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

(10) **DE 693 33 042 T2** 2004.05.06

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 662 086 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 042.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE93/00375**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 912 053.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 93/022342**
(86) PCT-Anmeldetag: **28.04.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **11.11.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.07.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **11.06.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.05.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C07K 14/435**
C12N 15/31, C12N 15/62, A61K 38/00, C07K 1/02

(30) Unionspriorität:
9201331 **28.04.1992** **SE**

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

(73) Patentinhaber:
Affitech A/S, Oslo, NO

(72) Erfinder:
BJÖRCK, Lars, S-240 17 Södra Sandby, SE;
SJÖBRING, Ulf, S-223 50 Lund, SE

(74) Vertreter:
LOUIS, PÖHLAU, LOHRENTZ, 90409 Nürnberg

(54) Bezeichnung: **PROTEIN L UND ENTSPRECHENDEN PROTEINHYBRIDEN**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Sequenzen von Protein L, die an leichte Ketten von Immunoglobulinen binden. Die Erfindung betrifft ferner Hybridproteine von Protein L mit der Fähigkeit zur Bindung an leichte Ketten sämtlicher Immunoglobuline und auch zur Bindung an leichte und schwere Ketten von Immunoglobulin G. Ferner betrifft die Erfindung DNA-Sequenzen, die für die Proteine kodieren, Vektoren, die derartige DNA-Sequenzen enthalten, mit den Vektoren transformierte Wirtszellen, Verfahren zur Herstellung der Proteine, eine Reagenzvorrichtung zum Trennen und Identifizieren von Immunoglobulinen, Zusammensetzungen und pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Proteine enthalten.

[0002] Die Erfindung betrifft insbesondere die DNA-Sequenz und die Aminosäuresequenz der die leichte Kette bildenden Domänen von Protein L.

[0003] Proteine, die an die konstanten Domänen (von hoher Affinität) der Immunoglobuline (Ig) binden, sind bekannt. So binden Protein A (Staphylococcus aureus) (A. Forsgren und J. Sjöquist, Protein A from Staphylococcus aureus. I. Pseudo-immune reaction with human gammaglobulin, J. Immunol., Bd. 97 (1966), S. 822–827) an IgG verschiedener Säugetierspezies. Die Bindung von Protein A an IgG wird im wesentlichen über Oberflächen im Fc-Fragment der schweren Kette des IgG-Moleküls vermittelt, obgleich eine bestimmte Bindung auch über Oberflächen im Fab-Fragment von IgG bewirkt wird. Protein A fehlt die Fähigkeit zur Bindung an humanes IgG3 und es bindet auch nicht an IgG mehrerer anderer Tierspezies, z. B. von wichtigen Laboratoriumstieren, wie Ratten und Ziegen, was die Verwendung von Protein A einschränkt.

[0004] Protein G (L. Björck und G. Kronvall, Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent, J. Immunol., Bd. 133 (1984), S. 969–974; K. Reis, E. Ayoub und M. Boyle, Streptococcal Fc receptors. I. Isolation and partial characeterization of the rectptor from a group C streptococcus, J. Immunol. Bd. 132 (1984), S. 3091–3097) bindet an schwere Ketten in humanem IgG und an alle vier Unterklassen davon und auch an IgG der meisten Säugetiere, einschließlich Ratten und Ziegen.

[0005] Protein H (P. Ákesson, J. Cooney, F. Kishimoto und L. Björck, Protein H – a novel IgG binding bacterial protein, Molec. Immun., Bd. 27 (1990), S. 523–531) bindet an das Fc-Fragment in IgG von Menschen, Affen, und Kaninchen. Jedoch ist die Bindung schwächer als im Fall von Protein G und A, was von Vorteil sein kann, wenn man die Bindung mit einem schwachen Mittel aufbrechen will, z. B. bei der Reinigung von Proteinen, die leicht denaturiert werden, mit Hilfe von Antikörpern.

[0006] Protein M (PCT/SE 91100447 der Anmelderin) bindet an das Fc-Fragment in IgG von Menschen, Affen, Kaninchen, Ziegen, Mäusen und Schweinen.

[0007] Protein L (L. Björck, Protein L, a novel bacterial cell wall protein with affinity to Ig L chains, J. Immunol., Bd. 140 (1988), S. 1194–1197), das an die leichten Ketten in Immunoglobulinen der gesamten Klassen G, A, M, D und E bindet, ist bekannt (US-4 876 194). Die Aminosäuresequenz und die Bindungsdomänen dieses Proteins sind jedoch bisher nicht bekannt.

[0008] Die vorerwähnten Proteine können bei der Analyse, Reinigung und Präparation von Antikörpern sowie für die diagnostische und biologische Forschung verwendet werden.

[0009] Die Beseitigung von Immunoglobulinen mit Hilfe von Plasmapherese kann einen günstigen Einfluß auf einige Autoimmunkrankheiten ausüben. Ein Protein mit breiter Bindungswirkung wäre von Vorteil, wenn man diesbezüglich sämtliche Klassen von Antikörpern beseitigen möchte.

[0010] Es ist seit langem bekannt, daß infektiöse Zustände verhindert oder geheilt werden können, indem man ein Immunserum zuführt, d. h. ein Serum, das reich an Antikörpern gegen den betreffenden Organismus oder dessen potenziell schädliche Produkte ist. Beispiele hierfür sind epidemische Gelbsucht, Tetanus, Diphtherie, Tollwut und allgemeine Gürtelrose. Antikörper gegen ein toxisches Produkt können auch im Fall von nicht infektiös verursachten Zuständen wirksam sein. Serum, das in Tieren gegen verschiedene Schlangengifte erzeugt worden ist, stellt diesbezüglich die gebräuchlichste Anwendung dar. Jedoch ist die Verabreichung von Seren oder Antikörperpräparaten nicht vollständig gefahrlos. In einigen Fällen können ernsthafte immunologische Reaktionen auftreten. Ferner wurden auch einzelne Fälle der Übertragung von ansteckenden Krankheiten, wie HIV und Hepatitis, durch diese Produkte beschrieben. Um diese sekundären Wirkungen zu vermeiden, ist es wünschenswert, therapeutische Antikörper im Reagenzglas (synthetisch) zu erzeugen. Eine große Anzahl neuer Techniken zur Synthese von Antikörpern wurde in den letzten Jahren vorgeschlagen. Zu Beispielen für derartige Techniken gehören Hybridomtechniken, die Synthese von chimären Antikörpern und die Herstellung von Antikörpern in Bakterien. Diese Techniken ermöglichen einen speziellen Aufbau der Antikörper, die die Anwendung derartiger Moleküle als Therapeutika noch erweitern können, z. B. im Fall von bestimmten Tumorerkrankungen. Bei einigen dieser neuen Verfahren fehlt dem Produkt jedoch das Fc-Fragment vollständig, d. h. das Fragment, an dem sämtliche der beschriebenen IgG-bindenden Proteine mit Ausnahme von Protein L binden. Infolgedessen besteht ein Bedürfnis nach einem Verfahren zur Reinigung von Antikörpern für therapeutische Zwecke, wobei Proteine, die ein breites Aktivitäts-/Spezifitätsspektrum der Bindung aufweisen, von Wert sein können.

[0011] Es ist seit langer Zeit möglich, die Antikörperreaktion mit ihrer hohen Spezifität zur Diagnose von frü-

heren oder in einigen Fällen auch von gerade stattfindenden Infektionen mit verschiedenen Parasiten einzusetzen. Dieses indirekte Verfahren zur Anzeige von infektiösen Mitteln wird als Serologie bezeichnet und kann in einigen Fällen die einzige diagnostische Alternative darstellen. In bestimmten Fällen kann es auch von Interesse sein, über spezifische IgE- oder IgA-Antikörper zu verfügen. Bei der Diagnose mit Hilfe der Serologie wird das Antigen häufig an einer festen Phase fixiert, wonach dem Patienten entnommenes Serum mit dem Antigen inkubiert wird. Gebundene Antikörper des Patienten können sodann auf verschiedenen Wegen nachgewiesen werden, häufig mit Hilfe eines sekundären Antikörpers (z. B. ein Antikörper, der gegen die leichten Ketten von humanen Antikörpern gerichtet ist), an dem eine identifizierbare Markierung angebracht worden ist, z. B. alkalische Phosphatase, Biotin, radioaktive Isotope, Fluorescein und dgl. In diesem Zusammenhang kann ein Protein mit einer breiten Ig-Bindungskapazität als Alternative zu sekundären Antikörpern verwendet werden.

[0012] Es gibt eine Anzahl von nicht-therapeutischen und nichtdiagnostischen Gründen für die Notwendigkeit dieser Bindung von Antikörpern. Antikörper werden häufig in der Forschung verwendet, und zwar sowohl zum Nachweis als auch zur Reinigung des Antigens, gegen das sie gerichtet sind. Sämtliche Techniken, die die Reinigung von Antikörpern erleichtern und insbesondere Techniken, die die Reinigung von verschiedenen Klassen ermöglichen, sind in diesem Zusammenhang von Interesse.

[0013] Infolgedessen besteht ein dringendes Bedürfnis nach einem Protein, das eine breite Bindungsaktivität/Spezifität aufweist und das an verschiedene Klassen von Immunoglobulinen verschiedener Tierspezies bindet. Derzeit gibt es kein bekanntes Protein, das an sämtliche Immunoglobulinklassen bindet. Die bekannten Proteine A, G, H und M binden nur an schwere Ketten in IgG. Das bekannte Protein L (Björck et al., 1988) bindet an die leichten χ-Ketten und γ-Ketten in Immunoglobulinen sämtlicher Klassen, obgleich die Bindungen an κ-Ketten wesentlich schwächer sind. Die Anmelderin hat folgendes ausgeführt: Kartierung von Protein L, Bestimmung der Aminosäuresequenz für Protein L, Identifizierung der an die leichte Kette bindenden Domänen an Protein L und Verwendung dieser Domänen zur Erzeugung von hybriden Proteinen, die IgG-Fc-Bindungsdomänen von Protein G aufweisen. Die Anmelderin ist in der Lage, durch Protein LG zu zeigen, daß dadurch ein Protein von breiterer Bindungsaktivität/Spezifität erzeugt werden kann. Die vorerwähnten Proteine A, G, H und M binden an die gleichen Oberflächen oder an eng nebeneinanderliegende Oberflächen an IgG-Fc. Das Protein L, das an die leichten Ketten bindet, kann somit mit beliebigen anderen, funktionell ähnlichen Proteinen kombiniert werden, die an das Fc-Fragment von schweren Ketten binden. Eine ähnliche Erweiterung der Ig-Bindungsaktivität wird mit sämtlichen Alternativen erreicht.

[0014] Somit betrifft die vorliegende Erfindung die Sequenz von Protein L, das an leichte Ketten in Ig bindet und das die in **Fig.** 1 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist, sowie Varianten, Unterfragmente, Mehrfache (Multiple) oder Gemische der Domänen B1–B5 mit den gleichen Bindungseigenschaften. Ferner betrifft die Erfindung eine DNA-Sequenz, die für derartige Proteinsequenzen kodiert, z. B. für die DNA-Sequenz von **Fig.** 1.

[0015] Insbesondere betrifft die Erfindung ein Protein, das an leichte Ketten in Ig bindet und die in **Fig.** 1 dargestellte Aminosäuresequenz oder die Aminosäuresequenz von mindestens einer der Domänen B1, B2, B3 und B4 und Gemischen und Mehrfachen davon aufweist. Ferner betrifft die Erfindung eine DNA-Sequenz, die für derartige Proteinsequenzen kodiert.

[0016] Schließlich betrifft die Erfindung ein Hybridprotein, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es Domänen umfaßt, die an die leichten χ-Ketten und λ-Ketten in Immunoglobulinen sämtlicher Klassen binden, und ferner Domänen umfaßt, die an schwere Ketten in Immunoglobulin G binden, wobei die Domänen, die an die leichten Ketten binden, unter den B1-, B2-, B3-, B4- und B5-Domänen in Protein L ausgewählt sind (vgl. Anspruch 1), und die Domänen, die an die schweren Ketten von Immunoglobulinen binden, unter den C1-, C2- und C3-Domänen in Protein G; den A-, B- und C1-Domänen von Protein H; den A-, B1-, B2- und S-Domänen in Protein M1; oder den E-, D-, A-, B- und C-Domänen in Protein A (vgl. **Fig.** 6) ausgewählt sind, sowie Varianten, Unterfragmente, Mehrfache oder Gemische dieser Domänen, die die gleichen Bindungseigenschaften aufweisen, die an schwere Ketten von Immunoglobulinen binden.

[0017] Unter dem Ausdruck Unterfragment ist ein Teilfragment der gegebenen Domänen oder Fragmente zu verstehen, die Teile aus den verschiedenen Domänen umfassen, die wechselseitig die gleichen Bindungseigenschaften aufweisen. Unter Varianten sind Proteine oder Peptide zu verstehen, bei denen die ursprüngliche Aminosäuresequenz durch Insertion, Addition, Substitution, Inversion oder Exklusion von einer oder mehreren Aminosäuren modifiziert worden ist, wobei aber die Bindungseigenschaften beibehalten oder verbessert worden sind. Ferner betrifft die Erfindung Proteine, die mehrere Anordnungen (Mehrfache) der Bindungsdomänen oder Gemische der Bindungsdomänen enthalten, wobei die Bindungseigenschaften erhalten geblieben sind. Die Erfindung betrifft ferner Gemische der verschiedenen Domänen von Aminosäuresequenzen, die wechselseitig die gleichen Bindungseigenschaften aufweisen.

[0018] Insbesondere betrifft die Erfindung ein Hybridprotein mit der Bezeichnung LG und ist dadurch gekennzeichnet, daß das Hybridprotein die B-Domänen in Protein L, die an die leichten Ketten in Immunoglobulinen binden, und die C1-Domänen und C2-Domänen in Protein G umfassen, die an die schweren Ketten binden und die in **Fig.** 3 dargestellte Aminosäuresequenz aufweisen. Die Erfindung betrifft ferner Varianten, Unterfrag-

mente, Mehrfache oder Gemische dieser Domänen.

[0019] Protein LG ist ein Hybridprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa (432 Aminosäuren) und umfaßt vier Domänen, von denen jede an leichte Ketten in Immunoglobulinen bindet und zwei IgG-Bindungsdomänen von Protein G. Das Hybridprotein vereinigt eine breite IgG-Bindungsaktivität, die aus dem hochgradigen Bindungsvermögen von Protein G an das Fc-Fragment der schweren Kette an LG stammt, mit der Fähigkeit von Protein L zur Bindung an leichte Ketten sämtlicher Klassen von Immunoglobulinen. Somit bindet Protein LG an polyklonales humanes IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Die Affinität für humanes polyklonales IgG beträgt 2×10^{10} M^{-1}. Sämtliche vier humanen Immunoglobulinklassen werden gebunden. Die Bindung an humanes IgG wird sowohl mit der κ- als auch λ-Kette erreicht. Sowohl das Fc-Fragment als auch das Fab-Fragment von IgG werden an das Hybridprotein gebunden. Das Protein bindet auch an humane IgA-, IgD-, IgE- und IgM-Antikörper. Die Bindung ist stärker gegenüber humanen Immunoglobulinen, die das χ-Isotop tragen, als gegenüber solchen die das λ-Isotop von leichten Ketten tragen. IgG der meisten Säugetiere wird durch Protein LG gebunden, somit auch IgG von Ziegen und Kühen, die nicht an Protein L binden. Kaninchen-IgG, das relativ schwach an Protein L bindet, wird gut an das Fusionsprotein gebunden. IgM- und IgA-Antikörper von Mäusen, Ratten und Kaninchen binden das Protein.

[0020] Protein LG ist hochgradig löslich. Es ist wärmebeständig und behält seine Bindungseigenschaften auch bei hohen Temperaturen. Die Bindungseigenschaften bleiben ferner in einem breiten pH-Bereich von 3–10 erhalten. Das Protein ist gegenüber Detergentien beständig und bindet an markierte Proteine im Anschluß an eine Trennung durch SDS-PAGE und Übertragung auf Membranen durch Elektroblotting. Das Protein kann an einer festen Phase (Nitrocellulose, Immobilon®, Polyacrylamid, Kunststoff, Metall und Papier) ohne Verlust seiner Bindungskapazität immobilisiert werden. Die Bindungseigenschaften werden durch Markierung mit radioaktiven Substanzen, Biotin oder alkalischer Phosphatase nicht beeinflußt. (Die Bindungseigenschaften von Protein LG sind in Beispiel 3 beschrieben).

[0021] Das Protein umfaßt 432 Aminosäuren und weist ein sich daraus ergebendes Molekulargewicht von 50 kDa auf. Die Sequenz ist aus einer ala-Sequenz der letzten drei Aminosäuren in der A-Domäne des Proteins L (val-glu-asn) aufgebaut, wobei diese ala-Sequenz mit den beiden Proteinen nicht in Beziehung steht, wonach die vier wechselseitig hochgradig homologen B-Domänen von Protein L folgen. Die erste der B-Domänen besteht aus 76 Aminosäuren und die restlichen Domänen jeweils aus 72 Aminosäuren. Die ersten neun Aminosäuren der fünften B-Domäne sind enthalten, wonach zwei nicht in Beziehung stehende Aminosäuren (pro-met) folgen. Anschließend folgen die Protein-G-Sequenzen. Der letzten Aminosäure in der sogenannten S-Domäne von Protein G folgen eine IgG-Bindungsdomäne von Protein G (C1; 55 Aminosäuren), die mittlere D-Region (15 Aminosäuren) und die zweite IgG-Bindungs-C-Domäne (C2; 55 Aminosäuren). Bei der letzten Aminosäure handelt es sich um ein Methionin, das in natürlichem Protein G als erste Aminosäure in der sogenannten W-Region auftritt.

[0022] Die Erfindung betrifft ferner DNA-Sequenzen, die für die vorerwähnten Proteine kodieren.

[0023] Das Gen, das für die IgG-bindenden Aminosäuresequenzen kodiert, 1äßt sich aus der chromosomalen DNA von Staphylococcus aureus auf der Grundlage der Informationen über die DNA-Sequenz für Protein A (S. Löfdahl, B. Guss, M. Uhlen und L. Philipsson und M. Lindberg, Gene for staphylococcal protein A, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 80 (1983), S. 697–701) und auf der Grundlage von **Fig.** 6 oder aus G-Streptococcus, vorzugsweise aus dem Stamm G 148 oder C-Streptococcus, vorzugsweise aus dem Stamm Streptococcus equisimilis C 40, auf der Grundlage der Informationen über Protein G (B. Guss, M. Elisasson, A. Olsson, M. Uhlen, A. -K. Frej, H. Jörvall, I. Flock und M. Lindberg, Structure of the IgGbinding regions of streptococcal protein G, EMBO J., Bd. 5 (1986), S. 1567–1575) und **Fig.** 6, oder aus Streptococcen der Gruppe A, z. B. S. pyogenes (Typ M1) auf der Grundlage der Informationen über die DNA-Sequenz für Protein H (H. Gomi, T. Hozumi, S. Hattori, C. Tagawa, F. Kishimoto und L. Björck, The gene sequence and some properties of protein H – a novel IgG binding protein, J. Immunol., Bd. 144 (1990), S. 4046-4052) und auf der Grundlage von **Fig.** 6, oder aus der chromosomalen DNA in Streptococcen der Gruppe A vom Typ M1 auf der Grundlage der Informationen über die DNA-Sequenz von Protein M (Patentanmeldung der Anmelderin PCT/SE-91100447) und auf der Grundlage der **Fig.** 6 und 7 isolieren. Das Gen, das für das Protein, das an die leichten Ketten bindet, kodiert, läßt sich aus der chromosomalen DNA von Pepto-cocccus magnus 312 auf der Grundlage der Informationen für die DNA-Sequenz für Protein L in Anspruch 2 isolieren.

[0024] Unter Verwendung der chromosomalen DNA, die aus den vorerwähnten Bakterien als Matrize erhalten worden ist, läßt sich dann ein DNA-Fragment, das mit Hilfe von zwei synthetischen Oligonucleotiden definiert worden ist, spezifisch durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifizieren. Dieses Verfahren ermöglicht auch den Einbau von Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme in den Enden der amplifizierten Fragmente (PCR-Technology, Principles and Applications for DNA-Amplification, Hrsg. Henry Erlich, Stockton Press, New York, 1989). Die Wahl von Erkennungssequenzen kann entsprechend dem gewählten Vektor angepaßt werden, um das Fragment oder das DNA-Fragment oder andere DNA-Fragmente, mit dem das amplifizierte Fragment kombiniert werden soll, zu exprimieren. Das amplifizierte Fragment wird sodann mit dem oder den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und mit dem oder den entsprechenden Fragmenten vereinigt.

Die Fragmente werden sodann zusammen in den gewählten Vektor (in diesem Fall der Expressionsvektor) kloniert (J. Sambrook, E. Fritsch und T. Maniatis, Molecular cloning: A laboratory manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor 1989, New York, USA). Es kann der Plasmidvektor pHD313 (H. Dalböge, E. Bech Jensen, H. Töttrup, A. Grubb, M. Abrahamson, I. Olafsson und S. Carlsen, High-level expression of active human cystatin C in Escherichia coli, Gene, Bd. 79 (1989), S. 325–332) oder alternativ einer der Vektoren der sogenannten PET-Serie (PET 20, 21, 22, 23), Produkte der Firma Novagen (Madison, Wisconsin, USA), verwendet werden.

[0025] Die Hybridproteine werden sodann einem geeigneten Wirt, vorzugsweise E. coli, einverleibt. Die Erfindung betrifft auch derartige Wirte, denen die Hybridproteine einverleibt sind.

[0026] Klone, die die gewünschten Proteine bilden, können aus den erhaltenen Transformanten unter Zuhilfenahme eines bekannten Verfahrens ausgewählt werden (Fahnestock et al., J. Bacteriol. Bd. 167 (1986), S. 870).

[0027] Wenn die Proteine, die an die leichten Ketten in den Immunoglobulinen und die schweren Ketten in IgG binden können, aus den erhaltenen positiven Klonen mit Hilfe herkömmlicher Verfahren gereinigt worden sind, werden die Bindungsspezifitäten der Proteine bestimmt, um die Klone auszuwählen, die ein Protein erzeugen, das an die leichten Ketten in Immunoglobulinen und an die schweren Ketten in IgG bindet.

[0028] Im Anschluß an die Isolierung von Plasmid-DNA im Klon mit herkömmlichen Verfahren, wird die DNA-Sequenz im inserierten Material nach bekannten Verfahren bestimmt (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 74 (1977), S. 5463).

[0029] Die Erfindung betrifft ferner DNA-Sequenzen, die mit den identifizierten DNA-Sequenzen unter herkömmlichen Bedingungen hybridisieren und die für ein Protein kodieren, das die angestrebten Bindungseigenschaften besitzt. Strikte Hybridisierungsbedingungen werden bevorzugt.

[0030] Die Expression der Gene kann mit Expressionsvektoren, die die erforderlichen Expressionskontrollregionen aufweisen, vorgenommen werden, wobei das Strukturgen nach diesen Regionen eingeführt wird. Wie in **Fig.** 1 und Anspruch 2 dargelegt, kann das Strukturgen für Protein LG oder für andere Hybridproteine mit Protein L verwendet werden.

[0031] Bezüglich der Expressionsvektoren wurden verschiedene Wirt-Vektor-Systeme entwickelt, unter denen besonders geeignete Wirt-Vektor-Systeme zur Expression der erfindungsgemäßen Gene ausgewählt werden können.

[0032] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Hybridproteine durch Züchtung einer Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor transformiert ist, in die DNA, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodiert, inseriert ist.

[0033] Dieses Verfahren umfaßt die folgenden Stufen:

(1) Inserieren eines DNA-Fragments, das für die Hybridproteine kodiert, in einen Vektor;
(2) Transformieren des erhaltenen Vektors in eine geeignete Wirtszelle;
(3) Züchten der erhaltenen, transformierten Zelle zur Herstellung des angestrebten Hybridproteins; und
(4) Extrahieren des Proteins aus der Kultur.

[0034] In der ersten Stufe wird das DNA-Fragment, das für das Hybridprotein kodiert, in einen Vektor inseriert, der sich für den Wirt eignet, der zur Expression des Hybridproteins zu verwenden ist. Das Gen kann dann durch Spalten des Vektors mit einem geeigneten Restriktionsenzym und anschließende Ligation des Gens mit dem Vektor inseriert werden.

[0035] In der zweiten Stufe wird der Vektor mit dem Hybridplasmid in Wirtszellen inseriert. Bei den Wirtszellen kann es sich um Escherichia coli, Bacillus subtilis oder Saccharomyces cerevisiae oder andere geeignete Zellen handeln. Die Transformation des Expressionshybridvektors in die Wirtszelle kann auf herkömmliche Weise durchgeführt werden und Klone, die transformiert worden sind, können sodann ausgewählt werden.

[0036] In der dritten Stufe werden die erhaltenen Transformanten in einem Medium gezüchtet, das sich zur Erzeugung der angestrebten Proteine durch Expression des Gens, das für das Hybridprotein kodiert, geeignet ist.

[0037] In der vierten Stufe wird das angestrebte Protein aus der Kultur extrahiert und sodann gereinigt. Dies kann unter Zuhilfenahme bekannter Verfahren durchgeführt werden. Beispielsweise können die Zellen mit Hilfe bekannter Verfahren lysiert werden, indem man die Zellen mit Ultraschall, Enzymen oder mechanisch unter Zellabbau behandelt. Das Protein, das aus den Zellen freigesetzt wird, oder das in das Medium ausgeschieden wird, kann unter Zuhilfenahme bekannter Verfahren, die auf dem Gebiet der Biochemie häufig angewandt werden, wie Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration, Affinitätschromatographie unter Verwendung von Immunoglobulinen als Liganden, hydrophobe Chromatographie oder Umkehrphasenchromatographie, gewonnen und gereinigt werden. Diese Verfahren können einzeln oder in geeigneten Kombinationen herangezogen werden.

[0038] Wie vorstehend erwähnt, können die erfindungsgemäßen Proteine zum Binden, Identifizieren oder Reinigen von Immunoglobulinen verwendet werden. Sie können auch an Pharmazeutika gebunden und in Zu-

bereitungen mit verzögerten Freisetzungseigenschaften eingesetzt werden. Zu diesem Zweck kann das Protein in einem Reagens für pharmazeutische Zusammensetzungen in Kombination mit entsprechenden Reagenzien, Additiven oder Trägern vorliegen.

[0039] Die Proteine können in einem gefriergetrockneten Zustand oder in einer PBS-Lösung (phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung) vom pH-Wert 7,2 mit 0,02% NaN_3 gehandhabt werden. Sie können auch in Verbindung mit einer festen Phase, z. B. Phasen auf Kohlenhydratbasis, wie CNBr-aktivierte Sepharose, Agarose, Kunststoffoberflächen, Polyacrylamid, Nylon, Papier, Magnetkügelchen, Filter und Filme, verwendet werden. Die Proteine können mit Biotin, alkalischer Phosphatase, radioaktiven Isotopen, Fluorescein und anderen fluoreszierenden Substanzen, Goldteilchen, Ferritin und Substanzen, die eine zu messende Lumineszenz ermöglichen, markiert werden.

[0040] Weitere Proteine können ferner als Träger verwendet werden. Diese Träger können erfindungsgemäß an die Proteine gebunden oder diesen einverleibt werden. Beispielsweise ist es denkbar, die Gesamtheit der Proteine A, G, H und M als Träger für inserierte Sequenzen von Protein L, das an leichte Ketten bindet, zu betrachten. Diese Träger können wiederum an die vorerwähnten Träger gebunden sein.

[0041] Bei verwendbaren pharmazeutischen Additiven handelt es sich um Produkte, die normalerweise auf diesem Gebiet eingesetzt werden, wie pharmazeutische Qualitäten von Mannit, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsaccharat, Talkum, Cellulose, Glucose, Gelatine, Saccharose, Magnesiumcarbonat und ähnliche Streckmittel, wie Lactose, Dicalciumphosphat und dgl.; Sprengmittel, wie Stärke oder Derivate davon; Gleitmittel, wie Magnesiumstearat und dgl.; Bindemittel, wie Stärke, Gummi arabicum, Polyvinylpyrrolidon, Gelatine, Cellulose und Derivate davon und dgl.

[0042] Nachstehend wird die Erfindung unter Bezugnahme auf die beigefügte Zeichnung näher erläutert.

[0043] **Fig.** 1 zeigt das Plasmid pHD389, wobei die ribosomale Bindungssequenz, die Sequenz für das Signalpeptid aus ompA und die Erkennungssequenz für mehrere Restriktionsenzyme dargestellt sind.

[0044] **Fig.** 2 zeigt die Aminosäuresequenz und die Nucleinsäuresequenz für Protein LG.

[0045] **Fig.** 3 stellt eine schematische Gesamtansicht der Herstellung von Protein L dar.

[0046] **Fig.** 4 stellt eine schematische Gesamtansicht der Herstellung von Protein LG dar.

[0047] **Fig.** 5a, 5b und 5c stellen schematische Gesamtansichten der Herstellung der Hybridproteine LA, LM bzw. LH dar.

[0048] **Fig.** 6 stellt eine schematische Gesamtansicht von Protein A, G, H und M1 dar. IgGFc-Bindungsdomänen für Protein A: E, D, A, B und C; für Protein G: C1, C2 und C3; für Protein H: A und/oder B; und für Protein M1: A, B1, B2, B3 und S.

[0049] **Fig.** 7 zeigt die Aminosäuresequenz und die Nucleinsäuresequenz für Protein M1.

[0050] **Fig.** 8 zeigt den Western Blot für Protein G, L und LG mit bestimmten Immunoglobulinen und Immunoglobulinfragmenten.

[0051] **Fig.** 9 zeigt einen Slot-Blot für Protein L, G und LG mit IgG, Igχ und Ig Fc.

[0052] Die Aminosäuresequenz und die Nucleinsäuresequenz der an die leichten Ketten bindenden Domänen von Protein L sind in Anspruch 1 bzw. Anspruch 2 dargestellt.

[0053] Es ist darauf hinzuweisen, daß die Zeichnungen nicht maßstabsgetreu sind.

Beispiel 1

Klonierung und Expression der an die leichten IgG-Ketten bindenden Domänen in Protein L

Konstruktion von synthetischen Oligonucleotiden (Primern) für Amplifikationssegeuenzen, die für Protein L, Domäne B1–B4, kodieren.

[0054] Es wurde festgestellt, daß ein Protein L-Peptid (exprimiert in E. coli), das aus der Sequenz ala-val-glu-asn-Domäne B1 (von Protein L) konstruiert ist, an die leichten Ketten der Immunoglobuline bindet (W. Kastern, U. Sjöbring und L. Björck, Structure of peptostreptococcal protein L and identification of a repeated immunoglobulin light chainbinding domain, J. Biol. Chem. (1992, im Druck). Da diese einfache Protein L-Domäne eine relativ geringe Affinität gegenüber Ig aufweist ($1 \times 10^{10}\ M^{-1}$) und da das natürlich vorkommende Protein L, das aus mehreren, wechselseitig ähnlichen Domänen (B1-B5) konstruiert ist, eine hohe Affinität gegenüber Ig besitzt ($1 \times 10^{10}\ M^{-1}$), wurden vier dieser Domänen miteinander auf folgende Weise exprimiert:

PL-N und PL-C1 sind synthetische Oligonucleotide (hergestellt in der biomolekularen Abteilung der Lund-Universität (Schweden) gemäß den Anagaben des Anmelders), die zur Amplifikation eines klonierbaren Genfragments verwendet werden, das durch PCR amplifiziert wird und das für vier Ig-bindende Protein L-Domänen kodiert (ala-val-glu-asn-B1-B2-B3-B4-lys-lys-val-asp-glu-lys-pro-glu-glu). Die Aminosäuren in der Protein-L-Sequenz sind für den Primer, der dem kodierten Strang entspricht, angegeben (PL-N):

PL-N: 5'-GCTCAGGCGGCGCCGGTAGAAAATAAAGAAGAAACACCAGAAAC-3'

valgluasnlysglugluthrproglu

[0055] Das 5'-Ende dieses Oligonucleotids ist homolog mit dem kodierten Strang im Protein L-Gen. Den Kodons, die für die letzten drei Aminosäuren in der A-Domäne (val-glu-asn) kodieren, folgen die Kodons für die ersten sechs Aminosäuren in der ersten der Ig-bindenden Domänen in Protein L (B1).

PL-C1: 5'-CAGCAGCAGGATTCTTATTATTCTTCTGGTTTTTCGTCAACTTT CTT-3'

[0056] Dieses Oligonucleotid ist homolog mit dem gegenüberliegenden, nicht-kodierenden Strang im Gen für Protein L (die Sequenz entspricht den ersten neun Aminosäuren in der Domäne B5).

[0057] DNA-Fragmente, die mit Hilfe von PL-N amplifiziert worden sind, enthalten die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym HpaII unmittelbar vor dem Kodon, von dem angenommen wird, daß es für die erste Aminosäure (val) im exprimierten Protein L-Fragment kodiert. Das Fragment, das mit HpaII gespalten worden ist, kann mit DNA (in diesem Fall aus dem verwendeten Expressionsvektor pHD389 bestehend), die mit dem Restriktionsenzym NarI gespalten worden ist, ligiert werden. Das DNA-Fragment, das mit HpaII gespalten und mit dem Vektor pHD389 (gespalten mit NarI) ligiert worden ist, wird in den entsprechenden Leseraster translatiert. Die Konstruktion führt zur Translation einer zusätzlichen Aminosäure (ala) unmittelbar vor der ersten Aminosäure in Protein L.

[0058] DNA-Fragmente, die mit Hilfe von PL-C1 amplifiziert worden sind, enthalten die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BamHI (in der Sequenz mit einem Überstrich versehen) unmittelbar nach der Sequenz, die für die letzte Aminosäure im exprimierten Protein L-Fragment (glu) kodiert. Der Vektor pHD389 enthält eine einzige Erkennungssequenz für BamHI als Teil seiner sogenannten multiplen Klonierungssequenz, der sich die NarI-Erkennungssequenz anschließt. DNA-Fragmente, die mit Hilfe von PL-C1 amplifiziert worden sind, enthalten zwei sogenannte Stoppkodons, was dazu führt, daß die Translation des in den Vektor inserierten Fragments aufhört.

[0059] Die zur Amplifikation in Betracht kommende Sequenz enthält keine internen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme HpaII oder BamHI.

Amplifizierungs- und Klonierungsverfahren

[0060] Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde gemäß den Angaben von R. Saiki, D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis und H. Erlich, Primer-directed, enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, Science Bd. 239 (1988), S. 487–491) durchgeführt. Die PCR wurde in einem Hybaid Intelligent-Heizblock (Teddington, UK) durchgeführt: 100 µl eines Reaktionsgemisches enthielten 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 100 µg/ml Gelatine, 300 µM der einzelnen Desoxynucleotide (dAPT, dCTP, dGTP, dTTP) (Pharmacia) 20 pmol der Oligonucleotide PL-N und PL-C1, 10 µl einer Lösung der Ziel-DNA (Matrizen-DNA) mit einem Gehalt an 0,1 mg/ml chromosomaler DNA aus Peptostreptococcus magnus, Spezies 312. Das Gemisch wurde mit Mineralöl (Sigma) abgedeckt. DNA wurde durch 10-minütiges Erwärmen auf 98°C denaturiert. 2,5 Einheiten AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) wurden zugegeben und die PCR wurde in 25 Zyklen durchgeführt, die jeweils aus einer 1-minütigen Denaturierungsstufe bei 94°C, einer anschließenden 1-minütigen Hybridisierungsstufe bei 56°C und schließlich einer 1-minütigen Erweiterungsstufe bei 72°C bestanden. Amplifizierte DNA wurde durch Elektrophorese in Agarosegel analysiert. Die amplifizierte DNA wurde mit den Restriktionsenzymen HpaII (Promega) (8 Einheiten/µg amplifizierte DNA) und BamHI (Promega) (10 Einheiten/µg amplifizierte DNA) bei 37°C gespalten. Das auf diese Weise amplifizierte und anschließend gespaltene DNA-Produkt wurde durch Elektrophorese in einem 2%igen (Gewicht/Volumen) Agarosegel (NuSieve Agarose, FMC Bioproducts) in einem TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, pH-Wert 8,0) isoliert. Das erhaltene Fragment mit einer Größe von 930 Basenpaaren wurde aus dem Gel geschnitten. Die DNA-Konzentration in dem auf diese Weise entfernten Gelstück wurde zu 0,05 mg/ml geschätzt. Das Agarosestück, das das gespaltene, amplifizierte Fragment enthielt, wurde in einem Wasserbad bei 65°C geschmolzen, wonach man das Fragment auf 37°C abkühlen ließ. 10 µl (0,5 µg) dieser DNA wurden in ein Halbmikroröhrchen (Sarstedt), das auf 37°C erwärmt worden war, übertragen, wonach sofort 1 µl des Vektors pHD389 zugegeben wurde und eine Spaltung mit NarI (Promega) und BamHI durchgeführt wurde. 1 µl 10 × Ligase-Puffer (Promega und 1 µl T4 DNA-Ligase (Promega, 1 Einheit/µl) wurden zugegeben. Die Ligationsreaktion wurde sodann zur Transformation des Stammes E. coli, LE392 verwendet, der mit dem Rubidium/Calciumchlorid-Verfahren gemäß Kushner (1978) kompetent gemacht worden war. Übliche molekularbiologische Verfahren wurden zur Manipulation von DNA herangezogen (J. Sambrook, E. Fritsch und T. Maniatis, Molecular cloning: A laboratory manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring

Harbor, New York (1989), USA). Bezüglich den anderen Punkten wurden die vom Hersteller der DNA-Ligase und der Restriktionsenzyme empfohlenen Spaltungs- und Ligationsbedingungen eingehalten.

Expressionssystem

[0061] Der Vektor pHD389 (vgl. **Fig.** 2) stellt eine modifizierte Variante des Plasmids pHD313 dar (H. Dalböge, E. Bech Jensen, H. Töttrup, A. Grubb, M. Abrahamson, I. Olafsson und S. Carlsen, High-level expression of active human cystatin C in Escherichia coli, Gene, Bd. 79 (1989), S. 325–332). Der Vektor, der in E. coli repliziert wird (enthält ori = Replikationsursprungsstelle aus dem Plasmid pUC19), wird so konstruiert, daß DNA-Fragmente, die in die Spaltungsstelle von NarI kloniert worden sind, stromabwärts und in unmittelbarer Nähe zum Signalpeptid (21 Aminosäuren) (aus dem Hüllprotein ompA von E. coli) transkribiert und translatiert werden. Die Translation wird durch das Kodon ATG, das für die erste Aminosäure (Methionin) im Signalpeptid kodiert, initiiert. Diese Konstruktion ermöglicht den Transport des translatierten Peptids in den periplasmatischen Raum in E. coli. Dies ist vorteilhaft, da dies die Gefahr eines Abbaus des gewünschten Produkts von Enzymen, die intrazellulär in E. coli auftreten, vermindert. Außerdem ist es einfacher, Peptide zu reinigen, die in den periplasmatischen Raum exportiert worden sind. Einzige Erkennungssequenzen (multiple Klonierungssequenzen) für mehrere andere Restriktionsenzyme, darunter EcoRI, SalI und BamHI, finden sich unmittelbar nach der NarI-Spaltungsstelle. Eine optimierte, sogenannte Shine-Dalgarno-Sequenz (auch als ribosomale Bindungsstelle, RBS, bezeichnet) findet sich 7 Nucleotide stromaufwärts vom ATG-Kodon in der Signalsequenz ompA, wobei diese optimierte Sequenz, die an eine komplementäre Sequenz in 16S-rRNA in den Ribosomen bindet, für die Initiation der Translation am richtigen Ort verantwortlich ist. Die Transkription einer derartigen DNA als solcher, die mit der Signalsequenz für ompA kotranskribiert wird, wird durch den P_R-Promotor aus dem Coliphagen λ gesteuert. Der Vektor enthält auch das Gen für cI857 aus dem Coliphagen λ, dessen Produkt die Transkription aus P_R herunterreguliert (und dessen Produkt konstitutiv exprimiert wird). Diese durch cI857 vermittelte Herunterregulierung der Transkription von P_R ist wärmeempfindlich. Die von diesem Promotor regulierte Transkription wird mit Hilfe der sogenannten rho-unabhängigen Transkriptionsterminationssequenz beendet (bildet eine Struktur in DNA, die dazu führt, daß DNA-abhängige RNA-Polymerase den DNA-Strang verläßt), die im Vektor unmittelbar stromabwärts von der multiplen Klonierungssequenz plaziert ist. Das Plasmid trägt auch das β-Lactamase-Gen (aus dem Plasmid pUC19), dessen Produkt eine Ampicillin-Selektion von E. coli-Klonen, die durch den Vektor transformiert worden sind, erlaubt.

Selektion von Protein L-bildenden Klonen

[0062] Die transformierten Bakterien wurden auf Kulturplatten mit einem LB-Medium, das ferner Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml enthält, gezüchtet. Die Züchtung der Bakterien lief über Nacht bei 30°C ab, wonach die Bakterien in einen Inkubator übertragen wurden, wo sie weitere 4 Stunden bei 42°C gezüchtet wurden. Sodann wurden die Platten über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Kolonien auf Nitrocellulosefilter übertragen. Filter und Kulturplatten wurden so markiert, daß die Identifikation der übertragenen Kolonien auf den entsprechenden Kulturplatten leicht möglich war. Sodann wurden die Kulturplatten erneut über Nacht bei 30°C inkubiert, so daß die verbleibenden Reste von übertragenen Bakterienkolonien erneut wachsen konnten. Anschließend wurden die Platten im Kühlschrank belassen. Die Bakterien in den Kolonien auf den Nitrocellulose-Eindrückstellen wurden lysiert, indem man den Filter 10 Minuten in 10% SDS inkubierte. Filter mit einem Gehalt an lysierten Bakterien wurden sodann mit einem Blockierungspuffer, der PBS (pH-Wert 7,2) mit 0,25% Gelatine und 0,25% Tween-20 (vier Bäder, jeweils 250 ml bei 37°C) enthielt, wonach der Filter mit radioaktiv markierten (markiert mit ^{125}I gemäß dem Chloramin-T-Verfahren) Ig-κ-Ketten (20 ng/ml in PBS mit 0,1% Gelatine) inkubiert wurden. Die Inkubation fand bei Raumtemperatur in einem Zeitraum von 3 Stunden statt, wonach das nicht-gebundene, radioaktiv markierte Protein mit PBS (pH-Wert 7,2) mit einem Gehalt an 0,5 M NaCl, 0,25% Gelatine und 0,25% Tween-20 (vier Bäder, jeweils 250 ml bei Raumtemperatur) ausgespült wurde. Sämtliche Filter wurden auf einen Röntgenfilm gelegt. Positive Kolonien wurden auf der ursprünglichen Kulturplatte identifiziert. Klone, die mit Ig-κ-Ketten reagierten, wurden ausgewählt und in bezug auf die Größe des DNA-Fragments, das in den Vektor eingeführt worden war, analysiert. Einer dieser Klone wurde in bezug auf die Bildung von Protein L, pHDL, selektiert. Die aus diesem Klon in das Plasmid pHD389 eingeführte DNA wurde sequenziert. Es wurde festgestellt, daß die DNA-Sequenz vollkommen mit den entsprechenden Sequenzen (B1-B4 und 21 Basen in B5) im Gen für Protein L aus Peptostreptococcus magnus Stamm 312 übereinstimmte. Die Größe und die Bindungseigenschaften des durch den Klon pHDL erzeugten Proteins wurde durch SDS-PAGE (vgl. **Fig.** 8), einen Dot-Blot-Versuch (vgl. **Fig.** 9) und durch kompetitive Bindungsversuche analysiert.

Erzeugung von Protein L

[0063] Mehrere Kolonien einer Kulturplatte mit E. coli-pHDL wurden zur Inokulation einer Vorkultur (LB-Medium unter Zugabe von 100 mg/Liter Ampicillin), die über Nacht bei 28°C gezüchtet wurde, verwendet. Am nächsten Morgen wurde die Vorkultur auf ein größeres Volumen (100-faches Volumen der Vorkultur) von frischem LB-Medium mit einem Gehalt an Ampicillin (100 mg/Liter) übertragen und in Schüttelkolben (200 U/min) (oder Fermentern) bei 28°C gezüchtet. Die Züchtungstemperatur wurde auf 40°C (Einleitung der Transkription) erhöht, nachdem der Absorptionswert bei 620 nm 0,5 erreicht hatte. Dann wurde die Züchtung 4 Stunden fortgesetzt (gilt nur für die Züchtung im Schüttelkolben). Nach Beendigung des Züchtungsvorgangs wurden die Bakterien abzentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterien durch ein osmotisches Schockverfahren bei 4°C lysiert (Dalböge et al., (1989), a. a. O.). Das Lysat wurde auf den pH-Wert 7 eingestellt. Verbleibende Bakterienreste wurden sodann abzentrifugiert, wonach der Überstand an IgG-Sepharose gemäß einem früher für Protein G und Protein L beschriebenen Verfahren gereinigt wurde (U. Sjöbring, L. Björck und W. Kastern, Streptococcal protein G: Gene structure and protein binding properties, J. Biol. Chem., Bd. 266 (1991), S. 399–405; und W. Kastern, U. Sjöbring und L. Björck, Structure of peptostreptococcal protein L and identification of a repeated immunoglobulin light chain-binding domain, J. Biol. Chem. (1992) im Druck.
[0064] Das Expressionssystem ergab etwa 20 mg/Liter Protein L bei Züchtung in Schüttelkolben. Die Kultur wurde bei DSSM unter der Hinterlegungs-Nr. DSSM E. coli LE392/pHDL hinterlegt.

Beispiel 2

Klonierung und Expression von Protein LG

Konstruktion von Oligonucleotiden (Primern) für Amplifikationssequenzen, die für Protein LG kodieren.

Protein L

[0065] Es wurde festgestellt, daß ein Protein-L-Peptid (exprimiert in E. coli), das aus der Sequenz ala-val-glu-asn-Domäne B1 (aus Protein L) konstruiert war, an die leichten Ketten der Immunoglobuline bindet (Kastern, Sjöbring und Björck, J. Biol. Chem. (1992), im Druck). Da die Affinität dieser einfachen Domäne an Ig relativ nieder ist (1×10^{10} M^{-1}) und da das natürlich auftretende Protein L, das aus mehreren wechselseitig ähnlichen Domänen (B1-B5) besteht, eine höhere Affinität an Ig (1×10^{10} M^{-1}) aufweist, wurden vier dieser Domänen miteinander auf folgende Weise exprimiert:
PL-N und PL-C2 (synthetische Oligonucleotide, die in der Abteilung für Molekularbiologie an der Universität Lund (Schweden) gemäß den Anweisungen des Anmelders hergestellt worden waren) sind synthetische Oligonucleotide, die unter Zuhilfenahme von PCR zur Amplifikation eines klonierbaren Genfragments mit der Bezeichnung B1-4 verwendet wurden. Dieses Fragment kodiert für vier Ig-bindende Protein-L-Domänen (ala-val-glu-asn-B1-B2-B3-B4-lys-lys-val-asp-glu-lys-pro-glu-glu):

PL-N: 5′-GCTCAGGCGGCGCCGGTAGAAAATAAAGAAGAAACACCAGAAAC-3′

valgluasnlysglugluthrproglu

Pl-C2: 5′-CAGCAGCAGCCATGGGTTCTTCTGGTTTTTCGTCAACTTTCTTA-3′

[0066] Aminosäuren sind unter den entsprechenden Tripletts im kodierten Strang angegeben. DNA-Fragmente, die mit Hilfe von PL-N amplifiziert worden sind, enthalten die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym HpaII unmittelbar stromaufwärts vom Triplett, das für die erste Aminosäure (val) im exprimierten Protein L-Fragment kodiert. Das Fragment, das mit HpaII gespalten worden ist, kann mit DNA ligiert werden (in diesem Fall wird der Expressionsvektor pHD389) verwendet, die mit NarI gespalten worden ist. Die Konstruktion führt zur Translation einer zusätzlichen Aminosäure (ala) unmittelbar stromaufwärts von der ersten Aminosäure im Protein L-Fragment. Das DNA-Fragment, das mit Hilfe von PL-C2 amplifiziert worden ist, enthält die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NcoI unmittelbar stromabwärts von der Sequenz, die für die letzte Aminosäure im exprimierten Protein L-Fragment (glu) kodiert. Amplifizierte Fragmente, die mit NcoI gespalten worden sind, können mit dem NcoI-gespaltenen, durch PCR erzeugten Protein-asp-CDC-met-Fragment ligiert werden (vgl. die nachstehenden Ausführungen).

Protein G

[0067] Es ist bekannt, daß eine einfache C-Domäne aus Protein G an IgG bindet (B. Guss, M. Eliasson, A. Olsson, M. Uhlen, A. -K. Frej, H. Jörnvall, I. Flock und M. Lindberg, Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G, EMBO J., Bd. 5 (1986), S. 1567–1575). Die Stärke, mit der eine einfach C-Domäne an IgG bindet, ist relativ gering ($5 \times 10^7\ M^{-1}$). Ein Fragment, das aus zwei C-Domänen mit einer dazwischenliegenden D-Region mit einer Länge von 15 Aminosäuren besteht, weist jedoch eine erheblich höhere Affinität in bezug auf IgG auf ($1 \times 10^9\ M^{-1}$). CDC-N und CDC-C sind Oligonucleotide, die als PCR-Primer zur Amplifikation eines klonierbaren DNA-Fragments mit der Bezeichnung CDC verwendet wurden, das für zwei IgG-bindende Protein-G-Domänen (pro-metasp-CDC-met) kodiert.

CDC-N: GGCCATGGACACTTACAAATTAATCCTTAATGGT
metaspthrtyrlysleuileleuasngly

CDC-C: CAGGTCGACTTATTACATTTCAGTTACCGTAAAGGTCTTAGT

[0068] Aminosäuren in der erhaltenen Sequenz sind unter dem Primer des Kodierungsstrangs angegeben. DNA-Fragmente, die mit Hilfe von CDC-N amplifiziert worden sind, enthalten die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NcoI (mit einer Linie oberhalb der Sequenz markiert). Gespaltene, amplifizierte Fragmente können mit dem Fragment ligiert werden, das mit Hilfe von PL-C2 amplifiziert und sodann mit NcoI gespalten worden ist. Das Fragment wird dabei in den korrekten Leseraster translatiert. DNA-Fragmente, die mit Hilfe von CDC-C amplifiziert worden sind, enthalten zwei sogenannte Stoppkodons, die die Translation beenden. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym SalI (durch eine Linie oberhalb der Sequenz markiert) folgt unmittelbar anschließend, wobei diese Sequenz auch im Expressionsvektor pHD389 gefunden wird (vgl. **Fig.** 1).

[0069] Die Sequenzen, die für die Bindungseigenschaften von Protein L (B1–B5) bzw. für Protein G (CDC) kodieren, enthalten keine internen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme HpaII, SalI oder NcoI.

Amplifikations- und Klonierungsverfaren

[0070] Eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde gemäß den Angaben von Saiki et al. (1988) durchgeführt. Die PCR wurde in einem Hybaid Intelligent-Heizblock (Teddington, UK) durchgeführt: 100 µl des Reaktionsgemisches enthielten 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 100 µg/ml Gelatine, jeweils 300 µM der einzelnen Desoxynucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Pharmacia). Um Sequenzen zu amplifizieren, die für die an leichte Ketten bindenden Teile von Protein L kodieren, wurden jeweils 20 pmol der Oligonucleotide PL-N und PL-C2 sowie 10 µl einer DNA-Lösung, die 0,1 mg/ml chromosomale DNA aus Peptostreptococcus magnus, Stamm 312 enthielt, zugesetzt. Als Alternative wurden zu jedem Oligonucleotid-Paar 20 pmol CDC-N und CDC-C und 10 µl einer DNA-Lösung, die 0,1 mg/ml chromosomale DNA aus einem Streptococcus-Stamm der Gruppe C (Streptococcus equisimilis) mit der Bezeichnung C40 (U. Sjöbring, L. Björck und W. Kastern, Streptococcal protein G: Gene structure and protein binding properties, J. Biol. Chem., Bd. 266 (1991), S. 399–405) oder mit NcoI und SalI (10 U/µg PCR-Produkt) (für CDC) bei 37°C versetzt. Die auf diese Weise amplifizierten und anschließend gespaltenen DNA-Fragmente wurden sodann durch Elektrophorese in einem 2%igen (Gew./Vol.) Agarosegel (NuSieve-Agarose, FCM Bioproducts) in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH-Wert 8,0) getrennt. Die erhaltenen Fragmente mit 930 bp (für B1-4) und 390 bp (für CDC) wurden aus dem Gel geschnitten. Die Konzentration an DNA in den auf diese Weise abgetrennten Gelstücken wurde zu 0,05 mg/ml bestimmt. Die aus dem Gel geschnittenen Agarosestücke, die die gespaltenen, amplifizierten Fragmente (B1-4 und CDC) enthielten, wurden in einem Wasserbad bei 65°C geschmolzen, wonach sie auf 37°C abgekühlt wurden. 10 µl (0,5 µg) dieser DNA wurden in ein Halbmikroröhrchen (Sarstedt) übertragen, auf 37°C vorgewärmt und anschließend mit 1 µl des Vektors pHD389, der mit NarI und SalI gespalten worden war, versetzt. 1 µl 10 × Ligase-Puffer (Promega) und 1 µl T4 DNA-Ligase (1 Einheit/µl) wurden ebenfalls zugegeben. Man ließ die Ligationsreaktion 6 Stunden bei 37°C ablaufen. Die vom Hersteller der DNA-Ligase und der Restriktionsenzyme (Promega) empfohlenen Spaltungs- und Ligationsbedingungen wurden ansonsten eingehalten. Die Ligationsreaktion wurde sodann zur Transformation von E. coli-Stamm LE392 herangezogen, der gemäß dem Rubidiumchlorid/Calciumdichlorid-Verfahren von Kushner (1978) kompetent gemacht worden war. Eine Manipulation von DNA wurde gemäß üblichen molekularbiologischen Verfahren durchgeführt (Sambrook et al., 1989).

Expressionssystem

[0071] Der Vektor pHD389 (vgl. **Fig.** 2) stellt eine modifizierte Variante des Plasmids pHD313 (Dalböge et al.,

1989) dar. Der Vektor, der in E. coli (enthält die Replikationsursprungsstelle aus dem Plasmid pUC19) repliziert worden war, wurde so konstruiert, daß DNA-Fragmente, die in die Spaltungsstelle für NarI kloniert worden waren unmittelbar danach oder stromabwärts vom Signalpeptid (21 Aminosäuren) aus dem Hüllprotein ompA von E. coli exprimiert werden. Eine Translation wird vom ATG-Kodon, das für die erste Aminosäure (Methionin) im Signalpeptid kodiert, initiiert. Die Konstruktion mit einer E. coli-individuellen Signalsequenz, die dem angestrebten Peptid vorausgeht, ermöglicht den Transport des translatierten Peptids in den periplasmatischen Raum von E. coli. Dies ist günstig, da dadurch die Gefahr eines Abbaus des gewünschten Produkts durch intrazellulär auftretende Enzyme von E. coli verringert wird. Ferner ist es einfacher, Peptide zu reinigen, die in den periplasmatischen Raum exportiert worden sind. Einzige Erkennungssequenzen (multiple Klonierungssequenzen) für mehrere andere Restriktionsenzyme, darunter EcoRI, SalI und BamHI, sind unmittelbar stromabwärts von der NarI-Spaltungsstelle vorhanden. Eine optimierte, sogenannte Shine-Dalgarno-Sequenz (auch als ribosomale Bindungsstelle, RBS, bezeichnet) findet sich 7 Nucleotide stromaufwärts vom ATG-Kodon in der Signalsequenz von ompA, wobei diese optimierte Shine-Dalgarno-Sequenz an eine komplementäre Sequenz in 16S-rRNA in den Ribosomen auf solche Weise bindet, daß festgestellt werden kann, daß die Translation am richtigen Ort initiiert worden ist. Die Transkription einer derartigen DNA als solcher, die mit der Signalsequenz für ompA kotranskribiert wird, wird durch den P_R-Promotor aus dem Coliphagen λ gesteuert. Der Vektor enthält auch das Gen für cI857 aus dem Coliphagen λ, dessen Produkt die Transkription von PR herunterreguliert und dessen Produkt konstitutiv exprimiert wird. Diese durch cI857 vermittelte Herrunterregulierung der Transkription von PR ist wärmeempfindlich. Die Transkription (die reguliert odergesteuert wird) dieses Promotors wird mit Hilfe der sogenannten rho-unabhängigen Transkriptionsterminationssequenz, die in den Vektor unmittelbar stromabwärts von der multiplen Klonierungsstelle inseriert ist, beendet. Das Plasmid trägt ferner das Gen für R-Lactamase (aus dem Plasmid pUC19), dessen Produkt eine Ampicillin-Selektion von E. coli-Klonen, die mit dem Vektor transformiert worden sind, ermöglicht.

Selektion von Protein LG erzeugenden Klonen

[0072] Die transformierten Bakterien wurden sodann auf Kulturplatten mit LB-Medium, das ferner Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml enthielt, gezüchtet. Die Bakterien wurden über Nacht bei 30°C gezüchtet, wonach sie in eine Züchtungskammer (42°C) gebracht und weitere 4 Stunden gezüchtet wurden. Die Platten wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Kolonien auf Nitrocellulosefilter übertragen. Die Filter und Kulturplatten wurden markiert, so daß später die übertragenen Kolonien auf der Kulturplatte identifiziert werden konnten. Die Kulturplatten wurden erneut über Nacht bei 30°C inkubiert, so daß Reste von transfizierten Bakterienkolonien, die auf den Platten verblieben waren, wieder wachsen konnten. Sodann wurden die Platten im Kühlschrank aufbewahrt. Der Filter wurde 10 Minuten in 10% SDS inkubiert, um die Bakterien in den Kolonien auf den Nitrocellulose-Eindrückstellen zu lysieren. Filter mit einem Gehalt an lysierten Bakterien wurden sodann mit einem Blockierungspuffer, der aus PBS (pH-Wert 7,2) mit einem Gehalt an 0,25% Gelatine und 0,25% Tween-20 bestand, gespült (vier Bäder von 250 ml mit 37°C), wonach die Filter über Nacht mit radioaktiv markierten (markiert mit ^{125}I gemäß dem Chloramin-T-Verfahren) Ig-κ-Ketten (20 ng/ml) in PBS mit 0,1% Gelatine inkubiert wurden. Das Inkubationsverfahren fand vier Stunden bei Raumtemperatur statt, wonach das nicht-gebundene, radioaktiv markierte Protein mit PBS (pH-Wert 7,2) mit einem Gehalt an 0,5 M NaCl, 0,25% Gelatine und 0,25% Tween-20 ausgespült wurde (vier Bäder, jeweils 250 ml bei Raumtemperatur). Sämtliche Filter wurden auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Positive Kolonien auf der ursprünglichen Kulturplatte wurden identifiziert. Eine Anzahl von positiven Kolonien wurden erneut auf neuen Platten gezüchtet. Neue Kolonien-Blot-Versuche wurden mit diesen Platten als Ausgangsmaterial durchgeführt, mit dem Zweck, E. coli-Kolonien, die IgG Fc binden, zu identifizieren. Dieses Tests wurden auf genau die gleiche Weise durchgeführt, wie sie vorstehend in Bezug auf die Identifizierung von E. coli-Kolonien beschrieben wurden, die an leichte Ketten von Ig bindendes Protein exprimierten, mit der Ausnahme, daß radioaktiv markiertes (^{125}I) IgG Fc (20 ng/ml) als Sonde verwendet wurde. Klone, die mit beiden Proteinen reagierten, wurden selektiert und bezüglich der Größe des in den Vektor eingeführten DNA-Fragments analysiert. Einer dieser Klone wurde zur Erzeugung von Protein LG verwendet, nämlich pHDLG. Die aus diesem Klon entnommene und in das Plasmid pHD389 eingeführte DNA wurde sequenziert. Die DNA-Sequenz stimmte vollständig mit den entsprechenden Sequenzen (B1-B4 und 21 Basen in B5) im Gen für Protein L aus Peptostreptococcus magnus Stamm 312 und mit der C1DC2-Sequenz im Gruppe C-Streptococcus-Stamm C40 überein. Die Größe und die Bindungseigenschaften des aus dem Klon pHDLG erzeugten Proteins wurden durch SDS-PAGE (vgl. **Fig.** 8), einen Dot-Blot-Versuch (vgl. **Fig.** 10) und kompetitive Bindungsversuche analysiert.

Erzeugung von Protein LG

[0073] Mehrere Kolonien aus einer Kulturplatte mit E. coli-pHDLG wurden zur Inokulation einer Vorkultur (LB-Medium unter Zugabe von 100 mg/Liter Ampicillin) verwendet und über Nacht bei 28°C gezüchtet. Am

nächsten Morgen wurde die Vorkultur auf ein größeres Volumen (100-faches Volumen der Vorkultur) an frischem LB-Medium mit einem Gehalt an Ampicillin (100 mg/Liter) übertragen und in vibrierenden Kolben (200 U/min) (oder Fermentern) bei 28°C gezüchtet. Nach Erreichen eines Absorptionswerts von 0,5 bei 620 nm wurde die Züchtungstemperatur auf 40°C erhöht (Induktion der Transkription). Das Züchtungsverfahren wurde sodann 4 Stunden fortgesetzt (gilt nur für die Züchtung in vibrierenden Kolben). Sodann wurden die Bakterien nach Beendigung des Züchtungsvorgangs abzentrifugiert. Die Bakterien wurden anschließend bei 4°C durch ein osmotisches Schockverfahren lysiert (Dalböge et al., 1989). Das Lysat wurde auf den pH-Wert 7 eingestellt. Verbleibende Bakterien wurden abzentrifugiert. Der Überstand wurde an IgG-Sepharose gemäß den früher gemachten Angaben für Protein G und Protein L gereinigt (Sjöbring et al., 1991, Kastern et al., 1992).

[0074] Das Expressionssystem ergab etwa 30 mg/Liter Protein LG bei Züchtung in vibrierenden Kolben. Es wurde eine Hinterlegung bei DSSM mit der Hinterlegungsbezeichnung DSSM E. coli LE392/pHDLG durchgeführt.

Beispiel 3

Analyse der Bindungseigenschaften von Protein LG

Western-Blot

[0075] Protein G (das C1D2-Fragment), Protein L (vier B-Domänen) und Protein LG wurden mit SDS-PAGE (10% Acrylamid-Konzentration) isoliert. Die isolierten Proteine wurden in drei ähnlichen Kopien (Dreifachversuch) auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Jede dieser Membranen wurde mit radioaktiv markierten Proteinen (20 ng/ml) inkubiert. Eine der Membrankopien wurde mit humaner, polyklonaler IgG, eine weitere mit einem humanen TgG-Fc-Fragment und die dritte mit isolierten humanen IgG-χ-Ketten isoliert. Nicht-gebundene, radioaktiv markierte Proteine wurden ausgespült. Sämtliche Filter wurden auf einen Röntgenfilm aufgelegt.

Slot-blot

[0076] Humane polyklonale Ig-Präparate und Ig-Fragmente wurden mit Hilfe von Slot-Blot-Geräten auf Nitrocellulose-Filter in gegebenen Mengen in drei ähnlichen Kopien aufgebracht (vgl. **Fig.** 10). Jede dieser Membranen wurde mit radioaktiv markierten Proteinen (20 ng/ml) inokuliert. Eine der Membrankopien wurde mit Protein LG, eine weitere mit Protein L und die dritte mit Protein G inkubiert. Nicht-gebundene, radioaktiv markierte Proteine wurden weggespült. Sämtliche Filter wurden sodann auf Röntgenfilme aufgelegt.

[0077] Die Ergebnisse sind in den **Fig.** 9 und 10 dargestellt.

[0078] Bei weiteren Bindungsversuchen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Tabelle
Bindung der Proteine G, L und LG an Immunoglobuline

Bindungsprotein:	**G**	**K_a**	**L**	**K_a**	**LG**	**K_a**
Immunoglobulin						
Human:						
Polyklonales IgG*	+	67 (10)	+	9,0	+	20
IgG-Unterklassen						
IgG_1	+	2,0	+		+	
IgG_2	+	3,1	+		+	
IgG_3	+	6,1	+		+	
IgG 4	+	4,7	+		+	
IgG-Fragment						
Fc*	+	6,0 (0,5)	-		+	+
$F(ab')_2$*	+	0,4 (0,2)	+		+	
kappa	-		+	1,5	+	
lambda	-		(-)#			
Weitere Ig-Klassen						
IgM	-		+	11,6	+	
IgA	-		+	10,4	+	
IgE	-		+		+	
IgD	-					
Weitere Spezies						
Polyklonal						
Affe	+		+		+	
Kaninchen IgG	+	70		+	0,074	+
IgG-Fc	+	3,0		-		+
$IgG\text{-}F(ab')_2$	+	0,44				+
Maus	+	41	+	2,6	+	
Ratte	+	1,5	+	0,39	+	
Ziege	+	14	-		+	

Tabelle (Fortsetzung)
Bindung der Proteine G, L und LG an Immunoglobuline

Bindungsprotein:	**G**	**K_a**	**L**	**K_a**	**LG**	**K_a**
Immunoglobulin						
Rind IgG_1	+	3	-		+	
IgG_2	+	2	-		+	
Pferd	+		-		+	
Meerschweinchen	+		+		+	
Schaf	+		-		+	
Hund	+		-		+	
Schwein	+		+		+	
Hamster	+					
Katze	-		-			
Huhn	-		-			
Monoklonal[&]						
Maus IgG_1	+		+		+	
IgG_{2a}	+		+		+	
IgG_{2b}	+				+	
IgG_3	+				+	
IgM	-		+		+	
IgA	-		+		+	
Ratte IgG_{2a}	+		+		+	
IgG_{2b}	+				+	
IgG_{2c}	+				+	

K_a = Affinitätskonstante (M^{-1}).

* Die Ziffern in Klammern geben die Affinität eines rekombinanten Proteins G aus zwei IgG-bindenden Domänen an.

Eine schwache Bindung an lamda-Ketten existiert.

& Die Bindung an P1 und PLG hängt vom Typ der leichten Kette von Ig ab.

Somit ist ersichtlich, daß das synthetisierte Hybridprotein LG eine breite Bindungsaktivität/Spezifität aufweist.

SEQUENZPROTOROLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: HighTech Receptro AB

(B) STRASSE: c/o Active, Skeppsbron 2

(C) ORT: MALMÖ

(E) LAND: Schweden

(F) POSTLEITZAHL: 211 20

(G) TELEFON: 040/35 07 00

(H) TELEFAX: 040/23 74 05

(I) TELEX: 32637 Active S

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Hybridprotein

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 1

(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy Disk

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(v) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: SE PCT/SE93/00375

(vi) DATEN DER VORANMELDUNG:

(A): ANMELDENUMMER: SE 9201331-7

(B): ANMELDETAG: 28. April 1992

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 305 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Escherichia coli LE392/pHDL, DSM 7054

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
Ala Val Glu Asn Lys Glu Glu Thr Pro Glu Thr Pro Glu Thr Asp Ser
1               5                  10                  15

Glu Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Phe Ala Asn Gly Ser
            20                  25                  30

Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Lys Ala Thr Ser Glu
        35                  40                  45

Ala Tyr Ala Tyr Ala Asp Thr Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr
    50                  55                  60

Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly
65                  70                  75                  80

Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala
                85                  90                  95

Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly
            100                 105                 110

Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu
        115                 120                 125

Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr
    130                 135                 140

Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro
145                 150                 155                 160

Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys
                165                 170                 175

Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu
            180                 185                 190

Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr Thr
        195                 200                 205

Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly
    210                 215                 220

Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala
225                 230                 235                 240

Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly
                245                 250                 255

Thr Phe Ala Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu
            260                 265                 270

Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly Tyr
        275                 280                 285

Thr Ile Asn Ile Arg Phe Ala Gly Lys Lys Val Asp Glu Lys Pro Glu
    290                 295                 300

Glu
305
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 921 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Escherichia coli LE392/pHDL, DSM 7054

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GCGGTAGAAA ATAAAGAAGA AACACCAGAA ACACCAGAAA CTGATTCAGA 50

AGAAGAAGTA ACAATCAAAG CTAACCTAAT CTTTGCAAAT GGAAGCACAC 100

AAACTGCAGA ATTCAAAGGA ACATTTGAAA AAGCAACATC AGAAGCTTAT 150

GCGTATGCAG ATACTTTGAA GAAAGACAAT GGAGAATATA CTGTAGATGT 200

TGCAGATAAA GGTTATACTT TAAATATTAA ATTTGCTGGA AAAGAAAAAA 250

CACCAGAAGA ACCAAAAGAA GAAGTTACTA TTAAAGCAAA CTTAATCTAT 300

GCAGATGGAA AAACACAAAC AGCAGAATTC AAAGGAACAT TTGAAGAAGC 350

AACAGCAGAA GCATACAGAT ATGCAGATGC ATTAAAGAAG GACAATGGAG 400

AATATACAGT AGACGTTGCA GATAAAGGTT ATACTTTAAA TATTAAATTT 450

GCTGGAAAAG AAAAAACACC AGAAGAACCA AAAGAAGAAG TTACTATTAA 500

AGCAAACTTA ATCTATGCAG ATGGAAAAAC ACAAACAGCA GAATTCAAAG 550

GAACATTTGA AGAAGCAACA GCAGAAGCAT ACAGATATGC TGACTTATTA 600

GCAAAAGAAA ATGGTAAATA TACAGTAGAC GTTGCAGATA AAGGTTATAC 650

TTTAAATATT AAATTTGCTG GAAAAGAAAA AACACCAGAA GAACCAAAAG 700

AAGAAGTTAC TATTAAAGCA AACTTAATCT ATGCAGATGG AAAAACTCAA 750

ACAGCAGAGT TCAAAGGAAC ATTTGCAGAA GCAACAGCAG AAGCATACAG 800

ATACGCTGAC TTATTAGCAA AAGAAAATGG TAAATATACA GCAGACTTAG 850

AAGATGGTGG ATACACTATT AATATTAGAT TTGCAGGTAA GAAAGTTGAC 900

GAAAAACCAG AAGAATAATA A 921

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 434 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Escherichia coli LE392/pHDL, DSM 7055

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Ala Val Glu Asn Lys Glu Glu Thr Pro Glu Thr Pro Glu Thr Asp Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Phe Ala Asn Gly Ser
20 25 30

Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Lys Ala Thr Ser Glu
35 40 45

Ala Tyr Ala Tyr Ala Asp Thr Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr
50 55 60

Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly
65 70 75 80

Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala
85 90 95

Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly
100 105 110

Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu
115 120 125

Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr
130 135 140

Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro
145 150 155 160

Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys
165 170 175

Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu
180 185 190

Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr Thr
195 200 205

Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly
210 215 220

Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala
225 230 235 240

Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly
245 250 255

Thr Phe Ala Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu
260 265 270

Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly Tyr
275 280 285

Thr Ile Asn Ile Arg Phe Ala Gly Lys Lys Val Asp Glu Lys Pro Glu
290 295 300

Glu Pro Met Asp Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Asn Gly Lys Thr Leu Lys
305 310 315 320

Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val
325 330 335

Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr
340 345 350

Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile
355 360 365

Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile
370 375 380

Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala
385 390 395 400

Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val
405 410 415

Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr
420 425 430

Glu Met

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1308 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Escherichia coli LE392/pHDL, DSM 7055

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GCGGTAGAAA ATAAAGAAGA AACACCAGAA ACACCAGAAA CTGATTCAGA 50

AGAAGAAGTA ACAATCAAAG CTAACCTAAT CTTTGCAAAT GGAAGCACAC 100

AAACTGCAGA ATTCAAAGGA ACATTTGAAA AAGCAACATC AGAAGCTTAT 150

GCGTATGCAG ATACTTTGAA GAAAGACAAT GGAGAATATA CTGTAGATGT 200

```
TGCAGATAAA GGTTATACTT TAAATATTAA ATTTGCTGGA AAAGAAAAAA      250
CACCAGAAGA ACCAAAAGAA GAAGTTACTA TTAAAGCAAA CTTAATCTAT      300
GCAGATGGAA AAACACAAAC AGCAGAATTC AAAGGAACAT TTGAAGAAGC      350
AACAGCAGAA GCATACAGAT ATGCAGATGC ATTAAAGAAG GACAATGGAG      400
AATATACAGT AGACGTTGCA GATAAAGGTT ATACTTTAAA TATTAAATTT      450
GCTGGAAAAG AAAAAACACC AGAAGAACCA AAAGAAGAAG TTACTATTAA      500
AGCAAACTTA ATCTATGCAG ATGGAAAAAC ACAAACAGCA GAATTCAAAG      550
GAACATTTGA AGAAGCAACA GCAGAAGCAT ACAGATATGC TGACTTATTA      600
GCAAAAGAAA ATGGTAAATA TACAGTAGAC GTTGCAGATA AAGGTTATAC      650
TTTAAATATT AAATTTGCTG GAAAAGAAAA AACACCAGAA GAACCAAAAG      700
AAGAAGTTAC TATTAAAGCA AACTTAATCT ATGCAGATGG AAAAACTCAA      750
ACAGCAGAGT TCAAAGGAAC ATTTGCAGAA GCAACAGCAG AAGCATACAG      800
ATACGCTGAC TTATTAGCAA AAGAAAATGG TAAATATACA GCAGACTTAG      850
AAGATGGTGG ATACACTATT AATATTAGAT TTGCAGGTAA GAAAGTTGAC      900
GAAAAACCAG AAGAACCCAT GGACACTTAC AAATTAATCC TTAATGGTAA      950
AACATTGAAA GGCGAAACAA CTACTGAAGC TGTTGATGCT GCTACTGCAG     1000
AAAAAGTCTT CAAACAATAC GCTAACGACA ACGGTGTTGA CGGTGAATGG     1050
ACTTACGACG ATGCGACTAA GACCTTTACA GTTACTGAAA AACCAGAAGT     1100
GATCGATGCG TCTGAATTAA CACCAGCCGT GACAACTTAC AAACTTGTTA     1150
TTAATGGTAA AACATTGAAA GGCGAAACAA CTACTAAAGC AGTAGACGCA     1200
GAAACTGCAG AAAAAGCCTT CAAACAATAC GCTAACGACA ACGGTGTTGA     1250
TGGTGTTTGG ACTTATGATG ATGCGACTAA GACCTTTACG GTAACTGAAA     1300
TGTAATAA                                                  1308
```

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, die ein Protein mit der Fähigkeit zur Bindung einer leichten Kette von Immunglobulin codiert, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie die Nucleotidsequenz:
(a)

```
GCG GTA GAA AAT AAA GAA GAA ACA CCA GAA ACA CCA GAA ACT GAT TCA   48
GAA GAA GAA GTA ACA ATC AAA GCT AAC CTA ATC TTT GCA AAT GGA AGC   96
ACA CAA ACT GCA GAA TTC AAA GGA ACA TTT GAA AAA GCA ACA TCA GAA  144
GCT TAT GCG TAT GCA GAT ACT TTG AAG AAA GAC AAT GGA GAA TAT ACT  192
GTA GAT GTT GCA GAT AAA GGT TAT ACT TTA AAT ATT AAA TTT GCT GGA  240
AAA GAA AAA ACA CCA GAA GAA CCA AAA GAA GAA GTT ACT ATT AAA GCA  288
AAC TTA ATC TAT GCA GAT GGA AAA ACA CAA ACA GCA GAA TTC AAA GGA  336
ACA TTT GAA GAA GCA ACA GCA GAA GCA TAC AGA TAT GCA GAT GCA TTA  384
AAG AAG GAC AAT GGA GAA TAT ACA GTA GAC GTT GCA GAT AAA GGT TAT  432
ACT TTA AAT ATT AAA TTT GCT GGA AAA GAA AAA ACA CCA GAA GAA CCA  480
AAA GAA GAA GTT ACT ATT AAA GCA AAC TTA ATC TAT GCA GAT GGA AAA  528
ACA CAA ACA GCA GAA TTC AAA GGA ACA TTT GAA GAA GCA ACA GCA GAA  576
GCA TAC AGA TAT GCT GAC TTA TTA GCA AAA GAA AAT GGT AAA TAT ACA  624
GTA GAC GTT GCA GAT AAA GGT TAT ACT TTA AAT ATT AAA TTT GCT GGA  672
AAA GAA AAA ACA CCA GAA GAA CCA AAA GAA GAA GTT ACT ATT AAA GCA  720
AAC TTA ATC TAT GCA GAT GGA AAA ACT CAA ACA GCA GAG TTC AAA GGA  768
ACA TTT GCA GAA GCA ACA GCA GAA GCA TAC AGA TAC GCT GAC TTA TTA  816
GCA AAA GAA AAT GGT AAA TAT ACA GCA GAC TTA GAA GAT GGT GGA TAC  864
ACT ATT AAT ATT AGA TTT GCA GGT AAG AAA GTT GAC GAA AAA CCA GAA  912
GAA TAATAA                                                      921
```

oder
(b) eine Nucleotidsequenz, die unter strikten Hybridisierungsbedingungen zu dem Komplement von (a) hybridisiert und ein Protein mit der Fähigkeit zur Bindung der leichten Kette von Immunglobulin codiert, aufweist.

2. DNA-Sequenz, die ein Protein codiert, das zur Bindung der leichten Kette von Immunglobulin und der schweren Kette von Immunglobulin G in der Lage ist, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgende Nucleotidsequenz:
(a)

```
GCG GTA GAA AAT AAA GAA GAA ACA CCA GAA ACA CCA GAA ACT GAT TCA   48
GAA GAA GAA GTA ACA ATC AAA GCT AAC CTA ATC TTT GCA AAT GGA AGC   96
ACA CAA ACT GCA GAA TTC AAA GGA ACA TTT GAA AAA GCA ACA TCA GAA  144
GCT TAT GCG TAT GCA GAT ACT TTG AAG AAA GAC AAT GGA GAA TAT ACT  192
GTA GAT GTT GCA GAT AAA GGT TAT ACT TTA AAT ATT AAA TTT GCT GGA  240
AAA GAA AAA ACA CCA GAA GAA CCA AAA GAA GAA GTT ACT ATT AAA GCA  288
AAC TTA ATC TAT GCA GAT GGA AAA ACA CAA ACA GCA GAA TTC AAA GGA  336
ACA TTT GAA GAA GCA ACA GCA GAA GCA TAC AGA TAT GCA GAT GCA TTA  384
AAG AAG GAC AAT GGA GAA TAT ACA GTA GAC GTT GCA GAT AAA GGT TAT  432
ACT TTA AAT ATT AAA TTT GCT GGA AAA GAA AAA ACA CCA GAA GAA CCA  480
AAA GAA GAA GTT ACT ATT AAA GCA AAC TTA ATC TAT GCA GAT GGA AAA  528
ACA CAA ACA GCA GAA TTC AAA GGA ACA TTT GAA GAA GCA ACA GCA GAA  576
GCA TAC AGA TAT GCT GAC TTA TTA GCA AAA GAA AAT GGT AAA TAT ACA  624
GTA GAC GTT GCA GAT AAA GGT TAT ACT TTA AAT ATT AAA TTT GCT GGA  672
AAA GAA AAA ACA CCA GAA GAA CCA AAA GAA GAA GTT ACT ATT AAA GCA  720
AAC TTA ATC TAT GCA GAT GGA AAA ACT CAA ACA GCA GAG TTC AAA GGA  768
ACA TTT GCA GAA GCA ACA GCA GAA GCA TAC AGA TAC GCT GAC TTA TTA  816
GCA AAA GAA AAT GGT AAA TAT ACA GCA GAC TTA GAA GAT GGT GGA TAC  864
ACT ATT AAT ATT AGA TTT GCA GGT AAG AAA GTT GAC GAA AAA CCA GAA  912
GAA CCC ATG GAC ACT TAC AAA TTA ATC CTT AAT GGT AAA ACA TTG AAA  960
GGC GAA ACA ACT ACT GAA GCT GTT GAT GCT GCT ACT GCA GAA AAA GTC 1008
TTC AAA CAA TAC GCT AAC GAC AAC GGT GTT GAC GGT GAA TGG ACT TAC 1056
GAC GAT GCG ACT AAG ACC TTT ACA GTT ACT GAA AAA CCA GAA GTG ATC 1104
GAT GCG TCT GAA TTA ACA CCA GCC GTG ACA ACT TAC AAA CTT GTT ATT 1152
AAT GGT AAA ACA TTG AAA GGC GAA ACA ACT ACT AAA GCA GTA GAC GCA 1200
GAA ACT GCA GAA AAA GCC TTC AAA CAA TAC GCT AAC GAC AAC GGT GTT 1248
GAT GGT GTT TGG ACT TAT GAT GAT GCG ACT AAG ACC TTT ACG GTA ACT 1296
GAA ATG TAATAA                                                 1308
```

oder

(b) eine Sequenz, die unter strikten Hybridisierungsbedingungen zu dem Komplement von (a) hybridisiert und die ein Protein codiert, das zur Bindung der leichten Kette von Immunglobulin und der schweren Kette von Immunglobulin G in der Lage ist, aufweist.

3. Protein mit der Fähigkeit zur Bindung der leichten Kette von Immunglobulin, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein (a) die folgende Aminosäuresequenz:

```
                    [ B1
Ala Val Glu Asn     | Lys Glu Glu Thr Pro Glu Thr Pro Glu Thr Asp Ser
  1                 5                   10                  15
Glu Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Phe Ala Asn Gly Ser
             20                  25                  30
Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Lys Ala Thr Ser Glu
         35                  40                  45
Ala Tyr Ala Tyr Ala Asp Thr Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr
     50                  55                  60
Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly
 65                  70                  75                  80
  [ B2
  | Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala
                 85                  90                  95
Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly
            100                 105                 110
Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu
        115                 120                 125
Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr
    130                 135                 140
                                    [ B3
Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly     | Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro
145                 150                 155                 160
Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys
                165                 170                 175
Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu
            180                 185                 190
Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr Thr
        195                 200                 205
```

```
Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly

    210                 215                 220

 B4
 Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala

225                 230                 235                 240

Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly

                245                 250                 255

Thr Phe Ala Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu

            260                 265                 270

Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly Tyr

        275                 280                 285

                                 B5
Thr Ile Asn Ile Arg Phe Ala Gly  Lys Lys Val Asp Glu Lys Pro Glu

    290                 295                 300

Glu
```

oder (b) die Sequenz von einer der mit B1, B2, B3 oder B4 bezeichneten Domänen von (a);
oder (c) die Sequenz von Mehrfachen oder Gemischen der mit B1, B2, B3 oder B4 von (a) bezeichneten Domänen aufweist.

4. Hybridprotein, dadurch gekennzeichnet, daß es die Fähigkeit zur Bindung der leichten Kette von Immunglobulin aufweist und eine oder mehreren der Domänen B1, B2, B3 oder B4 nach Anspruch 3 und mindestens eine Domäne, die an die schweren Ketten von Immunglobulin G bindet, enthält.

5. Hybridprotein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Domänen, die die schweren Ketten von Immunglobulin G binden, aus den C1-, C2- und C3-Domänen von Protein G; den A-, B- und C1-Domänen von Protein H; den A-, B1-, B2- und S-Domänen von Protein M1; oder den E-, D-, A-, B- und C-Domänen von Protein A; und Mehrfachen oder Gemischen hiervon, die an die schwere Kette von Immunglobulin G binden, ausgewählt sind.

6. Hybridprotein nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Domänen, die an die schweren Ketten von Immunglobulin G binden, aus den C1- und C2-Domänen des Protein G ausgewählt sind.

7. Hybridprotein nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Hybridprotein die folgende Aminosäuresequenz aufweist:

Ala	Val	Glu	Asn	Lys	Glu	Glu	Thr	Pro	Glu	Thr	Pro	Glu	Thr	Asp	Ser
1				5					10					15	
Glu	Glu	Glu	Val	Thr	Ile	Lys	Ala	Asn	Leu	Ile	Phe	Ala	Asn	Gly	Ser
			20					25					30		
Thr	Gln	Thr	Ala	Glu	Phe	Lys	Gly	Thr	Phe	Glu	Lys	Ala	Thr	Ser	Glu
		35					40					45			
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Ala	Asp	Thr	Leu	Lys	Lys	Asp	Asn	Gly	Glu	Tyr	Thr
	50					55					60				
Val	Asp	Val	Ala	Asp	Lys	Gly	Tyr	Thr	Leu	Asn	Ile	Lys	Phe	Ala	Gly
65					70					75					80

Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala
85 90 95

Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly
100 105 110

Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu
115 120 125

Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr
130 135 140

Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro
145 150 155 160

Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys
165 170 175

Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu
180 185 190

Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr Thr
195 200 205

Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly
210 215 220

Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala
225 230 235 240

Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly
245 250 255

Thr Phe Ala Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu
260 265 270
Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly Tyr
275 280 285
Thr Ile Asn Ile Arg Phe Ala Gly Lys Lys Val Asp Glu Lys Pro Glu
290 295 300
Glu Pro Met Asp Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Asn Gly Lys Thr Leu Lys
305 310 315 320
Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val
325 330 335
Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr
340 345 350
Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile
355 360 365
Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile
Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala
385 390 395 400
Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val
405 410 415
Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr
420 425 430
Glu Met

8. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Protein nach einem der Ansprüche 3 bis 7 codiert.

9. Protein nach Anspruch 3, das außerdem ein Trägerprotein aufweist, in das die Bindungsdomänesequenzen der leichten Kette eingefügt sind.

10. Plasmidvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 8 aufweist.

11. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem Plasmidvektor nach Anspruch 10 transformiert ist.

12. Wirtszelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Spezies E. coli, Bacillus subtilis

oder Saccharomyces cerevisiae angehört.

13. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach einem der Ansprüche 3 bis 7 oder das durch eine DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 codiert wird, gekennzeichnet durch Kultivieren einer Wirtszelle nach Anspruch 11 oder 12 unter geeigneten Bedingungen; Akkumulieren des Proteins in Kultur oder Lysieren der Zellen und Extrahieren des Proteins daraus.

14. Reagenskit zum Binden, Trennen und Identifizieren von Immunglobulinen, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Protein nach einem der Ansprüche 3 bis 7 oder ein nach dem Verfahren von Anspruch 13 hergestelltes Protein enthält.

15. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 3 bis 7 oder eines nach dem Verfahren nach Anspruch 13 hergestelltes Protein zum Binden, Trennen, Reinigen oder Identifizieren von Immunglobulinen.

16. Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Protein nach einem der Ansprüche 3 bis 7 und gegebenenfalls Hilfs- oder Trägerstoffe enthält.

17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, wobei der Trägerstoff eine feste Phase enthält, die aus Agarose, Kunststoffoberflächen, Polyacrylamid, Nylon, Papier, magnetischen Kügelchen, Filter und Filmen ausgewählt ist.

18. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Protein nach einem der Ansprüche 3 bis 7 und einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder ein pharmazeutisch verträgliches Streckmittel enthält.

Es folgen 18 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

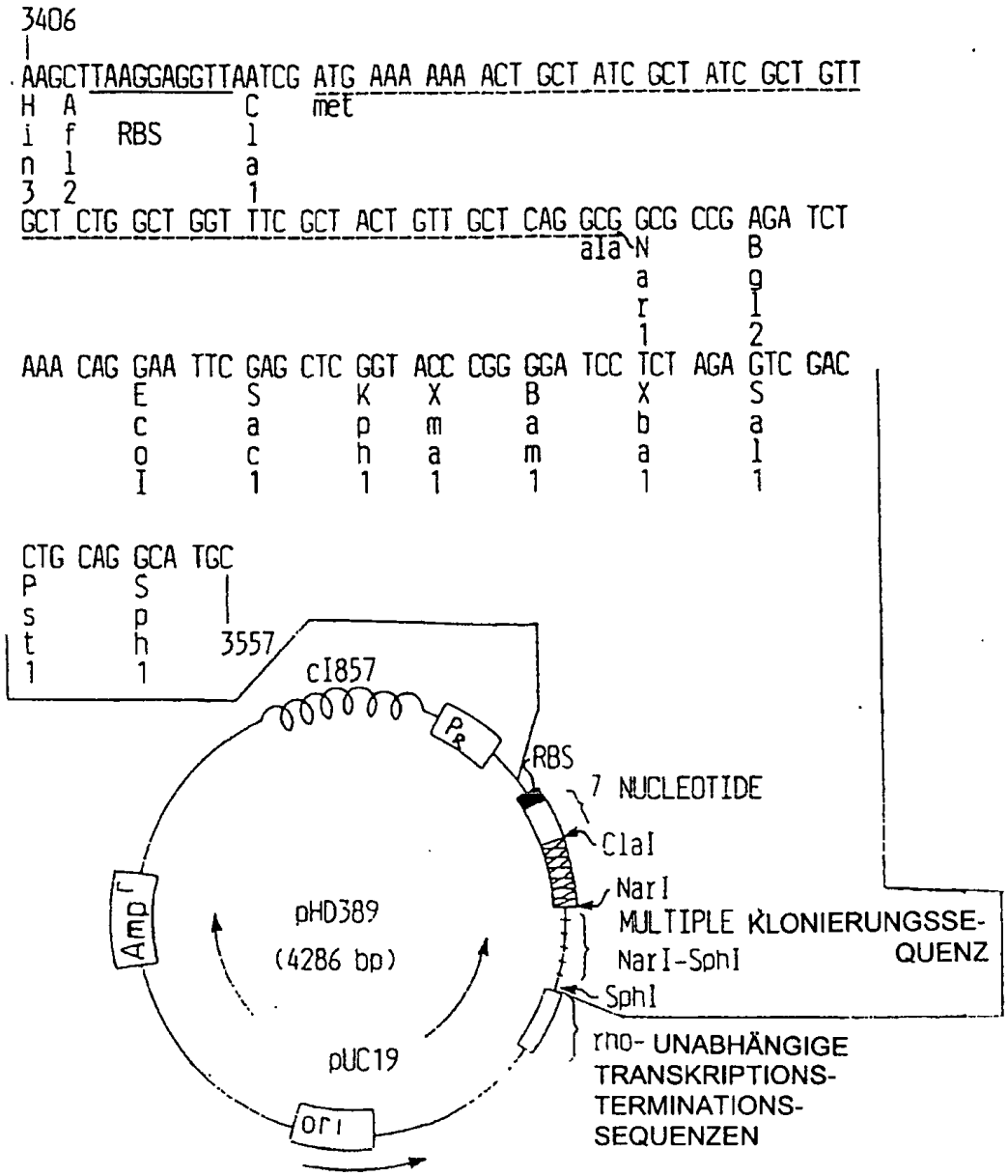


FIG.1 PLASMA pHD 389. DIE RIBOSOMALE BINDUNGSSEQUENZ (HERVORGEHOBEN DURCH AUSGEZOGENE LINIE), DIE SEQUENZ FÜR DAS SIGNALPEPTID AUS ompA (AUS E.coli) (GESTRICHELTE LINIE) UND DIE ERKENNUNGSSEQUENZ FÜR MEHRERE RESTRIKTIONSENZYME SIND DARGESTELLT.

PROTEIN LG

```
                 B1
          v                    v          v          v          v
GCGGTAGAAAATAAAGAAGAAACACCAGAAACACCAGAAACTGATTCAGAAGAAGAAGTA     60
AlaValGluAsnLysGluGluThrProGluThrProGluThrAspSerGluGluGluVal     20

          v          v          v          v          v          v
ACAATCAAAGCTAACCTAATCTTTGCAAATGGAAGCACACAAACTGCAGAATTCAAAGGA    120
ThrIleLysAlaAsnLeuIlePheAlaAsnGlySerThrGlnThrAlaGluPheLysGly     40

          v          v          v          v          v          v
ACATTTGAAAAAGCAACATCAGAAGCTTATGCGTATGCAGATACTTTGAAGAAAGACAAT    180
ThrPheGluLysAlaThrSerGluAlaTyrAlaTyrAlaAspThrLeuLysLysAspAsn     60

          v          v          v          v          v          v
GGAGAATATACTGTAGATGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAAATTTGCTGGA    240
GlyGluTyrThrValAspValAlaAspLysGlyTyrThrLeuAsnIleLysPheAlaGly     80

                 B2
          v          v          v          v          v          v
AAAGAAAAAACACCAGAAGAACCAAAAGAAGAAGTTACTATTAAAGCAAACTTAATCTAT    300
LysGluLysThrProGluGluProLysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeuIleTyr    100

          v          v          v          v          v          v
GCAGATGGAAAAACACAAACAGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAA    360
AlaAspGlyLysThrGlnThrAlaGluPheLysGlyThrPheGluGluAlaThrAlaGlu    120
```

FIG.2
(FORTS.)



FIG.2
(FORTS.)

DE 693 33 042 T2 2004.05.06

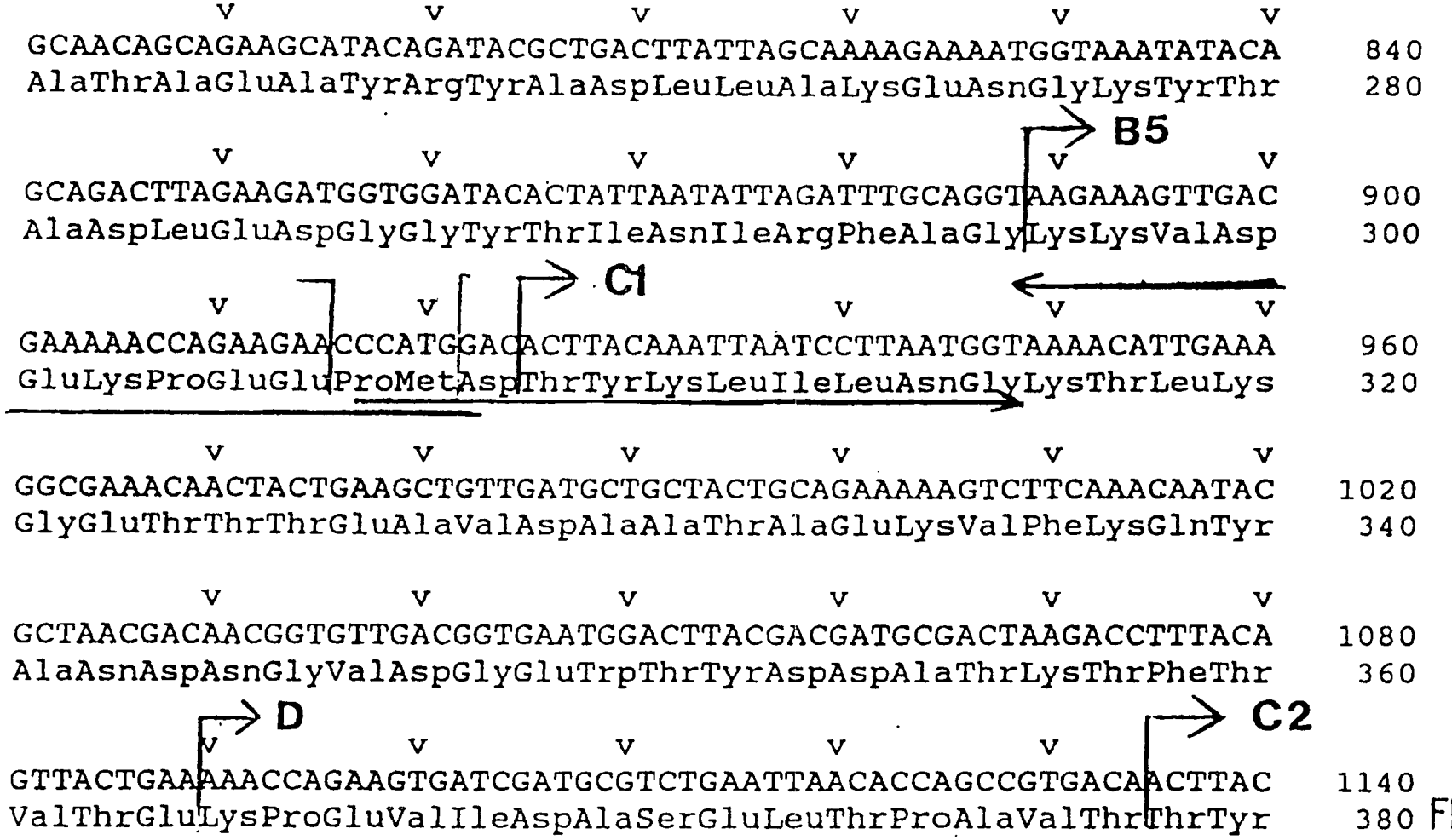

GCAACAGCAGAAGCATACAGATACGCTGACTTATTAGCAAAAGAAAATGGTAAATATACA 840
AlaThrAlaGluAlaTyrArgTyrAlaAspLeuLeuAlaLysGluAsnGlyLysTyrThr 280
B5
GCAGACTTAGAAGATGGTGGATACACTATTAATATTAGATTTGCAGGTAAGAAAGTTGAC 900
AlaAspLeuGluAspGlyGlyTyrThrIleAsnIleArgPheAlaGlyLysLysValAsp 300
C1
GAAAAACCAGAAGAACCCATGGACACTTACAAATTAATCCTTAATGGTAAAACATTGAAA 960
GluLysProGluGluProMetAspThrTyrLysLeuIleLeuAsnGlyLysThrLeuLys 320
GGCGAAACAACTACTGAAGCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAAAAAGTCTTCAAACAATAC 1020
GlyGluThrThrThrGluAlaValAspAlaAlaThrAlaGluLysValPheLysGlnTyr 340
GCTAACGACAACGGTGTTGACGGTGAATGGACTTACGACGATGCGACTAAGACCTTTACA 1080
AlaAsnAspAsnGlyValAspGlyGluTrpThrTyrAspAspAlaThrLysThrPheThr 360
D
C2
GTTACTGAAAAACCAGAAGTGATCGATGCGTCTGAATTAACACCAGCCGTGACAACTTAC 1140
ValThrGluLysProGluValIleAspAlaSerGluLeuThrProAlaValThrThrTyr 380

FIG. 2
(FORTS.)

```
          v         v         v         v         v         v
AAACTTGTTATTAATGGTAAAACATTGAAAGGCGAAACAACTACTAAAGCAGTAGACGCA   1200
LysLeuValIleAsnGlyLysThrLeuLysGlyGluThrThrThrLysAlaValAspAla    400

          v         v         v         v         v         v
GAAACTGCAGAAAAAGCCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTTGATGGTGTTTGG   1260
GluThrAlaGluLysAlaPheLysGlnTyrAlaAsnAspAsnGlyValAspGlyValTrp    420

          v         v         v         v
ACTTATGATGATGCGACTAAGACCTTTACGGTAACTGAAATGTAATAA     1308
ThrTyrAspAspAlaThrLysThrPheThrValThrGluMet -  -       434
```

FIG. 2

FIG.3 SCHEMATISCHE GESAMTANSICHT DER ERZEUGUNG VON PROTEIN L

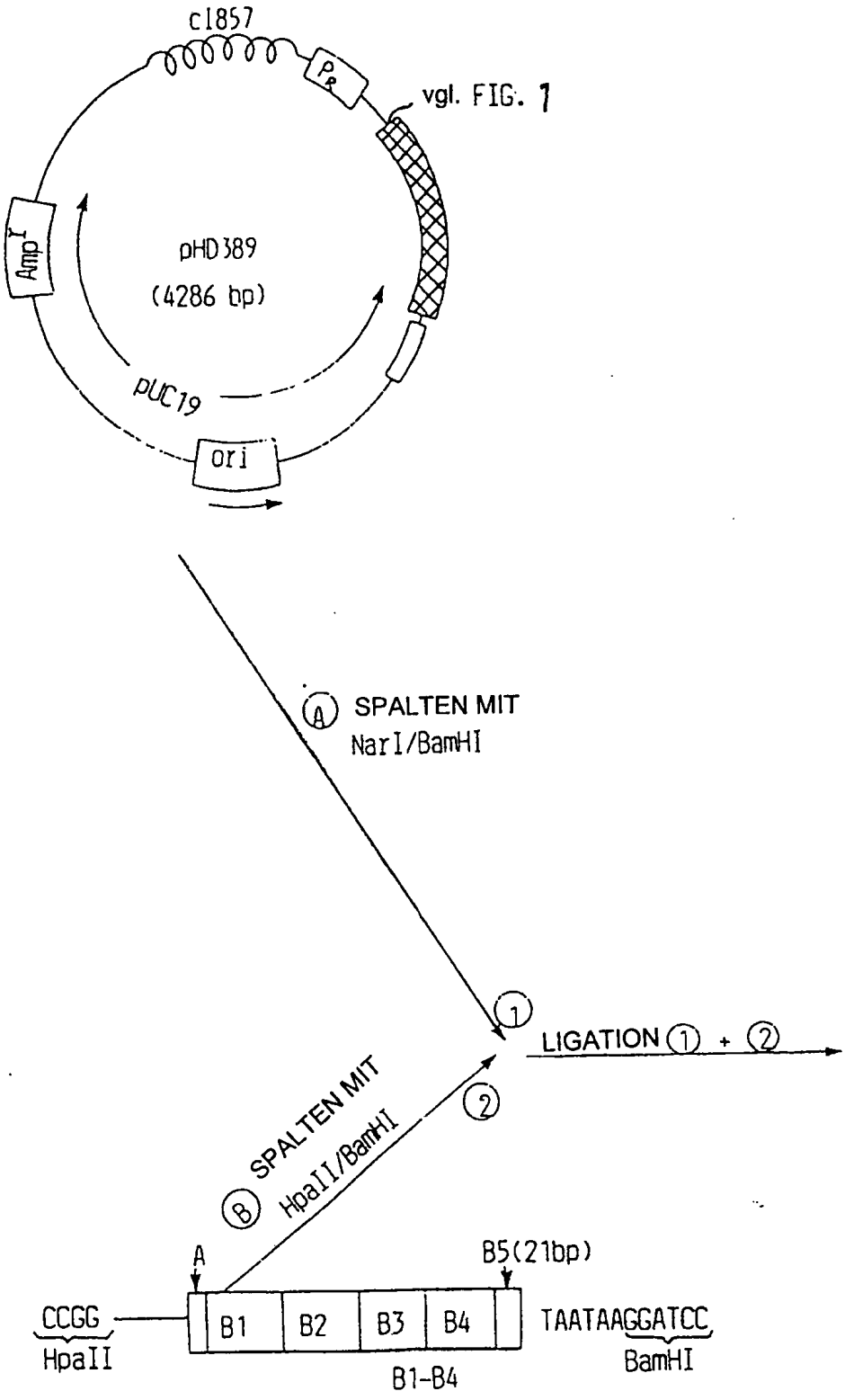
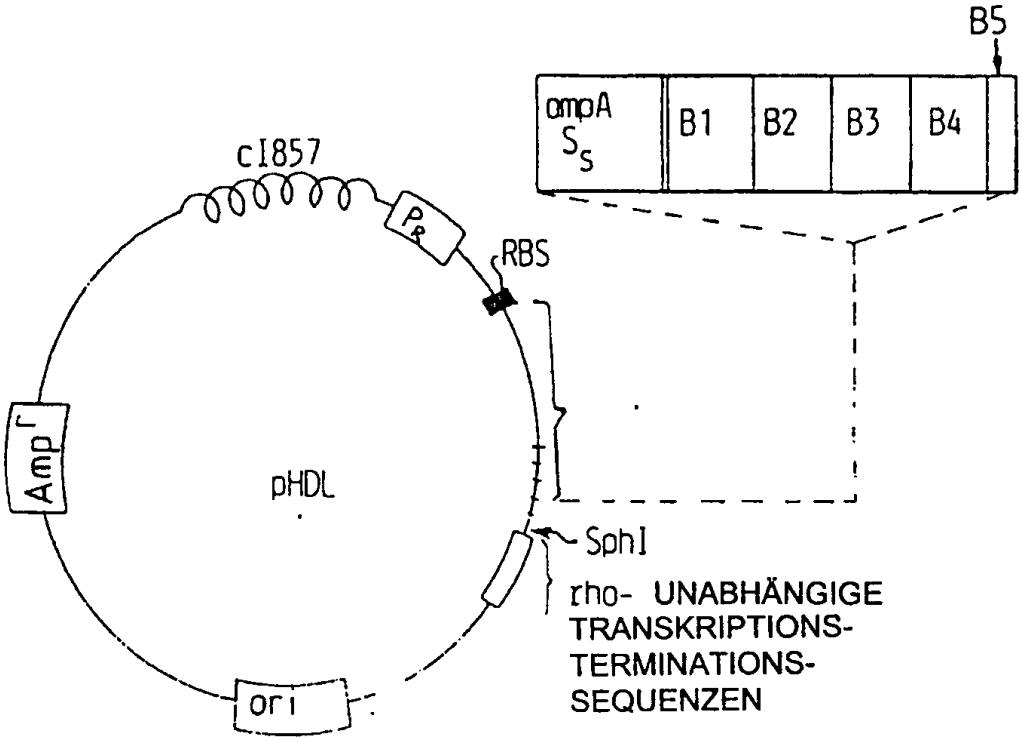


FIG.3(1)



TRANSFORMIEREN
IN E.coli
STAMM LE392

FIG.3(2)

FIG.4 SCHEMATISCHE GESAMTANSICHT DER ERZEUGUNG VON PROTEIN L

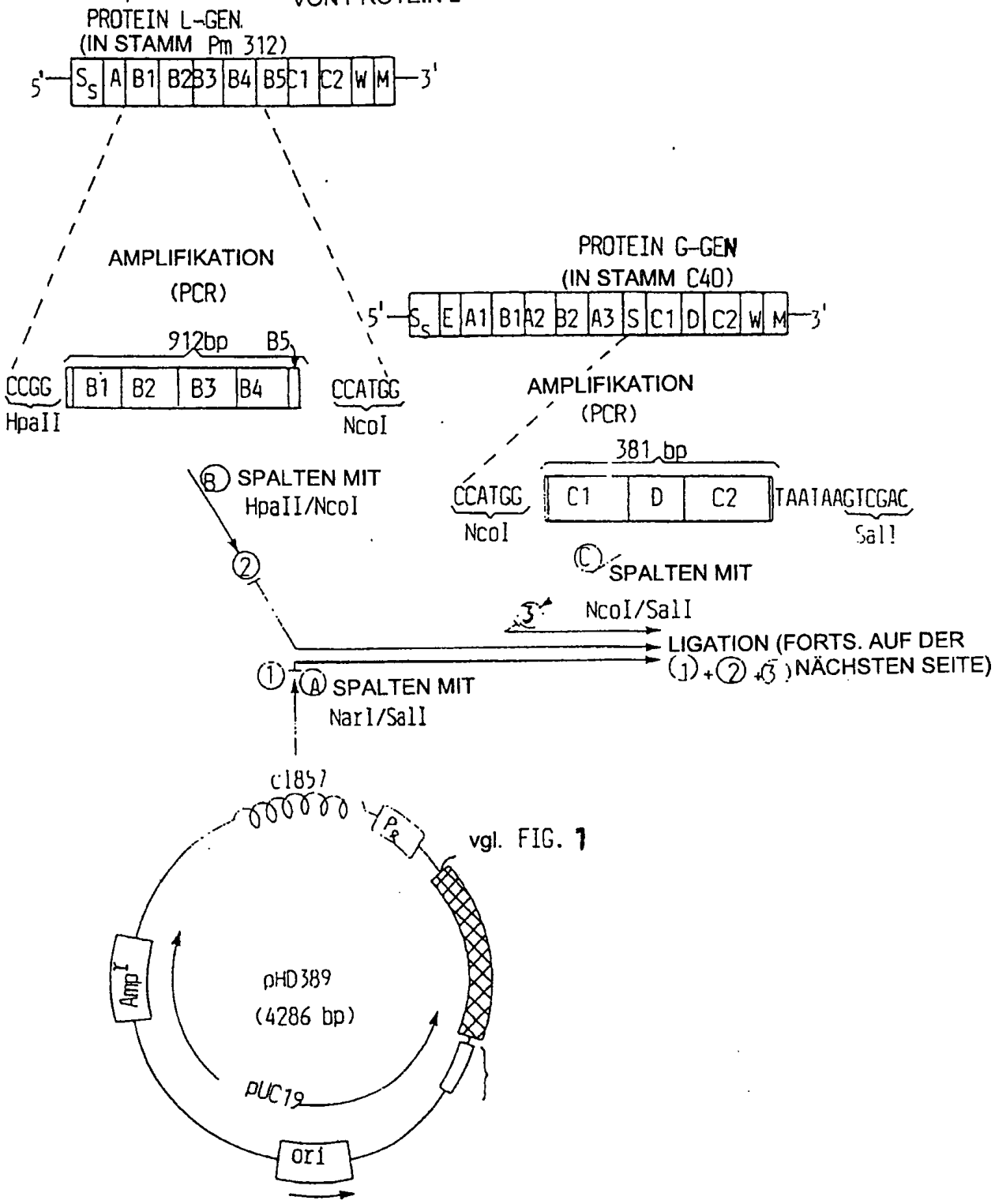
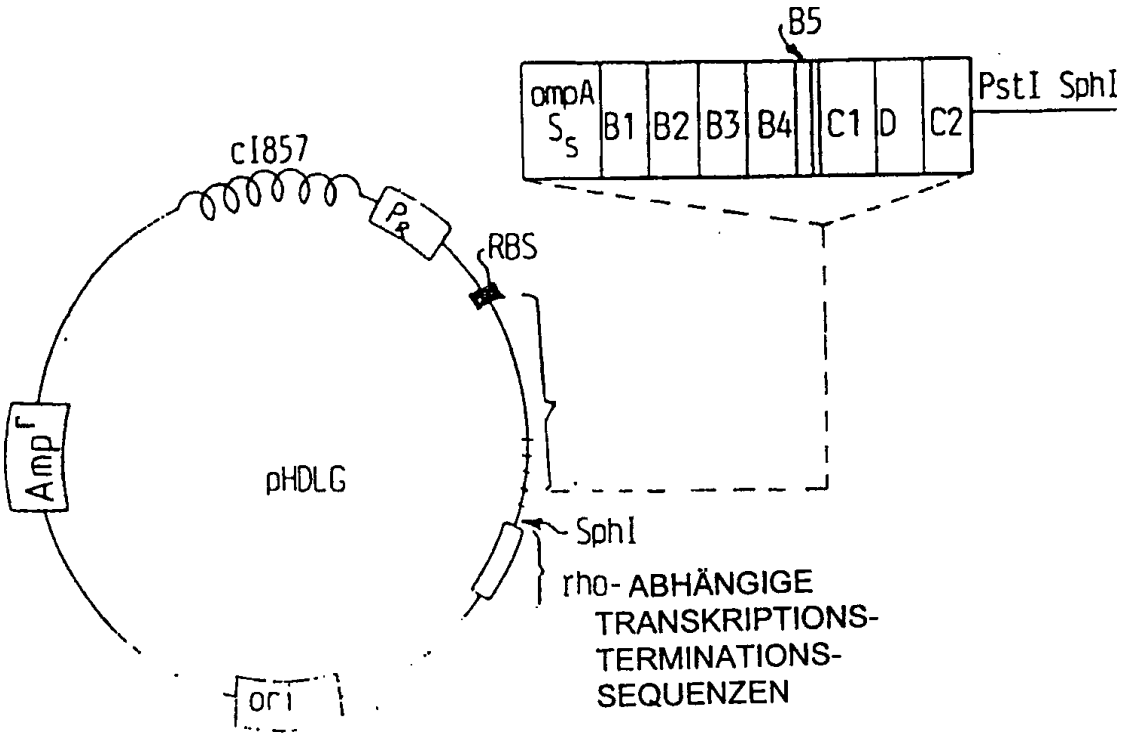


FIG.4(1)



TRANSFORMIEREN
IN E.coli
STAMM LE392

FIG.4(2)

FIG.5a SCHEMATISCHE GESAMTANSICHT DER ERZEUGUNG VON PROTEIN LA

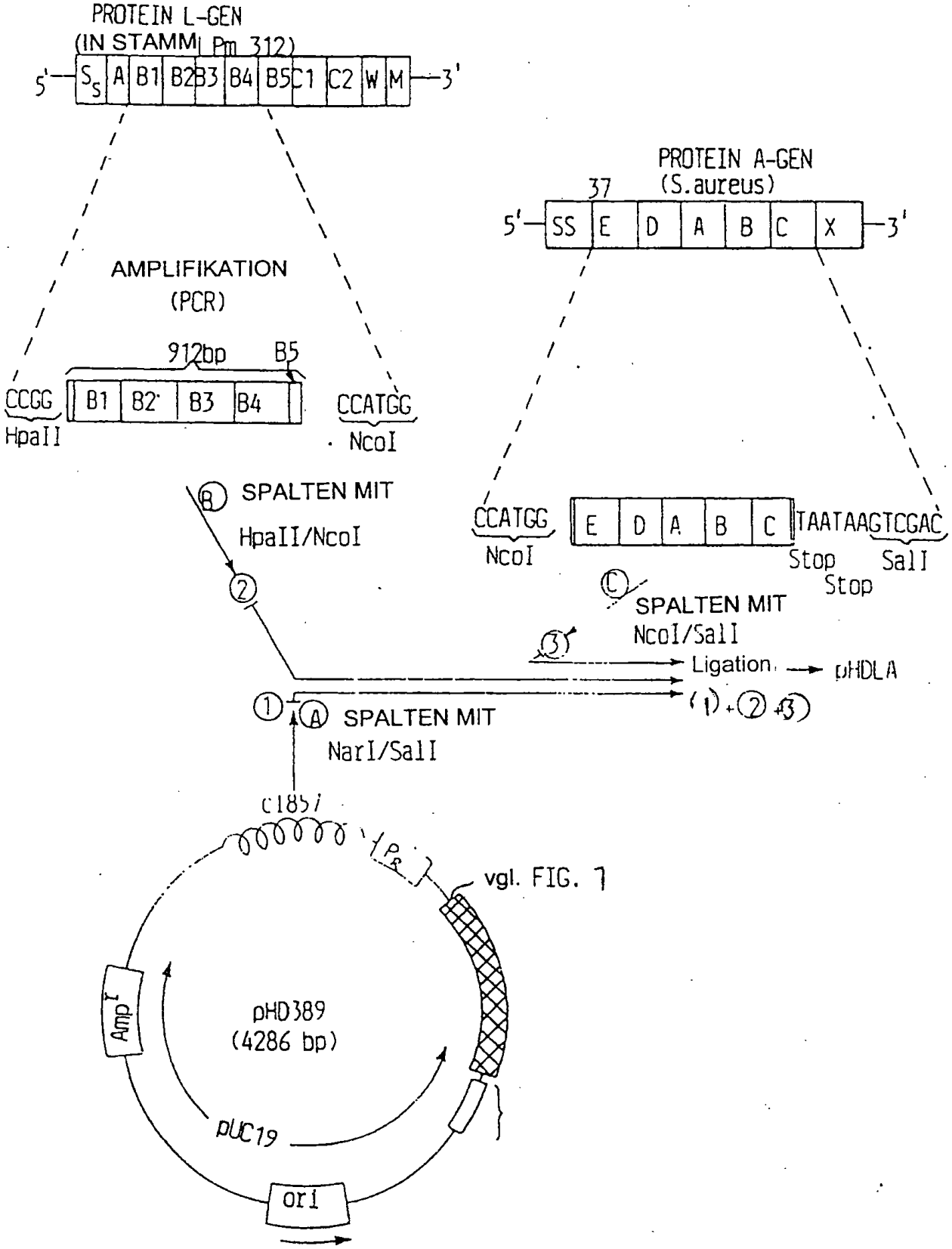


FIG.5b SCHEMATISCHE GESAMTANSICHT DER ERZEUGUNG VON PROTEIN LM

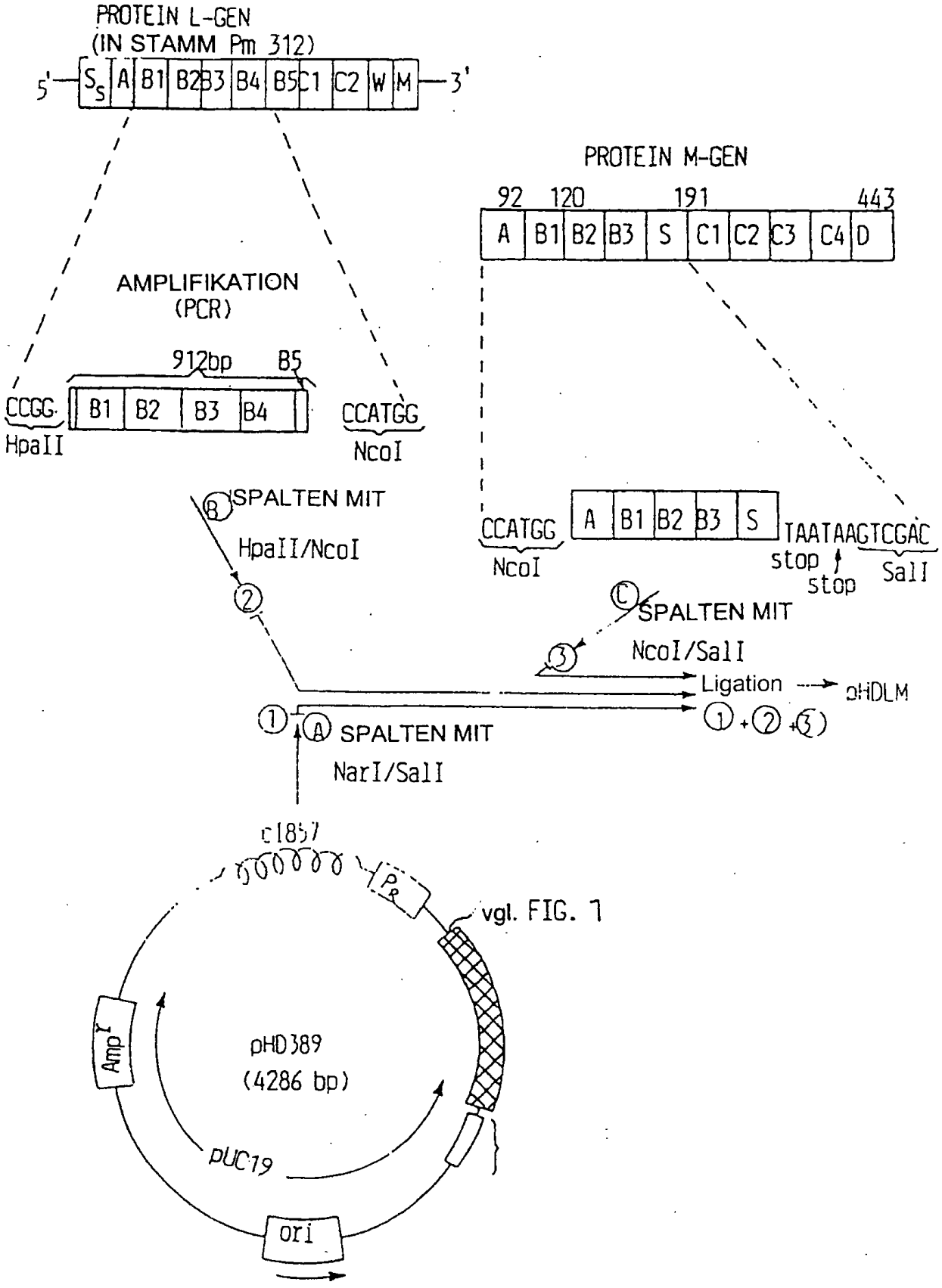
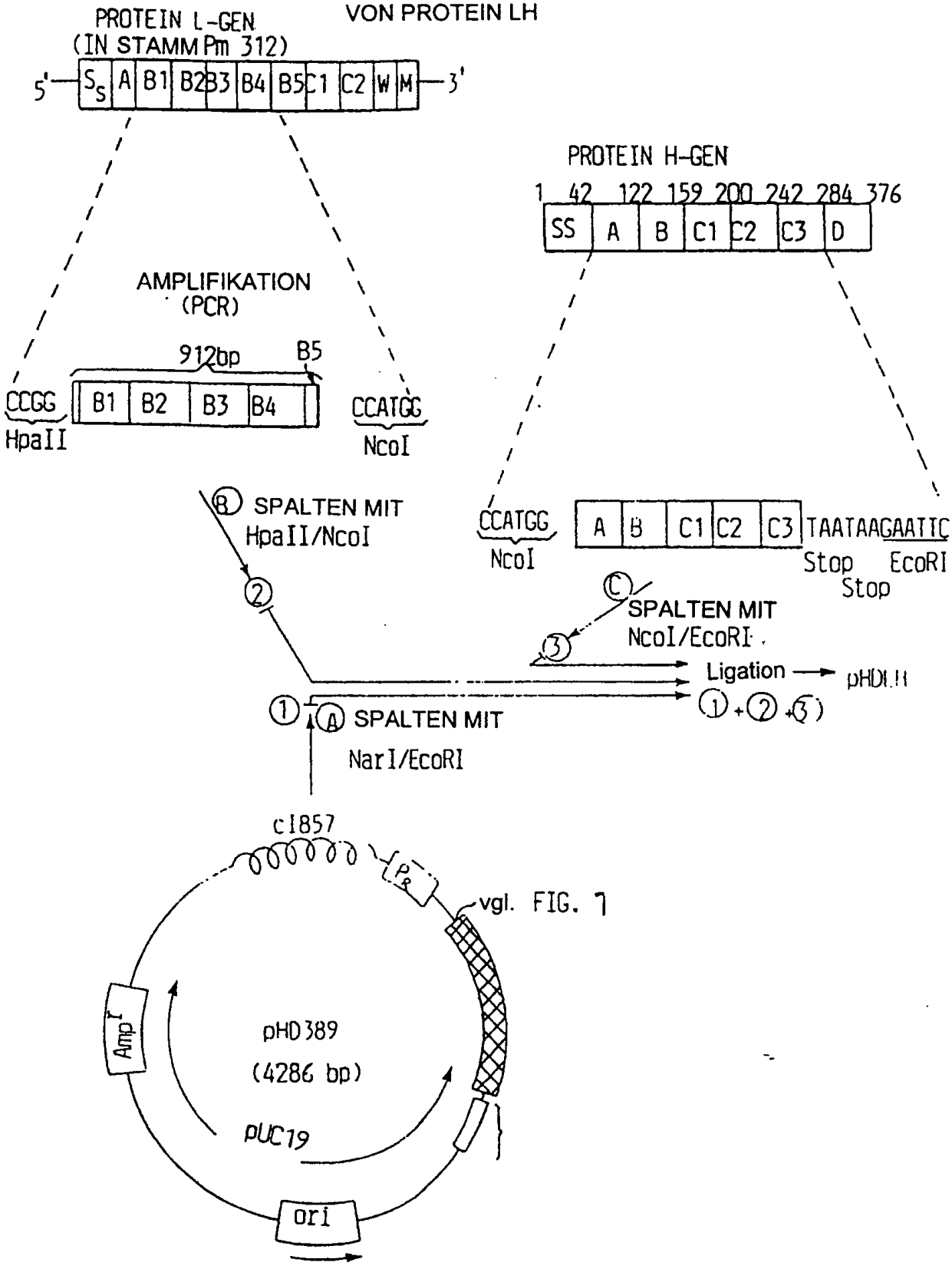


FIG. 5 c

SCHEMATISCHE GESAMTANSICHT DER ERZEUGUNG VON PROTEIN LH



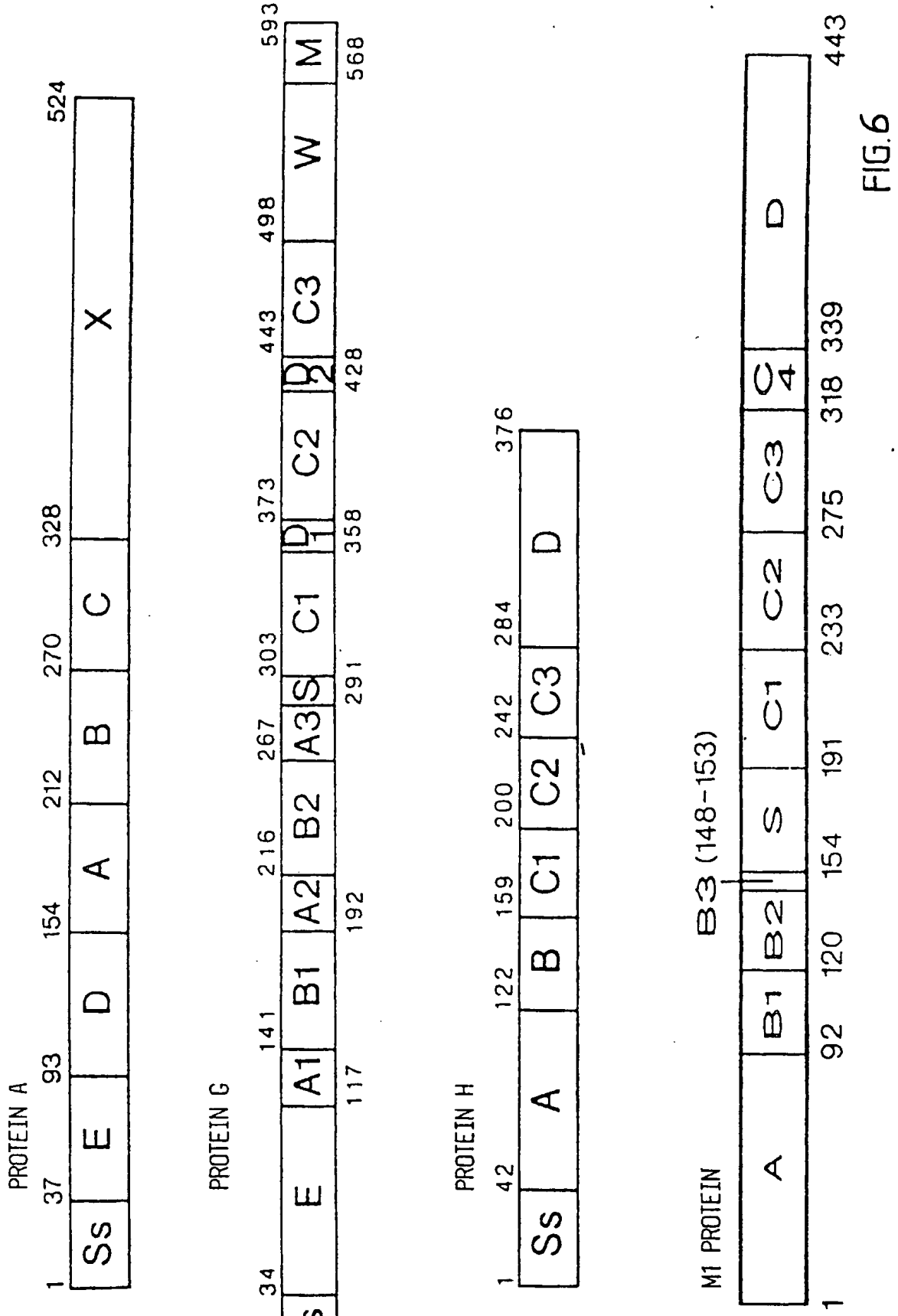

PROTEIN A
1
37
93
154
212
270
328
524
Ss
E
D
A
B
C
X
PROTEIN G
1
34
141
216
267
303
373
443
498
593
Ss
E
A1
B1
A2
B2
A3
S
C1
D1
C2
B2
C3
W
M
117
192
291
358
428
568
PROTEIN H
1
42
122
159
200
242
284
376
Ss
A
B
C1
C2
C3
D
M1 PROTEIN
B3 (148-153)
1
92
120
154
191
233
275
318
339
443
A
B1
B2
S
C1
C2
C3
C4
D

FIG.6

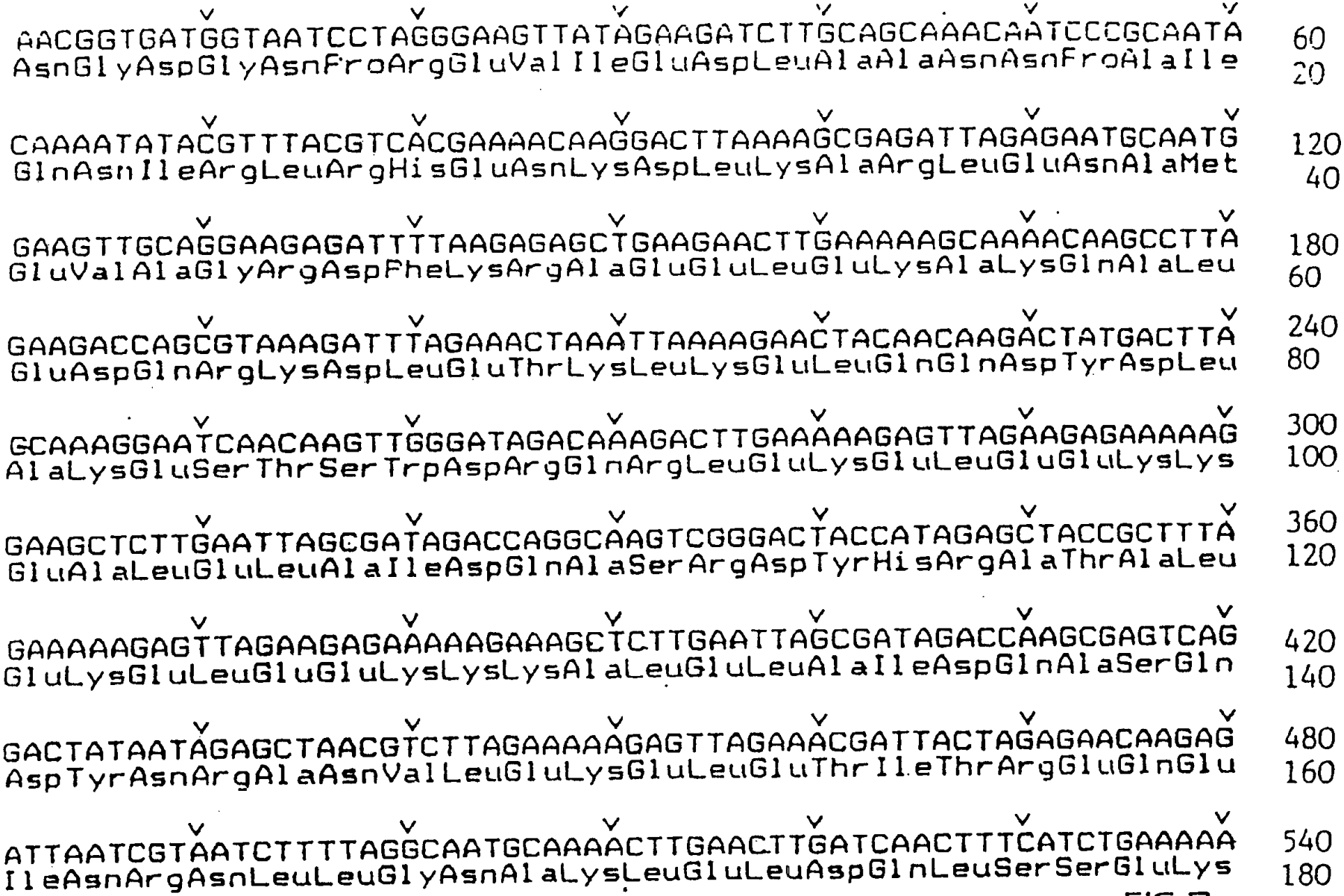


FIG. 7 (FORTS.)

DE 693 33 042 T2 2004.05.06

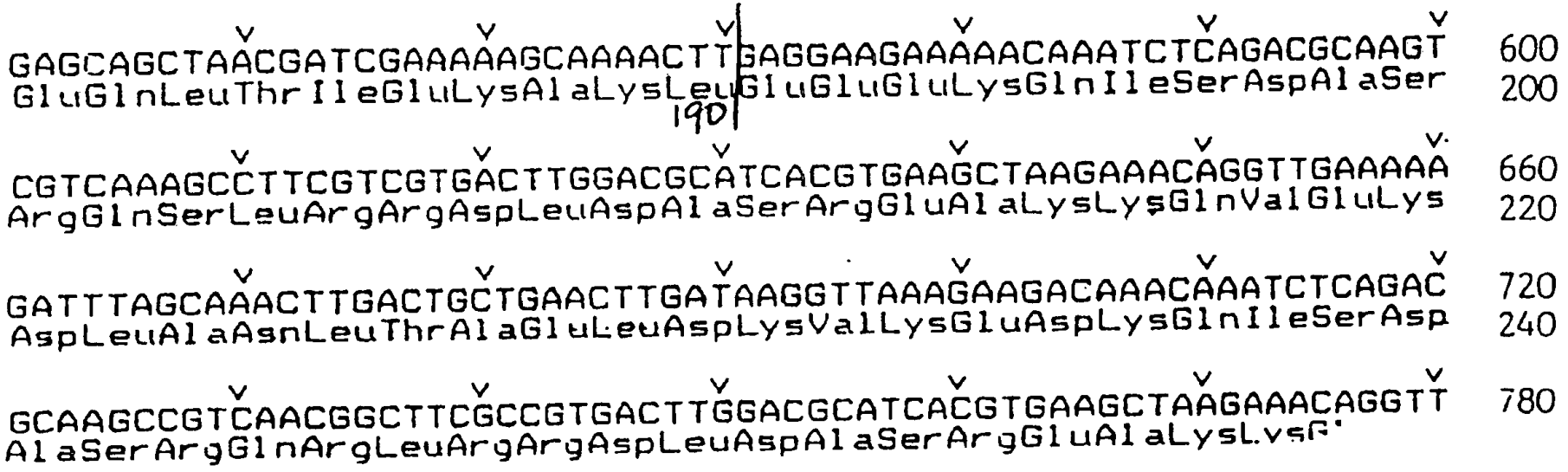


FIG.7 (FORTS.)

AMINOSÄURESEQUENZ UND NUCLEINSÄURESEQUENZ FÜR PROTEIN M1; IgG-BINDUNG ZWISCHEN AMINOSÄUREN 1-190

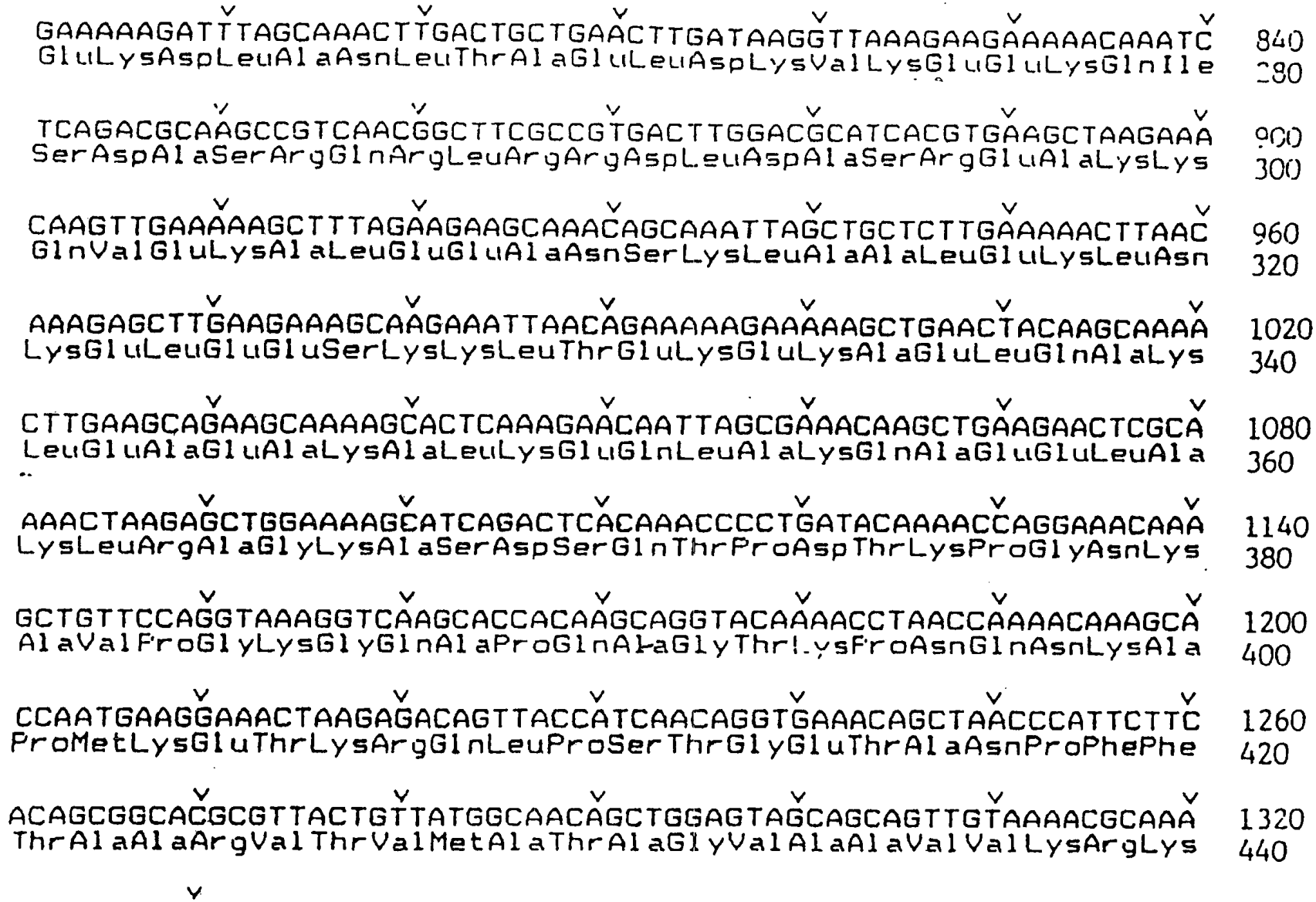


FIG.7

DE 693 33 042 T2 2004.05.06

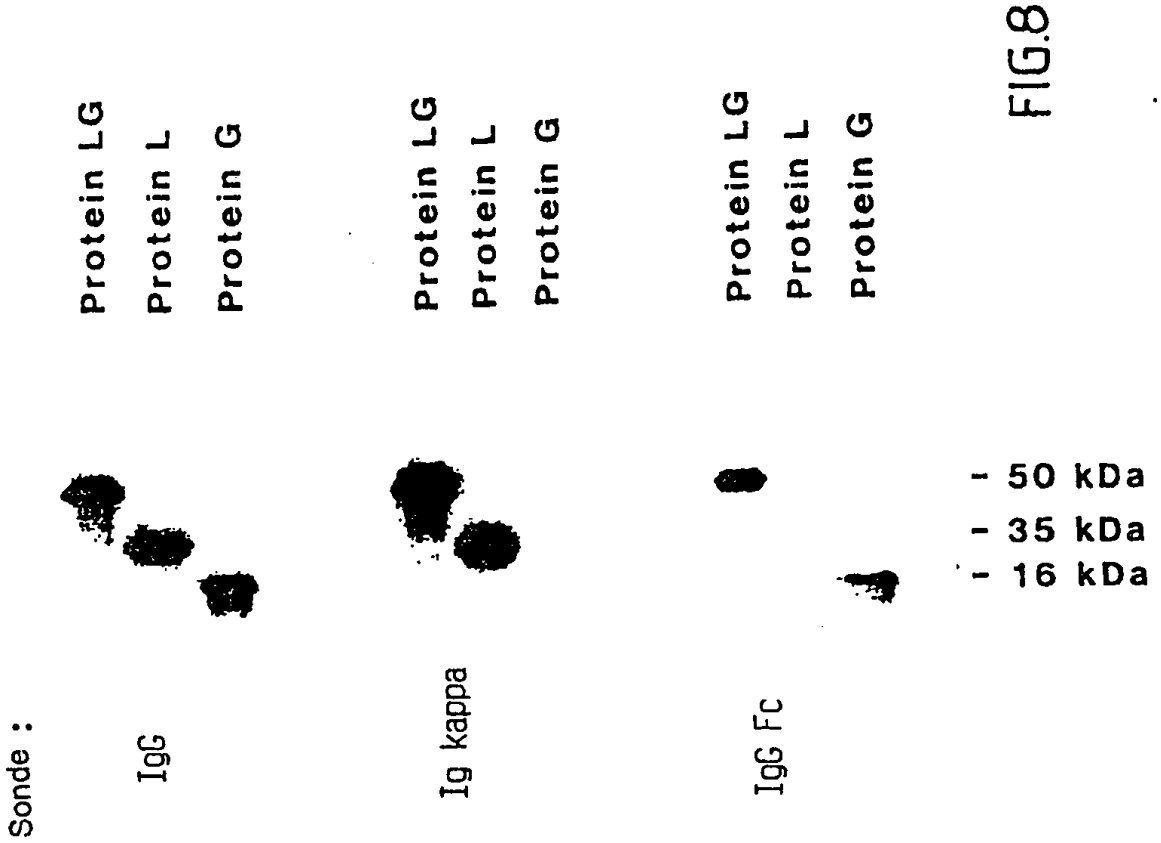

Protein LG
Protein L
Protein G
Protein LG
Protein L
Protein G
Protein LG
Protein L
Protein G
- 50 kDa
- 35 kDa
- 16 kDa
Sonde :
IgG
Ig kappa
IgG Fc

FIG.8

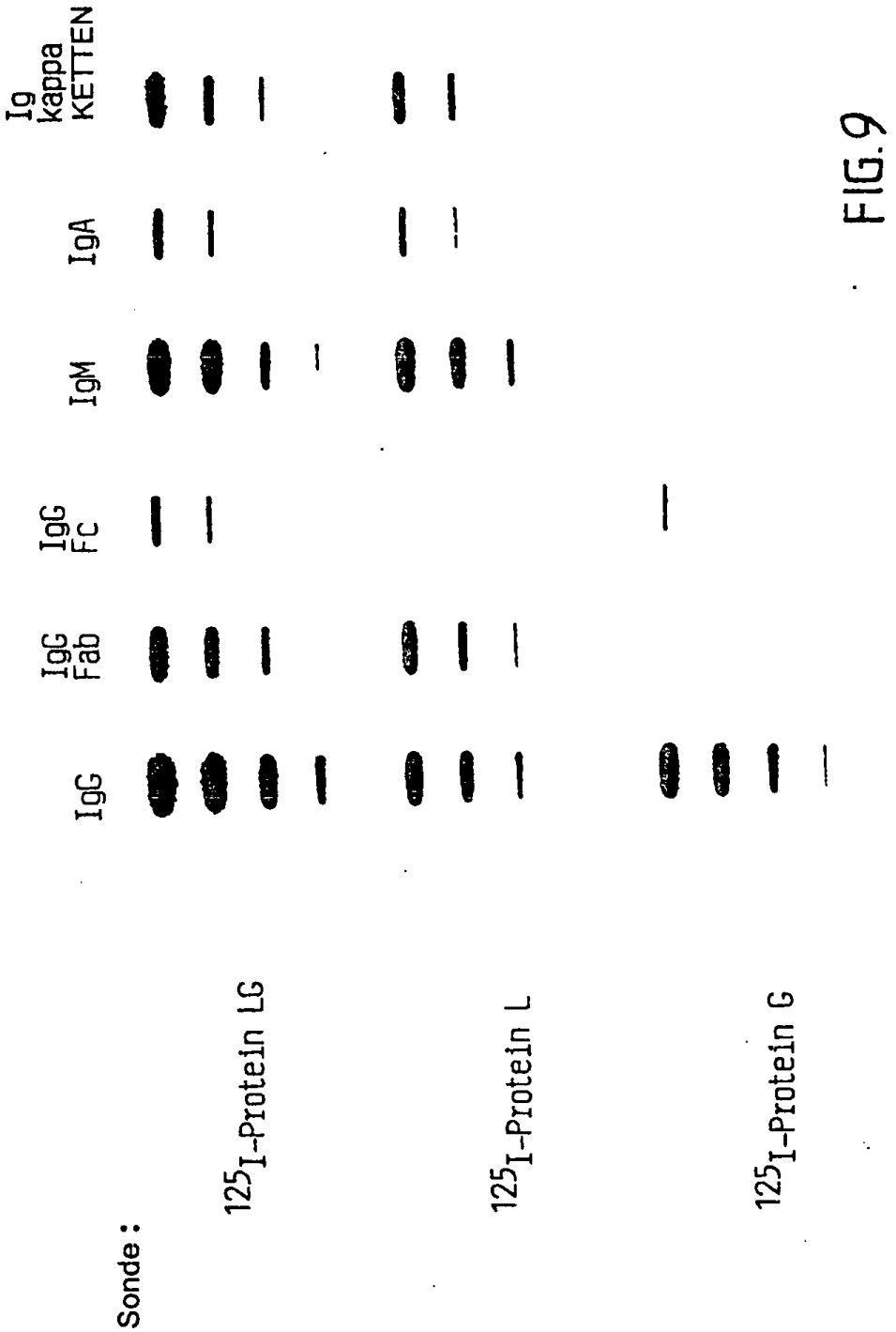

Sonde :
125I-Protein LG
125I-Protein L
125I-Protein G
IgG
IgG Fab
IgG Fc
IgM
IgA
Ig kappa KETTEN

FIG.9