 % (Gew./Vol.) Gelatine, 200 µM dATP; 200 µM dTTP; 200 µM dCTP; 200 µM dGTP; und 2,5 Einheiten Thermus aquaticus-DNA-Polymerase I (US-Patent Nr. 4,889,818) pro 100 Mikroliter an Puffer.

[0178] Das induzierende Agens kann jede Verbindung oder jedes System sein, welches die Funktion zur Synthese von Primerextensionprodukten erfüllt (einschließlich Enzymen). Geeignete Enzyme für diesen Zweck schließen beispielsweise mit ein, E. coli-DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment aus E. coli-DNA-Polymerase I, T4-DNA-Polymerase, andere verfügbare DNA-Polymerase, reverse Transkriptase und andere Enzyme, einschließlich hitzestabilen Enzymen, welche die Kombination der Nukleotide in der korrekten Form zur Bildung von Primerextensionprodukten erleichtern, die zu jedem Nukleinsäurestrang komplementär sind. Grundsätzlich wird die Synthese am 3'-Ende jedes Primers gestartet und in 5'-Richtung entlang des Zielstranges unter Erzeugung von Molekülen verschiedener Längen fortgeführt, bis die Synthese stoppt. Es können gleichwohl induzierende Agenzien sein, die die Synthese am 5'-Ende starten und in die oben genannte Richtung unter Verwendung des gleichen, wie oben beschriebenen, Verfahrens fortfahren.

[0179] Das induzierende Agens kann ebenfalls eine Verbindung oder ein System sein, welches zur Durchfüh-

rung der Synthese von RNA-Primerextensionsprodukten dient, einschließlich Enzymen. In bevorzugten Ausführungsformen kann das induzierende Agens eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, wie beispielsweise T7-RNA-Polymerase, T3-RNA-Polymerase oder SP6-RNA-Polymerase. Diese Polymerasen erzeugen ein komplementäres RNA-Polynukleotid. Die hohe Umsatzrate der RNA-Polymerase amplifiziert das anfängliche Polynukleotid, wie von Chamberlin et al., The Enzymes, Hrsg. P. Boyer, S. 87–108, Academic Press, New York (1982) beschrieben. Ein anderer Vorteil der T7-RNA-Polymerase ist, dass Mutationen während der Polynukleotidsynthese durch Austausch eines Teils der cDNA mit einer oder mehreren Oligodesoxynukleotiden (Polynukleotiden) und während der Transkription des teilweise fehlgepaarten Templates direkt eingeführt werden können, wie kürzlich von Joyce et al., Nuc. Acid Res., 17: 711–722 (1989) beschrieben. Auf der Basis der Transkription basierende Amplifikationssysteme wurde durch Gingeras et al., in PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, S. 245–252, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990) beschrieben.

[0180] Falls das induzierende Agens eine DNA-abhängige RNA-Polymerase ist und daher Ribonukleotidtriphosphate einbaut, werden ausreichende Mengen an ATP, CTP, GTP und UTP zu der Primerextensionsreaktionsmischung zugemischt und die erhaltene Lösung wird wie oben beschrieben behandelt.

[0181] Der neu synthetisierte Strang und sein komplementärer Nukleinsäurestrang bilden ein doppelsträngiges Molekül, welches in den nachfolgenden Schritten des Verfahrens verwendet werden kann.

[0182] Die ersten und/oder zweiten PCR-Reaktionen, die oben diskutiert wurden, können vorteilhafterweise verwendet werden, um den Rezeptor in ein vorselektiertes Epitop einzubauen, das bei der immunologischen Detektion und/oder Isolierung eines Rezeptors nützlich ist. Dieses wird durch Verwendung eines ersten und/oder zweiten Polynukleotidsyntheseprimers oder eines Expressionsvektors zum Einbau einer vorbestimmten Sequenz an Aminosäureresten in die Aminosäuresequenz des Rezeptors erreicht.

[0183] Nach Herstellung von V_H- und V_L-kodierdenden DNA-Homologen für eine Vielzahl verschiedener V_H- und V_L-kodierender Gene innerhalb des Repertoires werden die DNA-Moleküle üblicherweise weiter amplifiziert. Während die DNA-Moleküle durch klassische Verfahren, wie beispielsweise durch den Einbau in einen autonom replizierenden Vektor, amplifiziert werden können, werden zuerst bevorzugt die Moleküle durch Durchführung einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert, bevor diese in einen Vektor eingeführt werden. Die PCR wird typischerweise durch ein thermozyclisches Verfahren durchgeführt, d.h. durch wiederholten Anstieg und Abfall der Temperatur einer PCR-Reaktionsmischung innerhalb eines Temperaturbereichs, dessen untere Grenze bei etwa 10°C bis etwa 40°C liegt und dessen obere Grenze bei etwa 90°C bis etwa 100°C liegt. Das Ansteigen und Abfallen kann kontinuierlich sein, jedoch wird es vorzugsweise in Phasen mit Zeitperioden relativer Temperaturstabilität bei jeder der für die Polynukleotidsynthese, für die Denaturierung und für die Hybridisierung bevorzugten Temperaturen durchgeführt.

[0184] PCR-Amplifikationsverfahren werden im Genaueren in den US-Patenten Nr. 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159 und 4,965,188 und mindestens in verschiedenen Texten beschrieben, einschließlich "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", H. Erlich, Hrsg. Stockton Press, New York (1989); und "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis et al., Hrsg. Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990).

[0185] In bevorzugten Ausführungsformen wird lediglich ein Paar an ersten und zweiten Primern pro Amplifikationsreaktion verwendet. Die Produkte der Amplifikationsreaktion, die aus einer Vielzahl verschiedener Amplifikationen jeweils unter Verwendung einer Vielzahl verschiedener Primerpaare erhalten werden, werden anschließend miteinander kombiniert.

[0186] Gleichwohl beschäftigt sich die vorliegende Erfindung ebenfalls eingehend mit der Herstellung eines DNA-Homologs über eine Co-Amplifikation (unter Verwendung von zwei Primerpaaren) und der Multiplex-Amplifikation (unter Verwendung von bis zu 8, 9 oder 10 Primerpaaren).

[0187] In bevorzugten Ausführungsformen wird das PCR-Verfahren nicht nur dazu verwendet, eine Bibliothek aus DNA-Molekülen zu erzeugen, sondern ebenfalls, um Mutationen innerhalb der Bibliothek einzuführen oder um eine Artenvielfalt ausgehend von einem einzelnen Elternklon zu erzeugen und dabei eine Bibliothek bereitzustellen, die eine größere Heterogenität aufweist. Zuerst sollte festgehalten werden, dass das PCR-Verfahren selbst aufgrund einer im Stand der Technik bekannten Vielzahl an Faktoren inhärent mutagen ist. Zweitens können zusätzlich zu den Variationen, die eine Mutation induzieren und die im oben zitierten US-Patent Nr. 4,683,195 beschrieben werden, andere PCR-Variationen angewendet werden, die eine Mutation induzieren. Beispielsweise kann die PCR-Reaktionsmischung mit verschiedenen Mengen von einem oder mehreren der

in das Extensionsprodukt einzubauenden Nukleotide gebildet werden. Unter solchen Bedingungen verläuft die PCR-Reaktion unter Erzeugung von Nukleotidsubstitutionen innerhalb des Extensionsprodukts aufgrund des Mangels einer bestimmten Base. In ähnlicher Weise können ungefähr die gleichen molaren Mengen der Nukleotide in die ursprüngliche PCR-Reaktionsmischung in einer Menge mit aufgenommen werden, dass eine Anzahl von X-Cyclen effektiv durchgeführt und anschließend die Mischung durch eine Anzahl von Cyclen im Überschuss von X verwendet wird, beispielsweise 2X.

[0188] Alternativ können Mutationen während der PCR-Reaktion durch Aufnahme von Nukleotidderivaten in die Reaktionsmischung induziert werden, wie beispielsweise Inosin, welches normalerweise in den Nukleinsäuren des zu amplifizierenden Repertoires nicht gefunden wird. Während der nachfolgenden in vivo-DNA-Synthese und der Replikation der Nukleinsäuren in einer Wirtszelle werden die Nukleotidderivate mit einem Ersatznukleotid ersetzt werden und dabei eine Punktmutation erzeugen.

5. Lineare DNA-Expressionsvektoren

[0189] Ein DNA-Expressionsvektor zur Verwendung in einem Verfahren dieser Erfindung zur Herstellung einer Bibliothek aus DNA-Molekülen ist ein wie zuvor beschriebenes linearisiertes DNA-Molekül, das zwei (stromaufwärts und stromabwärts) kohäsive Enden besitzt, die für die gerichtete Ligation an ein Polypeptidgen angepasst wurden.

[0190] Ein linearer DNA-Expressionsvektor wird typischerweise durch Verdau mit einer Restriktionsendonuklease aus einem zirkulärem DNA-Expressionsvektor gemäß dieser Erfindung durch Schneiden an zwei vorgewählten Restriktionsschnittstellen innerhalb der Nukleotidsequenz des Vektors hergestellt, der für die gerichtete Ligation angepasst wurde, um ein lineares DNA-Molekül zu erzeugen, das die erforderten kohäsiven Enden besitzen, die für die gerichtete Ligation angepasst wurden. Die gerichtete Ligation bezieht sich auf die Anwesenheit von zwei (ein erstes und ein zweites) kohäsiven Enden in einem Vektor, oder in dem Insert-DNA-Molekül, zur Ligation des ausgewählten Vektors in solch einer Weise, dass die Enden auf einem einzelnen Molekül nicht komplementär sind. Ein erstes Ende des Vektors ist einem ersten Ende des Inserts komplementär, und das zweite Ende des Vektors ist dem zweiten Ende des Inserts komplementär.

6. Ligationsreaktionen zur Erzeugung von Genbibliotheken

[0191] Bei der Herstellung einer Bibliothek aus DNA-Molekülen gemäß dieser Erfindung wird eine wie oben beschriebene Ligationsmischung hergestellt, und die Mischung wird für einen Zeitraum solchen Ligationsbedingungen unterworfen, die ausreichend sind, um das gemischte Repertoire an Polypeptidgenen mit der Mehrheit der DNA-Expressionsvektoren zur Bildung einer Bibliothek zu ligieren (operativ verknüpfen).

[0192] Die Ligationsbedingungen sind solche Bedingungen, die ausgewählt wurden, um eine Ligationsreaktion zu begünstigen, wobei eine Phosphodiesterbindung zwischen den benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphorylenden der DNA gebildet werden. Die Ligationsreaktion wird bevorzugt durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert. Die Ligationsbedingungen können wie allgemein bekannt in Bezug auf die Zeit, die Temperatur, die Pufferkonzentration, die Mengen der zu ligierenden DNA-Molekülen und die Mengen an Ligase variieren. Bevorzugte Ligationsbedingungen schließen das Halten der Ligationsmischung bei 4 Grad Celsius (4°C) bis 12°C für 1 bis 24 Stunden in der Anwesenheit von 1 bis 10 Einheiten T4-DNA-Ligase pro Milliliter (ml) und etwa 1 bis 2 Mikrogramm (μg) DNA ein. Der Ligationspuffer in einer Ligationsmischung enthält typischerweise 0,5 M Tris-HCl (pH 7,4), 0,01 M $MgCl_2$, 0,01 M Dithiothrietol, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP und 0,1 mg/ml bovines Serumalbumin (BSA). Andere Ligationspuffer können ebenfalls verwendet werden.

[0193] Beispielhafte Ligationsreaktionen werden in Beispiel 2 beschrieben.

7. Herstellung von dicistronischen Genbibliotheken

[0194] Wie oben beschrieben, stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung einer Bibliothek dicistronischer DNA-Moleküle bereit. Ein dicistronisches DNA-Molekül ist ein einzelnes DNA-Molekül, das die Fähigkeit besitzt, zwei verschiedene Polypeptide aus zwei verschiedenen Cistronen zu exprimieren. In bevorzugten Ausführungsformen sind die zwei Cistrone operativ auf dem DNA-Molekül an relativen Orten so miteinander verknüpft, so dass beide Cistrone unter der Transkriptionskontrolle eines einzelnen Promotors stehen. Jedes dicistronische Molekül ist in der Lage, erste und zweite Polypeptide aus ersten und zweiten Cistronen exprimieren, die in einem geeigneten Wirt einen heterodimeren Rezeptor auf der Oberfläche eines Partikels eines filamentösen Phagen bilden können.

[0195] Das Verfahren zur Herstellung einer Bibliothek dicistronischer DNA-Moleküle umfasst die Schritte:
(a) Bildung einer ersten Ligationsmischung durch Kombination in einem Ligationspuffer:
(i) einem Repertoire von ersten Polypeptidgenen in der Form von dsDNA, wobei jedes kohäsive Enden besitzt, die für die gerichtete Ligation angepasst – wurden, und
(ii) eine Vielzahl an DNA-Expressionsvektoren in linearer Form, von denen jeder stromaufwärts und stromabwärts gelegene erste kohäsive Enden aufweist, die (a) für die gerichtete Aufnahme der ersten Polypeptidgene in einem gewöhnlichen Leserahmen angepasst wurden, und (b) operativ mit entsprechenden stromaufwärts und stromabwärts gelegenen translatierbaren DNA-Sequenzen verknüpft wurden. Die stromaufwärts gelegene DNA-Sequenz kodiert ein pelB-Sekretionssignal, die stromabwärts gelegene translatierbare DNA-Sequenz kodiert einen Membran-Anker eines Beschichtungsproteins eines filamentösen Phagen, und translatierbare DNA-Sequenzen sind operativ mit den entsprechenden stromaufwärts und stromabwärts gelegenen DNA-Expressionskontrollsequenzen verknüpft.
(b) Die Mischung Ligationsbedingungen für einen Zeitraum unterwerfen, die ausreichend sind, um die ersten Polypeptidgene mit den Vektoren operativ zu verknüpfen und eine Vielzahl zirkulärer DNA-Moleküle zu erzeugen, von denen jedes ein erstes Cistron zur Expression des ersten Polypeptides besitzt.
(c) Behandeln der Vielzahl an zirkulären DNA-Molekülen unter DNA-Spaltbedingungen, um eine Vielzahl von DNA-Expressionsvektoren in linearer Form zu erhalten, die jeweils stromaufwärts und stromabwärts gelegene zweite kohäsive Enden besitzen, die (i) für die gerichtete Aufnahme eines Repertoires an zweiten Polypeptidgenen in einen gewöhnlichen Leserahmen angepasst wurden, und (ii) operativ mit den entsprechenden stromaufwärts und stromabwärts gelegenen DNA-Sequenzen verknüpft sind. Die stromaufwärts gelegene DNA-Sequenz ist eine translatierbare Sequenz, die ein Sekretionssignal kodiert, die stromabwärts gelegene DNA-Sequenz besitzt mindestens ein Stoppcodon im Leserahmen, und die translatierbare DNA-Sequenz ist operativ mit einer DNA-Expressionskontrollsequenz verknüpft.
(d) Bildung einer zweiten Ligationsmischung durch Kombination in einem Ligationspuffer von:
(i) der in Schritt (c) gebildeten Vielzahl an DNA-Expressionsvektoren, und
(ii) dem Repertoire an zweiten Polypeptidgenen in der Form von dsDNA, von denen jedes kohäsive Enden besitzt, die für die gerichtete Ligation an die Vielzahl von DNA-Expressionsvektoren angepasst wurden; und
(e) die zweite Mischung Ligationsbedingungen für einen Zeitraum aussetzen, der ausreichend ist, um die zweiten Polypeptidgene mit den genannten Vektoren operativ zu verknüpfen und eine Vielzahl zirkulärer DNA-Moleküle zu erzeugen, die das zweite Cistron zur Expression des zweiten Polypeptids besitzen und dabei die Bibliothek bilden.

[0196] In bevorzugten Ausführungsformen ist ein Sekretionssignal ein pelB-Sekretionssignal. Ebenfalls bevorzugt ist die Verwendung eines Membranankers eines filamentösen Phagen, der, wie hier beschrieben, von cpIII oder cpVIII abgeleitet wurde.

[0197] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls ein Verfahren, wie in Anspruch 32 beansprucht, und eine Bibliothek aus Vektoren, wie in Anspruch 33 beansprucht, zur Verfügung. DNA-Expressionsvektoren, die zur Durchführung des obigen Verfahrens geeignet sind, sind die in größerer Genauigkeit zuvor beschriebenen dicistronischen Expressionsvektoren.

[0198] Bei der Durchführung des Verfahrens zur Erzeugung einer Bibliothek dicistronischer DNA-Moleküle wird es bevorzugt, dass die stromaufwärts und stromabwärts gelegenen ersten kohäsiven Enden nicht die gleichen Nukleotidsequenzen besitzen wie die stromaufwärts und stromabwärts gelegenen zweiten kohäsiven Enden. In dieser Ausführungsform schließt der Behandlungsschritt (c) zur Linearisierung der zirkulären DNA-Moleküle typischerweise die Verwendung von Restriktionsendonuklease mit ein, die für die Erzeugung der genannten zweiten Enden spezifisch sind, jedoch das zirkuläre DNA-Molekül nicht an den Stellen schneiden, die durch die ersten Enden gebildet werden. Beispielhaft und bevorzugte erste und zweite Enden sind die Enden, die durch die Spaltung von pCBAK8 mit Xho I und Spe I zur Bildung der stromaufwärts und stromabwärts gelegenen ersten Enden definiert werden, und die durch die Spaltung von pCBAK8 mit Sac I und Xba I zur Bildung der stromaufwärts und stromabwärts gelegenen zweiten Enden definiert werden. In dieser Ausführungsform können andere Paare kohäsiver Enden an den entsprechenden Paaren der ersten und zweiten Enden verwendet werden, so lange die vier Enden jeweils unterschiedliche, nicht-komplementäre Enden darstellen. Beispielhaft sind die in den hier beschriebenen Vektoren pCOMB3, pCOMB2-3, pCOMB2-3', pCOMB8 und pCOMB2-8 gefundenen Enden.

[0199] Verfahren zur Behandlung der Vielzahl zirkulärer DNA-Moleküle unter DNA-Spaltungsbedingungen zur Bildung von linearen DNA-Molekülen sind im allgemeinen gut bekannt und hängen von der zu spaltenden Nukleotidsequenz und dem Mechanismus zur Spaltung ab. Bevorzugte Behandlungen schließen das Mischen der DNA-Moleküle mit einer Restriktionsendonuklease mit ein, die für eine Endonukleaseerkennungsstelle an

der gewünschten Spaltposition spezifisch ist, und in einer Menge, die für die Restriktionsendonuklease ausreichend ist, um das DNA-Molekül zu spalten. Puffer, Spaltbedingungen und Substratkonzentrationen für die Restriktionsnukleasespaltung sind gut bekannt und hängen von den im besonderen Fall verwendeten Enzymen ab. Beispielhafte Spaltbedingungen für Restriktionsenzyme werden in Beispiel 2 beschrieben.

8. Verfahren zur Änderung der Artenvielfalt einer Bibliothek

[0200] Die vorliegende Erfindung kann zusammen mit Verfahren zur Änderung der Artenvielfalt einer Bibliothek filamentöser Phagen gemäß dieser Erfindung verwendet werden. Diese Verfahren steigern grundsätzlich die Artenvielfalt der Bibliothek und steigern dabei die Anzahl möglicher Epitop-bindender Komplexe, die auf eine gewünschte Bindungsaktivität zu sceenen sind. Alternativ können die Verfahren auf die Anreicherung einer Klasse Epitop-bindender Komplexe gerichtet werden. Die Klasse wird typischerweise durch die Fähigkeit definiert, ein bestimmtes Epitop oder eine Familie an Epitopen zu binden, die auf einem vorgewählten Antigen oder eine Gruppe von Antigenen vorhanden ist.

a. Steigerung der Artenvielfalt einer Bibliothek durch Mutation

[0201] Ein geeignetes Verfahren zur Steigerung der Artenvielfalt ist die Änderung der Sequenz der Aminosäuren von einem oder von mehreren Polypeptiden des Epitop-bindenden Komplexes, der durch das Genom eines Phagen dieser Erfindung kodiert wird. Änderungen können auf der Nukleinsäureebene durch Mutation der Nukleinsäure bequem eingeführt werden. Das Verfahren kann mit einer einzelnen Spezies von Nukleinsäuren durchgeführt werden, die ein Polypeptid dieser Erfindung kodiert, oder es kann mit einer Bibliothek von Nukleinsäuren durchgeführt werden, die in einer Phagenbibliothek dieser Erfindung vorhanden sind.

[0202] Die Mutation einer Nukleinsäure kann durch eine Vielzahl an Mitteln erreicht werden, jedoch wird dies am besten in einer PCR-Reaktion während eines PCR-Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung durchgeführt. Die PCR-Mutagenese kann, wie allgemein bekannt, zufällig oder auf spezifische Nukleotidsequenzen gerichtet sein. Die Durchführung einer PCR unter Bedingungen, die eine Zufallsmutagenese begünstigen, wurden kürzlich beschrieben und werden hier als "fehleranfällige PCR" bezeichnet. In ähnlicher Weise bezieht die gerichtete Mutagenese die Verwendung von PCR-Primern mit ein, die dafür entworfen wurden, auf einen spezifischen Mutationstyp in einer spezifischen Region der Nukleotidsequenz abzuzielen.

[0203] Die Erfindung kann zur Steigerung der Vielfältigkeit einer oder mehrerer Epitopbindender Komplexe mittels PCR-gerichteter Mutation eines Komplementäts-bestimmenden Bereichs (CDR) einer variablen Domäne eines Antikörpers nützlich sein, die in einem Polypeptid eines Epitop-bindenden Komplexes dieser Erfindung vorhanden ist. Die CDR-Mutagenese wurde kürzlich in allgemeiner Form für die "Humanisierung" eines Antikörpers durch Einführung humaner Sequenzen in die CDR-Region eines murinen Antikörpers beschrieben (siehe Europäische Anmeldung Nr. EP 239400).

[0204] Die Erfindung kann beispielsweise in einem Mutageneseverfahren zur Änderung der immunologischen Spezifizität eines klonierten Immunglobulingens nützlich sein, das in einem DNA-Vektor dieser Erfindung vorhanden ist. Das Verfahren stellt eine direkte Mutagenese in einer vorgewählten CDR eines Immunglobulingens zur Verfügung, wobei das Verfahren das Unterwerfen eines rekombinanten DNA-Moleküls unter PCR-Bedingungen umfasst, wobei das DNA-Molekül (rDNA) das klonierte Immunglobulingen enthält, welches eine Ziel-CDR besitzt, und wobei die PCR-Bedingungen zur Amplifikation einer vorgewählten Region der CDR geeignet sind. In dem Verfahren wird das rDNA-Molekül PCR-Bedingungen unterworfen, die ein wie unten beschriebenes PCR-Primeroligonukleotid miteinschließen, das den ersten Primer in einem PCR-Primerpaar, wie gut bekannt ist, so festlegt, dass ein amplifiziertes PCR-Produkt erzeugt wird, welches aus der vorgewählten CDR-Region abgeleitet ist, jedoch die Nukleotidsequenzen des PCR-Primers beinhaltet. Das zweite Oligonukleotid kann unter den PCR-Amplifikationsbedingungen jeder PCR-Primer sein, der aus dem zu mutagenisierenden Immunglobulingen, wie hier beschrieben, abgeleitet wurde.

[0205] Bevorzugte Verfahren sind solche, die ein, wie unten beschriebenes, Oligonukleotid dieser Erfindung verwenden.

[0206] In solchen Verfahren wird daher eingehend darauf eingegangen, dass ein Oligonukleotid als Primer in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Induktion einer Mutagenese in einem Komplementariäts-bestimmenden Bereich (CDR) eines Immunglobulingens nützlich ist. Das Oligonukleotid besitzt 3'- und 5'-Enden und umfasst (1) eine Nukleotidsequenz an seinem 3'-Ende, die in der Lage ist, an eine erste Gerüstregion eines Immunglobulingens zu hybridisieren, (2) eine Nukleotidsequenz an seinem 5'-Ende, die in der Lage ist, an eine

zweite Gerüstregion eines Immunglobulins zu hybridisieren, und (3) eine Nukleotidsequenz zwischen dem 3'- und dem 5'-Ende, die zur Einführung von Mutationen während einer PCR- in die CDR-Region zwischen den ersten und den zweiten Gerüstregionen des Immunglobulingens angepasst wurde, und dabei die CDR-Region mutagenisiert.

[0207] Insoweit als Immunglobulingene drei CDR-Regionen auf sowohl der schweren Kette und der leichten Kette eines Immunglobulins besitzen, wobei jede durch eine bestimmte Gerüstregion abgetrennt ist, soll klar sein, dass das oben genannte Beispiel bei der Einführung von Mutationen in ein spezifisches CDR dadurch leichter anzuwenden ist, dass die oben genannten 5'- und 3'-Nukleotidsequenzen derart ausgewählt werden, dass sie an die zur Ziel-CDR flankierenden Gerüstregionen hybridisieren. Die oben genannten ersten und zweiten Sequenzen der Gerüstregionen können diejenigen konservierten Sequenzen sein, die CDR1, CDR2 oder CDR3 auf entweder der schweren oder der leichten Kette flankieren. Beispielhaft und bevorzugt wird CDR3 aus der schweren Kette von humanem Immunglobulin.

[0208] Die Länge der 3'- und 5'-terminalen Nukleotidsequenzen eines Oligonukleotids, das ein Ziel mutagenisiert, kann wie gut bekannt in seiner Länge variieren, so lange die Länge eine zu den Sequenzen der Zielgerüstregion komplementäre Abfolge von Nukleotiden bereitstellt, so dass diese daran hybridisieren kann. Im Fall der 3'-terminalen Nukleotidsequenz muss diese eine ausreichende Länge besitzen und zur Zielgerüstregion komplementär sein, die 3'- zur mutagenisierenden CDR-Region lokalisiert ist, so dass diese hybridisiert und einen 3'-Hydroxylterminus zur Initiierung einer Primerextensionreaktion bereitstellt. Im Fall der 5'-terminalen Nukleotidsequenz muss diese eine ausreichende Länge und Komplementarität zur Zielgerüstregion besitzen, die 5'- zur mutagenisierenden CDR-Region lokalisiert ist, so dass sie Mittel zur Hybridisierung in einer wie oben beschriebenen PCR-Überlappungsextensionsreaktion bereitstellt, um die vollständige schwere oder leichte Kette von Immunglobulin zusammenzusetzen.

[0209] Gerüstregionen, die eine CDR flankieren, sind in der Immunologie charakterisiert und schließen bekannte Nukleotidsequenzen oder Konsensussequenzen mit ein, wie an anderer Stelle hier beschrieben. Ist ein einzelnes vorgewähltes Immunglobulingen zu mutagenisieren, sind die durch die Gerüstregion definierten Sequenzen bekannt, die ein bestimmtes CDR flankieren, oder sie können durch Protokolle zur Nukleotidsequenzierung leicht bestimmt werden. Soll ein Repertoire aus Immunglobulingenen mutagenisiert werden, sind die von der Gerüstregion abgeleiteten Sequenzen bevorzugt konserviert, wie an anderer Stelle hier beschrieben.

[0210] Bevorzugt sind die 3'- und 5'-terminalen Nukleotidsequenzen jeweils mindestens 6 Nukleotide lang, und können bis zu 50 oder mehr Nukleotide lang sein, obwohl diese Längen zur Sicherstellung einer genauen und reproduzierbaren Hybridisierung unnötig sind. Bevorzugt werden Längen in einem Bereich von 12 bis 30 Nukleotiden, und typischerweise etwa 18 Nukleotide.

[0211] Eine insbesondere bevorzugte von einer Gerüstregion definierte Nukleotidsequenz zur Verwendung als 3'-terminale Nukleotidsequenz besitzt die Nukleotidsequenz
5'-TGGGGCCAAGGGACCACG-3' (SEQ ID NO 122).

[0212] Eine insbesondere bevorzugte von einer Gerüstregion abgeleitete Nukleotidsequenz zur Verwendung als 5'-terminale Nukleotidsequenz besitzt die Nukleotidsequenz
5'-GTGTATTATTGTGCGAGA-3' (SEQ ID NO 123).

[0213] Die zwischen dem 3'- und dem 5'-Ende lokalisierte Nukleotidsequenz, die für die Mutagenisierung eines CDRs angepasst wurde, kann jede Nukleotidsequenz sein, insoweit die neue Sequenz mittels der oben angegebenen Verfahren eingebaut wird. Gleichwohl stellt der vorliegende Ansatz ein Mittel zur Verfügung, um eine große Population mutagenisierter CDR's in eine einzelne PCR-Reaktion durch die Verwendung einer Population redunanter Sequenzen zu erzeugen, die in der zu mutagenisierenden CDR-Region zufällige oder nahezu zufällige Nukleotide definieren.

[0214] Ein bevorzugtes Oligonukleotid umfasst eine Nukleotidsequenz zwischen den oben beschriebenen 3'- und 5'-Enden, die durch die Formel präsentiert wird: $[NNR]_n$, wobei N unabhängig jedes Nukleotid sein kann, R kann S, K oder ein Analog davon sein, wobei S gleich G oder C ist, K gleich G oder T ist und wobei n von 3 bis etwa 24 reicht. In bevorzugten Verfahren besitzt das Oligonukleotid die Formel:
5'-GTGTATTATTGTGCGAGA$[NNR]_n$TGGGGCCAAGGGACCACG-3' (SEQ ID NO 124).

[0215] Beispielhaft und insbesondere bevorzugt ist das Oligonukleotid, in dem R gleich S ist und n gleich 16, so dass das Oligonukleotid eine große Population redunanter Oligonukleotidsequenzen repräsentiert.

[0216] Die Erfindung kann daher in einem Verfahren zur Steigerung der Vielfalt einer Bibliothek aus Partikeln eines filamentösen Phagen nützlich sein, umfassend die Schritte: a) Bereitstellung einer Bibliothek aus Partikeln eines filamentösen Phagen gemäß der vorliegenden Erfindung und b) Mutieren der Nukleotidsequenz, die die variable Domäne von Immunglobulin kodiert und in jedem Expressionsvektor in der Bibliothek vorhanden ist, zur Bildung einer Bibliothek aus Phagenpartikeln, die jeweils eine mutierte Nukleotidsequenz der variablen Domäne eines Immunglobulins enthält.

[0217] Die Bereitstellung kann die Manipulation der Genome der Phagenpartikel in der Bibliothek miteinschließen, um Nukleinsäuren zur Durchführung einer mutagenisierenden PCR-Reaktion zu isolieren. Manipulationen einer Phagenbibliothek zur Isolierung des Phagengenoms zur Verwendung in einer PCR-Reaktion werden an anderer Stelle hier beschrieben.

[0218] In einem Verfahren umfasst die Mutagenese, eine Nukleotidsequenz einer fehlerbehafteten Polymerasekettenreaktion auszusetzen, wobei die Nukleotidsequenz die variable Domäne eines Immunglobulins kodiert. In einem anderen Verfahren umfasst die Mutagenese unter Verwendung eines hier beschriebenen CDR-gerichteten Oligonukleotids, eine Nukleotidsequenz, die die variable Domäne eines Immunglobulins kodiert, einem Verfahren zur Mutagenese einer CDR der Sequenz zu unterwerfen, die die variable Domäne eines Immunglobulins kodiert.

[0219] Beispielhafte Verfahren zur Mutagenese der CDR-Region einer besonderen Nukleinsäure, die einen Epitop-bindenden Komplex kodiert, unter Verwendung des oben angegebenen CDR-gerichteten Oligonukleotids, oder unter Verwendung einer fehlerbehafteten PCR zur Erzeugung einer großen Bibliothek verschiedener Komplexe, werden in den Beispielen beschrieben.

b. Anreicherung einer Bibliothek

[0220] Die Erfindung kann ebenfalls in Verbindung mit einem Verfahren zur Änderung der Artenvielfalt der Bibliothek durch Anreicherung der Bibliothek mit einer vorgewählten Klasse aus Epitop-bindenden Komplexen verwendet werden. Das Verfahren schließt im Allgemeinen eine Auswahl auf Basis der Affinität von solchen Phagenpartikeln in eine Bibliothek mit ein, die in der Lage sind, an ein vorgewähltes Antigen zu binden. Das Verfahren der Auswahl über die Affinität oder das Panning-Verfahren, wird in den Beispielen genauer beschrieben.

[0221] Die Erfindung kann daher in einem Verfahren zur Änderung der Vielfältigkeit einer Bibliothek aus Partikeln eines filamentösen Phagen verwendet werden, umfassend die Schritte a) Bereitstellen einer Bibliothek aus Partikeln eines filamentösen Phagen gemäß der vorliegenden Erfindung, b) Kontaktieren der bereitgestellten Bibliothek mit einem vorgewählten Liganden unter solchen Bedingungen, die für Mitglieder der Bibliothek ausreichend sind, um an den Liganden zu binden und einen Liganden-Phagenpartikel-Komplex zu bilden, und c) Isolieren des Phagenpartikels im Komplex abseits von nicht-gebundenen Mitgliedern der Bibliothek, zur Bildung einer MIT Liganden angereicherten Bibliothek, die Phagenpartikel umfasst, die eine Bindungsspezifität für den vorgewählten Liganden besitzen.

[0222] In bevorzugten Verfahren wird der vorgewählte Ligand auf einen festen Träger fixiert und der Liganden-Phagenpartikel-Komplex wird auf der festen Phase gebildet. Diese Verfahren umfasst weiterhin die Schritte i) Waschen des festen Trägers nach dem Schritt des Kontaktierens, um nicht-gebundene Mitglieder der Bibliothek von dem festen Träger zu waschen; und ii) Eluieren von jeglichen an die feste Phase gebundenen Phagenpartikeln vom festen Träger. Die eluierten Phagenpartikel werden gesammelt, wobei diese isolierte Phagenpartikel bilden, die eine angereicherte Bibliothek umfassen.

[0223] Die Elution kann unter einer Vielzahl von Bedingungen durchgeführt werden, die die Wechselwirkung des Liganden-Epitop-Bindungkomplexes unterbrechen. Typische Bedingungen schließen Hochsalz-Puffer oder Puffer mit niedrigem pH mit ein. Insbesondere bevorzugt sind Puffer mit einem pH von 1 bis 5, bevorzugt mit einem pH von etwa 2 bis 3. Alternativ kann die Wechselwirkung durch Kompetition mit einer Überschussmenge des vorgewählten Liganden im Elutionspuffer unterbrochen werden. Beide Elutionsverfahren werden in den Beispielen beschrieben.

[0224] Ein verwandtes Verfahren verbindet sowohl die Merkmale der Steigerung der Vielfältigkeit einer Bibliothek mit Mutation als auch die Anreicherung der Bibliothek mittels Panning zu "reifen" Epitop-Bindungskomplexaffinitäten für einen vorgewählten Liganden. Es ist daher möglich, unter Verwendung dieser Verfahren zur Änderung der Vielfältigkeit einer Bibliothek neue Bindungsspezifitäten und potentere Bindungsspezifitäten zu

entwickeln.

[0225] Die Kombination dieser Verfahren kann in einer Vielzahl von Möglichkeiten gestaltet werden, wie es einem erfahrenen Praktiker klar ist. Beispielsweise kann man eine Bibliothek isolieren, mutagenisieren (diversifizieren), und anschließend auf eine bestimmte Bindungsaktivität screenen (anreichern). Alternativ kann man ausgehend von einer Bibliothek eine bestimmte Aktivität anreichern, den spezifischen Epitop-bindenden Komplex mutagenisieren und die mittels Mutagenese erzeugte Bibliothek weiter anreichern.

[0226] In einer anderen Variation dieses Themas kann man die Unterschiede zwischen den Bibliotheken auf der Basis der von cpIII- und cpVIII-abgeleiteten Membran-Anker aufgrund ihrer inhärenten Unterschiede in der Wertigkeit verwenden. Da die Bibliothek eines Phagen, das den von cpIII-abgeleiteten Membran-Anker enthält, typischerweise lediglich 1 bis 4 Kopien des Epitop-bindenden Komplexes auf der Oberfläche jedes Phagenpartikels enthalten wird, zeigt der Phage einen Bindungskomplex mit einer verhältnismäßig "niedrigen" Valenz, die annähernd eins ist. Im Unterschied dazu wird eine Bibliothek eines Phagen, der einen von cpVIII-abgeleiteten Membran-Anker enthält, typischerweise 20 bis 1000 Kopien des Epitop-bindenden Komplexes auf der Oberfläche jedes Phagenpartikels enthalten, wobei der Partikel eine relativ "hohe" Valenz zeigt.

[0227] cpIII-basierte Bibliotheken werden daher als monovalent und cpVIII-basierte Bibliotheken werden daher als multivalent bezeichnet.

[0228] Bei der Anwendung der gut bekannten Prinzipien der Antikörperaffinität und Valenz soll es klar sein, dass eine cpIII-basierte Bibliothek aufgrund des Screenings nach grundsätzlich höheren Bindungsaffinitäts-Wechselwirkungen (Bindungskonstanten von 10^6 bis 10^9 M^{-1}) angereichert werden kann, im Vergleich zum breiten Bereich der Affinitäten (Bindungskonstanten von 10^4 bis 10^9 M^{-1}), die unter Verwendung eines multivalenten Reagenz isolierbar sind, das in der cpVIII-basierten Bibliothek gefunden wird. Eine auf cpVIII-basierte Bibliothek ist daher nützlich, um einen breiten Bereich an Affinitäten von Epitop-bindenden Komplexen von niedrigen bis zu hohen Affinitäten zu isolieren, wogegen eine cpIII-basierte Bibliothek verwendet werden kann, um einen kleineren Bereich Epitop-bindender Komplexe mit höherer Affinität zu isolieren.

[0229] Die Erfindung kann daher bei der Erzeugung einer ersten angereicherten Bibliothek durch Anreicherung einer cpVIII-basierten Bibliothek verwendet werden. Danach werden die Polypeptide, die für die Epitop-bindenden Komplexe kodieren, in einen cpIII-basierten Vektor transferiert, und anschließend auf eine Bindungswechselwirkung mit hoher Affinität angereichert. In einem Verfahren kann vor dem Transfer in den cpIII-basierten Vektor ein Mutageneseschritt angewendet werden.

[0230] In einem anderen Verfahren wird die Fähigkeit zur Entwicklung einer neuen Affinität anhand eines hier enthaltenen Beispiels gezeigt, in welchem ein Gen, welches ein geklontes V_H/V_L-Heterodimer kodiert und das in der Lage ist, ein Heterodimer zu exprimieren, welches den Liganden Tetanustoxoid (TT) bindet, unter Verwendung einer CDR-gerichteten PCR-Mutagenese mutagenisiert wird, und wobei die daraus resultierende mutagenisierte Nukleinsäurepopulation in eine cpIII-basierte Bibliothek insertiert und auf die Bindung eines davon unterschiedlichen Liganden, Fluoreszein, gescreent wird. Es wurde ein Epitop-bindender Komplex mit hoher Affinität identifiziert, der Fluoreszein bindet.

[0231] In einem verwandten Verfahren wurde eine naive (nicht-immunisierte) Bibliothek in eine cpVIII-basierte Bibliothek kloniert und auf die Bindung an das Antigen Progesteron gescreent. Verbindungen, die mit niedriger Affinität binden, wurden in eine cpIII-basierte Bibliothek kloniert, und es wurden drei bindende Klone mit hoher Affinität identifiziert, die Progesteron binden. Die drei Klone wurden vereinigt und dieses Reservoir wurde einer fehlerbehaftenden PCR-Mutagenese unterworfen, und die daraus erhaltene Bibliothek mutierter Nukleinsäuren wurde in einen cpIII-basieren Vektor kloniert und mit Hinblick auf Progesteron gescreent, um einen Epitopbindungskomplex mit hoher Affinität zu erhalten, der Progesteron bindet. Ein Komplex mit hoher Affinität wurde daher aus einer naiven Bibliothek "entwickelt".

[0232] Die vorliegende Erfindung kann daher ebenfalls zur Entwicklung der Affinität eines Epitop-bindenden Komplexes verwendet werden, der durch einen filamentösen Phagen dieser Erfindung kodiert wird, umfassend die Schritte a) Bereitstellen des Genoms eines filamentösen Phagen, b) Mutieren der Nukleotidsequenz, die die variable Domäne von Immunglobulin kodiert und in dem zur Verfügung gestellten Genom vorhanden ist, um eine Bibliothek aus Phagenpartikeln zu bilden, die die mutierte Nukleotidsequenz einer variablen Domäne von Immunglobulin enthalten, c) Kontaktieren der in Schritt b) gebildeten Bibliothek mit einem vorgewählten Liganden unter solchen Bedingungen, die für Mitglieder der Bibliothek ausreichend sind, um den Liganden zu binden und einen Liganden-Phagenpartikel-Komplex zu bilden, und d) Isolieren des Phagenpartikels in dem

genannten Komplex abseits von nicht-gebundenen Mitgliedern der Bibliothek, um eine mit Liganden-angereicherte Bibliothek zu bilden, die Phagenpartikel umfasst, die eine Bindungsspezifizität für den vorgewählten Liganden besitzen.

F. Phagenbibliotheken

[0233] Die vorliegende Erfindung beschäftigt sich eingehend mit einer Bibliothek an DNA-Molekülen, in der jede ein Fusionspolypeptid dieser Erfindung kodiert, wobei die Bibliothek in der Form einer Population verschiedener Partikel eines filamentösen Phagen vorliegt, wobei jedes ein unterschiedliches rDNA-Molekül dieser Erfindung enthält. Unter einem unterschiedlichen rDNA-Molekül wird ein rDNA-Molekül verstanden, das sich von der Basensequenz des Nukleotides unterscheidet, das ein Polypeptid dieser Erfindung kodiert, wenn die Nukleotidsequenz mit einem rDNA-Molekül in der Bibliothek verglichen wird.

[0234] Eine Phagenbibliothek ist daher eine Population eines filamentösen Phagen, bevorzugt eines f1-, fd- oder M13-filamentösen Phagen, wobei jeder Phage im Partikel einen rDNA-Expressionsvektor dieser Erfindung gepackt vorliegen hat, und die rDNA in den Phagenpartikel durch die Matrixproteine des Phagen eingekapselt sind. Anders formuliert enthält eine Phagenbibliothek eine Vielzahl von Partikeln eines filamentösen Phagen, von denen jeder unterschiedliche Phagenpartikel wie hier beschrieben mindestens einen Epitop-bindenden Komplex auf seiner Oberfläche enthält. Die vorliegende Erfindung stellt daher eine Bibliothek aus Phagenpartikeln bereit, wie in Anspruch 27 beansprucht. Eine bevorzugte Bibliothek umfasst Phagenpartikel, die DNA-Moleküle enthalten, welche mindestens 10^6, bevorzugt 10^7 und noch bevorzugter $10^{8–9}$ unterschiedliche Fusionspolypeptide dieser Erfindung kodieren. Unter unterschiedlichen Fusionspolypeptiden werden solche Polypeptide verstanden, die sich in der Sequenz der Aminosäurereste unterscheiden. Es ist sogar eine größere Vielfalt der Bibliothek erreichbar, wenn die Verfahren der hier beschriebenen zufälligen Kombination oder Mutagenese zur Steigerung der Vielfalt der Bibliothek verwendet werden.

[0235] Kodiert der gepackte Expressionsvektor erste und zweite Polypeptide eines sich autogen anordnenden Rezeptors, z.B. V_H- und V_L-Polypeptide, die ein Fab bilden, kann die Bibliothek ebenfalls so charakterisiert werden, dass sie eine Vielzahl an Rezeptorspezifitäten enthält oder exprimiert. Bibliotheken exprimieren daher mindestens 10^5, bevorzugt mindestens 10^6 und noch bevorzugter mindestens 10^7 unterschiedliche Rezeptoren, wie beispielsweise unterschiedliche Antikörper, T-Zellrezeptoren, Integrine und Ähnliches.

[0236] Die Größe der Bibliothek kann aufgrund einer Reihe von Faktoren variieren, insbesondere aufgrund des Verfahrens, durch das die Bibliothek erzeugt wird. Wie hier verwendet, bezeichnet die Größe die Komplexität oder Vielfalt der Bibliothek, die mit der Anzahl verschiedener Spezies gleich ist, die die Bibliothek ausmachen, und weniger zu der absoluten Anzahl an Partikeln in der Bibliothek.

[0237] Wird eine Bibliothek durch ein erstes getrenntes Klonieren zweier Genrepertoire erzeugt, die zu den ersten und zweiten Polypeptiden korrespondieren, so wird die resultierende Größe der Bibliothek nach zufälliger Kombination der zwei Repertoire in der Form eines dicistronischen Vektors stark vermehrt. Beispielsweise sind Genrepertoire von leichten und schweren variablen Ketten von Antikörpern in Betracht zu ziehen, die jeweils 10^6 unterschiedliche Mitglieder besitzen.

[0238] Das Kombinieren der zwei Repertoire führt theoretisch zu einer Bibliothek von 10^{12} möglichen unterschiedlichen dicistronischen Vektorspezien. Es wurde ein experimentelles System entworfen, um die Fähigkeit zu bewerten, zwei wie oben beschriebene Repertoire zur Erzeugung einer größeren Vielfalt zu mischen. Das System verwendet eine aus einer Maus abgeleitete kombinatorische Fab-Bibliothek, wobei die Maus mit dem Hapten para-Nitrophenylphosphonamidat (NPN) immunisiert wurde. Es wurden zweiundzwanzig verschiedene Klone isoliert, und die Nukleinsäuren, die die schwere und die leichte Kette kodieren, wurden isoliert und sequenziert, um festzustellen, dass 21 der 22 Paare auf der Ebene der Nukleinsäuresequenz unterschiedlich waren. Die 22 NPN-Liganden-bindenden Klone wurden zufällig rekombiniert (gemischt), und erneut auf die Bindung an NPN gecreent.

[0239] Nimmt man an, dass die schweren und die leichten Ketten lediglich Liganden-bindende heterodimere Rezeptormoleküle bilden können, falls sich die ursprünglichen Paare wieder vereinigen, sagt das Modell voraus, dass 4,6 Prozent der gesamten Kombination Liganden-bindende Kombinationen bereitstellen würden. Jeder höhere Prozentanteil zeigt, dass andere Paarungen als die ursprünglichen ebenfalls in der Lage sind, NPN zu binden. Die Ergebnisse zeigen, dass 27 Prozent der isolierten Klone NPN banden, was andeutet, dass aufgrund des Mischens ein 5,8-facher Anstieg in der Größe der Bibliothek an Rezeptoren erfolgte, die in der Lage sind, NPN zu binden. Dies zeigt, dass der Anstieg auf solche Klone begrenzt ist, die NPN binden. Andere Mit-

glieder der zufällig gemischten Bibliothek besitzen die Fähigkeit verschiedene, Nicht-NPN-Liganden zu binden. Es wurde daher gezeigt, dass Mischen die Vielfalt steigert.

[0240] Die Komplexität der Bibliothek kann ebenfalls durch Verwendung der hier beschriebenen Verfahren zur Mutagenese von Nukleotidsequenzen in einer vorher existierenden Bibliothek aus Sequenzen verwendet werden. Mit Hinblick auf die Unterschiede der Aminosäurereste für ein exprimiertes Fusionspolypeptid formuliert, kann es möglicherweise einen 20fachen Anstieg in der Größe der Bibliothek für jede Position eines Aminosäurerestes geben, der für die Zufallsmutagenese ausgewählt wurde.

[0241] Beispielsweise wurde unter Verwendung der gerichteten Mutagenese von Antikörpergenen im komplaritätsbestimmenden Bereich (CDR), wie in den Beispielen beschrieben, eine lineare Region aus 16 Aminosäureresten für die Zufallsmutagenese ausgewählt. Beginnend mit einer einzelnen Spezies und unter Mutation aller 16 Positionen der Reste über alle möglichen Kombinationen mit einer Auswahl von 20 unterschiedlichen Aminosäureresten würde theoretisch eine Bibliothek von 20^{16} unterschiedlichen Spezies, oder 6×10^{20} unterschiedlichen Spezies erzeugen.

[0242] Wie hier beschrieben, ist ein besonderer Vorteil eines filamentösen Phagen in der vorliegenden Erfindung, dass das DNA-Molekül, das im Phagenpartikel vorhanden ist und einen oder beide Mitglieder des heterodimeren Rezeptors kodiert, von anderen DNA-Molekülen, die in der Bibliothek vorhanden sind, auf der Basis der Anwesenheit des besonders exprimierten Fusionspolypeptides auf der Oberfläche des Phagenpartikels isoliert werden kann.

[0243] Die Isolation (Segregation) eines DNA-Moleküls, das Mitglieder eines heterodimeren Rezeptors kodiert, wird durch Segregation des Partikels eines filamentösen Phagen durchgeführt, der das Gen oder die Gene von Interesse abseits derjenigen Population anderer Phagenpartikel enthält, die die Bibliothek umfasst. Die Segregation von Phagenpartikeln umfasst die physikalische Abtrennung und Vervielfältigung von individuellen Phagenpartikeln abseits von anderen Phagenpartikeln in der Bibliothek. Verfahren zur physikalischen Abtrennung von Partikeln eines filamentösen Phagen zur Erzeugung von individuellen Phagenpartikeln, und die Vervielfältigung der individuellen Phagenpartikel zur Bildung von Populationen eines Phagenabkömmlings, der aus dem individuellen segregierten Partikel abgeleitet wurde, sind im Forschungsgebiet für filamentösen Phagen bekannt.

[0244] Ein bevorzugtes Abtrennungsverfahren schließt die Identifizierung des exprimierten Heterodimers auf der Oberfläche des Phagenpartikels mittels einer Ligandenbindungsspezifität zwischen dem Phagenpartikel und einem vorgewählten Liganden mit ein. Beispielhaft und bevorzugt ist die Verwendung von "Panning"-Verfahren, wobei eine Suspension von Phagenpartikeln mit einem Liganden auf einer festen Phase (Antigen) kontaktiert wird, und eine spezifische Bindung ermöglicht wird (oder eine Immunoreaktion, wobei das Heterodimer eine variable Domäne eines Immunglobulins miteinschließt). Nach der Bindung werden die nicht gebundenen Partikel von der festen Phase abgewaschen. Die gebundenen Phagenpartikel sind solche, die einen Liganden-spezifischen heterodimeren Rezeptor (Heterodimer) auf ihrer Oberfläche enthalten. Die gebundenen Partikel können anschließend durch Elution des gebundenen Partikels von der festen Phase wiedergewonnen werden, typischerweise durch Verwendung von wässrigen Lösungsmitteln, die mit der Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung interferieren. Typische Lösungsmittel schließen Puffer mit ein, die eine hohe Ionenstärke, einen niedrigen pH oder eine solche Menge an löslichem, kompetitierendem Liganden besitzen, die ausreichend ist, um die Rezeptor-Liganden-Bindungswechselwirkung zu unterbrechen.

[0245] Ein alternatives Verfahren zur Abtrennung eines Phagenpartikels auf der Grundlage der Ligangenspezifizität des Oberflächen-exprimierten Heterodimers aus einer Population an Partikeln ist die Fällung des Phagenpartikels aus der Phase der Lösung durch Quervernetzung mit dem Liganden. Ein beispielhaftes und bevorzugtes Quervernetzungs- und Fällungsverfahren wird im Genaueren in Beispiel 4c beschrieben.

[0246] Die Verwendung des oben erwähnten Verfahrens zur Partikelabtrennung stellt ein Mittel zum Screening einer Population von Partikeln eines filamentösen Phagen bereit, die in einer Phagenbibliothek gemäß dieser Erfindung vorhanden sind. Auf eine Phagenbibliothek angewendet, kann das Screening verwendet werden, um die Bibliothek in Bezug auf eine oder mehrere Partikel anzureichern, die ein Heterodimer mit einer vorgewählten Ligandenbindungsspezifität exprimieren. Wurde die Bibliothek so entworfen, dass sie multiple Spezies am Heterodimeren enthält, die alle eine etwas detektierbare Ligandenbindungsaktivität besitzen, jedoch in ihrer Proteinstruktur, sowie in der Antigenität, der Ligandenbindungsaffinität oder -avidität, und Ähnlichem unterschiedlich sind, kann das Sreeningsverfahren sequenziell verwendet werden, um zuerst eine Bibliothek zu erzeugen, die in Bezug auf eine vorgewählte Bindungsspezifität angereichert wurde, und um an-

schließend eine zweite Bibliothek zu erzeugen, die weiterhin durch weiteres Screening so angereichert wurde, dass sie eine oder mehrere isolierte Phagenpartikel umfasst. Verfahren zur Messung von Ligandenbindungsaktivitäten, Antigenität und ähnlichen Insertionen zwischen einem Liganden und einem Rezeptor sind im Allgemeinen gut bekannt und werden nicht weiter diskutiert, da sie keine essentiellen Merkmale der vorliegenden Erfindung sind.

[0247] In einer Phagenbibliothek kann daher die Population aus Partikeln in Bezug auf eine vorgewählte Ligandenbindungsspezifität angereichert sein.

[0248] Eine Phagenbibliothek kann ebenfalls eine Population an Partikeln umfassen, wobei jeder Partikel mindestens ein Fusionspolypeptid dieser Erfindung auf der Oberfläche des Phagenpartikels enthält. Die aktuelle Menge eines Fusionspolypeptids, das auf der Oberfläche eines Phagenpartikels vorhanden ist, hängt teilweise von der Wahl des im Fusionspolypeptid vorhandenen Membran-Ankerbeschichtungsproteins ab.

[0249] Wurde der Anker aus cpIII abgeleitet, gibt es typischerweise etwa 1 bis 4 Fusionspolypeptide pro Phagenpartikel. Wurde der Anker aus dem stärker bevorzugten cpVIII abgeleitet, gibt es das Potenzial für Hunderte von Fusionspolypeptiden auf der Oberfläche des Partikels in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen und von anderen hier diskutierten Faktoren. Die aktuelle Menge eines auf einem Phagenpartikel vorhandenen Polypeptides kann durch Kontrolle der durch den Phagenpartikel "gefangenen" Menge eingestellt werden, so wie sie in einer Wirtszelle synthetisiert wird.

[0250] Typischerweise enthält ein Phagenpartikel in einer Bibliothek dieser Erfindung etwa 10 bis etwa 500 von cpVIII abgeleitete Fusionspolypeptide auf der Oberfläche jedes Partikels, und noch bevorzugter etwa 20 bis 50 Fusionspolypeptide pro Partikel. Beispielhafte Mengen eines Oberflächenfusionspolypeptides werden durch die in Beispiel 4a beschriebenen Elektronenmikroskopaufnahmen gezeigt, die Partikel beschreiben, die etwa 20 bis 24 von cpVIII abgeleitete Fusionspolypeptide pro Partikel besitzen.

[0251] In einigen Fällen kann die vorliegende Erfindung zur Erzeugung einer Population aus Phagenpartikeln verwendet werden, die die Abkömmlinge eines einzelnen Partikels sind, und daher alle das gleiche Heterodimer auf der Partikeloberfläche exprimieren. Eine solche Population an Phagen ist homogen und mittels Klonierung erzeugt und stellt daher eine Quelle zur Expression großer Mengen eines bestimmten Fusionspolypeptides zur Verfügung. Eine beispielhafte klonierte homogene Phagenpopulation wird in Beispiel 4 beschrieben.

[0252] Ein Partikel eines filamentösen Phagen in einer Bibliothek der Erfindung wird durch Standardverfahren zur Herstellung von Partikeln eines filamentösen Phagen erzeugt und hängt von der Anwesenheit eines wie hier beschriebenen Replikationsursprungs eines filamentösen Phagen in einem DNA-Vektor dieser Erfindung ab, um die notwendigen Signale für (1) die Herstellung einer replikativen Form eines einzelsträngigen filamentösen Phagen und (2) das Packen der replikativen Form in einen Partikel eines filamentösen Phagen bereitzustellen. Solch ein DNA-Molekül kann durch Einführung einer genetischen Komplementierung gepackt werden, wenn es in einer Bakterienzelle vorhanden ist, um die Proteine von filamentösen Phagen bereitzustellen, die zur Erzeugung von infektiösen Phagenpartikeln benötigt werden. Ein typisches und bevorzugtes Verfahren für die genetische Komplementierung ist die Infektion einer bakteriellen Wirtszelle, die einen DNA-Expressionsvektor dieser Erfindung zusammen mit einem filamentösen Helferphagen enthält, und dabei die zur Anordnung des Phagenpartikels benötigten genetischen Elemente bereitstellt. Beispielhafte Helfer-Rettungsverfahren werden hier in Beispiel 2, und durch Short et al., Nuc. Acids Res., 16: 7583–7600 (1988) beschrieben.

[0253] Die Menge an heterodimeren Rezeptor, die auf der Oberfläche eines Partikels eines filamentösen Phagen während des Verfahrens des Ausstoßes von Phagenpartikeln aus der Wirtszelle gefangen wird, kann durch eine Vielzahl von Mitteln kontrolliert werden. In einem Verfahren kann die Menge an Fusionspolypeptiden durch die Verwendung von starken Promotoren in den ersten und zweiten Cistronen zur Expression der Polypeptide so kontrolliert werden, dass die Transkription der cistronischen Fusionspolypetide auf einem verhältnismäßig höheren Niveau stattfindet als das der Transkription des cpVIII-Gens auf dem Helferphagen. In einem anderen Verfahren kann der Helferphage eine Amber-Mutation im Gen zur Expression von cpVIII in einer solchen Weise besitzen, dass wenige Wildtyp cpVIII in der Wirtszelle transkribiert wird als Fusionspolypeptide, was zu ansteigenden Verhältnissen von Fusionspolypeptid im Vergleich zu cpVIII während des Extrusionsverfahrens führt.

[0254] In einem anderen Verfahren kann die Menge an heterodimeren Rezeptor auf der Oberfläche des Phagenpartikels durch Kontrolle des Zeitpunkts zwischen der Expression der Fusionspolypeptide und der Super-

infektion durch den Helferphagen kontrolliert werden. Nach Einführung des Expressionsvektors in die Wirtszelle ermöglichen lange Verweildauern vor der Zugabe des Helferphagen eine erhöhte Anreicherung der Fusionspolypeptide in der Wirtszelle, was zur Steigerung der Mengen des durch den ausgestoßenen Phagenpartikel gefangenen Menge an Fusionspolypeptid führt. Die vorliegende Erfindung stellt daher eine wie in den Ansprüchen 28 bis 30 beanspruchte Bibliothek zur Verfügung.

G. Diagnostische Verfahren

[0255] Die vorliegende Erfindung kann ebenfalls in einem diagnostischen System verwendet werden, bevorzugt in der Form eines Kits oder zur Prüfung auf die Anwesenheit eines vorgewählten Liganden, oder eines Antigens, in einer Probe, in der es wünschenswert ist, die Anwesenheit und bevorzugt die Menge des Liganden oder des Antigens gemäß den hier beschriebenen diagnostischen Verfahren zu detektieren.

[0256] Die Probe kann ein Gewebe, ein Gewebeextrakt, eine flüssige Probe oder eine Probe mit Körperflüssigkeit, wie beispielsweise Blut, Plasma oder Serum sein.

[0257] Das diagnostische System kann in einer zur Durchführung mit von mindestens einem Prüfungsverfahren ausreichenden Menge einen filamentösen Phagen oder einen Liganden-bindenden heterodimeren Rezeptor gemäß der vorliegenden Erfindung als getrennt gepacktes Reagenz miteinschließen.

[0258] Beispielhafte diagnostische Systeme zur Detektion eines vorgewählten Liganden auf der festen Phase und die Verwendung eines filamentösen Phagen dieser Erfindung werden in den Beispielen beschrieben.

[0259] Instruktionen zur Verwendung des gepackten Reagenz/der gepackten Reagenzien sind üblicherweise mit enthalten.

[0260] Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff "Packung" auf eine feste Matrix oder auf ein Material wie beispielsweise Glas, Plastik (z.B. Polyethylen, Polypropylen oder Polycarbonat), Papier, Folie oder Ähnliches, das in der Lage ist, innerhalb von festgelegten Grenzen einen heterodimeren Rezeptor, einen filamentösen Phagen oder eine Bibliothek eines Phagen der vorliegenden Erfindung zu halten. Eine Packung kann daher beispielsweise ein Glasfläschchen sein, das verwendet wurde, um Milligrammmengen einer kontemplierten markierten Phagenpräparation aufzunehmen, oder es kann die Vertiefung einer Mikrotiterplatte sein, an die welcher Mikrogramm-Mengen eines kontemplierten Rezeptors oder Phagenpartikel(s) operativ angeheftet wurde, z.B. so damit verknüpft wurde, dass er in der Lage ist, einen Liganden zu binden.

[0261] Eine "Gebrauchsanleitung" schließt üblicherweise eine handfeste Beschreibung mit ein, die die Konzentration des Reagenz oder mindestens die Parameter des Prüfungsverfahrens beschreibt, wie beispielsweise die relativen Mengen der zu mischenden Probe und die des Reagenz, die Wartezeiten für Reagenz/Probenmischungen, die Temperatur, die Pufferbedingungen und Ähnliches.

[0262] Ein diagnostisches System zur Verwendung im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann bevorzugt eine Markierung oder ein Signalmittel mit einschließen, das in der Lage ist, die Bildung eines Bindungsreaktionskomplexes anzuzeigen, der einen Liganden-bindenden heterodimeren Rezeptor enthält oder einen mit dem vorgewählten Liganden komplexierten Phagen.

[0263] Das hier verwendete Wort "Komplex" bezieht sich das Produkt einer spezifischen Bindungsreaktion, wie beispielsweise das einer Phagen-Liganden- oder einer Rezeptor-Liganden-Reaktion. Beispielhafte Komplexe sind Immunreaktionsprodukte.

[0264] Wie hier verwendet, beziehen sich die Begriffe "Markierung" und "Signalmittel" in ihren verschiedenen grammatikalischen Formen auf einzelne Atome und Moleküle, die entweder direkt oder indirekt in die Erzeugung eines detektierbaren Signals zur Anzeige der Anwesenheit eines Komplexes involviert sind. Jede Markierung oder jedes Signalmittel kann mit einem exprimierten Polypeptid oder einem Phagenpartikel verknüpft oder dort eingebaut werden, der in einem diagnostischen Verfahren verwendet wird. Solche Markierungen sind ihrerseits in der klinischen diagnostischen Chemie gut bekannt und machen nur insoweit einen Teil dieser Erfindung aus, als dass sie mit sonst neuen Proteinverfahren und/oder -systemen verwendet werden können.

[0265] Das Mittel zur Markierung kann ein fluoreszierendes Markierungsagens sein, das chemisch an Antikörper oder an Antigene ohne Denaturierung von diesen bindet, um ein Fluorochrom (Farbstoff zu bilden, welcher als Fluoreszenzindikator verwendbar ist. Geeignete Fluoreszenzmarkierungsagenzien sind Fluorochro-

me, wie beispielsweise Fluoreszeinisocyanat (FIC), Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), 5-Dimethylamin-1-naphthalensulfonylchlorid (DANSC), Tretramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC), Lissamin, Rhodamin 8200-sulfonylchlorid (RB 200 SC) und Ähnliches. Eine Beschreibung von Immunofluoreszenz-Analysetechniken ist in DeLuca "Immunofluorescence Analysis", in Antibody as a Tool, Marchalonis et al., Hrsg., John Wiley & Sons, Ltd., S. 189–231 (1982) zu finden.

[0266] In bevorzugten Verfahren ist die Signalgruppe ein Enzym, wie beispielsweise Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase), Glucoseoxidase, oder Ähnliches. In solchen Fällen, in denen die Hauptsignalgruppe ein Enzym, wie beispielsweise HRP oder Glucoseoxidase ist, werden zusätzliche Reagenzien benötigt, um die Tatsache sichtbar zu machen, dass sich ein Rezeptor-Liganden-Komplex (Immunoreaktant) gebildet hat. Solche zusätzlichen Reagenzien für HRP schließen Wasserstoffperoxid und den Vorläufer eines Oxidationsfarbstoffs, wie beispielsweise Diaminobenzidin, mit ein. Ein zusätzliches Reagenz, das zusammen mit Glucoseoxidase verwendbar ist, ist 2,2'-Amino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-G-sulfonsäure) (ABTS).

[0267] Radioaktive Elemente stellen ebenfalls nützliche Markierungsagenzien dar und werden hier beispielhaft verwendet. Ein beispielhaftes radiomarkierendes Agens ist ein radioaktives Element, welches Gammastrahlemissionen erzeugt. Elemente, welche selbst Gammastrahlen emittieren, wie beispielsweise ^{124}I, ^{125}I, ^{128}I, ^{132}I und ^{51}Cr, repräsentieren eine Klasse an Gammastrahlen emittierenden Signalgruppen mit einem radioaktiven Element. Insbesondere bevorzugt ist ^{125}I. Eine andere Gruppe an nützlichen Markierungsmitteln sind solche Elemente, wie beispielsweise ^{11}C, ^{18}F, ^{15}O und ^{13}N, welche ihrerseits Positronen emittieren. Die so emittierten Positronen erzeugen durch das Zusammentreffen mit Elektronen, die im Körper des Tieres vorhanden sind, Gammastrahlen. Ebenfalls verwendbar ist ein beta-Emitter, wie beispielsweise ^{111}Indium oder ^{3}H.

[0268] Die Verknüpfung von Markierungen, d.h. die Markierung von Polypeptiden und Proteinen, ist im Stand der Technik gut bekannt. Beispielsweise können Proteine oder ein Phage durch metabolischen Einbau von Radioisotopen-enthaltenden Aminosäuren markiert werden, die als Komponente im Kulturmedium bereitgestellt werden. Siehe beispielsweise Galfre et al., Meth. Enzymol., 73: 3–46 (1981). Im Besonderen sind die Verfahren zur Proteinkonjugation oder zum Koppeln mittels aktivierter funktioneller Gruppen anwendbar. Siehe beispielsweise Aurameas et al., Scand. J. Immunol., Vol. 8 Suppl. 7: 7–23 (1978), Rodwell et al., Biotech., 3: 889–894 (1984) und US-Pat. Nr. 4,493,795.

[0269] Die diagnostischen Systeme können ebenfalls bevorzugt als eine getrennte Packung ein spezifisches Bindungsagens mit einschließen. Ein "spezifisches Bindungsagens" ist eine molekulare Einheit, die zur selektiven Bindung einer Spezies an Reagenzien der vorliegenden Erfindung oder von einem Komplex, der eine solche Spezies enthält, in der Lage ist, jedoch nicht selbst ein Polypeptid oder ein Phage der vorliegenden Erfindung ist. Beispielhafte spezifische Bindungsagenzien sind Antikörpermoleküle, Komplementproteine oder Fragmente davon, S. aureus-Protein A, und Ähnliches. Bevorzugt bindet das spezifische Bindungsagens die Reagenz-Spezies, wenn die Spezies als Teil eines Komplexes vorhanden ist. In bevorzugten Systemen ist das spezifische Bindungsagens markiert. Enthält das diagnostische System ein spezifisches Bindungsagens, das nicht markiert ist, wird das Agens gleichwohl typischerweise als Mittel zur Amplifikation oder als Reagenz verwendet. In diesen Systemen ist das markierte spezifische Bindungsagens in der Lage, das Mittel zur Amplifikation spezifisch zu binden, wenn das Mittel zur Amplifikation an einen Komplex, der die Reagenz-Spezies enthält, gebunden ist.

[0270] Die diagnostischen Kits, die in Bezug auf die vorliegende Erfindung verwendbar sind, können in einem "ELISA"-Format verwendet werden, um die Menge eines vorgewählten Liganden in einer flüssigen Probe zu detektieren. "ELISA" bezieht sich auf einen Enzym-verknüpften Immunsorptionsassay, der einen an eine feste Phase gebundenen Antikörper oder Antigen verwendet und ein Enzym-Antigen- oder Enzym-Antikörperkonjugat zur Detektion und Quantifizierung der Menge an Antigen, das in einer Probe enthalten und auf die vorliegenden Verfahren leicht anwendbar ist. Eine Beschreibung des ELISA-Verfahrens wird in Kapitel 22 der 4. Ausgabe von Basic and Clinical Immunology von D.P. Sites et al, veröffentlicht durch Lange Medical Publications von Los Altos, CA, in 1982 und in den US-Patenten Nr. 3,654,090, Nr. 3,850,752 und Nr. 4,016,034.

[0271] In einigen diagnostischen Kits kann daher ein Polypeptid oder ein Phage der vorliegenden Erfindung an eine feste Matrix fixiert werden, um einen festen Träger zu bilden, den eine Packung in den diagnostischen Systemen umfasst.

[0272] Ein Reagenz wird typischerweise an einer festen Matrix mittels Adsorption aus einem wässrigen Medium fixiert, obwohl andere Verfahren zur Fixierung auf Proteine anwendbar sind und Polypeptide verwendet werden können, die Fachleuten gut bekannt sind. Beispielhafte Adsorptionsverfahren werden hier beschrie-

ben.

[0273] Verwendbare feste Matrizen sind im Stand der Technik ebenfalls gut bekannt. Solche Materialien sind wasserunlöslich und schließen quervernetztes Dextran mit ein, das unter dem Markennamen SEPHADEX von Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, NJ) erhältlich ist; Agarose; Beads aus Polystyren-Kügelchen von etwa 1 Mikron bis etwa 5 Millimeter im Durchmesser, die von Abbott Laboratories in Nord-Chicago, IL, erhältlich sind; Polyvinylchlorid, Polystyren, quervernetztes Polyacrylamid, Nitrocellulose- oder Nylon-basierte Netze, wie beispielsweise Blätter, Bänder oder Schalen; oder Röhren, Platten oder die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte, wie beispielsweise solche aus Polystyren oder Polyvinylchlorid.

[0274] Die Reagenz-Spezies, das markierte spezifische Bindungsagens oder das Amplifizierungsreagenz irgendeines hier beschriebenen diagnostischen Systems kann in Lösung bereitgestellt werden, wie beispielsweise einer flüssigen Dispersion, oder als ein im Wesentlichen trockenes Pulver, z.B. in lyophilisierter Form. Ist das Signalmittel ein Enzym, kann das Enzymsubstrat ebenfalls in einer getrennten Packung eines Systems bereitgestellt werden. Ein fester Träger, wie beispielsweise die zuvor beschriebene Mikrotiterplatte, und ein oder mehrere Puffer können ebenfalls als getrennt voneinander gepackte Elemente in diesem diagnostischen Prüfsystem enthalten sein.

[0275] Die hier in Bezug auf diagnostische Systeme diskutierten Packungsmaterialien sind solche, die gewöhnlicherweise in diagnostischen Systemen verwendet werden.

H. Prüfverfahren

[0276] Die vorliegende Erfindung kann ebenfalls auf verschiedene Prüfverfahren zur Bestimmung der Anwesenheit und bevorzugt der Menge eines vorgewählten Liganden, der typischerweise in einer wässrigen Zusammensetzung vorhanden ist, wie beispielsweise eine biologische flüssige Probe, unter Verwendung eines heterodimeren Rezeptors oder eines Phagen dieser Erfindung als Liganden-bindendes Reagenz zur Bildung eines Bindungsreaktionsproduktes angewendet werden, dessen Menge entweder direkt oder indirekt mit der Menge des vorgewählten Liganden in der Probe in Beziehung steht.

[0277] Es wird Fachleute klar sein, dass es vielzählige gut bekannte klinische diagnostische chemische Verfahren gibt, in welchen ein Bindungsreagenz dieser Erfindung verwendet werden kann, um ein Bindungsreaktionsprodukt zu erzeugen, dessen Menge in Beziehung zur Menge des Liganden in einer Probe steht. Beispielhafte Prüfverfahren werden daher hier beschrieben.

[0278] Verschiedene heterogene und homogene Protokolle, die entweder kompetitiv oder nicht-kompetitiv sind, können bei der Durchführung eines Prüfverfahrens dieser Erfindung angewendet werden.

[0279] In einem Verfahren kann die Erfindung auf ein Prüfverfahren zur direkten Bindung unter Verwendung eines Liganden-bindenden heterodimeren Rezeptors dieser Erfindung als Bindungsreagenz angewendet werden, um die Anwesenheit eines vorgewählten Liganden zu detektieren, welchen der Rezeptor bindet. Das Verfahren umfasst die Schritte a) Mischen einer Probe, von der angenommen wird, dass sie ein vorgewähltes Antigen mit einem Liganden-bindenden heterodimeren Rezeptor dieser Erfindung enthält, welcher an den vorgewählten Liganden unter Bindungsbedingungen bindet, die für den Liganden-bindenden heterodimeren Rezeptor ausreichend sind, um den Liganden zu binden und einen Liganden-Rezeptor-Komplex auszubilden; und b) Detektierung der Anwesenheit des Liganden-Rezeptor-Komplexes oder des Liganden-bindenden heterodimeren Rezeptors im Komplex.

[0280] Bindungsbedingungen sind solche, die die Liganden-Bindungsaktivität des Rezeptors beibehalten. Solche Bedingungen schließen einen Temperaturbereich von etwa 4 bis 50 Grad Celsius, einen Bereich des pH-Wertes von etwa 5 bis 9 und eine Ionenstärke mit ein, die von etwa der von destilliertem Wasser bis zu der von etwa ein molarem Natriumchlorid variiert.

[0281] Der Detektionsschritt kann, wie im Gebiet der Immunologie gut bekannt ist, entweder auf den Komplex oder das Bindungsreagenz (die Rezeptorkomponente des Komplexes) gerichtet werden. Es kann daher ein sekundäres Bindungsreagenz, wie beispielsweise ein für den Rezeptor spezifischer Antikörper, verwendet werden.

[0282] Alternativ kann der Komplex unter Zuhilfenahme eines markierten Rezeptormoleküls detektierbar sein, wodurch der Komplex markiert wird. Die Detektion umfasst in diesem Fall die Detektion der in dem Komplex

vorhandenen Markierung.

[0283] In einem bevorzugten Verfahren wird der Liganden-bindende heterodimere Rezeptor als Anlagerung an einen Partikel eines filamentösen Phagen, d.h. auf der Oberfläche des Phagen bereitgestellt. Eine beispielhafte Untersuchung unter Verwendung eines filamentösen Phagen dieser Erfindung wird in einem ELISA-Format in den Beispielen beschrieben.

[0284] In einem anderen Verfahren wird ein Partikel eines filamentösen Phagen detektierbar markiert, beispielsweise durch ein in ein Protein oder eine Nukleinsäure des hier beschriebenen Phagen eingebautes Radioisotop. In diesem Verfahren umfasst die Detektion die Detektion der Markierung im Komplex und dadurch die Detektion der Anwesenheit des Liganden in dem Komplex.

[0285] Ein weiterhin mögliches diagnostisches Verfahren verwendet die Multivalenz eines Partikels eines filamentösen Phagen zur Quervernetzung eines Liganden, wodurch eine Aggregation multipler Liganden und Phagenpartikel gebildet wird, die ein fällbares Aggregat erzeugt. Dieses Verfahren ist mit den gut bekannten Verfahren der Immunfällung vergleichbar. Das Verfahren umfasst die Schritte der Mischung einer Probe mit einer Vielzahl an Phagenpartikeln dieser Erfindung zur Bildung einer Bindungsmischung unter Bindungsbedingungen, gefolgt von einem Auftrennungsschritt zur Isolierung des gebildeten Bindungskomplexes. Die Isolierung wird üblicherweise durch Zentrifugation oder Filtration zur Entfernung des Aggregats aus der Mischung durchgeführt. Die Anwesenheit des Bindungskomplexes deutet auf die Anwesenheit des zu detektierenden vorgewählten Liganden hin.

Beispiele

[0286] Die folgenden Beispiele beabsichtigen, den Schutzbereich der Erfindung beispielhaft darzustellen, jedoch nicht einzuschränken.

1. Konstruktion eines dicistronischen Expressionsvektors zur Erzeugung eines heterodimeren Rezeptors auf Phagenpartikeln

[0287] Um ein Vektorsystem zur Erzeugung einer großen Anzahl von Fab-Antikörperfragmenten zu erhalten, die direkt gescreent werden können, wurden kürzlich Expressionsbibliotheken im Bakteriophagen Lambda konstruiert, wie in Huse et al., Science, 246: 1275–1281 (1989) beschrieben. Diese Systeme enthielten keine Gestaltungsmerkmale, die dafür sorgen, dass das exprimierte Fab zur Oberfläche eines Partikel eines filamentösen Phagen geleitet wird.

[0288] Das bei der Auswahl eines Vektorsystems verwendete Hauptkriterium war die Notwendigkeit der Erzeugung der größten Anzahl an Fab-Fragmenten, die direkt gescreent werden könnten. Der Bakteriophage Lambda wurde aus drei Gründen als Anfangspunkt zur Entwicklung eines Expressionsvektors ausgewählt. Erstens war die in-vitro-Packung von Phagen-DNA das effizienteste Verfahren zur erneuten Einführung von DNA in Wirtszellen. Zweitens war es möglich, die Proteinexpression auf der Stufe von einzelnen Phagenplaques zu detektieren. Letztendlich bringt das Screening von Phagenbibliotheken typischerweise weniger Schwierigkeiten mit unspezifischer Bindung mit sich. Die Alternative, Plasmidklonierungsvektoren, sind lediglich bei der Analyse von Klonen vorteilhaft nachdem diese identifiziert wurden. Dieser Vorteil ging in der vorliegenden Erfindung aufgrund der Verwendung eines dicistronischen Expressionsvektors, wie beispielsweise pCombVIII, nicht verloren, wodurch es ermöglicht wurde, dass ein Plasmid ausgeschnitten werden konnte, das die schwere Kette, die leichte Kette, oder Fab-exprimierende Inserts enthielt.

a. Konstruktion eines dicistronischen Expressionsvektors pCOMB

(i) Herstellung von Lambda Zap™ II

[0289] Lambda Zap™ II ist ein Derivat des originalen Lambda Zap (ATCC # 40,298), welcher alle Merkmale des ursprünglichen Lambda Zap beibehält, einschließlich 6 singulärer Klonierungsstellen, der Fusionsproteinexpression und der Fähigkeit, das Insert in der Form eines Phagemids (Bluescript SK-) schnell auszuschneiden, jedoch fehlt diesem die SAM 100-Mutation, welche das Wachstum auf vielen Non-Sup F-Stämmen, einschließlich XL1-Blue, ermöglicht. Lambda Zap™ II wurde wie in Short et al., Nuc. Acids Res., 16: 7583–7600, 1988, durch Ersetzen des Lambda S-Gens konstruiert, welches in einem 4254 Basenpaar (Bp)-DNA-Fragment enthalten war, das durch den Verdau von Lambda Zap mit dem Restriktionsenzym Nco I erzeugt wurde. Dieses 4254 Bp-DNA-Fragment wurde durch das 4254 Bp-DNA-Fragment ersetzt, das das Lambda S-Gen enthält,

welches aus Lambda gt10 (ATCC # 40,179) nach Verdau des Vektors mit dem Restriktionsenzym Nco I isoliert wurde. Das 4254 Bp-DNA-Fragment, das aus Lambda gt10 isoliert wurde, wurde in den originalen Lambda Zap-Vektor unter Verwendung von T4-DNA-Ligase und Standardverfahren ligiert, wie solchen, die in Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., Hrsg., John Wiley and Sons, NY, 1987, zur Bildung des Lambda Zap™ II beschrieben wurden.

(ii) Herstellung von Lambda Hc2

[0290] Zur Expression einer Vielzahl an V_H-kodierenden DNA-Homologen in einer E. coli-Wirtszelle wurde ein Lambda Hc2 benannter Vektor konstruiert. Der Vektor stellte Folgendes bereit: die Fähigkeit, die V_H-kodierenden DNA-Homologen im richtigen Leserahmen zu platzieren; eine Ribosomenbindungsstelle, wie durch Shine et al., Nature, 254: 34, 1975, beschrieben; eine Leitsequenz, die das exprimierte Protein zum periplasmischen Spalt führt und die pelB-Sekretionssignal genannt wird; eine Polynukleotidsequenz, die für ein bekanntes Epitop (Epitop tag) kodiert; und ebenfalls ein Polynukleotid, das für ein Spacerprotein zwischen dem V_H-kodierenden DNA-Homolog und dem für das Epitop-tag kodierenden Polynukleotid. Lambda Hc2 wurde kürzlich durch Huse et al., Science, 246: 1275–1281 (1989) beschrieben.

[0291] Um Lambda Hc2 herzustellen, wurde eine synthetische DNA-Sequenz, die alle oben genannten Merkmale enthält, dadurch konstruiert, dass einzelsträngige Polynukleotidsegmente mit einer Länge von 20 bis 40 Basen geplant wurden, die miteinander hybridisieren und die doppelsträngige synthetische DNA-Sequenz bilden würden, die in **Fig. 3** gezeigt ist. Die individuellen einzelsträngigen Polynukleotidsegmente werden in Tabelle 3 gezeigt.

[0292] Die Polynukleotide N2, N3, N9–4, N11, N10–5, N6, N7 und N8 (Tabelle 3) wurden einer Kinasebehandlung unterzogen durch Zugabe von 1 µl von jedem Polynukleotid mit 0,1 Mikrogramm/Milliliter (µg/ml) und 20 Einheiten an T4-Plynukleotidkinase zu einer Lösung, die 70 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM Dithiothreitol (DTT), 10 mM beta-Mercaptoethanol, 500 Mikrogramm pro Milliliter (µg/ml) bovines Serumalbumin (BSA) enthält. Die Lösung wurde bei 37 Grad Celsius (37°C) für 30 Minuten stehen gelassen und die Reaktion wurde durch Inkubation der Lösung bei 65°C für 10 Minuten gestoppt. Die Polynukleotide für die zwei Enden, 20 ng Polynukleotide N1 und Polynukleotide N12, wurden für die Kinasereaktion zu der oben angegebenen Lösung zusammen mit 1/10 Volumen einer Lösung zugegeben, die 20,0 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2,0 mM $MgCl_2$ und 50,0 mM NaCl enthält. Diese Lösung wurde auf 70°C für 5 Minuten erhitzt und man ließ diese anschließend auf Raumtemperatur, ungefähr 25°C, über 1,5 Stunden in einem 500 ml-Becherglas mit Wasser abkühlen. Während dieses Zeitraums lagerten sich alle 10 Polynukleotide aneinander, um das in **Fig. 3** gezeigte doppelsträngige synthetische DNA-Insert zu bilden. Die individuellen Polynukleotide wurden zur Stabilisierung des synthetischen DNA-Inserts durch die Zugabe von 40 µl der oben genannten Reaktion zu einer Lösung miteinander kovalent verknüpft, die 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 7 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM Adenosintriphosphat (ATP) und 10 Einheiten an T4-DNA-Ligase enthält. Diese Lösung wurde bei 37°C für 30 Minuten stehen gelassen und anschließend wurde die T4-DNA-Ligase durch Inkunbation der Lösung bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert. Die endständigen Polynukleotide wurden einer Kinasereaktion unterworfen durch Mischen von 52 µl der oben genannten Reaktion, sowie von 4 µl einer Lösung, die 10 mM ATP und 5 Einheiten an T4-Polynukleotidkinase enthält. Diese Lösung wurde bei 37°C für 30 Minuten stehen gelassen und anschließend wurde die T4-Polynukleotidkinase durch Beibehalten der Lösung bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert.

Tabelle 3

SEQ ID NO.		
(22)	N1)	5' GGCCGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCAT 3'
(23)	N2)	5' AATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATT 3'
(24)	N3)	5' GTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCC 3'
(25)	N6)	5' CAGTTTCACCTGGGCCATGGCTGGTTGGG 3'
(26)	N7)	5' CAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCTGCCGTAGGCAATAG 3'
(27)	N8)	5' GTATTTCATTATGACTGTCTCCTTGAAATAGAATTTGC 3'
(28)	N9-4)	5' AGGTGAAACTGCTCGAGATTTCTAGACTAGTTACCCGTAC 3'
(29)	N10-5)	5' CGGAACGTCGTACGGGTAACTAGTCTAGAAATCTCGAG 3'
(30)	N11)	5' GACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTCG 3'
(31)	N12)	5' TCGACGAATTCTATTAAGAACCGTAGTC 3'

[0293] Das vervollständigte synthetische DNA-Insert wurde direkt in den Lambda Zap™ II-Vektor ligiert, der im Beispiel 1a (i) beschrieben wurde, und der kurz vorher mit den Restriktionsenzymen Not I und Xho I verdaut wurde. Die Ligationsmischung wurde gemäß den Instruktionen des Herstellers unter Verwendung des Gigapack II Gold-Packungsextrakts gepackt, der von Stratagene, La Jolla, Kalifornien, erhältlich ist. Die gepackte Ligationsmischung wurde auf XL1-Blue-Zellen (Stratagene) ausplattiert. Individuelle Lambdaplaques wurden gepickt und die Inserts wurden gemäß dem In-vivo-Ausschneidungsprotokoll für Lambda Zap™ II ausgeschnitten, das vom Hersteller (Stratagene) zur Verfügung gestellt wurde. Dieses In-vivo-Ausschneidungsprotokoll bringt das klonierte Insert aus dem Lambda Hc2-Vektor in einen Phagemidvektor, um eine Manipulation und Sequenzierung zu vereinfachen. Die Genauigkeit der oben aufgelisteten Klonierungsschritte wurden durch Sequenzierung des Inserts unter Verwendung des Sanger-Didesoxyverfahrens bestätigt, das durch Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463–5467, (1977), beschrieben wurde unter Verwendung der Instruktionen des AMV-Reverse-Transkriptase ^{35}S-ATP-Sequenzierungskits (Stratagene). Die Sequenz des resultierenden doppelsträngigen synthetischen DNA-Inserts im V_H-Expressionsvektor (Lambda Hc2) wird in Fig. 3 gezeigt. Die Sequenz jedes Stranges (oben und unten) von Lambda Hc2 wird in dem Sequenzprotokoll als SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 2 aufgelistet. Der erhaltende Lambda Hc2-Expressionsvektor wird in Fig. 4 gezeigt.

(iii) Herstellung von Lambda Lc2

[0294] Um eine Vielzahl von V_L-kodierenden DNA-Homologen in einer E. coli-Wirtszelle zu exprimieren, wurde ein Lambda Lc2 genannter Vektor konstruiert, der in der Lage ist, die V_L-kodierenden DNA-Homologe in den richtigen Leserahmen zu bringen, und eine Ribosomenbindungsstelle, wie durch Shine et al., Nature, 254: 34 (1975), bereitstellt, und das pelB-Gen Leitsequenz-Ssekretionssignal bereitstellt, das kurz zuvor zur erfolgreichen Sekretion von Fab-Fragmenten in E. coli durch Lei et al., J. Bac., 169: 4379 (1987) und Better et al., Science, 240: 1041 (1988) verwendet wurde, und ebenfalls wird ein Polynukleotid bereitgestellt, das eine Restriktionsendonukleaseschnittstelle zur Klonierung enthält. Lambda Lc2 wurde kurz zuvor durch Huse et al., Science, 246: 1275–1281 (1989), beschrieben.

[0295] Eine synthetische DNA-Sequenz, die alle oben aufgezählten Merkmale enthält, wurde durch Planung von einsträngigen Polynukleotidsequenzen mit einer Länge von 20–60 Basen konstruiert, die miteinander hybridisieren und die doppelsträngige synthetische DNA-Sequenz bilden würden, die in Fig. 5 gezeigt ist. Die Sequenz jedes einzelnen einzelsträngigen Polynukleotidsegments (01–08) innerhalb der doppelsträngigen synthetischen DNA-Sequenz wird in Tabelle 4 gezeigt.

[0296] Die Polynukleotide 02, 03, 04, 05, 06 und 07 (Tabelle 4) wurden einer Kinasereaktion unterworfen durch Zugabe von 1 µl (0,1 µg/µl) von jedem Polynukleotid und 20 Einheiten an T4-Polynukleotidkinase zu einer Lösung, die 70 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl, 5 mM DTT, 10 mM beta-Mercaptoethanol, 500 mg/ml BSA enthält. Die Lösung wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und die Reaktion wurde durch Inkubation der Lösung bei 65°C für 10 Minuten gestoppt. 20 ng von jedem der zwei endständigen Polynukleotide, 01 und 08,

wurden zu der oben erwähnten Lösung der Kinasereaktion gemeinsam mit 1/10 des Volumens einer Lösung zugegeben, die 20,0 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2,0 mM MgCl und 15,0 mM Natriumchlorid (NaCl) enthält. Diese Lösung wurde auf 70°C für 5 Minuten erhitzt und anschließend ließ man diese auf Raumtemperatur abkühlen (ungefähr 25°C, über 1,5 Stunden in einem 500 ml-Becherglas mit Wasser). Während dieses Zeitraums lagerten sich alle 8 Polynukleotide so zusammen, dass sie das in Fig. 5 gezeigte doppelsträngige synthetische DNA-Insert bilden. Die individuellen Polynukleotide wurden zur Stabilisierung des synthetischen DNA-Inserts durch die Zugabe von 40 µl der oben genannten Reaktion zu einer Lösung kovalent miteinander verknüpft, die von 50 ml Tris-HCl, pH 7,5, 7 ml MgCl, 1 mM DTT, 1 mM ATP und 10 Einheiten T4-DNA-Ligase enthält. Diese Lösung wurde bei 37°C für 30 Minuten inkuniert und anschließend wurde die T4-DNA-Ligase durch Inkubation der Lösung bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert. Die endständigen Polynukleotide wurden durch Mischung von 52 µl der oben genannten Reaktion, 4 µl einer Lösung, enthaltend 10 mM ATP und 5 Einheiten an T4-Polynukleotidkinase einer Kinasereaktion unterzogen. Diese Lösung wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und die T4-Polynukleotidkinase wurde anschließend durch Inkubation der Lösung bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert.

Tabelle 4

SEQ ID NO.		
(32)	01)	5' TGAATTCTAAACTAGTCGCCAAGGAGACAGTCAT 3'
(33)	02)	5' AATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATT 3'
(34)	03)	5' GTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCC 3'
(35)	04)	5' GAGCTCGTCAGTTCTAGAGTTAAGCGGCCG 3'
(36)	05)	5' GTATTTCATTATGACTGTCTCCTTGGCGACTAGTTTAGAATTCAAGCT 3'
(37)	06)	5' CAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCTGCCGTAGGCAATAG 3'
(38)	07)	5' TGACGAGCTCGGCCATGGCTGGTTGGG 3'
(39)	08)	5' TCGACGGCCGCTTAACTCTAGAAC 3'

[0297] Das vervollständigte synthetische DNA-Insert wurde direkt in den in Beispiel 1(a) (i) beschriebenen Lambda Zap™ II-Vektor ligiert, der kurz zuvor mit den Restriktionsenzymen Sac I und Xho I verdaut wurde. Die Ligationsmischung wurde gemäß den Instruktionen des Herstellers unter Verwendung des Gigapack II-Gold-Packungsextrakts (Stratagene) gepackt. Die gepackte Ligationsmischung wurde auf XL1-Blue-Zellen (Stratagene) ausplattiert. Individuelle Lambdaplaques wurden gepickt und die Inserts wurden gemäß dem vom Hersteller (Stratagene) bereitgestellten In-vivo-Ausschneidungsprotokoll für Lambda Zap™ II ausgeschnitten. Dieses In-vivo-Ausschneidungsprotokoll bewegte die klonierten Inserts aus dem Lambda Lc2-Vektor in einen Plasmidphagemidvektor, der eine einfache Manipulation und Sequenzierung ermöglicht. Die Genauigkeit des oben genannten Klonierungsschritts wurde durch Sequenzierung des Inserts unter Verwendung der Instruktionen des Herstellers im „AMV-Reversetranskriptase ^{35}S-dATP-Sequenzierungs-Kit" (Stratagene) sequenziert. Die Sequenz des resultierenden Lc2-Expressionsvektors (Lambda Lc2) wird in Fig. 5 gezeigt. Jeder Strang wird getrennt im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO. 3 und SEQ ID NO. 4 aufgelistet. Der erhaltene Lc2-Vektor wird schematisch in Fig. 6 dargestellt.

[0298] Ein bevorzugter Vektor für die Verwendung in dieser Erfindung, Lambda Lc3 genannt, ist ein Derivat des oben hergestellten Lambda Lc2. Lambda Lc2 enthält eine Spe I-Restriktionsschnittstelle (ACTAGT), die 3' zu der EcoR I-Restriktionsschnittstelle und 5' zu der Shine-Dalgarno-Ribosomenbindungsstelle lokalisiert ist, wie in der Sequenz in Fig. 5 und in SEQ ID NO. 3 gezeigt. Eine Spe 1-Restriktionsschnittstelle ist ebenfalls in Lambda Hc2 vorhanden, wie in den Fig. 3 und Fig. 4 und in SEQ ID NO. 1 gezeigt. Ein kombinatorischer Vektor, genannt pComb, wurde durch Kombinieren von Teilen von Lambda Hc2 und Lc2, wie in Beispiel 1a (iv) unten beschrieben, konstruiert. Der erhaltene kombinatorische pComb-Vektor enthielt zwei Spe I-Restriktionsschnittstellen, von denen eine durch Lambda Hc2 und eine durch Lambda Lc2 bereitgestellt wird, wobei eine EcoR I-Schnittstelle dazwischen liegt. Trotz der Anwesenheit zweier Spe I-Restriktionsschnittstellen wurden DNA-Homologe, die Spe I- und EcoR I-kohäsive Enden besitzen, erfolgreich gerichtet in einen pComb-Expressionsvektor ligiert, der kurz zuvor mit Spe I und EcoR I, wie in Beispiel 1b unten beschrieben, verdaut wurde. Die Nähe der EcoR I-Restriktionsschnittstelle zur 3'-Spe I-Schnittstelle, die durch den Lc2-Vektor bereitgestellt wird, inhibierte den vollständigen Verdau der 3'-Spe I-Schnittstelle. Der Verdau von pComb mit Spe I und EcoR I führte daher nicht zur Entfernung der EcoR I-Schnittstelle zwischen den beiden Spe I-Schnittstellen.

[0299] Die Anwesenheit einer zweiten Spe I-Restriktionsschnittstelle kann bei Ligationen in einem pCom-Vektor unerwünscht sein, der lediglich mit Spe I verdaut wurde, da die Region zwischen den zwei Schnittstellen eliminiert werden würde. Ein Derivat von Lambda Lc2, dem die zweite oder 3'-Spe I-Schnittstelle fehlt, und Lambda Lc3 genannt wird, wird daher dadurch hergestellt, dass Lambda Lc2 zuerst mit Spe I zur Bildung eines linearisierten Vektors verdaut wird. Die Enden werden aufgefüllt, um stumpfe Enden zu bilden, die miteinander ligiert werden, um ein Lambda Lc3 zu erhalten, dem eine Spe I-Schnittstelle fehlt. Lambda Lc3 ist ein bevorzugter Vektor zur Verwendung bei der Konstruktion eines unten beschriebenen kombinatorischen Vektors.

(iv) Herstellung von pComb

[0300] Aus den Expressionsvektoren Lambda Hc2 oder Lambda Lc2 wurden unter Verwendung eines oben beschriebenen In-vivo-Ausschneidungsprotokolls Phagemiden ausgeschnitten. Aus den Phagemiden enthaltenden Zellen wurde doppelsträngige DNA entsprechend den durch Holmes et al., Anal. Biochem., 114: 193 (1981), beschriebenen Verfahren hergestellt. Die aus der In-vivo-Ausschneidung resultierenden Phagemiden enthielten die gleichen Nukleotidsequenzen zur Klonierung und Expression von Antikörperfragmenten wie die Ursprungsvektoren und wurden Phagemid Hc2 und Lc2 genannt, korrespondierend zu Lambda Hc2 und Lc2.

[0301] Zur Konstruktion des kombinatorischen Phagemidvektors pComb, der durch Kombinieren von Teilen aus Phagemid Hc2 und Phagemid Lc2 erzeugt wurde, wurde Phagemid Hc2 zuerst mit Sac I verdaut, um die 5' zum LacZ-Promotor gelegene Restriktionsschnittstelle zu entfernen. Der linearisierte Phagemid wurde anschließend mit Hilfe von T4-Polymerase mit stumpfen Enden versehen und ligiert, um ein Hc2-Phagemid zu ergeben, dem eine Sac I-Schnittstelle fehlt. Das modifiziert Hc2-Phagemid und das Lc2-Phagemid wurden anschließend getrennt voneinander einem Restriktionsverdau mit Sca I und EcoR I unterworfen, um zu einem Hc2-Fragment zu führen, das 5' nach 3' Sca I, Not I Xho I, Spe I und EcoR I-Restriktionsschnittstellen und ein Lc2-Fragment besitzt, das von 5' nach 3' EcoR I-, Sac I-, Xba I- und Sac I-Restriktionsschnittstellen enthält. Die linearisierten Phagemiden wurden anschließend miteinander an ihren jeweiligen kohäsiven Enden zur Bildung von pComb ligiert, einem zirkularisierten Phagemid, das eine lineare Anordnung aus Restriktionsschnittstellen von Not I, Xho I, Spe I, EcoR I, Sac I, Xba I, Not I, Apa I und Sca I besitzt. Der ligierte Phagemidvektor wurde anschließend in einen geeigneten bakteriellen Wirt eingebracht und es wurden Transformanten auf dem Antibiotikum Ampicillin ausgewählt.

[0302] Ausgewählte Ampicillin-resistente Transformanten wurden auf die Anwesenheit von zwei Not I-Schnittstellen gescreent. Der erhaltene Ampicillin-resistente kombinatorische Phagemidvektor wurden pComb genannt, dessen schematischer Aufbau in **Fig. 7** gezeigt wird. Der erhaltene kombinatorische Vektor pComb, bestand aus einem DNA-Molekül, welches zwei Kassetten zur Expression zweier Polypeptide und Sequenzen von Nukleotidresten für die folgenden operativ miteinander verknüpften aufgezählten Elemente in einer 5'- zu 3'-Richtung besitzt: eine erste Kassette, die aus einem induzierbaren LacZ-Promotor stromaufwärts vom LacZ-Gen besteht; eine Not I-Restriktionsschnittstelle; eine Ribosomenbindungsstelle; eine pelB-Leitsequenz; einen Spacer; eine Klonierungsregion, die von einer 5'-Xho- und einer 3'-Spe I-Restriktionsschnittstelle umgeben ist; ein Dekapeptidtag, gefolgt von Stoppsequenzen zur Expressionskontrolle; eine EcoR I-Restriktionsschnittstelle 5' zu einer zweiten Kassette gelegen, die aus einer Ribosomenbindungsstelle zur Expressionskontrolle besteht; eine pelB-Leitsequenz; eine Spacerregion; eine Klonierungsregion, die von einer 5'-Sac I- und einer 3'-Xba I-Restriktionsschnittstelle umgeben ist, gefolgt von Stoppsequenzen zur Expressionskontrolle und einer zweiten Not I-Restriktionsschnittstelle.

[0303] Ein bevorzugter kombinatorischer Vektor zur Verwendung in dieser Erfindung, genannt pComb2, wird durch Kombination von Anteilen von Phagemid Hc2 und Phagemid Lc3, wie oben beschrieben zur Herstellung von pComb, konstruiert. Der erhaltene kombinatorische Vektor pComb2 besteht aus einem DNA-Molekül, das zwei zu pComb identische Kassetten zur Expression zweier Fusionsproteine besitzt, die zu pComb identisch sind, mit der Ausnahme, dass eine zweite Spe I-Restriktionsschnittstelle in der zweiten Kassette eliminiert ist.

b. Konstruktion der Vektoren pCombVIII und pCombIII zur Expression von Fusionsproteinen, die einen Membran-Anker eines Beschichtungsproteins auf einem Bakteriophagen besitzen

[0304] Aufgrund der multiplen Endonukleaserestriktionsschnittstellen ist der oben hergestellte pComb-Phagemidexpressionsvektor ein nützliches Klonierungsvehikel zu Modifikation für die Herstellung eines Expressionsvektors dieser Erfindung. An dieser Stelle wird pComb mit EcoR I und Spe I verdaut, gefolgt von einer Phosphatasebehandlung zur Erzeugung von linearisiertem pComb.

(i) Herstellung von pCombVIII

[0305] Ein in Beispiel 2g hergestelltes PCR-Produkt, das eine Nukleotidsequenz besitzt, die eine Membran-Ankerdomäne des Beschichtungsproteins VIII (cpVIII) aus einem filamentösen Bakteriophagen und kohäsive Spe I- und EcoR I-Enden definiert, wurde mit linearisiertem pComb zur Bildung einer Ligationsmischung linearisiert. Das PCR-Fragment, das den Membran-Anker von cpVIII kodiert, wurde an den korrespondierenden kohäsiven Enden gerichtet in den pComb-Phagemidexpressionsvektor ligiert, was zur Bildung von pCombVIII (ebenfalls pComb8 genannt) führte. pCombVIII enthält eine in SEQ ID NO. 116 von der Nukleotidbase 1 bis zur Base 259 definierte Kassette, und enthält ein pelB-Sekretionssignal, das mit dem cpVIII-Membran-Anker operativ verknüpft wurde.

[0306] Ein bevorzugter Phagemidexpressionsvektor zur Verwendung in dieser Erfindung, der entweder pComb2-VIII oder pComb2-8 genannt wurde, wurde wie oben beschrieben, durch gerichtete Ligation des PCR-Fragments, das den cpVIII-Membran-Anker kodiert, in einen pComb2-Phagemidexpressionsvektor über Spe I- und EcoR I-kohäsive Enden hergestellt. pComb2-8 besaß nur eine Spe I-Restriktionsschnittstelle.

(ii) Herstellung von pCombIII

[0307] Ein anderer Phagemidexpressionsvektor wurde unter Verwendung von Sequenzen konstruiert, die die Membran-Ankerdomäne aus dem Bakteriophagen cpIII kodiert. Ein PCR-Produkt, das den cpIII-Membran-Anker definiert, und eine Sequenz der LacZ-Promotorregion 3' zum Membran-Anker zur Expression der leichten Kette sowie Spe I und EcoR I kohäsive Enden enthält, wurde wie für cpVIII beschrieben hergestellt, wobei die Details in Beispiel 2g beschrieben werden. Das aus cpIII abgeleitete PCR-Produkt wurde anschließend zur Bildung des Vektors pComb2-3 (ebenfalls pComb2-III genannt) in einen linearisierten pComb2-Vektor ligiert, der lediglich eine Spe I-Schnittstelle enthielt.

[0308] Ein stärker bevorzugter Phagemidexpressionsvektor zur Verwendung in dieser Erfindung, der zusätzliche Restriktionsenzymklonierungsstellen besitzt und pComb-III' oder pComb2-3' genannt wurde, wurde wie oben für pComb2-3 beschrieben durch Zugabe eines 51-Basenpaar-Fragments aus pBluescript hergestellt, wie durch Short et al., Nuc. Acids Res., 16: 7583–7600 (1988) beschrieben und wie von Stratagene kommerziell verfügbar. Um pComb2-3' herzustellen, wurde pComb2-2 zuerst mit Xho I- und Spe I-Restriktionsenzymen zur Bildung von linearisiertem pComb2-3 verdaut. Der Vektor Bluescript wurde mit den gleichen Enzymen unter Freisetzung eines 51-Basenpaar-Fragments verdaut, das die Restriktionsenzymschnittstellen Sal I, Acc I, Hinc II, Cla I, Hind III, EcoR V, Pst I, Sma I und BamH I besitzt. Das 51-Basenpaar-Fragment wurde in den linearisierten pComb2-3-Vektor über die kohäsiven Xho I- und Spe I-Enden unter Bildung von pComb2-3' ligiert.

c. Konstruktion von pCBAK-Vektoren, die einen Chloramphenicolresistenzmarker besitzen

[0309] Um ein anderes selektierbares Markergen, wie beispielsweise Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) zur Selektion von Bakterien zu verwenden, die mit einem Vektor dieser Erfindung transformiert wurden, wurden Expressionsvektoren auf der Basis von pComb entwickelt, die ein Gen besitzen, das CAT kodiert und pCBAK-Vektoren genannt werden. Die pCBAK-Vektoren werden durch Kombinieren von Teilen von pCB und pComb hergestellt.

(i) Herstellung von pCB

[0310] pBlueScript-Phagemidvektoren, pBC SK(–) und pBS SK(–), (Stratagene), wurden zur Erzeugung eines pCB genannten dritten Vektors, wie unten beschrieben, modifiziert und kombiniert.

[0311] pBC SK(–), das ein selektierbares Chloramphenicolmarkerresistenzgen enthält, wurde mit Bst BI verdaut und mit T4-Polymerase mit stumpfen Enden versehen. Ein zweiter Verdau mit Pvu I ermöglichte die Entfernung eines 1 Kilobasen (Kb)-Fragmentes unter Zurücklassung eines 2,4 Kb-linearisierten Vektors, welcher das selektierbare CAT-Markerresistenzgen, so wie eines induzierbaren LacZ-Promotor stromaufwärts des LacZ-Gens und einer Region mit einem ColE1-Ursprung. Das 2,4 Kb-Fragment wurde wiedergewonnen. Der pBS SK(–)-Vektor wurde mit Aat II verdaut und mit T4-Polymerase mit stumpfen Enden versehen. Ein zweiter Verdau mit Pvu I ermöglichte die Isolation eines 800 Basenpaar (Bp)-Fragmentes, das den f1-Replikationsursprung enthält. Die Ligation des aus pBS abgeleiteten 800 Bp-f1-Fragments mit dem 2,4 Kb pBC-Fragment erzeugte einen pCB-Vorläufervektor, der eine Sac I-Schnittstelle, einen f1-Replikationsursprung, ein selektierbares CAT-Markerresistenzgen, einen ColE1-Ursprung, eine multiple Klonierungsschnittstelle (MCS), flankiert durch T_3- und T_7-Promotoren, und einen stromaufwärts vom LacZ-Gen gelegenen induzierbaren LacZ-Promo-

tor enthält.

[0312] Der pCB-Vorläufervektor wurde anschließend mit Sac I verdaut und mit T4-Polymerase mit stumpfen Enden versehen. Der mit T4-Polymerase behandelte pCB-Vektor wurde anschließend zur Bildung des pCB-Vektors erneut ligiert, wobei diesem eine Sac I-Schnittstelle fehlt.

(ii) Herstellung von pCBAK0

[0313] Der das selektierbare CAT-Markerresistenzgen enthaltende pCB-Vektor wurde mit Sac II und Apa I verdaut und mit Phosphatase zur Vorbeugung der erneuten Ligation sowie zur Bildung von linearisiertem pCB-Vektor behandelt. Der in Beispiel 1(a) (iv) hergestellte pComb-Vektor wurde mit Sac II und Apa I einem Restriktionsverdau unterworfen, um ein Fragment freizusetzen, das Sequenzen aus Nukleotidresten besitzt, beginnend 5' zum LacZ-Promotor bis jenseits des 3'-Endes der zweiten Not I-Schnittstelle. Das Sac II- und Apa I-pComb-DNA-Fragment wurde anschließend gerichtet in den ähnlich verdauten pCB-Vektor zur Bildung des Phagemidexpressionsvektors pCBAKO ligiert. Bevorzugte pCBAK-Expressionsvektoren werden mit pComb2 konstruiert. Die erhaltenen pCBAK-Expressionsvektoren enthielten lediglich eine Spe I-Restriktionsschnittstelle.

(iii) Herstellung von pCBAK8

[0314] Um einen pCBAK-basierten Phagemidexpressionsvektor herzustellen, der eine Ankerdomäne eines Beschichtungsproteins auf einem Bakteriophagen im exprimierten Fusionsprotein kodiert, wurde der in Beispiel 1c (ii) hergestellte pCB-Phagemidklonierungsvektor durch Verdau mit Sac II und Apa I linearisiert. Der in Beispiel 1b (i) hergestellte pCombVIII-Phagemidexpressionsvektor wurde einem Restriktionsverdau mit Sac II und Apa I zur Bildung eines Fragments unterworfen, das eine Sequenz aus Nukleotidresten enthält, die 5' des LacZ-Promotors beginnt und über das 3'-Ende der zweiten Not I-Schnittstelle hinausreicht. Das Fragment wurde gerichtet in den linearisierten pBC-Klonierungsvektor zur Bildung des Phagemidexpressionsvektors pCBAK8 ligiert.

(iv) Herstellung von pCBAK3

[0315] Der Phagemidexpressionsvektor pCBAK3 für die Expression von Fusionsprotein, der cpIII-Membran-Ankerdomänen besitzt, wurde in ähnlicher Weise durch gerichtetes Ligieren des im Restriktionsverdau mit Sac II und Apa I hergestellten Fragments aus pCombIII in den mit Sac II und Apa I linearisierten pCB-Klonierungsvektor konstruiert.

2. Konstruktion von dicistronischen Expressionsvektoren zur Expression von anti-NPN-Heterodimer auf Phagenoberflächen

[0316] Bei der Durchführung dieser Erfindung wurden die schweren (Fd bestehend aus V_H und C_K1) und die leichten (Kappa) Ketten (V_L, C_L) von Antikörpern zuerst auf das Periplasma von E. coli zur Anordnung von heterodimeren Fab-Molekülen gerichtet. Um eine Expression von Antikörper Fab-Bibliotheken auf einer Phagenoberfläche zu erhalten, müssen die Sequenzen der Nukleotidreste, die entweder die Fd- oder leichten Ketten kodieren, operativ mit der Sequenz der Nukleotidreste verknüpft sein, die den Membran-Anker eines Beschichtungsproteins eines filamentösen Bakteriophagen kodieren. Zwei bevorzugte Beschichtungsproteine für die Verwendung in dieser Erfindung bei der Bereitstellung eines Membran-Ankers sind VIII und III (cpVIII und cpIII). In den hier beschriebenen Beispielen werden Verfahren zur operativen Verknüpfung einer Sequenz aus Nukleotidresten, die eine Fd-Kette kodieren, entweder an einen cpVIII- oder cpIII-Membran-Anker in ein Fusionsprotein dieser Erfindung beschrieben.

[0317] In einem Phagemidvektor sind ein erstes und ein zweites Cistron, die aus translatierbaren DNA-Sequenzen bestehen, operativ miteinander verknüpft, um ein dicistronisches DNA-Molekül zu bilden. Jedes Cistron im dicistronischen DNA-Molekül ist mit den DNA-Expressionskontrollsequenzen für die koordinierte Expression eines Fusionsproteins, Fd-cpVIII oder Fd-cpIII, und einer leichten (Kappa) Kette verknüpft.

[0318] Das erste Cistron kodiert ein periplasmisches Sekretionssignal (pelB-Leitsequenz), die operativ mit dem Fusionsprotein verknüpft ist, entweder Fd-cpVIII oder Fd-cpIII. Das zweite Cistron kodiert eine zweite pelB-Leitsequenz, die operativ mit einer leichten (kappa) Kette verknüpft ist. Die Anwesenheit der pelB-Leitsequenz erleichtert die koordinierte, jedoch getrennte Sekretion von sowohl dem Fusionsprotein wie auch der leichten Kette aus dem bakteriellen Cytoplasma in den periplasmischen Spalt.

[0319] Das oben beschriebene Verfahren wird schematisch in Fig. 8 skizziert. Kurz gesagt, trägt der Phagemidexpressionsvektor ein selektierbares Chloramphenicolacetyltransferase (CAT)-Resistenzmarkergen zusätzlich zu der Fd-cpVIII-Fusion und der kappa-Kette. Der f1-Phagenreplikationsursprung erleichtert die Erzeugung von einzelsträngigem Phagemid. Die Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG) induzierte Expression eines dicistronischen Signals, das die Fd-cpVIII-Fusion (V_H, C_{H1}, cpVIII) und die leichte Kette (V_L, C_L) kodiert, führt zur Bildung von schweren und leichten Ketten. Jede Kette wird zum periplasmischen Spalt durch die pelB-Leitsequenz geführt, welche anschließend abgespalten wird. Die schwere Kette wird in der Membran durch die cpVIII-Membran-Ankerdomäne verankert, während die leichte Kette in das Periplasma sekretiert wird. Die schwere Kette ordnet sich in der Anwesenheit der leichten Kette zur Bildung von Fab-Molekülen an. Das gleiche Ergebnis kann erhalten werden, falls alternativ die leichte Kette in der Membran über ein Fusionsprotein der leichten Kette verankert wird, das einen Membran-Anker besitzt, und die schwere Kette über eine pelB-Leitsequenz in das Periplasma sekretiert wird.

[0320] Das Beschichtungsprotein VIII wird mit der anschließenden Infektion von E. coli mit einem Helferphagen, während die Anordnung auf dem filamentösen Bakteriophagen fortschreitet, entlang der gesamten Länge des Partikels eines filamentösen Phagen, wie in den Fig. 8 und Fig. 9 gezeigt, eingebaut. Falls cpIII verwendet wird, geschieht die Anreicherung auf dem Schwanz des Bakteriophagen. Der Vorteil der Verwendung von Membran-Ankern aus cpVIII gegenüber cpIII ist doppelt begründet. Erstens gibt es entlang der Partikeloberfläche eine Vielzahl an Bindungsstellen, die aus ungefähr 2700 cpVIII-Monomeren bestehen, die in einem röhrenförmigen Aufbau angeordnet sind. Zweitens interferiert das Konstrukt nicht mit der Infektiosität des Phagen.

a. Selektion des Polynukleotids

[0321] Die für die Immunglobulinprotein CDR's kodierenden Nukleotidsequenzen sind hochvariabel. Gleichwohl gibt es verschiedene Regionen konservierter Sequenzen, die die V-Regiondomänen beispielsweise von jeweils der leichten oder der schweren Kette flankieren, und die im Wesentlichen konservierte Nukleotidsequenzen enthalten, z.B. Sequenzen, die mit der gleichen Primersequenz hybridisieren werden. Daher werden Polynukleotidsynthese(Amplifikations)-Primer konstruiert, die mit den konservierten Sequenzen hybridisieren und in das erzeugte DNA-Homolog Restriktionsschnittstellen einbauen, und die zur operativen Verknüpfung der synthetisierten DNA-Fragmente mit einem Vektor geeignet sind. Genauer formuliert werden die Primer so entworfen, dass die resultierenden erzeugten DNA-Homologe in einen Expressionsvektor dieser Erfindung in einen Leserahmen mit der stromaufwärts gelegenen translatierbaren DNA-Sequenz in der Region des Vektors eingebaut werden können, der die Mittel für die gerichtete Ligation enthält.

(i) V_H-Primer

[0322] Zur Amplifikation der V_H-Domänen wurden Primer entworfen, um kohäsive Enden einzubringen, die mit der gerichteten Ligation in die singulären Xho I- und Spe I-Schnittstellen des Phagemids Hc2-Expressionsvektors kompatibel sind. Beispielsweise wurde der 3'-Primer (Primer 12A in Tabelle 5) so entworfen, dass er zu der mRNA in der J_H-Region komplementär ist. In allen Fällen wurden die 5'-Primer (Primer 1–10, Tabelle 5) so ausgewählt, dass sie zu der cDNA des ersten Stranges in der konservierten N-terminalen Region (antisense-Strang) komplementär sind. Die anfängliche Amplifikation wurde mit einer Mischung aus 32 Primern (Primer 1, Tabelle 5) durchgeführt, die an fünf Positionen degeneriert waren. Hybridom-mRNA konnte mit gemischten Primern amplifiziert werden, jedoch ergaben anfängliche Ansätze zur Amplifikation von mRNA auf Milz unterschiedliche Ergebnisse. Es wurden daher verschiedene Alternativen für die Amplifikation unter Verwendung der gemischten 5'-Primer verglichen.

[0323] Die erste Alternative war die Konstruktion von multiplen singulären Primern, von denen acht in Tabelle 5 gezeigt werden, und die zu individuellen Mitgliedern des gemischten Primerpools korrespondieren. Die individuellen Primer 2–9 der Tabelle 5 wurden durch Einbau von beiden der zwei möglichen Nukleotide an drei der fünf degenerierten Positionen konstruiert.

[0324] Die zweite Alternative war die Konstruktion eines Primers, der Inosin an vier variablen Positionen enthält (Primer 10, Tabelle 5), basierend auf der veröffentlichten Arbeit von Takahashi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82: 1931–1935, (1985) und Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260: 2605–2608, (1985). Dieser Primer besitzt den Vorteil, dass er nicht degeneriert und zur gleichen Zeit die negativen Effekte der Fehlpaarungen bei den nicht-konservierten Positionen minimiert, wie von Martin et al., Nuc. Acids Res., 13: 8927 (1985) diskutiert. Gleichwohl war nicht bekannt, ob die Anwesenheit von Inosinnukleotiden zum Einbau von unerwünschten Sequenzen in den klonierten V_H-Regionen führt. Inosin wurde daher an der einen Position nicht eingebaut, die in den amplifizierten Fragmenten nach der Spaltung der Restriktionsschnittstellen verbleibt. Im Ergebnis war Ino-

sin nicht im klonierten Insert vorhanden.

[0325] Zusätzliche V_H-Amplifikationsprimer, die die einzigartigen 3'-Primer enthielten, wurden so entworfen, dass sie komplementär zu einem Teil der Domäne der ersten konstanten Region der mRNA der gamma-1-schweren Kette sind (Primer 16 und 17, Tabelle 5). Diese Primer werden DNA-Homologe erzeugen, die Polynukleotide enthalten, die für die Aminosäuren aus den V_H-Regionen und den Domänen der ersten konstanten Region der schweren Kette kodieren. Diese DNA-Homologe können daher eher zur Erzeugung von Fab-Fragmenten als F_V verwendet werden.

[0326] Es wurden zusätzliche singuläre 3'-Primer betrachtet, die dafür entworfen wurden, um mit ähnlichen Regionen der schweren Kette anderer Klassen an Immunglobulin, wie beispielsweise IgM, IgE und IgA zu hybridiseren. Es wurden ebenfalls andere 3'-Primer betrachtet, die mit einer spezifischen Region einer spezifischen Klasse der CH_1-konstanten Region hybridisieren und unter Verwendung dieser Primer zur Übertragung der amplifizierten V_H-Domänen zu einem Expressionsvektor angepasst wurden, der in der Lage ist, diese V_H-Domänen mit einer unterschiedlichen Klasse einer schweren oder leichten Kette der konstanten Region zu exprimieren.

[0327] Als Kontrolle für die Amplifikation aus Milz oder Hybridom-mRNA wurde ein Set aus Primern konstruiert, das mit einer hochkonservierten Region innerhalb des Gens der konstanten Region der schweren Kette von IgG hybridisert. Der 5'-Primer (Primer 11, Tabelle 5) ist zu der cDNA in der C_H2-Region komplementär, während der 3'-Primer (Primer 13, Tabelle 5) zu der mRNA in der C_H3-Region komplementär ist. Es wird angenommen, dass zwischen diesen Primern und ihren Templates keine Fehlpaarungen auftraten.

[0328] Die für die Amplifikation der schweren Kette der Fd-Fragmente zur Konstruktion von Fab verwendeten Primer werden mindestens in Tabelle 5 gezeigt. Die Amplifikation wurde in acht getrennten Reaktionen durchgeführt, von denen jede einen der 5'-Primer (Primer 2-9) und einen der 3'-Primer (Primer 16) enthielt. Die verbleibenden 5'-Primer, die für die Amplifikation in eine einzelne Reaktion verwendet wurden, sind entweder ein degenerierter Primer (Primer 1) oder ein Primer, der Inosin an vier degenerierten Positionen einbaut (Primer 10, Tabelle 5 und Primer 17 und 18, Tabelle 6). Der verbleibende 3'-Primer (Primer 14, Tabelle 6) wurde verwendet, um F_V-Fragmente zu konstruieren. Viele der 5'-Primer bringen eine Xho I-Schnittstelle ein und die 3'-Primer bringen eine Spe I-Restriktionsschnittstelle zur Insertion des V_H-DNA-Homologs in Phagemid Hc2-Expressionsvektor (**Fig. 4**) mit ein.

[0329] Die zur Amplifikation der variablen Regionen der humanen schweren Kette entworfenen Primer werden in Tabelle 6 gezeigt. Einer der 5'-Primer der schweren Kette enthielt Inosinreste an degenerierten Nukleotidpositionen, die es einem einzelnen Primer ermöglichen, an eine Vielzahl von Sequenzen der variablen Region zu hybridisieren. Primer, die entwickelt wurden, um an die Sequenzen der konstanten Regionen verschiedener IgG-mRNAs zu hybridisieren, sind ebenfalls in Tabelle 6 gezeigt.

(ii) V_L-Primer

[0330] Die die V_L-CDRs kodierenden Nukleotidsequenzen sind hochvariabel. Gleichwohl gibt es verschiedene Regionen konservierter Sequenzen, die die V_L-CDR-Domänen flankieren, einschließlich der J_L-, V_L-Gerüstregionen und der V_L-Leitsequenz/Promotor. Es wurden daher Amplifikationsprimer entworfen, die mit den konservierten Sequenzen hybridisierten und Restriktionsschnittstellen mit einbrachten, die die Klonierung der amplifizierten Fragmente in den Phagemid Lc2-Vektor ermöglichten, der mit Sac I und Xba I geschnitten wurde.

[0331] Zur Amplifikation der V_L-CDR-Domänen wurden die 5'-Primer (Primer 1–8 in Tabelle 6) so entworfen, dass sie zu der cDNA des ersten Stranges in konservierten N-terminalen Regionen komplementär sind. Diese Primer führten ebenfalls eine Sac I-Restriktionsendonukleaseschnittstelle ein, die es ermöglicht, dass das V_L-DNA-Homolog in den Phagemid Lc2-Expressionsvektor kloniert werden konnte. Der 3'-V_L-Amplifikationsprimer (Primer 9 in Tabelle 6) wurde so entworfen, dass er zu der mRNA in den J_L-Regionen komplementär ist und die Xba I-Restriktionsendonukleaseschnittstelle einführt, die benötigt wird, um das V_L-DNA-Homolog in den Phagemid Lc2-Expressionsvektor (**Fig. 6**) zu insertieren.

[0332] Zusätzliche 3'-V_L-Amplifikationsprimer wurden so entworfen, dass sie mit der konstanten Region entweder von Kappa oder Lambda mRNA (Primer 10 und 11 in Tabelle 6) hybridisieren. Diese Primer ermöglichen es, dass ein DNA-Homolog erzeugt wird, das Polynukleotidsequenzen enthält, die für Aminosäuren der konstanten Region entweder der Kappa- oder Lambda-Kette kodieren. Diese Primer ermöglichen es, eher ein Fab-Fragment als ein F_V-Fragment zu erzeugen.

[0333] Die für die Amplifikation der Sequenzen der leichten (kappa) Kette für die Konstruktion von Fabs verwendeten Primer werden mindestens in Tabelle 6 gezeigt. Die Amplifikation mit diesen Primern wurde in 5 getrennten Reaktionen durchgeführt, von denen jede einen der 5'-Primer (Primer 3–6 und 12) und einen der 3'-Primer (Primer 13) enthielt. Der verbleibende 3'-Primer (Primer 9) wurde verwendet, um F_V-Fragmente zu konstruieren. Die 5'-Primer enthalten eine Sac I-Restriktionsschnittstelle und die 3'-Primer enthalten eine Xba I-Restriktionsschnittstelle.

[0334] Die zur Amplifikation der variablen Regionen der humanen leichten Kette von sowohl den Lambda- wie auch den Kappa-Isotypen entwickelten V_L-Amplifikationsprimern werden ebenfalls in Tabelle 6 gezeigt.

[0335] Alle hier beschriebenen Primer und synthetischen Polynukleotide, einschließlich den in den Tabellen 3–7 gezeigten, wurden entweder von Research Genetics in Huntsville, Alabama, bezogen oder auf einem DNA-Synthesizer von Applied Biosystems Modell 381A unter Verwendung der Instruktionen des Herstellers, synthetisiert.

Tabelle 5

(1)	5' AGGT(C/G) (C/A) A (G/A) CT (G/T) CTCGAGTC(T/A) GG 3'	Degenerierter 5'-Primer für die Amplifikation von variablen Regionen der schweren Kette (V_H) aus Maus und Mensch
(2)	5' AGGTCCAGCTGCTCGAGTCTGG 3'	Singulärer 5'-Primer für die Amplifikation von V_H aus Maus und Mensch
(3)	5' AGGTCCAGCTGCTCGAGTCAGG 3'	Singulärer 5'-Primer für die Amplifikation von V_H aus Maus und Mensch
(4)	5' AGGTCCAGCTTCTCGAGTCTGG 3'	Singulärer 5'-Primer für die Amplifikation von V_H aus Maus und Mensch
(5)	5' AGGTCCAGCTTCTCGAGTCAGG 3'	Singulärer 5'-Primer für die Amplifikation von V_H aus Maus und Mensch
(6)	5' AGGTCCAACTGCTCGAGTCTGG 3'	Singulärer 5'-Primer für die Amplifikation von V_H aus Maus und Mensch
(7)	5' AGGTCCAACTGCTCGAGTCAGG 3'	Singulärer 5'-Primer für die Amplifikation von V_H aus Maus und Mensch
(8)	5' AGGTCCAACTTCTCGAGTCTGG 3'	Singulärer 5'-Primer für die Amplifikation von V_H aus Maus und Mensch
(9)	5' AGGTCCAACTTCTCGAGTCAGG 3'	Singulärer 5'-Primer für die Amplifikation von V_H aus Maus und Mensch
(10)	5' AGGTIIAICTICTCGAGTC(T/A)GG 3'	5'-degenerierter Primer, enthaltend Inosin an 4 degenerierten Positionen zur Amplifikation von V_H aus Maus
(11)	5' GCCCAAGGATGTGCTCACC 3'	5'-Primer zur Amplifikation in der C_H2-Region von IgG1 aus Maus
(12)	5' CTATTAGAATTCAACGGTAACAGTGGTGCCTTGGCCCCA 3'	3'-Primer zur Amplifikation von V_H und Einführung einer 3'-EcoR I-Schnittstelle
(12A)	5' CTATTAACTAGTAACGGTAACAGTGGTGCCTTGGCCCCA 3'	3'-Primer zur Amplifikation von V_H unter Verwendung einer 3'-Spe I-Schnittstelle
(13)	5' CTCAGTATGGTGGTTGTGC 3'	3'-Primer zur Amplifikation in der C_H3-Region von IgG1 aus Maus
(14)	5' GCTACTAGTTTTGATTTCCACCTTGG 3'	3'-Primer zur Amplifikation von variablen Regionen der leichten (kappa) Kette aus Maus (V_L)
(15)	5' CAGCCATGGCCGACATCCAGATG 3'	5'-Primer zur Amplifikation der variablen Regionen der leichten (kappa) Kette aus Maus

Tabelle 5 - Fortsetzung

(16)	5' AATTTTACTAGTCACCTTGGTGCTGCTGGC 3'	Singulärer 3'-Primer zur Amplifikation von V_H, einschließlich des Teils der ersten konstanten gamma-1 Region aus Maus
(17)	5' TATGCAACTAGTACAACCACAATCCCTGGGCACAATTTT 3'	Singulärer 3'-Primer zur Amplifikation von Fd, einschließlich der ersten konstanten Region aus IgG1 aus Maus und der Gelenksregion
(18)	5' AGGCTTACTAGTACAATCCCTGGGCACAAT 3'	3'-Primer zur Amplifikation von Fd aus Maus, einschließlich des Teils der ersten konstanten Region von IgG aus Maus und eines Teils der Gelenksregion

Tabelle 6

(1)	5' CCAGTTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation der variablen Regionen der leichten (kappa) Kette
(2)	5' CCAGTTCCGAGCTCGTGTTGACGCAGCCGCCC 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation der variablen Regionen der leichten (kappa) Kette
(3)	5' CCAGTTCCGAGCTCGTGCTCACCCAGTCTCCA 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation der variablen Regionen der leichten (kappa) Kette
(4)	5' CCAGTTCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCA 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation der variablen Regionen der leichten (kappa) Kette
(5)	5' CCAGATGTGAGCTCGTGATGACCCAGACTCCA 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation der variablen Regionen der leichten (kappa) Kette
(6)	5' CCAGATGTGAGCTCGTCATGACCCAGTCTCCA 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation der variablen Regionen der leichten (kappa) Kette
(7)	5' CCAGATGTGAGCTCTTGATGACCCAAACTCAA 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation der variablen Regionen der leichten (kappa) Kette
(8)	5' CCAGATGTGAGCTCGTGATAACCCAGGATGAA 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation der variablen Regionen der leichten (kappa) Kette
(9)	5' GCAGCATTCTAGAGTTTCAGCTCCAGCTTGCC 3'	Singulärer 3'-Primer zur Amplifikation der variablen Regionen der leichten (kappa) Kette
(10)	5' CCGCCGTCTAGAACACTCATTCCTGTTGAAGCT 3'	Singulärer 3'-Primer zur Amplifikation der leichten (kappa) Kette aus Maus, einschließlich der konstanten Region
(11)	5' CCGCCGTCTAGAACATTCTGCAGGAGACAGACT 3'	Singulärer 3'-Primer zur Amplifikation der leichten (lambda) Kette aus Maus, einschließlich der konstanten Region
(12)	5' CCAGTTCCGAGCTCGTGATGACACAGTCTCCA 3'	Singulärer 5'-Primer zur V_L-Amplifikation
(13)	5' GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCCTGTTGAA 3'	Singulärer 3'-Primer zur Amplifikation der leichten (kappa) Kette
(14)	5' CTATTAACTAGTAACGGTAACAGTGGTGCCTTGCCCCA 3'	Singulärer 3'-Primer zur Amplifikation von F_v aus Maus
(15)	5' AGGCTTACTAGTACAATCCCTGGGCACAAT 3'	Singulärer 3'-Primer zur Amplifikation von IgG Fd aus Maus
(16)	5' GCCGCTCTAGAACACTCATTCCTGTTGAA 3'	Singulärer 3'-Primer zur Amplifikation der leichten (kappa) Kette aus Maus

Tabelle 6 -Fortsetzung Seite 1

(17)	5' AGGTIIAICTICTCGAGTCTGC 3'	Degenerierter 5'-Primer, enthaltend Inosin an 4 degenerierten Positionen zur Amplifikation von V_H aus Maus
(18)	5' AGGTIIAICTICTCGAGTCAGC 3'	Degenerierter 5'-Primer, enthaltend Inosin an 4 degenerierten Positionen zur Amplifikation von V_H aus Maus
(19)	5' GTGCCAGATGTGAGCTCGTGATGACCCAGTCTCCA 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation von Kappa-V_L aus Mensch und Mause
(20)	5' TCCTTCTAGATTACTAACACTCTCCCCTGTTGAA 3'	Singulärer 3'-Primer zur Amplifikation von Kappa-V_L
(21)	5' GCATTCTAGACTATTATGAACATTCTGTAGGGGC 3'	Singulärer 3'-Primer zur Amplifikation von Lambda-V_L aus Mensch, Maus und Kaninchen
(22)	5' CTGCACAGGGTCCTGGGCCGAGCTCGTGGTGACTCAG 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation von Lambda-V_L aus Mensch
(23)	5' AGITGCAIITGCTCGAGTCTGG 3'	5'-degenerierter Primer zur Amplifikation von V_H aus Mensch, enthaltend Inosin an 3 degenerierten Positionen
(24)	5' GTGGGCATGTGTGAGTTGTGTCACTAGTTGGGGTTTTGAGCTC 3'	Singulärer 3'-Primer zur Amplifikation von V_H aus Mensch
(25)	5' AGCATCACTAGTACAAGATTTGGGCTC 3'	Singulärer 3'-Primer zur Amplifikation von IgG1 Fd aus Mensch
(26)	5' AGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation von variablen Regionen (V_H) aus Mensch
(27)	5' AGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation von variablen Regionen (V_H) aus Mensch
(28)	5' AGGTGCAACTGCTCGAGTCTGG 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation von variablen Regionen (V_H) aus Mensch
(29)	5' AGGTGCAACTGCTCGAGTCGGG 3'	Singulärer 5'-Primer zur Amplifikation von variablen Regionen (V_H) aus Mensch

Tabelle 6 - Fortsetzung Teil 2

(30)	5' TCCTTCTAGATTACTAACACTCTCCCCTGTTGAA 3'	3'-Primer in der konstanten Region der humanen leichten (kappa) Kette
(31)	5' CTGCACAGGGTCCTGGGCCGAGCTCGTGGTGACTCAG 3'	5'-Primer zur Amplifikation variablen Regionen der leichten (lambda) Kette aus Mensch
(32)	5' GCATTCTAGACTATTAACATTCTGTAGGGGC 3'	3'-Primer der konstanten Region der leichten (lambda) Kette aus Mensch
(33)	5' ACCCAAGGACACCCTCATG 3'	Kontrollprimer, der mit der humanen CH_2-Region hybridisiert
(34)	5' CTCAGTATGGTGGTTGTGC 3'	Kontrollprimer, der mit der humanen CH_3-Region hybridisiert
(35)	5' GTCTCACTAGTCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC 3'	5'-Primer zur Amplifikation der ersten konstanten Region der schweren Kette von IgG aus Mensch
(36)	5' ATATACTAGTGAGACAGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCA 3'	3'-Primer zur Amplifikation von variablen Regionen der schweren Kette aus Mensch
(37)	5' ACGTCTAGATTCCACCTTGGTCCC 3'	3'-Primer zur Amplifikation von variablen Regionen der kappa-Kette aus Mensch
(38)	5' GCATACTAGTCTATTAACATTCTGTAGGGGC 3'	5'-Primer zur Amplifikation der konstanten Region der leichten (kappa) Kette aus Mensch
(39)	5' CCGGAATTCTTATCATTTACCCGGAGA 3'	3'-Primer, der in der CH3-Region von humanem IgG1 lokalisiert ist, zur Amplifikation der gesamten schweren Kette
(40)	5' TCTGCACTAGTTGGAATGGGCACATGCAG 3'	3'-Primer zur Amplifikation der Fd-Region von IgM aus Maus

[0336] Die in Tabelle 5 aufgelisteten 19 Primer wurden im Sequenzprotokoll aufgelistet und mit den folgenden SEQ ID NO bezeichnet:

(1) = SEQ ID NO 40

(2) = SEQ ID NO 41

(3) = SEQ ID NO 42
(4) = SEQ ID NO 43
(5) = SEQ ID NO 44
(6) = SEQ ID NO 45
(7) = SEQ ID NO 46
(8) = SEQ ID NO 47
(9) = SEQ ID NO 48
(10) = SEQ ID NO 49
(11) = SEQ ID NO 50
(12) = SEQ ID NO 51
(12A) = SEQ ID NO 52
(13) = SEQ ID NO 53
(14) = SEQ ID NO 54
(15) = SEQ ID NO 55
(16) = SEQ ID NO 56
(17) = SEQ ID NO 57
(18) = SEQ ID NO 58

[0337] Die in Tabelle 6 als "(1)" bis "(40)" aufgelisteten 40 Primer wurden ebenfalls einzeln und nacheinander im Sequenzprotokoll, beginnend mit SEQ ID NO 59 bis SEQ ID NO 98, aufgelistet.

b. Herstellung eines Genrepertoires, das die variable Domäne von Immunglobulin kodiert

[0338] Nitrophenylphosphonamidat (NPN) wurde als Ligand zur Rezeptorbindung bei der Herstellungeines heterodimeren Rezeptors gemäß dem Verfahren dieser Erfindung ausgewählt.

[0339] „Keyhole limpet hemocyanin" (KLH) wurde an NPN zur Bildung eines NPN-KLH-Konjugats konjugiert, das zur Immunisierung einer Maus zur Erzeugung einer anti-NPN-Immunantwort verwendet wurde, wodurch eine Quelle Liganden-spezifischer heterodimerer Rezeptorgene bereitgestellt wurde.

[0340] Das NPN-KLH-Konjugat wurde durch Mischen von 250 µl einer Lösung, enthaltend 2,5 mg NPN in Dimethylformamid, mit 750 µl einer Lösung hergestellt, enthaltend 2 mg KLH in 0,01 molarem (M) Natriumphosphatpuffer (pH 7,2). Die zwei Lösungen wurden durch langsame Zugabe der NPN-Lösung zur KLH-Lösung gemischt, während die KLH-Lösung mit einem rotierenden Rührbalken bewegt wurde. Die Reaktionsmischung wurde anschließend bei 4°C für 1 Stunde mit der gleichen Bewegung stehen gelassen, um eine Fortsetzung der Konjugation zu ermöglichen. Das konjugierte NPN-KLH wurde vom nicht-konjugierten NPN-KLH mittels Gelfiltration über Sephadex G-25 isoliert. Das isolierte NPN-KLH-Konjugat wurde, wie unten beschrieben, in Mäuse injiziert.

[0341] Das NPN-KLH-Konjugat wurde für die Injektion in Mäuse durch Zugabe von 100 µg des Konjugats zu 250 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) hergestellt. Ein gleiches Volumen an vollständigem Freund'schem Adjuvans wurde zugegeben und die gesamte Lösung wurde für 5 Minuten emulgiert. Eine 129 G_{IX+}-Maus wurde mit 300 µl der Emulsion injiziert. Die Injektionen wurden an verschiedenen Stellen unter Verwendung einer 21 er Nadel subkutan verabreicht. Eine zweite Immunisierung mit NPN-KLH wurde zwei Wochen später verabreicht. Diese Injektionen wurden wie folgt hergestellt: 50 Mikrogramm (µg) an NPN-KLH wurden in 250 µl PBS verdünnt und es wurde der NPN-KLH-Lösung ein gleiches Volumen an Alaun zugegeben. Der Maus wurden 500 µl der Lösung unter Verwendung einer 23er Nadel intraperitoneal injiziert. Einen Monat später wurde den Mäusen eine finale Injektion von 50 µg des NPN-KLH-Konjugats gegeben, das auf 250 µl PBS verdünnt wurde. Diese Injektion wurde intravenös in die laterale Schwanzvene unter Verwendung einer 30er Nadel gegeben. Fünf Tage nach dieser finalen Injektion wurden die Mäuse getötet und gesamte zelluläre RNA wurde aus ihrer Milz isoliert.

[0342] Die gesamte zelluläre RNA wurde unter Verwendung der durch Chomczynski et al., Anal Biochem., 162: 156–159 (1987) beschrieben Verfahren und unter Verwendung des RNA-Isolationskits (Stratagene) gemäß den Instruktionen des Herstellers aus der Milz einer einzelnen Maus hergestellt, die mit KLH wie oben beschrieben NPN immunisiert wurde. Kurz formuliert, wurde unmittelbar nach Entfernung der Milz aus der immunisierten Maus das Gewebe in 10 ml einer denaturierenden Lösung unter Verwendung eines Glashomogenisierers homogenisiert, wobei die Lösung 4,0 M Guanidiniumisothiocyanat, 0,25 M Natriumcitrat bei pH 7,0 und 0,1 M beta-Mercaptoethanol enthält. Zur homogenisierten Milz wurde 1 ml Natriumacetat bei einer Konzentration von 2 M bei pH 4,0 zugegeben. Ein ml Phenol, der zuvor mit Wasser gesättigt wurde, wurde eben-

falls zur der denaturierenden Lösung zugegeben, die die homogenisierte Milz enthält. Zwei ml einer Chloroform:Isoamylalkohol (24:1 V/V)-Mischung wurde zu diesem Homogenat zugegegben. Das Homogenat wurde für zehn Sekunden kräftig gemischt und auf Eis für 15 Minuten gehalten. Das Homogenat wurde anschließend auf ein dickwandiges 50 ml-Polypropylenzentrifugenröhrchen (Fisher Scientific Company, Pittsburg, PA) übertragen. Die Lösung wurde bei 10000 × g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die obere RNA-enthaltende wässrige Schicht wurde in ein frisches 50 ml-Polypropylenzentrifugenröhrchen überführt und mit einem gleichen Volumen an Isopropylalkohol gemischt. Diese Lösung wurde bei –20°C für mindestens eine Stunde inkubiert, um die RNA zu fällen. Die die Lösung enthaltende gefällte RNA wurde bei 10000 × g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die gefällte gesamte RNA wurde gesammelt und in 3 ml der oben beschriebenen denaturierenden Lösung gelöst. Drei ml Isopropylalkohol wurden zu der resuspendierten gesamten zellulären RNA zugegeben und kräftig gemischt. Diese Lösung wurde bei –20°C für mindestens 1 Stunde gehalten, um die RNA zu fällen. Die Lösung, die die gefällte RNA enthält, wurde bei 10000 × g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die gefällte RNA wurde einmalig mit einer Lösung, enthaltend 75 % Ethanol, gewaschen. Die gefällte RNA wurde unter Vakuum bei 15 Minuten getrocknet und anschließend in mit Dimethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem (DEPC-H_2O)-H_2O resuspendiert.

[0343] Messenger-RNA (mRNA), die mit Sequenzen angereichert war, die lange Poly A-Schwänze enthielt, wurde aus der gesamten zellulären RNA unter Verwendung von Verfahren hergestellt, die in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis et al., Hrsg., Gold Spring Harbor, NY, (1982), beschrieben wurden. Kurz formuliert, wurde eine Hälfte der gesamten RNA, die aus der Milz einer einzelnen immunisierten Maus isoliert und wie oben beschrieben hergestellt wurde, in 1 ml an DECP-H_2O resuspendiert und bei 65°C für 5 Minuten inkubiert. Ein ml eines 2 × Kochsalzladungspuffers, der aus 100 mM Tris-HCl (Tris[hydroxymethyl]aminomethanhydrochlorid) besteht, sowie 1 M Natriumchlorid (NaCl), 2,0 mM Dinatriumethylendiamintetraessigsäure (EDTA) bei pH 7,5 und 0,2 % Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde zur resuspendierten RNA zugegeben und man ließ die Mischung auf Raumtemperatur abkühlen. Die Mischung wurde anschließend auf eine Oligo-dT (Collaborative Research Type 2 oder Type 3)-Säule gegeben, die zuvor durch Waschen der Oligo-dT-Säule mit einer Lösung hergestellt wurde, die 0,1 M Natriumhydroxid und 5 mM EDTA enthielt und anschließend durch Equilibieren der Säule mit DEPC-H_2O. Das Eluat wurde in einem sterilen Polypropylenröhrchen gesammelt und erneut auf die gleiche Säule nach Erhitzen des Eluats für 5 Minuten bei 65°C aufgegeben. Die Oligo-dT-Säule wurde anschließend mit 2 ml Hochsalzladepuffer gewaschen, der aus 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA bei pH 7,5 und 0,1 % SDS besteht. Die Oligo-dT-Säule wurde anschließend mit 2 ml 1 × Mediumsalzpuffer gewaschen, der aus 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM, 1 mM EDTA und 0,1 % SDS besteht. Die Messenger-RNA wurde von der Oligo-dT-Säule mit 1 ml eines Puffers eluiert, der aus 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA bei pH 7,5 und 0,05 % SDS besteht. Die Messenger-RNA wurde Extraktion dieser Lösung mit Phenol/Chloroform extrahiert, gefolgt von einer einzelnen Extraktion mit 100 % Chloroform. Die Messenger-RNA wurde durch Ethanolfällung aufkonzentriert und in DEPC-H_2O resuspendiert.

[0344] Die Messenger-RNA (mRNA), die gemäß dem oben erläuterten Verfahren isoliert wurde, enthält eine Vielzahl verschiedener V_H-kodierender Polynukleotide, d.h. eine Menge von mehr als 10^4 unterschiedlichen V_H-kodierenden Genen, und sie enthält eine ähnliche Anzahl an V_L-kodierenden Genen. Die mRNA-Population repräsentiert daher ein Repertoire aus Genen, die für die variable Region kodieren.

c. Herstellung von DNA-Homologen

[0345] Bei der Vorbereitung für die PCR-Amplifikation wird die oben beschriebene mRNA als Template für die cDNA-Synthese mittels einer Primerextensionsreaktion verwendet. In einer typischen 50 µl-Transkriptionsreaktion werden zuerst 5–10 µg der Milz-mRNA in Wasser mit 500 ng (50,0 pmol) des 3'-V_H-Primers (Primer 12A, Tabelle 5) bei 65°C für 5 Minuten hybridisiert (angelagert). Anschließend wird die Mischung auf 1,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 40 mM Tris-HCl, pH 8,0, 8 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl und 2 mM Spermidin eingestellt. Es wurden 26 Einheiten der reversen Transkriptase aus dem murinen Leukämievirus von Moloney (Stratagene) zugegeben und die Lösung wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

[0346] Die PCR-Amplifikation wird in einer 100 µl-Reaktion durchgeführt, die die Produkte der reversen Transkriptasereaktion (ungefähr 5 µg des cDNA/RNA-Hybrids), 300 ng an 3'-V_H-Primer (Primer 12A aus Tabelle 5), 300 ng von jedem der 5'-V_H-Primer (Primer 2–10 aus Tabelle 5), 200 mM einer Mischung aus dNTPs, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 15 mM $MgCl_2$, 0,1 % Gelatine und 2 Einheiten an Thermus aquaticus (Taq)-Polymerase (Perkin-Elmer-Cetus, Emeryville, Kalifornien) enthält. Die Reaktionsmischung wird mit Mineralöl überschichtet und 40 Zyclen einer Amplifikation unterworfen. Jeder Amplifikationszyclus schließt eine Denaturierung bei 92°C für 1 Minute, eine Anlagerung bei 52°C für 2 Minuten und die Polynukleotidsynthese durch Primerextension (Verlängerung) bei 72°C für 1,5 Minuten mit ein. Die Proben, die das amplifizierte V_H-kodie-

rende DNA-Homolog enthalten, werden anschließend zweifach mit Phenol/Chloroform extrahiert, einmal mit Chloroform, mit Ethanol gefällt und bei –70°C in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 1 mM EDTA gelagert.

[0347] Unter Verwendung der singulären 5'-Primer (2–9, Tabelle 5) wird eine effiziente Synthese von V_H-kodierenden DNA-Homologen und die Amplifikation aus Milz-mRNA erreicht, wie mittels Agarosegelelektrophorese gezeigt. Die amplifizierte cDNA (V_H-kodierendes DNA-Homolog) wurde als große Bande in der erwarteten Größe (360 Bp) beobachtet. Die Menge des amplifizierten V_H-kodierenden Polynukleotidfragments war in jeder Reaktion ähnlich, was andeutet, dass alle diese Primer beim Start der Amplifikation etwa gleich effizient waren. Die Ausbeute und Qualität der Amplifikation mit diesen Primern ist reproduzierbar. Der Primer, der Inosin enthält, synthetisiert ebenfalls amplifizierte V_H-kodierende DNA-Homologe aus Milz-mRNA in einer reproduzierbaren Art und Weise, was zur Erzeugung des Fragments in der erwarteten Größenordnung führt, und mit einer Intensität, die zu der anderer amplifizierter cDNAs ähnlich ist. Die Anwesenheit von Inosin ermöglicht ebenfalls die effiziente Synthese und Amplifikation von DNA-Homologen, was klar andeutet, dass solche Primer bei Erzeugung einer Vielzahl von V_H-kodierenden DNA-Homologen nützlich sind. Die von den Primern der konstanten Region (Primer 11 und 13, Tabelle 5) erhaltenen Amplifikationsprodukte sind intensiver, was andeutet, dass die Amplifikation effizienter war, möglicherweise aufgrund eines höheren Grades an Homologie zwischen dem Template und den Primern. Folgt man den oben erwähnten Verfahren, wird eine V_H-kodierende Genbibliothek aus den Produkten von acht Amplifikationen konstruiert, von denen jede mit einem unterschiedlichen 5'-Primer durchgeführt wurde. Gleiche Anteile der Produkte aus jeder Primerextensionsreaktion werden gemischt und die gemischten Produkte werden anschließend verwendet, um eine Bibliothek aus Vektoren zu erzeugen, die V_H-kodierende DNA-Homologe enthalten.

[0348] DNA-Homologe aus V_L werden ebenfalls wie oben beschrieben aus der aufgereinigten mRNA hergestellt. Bei der Vorbereitung der PCR-Amplifikation wird eine gemäß den obigen Beispielen erzeugte mRNA als Template für die cDNA-Synthese verwendet. In einer typischen 5 µl-Transkription wird zuerst 5–10 mg Milz-mRNA in Wasser bei 65°C für 5 Minuten an 300 ng (50 pmol) des 3'-V_L-Primers (Primers 14, Tabelle 5) angelagert. Anschließend wird die Mischung auf 1,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 40 mM Tris-HCl, pH 8,0, 8 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl und 2 mM Spermidin eingestellt. 26 Einheiten der reversen Transkriptase aus dem murinen Leukämievirus von Moloney (Stratagene) wurden zugegeben und die Lösung wurde 1 Stunde bei 37°C gehalten. Die PCR-Amplifikationsreaktion wird in einer 100 µl-Reaktion durchgeführt, die ungefähr 5 µg des wie oben beschrieben hergestellten cDNA/RNA-Hybrids enthält, sowie 300 ng des 3'-V_L-Primers (Primer 14 aus Tabelle 5), 300 ng des 5'-V_L-Primers (Primer 16 aus Tabelle 5), 200 mM einer Mischung aus dNTPs, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 15 mM $MgCl_2$, 0,1 % Gelatine und 2 Einheiten an Taq-DNA-Polymerase. Die Reaktionsmischung wurde mit Mineralöl überschichtet und 40 Cyclen einer Amplifikation unterworfen. Jeder Amplifikationscyclus schließt eine Denaturierung bei 92°C für 1 Minute, eine Anlagerung bei 52°C für 2 Minuten und eine Verlängerung bei 72°C für 1,5 Minuten mit ein. Die amplifizierten Proben wurden anschließend zweifach mit Phenol/Chloroform extrahiert, einmal mit Chloroform, mit Ethanol gefällt und anschließend bei –70°C in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 1 mM EDTA gelagert.

d. Insertion von DNA-Homologen in einen DNA-Expressionsvektor

[0349] Um eine Expressionsbibliothek herzustellen, die mit V_H-Sequenzen angereichert ist, wurden DNA-Homologe, die mit V_H-Sequenzen angereichert sind, gemäß Beispiel 2c unter Verwendung des gleichen Sets an 5'-Primern, jedoch mit Primer 12A (Tabelle 5) als 3'-Primer, hergestellt. Die resultierenden, mittels PCR amplifizierten Produkte (2,5 µg/30 µl 150 mM NaCl, 8 mM Tris-HCl, pH 7,5, 6 mM $MgSo_4$, 1 mM DTT, 200 µg/ml BSA) wurden bei 37°C mit den Restriktionsenzymen Xho I (125 Einheiten) und Spe I (125 Einheiten) verdaut. In Klonierungsexperimenten, die eine Mischung der Produkte der Amplifikationsreaktionen erforderten, wurden gleiche Volumina (50 µl, 1–10 µg Konzentration) von jeder Reaktionsmischung nach der Amplifikation, jedoch vor dem Restriktionsverdau, miteinander kombiniert. Die V_H-Homologen werden auf einem 1 %igen Agarosegel unter Verwendung von Standardelektroelutionstechniken eluiert, die in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis et al., Hrsg., Cold Spring Habor, NY, (1982), beschrieben wurden. Nach Gelelektrophorese der verdauten, mit PCR amplifizierten, Milz-mRNA wurde die Region aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA-Fragmente von ungefähr 350 Bp enthielt, in eine Dialysemembran elektroeluiert, mit Ethanol gefällt und in eine TE-Lösung, enthaltend 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 1 mM EDTA bis zu einer finalen Konzentration von 50 ng/µl resuspendiert. Die resultierenden V_H-DNA-Homologen repräsentieren ein Repertoire an Polypeptidgen, das für die gerichtete Ligation in den Vektor Lambda Hc2 angepasste kohäsive Enden besitzt. Diese hergestellten V_H-DNA-Homologen werden anschließend direkt mittels gerichteter Ligation in einen, wie unten beschriebenen, linearisierten Lambda Hc2-Expressionsvektor eingefügt.

[0350] Der Lambda Hc2-Expressionsvektor wird zum Einbringen eines DNA-Homologs durch Zugabe von

100 µg dieser DNA zu einer Lösung hergestellt, die 250 Einheiten von jeder der beiden Restriktionsendonukleasen Xho I und Spe I (beide von Boehringer Mannheim, Indiananapolis, IN) und einen vom Hersteller empfohlenen Puffer enthalten. Diese Lösung wird bei 37°C für 1,5 Stunden inkubiert. Die Lösung wird auf 65°C für 15 Minuten erhitzt, um die Restriktionsendonukleasen zu inaktivieren. Die Lösung wird auf 30°C abgekühlt und 35 Einheiten einer Hitze inaktivierbaren (HK, heat-killable) Phosphatase (Epicenter, Madison, WI) und $CaCl_2$ werden gemäß den Spezifikationen des (Herstellers zugegeben. Diese Lösung wird bei 30°C für 1 Stunde inkubiert. Die DNA wird durch Extraktion der Lösung mit einer Mischung aus Phenol und Chloroform extrahiert, gefolgt von einer Ethanolfällung. Der Lambda Hc2-Expressionsvektor ist nun für die Ligation mit den in den oben genannten Beispielen hergestellten V_H-DNA-Homologen bereit. Diese erzeugten V_H-DNA-Homologen werden anschließend direkt in den mit Xho I und Spe I in einem Restriktionsverdau geschnittenen Lambda Hc2-Expressionsvektor eingebracht, der durch Ligation von 3 Mol Inserts aus V_H-DNA-Homologen mit jedem Mol des Hc_2-Expressionsvektors über Nacht bei 5°C hergestellt wurde. Es wurden ungefähr $3,0 \times 10^5$ Plaque-bildende Einheiten nach Packung der DNA mit Gigapack II Gold (Stratagene) erhalten, von denen 50 % Rekombinante darstellen. Die die V_H-DNA-Homologen enthaltende Ligationsmischung wird gemäß den Spezifikationen des Herstellers unter Verwendung von Gigapack Gold II-Packungsextrakt (Stratagene) gepackt. Die resultierenden Lambda Hc2-Expressionsbibliotheken werden anschließend in XL1-Blue-Zellen transformiert.

[0351] Um eine mit V_L-Sequenzen angereicherte Bibliothek herzustellen, werden entsprechend Beispiel 2c mit V_L-Sequenzen angereicherte und mit PCR amplifizierte Produkte hergestellt. Diese V_L-DNA-Homologe werden mit den Restriktionsenzymen Sac I und Xba I verdaut und die verdauten V_L-DNA-Homologe werden auf einem 1 %igen Agarosegel, wie oben für die V_H-Homologen, aufgereinigt, um ein Repertoire aus V_L-Polypeptidgenen zu bilden, das für die gerichtete Ligation angepasst wird. Die hergestellten V_L-DNA-Homologen werden anschließend gerichtet in den Lambda Lc2-Expressionsvektor ligiert, der zuvor mit den Restriktionsenzymen Sac I und Xba I, wie für Lambda Hc2 beschrieben, verdaut wurde. Die Ligationsmischung, die die V_L-DNA-Homologen enthält, wird zur Bildung einer Lambda Lc2-Expressionsbibliothek, wie oben beschrieben, gepackt und ist soweit vorbereitet, um auf XL1-Blue-Zellen ausplattiert zu werden.

e. Zufälliges Kombinieren von V_H- und V_L-DNA-Homologen auf dem gleichen Expressionsvektor

[0352] Die Expression einer Bibliothek, die Vektoren zur Expression von zwei Cistronen enthält, die die schweren und leichten Ketten exprimieren, wird in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt werden getrennte Bibliotheken für die schwere und die leichte Kette in Expressionsvektoren Lambda Hc2 und Lambda Lc2 wie beschrieben unter Verwendung von Genrepertoiren konstruiert, die aus einer mit NPN-KLH immunisierten Maus erhalten wurden. Im zweiten Schritt werden diese zwei Bibliotheken an den antisymmetrischen EcoR I-Schnittstellen kombiniert, die in jedem Vektor vorhanden sind. Dies führt zu einer Bibliothek aus Klonen, von denen jede potenziell eine schwere und eine leichte Kette koexprimiert. Die aktuellen Kombinationen sind zufällig und reflektieren nicht notwendigerweise die in der B-Zellpopulation des Elterntieres vorhandenen Kombinationen.

[0353] Die aus den oben durchgeführten Immunisierungen (Beispiel 2b) erhaltene Milz-mRNA wird isoliert und zur Erzeugung einer primären Bibliothek aus V_H-Gensequenzen unter Verwendung des Lambda Hc2-Expressionsvektors verwendet. Die primäre Bibliothek enthält $1,3 \times 10^6$ Plaque-bildende Einheiten (pfu) und kann auf die Expression des Dekapeptidtags gescreent werden, um den prozentualen Anteil an Klonen zu bestimmen, der V_H- und C_H1 (Fd)-Sequenzen exprimiert. Die Sequenz für dieses Peptid ist lediglich im Leserahmen für die Expression, gefolgt von der Klonierung eines Fd (oder V_H)-Fragments in den Vektor. Mindestens 80 % der Klone in der Bibliothek exprimieren Fd-Fragmente aufgrund der Immunodetektion des Dekapeptid-Tags.

[0354] Die Bibliothek der leichten Kette wird in der gleichen Art wie für die schwere Kette konstruiert und enthält $2,5 \times 10^6$ Mitglieder. Das Screening von Plaques unter Verwendung eines anti-kappa-Kette Antikörpers deutet an, dass 60 % der in der Bibliothek enthaltenen Bestandteile Inserts der leichten Kette exprimieren. Ein kleiner prozentualer Anteil der Inserts resultieren aus der unvollständigen Dephosphorylierung eines Vektors nach der Spaltung mit Sac I und Xba I.

[0355] Wurden sie einmal erhalten, werden die zwei Bibliotheken zur Konstruktion einer kombinatorischen Bibliothek durch Kreuzen einer EcoR I-Schnittstelle verwendet. Um die Kreuzung durchzuführen, wird zunächst die DNA aus jeder Bibliothek aufgereinigt.

[0356] Die in Beispiel 2d hergestellt Lambda Lc2-Bibliothek wird amplifiziert und 500 µg der Phagen-DNA aus der Lambda Lc2-Expressionsbibliothek wird aus dem amplifizierten Phagenvorrat unter Verwendung der in

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis et al., Hrsg., Cold Spring Harbor, NY, (1982), beschriebenen Verfahren hergestellt. Fünfzig µg dieser Phagen-DNA aus der amplifizierten Expressionsbibliothek wird in einer Lösung, enthaltend 100 Einheiten an MLU I-Restriktionsendonuklease (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) in 200 µl eines durch den Hersteller der Endonuklease bereitgestellten Puffer für 1,5 Stunden bei 37°C gehalten. Die Lösung wird anschließend mit einer Mischung aus Phenol und Chloroform extrahiert. Die DNA wird anschließend mit Ethanol gefällt und in 100 µl Wasser resuspendiert. Der Lösung werden 100 Einheiten der Restriktionsendonuklease EcoR I (Boehringer) in einem finalen Volumen von 200 µl an Puffern zugegeben, der die durch den Hersteller spezifizierten Bestandteile enthält. Diese Lösung wird bei 37°C für 1,5 Stunden beibehalten und die Lösung wird anschließend mit einer Mischung aus Phenol und Chloroform extrahiert. Die DNA wird mit Ethanol gefällt und die DNA wird anschließend in TE resuspendiert.

[0357] Die in Beispiel 2d hergestellte Lambda Hc2-Expressionsbibliothek wird amplifiziert und 500 µg der Phagen-DNA der Lambda Hc2-Expressionsbibliothek wird unter Verwendung der oben genau beschriebenen Verfahren hergestellt. Fünfzig µg dieser Phagen-DNA der amplifizierten Bibliothek wird in einer Lösung, die 100 Einheiten einer Hind III-Restriktionsendonuklease (Boehringer) enthält, für 1,5 Stunden bei 37°C in 200 µl eines Puffers inkubiert, der durch den Hersteller der Endonuklease bereitgestellt wird. Die Lösung wird anschließend mit einer Mischung aus Phenol und Chloroform extrahiert, die mit 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, gesättigt wurde. Die DNA wird anschließend mit Ethanol gefällt und in 100 µl Wasser resuspendiert. Der Lösung werden 100 Einheiten der Restriktionsendonuklease EcoR I (Boehringer) in einem finalen Volumen von 200 µl Puffer zugegeben, das die durch den Hersteller spezifizierten Bestandteile enthält. Diese Lösung wird bei 37°C für 1,5 Stunden inkubiert und die Lösung wird anschließend mit einer Mischung aus Phenol und Chloroform extrahiert. Die DNA wird mit Ethanol gefällt und die DNA wird in TE resuspendiert.

[0358] Die einem Restriktionsverdau unterzogenen Hc2- und Lc2-Expressionsbibliotheken werden miteinander ligiert. Dafür wird eine DNA-Mischung, die aus 1 µg Hc2- und 1 µg DNA einer Lc2-Phagenbibliothek besteht, in einer 10 µl-Reaktion unter Verwendung der in einem Ligationskit (Stratagene) bereitgestellten Reagenzien hergestellt. Die DNA-Mischung wird auf 45°C für 5 Minuten zum Schmelzen aller kohäsiven Enden erwärmt, die sich aneinander angelagert haben mögen. Die Mischung wird anschließend auf 0°C zur Vorbeugung erneuter Ligation abgekühlt. T4-DNA-Ligase aus Bakteriophagen (0,1 Weiss-Einheiten, die zu 0,2 Einheiten äquivalent sind, wie in einem Exonukleaseresistenzassay bestimmt) wurde zur abgekühlten DNA-Lösung gemeinsam mit 1 µl 5 mM ATP und 1 µl 10 x-Bakteriophagen-T4-DNA-Ligasepuffer (10x-Puffer wird durch Mischung von 200 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT und 500 µg/ml BSA) zur Bildung einer Ligationsmischung gemischt. Nach Ligation bei 4°C für 16 Stunden wird 1 µl der ligierten Phagen-DNA mit Gigapack Gold II-Packungsextrakt gepackt und auf XL1-Blue-Zellen, die gemäß den Instruktionen des Herstellers hergestellt wurden, zur Bildung einer Bibliothek aus Lambdaphagen mit dicistronischen Expressionsvektoren ausplattiert, die in der Lage sind, die aus mit NPN-immunisierten Mäusen abgeleiteten schweren und leichten Ketten zu exprimieren. Ein Teil der erhaltenen Klone wird verwendet, um die Effektivität der Kombination zu bestimmen.

f. Selektion auf anti-NPN-reaktive Heterodimer-erzeugende dicistronische Vektoren

[0359] Die oben in Beispiel 2a hergestellte kombinatorische Fab-Expressionsbibliothek wurde gescreent, um Klone zu identifizieren, die eine Affinität für NPN besitzen. Um die Häufigkeit der Phagenklone zu bestimmen, die die Fragmente der leichten und schweren Kette koexprimieren, sowie das doppelte Vorhandensein der leichten Kette bzw. der schweren Kette, wurden wie oben kombinatorische Bibliotheken auf die Expression der leichten und schweren Kette gescreent. In der vorliegenden Untersuchung von etwa 500 rekombinanten Phagen koexprimierten ungefähr 60 % Proteine der leichten und schweren Kette.

[0360] Alle drei Bibliotheken, die der leichten Kette, der schweren Kette und die kombinatorische Bibliothek, wurden daraufhin gescreent, ob sie einen rekombinanten Phagen enthielten, der solche Antikörperfragmente exprimierte, die NPN binden. In einem typischen Verfahren wurden 30000 Phagen auf XL1-Blue-Zellen ausplattiert und es wurden doppelte Lagen mit Nitrocellulose auf die Bindung mit NPN gescreent, das an ^{125}I-markiertes BSA gekoppelt hat. Das BSA wurde unter Befolgung des Chloramin-T-Verfahrens, wie durch Bolton et al, Biochem., 133: 529–534 (1973) beschrieben, iodiniert. Eine zweifache Durchsicht von 80000 rekombinanten Phagen aus der Bibliothek der leichten Kette und eine ähnliche Anzahl aus der Bibliothek der schweren Kette identifizierte keine Klone, die das Antigen binden. Im Gegensatz dazu wurden bei der Sichtung einer ähnlichen Anzahl von Klonen an der Fab-Expressionsbibliothek viele Phagenplaques identifiziert, die NPN binden. Diese Beobachtung deutet an, dass unter solchen Bedingungen, bei denen viele schwere Ketten in Kombination mit leichten Ketten an Antigen binden, die gleichen schweren oder leichten Ketten dies alleine nicht erreichen. Im Fall von NPN wird daher angenommen, dass es viele schwere und leichte Ketten gibt, die lediglich

Antigen binden, wenn sie mit spezifischen leichten und schweren Ketten kombiniert werden.

[0361] Um die Fähigkeit abzuschätzen, eine große Anzahl an Klone zu screenen und eine eher quantitative Schätzung der Häufigkeit von Antigen-bindenden Klonen in der kombinatorischen Bibliothek zu erreichen, wurden eine Million Phagenplaques gescreent und ungefähr 100 Klone identifiziert, die an Antigen binden. Für sechs Klone, von denen angenommen wurde, dass sie NPN binden, wurde eine Region der Platte ausgewählt, die die sechs positiven und ungefähr 20 sie umgebenden Bakteriophagenplaques enthalten, und jeder Plaque wurde gepickt, erneut ausplattiert und auf doppelten Lagen gescreent. Wie erwartet band ungefähr einer von 20 Phagen spezifisch an Antigen. Gepickte Klone von Regionen des ausplattierten Phagen, von denen angenommen wurde, dass sie negativ sind, ergaben beim erneuten Ausplattieren keine positiven Ergebnisse.

[0362] Klon 2b, einer der Plaques, der mit NPN reagierte, wurde gemäß einem In-vivo-Ausschneideprotokoll ausgeschnitten, indem 200 µl einer Phagenstammlösung und 300 µl eines F+-Derivats von XL1-Blue (A_{600} = 1,00) (Stratagene) mit 1 µl eines M13mp8-Helferphagen (1×10^{10} pfu/Milliliter (ml)) gemischt und bei 37°C für 15 Minuten inkubiert wurden. Nach vierstündigem Inkubieren in Luria-Bertani (LB)-Medium und Erhitzen bei 70°C für 20 Minuten zum Töten der XL1-Blue-Zellen durch Hitze, wurden die Phagemiden in XL1-Blue-Zellen erneut infiziert und auf LB-Platten ausplattiert, die Ampicillin enthalten. Dieses Verfahren verwandelte das klonierte Insert aus Lambda Zap II-Vektor in einen Plasmidvektor, der eine einfache Manipulation und Sequenzierung (Stratagene) ermöglicht. Die das V_H- und den Teil von V_L-kodierende Phagemid-DNA wurde anschließend mittels DNA-Sequenzierung unter Verwendung des Sanger-Dideoxyverfahrens sequenziert, das in Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 5463-5467 (1977) beschrieben wurde, unter Verwendung eines Sequenasekits gemäß den Instruktionen des Herstellers (US Biochemical Corp., Cleveland, Ohio). Die Sequenz aus Nukleotidresten der Fd-Kette des Klons 2b wird im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO. 99 aufgelistet. Die Sequenzen aus Nukleotidresten der variablen und konstanten Regionen der leichten (kappa) Kette werden im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO. 100 und SEQ ID NO. 101 aufgelistet.

g. Herstellung einer DNA-Sequenz, die einen Membran-Anker eines

[0363] Beschichtungsproteins eines filamentösen Phagen kodiert cpVIII-Membran-Anker: M13mp18, ein kommerziell erhältlicher Bakteriophagenvektor (Pharmacia, Piscataway, New Jersey), wurde als Quelle zur Isolierung des cpVIII-kodierenden Gens verwendet. Die Sequenz des Gens, das die Membran-Ankerdomäne des cpVIII kodiert und im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO. 102 aufgelistet wird, wurde mittels PCR-Amplifikation so modifiziert, dass die Restriktionsendonukleaseschnittstellen von Spe I und EcoR I und zwei Stoppkodons vor der EcoR I-Schnittstelle eingebaut wurden. Die korrespondierende Sequenz der Aminosäurereste der Membran-Ankerdomäne von cpVIII wird als SEQ ID NO. 17 aufgelistet.

[0364] Um eine replikative Form eines modifizierten cpVIII herzustellen, wurde zuerst DNA aus M13mp18 isoliert. Kurz beschrieben wurden in 2 ml LB (Luria-Bertani-Medium) 50 µl einer Kultur eines Bakterienstammes, der ein F'-Episom (JM107, JM109 oder TG1) trägt, mit einem Zehntel einer Suspension an Bakteriophagenpartikeln gemischt, die aus einem einzelnen Plaque stammten. Die Mischung wurde 4 bis 5 Stunden bei 37°C unter konstanter Bewegung inkubiert. Die Mischung wurde anschließend bei 12000 × g für 5 Minuten zentrifugiert, um die infizierten Bakterien zu pelletieren. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurde das Pellet durch kräftiges Vortexen in 100 µl einer eiskalten Lösung I resuspendiert. Lösung I wurde durch Mischen von 50 mM Glucose, 10 mM EDTA und 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, und Autoklavieren für 15 Minuten hergestellt.

[0365] Zur bakteriellen Suspension wurden 200 µl einer frisch hergestellten Lösung II zugesetzt und das Röhrchen wurde schnell fünfmal umgedreht. Die Lösung II wurde durch Mischen von 0,2 N NaOH und 1 % SDS hergestellt. Zur bakteriellen Suspension wurden 150 µl einer eiskalten Lösung III zugegeben und das Röhrchen wurde sanft in einer umgekehrten Position für 10 Sekunden gevortext, um die Lösung III im viskosen bakteriellen Lysat zu verteilen. Lösung III wurde durch Mischen von 60 ml 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig und 28,5 ml Wasser hergestellt. Das resultierende bakterielle Lysat wurde anschließend auf Eis für 5 Minuten aufbewahrt, gefolgt von einer Zentrifugation bei 12000 × g für 5 Minuten bei 4°C in einer Mikrofuge. Der erhaltene Überstand wurde wiedergewonnen und in ein neues Röhrchen überführt. Zum Überstand wurde ein gleiches Volumen an Phenolchloroform zugegeben und die Mischung wurde gevortext. Die Mischung wurde anschließend bei 12000 × g für 2 Minuten in einer Mikrofuge zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und die doppelsträngige Bakteriophagen-DNA wurde mit 2 Volumina an Ethanol bei Raumtemperatur gefällt. Nachdem man die Mischung bei Raumtemperatur für 2 Minuten stehen ließ, wurde die Mischung zum Pelletieren der DNA zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die pelletierte DNA in replikativer Form wurde in 25 µl Tris-HCl, pH 7,6 und 10 mM EDTA (TE) resuspendiert.

[0366] Die doppelsträngige M13mp18-DNA wurde in replikativer Form anschließend als Template für die PCR verwendet. Die Primer AK 5 (SEQ ID NO. 103) und AK 6 (SEQ ID NO. 104), deren Sequenzen in Tabelle 7 unten aufgelistet sind, wurden in der PCR-Reaktion zur Amplifikation des reifen Gens für die Ankerdomäne des cpVIII-Mitglieds verwendet, und bringen die zwei Klonierungsschnittstellen für Spe I und EcoR I mit ein. Zur PCR-Reaktion wurden 2 µl, enthaltend 1 ng M13mp18-DNA in replikativer Form, mit 10 µl 10X kommerziell erhältlichem PCR-Puffer (Promega Biotech, Madison, Wisconsin) in einem 0,5 ml Mikrofugenröhrchen gemischt. Zur DNA-Mischung wurden 8 µl einer 2,5 mM-Lösung an dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zugesetzt, um eine finale Konzentration von 200 mM (µM) zu erreichen. Es wurden drei µl (mit 60 Picomol (pM) äquivalent) des 5'-Forward-AK 5-Primers und 3 µl (60 pM) des 3'-Rückwärts-AK 6-Primers in der DNA-Lösung gemischt. Zur Mischung wurden 73 µl steriles Wasser und 1 µl/5 Einheiten an Polymerase (Promega Biotech) zugegeben. Zwei Tropfen Mineralöl wurden oben auf die Mischung aufgebracht und es wurden 40 Runden einer PCR-Amplifikation in einem Thermocycler durchgeführt. Der Amplifikationszyclus bestand aus 52°C für 2 Minuten, 72°C für 1,5 Minuten und 91°C für 2 Minuten. Die erhaltenen, PCR-modifizierten und ein DNA-Fragment der cpVIII-Membran-Ankerdomäne aus M13mp18-enthaltenden Proben wurden anschließend mit Gene Clean (BIO101, La Jolla, Kalifornien) aufgereinigt, zweifach mit Phenol/Chloroform extrahiert, einmal mit Chloroform, gefolgt von einer Fällung mit Ethanol, und wurden anschließend bei –70°C in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 1 mM EDTA gelagert.

Tabelle 7

SEQ. ID. NO.	Primer	
(103)[1]	AK 5 (F)	5' GTGCCCAGGGATTGTACTAGTGCTGAGGGTGACGAT 3'
(104)[2]	AK 6 (B)	5' ACTCGAATTCTATCAGCTTGCTTTCGAGGTGAA 3'
(105)[3]	Hc3 (F)	5' AGGTCCAGCTTCTCGAGTCTGG 3'
(106)[4]	AK 7 (B)	5' GTCACCCTCAGCACTAGTACAATCCCTGGGCAC 3'
(107)[5]	G-3 (F)	5' GAGACGACTAGTGGTGGCGGTGGCTCTCCATTC GTTTGTGAATATCAA 3'
(108)[6]	G-3 (B)	5' TTACTAGCTAGCATAATAACGGAATACCCAAAA GAACTGG 3'
(109)[7]	LAC-F	5' TATGCTAGCTAGTAACACGACAGGTTTCCCGAC TGG 3'
(110)[8]	LAC-B	5' ACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTC 3'
(125)9	LAC-B'	5' AGCTGTTGAATTCGTGAAATTGTTATCCGCT 3'

(Vorwärtsprimer)(Rückwärtsprimer)(Von 5' nach 3': die überlappende Sequenz wurde für das C_H1-3'-Ende ist doppelt unterstrichen; die Sequenz der Spe I-Restriktionsschnittstelle ist einfach unterstrichen; die überlappende Sequenz für cpVIII ist doppelt unterstrichen.)(Die Sequenz der EcoR I-Restriktionsschnittstelle ist einfach unterstrichen.)(Die Sequenz der Xho I-Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen.)(Von 5' nach 3': die überlappende Sequenz für cpVIII ist doppelt unterstrichen; die Sequenz für die Spe I-Restriktionsschnittstelle ist einfach unterstrichen; die überlappende Sequenz für das C_H1-3'-Ende ist doppelt unterstrichen.)(Von 5' nach 3': die Sequenz für die Spe I-Restriktionsschnittstelle ist einfach unterstrichen; die mit dem 5'-Ende von cpIII überlappende Sequenz ist doppelt unterstrichen.)(Von 5' nach 3': die Sequenz für die Nhe I-Restriktionsschnittstelle ist einfach unterstrichen; die mit dem 3'-Ende von cpIII überlappende Sequenz ist doppelt unterstrichen.)(Von 5' nach 3': die mit dem 3'-Ende von cpVIII überlappende Sequenz ist doppelt unterstrichen; die Sequenz für die Nhe I-Restriktionsschnittstelle beginnt mit dem Nukleotidrest "G" bei Position 4 und erstreckt sich über 5 weitere Reste = GCTAGC.)(Die Sequenz für die EcoR I-Restriktionsschnittstelle ist einfach unterstrichen.)(Der alternative Rückwärtsprimer für die Amplifikation von LacZ; die Sequenz für die Eco R-Restriktionsschnittstelle ist einfach unterstrichen.)

[0367] Um die Amplifikation der modifzierten cpVIII-Membran-Ankerdomäne zu bestätigen, wurden die PCR-aufgereinigten DNA-Produkte einer Elektrophorese auf einem 1 %igen Agarosegel unterworfen. Die erwartete Größe von cpVIII betrug ungefähr 150 Basenpaare. Der Bereich in der Agarose, der das modifizierte cpVIII-DNA-Fragment enthielt, wurde aus der Agarose, wie oben beschrieben, isoliert. Die Sequenz des iso-

lierten modifizierten cpVIII-DNA-Fragments wird als SEQ ID NO. 111 aufgelistet. Das isolierte cpVIII-DNA-Fragment wurde anschließend mit einem ähnlich hergestellten Fragment eines modifizierten Fd gemischt, wie oben in Beispiel 2i beschrieben, um ein DNA-Segment zu bilden, das das Fusionsprotein Fd-cpVIII kodiert.

[0368] cpIII-Membran-Anker: M13mp18 wurde ebenfalls als Quelle zur Isolierung des Gens verwendet, das die Membran-Ankerdomäne bei cpIII kodiert, von welchem die Sequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO. 112 aufgelistet ist. Die Sequenz aus Aminosäureresten der Membran-Ankerdomäne von cpIII wird als SEQ ID NO. 16 aufgelistet. Die DNA aus M13mp18 wurde in replikativer Form, wie oben beschrieben, hergestellt und als Template für zwei PCR-Amplifikationen zur Konstruktion eines DNA-Fragmentes verwendet, das aus dem reifen Gen für die cpIII-Membran-Ankerdomäne besteht, welche 5' zu einer Sequenz gelegen ist, die den LacZ-Promotor kodiert, sowie den Operator und die Cap-Bindungsstelle für die Kontrolle der Expression der leichten Kette. Die Restriktionsschnittstellen Spe I und EcoR I wurden in den Amplifikationsreaktionen erzeugt und an den 3'- und 5'-Enden des Fragments positioniert. Das Verfahren zur Erzeugung dieses Fragments durch Kombinieren der Produkte zweier getrennter PCR-Amplifikationen wird unten beschrieben.

[0369] Das Primerpaar G-3 (F) (SEQ ID NO. 107) und G-3 (B) (SEQ ID NO. 108), die in Tabelle 7 aufgelistet sind, wurde in der wie oben durchgeführten ersten PCR-Reaktion verwendet, um das Gen des cpIII-Membran-Ankers zu amplifizieren und die Spe I- und Nhe I-Restriktionsschnittstellen in das Fragment einzubauen. Das amplifizierte PCR-Fragment enthielt ebenfalls Nukleotidsequenzen zur Kodierung eines fünf Aminosäuren langen Zwischenstücks, das aus vier Glycinresten und einem Serin zusammengesetzt ist, das zwischen der schweren Kette und den für cpIII-kodierenden Domänen positioniert ist. Einmal exprimiert, diente die fünf Aminosäure lange Sequenz, der eine ordentliche Sekundärstruktur fehlt, zu dem Zweck, die Interaktion zwischen den Fab- und cpIII-Domänen zu minimieren. Das erhaltene PCR-modifizierte cpIII-DNA-Fragment, das Spe I- und Nhe I-Schnittstellen an den 5'- und 3'-Enden des Fragments besitzt, wurde verifiziert und wie oben beschrieben aufgereinigt. Die Sequenz des PCR-modifizierten DNA-Fragments der cpIII-Membran-Ankerdomäne wird im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO. 113 aufgelistet. Eine zweite PCR-Amplifikation wurde unter Verwendung der Primerpaare Lac-F (SEQ ID NO. 109) und Lac-B (SEQ ID NO. 110), die in Tabelle 7 aufgelistet sind, mit einem separaten Aliquot, einer Template-DNA der replikativen Form von M13mp18, durchgeführt, um den LacZ-Promotor, den Operator und die Cap-Bindungsstelle zu amplifizieren, die eine 5'-Nhe I-Schnittstelle und eine 3'-EcoR I-Schnittstelle besitzen. Die für diese Amplifikationen verwendeten Primer wurden so entworfen, dass sie eine Nhe I-Schnittstelle am 5'-Ende des amplifizierten Fragmentes so einführen, dass sie mit einem Teil des 3'-Endes des cpIII-Genfragmentes und mit der Nhe I-Schnittstelle 3' zum amplifizierten cpIII-Fragment überlappen. Die Reaktion und Aufreinigung des PCR-Produktes wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Sequenz des erhaltenen PCR-modifizierten cpIII-DNA-Fragments, das eine 5'-Nhe I- und eine 3'-EcoR I-Restriktionsschnittstelle besitzt, wird im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO. 114 aufgelistet.

[0370] Ein alternativer Lac-B-Primer zur Verwendung bei der Konstruktion der cpIII-Membran-Anker- und LacZ-Promotorregion, war Lac-B', wie in Tabelle 7 gezeigt. Die Amplifikationsreaktionen wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt, mit der Ausnahme, dass in der zweiten PCR-Amplifikation Lac-B' zusammen mit Lac-F anstelle von Lac-B verwendet wurde. Das Produkt der Amplifikationsreaktion wird im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO. 114 von der Nukleotidposition 1 bis zur Nukleotidposition 72 aufgelistet. Die Verwendung von Lac-B' führte zu einer LacZ-Region, der 29 Nukleotide am 3'-Ende fehlen, welches jedoch zum längeren Fragment funktionell äquivalent war, das mit den Lac-F- und Lac-B-Primern erzeugt wurde.

[0371] Die Produkte der ersten und zweiten PCR-Amplifikationen unter Verwendung der Primerpaare 6–3 (F) und 6–3 (B) und Lac-F und Lac-B wurden anschließend an denjenigen Nukleotiden rekombiniert, die mit der Überlappung des cpIII-Membran-Ankers und mit der Nhe I-Restriktionsschnittstelle korrespondieren; Sie wurden anschließend einer zweiten PCR-Runde unter Verwendung des G3-F (SEQ ID NO. 107)- und Lac-B (SEQ ID NO. 110)-Primerpaars zur Bildung eines rekombinierten PCR-DNA-Fragmentproduktes unterworfen, das aus Folgendem besteht: eine 5'-Spe I-Restriktionsschnittstelle; eine cpIII-DNA-Membran-Ankerdomäne, beginnend an derjenigen Sequenz aus Nukleotidresten, die zum Aminosäurerest 198 des gesamten reifen cpIII-Proteins korrespondiert; eine endogene Stoppstelle, die durch den Membran-Anker am Aminosäurerest Nr. 112 bereitgestellt wird; eine Sequenz für eine Nhe I-Restriktionsschnittstelle, einen LacZ-Promotor, einen Operator und eine Cap-Bindungsstelle; und eine 3'-EcoR I-Restriktionsschnittstelle. Das rekombinierte PCR-modifizierte DNA-Fragment der cpIII-Membran-Ankerdomäne wurde anschließend einem Restriktionsverdau mit Spe I und EcoR I unterzogen, um ein DNA-Fragment für die gerichtete Ligation in einen pComb2-Phagemidexpressionsvektor zu erzeugen, der lediglich eine in Beispiel 1a (iv) hergestellte Spe I-Schnittstelle besitzt, um einen pComb2-III (hier ebenfalls als pComb2-III bezeichnet)-Phagemidexpressionsvektor herzustellen, wie in Beispiel 1b (ii) beschrieben.

h. Isolierung des anti-NPN-kodierenden V_H-DNA-Segments

[0372] Um modifizierte Fd-Fragmente zur Rekombination mit den PCR-modifizierten Fragmenten der cpVIII-Membran-Ankerdomäne zur Bildung eines Fd-cpVIII-DNA-Fusionsprodukts herzustellen, wurde eine, wie oben beschriebene, PCR-Amplifikation zur Verwendung des in Beispiel 2f hergestellten Klons als Template durchgeführt. Die Primer Hc3 (SEQ ID NO. 105) und AK 7 (SEQ ID NO. 106), deren Sequenzen in Tabelle 7 aufgelistet sind, wurden bei der PCR-Amplifikation des Fd-Teils des Klons 2b und zum Einbau von Xho I- und Spe I-Klonierungsstellen zusammen mit einer cpVIII-überlappenden Sequenz verwendet. Das amplifizierte, mittels PCR-modifizierte Fd-Produkt wurde aufgereinigt, einer Elektrophorese unterworfen und von 1 %igen Agarosegelen, wie oben beschrieben, isoliert. Die Größe des Fd-Fragments betrug 680 Basenpaare.

i. Herstellung eines DNA-Segments, welches einen Teil des Fusionsproteins Fd-cpVIII kodiert

[0373] Das aufgereinigte PCR-modifizierte Fd-DNA-Fragment, welches Nukleotidsequenzen enthält, die mit cpVIII überlappend, und das wie oben hergestellt wurde, wurde anschließend dem PCR-modifizierten Fragment der cpVIII-Membran-Ankerdomäne zur Bildung einer Mischung zugegeben. Man ließ die Fragmente in der Mischung an ihren komplementären Regionen rekombinieren. Die die rekombinierten PCR-Fragmente enthaltende Mischung wurde anschließend einer wie oben beschriebenen zweiten Runde der PCR-Amplifikation unter Verwendung des endständigen Primerpaars AK 6 (SEQ ID NO. 104) und Hc3 (SEQ ID NO. 105) (Tabelle 7) unterworfen. Das korrespondierende Produkt der PCR-Amplifikation wurde aufgereinigt und einer Elektrophorese auf Agarosegelen, wie oben beschrieben, unterworfen. Beim PCR-Produkt wurde festgestellt, dass es ungefähr 830 Basenpaare (Fd = 680 + 150) lang ist, was die Fusion mit Fd mit cpVIII bestätigt. Die Sequenz des PCR-Produktes, das die Fd-Sequenz mit der cpVIII-Sequenz im Rahmen in einer 5'- zu 3'-Richtung verknüpft, wird als SEQ ID NO. 115 aufgelistet. Das Fd-cpVIII-Fusionsprodukt wurde anschließend in den in Beispiel 2j beschriebenen gerichteten Ligationen zur Instruktion eines pCBAK8-2b dicistronischen Phagemidexpressionsvektors verwendet.

j. Konstruktion eines pCBAK8-2b-dicistronischen Expressionsvektors

[0374] Um einen Phagemidvektor für die koordinierte Expression eines Fd-cpVIII-Fusionsproteins mit der leichten (kappa) Kette zu konstruieren, wurde das oben in Beispiel 2i hergestellte und mittels PCR amplifizierte Fd-cpVIII-Fusionsprotein zuerst in den Phagemidexpressionsvektor des Klons 2b ligiert, der aus der in Beispiel 2f hergestellten NPN-kombinatorischen Bibliothek isoliert wurde. Das Fd-cpVIII-Fusionsprodukt wurde zur Ligation zuerst einem Restriktionsverdau mit Xho I und EcoR I unterworfen. Der Phagemidvektor des Klons 2b wurde in ähnlicher Weise verdaut, was zur Entfernung der Klonierungs- und der Dekapeptidregionen führte. Das verdaute Fd-cpVIII-Fragment wurde zugegeben und in den verdauten Klon 2b an die durch einen Restriktionsverdau mit Xho I und EcoR I erzeugten kohäsiven Enden ligiert. Die Ligation führte zu einer operativen Verknüpfung der Sequenz aus Nukleotidresten, die das Fd-cpVIII-Polypeptidfusionsprotein kodieren, mit einer zweiten Kassette, die die Sequenzen derjenigen Nukleotidreste besitzt, die die Ribosomenbindungsstelle kodieren, sowie einer pelB-Leitsequenz und der bereits in Klon 2b vorhandenen leichten (kappa) Kette, um im ursprünglichen Phagemidexpressionsvektor des Klos 2b ein dicistronisches DNA-Molekül zu bilden.

[0375] Der E. coli-Stamm TG1 wurde anschließend mit dem Phagemid transformiert, das das dicistronische DNA-Molekül enthält, und es wurden Transformanten auf Ampicillin ausgewählt, da der ursprüngliche Klon 2b ein mit Ampicillin selektierbares Resistenzmarkergen enthielt. Zur hocheffizienten Elektrotransformation von E. coli wurde ein 1:100 Volumen einer Übernachtkultur aus TG1-Zellen in einem Liter einer L-Brühe (1 % Bactotrypton, 0,5 % Bactohefeextrakt, 0,5 % NaCl) inokuliert. Die Zellsuspension wurde bei 37°C unter kräftigem Schütteln bis zu einer Absorption bei 600 nm von 0,5 bis 1,0 inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, zunächst durch Herunterkühlen des Kolbens auf Eis für 10 bis 30 Minuten, gefolgt von einer Zentriguation in einem kalten Rotor bei 4000 × g für 15 Minuten, um die Bakterien zu pelletieren. Der erhaltene Überstand wurde entfernt und das bakterielle Zellpellet wurde in einer Gesamtmenge von einem Liter kalten Wassers zur Bildung einer Zellsuspension resuspendiert. Die Zentrifugation und das Resuspensionsverfahren wurde zwei weitere Male wiederholt und nach der abschließenden Zentrifugation wurde das Zellpellet in 20 ml kaltem 10 %igem Glycerin resuspendiert. Die resuspendierte Zellsuspension wurde anschließend zur Bildung eines Zellpellets zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde auf ein Endvolumen von 2 bis 3 ml in kaltem 10 %igem Glycerin unter Bildung einer Zellkonzentration von 1 bis 3 × 10^{10} Zellen/ml resuspendiert. Für das Elektrotransformationsverfahren wurden 40 µl der hergestellten Zellsuspension mit 1 bis 2 µl Phagemid-DNA zur Bildung einer Zell-Phagemid-DNA-Mischung zugegeben. Die erhaltene Mischung wurde gemischt und man ließ diese für 1 Minute auf Eis stehen. Ein Elektroporationsgerät, beispielsweise ein Genpulser, wurde auf 25 µF und 2,5 kV eingestellt. Die Pulskontrolle wurde auf 200 Ohm eingestellt.

Die Zell-DNA-Mischung wurde in eine kalte 0,2 cm Elektroporationsküvette überführt. Die Küvette wurde anschließend in die gekühlte Sicherheitskammer gegeben und einmal mit den oben genannten Einstellungen gepulst. Zur gepulsten Mischung wurde anschließend 1 ml eines SOC-Mediums zugegeben und die Zellen wurden mit einer Pasteurpipette resuspendiert (das SOC-Medium wurde durch Mischung von 2 % Bactotrypton, 0,5 % Bactohefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$ und 20 mM Glucose hergestellt). Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 17 × 100 mm-Polypropylenröhrchen überführt und bei 37°C für eine Stunde gelagert. Anschließend an den Aufbewahrungszeitraum wurden die transformierten TG1-Zellen auf Ampicillin-LB-Platten zur Selektion von Ampillin-resistenten Kolonien ausplattiert, die das Phagemid enthalten, welches das selektierbare Markergen bereitstellt.

[0376] Es wurden Ampicillin-resistente Kolonien ausgewählt und auf die korrekte Insertgröße und die Expression von Fab analysiert. Kurz formuliert, wurden DNA-Minipreps der ausgewählten Kolonien für die Isolierung von Phagemid-DNA hergestellt. Die isolierte Phagemid-DNA aus jeder Miniprep wurde einem Restriktionsverdau mit Xho I und EcoR I unterworfen und die Produkte des Verdaus wurden einer Elektrophorese auf einem 1 %igen Agarosegel unterworfen. Der Klon AK16 wurde ausgewählt und als 830 Bp-Fragment auf den Gelen visualisiert, was die Insertion des Fd-cpVIII-PCR-Fusionsprodukts in den verdauten Klon 2b bestätigt.

[0377] Der Phagemid von Klon AK16 wurde anschließend einem Restriktionsverdau mit Xho I und Xba I unterworfen und es wurden die Sequenz aus Nukleotidresten des dicistronischen DNA-Moleküls, das das Fd-cpVIII-Fusionsprotein kodiert, sowie die Ribosomenbindungsstelle und die pelB-Leitsequenz zur Expression der leichten Kette, eine Spacerregion und die 2b-leichte (kappa) Kette, mittels Agarosegelelektrophorese isoliert. Das isolierte dicistronische DNA-Fragment wurde anschließend in einen pCBAKO-Expressionsvektor ligiert, der einem Restriktionsverdau mit Xho I und Xba I unterworfen und in Beispiel 1c (ii) hergestellt wurde, um einen pCBAK8-2b genannten dicistronischen Phagemidexpressionsvektor zu bilden.

[0378] Der erhaltene pCBAK8-2b-Expressionsvektor bestand aus Nukleotidsequenzen, die die folgenden Elemente kodieren: den Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1; ein selektierbares Resistenzmarkergen für Chloramphenicolacetyltransferase; einen induzierbaren LacZ-Promotor stromaufwärts des LacZ-Gens; eine multiple Klonierungsstelle, flankiert von T3- und T7-Polymerasepromotoren; und das dicistronische DNA-Molekül (eine erste Kassette, bestehend aus einer Ribosomenbindungsstelle, einer pelB-Leitsequenz und einem Fd-cpVIII-DNA-Fusionsprodukt, welches operativ mit einer zweiten Kassette verknüpft ist, das aus einer zweiten Ribosomenbindungsstelle, einer zweiten pelB-Leitsequenz und einer leichten (kappa) Kette besteht).

k. Konstruktion eines pCBAK3-2b-dicistronischen Expressionsvektors

[0379] Um einen Phagemidvektor für die koordinierte Expression eines Fd-cpIII-Fusionsproteins mit der leichten (kappa) Kette zu konstruieren, wurde das mittels PCR-amplifizierte und in Beispiel 2g hergestellte Fragment der rekombinierten cpIII-Membran-Anker- und LacZ-Promotorregion, das eine 5'-Spe I- und eine 3'-EcoR I-Restriktionsschnittstelle besitzt, zuerst gerichtet in einen pComb2-Phagemidexpressionsvektor ligiert, der zuvor mit Spe I und EcoR I verdaut und in Beispiel 1a (iv) hergestellt wurde, um einen pComb2-3 (ebenfalls pComb2-III genannt)-Phagemidvektor zu bilden. Siehe Beispiel 1b (ii) für Details der Vektorkonstruktion. Dieser Vektor wurde in dieser Erfindung verwendet, wenn Ampicillin-resistente Vektoren bevorzugt wurden. Der erhaltene pComb2-3-Vektor, der lediglich eine Spe I-Restriktionsschnittstelle besitzt, enthielt daher getrennte LacZ-Promotor/Operatorsequenzen zur Ausrichtung der separaten Expression des Fusionsprodukts der schwere Kette (Fd)-cpIII und des Proteins der leichten Kette. Die exprimierten Proteine wurden auf den periplasmischen Spalt durch pelB-Leitsequenzen zur funktionellen Anordnung auf der Membran gerichtet. Der Einschluss der Intergen-Region des Phagen F1 im Vektor ermöglichte die Packung von einzelsträngigem Phagemid unter Zuhilfenahme eines Helferphagen. Die Verwendung der Superinfektion eines Helferphagen führte zur Expression von zwei Formen von cpIII. Die normale Phagenmorphogenese wird daher durch die Kompetition zwischen der Fab-cpIII-Fusion und dem nativen cpIII des HelferPhagen für den Einbau in den Viruspartikel gestört, wie schematisch in **Fig. 8** für Fab-cpVIII-Fusionen gezeigt.

[0380] Zur Erzeugung von Chloramphenicol-resistenten Vektoren zur Verwendung in dieser Erfindung wurde der erhaltene pComb2-3-Phagemidvektor anschließend einem Restriktionsverdau mit Sac I und Apa I zur Bildung eines isolierten Fragmentes unterworfen. Das erhaltene isolierte Fragment, enthaltend die Expressionskontrollsequenzen und die cpIII-Sequenz, wurde anschließend gerichtet in einen ähnlich verdauten pCBAKO-Phagemidvektor ligiert, der in Beispiel 1c (ii) hergestellt wurde, um einen pCBAK3-Phagemidexpressionsvektor zu bilden. Diesem Vektor fehlten die Sequenzen von Fd und der leichten (kappa) Kette.

[0381] Anschließend wurden ein Chloramphenicol-resistenter Phagemidexpressionsvektor, pCBAK3-2b, für die Expression eines Fusionsproteins und der leichten (kappa) Kette konstruiert. Kurz beschrieben, wurde der oben hergestellte pCBAK3-Phagemidexpressionsvektor zuerst einem Verdau mit Xho I und Spe I zur Bildung eines linearisierten pCBAK3-Phagemidexpressionsvektors unterworfen. Das in Beispiel 2h hergestellte und mittels PCR-amplifizierte und modifizierte Fd-Fragment, welches Xho I- und Spe I-Schnittstellen enthält, wurde anschließend einem Restriktionsverdau mit Xho I und Spe I unterworfen. Das erhaltene Fd-Fragment wurde anschließend über kohäsive Enden gerichtet in den pCBAK3-Phagemidexpressionsvektor ligiert, der mit Xho I und Spe I einem Restriktionsverdau unterworfen wurde, um einen zweiten Phagemidexpressionsvektor zu bilden, in welchem das PCR-modifizierte Fd-Fragment mit den für cpIII kodierenden Sequenzen aus Nukleotidresten in-frame operativ verknüpft war. Der E. coli-Stamm XL1-Blue (Stratagene) wurde anschließend mit dem oben genannten Fd-cpIII-enthaltenden Phagemidvektor transformiert. Die das Fd-cpIII-kodierende Phagemid enthaltenden Transformanten wurden auf Chloramphenicol selektiert. Aus Chloramphenicol-resistenten Klonen wurde Phagemid-DNA isoliert und einem Restriktionsverdau mit Sac I und Xba I zur Bildung eines linearisierten Phagemidexpressionsvektors unterworfen, in welchen ein unten hergestelltes Sac I- und Xba I-Fragment der leichten Kette gerichtet ligiert wurde.

[0382] Der Phagemidklon 2b, der aus der ursprünglichen kombinatorischen Bibliothek isoliert wurde, wie in Beispiel 2a beschrieben, wurde einem Restriktionsverdau mit Sac I und Xba I unterworfen, um die Sequenz aus Nukleotiden zu isolieren, die leichte (kappa) Kette kodiert. Die isolierte Kette der leichten (kappa) Kette wurde anschließend gerichtet in den oben hergestellten Phagemidexpressionsvektor ligiert, der mit Sac I und Xba I einem Restriktionsverdau unterworfen wurde und der Fd-cpIII enthält, um den Phagemidexpressionsvektor pCBAK3-2b zu bilden. Der resultierende Vektor enthielt die Sequenz aus Nukleotidresten eines dicistronischen DNA-Moleküls für die koordinierte Expression eines Fd-cpIII-Fusionsproteins mit der leichten (kappa) Kette. Der resultierende Phagemidexpressionsvektor bestand aus Sequenzen von Nukleotidresten, die die folgenden Elemente kodieren: Den Replikationsursprung eines filamentösen Phagen f1; ein selektierbares Resistenzmarkergen für Chloramphenicolacetyltransferase; einen induzierbaren LacZ-Promotor stromaufwärts des LacZ-Gens; eine multiple Klonierungsstelle, flankiert von T3- und T7-Polymerasepromotoren; und das dicistronische Molekül (eine erste Kassette, bestehend aus einer ersten Ribosomenbindungsstelle und einer pelB-Leitsequenz, die operativ mit Fd-cpIII verknüpft ist, die operativ mit einer zweiten Kassette verknüpft ist, die aus einem zweiten LacZ besteht, einer zweiten Ribosomenbindungsstelle und einer zweiten pelB-Leitsequenz, die operativ mit einer leichten (kappa) Kette verknüpft ist.

[0383] Anschließend wurden XL1-Blue-Zellen mit dem Phagemidexpressionsvektor pCBAK3-2b transformiert. Die transformierten Kolonien, die die Chloramphenicol-resistenten Phagemiden enthalten, wurden wie oben beschrieben selektiert und es wurde auf ein Insert mit der korrekten Größe und auf die Expression von Fab hin analysiert, wie in Beispiel 2j beschrieben. Nach Bestätigung des Inserts und der Expression von Fab im pCBAK3-2b-Phagemidvektor wurden XL1-Blue-Zellen anschließend transformiert und zur Expression von Fab-Antikörpern, wie in den Beispielen 3 und 4 beschrieben, induziert.

[0384] Die Ergebnisse der Expression, Selektion und des Screenens auf Fab-cpIII-Fusionen ergab einen Vorteil von monovalenten Formen, bereitgestellt durch Fab-cpIII-Fusionen, gegenüber multivalenten Formen, bereitgestellt durch Fab-cpVIII-Fusionen, da es das Sortieren der Klone auf der Basis der Affinität sowie der Spezifität in einer solchen Weise ermöglichte, wie es das Immunsystem bewerkstelligt. Eine 253-fache Anreicherung des stark bindenden Klons10C gegenüber dem schwächer bindenden Klon 7E unter Verwendung des pComb3-Systems, wie in Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 7978–7982 (1991) beschrieben. Studien mit Peptidbibliotheken auf Phagen, die vier bis fünf Kopien des Peptids auf der Phagenoberfläche aufweisen, zeigen, dass eine Multivalenz die Auftrennung von Phagen verhindert, die Peptide mit moderaten Affinitäten (10^{-6} M) aufweisen, gegenüber solchen, die Peptide mit hohen Affinitäten aufweisen (10^{-9} M). Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87: 6378–6382 (1990). Die Multivalenz führte zu einem Chelateffekt, der die Fähigkeit reduziert, zwischen solchen Phagen zu unterscheiden, die Fabs mit hoher Affinität hervorbringen, gegenüber solchen, die Fabs mit niedriger Affinität hervorbringen.

[0385] Die Verwendung des Systems wurde weiterhin anhand der Sortierung einer kürzlich charakterisierten (ein Binder pro 5000 Klone) humanen kombinatorischen anti-Tetanus-toxoiden Fab-Bibliothek gezeigt, wie in Beispiel 6 und durch Persson et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 2432–2436 (1991) beschrieben. Die Bibliothek, die ursprünglich in einem Vektorsystem eines Lambdaphagen war, wurde in pComb2-3 unter Beibehaltung der ursprünglichen Paarungen von schweren und leichten Ketten wieder konstruiert. Die Größe der Bibliothek, 10^7 Klone, war 10-fach größer als die ursprüngliche Lambdaphagenbibliothek. Nach einer einzelnen Panning-Runde wurde bei 13 oder 57 gepickten Klonen festgestellt, dass sie Binder von Tetanustoxoid sind, was eine 10^3-fache Anreicherung darstellt. Nach dem dritten Panning stieg die Phagenausbeute 200-fach an,

was eine Anreicherung von spezifischen Phagen andeutet. Alle Klone waren daher Antigen-spezifische Binder. Es sind daher große kombinatorische Bibliotheken von 10^8-Mitgliedern bei Verwendung dieses Systems zugänglich. Selbst größere Bibliotheken werden durch Mutagenese erreicht, wie in den Beispielen 6–8 beschrieben.

3. Expression von anti-NPN-Heterodimer auf Phagenoberflächen

[0386] Zur Expression von Antikörper-Fab, das gegen NPN auf Phagenoberflächen gerichtet ist, wurden XL1-Blue-Zellen getrennt voneinander mit den Phagemidvektoren pCBAK8-2b und pCBAK3-2b transformiert, die in den Beispielen 2j und 2k hergestellt wurden. Die Transformanten wurden auf LB-Platten selektiert, die 30 µg/ml Chloramphenicol enthielten. Gegen Antibiotikum resistente Kolonien wurden für jede Phagemidtransformation ausgewählt und in Flüssigkulturen bei 37°C in Supernährlösung (Supernährlösung wurde durch Mischen der folgenden Bestandteile hergestellt: 20 g 3-[N-Morpholin]-propansulfonsäure (MOPS); 60 g Trypton; 40 g Hefeextrakt; und 2 Liter Wasser; pH auf 7,0 mit 10 m NaOH einstellen), enthaltend 30 µg/ml Chloramphenicol und 12,5 µg/ml Tetracyclin für die jeweilige antibiotische Selektion auf dem Phagemid und dem F'-Episom kultiviert. Die gegen Antibiotika resistenten transformierten XL1-Blue-Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,4 in Superbrühe verdünnt. Das Induktionsmittel, Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG), wurde zur bakteriellen Suspension in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Mischung wurde bei 37°C für 1 Stunde inkubiert, um die Expression des Expressionsproteins und der leichten (kappa) Kette aus dem LacZ-Promotor zu induzieren. Anschließend wurde der Helferphage, entweder R408 oder VCS M13 (Stratagene), zur induzierten bakteriellen Suspension in einem Verhältnis von 10–20 Helferphagen zu 1 transformierten bakteriellen Zelle zugemischt, um die Erzeugung von Kopien des sense-Stranges der Phagemid-DNA zu starten. Die den Helferphagen enthaltende Mischung wurde anschließend für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert, um die Anordnung von filamentösen Phagen zu ermöglichen, wobei die exprimierten anti-NPN-Fab-Antikörper, die entweder mit den Bakteriophagen-Membrananker domänen von cpVIII oder cpIII fusioniert waren, auf der Oberfläche der Bakteriophagenpartikel eingebaut wurden. Die Bakteriensuspension wurde anschließend unter Erhalt eines bakteriellen Zellpellets und eines phagenhaltigen Überstandes zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, gesammelt und, wie unten beschrieben, auf die Anwesenheit von funktionellen NPN-Fab-Molekülen überprüft, die auf dem Phagenpartikel entweder durch cpVIII oder cpIII verankert waren.

4. Testverfahren zum Prüfen auf die Anwesenheit und der Funktion von anti-NPN-Heterodimer auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen

a. Elektronenmikroskopie

[0387] Um funktionelle Fab-Moleküle zu lokalisieren, wurde die Bindung an Antigen untersucht, das mit kolloidalem Gold markiert wurde. Die in Beispiel 3 hergestellten phagenhaltigen Überstände und Bakterienzellen wurden auf Trägern aufgebracht, die mit Formvar (Polysciences, Inc., Warrington, Pennsylvania) beschichtet wurden und auf einer festen Phase fixiert waren. In einigen Experimenten wurden Träger mit Zellen beschichtet und in situ mit Phagen infiziert. Anschließend wurden die Träger mit 1 %igem bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS bei pH 7,2 geblockt, gewaschen und mit kolloidalen Goldpartikeln mit 2–7 Nanometern (nm), die mit BSA-NPN-Haptenkonjugat beschichtet waren, für einen solchen Zeitraum inkubiert, der ausreichend war, einen markierten Immunreaktionskomplex zu erzeugen. Die Träger wurden gewaschen, um überschüssige Goldpartikel zu entfernen, und in Uranylacetat negativ gefärbt und mittels Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht.

[0388] Die Untersuchung von filamentösen Phagen und permeabilisierten Zellen, die den filamentösen Phagen hervorbringen, führte zu einer spezifischen Markierung von Phagen oder von exponierten bakteriellen Membranen. Am Phagen wurde beobachtet, dass er 1 bis 24 Kopien von Antigenbindungsstellen pro Partikel enthält. Weder der Helferphage allein noch intaktes E. coli waren mit Antigen markiert. Der Hintergrund an nicht-spezifischer Bindung war sehr gering. Die von den E. coli-Oberflächen ausgehenden Partikel eines filamentösen Phagen waren, wie in **Fig. 9** gezeigt, mit Antigen markiert.

[0389] Die Erzeugung eines verwandten Phagenoberflächenexpressionsvektors unter Verwendung von cpIII als Fusionspartner zusammen mit Klon 2b, pCBAK3-2b, führte am Kopf des Phagen, jedoch nicht an der Säule zur spezifischen Antigenmarkierung. Als cpIII-Fusionsprotein exprimiertes humanes anti-Tetanus-Fab band zusätzlich nicht an BSA-NPN-Antigen.

b. Phage Elisa

[0390] Die Mikrotiterplatten wurden mit NPN-BSA-Konjugat (0,1 ml, 1 µg/ml in 0,1 M Tris-HCl, pH 9,2) beschichtet und mit 1 % BSA in PBS geblockt. In Beispiel 3 hergestellte zweifache serielle Verdünnungen eines aus pCBAK8-2b abgeleiteten Phagen (0,1 ml) wurden zur vorher beschichteten Mikrotiterplatte zugegeben und für 3 Stunden bei Raumtemperatur oder für 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden mit PBS gewaschen und es wurde anti-kappa alkalisches Phosphatasekonjugat aus Ziege (Fisher Biotech, Pittsburgh, Pennsylvania) zugegeben (0,1 ml zu 1/1000 in PBS verdünnt, das 0,1 % BSA enthält) und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden in PBS gewaschen und es wurde Substrat zugegeben (0,1 ml, 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, enthaltend 50 mM $MgCl_2$). Nach der Inkubation bei 37°C zur Signalentwicklung wurden die optischen Dichten bei 400 nm bestimmt. Mit der Zugabe von steigenden Mengen freien NPN-Haptens im Bereich von null bis zu 5 mg/Vertiefung wurden Kompetitionsanalysen durchgeführt.

[0391] Die ELISA-Analysen bestätigten die Anwesenheit von funktionellem Antikörper-Fab. Der aus der Helferphageninfektion von Zellen, die das pCBAK8-2b-Konstrukt tragen, erzeugte Phagenüberstand zeigte in einem zweiseitigen ELISA auf NPN-Antigen-beschichteten Platten, wenn diese mit einem Enzymkonjugat aus einer anti-Maus kappa-Kette sondiert wurden, die erwarteten Titrationskurven mit seriellen zweifachen Verdünnungen eines Antikörpers, der Phagen enthält. Die Ergebnisse des zweiseitigen ELISAs werden in **Fig. 10** gezeigt. Für ein in diesem Testverfahren zu erzeugendes Signal muss der Phagenpartikel (i) funktionell assoziierte Fd- und kappa-Ketten besitzen und (ii) multivalent sein. Die Spezifität des Partikels wurde durch Inhibierung der Bindung an die Platte in der Anwesenheit von steigenden Konzentrationen an freiem Hapten bestimmt. Die erzeugten Phagenpartikel zeigten eine Bindung an die feste Phase des ELISA und konnten durch Zugabe von Hapten, wie in **Fig. 11** gezeigt, inhibiert werden. Eine vollständige Inhibition wurde dann erreicht, wenn 5 ng an freiem NPN-Hapten im Testverfahren verwendet wurde. Der Helferphage ergab im ELISA kein Signal. Diese Ergebnisse zeigen die funktionelle Anordnung der Polypeptide der schweren und leichten Kette des Antikörpers zur Bildung eines Epitop-bindenden Komplexes, der auf der Oberfläche des Phagenpartikels vorhanden ist und in der Lage ist, den vorgewählten Ligandenteil zu binden, der ein Epitop enthält.

c. Antigenspezifische Fällung eines Phagen

[0392] Der Phagenüberstand aus XL1-Blue wurde mit dem in Beispiel 3 hergestellten pCBAK8-2b dicistronischen Expressionsvektor transformiert (1 ml) und wurde mit BSA-NPN-Konjugat (10 µl, 2 mg/ml) für 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Mischung wurde anschließend durch Zentrifugation bei 3000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert und es wurde das Auftreten eines Präzipitats festgestellt. Der Helferphage wurde als Kontrolle verwendet. Das Pellet wurde wiederholt in kaltem PBS (5 × 3 ml/Waschgang) gewaschen und anschließend in LB (0,5 ml) resuspendiert. Die gelösten Präzipitate wurden zu frischen XL1-Blue-Zellen zugegeben (0,5 ml der Übernachtkultur), für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und es wurden Aliquots auf LB-Agar ausplattiert, das Chloramphenicol (30 µg/ml) enthielt. Die Kolonien wurden zufällig ausgewählt. Auf Nitrozellulose übertragene Kolonien wurden mit Lysozym behandelt, um die Zellwand zu verdauen, kurz mit Chloroform behandelt, um die äußere Membran aufzubrechen, in 1 BSA in PBS geblockt und mit ^{125}I-markiertem BSA-NPN-Antigen inkubiert. Nach verschiedenen Waschschritten in PBS (enthaltend 0,05 % Tween-20) wurde ein Film mit dem gewaschenen und trockenen Filter über Nacht bei –70°C exponiert und die Autoradiografien wurden anschließend entwickelt.

[0393] Die Präzipitate wurden mit einem Antikörper-enthaltenden Phagen in der Anwesenheit von BSA-NPN, jedoch nicht mit einem Helferphagen, erzielt. Die Partikel behielten ihre Infektiosität im Weiteren bei der anschließenden Inkubation mit bakteriellen Zellen bei, die das F'-Episom trugen, und erzeugten 4 × 10^5-Kolonien aus einem einzelnen gelösten Präzipitat.

[0394] Zusätzlich wurde eine DNA-Restriktionsanalyse durchgeführt, um die Anwesenheit von Inserten der schweren und leichten Kette festzustellen. Die DNA-Restriktionsanalysen der Klone ergaben die Anwesenheit eines Xho I- und Xba I-Fragmentes von 1,4 Kb, wie für das Fd-cpVIII-Fusionskonstrukt und das Insert der kappa-Kette erwartet.

[0395] Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Beweis für die Antigenspezifität und Multivalenz. Zusätzlich zur Bereitstellung von immunologischen Parametern ermöglicht diese Präzipitierung Möglichkeiten zur vereinfachten Anreicherung von Antigenspezifischen Phagenpartikeln. Im Grunde genommen können Phagen-enthaltende spezifische Antikörper in hohem Maße durch Fällung mit Antigenen angereichert werden (welche Zelloberflächenmarker, virale, bakterielle, wie auch synthetische Moleküle sein können). Die gewaschenen Anti-

gen-Antikörper-Präzipitate können durch die Zugabe von überschüssigem Antigen gelöst werden und es können brauchbare Phagenkonstrukte gewonnen werden. Zur Gewinnung von seltenen Spezies kann ein immobilisiertes Antigen verwendet werden, welches den Weg für die differentielle Affinitätselution eröffnet.

[0396] Um die Verwendbarkeit von immobilisiertem Antigen für die Anreicherung von Klonen mit einer definierten Bindungsspezifität zu zeigen, wurde ein Panningexperiment durchgeführt. Es wurde ein Ampicillin-resistentes Phagemid konstruiert, das ein anti-Tetanus-Fab als cpVIII-Fusion exprimiert. Die Gewinnung dieses Klons mit einem Helferphagen erzeugte einen Phagen, der das Ampicillin-resistente Phagemid kodiert, welches das anti-Tetanus-Fab auf seiner Beschichtung zeigte. Diese Phagen, die Tetanusspezifität kodierten, wurden mit NPN-Hapten-kodierendem Phagen gemischt (1:100) und man ließ diese an eine Mikrotiterplatte binden, die mit Tetanustoxoid beschichtet wurde. Nach einer einstündigen Verweildauer wurde die Platte extensiv gewaschen und die Phagen wurden anschließend mit einem Niedrig-pH-Puffer eluiert. Die Infektion von XL1-Blue-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase und das anschließende Ausplattieren von Aliquots auf Ampicillin und Chloramphenicol ermöglichte die direkte Quantifizierung der Anreicherung. Die Untersuchung von über 1000 Kolonien zeigte, dass Ampicillin-resistente Kolonien, die aus dem eluierten Phagen stammten, Chloramphenicol-resistente Kolonien um einen Wert von 27 zu 1 übertrafen. Das Panning reicherte den anti-Tetanus-Fab-tragenden Phagen daher 2700-fach an. Dieses Ergebnis legt nahe, dass ein Klon einer definierten Spezifität, der in einem Teil pro Million vorhanden ist, über nicht-spezifische Klone nach der Abfolge von zwei Panningrunden dominieren wird.

5. Vorteile der Anordnung von kombinatorischen Antikörper-FAB-Bibliotheken entlang von Phagenoberflächen

[0397] Es wird ein leistungsfähiges Verfahren zur Erzeugung von Bibliotheken mit 10^{8-9} Mitgliedern und eine Auswahl aus der Bibliothek kombinatorischer Fabs mittels vorgewählter Bindungsaktivitäten gezeigt. Im hier beschriebenen Vektor wurden die Restriktionsklonierungsstellen zur Insertion von mittels PCR erzeugten Antikörperfragmenten beibehalten, wie kürzlich für den Lambdavektor beschrieben. Die Gewinnung der Gene, die die Antikörper-Fd und kappa-Ketten kodieren, wird durch die Verwendung des f1-Replikationsursprungs vermittelt, was aufgrund der Koinfektion mit dem Helferphagen zur Synthese und Packung des positiven Strangs auf dem Vektor führt. Da sich der "reife" Viruspartikel durch Einbau des großen Beschichtungsproteins um die einzelsträngige DNA anordnet, wenn diese durch die innere Membran in den periplasmischen Spalt gelangt, fängt es nicht nur die genetische Information mit ein, die auf dem Phagemidvektor befördert wird, sondern baut ebenso verschiedene Kopien funktioneller Fabs entlang der Länge des Partikels mit ein. Aufgrund nachfolgender Infektion von Wirtszellen, die das F'-Episom des Phagemid tragen, wird eine Resistenz vermittelt, die eine Selektion von Kolonien auf das geeignete Antibiotikum hin ermöglicht. Im Wesentlichen wurde die Antigenerkennungseinheit mit den Anweisungen für seine Herstellung verknüpft.

[0398] Die volle Leistung des früheren kombinatorischen Systems konnte nicht vollständig verwendet werden, da das Screening mit lediglich etwa 0,1–1 % der Mitglieder den direkten Zugang ermöglichte. Im Phagemid/M13-System wurden Bibliotheken ähnlicher Größe erzeugt und es waren alle Mitglieder über eine Affinitätsselektion zugänglich. Ungleich dem Lambdavektor, welcher monovalente Fabs erzeugte, erzeugte dieses System weiterhin multivalente Partikel, was daher das Einfangen eines breiteren Bereiches an Affinitäten ermöglichte.

[0399] Die singulären Phagemidrestriktionsschnittstellen ermöglichen die Rekombination von Fd- und kappa-Ketten, das einen Austausch oder ein Mischen der Kette ermöglicht. Die Gewinnung von filamentöser einzelsträngiger DNA ermöglicht das schnelle Sequenzieren und die Analyse des genetischen Aufbaus des Klons, der von Interesse ist. Tatsächlich kann es ins Auge gefasst werden, dass eine Phagen-kodierte Antikörperspezifität durch Antigenselektion vor der DNA-Sequenzierung oder Mutagenese angereichert wird. Die Möglichkeit im Weiteren einen iterativen Prozess der Mutation, gefolgt von einer Selektion, zu entwickeln, kann die schnelle Erzeugung von Antikörpern mit hoher Affinität aus Keimbahnsequenzen ermöglichen. Das Verfahren kann automatisiert werden. Ungeachtet des Potenzials des Systems, die Natur nachzubilden, würde das Phagemid/M13-System eine vollständige Zergliederung der Antikörperantwort in Menschen ermöglichen, was möglicherweise zu nützlichen therapeutischen und diagnostischen Reagenzien führt.

[0400] Die Membranverankerung der schweren Kette und die Kompartimentierung der kappa-Kette im Periplasma ist der Schlüssel zur Expression dieses funktionellen dimeren Proteins. Das Potenzial dieses Systems ist keineswegs auf Antikörper begrenzt und kann auf jedes Proteinerkennungssystem oder auf eine Kombination von Systemen ausgedehnt werden, die multiple Mitglieder enthalten. Beispielsweise ist nun das Koppeln von Liganden und Effektorsystemen in eine Matrix hoher Avidität möglich. In einer ähnlichen Weise kann eine Ligandenbibliothek gegen eine Bibliothek aus Rezeptoren sortiert werden.

6. Zufallsmutagenese der CDR3-Region einer schweren Kette, die ein anti-Tetanustoxoid kodiert

a. PCR-Mutagenese mit degenerierten Oligonukleotiden

[0401] Um ein mutagenisiertes Heterodimer dieser Erfindung mit geänderter Spezifität zu erhalten, welches nicht länger ein Tetanustoxoidantigen (TT) erkennt, sondern ein neues Antigen erkennen und spezifisch daran binden würde, wurde ein Verfahren entwickelt, um lediglich die CDR3-Region eines Fragmentes der schweren Kette zufällig anzuordnen, das durch eine bekannte Nukleotidsequenz kodiert wird. Dieser Ansatz wird schematisch in Fig. 12 aufgezeigt, wobei ein repräsentatives Fragment der schweren Kette innerhalb eines Phagemidklons, bestehend aus alternierenden Gerüstregionen (1 bis 4), gezeigt durch weiße Blöcke, und Komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) (1 bis 3), gezeigt durch kreuzschraffierte Blöcke, und die erste konstante Region (CH1) zwei separaten PCR-Runden unterworfen wird. In der ersten PCR-Amplifikationsreaktion wird das 5'-Ende der schweren Kette bis hin zum 3'-Ende der Gerüstregion 3 amplifiziert. In der zweiten PCR-Amplifikationsreaktion wird die CDR3-Region zufällig mutagenisiert, wie durch die schwarze Box angedeutet. Dies wird durch die Verwendung eines Pools von Oligonukleotidprimern bewerkstelligt, die mit einer degenerierten Region synthetisiert wurden, und die zwischen den und fortlaufend zu den Sequenzen der konservierten Gerüstregionen 3 und 4 liegen. Die resultierenden Amplifikationsprodukte aus der zweiten Amplifikation, von denen jeder eine zufällig angeordnete CDR3-Region besitzt, besaßen ihr 5'-Ende am 3'-Ende der Gerüstregion 3 und das 3'-Ende des Produktes reichte bis zum 3'-Ende der CH1-Region.

[0402] Der Pool aus degenerierten Oligonukleotidprimern wurde so entworfen, dass er zur Amplifikation von Produkten führt, die ein 5'-Ende besitzen, welches mit dem 3'-Ende der Produkte des ersten PCR-Reaktionsprodukts komplementär ist und damit überlappt. Die zwei getrennten PCR-Reaktionsprodukte werden daher vereinigt und einer dritten PCR-Reaktion unterworfen, in welcher die überlappende Region zwischen den beiden Produkten ausgedehnt wird, was zu einer schweren Kette mit einer zufällig angeordneten CDR3-Region führt.

[0403] Ein DNA-Template der schweren Kette zur Verwendung in dieser Erfindung war in einem Klon (ein 7E genannter Phagemidvektor, der Fragmente der schweren und leichten Kette enthält) aus einer humanen kombinatorischen anti-Tetanustoxoid (TT)-Fab-Bibliothek erhältlich, die aus Lambda Hc2- und Lc2-Bibliotheken abgeleitet wurde, wie durch Persson et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 2432–2436 (1991) beschrieben. Um eine semi-synthetische kombinatorische Bibliothek zu erzeugen, wurde der Klon 7E im pComb2-3'-dicistronischen Expressionsvektor für die Expression eines Membrananker-Fusionsproteins der schweren Kette von cpIII (Fd-cpIII) und einer löslichen leichten Kette konstruiert, wie für anti-NPN in Beispiel 2k durch Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 7978–7982 (1991) beschrieben.

[0404] Der Phagemidvektor pComb2-3' wurde hergestellt, wie in Beispiel 1b (ii) beschrieben. Die ursprüngliche Paarung der leichten und schweren Ketten aus dem 7E-Lambdaklon wurde durch Ligation des Xho I- – Xba I-Fragments in einen Xho I- – Xba I-verdauten pComb2-3'-Vektor beibehalten. Um die cpIII-Membran-Ankersequenz zu ersetzen, wurde die LacZ-Promotorsequenz und die pelB-Leitsequenz durch Verdau mit Xho I – Xba I zerstört, ein Spe I- – Sac I-Fragment aus dem pComb3, wie in Beispiel 1b (ii) hergestellt, wurde in den pComb2-3'-Vektor ligiert, der die Sequenzen der schweren und leichten Kette aus dem Klon 7E enthält. Der resultierende Phagemidklon, im Folgenden als pC3-TT7E bezeichnet, wurde zuerst exprimiert, wie für die anti-NPN-Heterodimeren auf den Phagenoberflächen in Beispiel 3 beschrieben, und anschließend durch Panning auf TT-beschichteten Platten gescreent, wie für anti-NPN in Beispiel 4c beschrieben. Der Klon pC3-TT7E zeigte gegenüber TT einen Kd in der Größenordnung von 10^{-7} M und wurde mittels eines nicht-spezifischen Phagen um 10^{3}-fach angereichert, wie durch Barbas et al., supra, beschrieben.

[0405] Der Klon pC3-TT7E, der beiderseits die Sequenzen der schweren und leichten Kette enthält, wurde als Template-DNA für die Zufallsmutagenese der CDR3-Region der schweren Kette verwendet, um die Antigenbindungsspezifizität so wie hier beschrieben zu ändern. Die Sequenz der schweren Kette wurde bestimmt, wie in Beispiel 1a (ii) beschrieben. Es wurden zwei getrennte PCR-Reaktionen durchgeführt, wie in Fig. 12 beschrieben.

[0406] Die erste PCR-Reaktion führte zur Amplifikation der Region des Fragments der schweren Kette im PC3-TT7E-Klon, beginnend von der Gerüstregion 1 bis hin zum Ende der Gerüstregion 3, welche 5' zur CDR3 gelegen ist, die ungefähr 400 Basenpaare lang ist. Um diese Region zu amplifizieren, wurden die folgenden Primerpaare verwendet. Der 5'-antisense-Oligonukleotidprimer FT3X, der die Nukleotidsequenz 5'-G-CAA-TAA-ACC-CTC-ACT-AAA-GGG-3' (SEQ ID NO. 118) besitzt, hybridisierte an den nicht-kodierenden Strang der schweren Kette, die zu der 5'-Region der Gerüstregion 1 korrespondiert und den Anfang davon mit-

einschließt. Der 3'-sense-Oligonukleotidprimer, B7EFR3, der die Nukleotidsequenz 5'-TCT-CGC-ACA-ATA-ATA-CAC-GGC-3' (SEQ ID NO. 119) besitzt, hybridisierte mit dem kodierenden Strang der schweren Kette, die zum 3'-Ende der Gerüstregion 3 korrespondiert. Die Oligonukleotidprimer wurden durch Research Genetics (Hunstville, AL) synthetisiert. Die PCR-Reaktion wurde in einer 100 µl-Reaktion durchgeführt, die ein µg von jedem der Oligonukleotidprimer FTX3 und B7EFR3 enthielt, sowie 8 µl 2,5 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µl Taq-Polymerase, 10 ng an Template-pCE-TT7E und 10 µl 10X-PCR-Puffer, der kommerziell bezogen wurde (Promega Biotech). Zwei Tropfen Mineralöl wurden oben auf die Mischung gegeben und es wurden 35 Runden einer PCR-Amplifikation in einem Thermocycler durchgeführt. Der Amplifikationszyklus bestand aus einer Denaturierung bei 94°C für eine Minute, einer Anlagerung bei 50°C für 1 Minute, gefolgt von einer Verlängerung bei 72°C für zwei Minuten. Die resultierenden PCR-Amplifikationsprodukte wurden anschließend wie in Beispiel 1d auf einem Gel aufgereinigt und in einer Überlappungsextensions-PCR-Reaktion mit den Produkten der zweiten PCR-Reaktion verwendet, beide wie unten beschrieben, um die zwei Produkte in rekonstruierte schwere Ketten zu rekombinieren, die mutagenisierte CDR3-Regionen enthalten, wie in **Fig. 12** beschrieben. Die Gesamtausbeute an DNA aus dieser Amplifikation betrug ungefähr 3 µg/100 µl.

[0407] Die zweite PCR-Reaktion führte zur Amplifikation der schweren Kette des 3'-Endes der Gerüstregion 3 bis hin zum Ende der CH1-Region, welche ungefähr 390 Basenpaare lang ist. Um diese Region zu amplifizieren, wurden die folgenden Primer verwendet. Der 5'-antisense-Oligonukleotidprimerpool, genannt 7ECDR3, besaß die Nukleotidsequenz, repräsentiert durch die Formel 5'-GTG-TAT-TAT-TGT-GCG-AGA-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-TGG-GGC-CAA-GGG-ACC-ACG-3', wobei N A, C, G oder T sein kann und S entweder C oder G ist (SEQ ID NO. 120), wobei das 5'-Ende des Primerpools komplementär zum 3'-Ende der Gerüstregion 3 war, wie sie durch die komplementäre Nukleotidsequenz des Oligonukleotidprimers B73FR3 repräsentiert wurde, und das 3'-Ende des Primerpools war komplementär zum 5'-Ende der Gerüstregion 4. Die Region zwischen den zwei spezifizierten Enden des Primerpools wurde durch eine 48-mer NNS-Degeneration repräsentiert, welche schließlich eine unterschiedliche Population mutagenisierter CDR3-Regionen mit einer Länge von 16 Aminosäureresten kodierte. Der von Persson et al., supra, beschriebene 3'-sense-Oligonukleotidprimer CG1/Z besitzt die Nukleotidsequenz 5'-GCATGTACTAGTTTTGTCACAAGATTTGGG-3' (SEQ ID NO. 121), welcher mit dem kodierenden Strang der schweren Kette hybridisiert, der zum 3'-Ende des CH1 korrespondiert. Die zweite PCR-Reaktion wurde auf dem pC3-TT7E in einer wie oben beschriebenen 100 µl-Reaktion durchgeführt, die ein µg von jedem der Oligonukleotidprimer 7ECDR3 und CG1Z enthielt. Die resultierenden PCR-Amplifikationsprodukte wurden anschließend, wie oben beschrieben, über ein Gel aufgereinigt. Die Gesamtausbeute an DNA aus dieser zweiten PCR-Mutageneseamplifikation betrug ungefähr 3 µg/100 µl.

[0408] Einhundert Nanogramm gelgereinigter Produkte aus den ersten und zweiten PCR-Reaktionen wurden anschließend jeweils mit 1 µg FTX3- und CG1Z-Oligonukleotidprimern als Primerpaar in einer finalen PCR-Reaktion gemischt, um ein wie in **Fig. 12** beschriebenes vollständiges Fragment der schweren Kette durch Überlappungsextension zu bilden. Die PCR-Reaktionsmischung enthielt ebenfalls 10 µl 10X-PCR-Puffer, 1 µl Taq-Polymerase und 8 µl 2,5 mM dNTPs, wie oben beschrieben. Die PCR-Reaktion wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Um ausreichende Mengen des Amplifikationsproduktes zu erhalten, wurden 15 identische PCR-Reaktionen durchgeführt. Die resultierenden Fragmente der schweren Kette, beginnend mit Gerüstregion 1 bis hin zum Ende von CH1, welche zufällig mutagenisierte CDR3-Regionen besitzen, waren ungefähr 790 Basenpaare lang. Die Amplifikationsprodukte der schweren Kette aus den 15 Reaktionen wurden zunächst vereinigt und anschließend über ein Gel, wie oben beschrieben, vor ihrem Einbau in eine Phagemidbibliothek aufgereinigt. Die Gesamtausbeute an DNA aus jeder Amplifikation betrug ungefähr 3 µg/µl und die gesamte vereinigte Ausbeute betrug daher ungefähr 45 µg der amplifizierten mutagenisierten schweren Kette.

b. Konstruktion der Phagemidbibliothek

[0409] Die resultierenden in Beispiel 6a hergestellten aufgereinigten Fragmente der schweren Kette wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen Xho I und Spe I aufgereinigt, wie in Beispiel 2d beschrieben. Die resultierenden Fragmente der schweren Kette wurden anschließend auf einem Gel vor ihrem Einbau in den pC3-TT7E-Phagemidvektorklon aufgereinigt, welcher zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurde, um das nicht-mutagenisierte Fragment der schweren Kette zu entfernen und einen linearen Vektor zu bilden. Die Ligation von 640 ng der Xho I-Spe I-Fragmente der schweren Kette, die mutagenisierte CDR3-Regionen besitzen, in zwei µg des linearisierten pC3-TT7E-Phagemidvektors zur Bildung eines zirkularisierten Vektors, der mutagenisierte CDR3-Regionen besitzt, wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter Verwendung von 10 Einheiten BRL-Ligase (Gaithersburg, MD) in BRL-Ligasepuffer in einem Reaktionsvolumen von 150 µl durchgeführt. Es wurden fünf getrennte Ligationsreaktionen durchgeführt, um die Größe der Phagenbi-

bliothek zu steigern, die mutagenisierte CDR3-Regionen besitzt. Die Gesamtmenge an amplifizierter mutagenisierter schwerer Kette betrug daher für fünf Ligationsreaktionen 3,2 µg. Nach den Ligationsreaktionen wurde die zirkularisierte DNA bei –20°C für 2 Stunden durch Zugabe von 2 µl an 20 mg/ml Glycogen, 15 µl an 3 M Natriumacetat bei pH 5,2 und 300 µl Ethanol gefällt. Die DNA wurde anschließend durch Mikrozentrifugation bei 4°C für 15 Minuten pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Das Pellet wurde in 10 µl Wasser resuspendiert und durch Elektroporation in 300 µl E. coli-XL1-Blue-Zellen, wie in Beispiel 2k beschrieben, zur Bildung einer Phagenbibliothek transformiert. Die Gesamtausbeute der vier beschriebenen Mutagenese- und Transformationsverfahren betrug ungefähr 5×10^7-Transformanten. Die XL1-Blue-Zellen aus E. coli wurden als Wirte ausgewählt, da das einzelne Stoppkodon TAG unterdrückt wird.

[0410] Nach der Transformation wurden zur Isolierung des Phagen, auf welchem die Expression von Heterodimer induziert wurde, für ein abschließendes Panning auf Targetantigenen, wie beispielsweise Fluoreszein, 3 ml SOC-Medium (SOC wurde hergestellt durch Mischen von 20 g Bacto-trypton, 5 g Hefeextrakt und 0,5 g NaCl in einem Liter Wasser, Einstellen des pH auf 7,5 und Zugabe von 20 ml Glucose direkt vor Verwendung zur Induktion der Expression des Heterodimers von Fd-cpIII und der leichten Kette) zugemischt, und die Kultur wurde bei 220 rpm für eine Stunde bei 37°C geschüttelt, wobei nach dieser Zeit 10 ml an SB (SB wurde durch Mischen von 30 g Trypton, 20 g Hefeextrakt und 10 g Mops-Puffer mit einem auf 7 eingestellten pH hergestellt), welches 20 µg/ml Carbenicillin und 10 µg/ml Tetracyclin enthält, zugegeben wurde, und die Mischung wurde bei 300 rpm für eine weitere Stunde geschüttelt. Die resultierende Mischung wurde zu 100 ml SB, enthaltend 50 µg/ml Carbenicillin und 10 µg/ml Tetracyclin zugegeben und für eine Stunde geschüttelt; nach dieser Zeit wurde der Helferphage VCSM13 (10^{12} pfu) zugegeben und die Mischung wurde für weitere zwei Stunden geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden 70 µg/ml Kanamycin zugemischt und bei 30°C über Nacht inkubiert. Die niedrige Temperatur führte zu einem besseren Einbau an Heterodimer auf der Oberfläche des Phagen. Der Überstand wurde durch Zentrifugation geklärt (4000 rpm bei 15 Minuten in einem JA10-Rotor bei 40°C). Der Phage wurde durch Mischung mit 4 % (Gew.-%), Polyethylenglycol 8000 und 3 % (Gew.-%) NaCl gefällt und für 30 Minuten auf Eis gehalten, gefolgt von einer Zentrifugation (9000 rpm für 20 Minuten in einem JA10-Rotor bei 4°C). Die Phagenpellets wurden in 2 ml PBS resuspendiert und für 3 Minuten zur Ablagerung der Pellets mikrozentrifugiert, in neue Röhrchen überführt und bei –20°C für ein anschließendes Screening, wie oben beschrieben, gelagert.

[0411] Zur Bestimmung der Titer (titering) Kolonie bildenden Einheiten (cfu) wurde der Phage (gepackter Phagemid) in SB verdünnt und 1 µl wurde zur Infektion von 50 µl frische. (OD600 = 1) E. coli-XL1-Blue-Zellen verwendet, die in SB kultiviert wurden, das 10 µg/ml Tetracyclin enthält. Es wurden Phagen und Zellen bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert und anschließend direkt auf LB/Carbenicillinplatten ausplattiert.

c. Selektion von anti-Fluoreszeinheterodimeren auf Phagenoberflächen

1) Multiples Panning auf der Phagenbibliothek, die mutagenisierte CDR3-Regionen besitzt

[0412] Die in Beispiel 6b erzeugte Phagenbibliothek, die Fragmente der schweren Kette mit mutagenisierten CDR3-Regionen besitzt, wurde, wie hier beschrieben, auf einer mit 50 µg/ml-Fluoreszein-BSA-Konjugat beschichteten Mikrotiterplatte einer Panningprozedur unterworfen, um auf anti-Fluoreszeinheterodimere zu screenen. Fluoreszein wurde an BSA gemäß der in "Antibodies: A Laboratory Manual", Hrsg. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, beschriebenen Verfahren konjugiert.

[0413] Das verwendete Panningverfahren war eine Modifikation des ursprünglich durch Parmley und Smith beschriebenen (Parmley et al., Gene, 73: 30–5–318). Zwei bis vier Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Costar 3690) wurden über Nacht bei 4°C mit 25 µl an 50 µg/ml des oben hergestellten TT-Antigens in 0,1 M Bicarbonat, pH 8,6 beschichtet. Die Vertiefungen wurden zweifach mit Wasser gewaschen und durch vollständiges Füllen der Vertiefungen mit 3 % (Gew.-%) BSA in PBS und Inkubieren der Platte für eine Stunde bei 37°C geblockt. Nachdem die Blockierungslösung ausgeschüttelt wurde, wurden 50 µl der oben hergestellten Phagenbibliothek (typischerweise 10" cfu) zu jeder Vertiefung zugegeben, und die Platte wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

[0414] Der Phage wurde entfernt und die Platte wurde einmal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde jede Vertiefung zehnfach mit TBS/Tween (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 % Tween 20) über einen Zeitraum von einer Stunde bei Raumtemperatur gewaschen, wobei das Waschen aus dem Hoch- und Herunterpipettieren zum Waschen der Vertiefung bestand, wobei man jedes Mal die Vertiefungen zwischen den Waschschritten vollständig mit TBS/Tween gefüllt stehen ließ. Die Platte wurde einmal mehr mit destilliertem

Wasser gewaschen und anhaftender Phage wurde durch Zugabe von 50 µl Elutionspuffer (0,1 M HCl, eingestellt auf pH 2,2 mit festem Glycin, enthaltend 1 mg/ml BSA) zu jeder Vertiefung, gefolgt von einer Verweildauer bei Raumtemperatur von 10 Minuten, eluiert. Der Elutionspuffer wurde mehrere Male auf- und abpipettiert, entfernt, und mit 3 µl 2 M Tris-Base pro 50 µl an verwendetem Elutionspuffer neutralisiert.

[0415] Der eluierte Phage wurde verwendet, um 2 ml an frischen (OD_{600} = 1) E. coli-XL1-Blue-Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur zu infizieren; nach dieser Zeit wurden 10 ml SB, enthaltend 20 µg/ml Carbenicillin und 10 µg/ml Tetracyclin, zugemischt. Es wurden Aliquots von 20, 10 und 1/10 µl aus der Kultur zum Ausplattieren entfernt, um die Anzahl an Phagen (gepackte Phagemiden) zu bestimmen, die von der Platte eluiert wurden. Die Kultur wurde für eine Stunde bei 37°C geschüttelt, wonach sie zu 100 ml SB, enthaltend 50 µg/ml Carbenicillin und 10 µg/ml Tetracyclin zugegeben wurde und eine Stunde geschüttelt wurde. Anschließend wurde der Helferphage VCSM13 (10^{12} pfu) zugegeben und die Kultur wurde für weitere zwei Stunden geschüttelt. Nach diesem Zeitraum wurden 70 µg/ml Kanamycin zugegeben und die Kultur wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Phagenherstellung und das weitere Panningverfahren wurde, wie oben beschrieben, wiederholt.

[0416] Nach jeder Panningrunde wurde die prozentuale Ausbeute an Phagen bestimmt, wobei -Ausbeute – (Anzahl an eluierten Phagen/Anzahl an verwendeten Phagen) × 100. Das anfängliche Phageninputverhältnis wurde wie in Beispiel 6b durch Titrierung auf Selektionsplatten bei etwa 10^{11} cfu für jede Runde des Panningverfahrens bestimmt.

[0417] Das abschließende Phagenoutputverhältnis wurde durch Infektion von 2 ml XL1-Blue-Zellen wie oben beschrieben aus der logarithmischen Phase, und durch Ausplattieren von Aliquots auf Selektionsplatten bestimmt.

[0418] Als Alternative zur Elution mit Säure wurde der auf den Vertiefungen der Mikrotiterplatte gebundene Phage durch Zugabe von 50 µl einer Lösung aus 10^{-5} M Fluoreszein verdünnt in PBS, gefolgt von einer Verweildauer von einer Stunde bei 37°C, eluiert. Die Lösung wurde anschließend auf- und abpipettiert, um die Vertiefungen zu waschen. Das resultierende Eluat wurde anschließend in 2 ml aus frischen E. coli-XL1-Blue-Zellen überführt für eine wie oben beschriebene Infektion zur Herstellung von Phagen und zur weiteren Panningprozedur. In anschließenden Panningrunden wurde der Phage mit 10^{-6} M Fluoreszein eluiert.

[0419] Die Messwerte der Phagenmenge, die spezifisch an Fluoreszein-beschichtete Vertiefungen über vier aufeinanderfolgende Runden des Pannings und der Elution mit Säure oder Fluoreszein alleine gebunden war, werden unten in Tabelle 8 gezeigt. Es wurden mit jedem Elutionsprotokoll vergleichende Ausbeuten von Phagen erreicht, auf welchen Heterodimere exprimiert wurden, die spezifisch an Fluoreszein banden. Diese Daten bestätigten, dass die Mutagenese der CDR3-Region, wie in dieser Erfindung beschrieben, ein Heterodimer, welches anfänglich spezifisch an TT gebunden hat, zu einem solchen ändert, das spezifisch Fluoreszein gebunden hat.

Tabelle 8

Eluierter Phage

	Säureelution	Fluoreszeinelution
Runde 1	$5{,}6 \times 10^5$/Vertiefung	$4{,}7 \times 10^5$/Vertiefung
Runde 2	$4{,}6 \times 10^6$/Vertiefung	$5{,}6 \times 10^5$/Vertiefung
Runde 3	$3{,}8 \times 10^5$/Vertiefung	$1{,}4 \times 10^6$/Vertiefung
Runde 4	$1{,}3 \times 10^6$/Vertiefung	$4{,}0 \times 10^6$/Vertiefung

[0420] Die nicht-spezifische Bindung an diese Oberfläche mit einer Kontrollphase variierte zwischen 10^4 und 10^5 Phagen pro Vertiefung. Die Erzeugung von löslichem Fab und die Bestätigung der Bindung an Fluoreszein mittels ELISA, wie in 2) unten beschrieben, ergab 8 reaktive Klone aus den 60 zufällig ausgewählten transformierten Kolonien und 38 reaktive Klone aus 40 zufällig ausgewählten transformierten Kolonien für die mit Säure eluierten und die mit Fluoreszein eluierten Bibliotheken.

2) Herstellung von löslichen Heterodimeren zur Charakterisierung der Bindungsspezifität an Fluoreszein

[0421] Um die Spezifität der mutagenisierten Heterodimere weiter zu charakterisieren, die auf der Oberfläche

des Phagen, wie oben beschrieben, exprimiert wurden, wurden lösliche Fab-Heterodimere von sowohl dem mit Säure eluierten wie auch dem mit Fluoreszein eluierten Phagen hergestellt und in ELISA-Testverfahren auf Fluoreszein-beschichteten Platten analysiert, sowie durch kompetitives ELISA mit ansteigenden Konzentrationen und löslichem Fluoreszein-BSA und ebenfalls durch Fluoreszenzquenchinganalysen. Die letztgenannten Analysen wurden, wie in "Fluorescein Hapten: An Immunological Probe", Hrsg. E. W. Voss, CRC Press, Inc., S. 52–54, 1984, beschrieben, durchgeführt.

[0422] Um lösliche Heterodimere herzustellen, wurde Phagemid-DNA aus positiven Klonen isoliert und mit Spe I und Nhe I verdaut. Der Verdau mit diesen Enzymen erzeugte kompatible kohäsive Enden. Das 4,7 Kb-DNA-Fragment, dem der Gen III-Anteil fehlte, wurde über ein Gel aufgereinigt (0,6 % Agarose) und mit sich selbst ligiert. Die Transformation von E. coli-XL1-Blue ermöglichte die Isolierung von Rekombinanten, denen das cpIII-Fragment fehlt. Die Klone wurden mittels Xho I- – Xba I-Verdau auf die Entfernung des cpIII-Fragments hin untersucht, was zu einem 1,6 Kb-Fragment führen sollte. Die Klone wurden in 100 ml SB, enthaltend 50 µg/ml Carbenicillin und 20 mM $MgCl_2$, bei 37°C kultiviert, bis ein OD_{600} von 0,2 erreicht wurde. Es wurde IPTG (1 mM) zugegeben und die Kultur wurde über Nacht bei 30°C kultiviert (Wachstum bei 37°C führt lediglich zu einer leichten Reduktion in der Ausbeute an Heterodimer). Die Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 4000 rpm für 15 Minuten in einem JA10-Rotor bei 4°C pelletiert. Die Zellen wurden in 4 ml PBS resuspendiert, das 34 µg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) enthält, und durch Ultraschall auf Eis (2–4 Minuten bei 50 % Leistung) lysiert. Die Trümmer wurden mittels Zentrifugation bei 14000 rpm in einem JA20-Rotor bei 4°C für 15 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde direkt für die ELISA-Analyse, wie unten beschrieben, verwendet und bei 20°C gelagert. 10 ml Kulturen erbrachten ausreichend Heterodimer für die Analyse bei der Untersuchung einer großen Anzahl an Klonen. In diesem Fall wurden die Ultraschallanwendungen in 2 ml Puffer durchgeführt.

[0423] Die oben hergestellten löslichen Heterodimere wurden mittels ELISA untersucht. Für diesen Test wurden in einer individuelle Vertiefung auf einer Mikrotiterplatte 1 µg/Vertiefung an Fluoreszein-BSA-Lösung gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert, um es der Proteinlösung zu ermöglichen, sich an die Wände der Vertiefung anzulagern. Nach der Verweildauer wurden die Vertiefungen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Lösung aus 3 % BSA inkubiert, um nicht-spezifische Stellen auf der Vertiefung zu blocken. Die Platten wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert, wonach die Platten umgedreht und ausgeschüttelt wurden, um die BSA-Lösung zu entfernen. Die oben hergestellten löslichen Heterodimere wurden anschließend zu jeder Vertiefung zugegeben und darin bei 37°C für eine Stunde zur Bildung von Immunreaktionsprodukten belassen. Nach der Verweildauer wurden die Vertiefungen zehnmal mit PBS zur Entfernung von nicht-gebundenem löslichen Antikörper gewaschen und anschließend mit einem sekundären anti-humanem FAB aus Ziege erhalten, der an alkalische Phosphatase konjugiert wurde, und welcher in PBS verdünnt wurde, das 1 % BSA enthält. Die Vertiefungen wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert, wonach die Vertiefungen zehnmal mit PBS gewaschen wurden, gefolgt von einer Entwicklung mit p-Nitrophenylphosphat (PNPP).

[0424] Iimmunoreaktive Heterodimere, die wie im oben erwähnten ELISA bestimmt wurden, wurden anschließend durch einen kompetitiven ELISA zur Bestimmung der Affinität der mutagenisierten Heterodimere analysiert. Der ELISA wurde wie oben beschrieben mit steigenden Konzentration an löslichem Fluoreszein-BSA durchgeführt, welches von einer Konzentration von 10^{-9} M bis zu einer Konzentration von 10^{-5} M reichte, und das in der Anwesenheit des löslichen Heterodimers zugemischt wurde. Die maximale Inhibition der Bindung wurde bei einer Konzentration von 10^{-6} M freiem Antigen erreicht, mit einer halben maximalen Inhibition, die mit ungefähr 10^{-7} M freiem Antigen erhalten wurde. Die aus allen Klonen exprimierten Antikörper besaßen ungefähre Dissoziationskonstanten (Kd) in einem Bereich von 10^{-7} bis 10^{-8} M für Fluoreszein-BSA-Konjugate für sowohl die Fluoreszein- wie die Säureelutionen. Wahre Kds wurden in Fluoreszenzquenchinganalysen bestimmt. Antikörper, die auf Phagen aus Klonen nach einer Fluoreszeinelution exprimiert wurden, besaßen für Fluoreszein höhere Affinitäten von 10^{-7} gegenüber 10^{-6} M für die sauer eluierten Antikörper. Der Elternklon 7E zeigte innerhalb detektierbarer Grenzen im Testverfahren keine Quenchung, was eine Affinität für freies Fluoreszein von weniger als 10^{-5} M nahelegt. Die Affinitäten der stärksten Binder von Antikörpern an Fluoreszein (10^{-7} M) näherten sich dem ungefähren Kd der sekundären Antwort von immunisierten Mäusen für freies Fluoreszein (10^{-7} M) an, wie durch Kranz et al., Mol. Immunol., 20: 1313–1322 (1983), beschrieben.

[0425] Die mutagenisierten Heterodimere dieser Erfindung wurden daher spezifisch erkannt und an Fluoreszein gebunden. Es wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, um zu bestätigen, dass die mutagenisierten Heterodimere nicht länger das TT erkannten, an welches das nicht-mutagenisierte Heterodimer ursprünglich gebunden hatte. Anschließend wurden Fluoreszenzquenchinganalysen durchgeführt, um die Spezifität der Bindung der mutagenisierten Heterodimere zu bestätigen. Die aus Phagen hergestellten löslichen Heterodimere, welche entweder mit Säure oder Fluoreszein alleine eluiert wurden, waren gleichermaßen effektiv bei der Bindung von Fluoreszein mittels irgendeinem der vorangegangenen Ansätze. Die hier beschriebene Erfin-

dung der Mutagenese der CDR3-Region der schweren Kette eines Heterodimers führt daher zur Veränderung der Bindungsspezifität von TT zu Fluoreszein.

d. Sequenzanalyse ausgewählter anti-Fluoreszein-Heterodimere

[0426] Es wurde die vollständige Nukleotidsequenz der mutierten schweren Kette einer repräsentativen Anzahl an Fluoreszein-BSA bindenden Klonen bestimmt. Es wurden keine PCR-induzierten Mutationen außerhalb der CDR3-Region beobachtet. Die vorausgesagten Aminosäuresequenzen der CDR3-Region der schweren Kette werden in **Fig. 13** mit den korrespondierenden SEQ ID NO. in Klammern gezeigt. Sieben Klone, die aus der Säureelutionsbehandlung erhalten wurden, zeigten keine Konsensussequenz. Das Fehlen von Konsensusverhalten in den sauer eluierten Klonen kann ihrer Erkennung eines komplexeren Epitops zugeschrieben werden, das aus Fluoreszein und BSA besteht und wird durch die ungleichen Affinitäten in Bezug auf Fluoreszein und Fluoreszein-BSA reflektiert.

[0427] Im Gegensatz dazu zeigten die mittels Fluoreszein-eluierten Klone eine hohe Selektion an Konsensussequenzen. Von zehn sequenzierten Klonen zeigten lediglich drei unterschiedliche Sequenzen. Alle diese Klone besaßen einen Glycinrest an der Aminosäureposition 95 und einen Asparaginsäurerest an Position 101. Die Positionen der Aminosäurereste folgen dem des Kabat-Nummerierungssystems, wie durch Kabat et al. in "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Department of Health and Human Services, (1987), beschrieben. Zur Kodierung des Glycinrestes wurden beide möglichen Kodons verwendet, die durch das Syntheseprotokoll bereitgestellt wurden, in welchem alle 32 möglichen Kodons erzeugt werden. In natürlichen Antikörpern spielt der Asparaginsäurerest an Position 101 üblicherweise eine strukturelle Rolle bei der Bildung einer Salzbrücke mit einem Argininrest an Position 94 in der Gerüstregion 3 (FR3). Der künstliche Selektionsprozess wiederholte daher eine Wechselwirkung mit struktureller Signifikanz, welche das wiederspiegelt, was im Tier beobachtet wird.

[0428] Zusätzlich enthielten neun der aus zehn Klonen exprimierten semi-synthetischen Antikörper eine Serin-Arginin-Prolin-Triplettsequenz nahe dem Zentrum des Loops direkt benachbart oder einen Rest entfernt zur aminoterminalen Seite eines Argininrestes, obwohl die Kodonverwendung für zwei dieser Reste unterschiedlich war. Dem Klon F31 fehlte dieses zentrale Motiv. Alle Reste waren reich an Argininresten, welches durch drei der 31 möglichen Kodons kodiert wurde. Ein Vergleich des Auftretens innerhalb der zehn unterschiedlichen CDR3-Sequenzen von Arginin mit Leucin und Serin, welches ebenfalls durch drei mögliche Kodons in der Synthese kodiert wurde, ergab ein Argin-Leucin-Serin-Verhältnis von 29:16:15. Diese Neigung zur Selektion von Arginin kann das Ergebnis des dianionischen Charakters von Fluoreszein sein.

[0429] Die Beobachting, dass unschädliche Kodons verwendet wurden, stützt die Theorie, dass klonale Selektion auf der Ebene des Antigen-Antikörper-Zusammenschlusses auftritt und nicht aufgrund einiger unerwarteter Neigungen beim Einbau von Nukleotiden in DNA.

7. Zufallsmutagenese der CDR3-Region einer leichten Kette. die anti-Tetanustoxoid kodiert

a. PCR-Mutagenese mit degenerierten Oligonukleotiden

[0430] Folgt man, wie in Beispiel 6 beschrieben, einem der Zufallsmutagenese der schweren Kette ähnlichen Verfahren, wird die CDR3-Region eines Fragmentes der leichten Kette des anti-Tetanustoxoid-spezifischen Phagemidklons pC3-TT7E zufällig angeordnet, um Antikörper zu erzeugen, die eine Spezifität für Fluoreszein besitzen. Die PCR-Amplifikationen wurden wie in Beispiel 6a, unter Ausnahme der in den Reaktionen verwendeten Oligonukleotidprimer durchgeführt.

[0431] Die erste PCR-Reaktion führte zur Amplifikation der Region des Fragments der leichten Kette im pC3-TT7E-Klon aus der 5'-EcoR V-Schnittstelle des Vektors bis hin zum 5'-Ende der CDR3-Region. Um diese Region zu amplifizieren, wurden die folgenden Primer verwendet: der 5'-antisense-Oligonukleotidprimer KEF, der die Nukleotidsequenz 5'-GAATTCTAAACTAGCTAGTCG-3' (SEQ ID NO. 126) besitzt, welche mit dem nicht-kodierenden Strang der leichten Kette hybridisiert, der mit der EcoR V-Stelle in Vektor korrespondiert; der 3'-sense-Oligonukleotidprimer KV12B, der die Nukleotidsequenz 5'-ATACTGCTGACAGTAATACAC-3' (SEQ ID NO. 127) besitzt, welcher mit dem kodierenden Strang der zum 5'-Ende von CDR3-korrespondierenden schweren Kette hybridisiert. Die PCR-Amplifikation wurde, wie in Beispiel 6a beschrieben, durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden wie in Beispiel 1d anschließend über ein Gel aufgereinigt und in einer Überlappungsextensions-PCR-Reaktion mit den Produkten der zweiten PCR-Reaktion verwendet, beide wie unten beschrieben, um die zwei Produkte in rekonstruierte schwere Ketten zu rekombinieren, die die mutagenisierten

CDR3-Regionen enthalten, wie in Fig. 12 dargestellt.

[0432] Die zweite PCR-Reaktion führte zur Amplifikation der leichten Kette, ausgehend vom 5'-Ende der CDR3-Region bis zum Ende der CH1-Region. Um diese Region zu amplifizieren, wurden die folgenden Primer verwendet. Der 5'-antisense-Oligonukleotidprimerpool, genannt KV5R, besaß die Nukleotidsequenz repräsentiert durch die Formel 5'-TATTACTGTCAGCAGTATNNKNNKNNKNNKNNKACTTTCGGCGGAGGGACC-3' (SEQ ID NO. 128), wobei N ein A, C, G oder T sein kann und wobei K entweder G oder T ist, wobei das 5'-Ende des Primerpools zum 5'-Ende von CDR3 komplementär war und das 3'-Ende des Primerpools zu dem 3'-Ende von CDR3 komplementär war und zu dem 5'-Ende der Gerüstregion 4. Die Region zwischen den zwei spezifizierten Enden des Primerpools wurde durch eine 15-mer Degeneration repräsentiert, welche schließlich eine diverse Population interner mutagenisierter CDR3-Regionen mit einer Länge von 5 Aminosäuren kodierte, die durch nicht-mutagenisierte 5'- und 3'-Enden der CDR3-Regionen eingegrenzt wird. Der 3'-Oligonukleotidprimer T7B, der die Nukleotidsequenz 5'-AATACGACTCACTATAGGGCG-3" (SEQ ID NO. 129) besitzt, hybridiserte an den kodierenden Strang der leichten Kette, die zur T7-Region im Vektor korrespondiert. Die zweite PCR-Reaktion wurde auf pC3-TT7E, wie in Beispiel 6a, mit den KV5R- und T7B-Primern durchgeführt. Die resultierenden PCR-Amplifikationsprodukte wurden anschließend wie oben beschrieben über ein Gel aufgereinigt.

[0433] Anschließend wurden fünfhundert Nanogramm an gelgereinigten Produkten aus den ersten und zweiten PCR-Reaktionen mit 1 µg von sowohl KEF- wie auch T7B-Oligonukleotidprimern als Primerpaar in einer finalen PCR-Reaktion zur Bildung eines vollständigen Fragments der leichten Kette durch Überlappungsextension zugegeben, wie in Fig. 12 beschrieben. Die PCR-Amplifikation wurde, wie in Beispiel 6a beschrieben, durchgeführt. Um eine ausreichende Menge an Amplifikationsprodukte zu erhalten, wurden 5 identische PCR-Reaktionen durchgeführt. Die resultierenden Fragmente der leichten Kette, welche an der 5'-EcoR V-Stelle beginnen und bis zur T7-Region reichen, besaßen fünf interne Aminosäuren einer zufällig angeordneten CDR3.

b. Konstruktion einer Phagemidbibliothek

[0434] Die in Beispiel 7a hergestellten und über eine Gelaufreinigung erhaltenen Fragmente der leichten Kette wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen Sac I und Xba I, wie in Beispiel 2d beschrieben, verdaut. Die erhaltenen Fragmente der leichten Kette wurden anschließend vor der Ligation in den pC3-TT7E-Phagemidvektor-Klon, der vorher mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut wurde, über ein Gel aufgereinigt, um das nicht-mutagenisierte Fragment der leichten Kette zu entfernen und einen linearisierten Vektor zu bilden. Es wurde eine Ligation von 450 ng Amplifikationsprodukten der leichten Kette in 1,4 µg linearisierten pC3-TT7E-Phagemidvektor zur Bildung von zirkularisierten Vektoren, welche mutagenisierte CDR3-Regionen besitzen, wie in Beispiel 6b durchgeführt. Es wurden fünf getrennte Ligationsreaktionen durchgeführt, um die Größe der Phagenbibliothek zu steigern, welche intern mutagenisierte CDR3-Regionen besitzt. Nach den Ligationsreaktionen wurde die zirkularisierte DNA gefällt und in E. coli-XL1-Blue-Zellen wie in Beispiel 6b beschrieben zur Bildung einer Phagenbibliothek transformiert. Die Gesamtausbeute aus dem hier beschriebenen Mutagenese- und Transformationsverfahren betrug ungefähr 2×10^7-Transformanten. Die Phagen wurden, wie für die Mutagenesetransformanten der schweren Kette beschrieben, isoliert.

c. Selektion von anti-Fluoreszeinheterodimeren auf Phagenoberflächen und Sequenzanalyse von ausgewählten Antikörpern

[0435] Die in Beispiel 7b erzeugte Phagenbibliothek, welche Fragmente der leichten Kette mit fünf intern mutagenisierten Aminosäuren in der CDR3-Region besitzt, wurde, wie in Beispiel 6c beschrieben, einer Panningprozedur unterworfen. Die Anzahl an Phagen, die über drei aufeinanderfolgende Runden des Pannings und der Haptenelution mit einem Phageninput von 10^{11} spezifisch an Fluoreszein-beschichtete Vertiefungen gebunden wurden, betrugen $0{,}75 \times 10^6$, 1×10^6 und $2{,}4 \times 10^7$. Die wiederholten Zyklen von Transformation, Phagenherstellung, Panning und Elution führten daher zu einer signifikanten Anreicherung von Heterodimeren, welche spezifisch an Fluoreszein banden. Lösliche Fabs wurden, wie in Beispiel 6b2) zur Charakterisierung der Bindungsspezifität an Fluoreszein hergestellt. Es wurden sieben Klone, wie in Beispiel 6d beschrieben, für die Sequenzanalyse ausgewählt. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse werden in Fig. 14 gezeigt. Die mutierte Region der leichten Kette von CDR3 umfasst die Kabat-Aminosäurepositionen der leichten Kette von Immunglobulin von 92 bis 96. Die Sequenz dieser Region des anfänglichen Klons pC3-TT7E war Gly-Ser-Ser-Leu-Trp (SEQ ID NO. 148). Von den sieben mutierten und auf Fluoreszein selektierten Antikörpern, von denen fünf aus den Klonen P2, P21, P23, P28 und P19 stammten, besaßen die Aminosäuresequenz Thr-Arg-Pro-Gly-Val (SEQ ID NO. 149), jedoch war jeder das Ergebnis von Translationen aus singulären Nukleotidsequenzen. Die

zwei verbleibenden Antikörper aus den P15-und P11-Klonen, die aus singulären Nukleotidsequenzen abgeleitet wurden, besaßen ebenfalls singuläre Aminosäuresequenzen. Da die meisten der mutagenisierten leichten Ketten die gleiche Aminosäuresequenz besaßen, welche durch mögliche Kodons in der Synthese kodiert wurden, wiederholte das künstliche Selektionsverfahren eine Wechselwirkung mit struktureller Signifikanz, die im Tier aus dem Prozess der natürlichen Selektion resultiert.

[0436] Die Mutagenese der CDR3-Region ist nicht auf die CDR3-Regionen begrenzt, da die Primer so entworfen werden können, dass sie zur Zufallsmutagenese von CDR1 und CDR2 von sowohl der schweren wie auch der leichten Kette führen. Die Mutation von allen sechs CDR-Regionen würde in einer außergewöhnlich vielfältigen Bibliothek jenseits dessen führen, was in einem Tier erhalten werden kann. Um eine zufällige Anordnung in allen CDRs zu erhalten, könnten die CDRs der schweren Kette zuerst ausgehend von einem anfänglichen Klon zufällig angeordnet werden, gefolgt von einer Selektion am besten bindenden Antikörper. Auf den CDRs der leichten Kette könnte ein zweiter Mutageneseschritt durchgeführt werden und die erhaltene Bibliothek kann mit den ausgewählten Bindern der schweren Kette gemischt werden. Alternativ könnten alle CDRs gleichzeitig zufällig angeordnet werden, was zu Bibliotheken der schweren und der leichten Kette führt, welche anschließend kombiniert werden und einer Selektion gegen ein vorgewähltes Antigen unterworfen werden.

[0437] Die Beispiele 6 und 7 beschreiben daher ein Verfahren, das für die vorliegende Erfindung bei der Mutagenese der schweren und leichten komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) eines Immunglobulins von Relevanz ist, und ebenfalls dafür verwendbare Oligonukleotide beschreibt.

8. In-vitro-Selektion und Affinitätsreifung von Antikörpern aus einer naiven kombinatorischen Immunglobulinbibliothek

[0438] Ws wurde ein Ansatz für eine kombinatorische Immunglobulinbibliothek verwendet, um monoklonale Antikörper aus nicht-immunen adulten Mäusen zu erhalten, und dabei die Grundprinzipien zu begründen für (i) Erhalt des Zugangs zu naiven kombinatorischen Antikörperbibliotheken mit vorbestimmten Spezifitäten und (ii) Steigerung der Affinität der ausgewählten Antikörperbindungsstellen durch Zufallsmutagenese. Es wurde eine kombinatorische Fab-Bibliothek, die Fragmente der leichten Kette von Igμ und κ auf der Oberfläche von filamentösen Phagen exprimiert, aus dem Knochenmark nicht-immunsierter adulter Balb/c-Mäuse mit dem multivalenten Displayvektor pComb8 hergestellt, der in Beispiel 1b (i) hergestellt wurde. Phagen, die Fabs mit niedrigen Affinitäten aufweisen, die Bindungskonstanten von ungefähr 10^4 bis 10^5 M^{-1} spezifisch für Progesteron zeigen, wurden aus der Bibliothek mittels ihrer Fähigkeit isoliert, das Hapten zu binden. Es wurde eine Zufallsmutagenese der im monovalenten Phagendisplay pComb3 exprimierten Regionen der schweren und leichten Kette durch eine fehlerhafte PCR durchgeführt. Es wurden anschließend Klone mit einer verbesserten Affinität für Progesteron ausgewählt. Wie hier beschrieben, wurden daher Antikörper mit gewünschten Eigenschaften aus einer Nicht-Immunquelle ausgewählt und eine Affinitätsreifung durch Verwendung der Zwillingsvektoren pComb8 und pComb3 erreicht, was daher den Weg eröffnete, spezifische Antikörper aus einer generischen Bibliothek unter Umgehung der Immunisierung zu erhalten.

[0439] Die hier beschriebene Erfindung besitzt drei wesentliche Merkmale: (i) die Fähigkeit, anfänglichen Zugang zu Fabs niedriger Affinität aus einer naiven Bibliothek durch Verwendung eines multivalenten Phagenexpressionssystems zu erhalten, (ii) anschließende Affinitätsreifung durch einen fehlerbehaftete PCR und (iii) die Verwendung eines einzelkettigen Konstrukts während des Reifungsprozesses zur Vermeidung eines hohen Hintergrundes an künstlicher Bindung aufgrund des Verlustes der leichten Kette. Werden sie einzeln verwendet, ermöglichen diese Verfahren die Selektion und Affinitätsreifung von Antikörpern aus einer naiven Bibliothek.

a. RNA-Isolation und cDNA-Synthese

[0440] Es wurden drei nicht-immunisierte adulte männliche (6 Monate) Balb/cByJ-Mäuse (Scripps breeding colony) verwendet, um 5×10^7-Knochenmarkszellen in 4 % fötalem Kalbsserum in PBS herzustellen. Um auf Oberflächen IgG-positive Zellen hin zu depletieren, wurde die Präparation mit anti-Maus-IgG_{2b} aus Ratte (0,1 ml), anti-Maus-IgG aus Ziege (0,1 ml) und anti-Maus-IgG_{2b} aus Kaninchen (0,1 ml) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert, mit PBS gewaschen und in 9 ml PBS resuspendiert. Es wurde Kaninchenkomplement zugegeben (1 ml) und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert und Gesamt-RNA wurde, wie in Beispiel 2b beschrieben, isoliert. Die Gesamt-RNA wurde als Template für die cDNA-Synthese für μ- und κ-Ketten mit den folgenden Primern verwendet: Igμ, 5-ATTGGGACTAGTTTCTGCGACAGCTGGAAT-3' (SEQ ID NO. 151) (die Spe I-Restriktionsschnittstellensequenz ist unterstrichen) und κ,

5-GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCCTGTTGAA-3' (SEQ ID NO. 152) (die Xba I-Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen) unter Verwendung von SuperScript Kit (BRL).

[0441] Kurz beschrieben, werden 7 µg an Gesamt-RNA mit 60 pmol Primer gemischt, auf 70°C für 10 Minuten erhitzt und sofort auf Eis gekühlt. Zwei µl RNaseinhibitor, 10 µl 5x-Synthesepuffer, 8 µl dNTP-Mix (um eine Endkonzentration von 200 µM von jedem NTP zu erhalten), 5 µl 0,1 M DTT und 1 µl BRL SuperScript RT (200 U/µl) wurden zugegeben, und die Reaktion wurde auf 50 µl mit DEPC-behandeltem Wasser aufgefüllt. Man ließ die Reaktion bei Raumtemperatur für 10 Minuten und anschließend bei 42°C für 50 Minuten laufen. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 90°C für 5 Minuten und durch anschließendes Stellen auf Eis für 10 Minuten gestoppt, gefolgt von der Zugabe von 1 µl RNase H und Inkubation bei 37°C für 20 Minuten. Die PCR-Amplifikation wurde, wie in Beispiel 2 beschrieben, in einer 100 µl-Reaktionsmischung unter Verwendung von V_H 1–9 und dem µ-Kettenprimer für die schweren Ketten und V_L 3–7 und den κ-Kettenprimern für die leichten Ketten, wie in Tabelle 5 gezeigt, durchgeführt.

b. Die Konstruktion einer naiven Immunglobulin-µ/κ-Bibliothek

[0442] Die PCR-amplifizierte DNA der µ-Kette und κ-Kette wurde mit Xho I-Spe I und Sac I-Xba I gespalten. Die erhaltenen Xho I-Spe I-Fragmente der µ-Kette wurden in den in Beispiel 1b (i) hergestellten pComb8-Phagemidvektor zur Erzeugung einer µ-Ketten-cpVIII-Fusionsbibliothek insertiert. Die Transformation in E. coli-XL1-Blue und die Phagenerzeugung wurde im Wesentlichen, wie in Beispiel 6 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden die Sac I-Xba I-Fragmente der κ-leichten Kette in die Bibliothek der Fusion der schweren Kette F_dµ-cpVIII kloniert.

[0443] Eine kombinatorische Bibliothek aus 5 × 10^6-Mitgliedern wurde durch anschließende Klonierung der Fragmente der IgµF_d und κ-leichten Kette in dem pComb8-Vektor erzeugt, welcher die Funktion des Fd-Fragments der schweren Kette an cpVIII ermöglichte. Da die Fab-Antikörperfragmente eine hohe Kopienanzahl auf der Phagenoberfläche zeigten, wurde dieser Vektor ausgewählt, um Zugang zu Antikörpern mit niedriger Affinität zu erhalten, von welchen erwartet wird, dass sie in einem nicht-selektierten und unbehandelten Repertoire gefunden werden.

c. Selektion von Antikörpern niedriger Affinität. die für Progesteron spezifisch sind

[0444] Die oben hergestellten rekombinanten Phagemiden wurden in M13-Phagenpartikel gepackt und es wurden fünf Panning-Runden auf Progesteron-3-(o-carboxymethyl)-oxim-BSA-beschichteten ELISA-Vertiefungen, wie in Beispiel 6 beschrieben, durchgeführt. Kurz beschrieben, wurden Vertiefungen einer Mikrotiterplatte bei 4°C mit 50 µl 100 µg/ml Progesteron-3-(o-carboxymethyl)-oxim-BSA-Konjugat (Sigma #P4778) in PBS beschichtet. Die Vertiefungen wurden zweifach mit Wasser gewaschen und durch vollständiges Füllen mit 1 % (Gew.-%) BSA in PBS und Inkubieren der Platten bei 37°C für eine Stunde geblockt. Die Blocklösung wurde entfernt und es wurden 50 µl der Phagenbibliothek (typischerweise 10^{11} cfu) in PBS-BSA (0,1 Gew.-%) zu jeder Vertiefung zugegeben und die Platten für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Waschschritte, die Elution und die Multiplikation des Phagen wurden im Wesentlichen, wie in Beispiel 6a (i) beschrieben, durchgeführt.

[0445] Die nach der ersten und dritten Runde eluierten Phagen wurden auf die Expression von anti-Progesteron-Fabs durch das Übertragen von Bakterienkolonien, wie in Beispiel 2f beschrieben, analysiert. Die Kolonien wurden auf die Bindung von Progesteron mit einem Progesteron-3-(o-carboxmethyl)-oxim-HRP-Konjugat sondiert. Die Filter wurden unter Verwendung von 4-Chloronaphthol entwickelt. Man ließ Vorsicht walten, um Artefakte auszuschließen, die durch Phagemiden entstehen, welche die Igµ$F_d$cpVIII-Fusion ohne eine korrespondierende leichte Kette exprimieren. Diese Phagen, die lediglich die schwere Kette besitzen, reagierten unspezifisch mit nicht-verwandten Antigenen, wie beispielsweise BSA, HRP, Lysozym aus Hühnereiern, vermutlich aufgrund des hydrophoben Bereichs, der sich auf einer ungepaarten schweren Kette zeigt.

[0446] Es wurden diejenigen Kolonien weiter untersucht, die das stärkste Signal im Westernblot zeigten, und es wurden drei Klone, PgA11, PgB6 und PgF1, für die weitere Analyse ausgewählt. Die ersten zwei entstammen der ersten Panning-Runde, und der letztgenannte wurde nach der dritten Selektionsrunde isoliert. Alle drei Fabs, die in ihrer löslichen Form hergestellt wurden, wie in Beispiel 6c2) beschrieben, banden spezifisch an Progesteron-3-(o-carboxymethyl)-oxim-BSA und Progesteron-11a-hemisuccinyl-BSA. Weiterhin zeigten alle drei Fab's eine signifikante Kreuzreaktivität gegen ein Epitop auf Cytochrom C. Ihre scheinbaren Bindungskonstanten für Progesteron-3-(o-carboxymethyl)-oxim-BSA wurden mit 10^4 M^{-1} für PgA11, und 3 × 10^4 M^{-1} und 10^5 M^{-1} für PgF1 und PgB6 bestimmt. Diese Bindungskonstanten lagen sehr weit unter dem, was für anti-Progesteron-nukleonale Antikörper mit Affinitäten von 2 bis 5 × 10^8 M^{-1} beschrieben wurde. Die Klone PgB66 und

PgF1 verwendeten die gleiche Kombination eng miteinander verwandter V_H- und V_L-Gene. Ihre beiden V_H-Gene waren mit zwei engverwandten, jedoch unterschiedlichen Keimbahn-Genen ohne ein Anzeichen einer somatischen Mutation identisch, wie man es für ein naives Repertoire erwarten würde. Die naiven Keimbahn-Gen(e) sind für ihre engverwandten V_L-Gene noch nicht bekannt. Da beide V_H-Gene sich zu unterschiedlichen D- und J-Segmenten verbunden haben, können die Klone PgB6 und PgF1 nicht den gleichen Ursprung besitzen, jedoch müssen diese aus zwei unabhängigen Klonierungsereignissen ausgewählt worden sein, was in Richtung einer möglichen Bedeutung dieser besonderen Kombination für die Progesteronbindung deutet. Die durch PgA11 verwendeten V_L- und V_H-Gene sind mit den anderen zwei Klonen nicht nahe verwandt.

[0447] Dies zeigt also, dass durch Verwendung eines multivalenten Displayvektors Fab's aus naiven kombinatorischen Bibliotheken mit Affinitäten isoliert werden können, die mit solchen vergleichbar sind, die mit der primären Immunantwort auf Haptene, wie beispielsweise Phosphorylcholin und Nitrophenol, beobachtet werden. Der Ansatz mit der kombinatorischen Bibliothek kann daher zur Kombinationen von V-Genen oder einem V-Gen führen, welche in vivo nicht selektiert worden wären.

d. Affinitätsreifung durch PCR-gerichtete Mutagenese

[0448] Um das Verfahren der somatischen Mutation zu imitieren, welche zum Selektieren von Antikörpern mit einer höheren Affinität führt, wurden Zufallsmutationen von sowohl den V_L- wie auch den V_H-Regionen erzeugt und anschließend Antikörper mit einer gesteigerten Affinität für das Haptenprogesteron selektiert. Um die Mutation mittels einer fehlerbehafteten PCR spezifisch und lediglich auf die V-Regionen zu richten, wurde ein einzelsträngiges Fusionsplasmid Fv-cpIII in einem pComb2-3-Phagemidvektor konstruiert, welcher „in-frame"-Fusionen der folgenden Elemente enthielt: die pelB-Leitsequenz zur Sekretion, die V_H- und V_L-Leserahmen, welche mit einem synthetischen Oligonukleotid verknüpft waren, das für ein, wie in Beispiel 6a diskutiertes, flexibles Peptid kodiert, und der cpIII-Rest. Die Verwendung eines einzelkettigen Vektors beseitigt weiterhin die Schwierigkeiten aufgrund unerwünschter Selektion von nichtspezifischer Bindung durch Phagen, welche lediglich die schweren Ketten von Ig exprimieren.

[0449] Zur Herstellung einer einzelkettigen Fusion der schweren und leichten Ketten (genannt F_V)- mit dem Membran-Anker cpIII wurde das in Beispiel 1b (ii) hergestellte Plasmid pComb2-3, welches lediglich eine Spe I-Restriktionsschnittstelle besitzt, mit den Restriktionsendonukleasen Xba I und Nhe I verdaut und erneut ligiert, wodurch die Klonierungskassette der leichten Kette eliminiert wurde. Es wurden ein synthetischer DNA-Linker, welcher eine 15 Aminosäuren lange Verbindungssequenz kodiert, die aus zwei Oligonukleotiden besteht, einem 5'-antisense-Primer, der die Nukleotidsequenz 5'-TCGAGAAAGTCTCTAGAGGTAAATCTTCTGGTTCTGGTTCCGAATCTAAATCTACT GAGCTCAAAGTCA-3' (SEQ ID NO. 153) und ein 3'-sense-Primer, der die Nukleotidsequenz 5'-CTAGTGACTTTGAGCTCAGTAGATTTAGATTCGGAACCAGAACCAGAAGATTTACCTCTA-GAGACTTTC-3 (SEQ ID NO. 154) besitzt, in den Xho I-Spe I-verdauten, verkürzten pComb2-3-Vektor zur Bildung des Phagemids ScpComb2-3 insertiert. Die interne Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen Xba I (TCTAGA) und Sac I (GAGCTC) sind unterstrichen. Die V_H- und V_L-Segmente der Progesteronbinder wurden anschließend durch PCR, wie in Beispiel 2g, in zwei getrennten Reaktionen amplifiziert.

[0450] In der ersten PCR-Amplifikation wurden die Primer, die zur oben aufgelisteten SEQ ID NO. 153 korrespondieren und das Oligonukleotid, das die Nukleotidsequenz 5'-ATTTGGGAAGGACTGTCTAGATGMRGAGAC-3' (SEQ ID NO. 155) besitzt, wobei M entweder A oder C und R entweder A oder G ist, zur Amplifikation des Fragmentes der schweren Kette verwendet. Das Fragment der leichten Kette wurde getrennt davon mit dem oben aufgelisteten zu SEQ ID NO. 154 korrespondierenden Primer und dem Oligonukleotid amplifiziert, das die Nukleotidsequenz 5'-GAGGACTAGTTACAGTTGGTGCAGCATCAG-3' (SEQ ID NO. 156) besitzt. Die interne Erkennungssequenz für Xba I (TCTAGA) und Spe I (ACTAGT) sind unterstrichen. Die V_H- und V_L-PCR-Fragmente wurden mit Xho I-Xba I und Sac I-Spe I verdaut und anschließend in ScpComb2-3 eingefügt.

e. Expression und Detektion von löslichen Fab's und einzelkettigen Fusionsantikörpern, die spezifisch für Progesteron sind

[0451] Zur Erzeugung von Fab wurde derjenige Anteil für das Gen VIII in Phagemiden, der die Progesteronbinder PgA11, PgB6 und PgF1 kodiert, mit den Restriktionsendonukleasen Spe I und EcoR I ausgeschnitten und anschließend durch einen synthetischen Linker ersetzt, der ein TAA-Stoppkodon (unterstrichen) kodiert. Der Linker wurde durch die Oligonukleotide 5'-CTAGTTAACTGAGTAAG-3' (SEQ ID NO. 157) und 5'-AATTCTTACTCAGTTAA-3' (SEQ ID NO. 158) gebildet. Die Erzeugung und Detektion eines Antikörper-Fab-Fragmen-

tes wurde im Wesentlichen wie in Beispiel 6c2) durchgeführt, mit der Ausnahme, dass die E. coli-Zellen durch drei Einfrierungs- und Auftauzyklen aufgebrochen wurden. Zur Erzeugung von löslichen Antikörperfragmenten wurden die V_H-Linker-V_L-Fusionen aus dem ScpComb2-3-Phagemid mit Xho I und Spe I ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pTAC01 (Pharmacia) subkloniert, welcher ein Derivat von pF1260 darstellt. Der pTAC01-Vektor besitzt den induzierbaren tac-Promotor, die pelB-Leitsequenz zur Sekretion und ermöglicht eine „in-frame"-Fusion des eingefügten einzelkettigen Fusionskonstruktes mit einer, wie in Beispiel 1a beschriebenen, Dekapeptidsequenz als Marker für eine immunchemische Detektion. Die Expression und Detektion der einzelkettigen Fusionsantikörperfragmente wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt, mit der Ausnahme, dass ein an alkalische Phosphatase konjugierter Antidekapeptid-Antikörper für das ELISA verwendet wurde.

[0452] Drei einzelkettige Fusionsklone wurden anhand des Screeningprotokolls selektiert und ScpComb2-3-PgF1, -PgB6 und -PgA11 genannt. Diese erhaltenen Plasmide wurden anschließend einer fehlerbehafteten PCR-Mutagenese, wie unten beschrieben, unterworfen.

f. Gerichtete Mutagenese der schweren und leichten Ketten mittels fehlerbehafteter PCR

[0453] Es wurden gleiche Mengen von den oben hergestellten unverdauten PgF1-, PgB6- und PgA11 ScpComb2-3-Plasmiden zugegeben und seriell verdünnt. Aliquots von 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng und 0,01 ng der Mischungen wurden getrennt voneinander 35 Cyclen (1 Minute bei 94°C, 2 Minuten bei 50°C, 1 Minute bei 72°C) einer Amplifikation unter den folgenden Reaktionsbedingungen unterworfen: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 6,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM $MnCl_2$, 0,01 % Gelatine, 0,1 % Triton X-100, 1 mM von jeweils dCTP, dGTP, dTTP, 0,2 mM dATP, 0,1 mM dITP, unter Verwendung des reversen Sequenzierungsprimers M 13, 5'-AACAGCTATGACCATG-3' (SEQ ID NO. 159), und eines rückwärtsgerichteten Primers, der zu dem cpI-II-Rest komplementär ist, 5'-GACAGGAGGTTGAGGCAGGT-3' (SEQ ID NO. 160) bei 100 mM. Das grundlegende Verfahren einer fehlerbehafteten PCR wurde ursprünglich durch Leung et al., J. Methods Cell. Mol. Biol., 1: 11–15 (1989) beschrieben. Die zu mutagenisierende DNA-Region wurde mit Hilfe einer PCR unter solchen Bedingungen amplifiziert, die die Genauigkeit der DNA-Synthese mit der Taq-DNA-Polymerase reduzierte. Wie durch Leung et al., supra, gezeigt, führten die Konzentrationen der Reagenzien $MnCl_2$ und dATP, die in den PCR-Amplifikationen verwendet wurden, zu einer Mutationshäufigkeit von 1 % und 1,4 %. Die Mutationshäufigkeit stieg daher mit einem Abfall der dATP-Konzentration an.

[0454] Die PCR-Reaktionen aller Verdünnungen des Templates wurden vereinigt und mit Phenol vor dem Verdau mit Xho I und Spe I behandelt. Die über ein Gel aufgereinigten und verdauten PCR-Fragmente wurden in das mit Xho I-Spe I-verdaute ScpComb2-3-Plasmid zurückligiert. Die Ligationsprodukte wurden einer Elektroporese in E. coli-XL1-Blue unterworfen, was zu 10^6-Transformanten führte. Die anschließenden Schritte der Phagenerzeugung und des Pannings wurden, wie in Beispiel 6 beschrieben, durchgeführt, mit der Ausnahme, dass der Phage einem Panning in der Abwesenheit von BSA unterzogen wurde.

[0455] Es wurde daher eine Bibliothek mutierter einzelkettiger anti-Progesteron-Phagemidantikörper erstellt und einer Panningprozedur mit Progesteron-3-(o-carboxymethyl)-oxim-BSA unterworfen, und die Anzahl von eluierten cfu wurde als Wert für die relative Affinität des dargestellten einzelkettigen Antikörpers zum Hapten verwendet. Nach der dritten Panning-Runde wurde ein 50- bis 100-facher Anstieg in der Ausbeute des eluierten Phagemids relativ zur nicht-mutierten Population beobachtet. Die individuellen Mutanten zeigten einen 10- bis 300-fachen Anstieg in der Ausbeute nach der Panningprozedur im Vergleich zu den Ausgangsklonen, was andeutet, dass die Mutanten Antikörperbindungsstellen mit einer gesteigerten Affinität kodierten. Die vier besten Mutanten, ScPgB6-1, -2, -3 und -4 genannt, wurden für die Bestimmung ihrer Affinität in Bezug auf das Hapten-Konjugat und für eine Sequenzanalyse ausgewählt.

g. Bestimmung der Affinität mutagenisierter einzelkettiger Fusions-anti-Progesteron-Antikörper

[0456] Die Bindungskonstanten der löslichen Antikörperfragmente, die aus den vier besten Mutanten hergestellt wurden, ScPgB6-1, -2, -3 und -4, wie oben ausgewählt, wurden mittels kompetitiven ELISA bestimmt, wie in Beispiel 6c2) beschrieben. Kurz formuliert, wurden Vertiefungen einer Mikrotiterplatte bei 4°C mit 50 µl von 100 µg/ml Progesteron-3-(o-carboxymethyl)-oxim-BSA-Konjugat in PBS beschichtet. Die Vertiefungen wurden zweimal mit Wasser gewaschen und mit 1 Gew.-% BSA in PBS bei 37°C für eine Stunde geblockt. Fab oder einzelkettige Fusionsüberstände wurden mit Progesteron-3-(o-carboxymethyl)-oxim-BSA in PBS-BSA (0,1 Gew.-%) gemischt und in den Vertiefungen bei 37°C für zwei Stunden inkubiert. Die Platten wurden mit PBS-Tween (0,05 Vol.-%) gewaschen und ein Konjugat aus anti-Maus-κ-Kette aus Ziege mit alkalischer Phosphatase (Southern Biotech) oder monoklonale anti-Dekapeptid-Antikörper aus Maus, die mit alkalischer Phos-

phatase konjugiert wurden, wurden zugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden wie zuvor gewaschen und es wurde Substrat zugegeben (0,1 ml, p-Nitrophenylphoshat bei 1 ml/ml in 0,1 M Tris, pH 9,4, enthaltend 50 mM $MgCl_2$). Nach Inkubation bei 25°C für 60 bis 180 Minuten wurde die Absorption bei 405 nm bestimmt. Es wurden scheinbare Affinitäten als reziproke Werte der Haptenkonzentration bestimmt, die zur Inhibition von 50 % der maximalen Bindung in einem kompetitiven ELISA benötigt wurde. Dies war eine gute Annäherung an die Affinität und ermöglichte eine Einteilung der Bindungsaktivitäten.

[0457] Die Affinität der mutierten Sc-Antikörper zu Progesteron-3-(o-carboxymethyl)-oxim-BSA, wie sie mittels kompetitiver ELISA bestimmt wurde, stieg für ScPgB6-1 um ein 30-faches gegenüber dem parenteralen ScPgB6-Antikörper an, und ungefähr auf ein 13-faches für sowohl ScPgB6-3 wie auch ScPgB6-4. Interessanterweise zeigte der Klon mit den wenigsten Mutationen die höchste Affinität. Das Kreuzreaktivitätsmuster für die mutierten Sc-Antikörper änderte sich nicht, mit der Ausnahme, dass ScPgB6-1 den größten Teil seiner Reaktivität gegenüber Cytochrom C verloren hat. In ausführlichen Untersuchungen von Immunantworten auf Haptene konnte ein Anstieg der Affinität um eine Größenordnung spezifischen einzelnen Aminosäureaustauschen zugeordnet werden, was nahe legt, dass lediglich ein oder zwei Aminosäurenaustausche an der Kombinierungsstelle der Sc-anti-Progesteronantikörper deren Affinitätssteigerung zum Haptenkonjugat begründen. Da kein Mutant mit lediglich einem einzelnen Aminosäureaustausch gewonnen wurde, konnte der kritische Rest/die kritischen Reste nicht identifiziert werden, welche die gesteigerte Affinität zum Haptenkonjugat verursachten. Weiterhin wurden keine in allen dreien mutanten gemeinsam auftretenden Aminosäureaustausche beobachtet, was nahe legt, dass die Änderung von verschiedenen Resten die Affinitätssteigerung in Bezug auf 3'-(O-carboxymethyl)-progesteron bedingen kann. Ein Austausch von Ser_{64} zu Pro_{64} in V_H-CDR2 ist für die Mutanten ScPgB6-3 und ScPgB6-4 üblich. Obwohl beide Mutanten eine ähnliche Affinität zum Haptenkonjugat aufwiesen, konnte keine eindeutige Abschätzung der Wichtigkeit dieses Restes für die Antigenbindung durchgeführt werden, da in den V_L- und V_H-Regionen der beiden Mutanten multiple Aminosäureaustausche auftraten.

h. Nukleinsäuresequenzierung

[0458] Die vollständigen Nukleotidsequenzen der variablen Regionen der schweren und leichten Ketten wurden unter Verwendung van Sequenase 2.0 (United States Biochemical) aus doppelsträngiger DNA bestimmt. Die DNA-Sequenzierung ergab, dass alle vier mutierten Klone, ScPgB6-1, -2, -3 und -4, die aus ScPgB6 stammten, mit ScPgB6-1 und ScPgB6-2 identisch sind. Der prädominante Mutationstyp, der mit Hilfe dieses PCR-Protokolls erhalten wurde, war ein A-G/T-C-Nukleotidaustausch (68 %), während T-G/A-C-, G-A/C-T-, T-A/A-T-, G-C/C-G- oder C-A/G-T-Austauscher mit etwa der gleichen Häufigkeit auftraten. Es wurden DNA-Sequenzen mit einer höheren als üblichen Mutationshäufigkeit beobachtet, d.h. Hotspots der Mutation. Weiterhin unterschieden sich die drei mutierten Klone in der Anzahl der Basenpaaraustausche. Die Mutationshäufigkeit sowohl in den V_H- wie auch den V_L-Regionen wurde mit 1,5 % für ScPgB6-1, 2,1 % für ScPgB6-3 und 4,1 % für ScPgB6-4 bestimmt, was zu multiplen Aminosäureaustauschen in den CDRs und den Gerüstregionen der Mutanten führte.

[0459] Zusammengefasst ist die Erfindung für die Selektion und Affinitätsreifung von spezifischen Antikörpern für ein Hapten aus einer naiven Bibliothek verwendbar. Obwohl das In-vitro-Selektions- und Mutagenesesystem im Vergleich zur Komplexität des Immunsystems vergleichsweise einfach ist, gibt es einige gemeinsame Merkmale: (i) die Affinität von Antikörpern, die aus einer naiven kombinatorischen Bibliothek ausgewählt wurden, kann die gleiche Größenordnung erreichen wie die der Antikörper aus einer primären Immunantwort auf Haptene; (ii) obwohl die Mechanismen zur Erzeugung von Mutationen in vivo oder in vitro unterschiedlich waren, wurden Hotspots der Mutation beobachtet; (iii) der Anstieg der Affinität nach einer Mutationsrunde und die Selektion in vitro liegt in der gleichen Größenordnung wie für den Übergang von primären zu sekundären Immunantworten auf Haptene beobachtet; und (iv) es wurde eine mutierte Antikörperkombinierungsstelle mit einer veränderten Crossreaktivität gewonnen, wie dies gelegentlich in vivo beobachtet wird.

[0460] Als der kombinatorische Antikörperansatz zuerst dahingehend beschrieben wurde, ob dieser als Einstieg in das in vivo ausgedehnte Antikörperrepertoire verwendet werden könnte, war dies fragwürdig. Die vorliegende Erfindung zeigt, dass Kombinationen von Antikörperketten zugänglich sein und entwickelt werden können, welche in vivo nie selektiert werden können. Es scheint daher, als ob es möglich ist, die Vielfältigkeit der Antikörperantwort in vivo durch molekulare Klonierungsverfahren zu erweitern.

SEQ ID NO 17

5'

Ala Glu Gly Asp Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asn Ser Leu

Gln Ala Ser Ala Thr Glu Tyr Ile Gly Tyr Ala Trp Ala Met

Val Val Val Ile Val Gly Ala Thr Ile Gly Ile Lys Leu Phe

Lys Lys Phe Thr Ser Lys Ala Ser

SEQ ID NO 99

5'

GGCCGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACG

GCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGGTGAAA

CTGCTCGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACC

TGCTCTGTCACTGACTACTCCATCACCAGTGCTTATTACTGGAACTGGATCCGG

CAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAATGGATGGGCTACATAAGCTACGACGGTGTC

AATAAGTATGATCCATCTCTCAAGAATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCT

AACAATCAGTTTTTCCAGAAGTTGATTTCTGTGACTTCTGAGGACACAGGAACA

TATGACTGTTCAAGAGGGACTAGGGCCTCTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGA

ATTTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTG

GCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTC

AAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCC

AGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGC

AGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAAC

GTTGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGAT

TGTACTAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAA

SEQ ID NO 100

5'

TGAATTCTAAACTAGTCGCCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACG

GCAGCCGCTGGATTGTTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCGAGCTCCAGATGAC

CCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCACATGTC

GATCAAGTGAGAATATTACAATTACT

SEQ ID NO 101

5'

CTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCT

GGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACTACAATGT

CAAGGGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTG

ATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAG

GACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGATGCCACTCACAAGACATCAAC

TTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAATTCTAGACGGCGC

SEQ ID NO 102

5'

GCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGAC

CGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTCGGCGCAACTATCG

GTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGC

SEQ ID NO 111

5'

GTGCCCAGGGATTGTACTAGTGCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAA

CTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTG

TCATTGTCGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCA

AGCTGATAGAATTCGAGT

SEQ ID NO 112

5'

CCATTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAA

CCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCT

GAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGA

GGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATG

GCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTA

CAGTCTGACGCTAAAGGCAAACTTGATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGCT

GCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGT

GCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGAC

GGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTC

CCTCAATCGGTTGAATGTCGCCCTTTTGTCTTTAGCGCTGGTAAACCATAT

GAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATTCGGTGTCTTTGCGTTT

CTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATA

CTGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTTTGGGTATTCCGTTAT

TAT

SEQ ID NO 113

5'

GAGACGACTAGTGGTGGCGGTGGCTCTCCATTCGTTTGTGAATATCAAGGC

CAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGC

TCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGC

GGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGT

TCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATG

ACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACTT

GATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGAC

GTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCT

AATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAAT

AATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTCGCCCT

TTTGTCTTTAGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAA

ATAAACTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTT

ATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAA

TCATGCCAGTTCTTTTGGGTATTCCGTTATTATGCTAGCTAGTAA

SEQ ID NO 114

5'

TATGCTAGCTAGTAACACGACAGGTTTCCCGACTGG

AAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGT

TAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTT

ATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC

GGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCAT

GATTACGAATTCGAGCTCGGT

SEQ ID NO 115

5'

AGGTCCAGCTTCTCGAGTCTGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCT

CTCACCTGCTCTGTCACTGACTACTCCATCACCAGTGCTTATTACTGGAACTGGAT

CCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAATGGATGGGCTACATAAGCTACGACGGTG

TCAATAAGTATGATCCATCTCTCAAGAATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCT

AACAATCAGTTTTTCCAGAAGTTGATTTCTGTGACTTCTGAGGACACAGGAACATA

TGACTGTTCAAGAGGGACTAGGGCCTCTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAATTT

CAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCT

GGATCTGCTGCCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTA

TTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGC

ACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACT

GTCCCCTCCAGCCCTCGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCACCCGGC

CAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTACTAGTGCTGAGG

GTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATAT

ATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTCGGCGCAACTATCGGTATCAA

GCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAGAATTCGAGT

SEQ ID NO 116

5'

ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCC

AACCAGCCATGGCCCAGGTGAAACTGCTCGAGATTTCTAGACTAGTGCTGAG

GGTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCG

AATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTCGGCGCAACTAT

CGGTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAGAATTCG

SEQ ID NO 117

5'

GTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCG

CAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTGCTTT

CTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAA

TCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC

CAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATA

GACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACT

CTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGA

TTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGAT

TTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTA

AA

Patentansprüche

1. Ein filamentöser Phage, der ein Genom einkapselt, das erste und zweite Polypeptide kodiert, die geeignet sind, einen Liganden-bindenden heterodimeren Rezeptor zu bilden, wobei das erstes Polypeptid von einer aminoterminalen, prokaryotischen Sekretionssignal-Domäne und einer carboxyterminalen cpIII-Membran-Ankerdomäne filamentöser Phagen flankiert ist, und das zweite Polypeptid an eine aminoterminale, prokaryotische Sekretionssignal-Domäne fusioniert ist.

2. Der filamentöse Phage nach Anspruch 1, wobei der Rezeptor ein Epitop-Bindungskomplex ist.

3. Ein filamentöser Phage nach Anspruch 1, wobei das erste Polypeptid ein V_H-Polypeptid ist, das mehr als 60 Aminosäurereste und weniger als 125 Aminosäurereste aufweist, und das zweite Polypeptid ein V_L-Poypeptid ist, das mehr als 60 Aminosäurereste und weniger als 125 Aminosäurereste aufweist.

4. Der filamentöse Phage nach Anspruch 1 oder Anspruch 3, wobei der Phage nachweisbar markiert ist.

5. Ein Liganden-bindender heterodimerer Rezeptor, der erste und zweite Polypeptide umfasst, wobei das erste Polypeptid an eine carboxyterminale cpIII-Membran-Ankerdomäne filamentöser Phagen fusioniert ist.

6. Der Rezeptor nach Anspruch 5, wobei der Rezeptor ein Epitop-Bindungskomplex ist.

7. Der Rezeptor nach Anspruch 6, wobei das erste Polypeptid eine schwere Polypeptidkette eines Antikörpers ist, und das zweite Polypeptid eine leichte Polypeptidkette eines Antikörpers ist.

8. Der Rezeptor nach Anspruch 6, wobei das erste Polypeptid eine leichte Kette eines Antikörpers ist, und das zweite Polypeptid eine schwere Kette eines Antikörpers ist.

9. Ein Liganden-bindender heterodimerer Rezeptor, der erste und zweite Polypeptide umfasst, wobei eins der ersten und zweiten Polypeptide ein V_H-Polypeptid ist, das mehr als 60 Aminosäurereste und weniger als 125 Aminosäurereste aufweist, und das andere der ersten und zweiten Polypeptide ein V_L-Polypeptid ist, das mehr als 60 Aminosäurereste und weniger als 125 Aminosäurereste aufweist, und wobei eins der ersten und zweiten Polypeptide an eine carboxyterminale Membran-Ankerdomäne filamentöser Phagen fusioniert ist.

10. Der Rezeptor nach Anspruch 9, wobei der Membran-Anker filamentöser Phagen der cpVIII-Membran-Anker ist.

11. Der Rezeptor nach Anspruch 10, wobei der Membran-Anker filamentöser Phagen eine Aminosäurese-

quenz aufweist, die durch die Reste 1 bis 50 in der Formel in SEQ ID NO. 17 bestimmt ist.

12. Der Rezeptor nach Anspruch 9, wobei der Membran-Anker filamentöser Phagen der cpIII-Membran-Anker ist.

13. Der Rezeptor nach Anspruch 5 oder Anspruch 12, wobei der Membran-Anker filamentöser Phagen eine Aminosäuresequenz aufweist, die durch die Reste 28 bis 663 der in SEQ ID NO. 113 gezeigten Nukleotidsequenz, kodiert ist.

14. Ein Vektor zur Expression eines Fusionspolypeptids, wobei der Vektor stromaufwärts und stromabwärts translatierbare DNA-Sequenzen umfasst, die operativ an eine Nukleotidsequenz geknüpft sind und für eine gerichtete Ligation einer einzufügenden DNA geeignet sind, wobei die stromaufwärts Sequenz ein prokaryotisches Sekretionssignal kodiert, die stromabwärts Sequenz einen Membran-Anker filamentöser Phagen kodiert, die translatierbaren DNA-Sequenzen operativ an einen Satz an DNA-Expressionssignalen für eine Expression der translatierbaren DNA-Sequenzen als Teil des Fusionspolypeptids geknüpft sind, und wobei der Vektor weiter eine zweite, stromaufwärts translatierbare DNA-Sequenz umfasst, die ein prokaryotisches Sekretionssignal kodiert, operativ an eine Nukleotidsequenz geknüpft, die für eine gerichtete Ligation einer zweiten einzufügenden DNA geeignet ist, wobei die zweite translatierbare DNA-Sequenz operativ an einen Satz an DNA-Expressionssignalen für eine Expression der zweiten translatierbaren DNA-Sequenzen als Teil eines zweiten Fusionspolypeptids geknüpft ist.

15. Der Vektor nach Anspruch 14, wobei das prokaryotische Sekretionssignal ein pelB-Sekretionssignal ist.

16. Der Vektor nach Anspruch 15, wobei das pelB-Sekretionssignal eine Aminosäuresequenz aufweist, die durch eine Formel wiedergegeben ist, ausgewählt aus einer Gruppe, bestehend aus:
(a) SEQ ID NO 5,
(b) SEQ ID NO 6 und
(c) SEQ ID NO 7.

17. Der Vektor aus Anspruch 14, wobei der Membran-Anker filamentöser Phagen dem Membran-Anker gemäß einem der Ansprüche 10–12 entspricht.

18. Der Vektor aus Anspruch 17, wobei der Membran-Anker filamentöser Phagen die Aminosäuresequenz aufweist, die durch die Basen 28 bis 663 der Nukleotidsequenz, die in SEQ ID NO. 113 gezeigt ist, kodiert wird.

19. Der Vektor nach Anspruch 14, der weiter einen Replikationsursprung filamentöser Phagen umfasst.

20. Der Vektor nach Anspruch 14, wobei der Satz an Expressionssignalen einschließt: einen Promotor, eine ribosomale Bindungsstelle und mindestens ein Stop-Kodon im Leseraster mit der stromabwärts translatierbaren DNA-Sequenz.

21. Der Vektor nach Anspruch 14, wobei der Vektor eine Nukleotidsequenz aufweist, die von der Base 1 bis Base 259 reicht, wie in der SEQ ID NO. 116 gezeigt.

22. Der Vektor nach Anspruch 14, wobei der Vektor eine Nukleotidsequenz aufweist, die durch die Basen 36 bis 118 in der Formel in SEQ ID NO. 3 bestimmt ist.

23. Ein Polypeptid, das aus einem Liganden-bindenden Rezeptor-Polypeptid besteht, das operativ an das carboxyterminale Ende einer cpIII-Membran-Ankerdomäne filamentöser Phagen geknüpft ist.

24. Das Polypeptid nach Anspruch 23, wobei das Polypeptid eine variable Polypeptidkette eines Antikörpers ist.

25. Das Polypeptid aus Anspruch 24, wobei die variable Kette eine schwere Polypeptidkette eines Antikörpers ist.

26. Ein V_H- oder V_L-Polypeptid, das mehr als 60 Aminosäurereste und weniger als 125 Aminosäurereste aufweist, wobei es operativ an das carboxyterminale Ende einer Membran-Ankerdomäne filamentöser Phagen geknüpft ist.

27. Eine Bibliothek filamentöser Phagenpartikel, wobei jedes Phagenpartikel einen DNA-Expressionsvektor gemäß Anspruch 14 enthält.

28. Die Bibliothek nach Anspruch 27, wobei die Bibliothek mindestens 10^7 verschiedene Spezies der DNA-Expressionvektoren enthält.

29. Eine Bibliothek filamentöser Phagenpartikel, wobei jedes Phagenpartikel mindestens einen Liganden-bindenden heterodimeren Rezeptor gemäß Anspruch 5 enthält.

30. Eine Bibliothek filamentöser Phagenpartikel, wobei jedes Phagenpartikel mindestens einen Liganden-bindenden heterodimeren Rezeptor enthält, der erste und zweite Polypeptide umfasst, wobei das erste Polypeptid an eine carboxyterminale Membran-Ankerdomäne filamentöser Phagen fusioniert ist, und die Bibliothek mindestens 10^5 verschiedene Rezeptoren exprimiert.

31. Ein Verfahren zur Herstellung einer Bibliothek bicistronischer DNA-Moleküle, wobei jedes bicistronische DNA-Molekül erste und zweite Cistrone zur Expression erster und zweiter Polypeptide eines heterodimeren Rezeptors auf der Oberfläche eines filamentösen Phagens enthält, wobei das Verfahren umfasst:
(a) die Bildung einer ersten Ligationsmischung durch Kombination in einem Ligationspuffer von:
i. einem Repertoire erster Polypeptidgene in Form von linearer dsDNA, wobei jedes kohäsive Enden für eine gerichtete Ligation aufweist und
ii. eine Vielzahl an DNA-Expressionsvektoren in linearer Form, wobei jeder Vektor stromaufwärts und stromabwärts gelegene erste kohäsive Enden aufweist, die (a) für ein gerichtetes Aufnehmen eines der ersten Polypeptidgene in einem üblichen Leseraster geeignet sind und (b) operativ an die jeweiligen stromaufwärts und stromabwärts translatierbaren DNA-Sequenzen geknüpft sind, wobei die stromaufwärts translatierbaren DNA-Sequenzen ein prokaryotisches Sekretionssignal kodieren, die stromabwärts translatierbaren DNA-Sequenzen einen Membran-Anker filamentöser Phagen kodieren und die translatierbaren DNA-Sequenzen an die jeweiligen stromaufwärts und stromabwärts gelegenen DNA-Expressions-Kontrollsequenzen operativ geknüpft sind; und
(b) die Mischung Ligationsbedingungen für eine Zeitdauer aussetzen, die ausreichend ist, um die ersten Polypeptidgene operativ an die Vektoren zu verknüpfen und eine Vielzahl an zirkulären DNA-Molekülen herzustellen, wobei jedes ein erstes Cistron zur Expression des ersten Polypeptids aufweist;
(c) die Herstellung einer Vielzahl an DNA-Expressionvektoren in linearer Form, wobei jeder lineare Vektor zweite stromaufwärts und stromabwärts gelegene kohäsive Enden aufweist,
i. geeignet für ein gerichtetes Aufnehmen von einem Polypeptidgen aus einem Repertoire an zweiten Polypeptidgenen in einem üblichen Leseraster und
ii. operativ an die jeweiligen stromaufwärts und stromabwärts gelegenen translatierbaren DNA-Sequenzen geknüpft, wobei die stromaufwärts gelegene translatierbare DNA-Sequenz eine translatierbare Sequenz darstellt, die ein prokaryotisches Sekretionssignal kodiert, die stromabwärts gelegene DNA-Sequenz mindestens ein Stop-Kodon in dem Leseraster aufweist, die translatierbare DNA-Sequenz operativ an eine DNA-Expression-Kontrollsequenz geknüpft ist, dadurch, dass eine Vielzahl an zirkulären DNA-Molekülen endonukleolytischen Bedingungen ausgesetzt wird, die ausreichend sind, um die zirkulären DNA-Moleküle zu spalten und die zweiten kohäsiven Enden zu bilden;
(d) die Bildung einer zweiten Ligationsmischung durch Kombination in einem Ligationspuffer von:
i. einer Vielzahl an DNA-Expressionvektoren, gebildet in Schritt (c), und
ii. einem Repertoire an zweiten Polypeptidgenen in Form von dsDNA, wobei jede kohäsive Enden aufweist, die für eine gerichtete Ligation an die Vielzahl linearer DNA-Vektoren geeignet sind, und
(e) die zweite Mischung Ligationsbedingungen für eine Zeitdauer aussetzen, die ausreichend ist, um die zweiten Polypeptidgene operativ an die Vektoren zu verknüpfen und eine Vielzahl an zirkulären DNA-Molekülen herzustellen, wobei jedes zweite Cistrone zur Expression der zweiten Polypeptide aufweist, und somit die Bibliothek gebildet wird.

32. Das Verfahren aus Anspruch 31, wobei der heterodimere Rezeptor ein Epitop-Bindungskomplex ist.

33. Eine Bibliothek bicistronischer DNA-Moleküle, wobei jedes erste und zweite Cistrone enthält, die geeignet sind, erste und zweite Polypeptide eines heterodimeren Rezeptors auf der Oberfläche eines filamentösen Phagens zu exprimieren, und die Bibliothek gemäß des Verfahrens in Anspruch 31 hergestellt ist.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

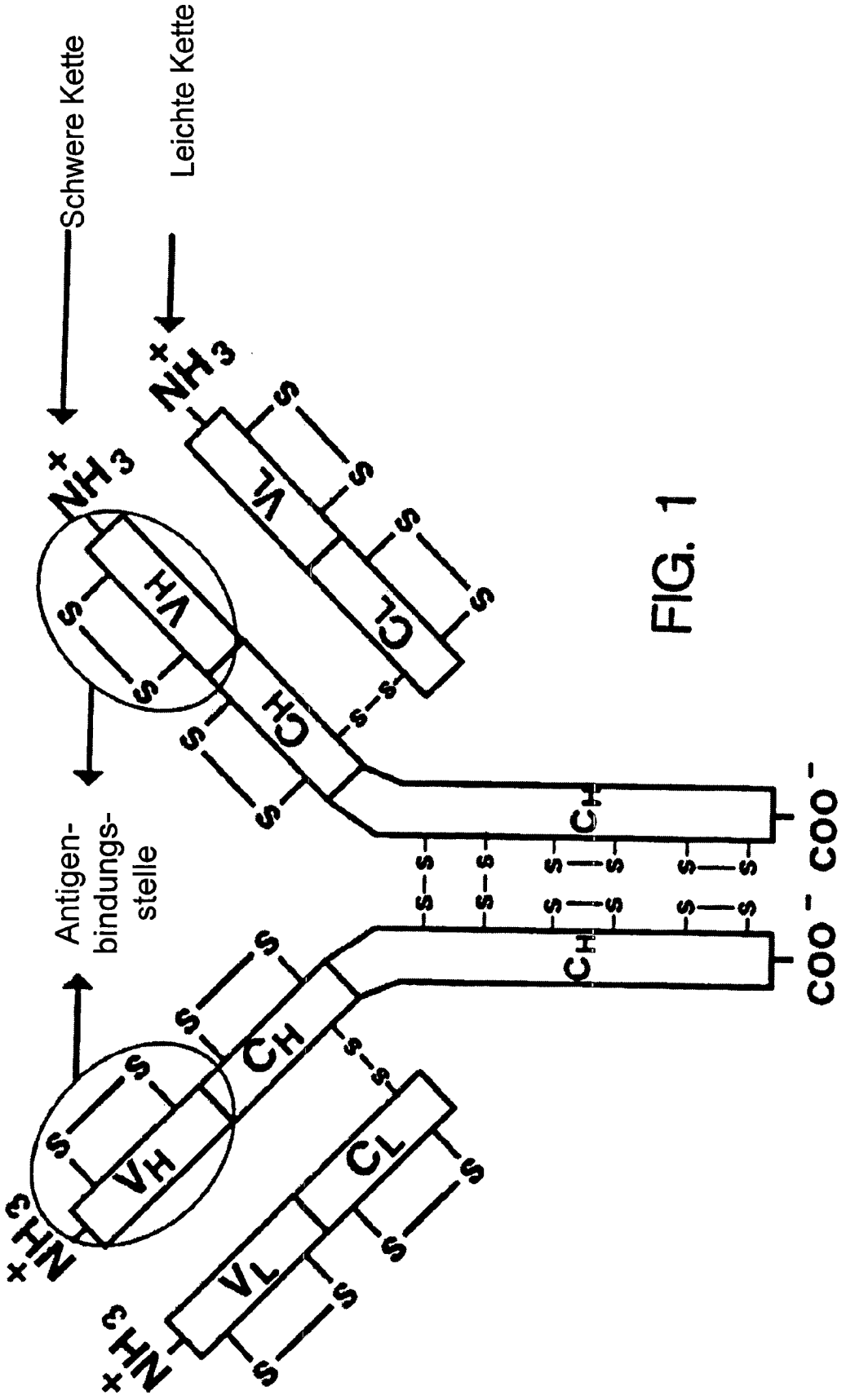


FIG. 1

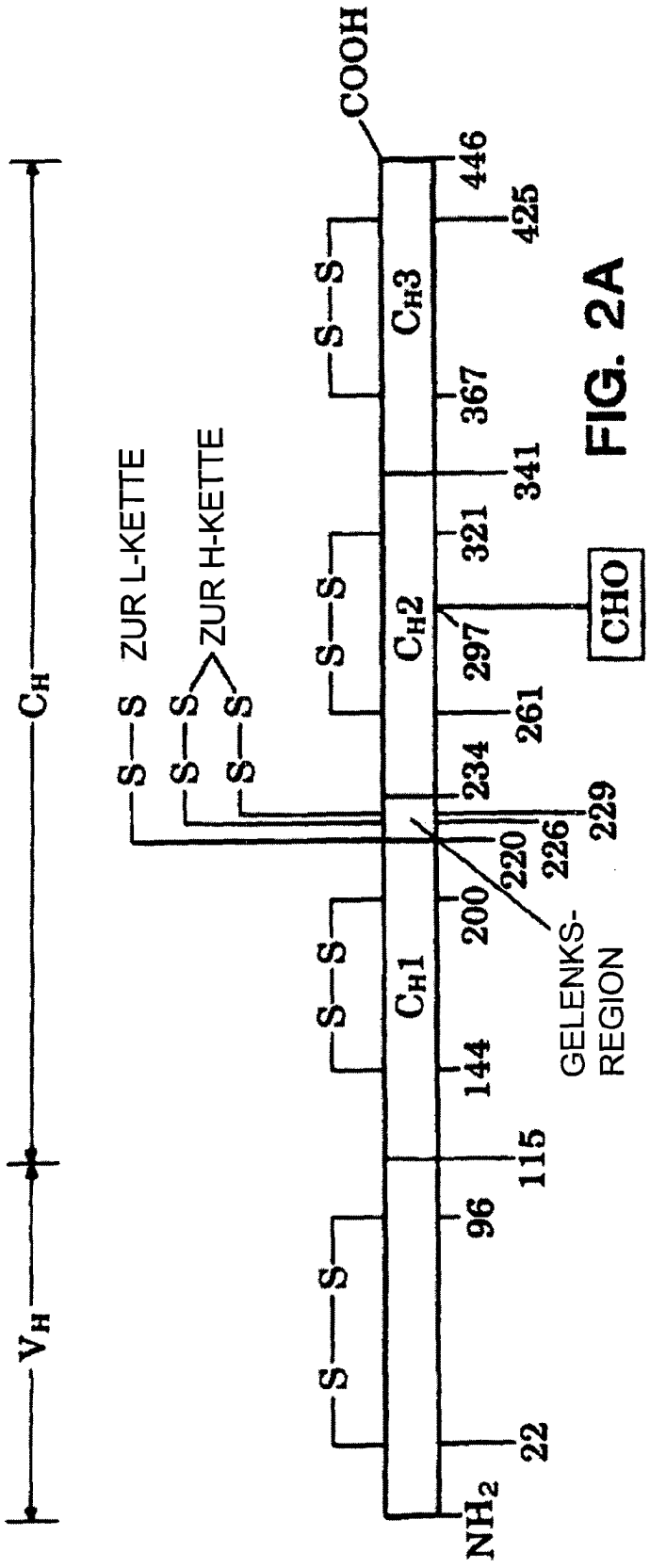

COOH
446
425
S—S
C_H3
367
341
321
S—S
C_H2
CHO
297
261
234
229
226
220
200
S—S
C_H1
GELENKS-
REGION
144
115
96
S—S
S—S
22
NH_2
C_H
V_H
S—S ZUR L-KETTE
S—S
S—S ZUR H-KETTE

FIG. 2A

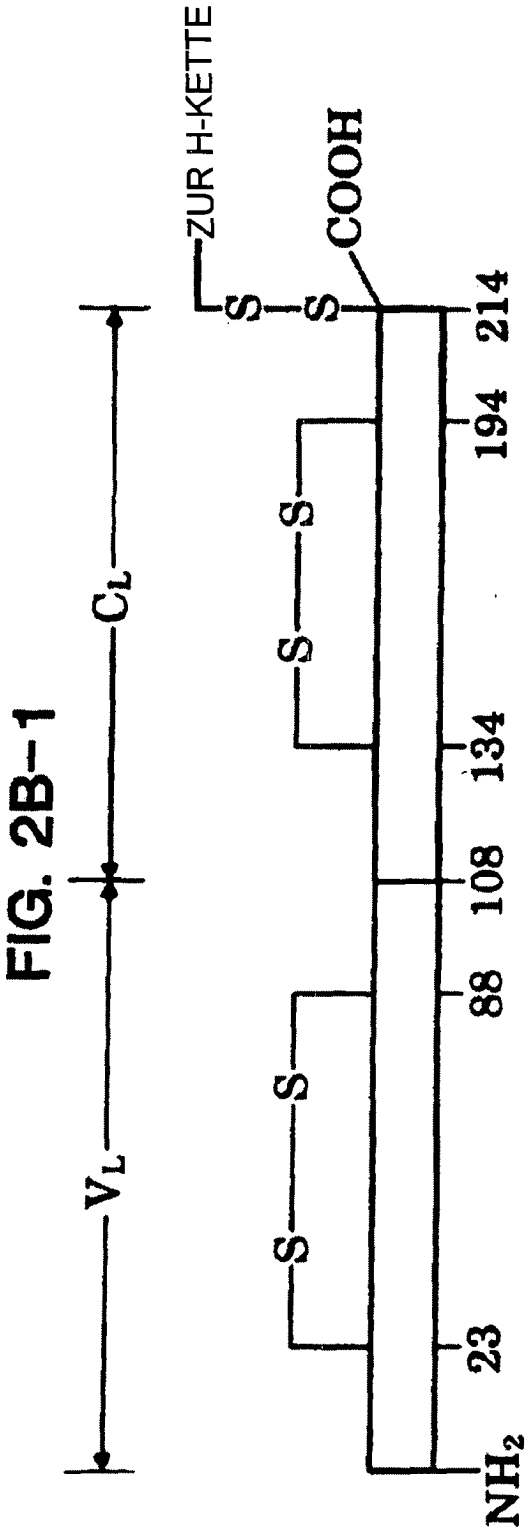


FIG. 2B-1

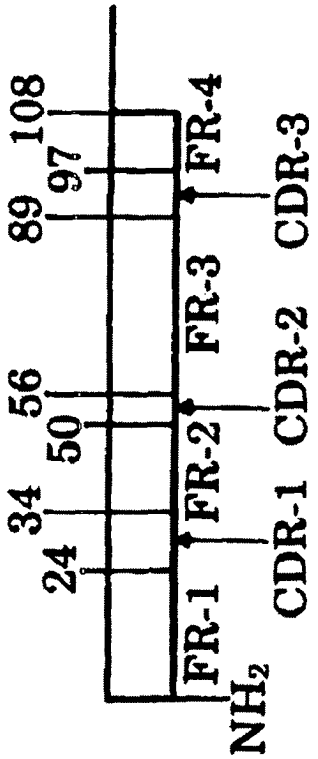


FIG. 2B-2

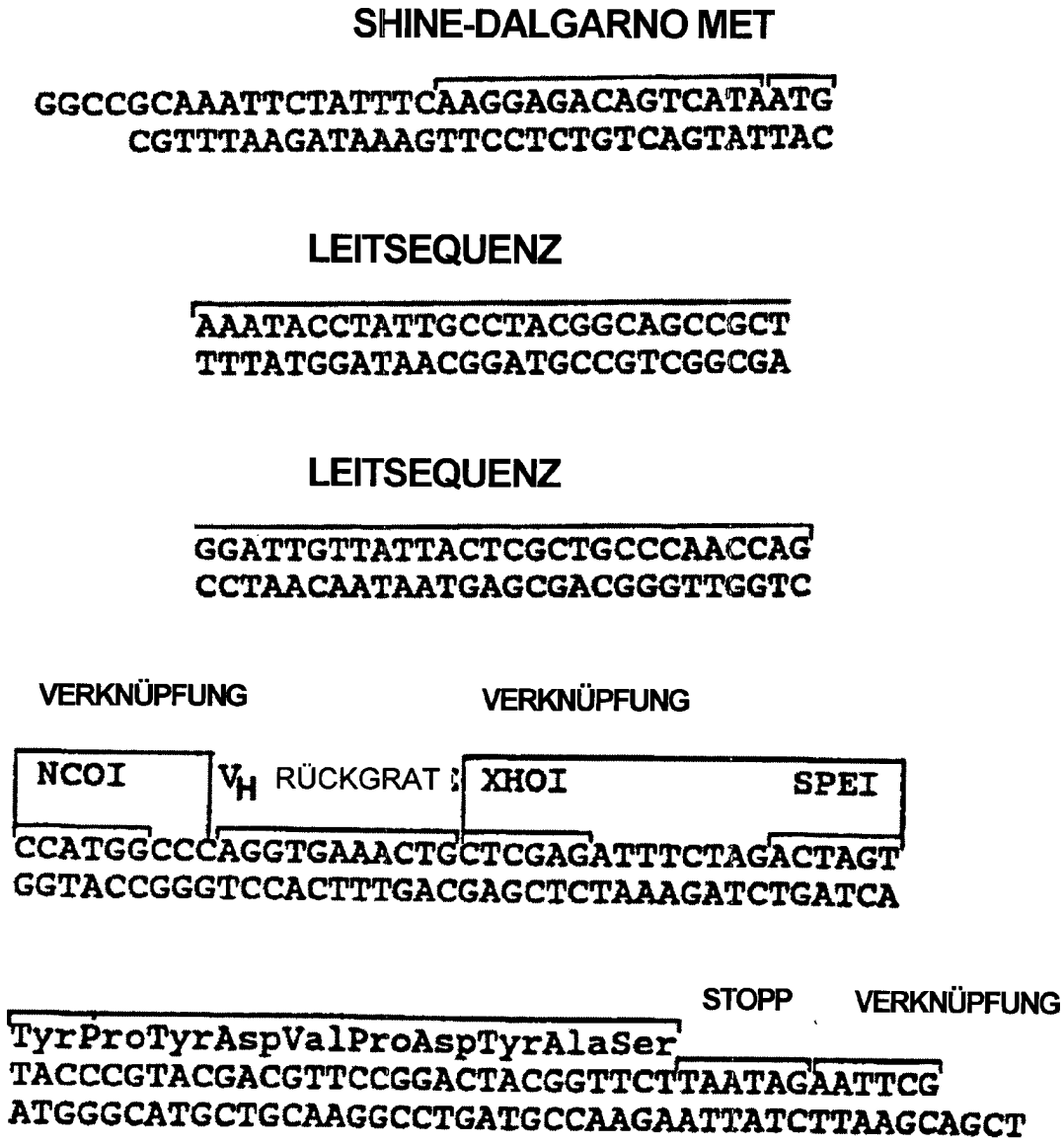

SHINE-DALGARNO MET
GGCCGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATG
CGTTTAAGATAAAGTTCCTCTGTCAGTATTAC
LEITSEQUENZ
AAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCT
TTTATGGATAACGGATGCCGTCGGCGA
LEITSEQUENZ
GGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAG
CCTAACAATAATGAGCGACGGGTTGGTC
VERKNÜPFUNG
VERKNÜPFUNG
NCOI
V_H RÜCKGRAT
XHOI
SPEI
CCATGGCCCAGGTGAAACTGCTCGAGATTTCTAGACTAGT
GGTACCGGGTCCACTTTGACGAGCTCTAAAGATCTGATCA
STOPP
VERKNÜPFUNG
TyrProTyrAspValProAspTyrAlaSer
TACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTCG
ATGGGCATGCTGCAAGGCCTGATGCCAAGAATTATCTTAAGCAGCT

FIG. 3

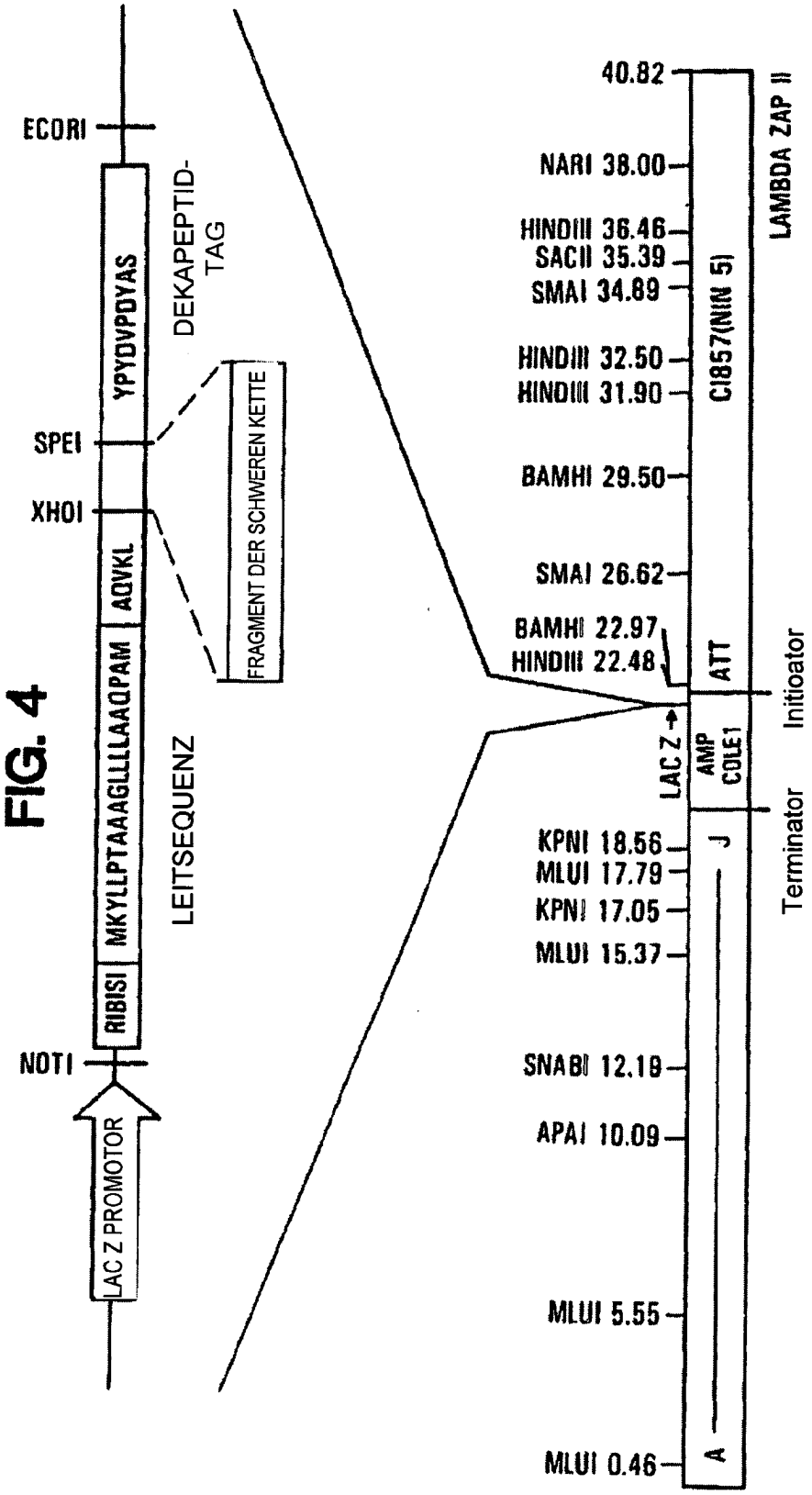

ECORI
SPEI
XHOI
NOTI
RIBISI
MKYLLPTAAGLLLLAAQPAM
AQVKL
YPYDVPDYAS
DEKAPEPTID-TAG
FRAGMENT DER SCHWEREN KETTE
LEITSEQUENZ
LAC Z PROMOTOR
40.82
NARI 38.00
HINDIII 36.46
SACII 35.39
SMAI 34.89
HINDIII 32.50
HINDIII 31.90
BAMHI 29.50
SMAI 26.62
BAMHI 22.97
HINDIII 22.48
LAC Z
AMP
COLE1
KPNI 18.56
MLUI 17.79
KPNI 17.05
MLUI 15.37
SNABI 12.19
APAI 10.09
MLUI 5.55
MLUI 0.46
LAMBDA ZAP II
CI857(NIN 5)
ATT
J
A
Initioator
Terminator

FIG. 4

FIG. 5

ECOR I SHINE-DALGARNO MET

TGAATTCTAAACTAGTCGCCAAGGAGACAGTCATAATGAAAT
TCGAACTTAAGATTTGATCAGCGGTTCCTCTGTCAGTATTACTTTA

LEITSEQUENZ

ACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAG
TGGATAACGGATGCCGTCGGCGACCTAACAATAATGAGCGACGGGTTGGTC

NCO I SAC I XBA I Not I

CCATGGCCGAGCTCGTCAGTTCTAGAGTTAAGCGGCCG
GGTACCGGCTCGAGCAGTCAAGATCTCAATTCGCCGGCAGCT

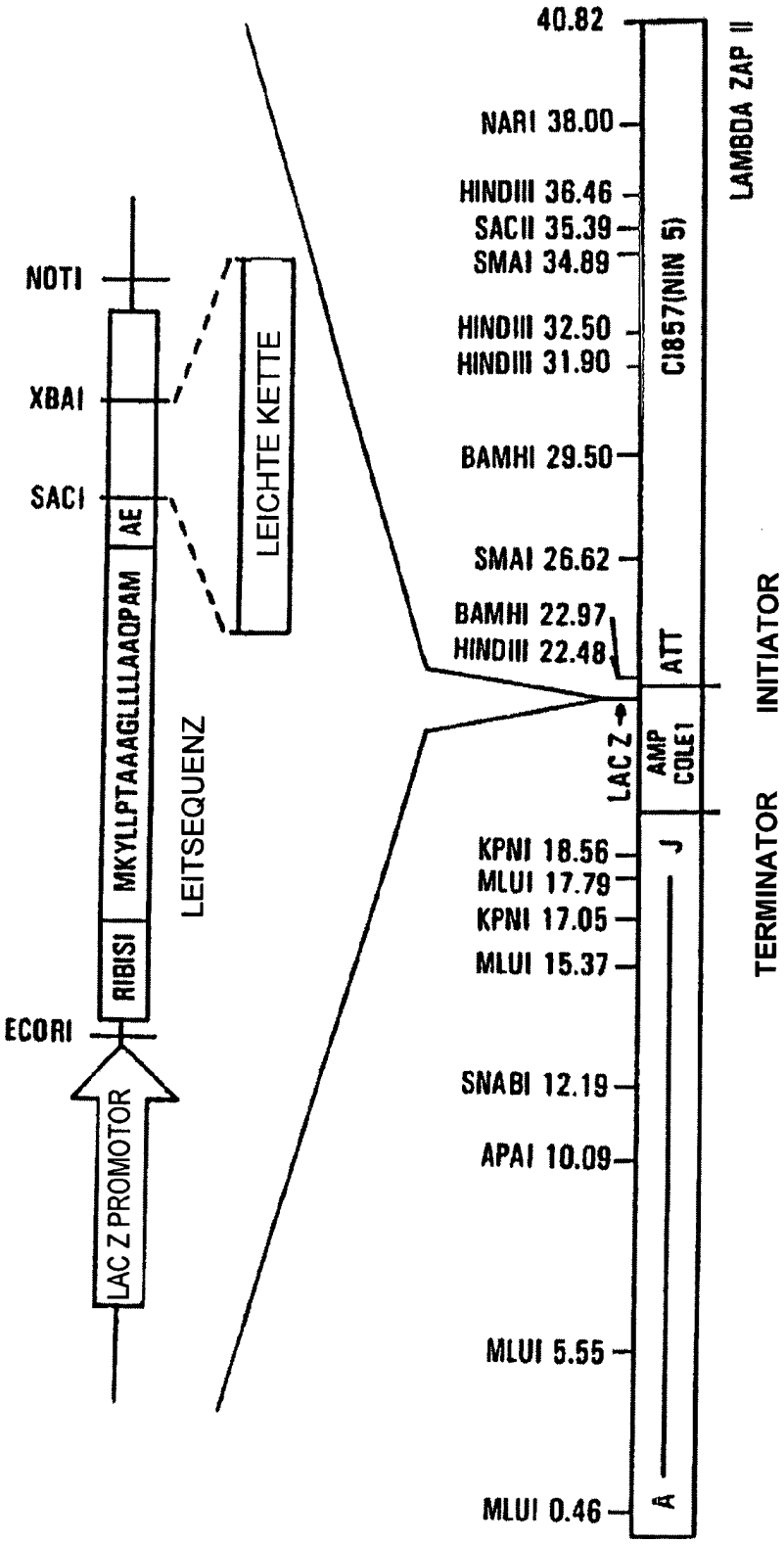

40.82
NARI 38.00
HINDIII 36.46
SACII 35.39
SMAI 34.89
HINDIII 32.50
HINDIII 31.90
BAMHI 29.50
SMAI 26.62
BAMHI 22.97
HINDIII 22.48
KPNI 18.56
MLUI 17.79
KPNI 17.05
MLUI 15.37
SNABI 12.19
APAI 10.09
MLUI 5.55
MLUI 0.46
LAMBDA ZAP II
CI857(NIN 5)
ATT
INITIATOR
LAC Z
AMP
COLE1
J
A
TERMINATOR
NOTI
XBAI
SACI
AE
LEICHTE KETTE
RIBISI
MKYLLPTAAAGLLLAAQPAM
LEITSEQUENZ
ECORI
LAC Z PROMOTOR

FIG. 6

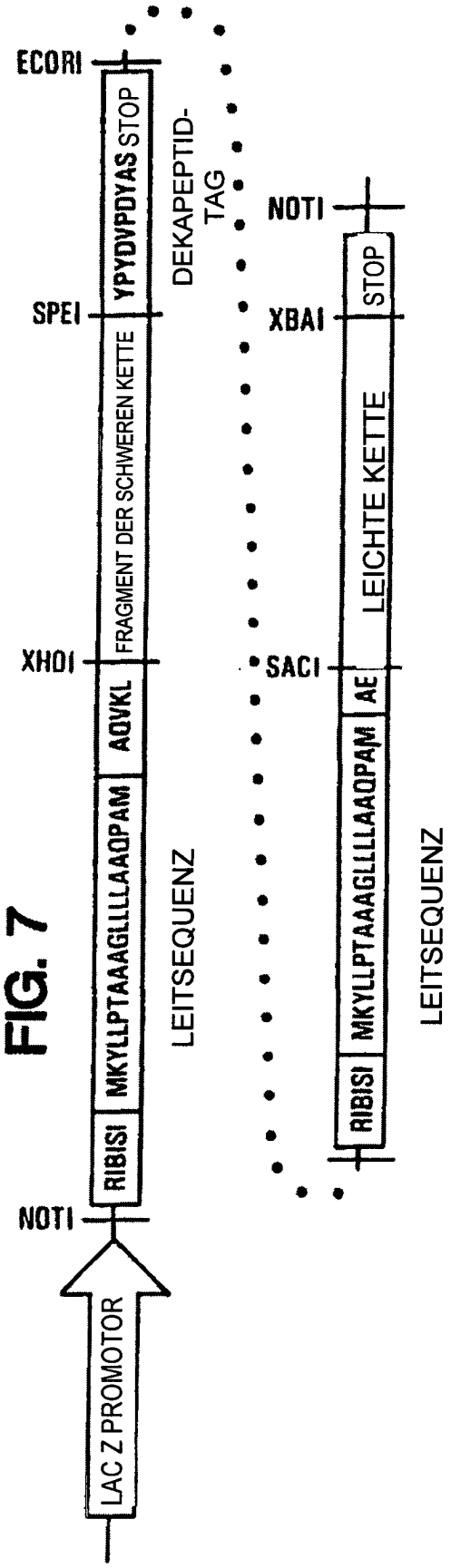

ECORI
SPEI
XHOI
NOTI
YPYDVPDYAS STOP
FRAGMENT DER SCHWEREN KETTE
AQVKL
MKYLLPTAAAGLLLAAQPAM
RIBISI
LAC Z PROMOTOR
LEITSEQUENZ
DEKAPEPTID-TAG
NOTI
XBAI
SACI
STOP
LEICHTE KETTE
AE
MKYLLPTAAAGLLLAAQPAM
RIBISI
LEITSEQUENZ

FIG. 7

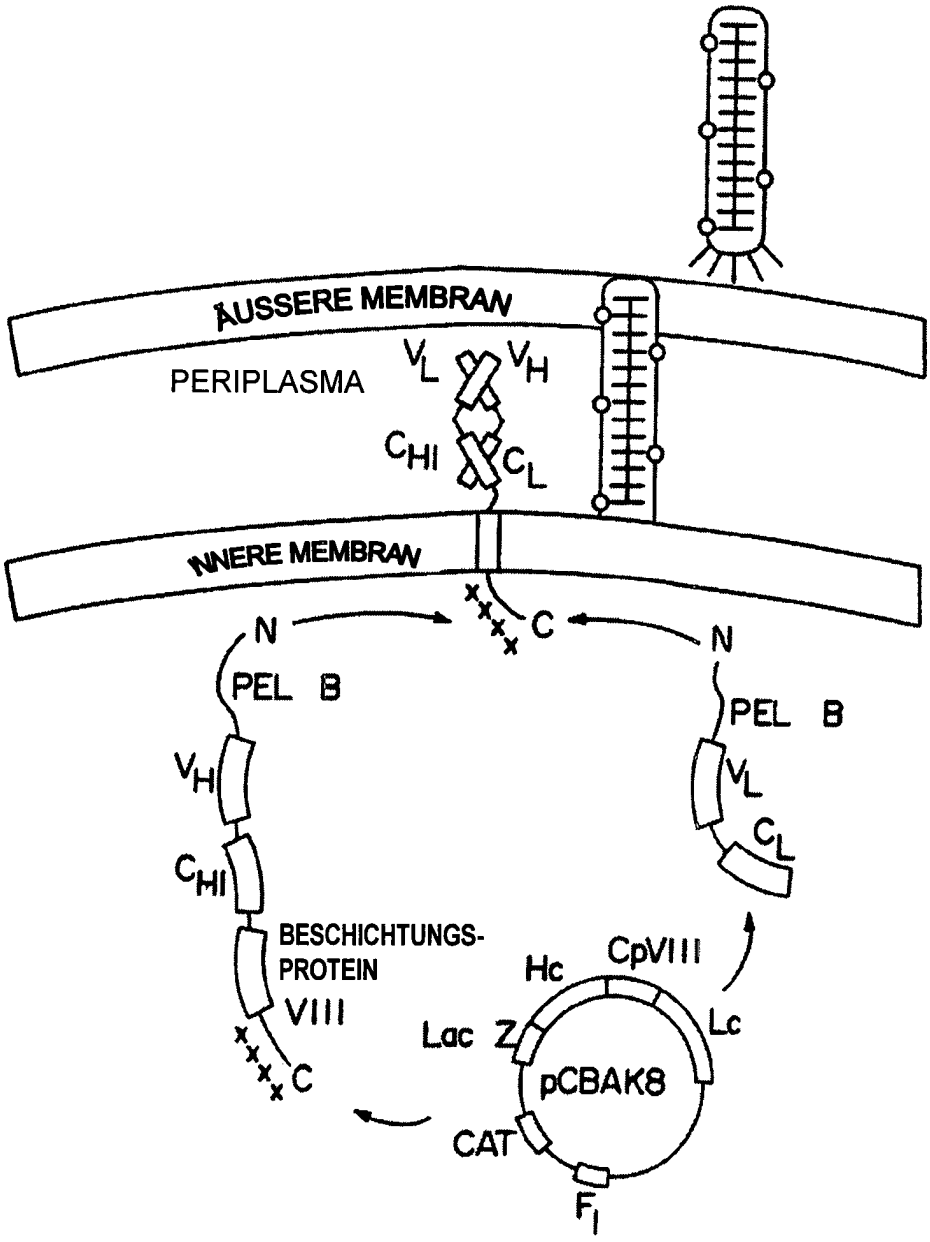

ÄUSSERE MEMBRAN
PERIPLASMA
V_L
V_H
C_{HI}
C_L
INNERE MEMBRAN
N
C
PEL B
V_H
C_{HI}
BESCHICHTUNGS-
PROTEIN
VIII
C
N
PEL B
V_L
C_L
Hc
CpVIII
Lc
Lac Z
pCBAK8
CAT
F_1

FIG. 8

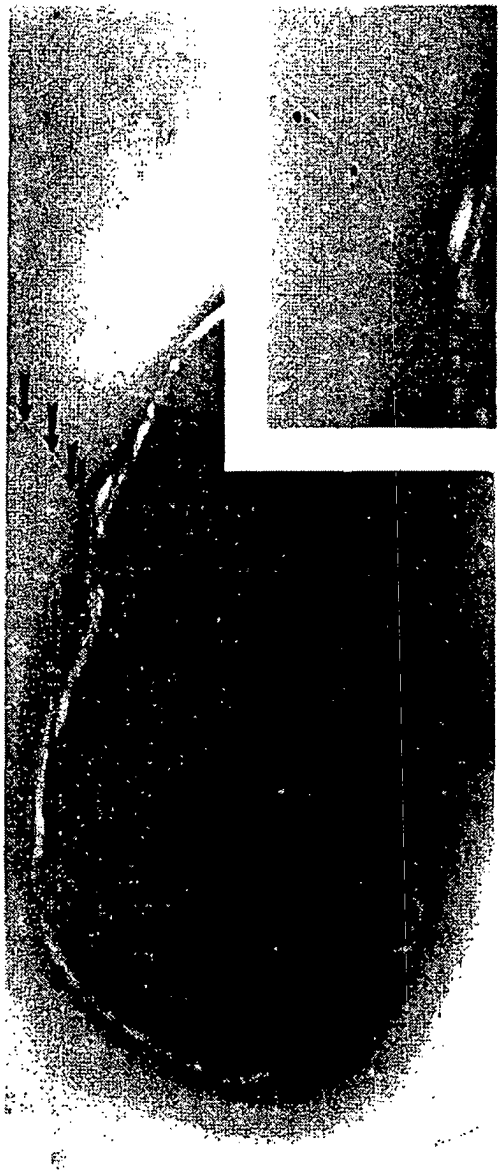


FIG. 9A–1

FIG. 9A–2

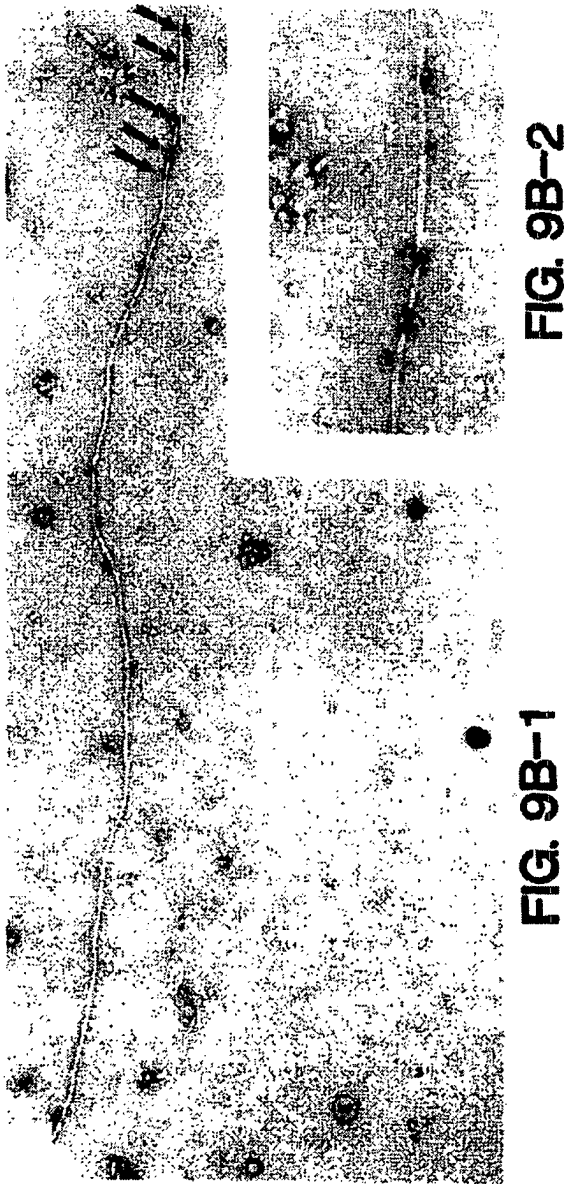


FIG. 9B–1

FIG. 9B–2

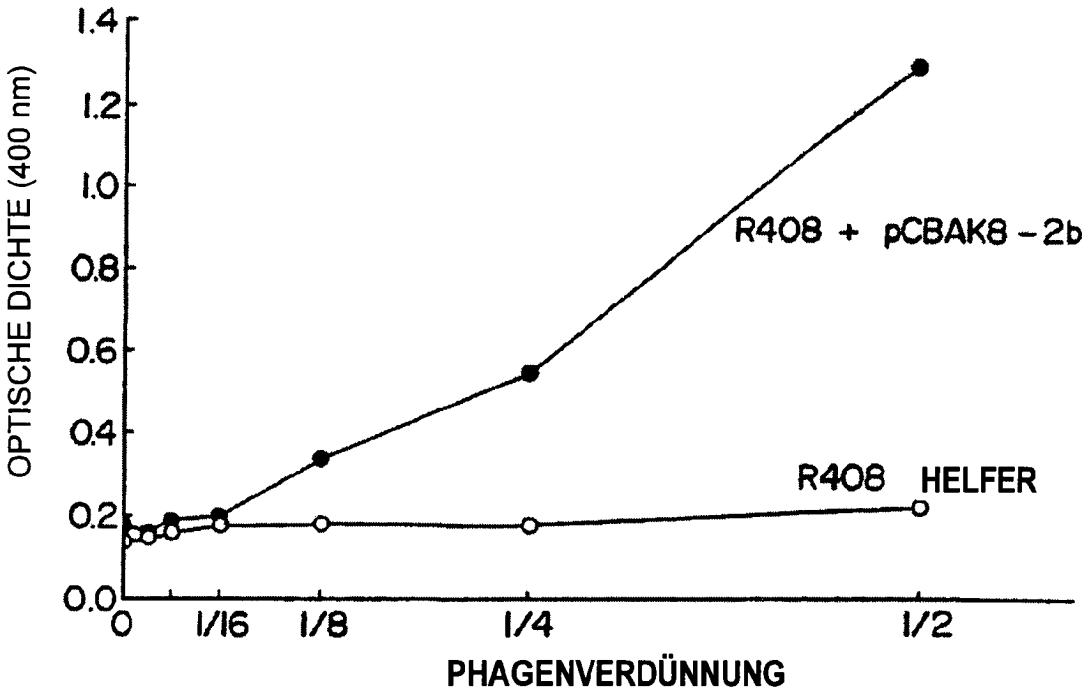

OPTISCHE DICHTE (400 nm)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
R408 + pCBAK8 – 2b
R408 HELFER
0
1/16
1/8
1/4
1/2
PHAGENVERDÜNNUNG

FIG. 10

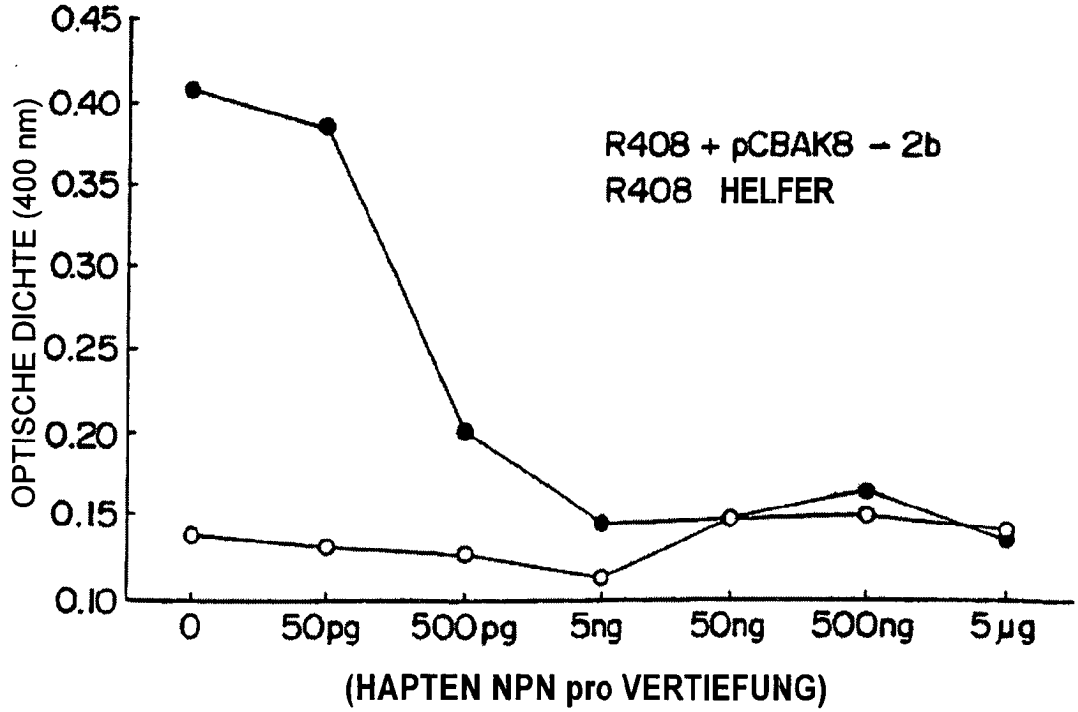

OPTISCHE DICHTE (400 nm)
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
R408 + pCBAK8 – 2b
R408 HELFER
0
50pg
500pg
5ng
50ng
500ng
5µg
(HAPTEN NPN pro VERTIEFUNG)

FIG. 11

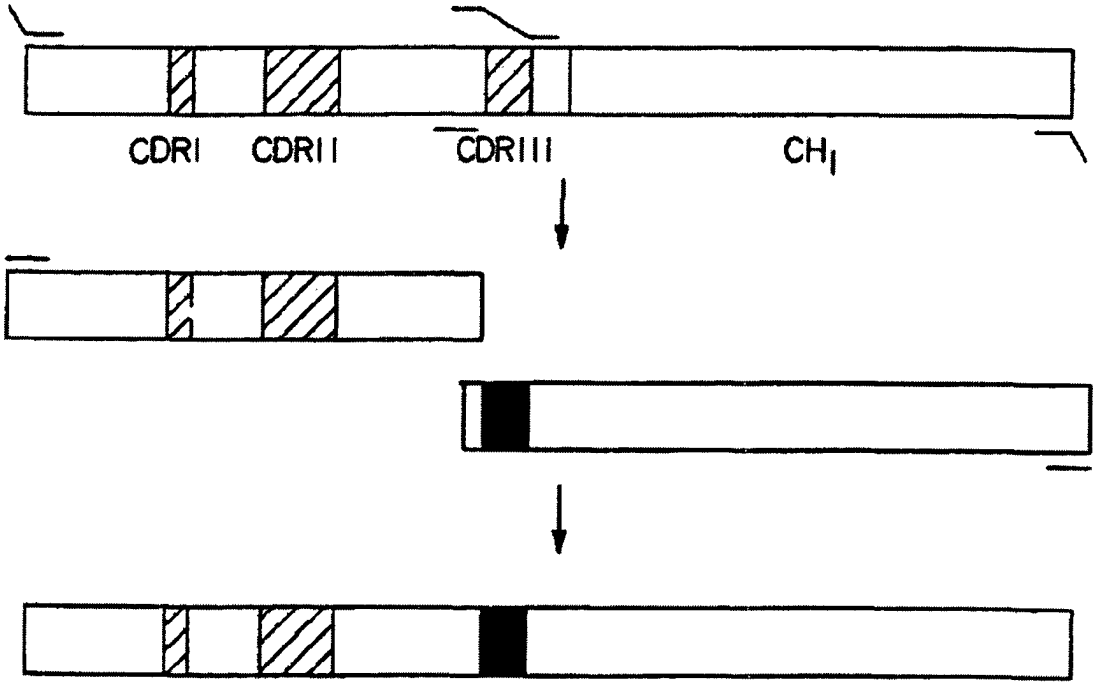


FIG. 12

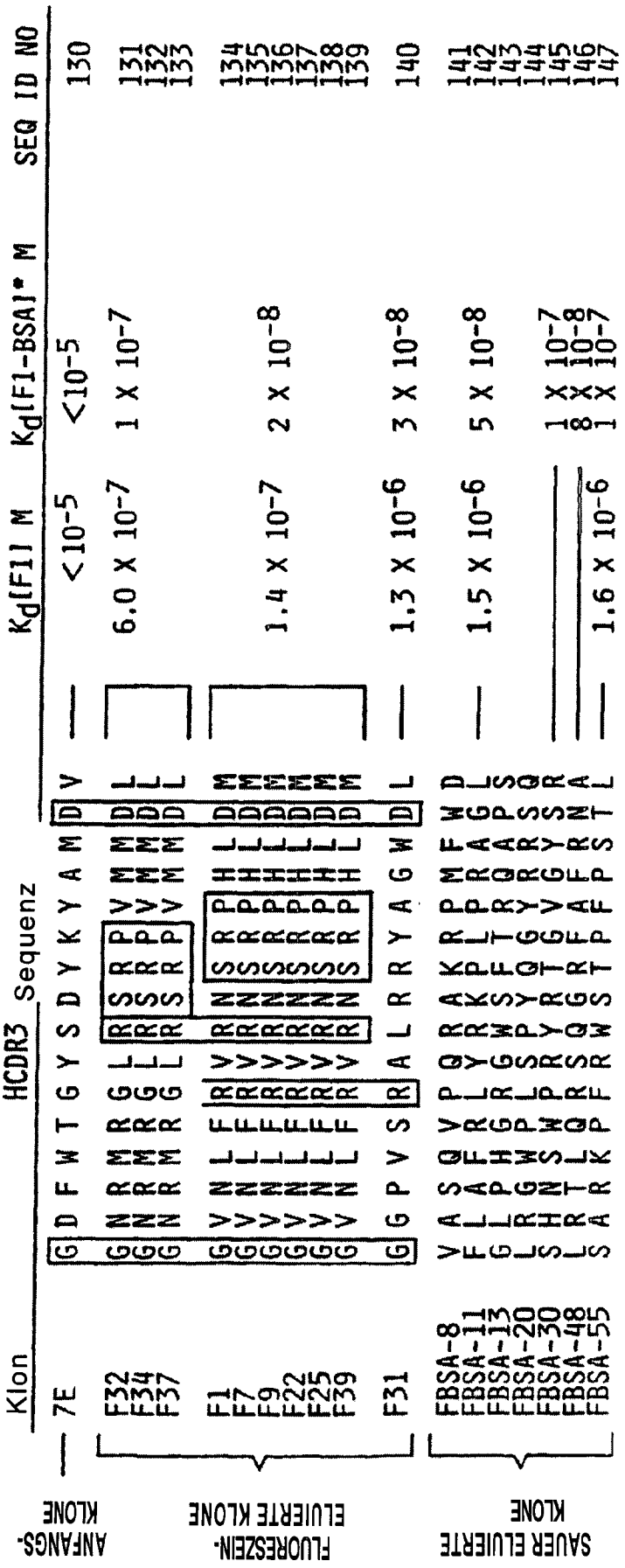

ANFANGS-KLONE
FLUORESZEIN-ELUIERTE KLONE
SAUER ELUIERTE KLONE
Klon
HCDR3 Sequenz
K_d[F1] M
K_d[F1-BSA]* M
SEQ ID NO
7E
F32
F34
F37
F1
F7
F9
F22
F25
F39
F31
FBSA-8
FBSA-11
FBSA-13
FBSA-20
FBSA-30
FBSA-48
FBSA-55
<10-5
6.0 X 10-7
<10-5
1 X 10-7
1.4 X 10-7
2 X 10-8
1.3 X 10-6
3 X 10-8
1.5 X 10-6
5 X 10-8
1 X 10-7
8 X 10-8
1 X 10-7
1.6 X 10-6
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147

FIG. 13

ANFANGS-KLON	KLON	CDR3 DER LEICHTEN KETTE, KORRESPONDIEREND ZU DEN KABAT-POSITIONEN 92-96	SEQ ID NR.
FLUORESZEIN-ELUIERTE KLONE	7E	Gly Ser Ser Leu Trp	148
	p2	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p21	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p23	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p28	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p19	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p15	Ser Phe Lys Asn Trp	150
	p11	Gly Tyr Arg Lys Trp	151

FIG. 14