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

(10) **DE 695 30 305 T2** 2004.02.12

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 779 933 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 30 305.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/11235**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 931 709.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/007754**
(86) PCT-Anmeldetag: **01.09.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.03.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.06.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **09.04.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.02.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12P 21/06**
C07H 21/04

(30) Unionspriorität:
300386 **02.09.1994** **US**

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

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

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

(72) Erfinder:
BARBAS, F., Carlos, San Diego, US; BURTON, R., Dennis, La Jolla, US; LERNER, A., Richard, La Jolla, US

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPER BIBLIOTHEKEN MIT UNIVERSELLEN ODER ZUFÄLLIG GEWÄHLTEN IMMUNGLOBULIN LEICHTEN KETTEN**

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 betrifft im Allgemeinen das Gebiet der Proteinbiochemie und Imniunologie und betrifft speziell Verfahren für die Herstellung von heterodimeren Immunglobulinmolekülen, die schwere und leichte variable Kettenpolypeptide enthalten.

Hintergrund

[0002] Es wurden große Bibliotheken von vollständig oder teilweise synthetischen Antikörperverbindungsstellen oder Paratopen unter Verwendung filamentöser Phagen-Display-Vektoren hergestellt, die als Phagemide bezeichnet werden, was zu großen Bibliotheken monoklonaler Antikörper mit verschiedenen und neuen Immunspezifitäten führte. Die Technologie verwendet eine filamentöse Phagenmantelproteinmembrananker-domäne als Mittel zur Verbindung des Genprodukts und dem Gen während dem Stadium des Zusammenbaus der filamentösen Phagenreplikation und wurde zur Klonierung und Expression von Antikörpern aus kombinatorischen Bibliotheken verwendet. Kang et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 4363–4366 (1991).
[0003] Es wurden kombinatorische Bibliotheken von Antikörpern unter Verwendung sowohl des cpVIII-Membrankers (Kang et al., supra) wie auch des cpIII-Membrankers (Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 7978–7982 (1991)) hergestellt.
[0004] Die Diversität einer filamentösen Phagen-basierenden kombinatorischen Antikörperbibliothek kann durch das Vermischen der schweren und leichten Kettengene erhöht werden. (Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 111120–11123, 1991), durch Veränderung der komplementbestimmenden Region 3 (CDR3) der klonierten schweren Kettengene der Bibliothek (Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 4457–4461, 1992), und durch die Einführung von Zufallsmutationen in die Bibliothek durch fehleranfällige Polymerasekettenreaktionen (PCR, polymerase chain reaction) (Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 3576–3580, 1992). Zum Beispiel offenbart die WO 94/18219 degenerierte Oligonukleotide, die zur Erhöhung der Diversität einer Antikörperbibliothek durch Zufallsmutagenese nützlich sind sowie eine universelle leichte Kette, die in Herstellungsverfahren von Bibliotheken nützlich ist.
[0005] Die Mutagenese von Proteinen wurde verwendet, um die Funktion zu verändern, und in einigen Fällen die Bindungsspezifität eines Proteins. Typischerweise ist die Mutagenese positionsgerichtet und daher, abhängig von der systematischen Auswahl der Mutation, die in dem Protein zu induzieren ist, arbeitsaufwendig. Siehe, z. B., Corey et al., J. Amer. Chem. Soc., 114: 1784–1790 (1992), in der Rattentrypsine durch positionsgerichtete Mutagenese modifiziert wurden. Es wurde eine teilweise Zufallsauswahl der ausgewählten Kodons in dem Thymidinkinase (TK)-Gen als ein Mutageneseverfahren verwendet, um TK-Variantenproteine zu entwickeln. Munir et al., J. Biol. Chem, 267: 6584–6589 (1992).
[0006] Es gibt weiterhin einen Bedarf an Verfahren zur Erhöhung des Repertoires von möglichen Antikörpermolekülen, mit denen nützliche Bindungsfunktionen manipuliert werden können, einschließlich Immunglobulinpolypeptide der schweren Kette und der leichten Kette.

Kurze Beschreibung der Erfindung

[0007] Es wurde nun festgestellt, dass die Phagemid-Display-Technologie durch Manipulationen der leichten Immunglobulinkette zur Herstellung diverser Bibliotheken mit Immunglobulinspezifitäten verbessert werden kann. Insbesondere wird gezeigt, dass die variable Domäne der leichten Immunglobulinketten in ihren komplementbestimmenden Regionen (CDR) durch Zufallsmutagenese zufallsgeneriert werden kann, um größere und stärker diverse Bibliotheken von leichten Ketten zu ergeben, aus denen neue und nützliche Immunspezifitäten abgeleitet werden können.
[0008] Daher beschreibt die Erfindung in einer Ausführungsform ein Verfahren zur Induktion einer Mutagenese in einer komplementbestimmenden Region (CDR) eines Gens der leichten Immunglobulinkette für den Zweck der Herstellung von Bibliotheken der Gene der leichten Kette zur Verwendung in Kombination mit Genen der schweren Kette und Genbibliotheken zur Herstellung von Antikörperbibliotheken verschiedener und neuer Immunspezifitäten.
[0009] Das Verfahren umfasst die Mutagenese eines CDR-Anteils eines Gens einer leichten Immunglobulinkette, das die in SEQ ID NR: 62 gezeigte Sequenz umfasst, durch das Amplifizieren eines CDR-Anteils des Immunglobulingens durch Polymerase – Kettenreaktion (PCR polymerase chain reaction) unter Verwendung eines PCR-Primen-Oligonukleotids, wobei besagtes Oligonukleotid 3'- und 5'-Termini aufweist und dieses:

a) eine Nukleotidsequenz an seinem 3'-Terminus, die in der Lage ist, an eine erste Gerüstregion eines Immunglobulingens zu hybridisieren;

b) eine Nukleotidsequenz an seinem 5'-Terminus, die in der Lage ist, an eine zweite Gerüstregion eines Im-

munglobulingens zu hybridisieren; und
c) eine Nukleotidsequenz zwischen den 3'- und 5'-Termini gemäß der Formel:

$[NNK]_n$,

worin N unabhängig von den anderen jegliches Nukleotid sein kann, K ist G oder T, und n ist 3 bis ungefähr 24, wobei besagte 3'- und 5'-terminale Nukleotidsequenzen eine Länge von ungefähr 6 bis 50 Nukleotide aufweisen oder ein Oligonukleotid mit einer dazu komplementären Sequenz aufweist, umfasst.

[0010] In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung das oben genannte Mutagenseverfahren, das zusätzlich die Schritte:

a) des Isolierens der amplifizierten CDR zur Ausbildung einer Bibliothek von Genen mutagenisierter leichter Immunglobulinketten;
b) des Exprimierens der isolierten Bibliothek von Genen mutagenisierter leichter Ketten in Kombination mit einem oder mehreren Genen einer schweren Kette, um eine kombinatorische Antikörperbibliothek exprimierter schwerer und leichter Kettengene auszubilden; und
c) des Selektierens der Spezies der kombinatorischen Antikörperbibliothek auf die Fähigkeit hin, ein ausgewähltes Antigen zu binden, umfasst.

[0011] In einer Ausführungsform können das eine oder die mehreren Gene der schweren Immunglobulinkette als eine Bibliothek von Genen der schweren Kette wie des Weiteren hierin beschrieben zur Verfügung gestellt werden.

[0012] Zusätzlich wird in der vorliegenden Erfindung gezeigt, dass bestimmte variable Domänenpolypeptide der leichten Immunglobulinketten als ein leichter Kettenpartner für eine große Vielfalt von schweren Ketten nützlich sind, d. h., die leichte Kette bildet funktionelle heterodimere Antikörpermoleküle nach Association mit verschiedenen schweren Ketten aus, was die Fähigkeit demonstriert, universell als eine leichte Kette in den derzeit beschriebenen kombinatorischen Bibliotheken zu fungieren.

[0013] Somit hat in bevorzugten Mutageneseverfahren das Gen der variablen Domäne der leichten Immunglobulinklette die Sequenzeigenschaften, die in SEQ ID NR: 62 gezeigt werden, die das bevorzugte hierin beschriebene universelle leichte Kettenpolypeptid kodiert.

[0014] In einer verwandten Ausführungsform betrifft die Erfindung die direkte Verwendung des Gens des universellen leichten Kettenpolypeptids ohne Diversifizierung durch Mutagenese seiner CDR-Domänen. Spezifisch betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines heterodimeren Immunglobulinmoleküls mit Polypeptiden der variablen Immunglobulindomäne von schweren und leichten Ketten, umfassend die Schritte:

a) des Kombinierens eines Gens einer leichten Immunglobulinkette mit variabler Domäne, die eine Sequenz mit den Sequenzeigenschaften der in SEQ ID NR: 62 gezeigten leichten Kette umfasst, mit einem oder mehreren Genen der schweren Immunglobulinketten mit variabler Domäne, um eine kombinatorische Genbibliothek von schweren und leichten Immunglobulinketten auszubilden, wobei das Kombinieren das operative Verbinden des Gens der leichten Kette mit einem der Gene der schweren Kette in einem Vektor umfasst, der in der Lage ist, die Gene der schweren und leichten Kette zu koexprimieren;
b) der Expression der kombinatorischen Genbibliothek, um eine kombinatorische Antikörperbibliothek exprimierter Polypeptide der schweren und leichten Kette auszubilden; und
c) des Auswählens von Spezies der kombinatorischen Antikörperbibliothek auf die Fähigkeit hin, ein ausgewähltes Antigen zu binden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0015] In den Zeichnungen, die einen Teil dieser Offenbarung ausbilden, illustriert:

[0016] **Fig.** 1 die Strukturen von Hapten-Konjugaten, die zur Selektion der semisynthetischen Fab-Heterodimere dieser Erfindung verwendet wurden. Konjugat 1 ist Fluorescein-BSA (FI-BSA), wie in Beispiel 5B beschrieben. Konjugate 2 und 3, jeweils S-BSA und C-BSA, wurden wie in Beispiel 5B beschrieben, hergestellt.

[0017] **Fig.** 2 zeigt graphisch die anti-synthetische Hapten-Konjugatspezifität ausgewählter Fab-Heterodimere durch ELISA. Die in dem ELISA verwendeten Antigene, die von links nach rechts gezeigt werden, sind das ursprüngliche pC3AP313-spezifische Tetanustoxoid (nach oben gestrichelter Balken), das FI-BSA-Konjugat (schwarzer Balken), BSA (horizontaler Balken), das S-BSA-Konjugat (rückwärts gestrichelter Balken) und das C-BSA-Konjugat (weißer Balken). Ein Standard-ELISA wurde wie in Beispiel 6A beschrieben, durchgeführt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

A. Definitionen

[0018] Aminosäurerest: Eine Aminosäure, die durch chemischen Verdau (Hydrolyse) eines Polypeptids an seinen Peptidverbindungen, hergestellt wird. Die hierin beschriebenen Aminosäurereste liegen vorzugsweise in der "L"-isomeren Form vor. Jedoch können Reste in der "D"-isomeren Form für einen jeglichen L-Aminosäurerest substituiert werden, so lange die gewünschte funktionelle Eigenschaft durch das Polypeptid erhalten bleibt. NH_2 bezeichnet die freie Aminogruppe, die an dem Aminoterminus eines Polypeptids vorhanden ist. COOH bezeichnet die freie Carboxygruppe, die an dem Carboxyterminus eines Polypeptids vorhanden ist. Im Einklang mit der Standard-Polypeptidnomenklatur (beschrieben in J. Biol. Chem., 243: 3552–59 (1969) und übernommen von 37 CFR § 1.822 (b) (2)) werden die Abkürzungen für Aminosäurereste in der folgenden Korrespondenztabelle gezeigt:

KORRESPONDENZTABELLE

SYMBOL		AMINOSÄURE
1-Buchstabe	3-Buchstabe	
Y	Tyr	Tyrosin
G	Gly	Glycin
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	Trypthophan
R	Arg	Arginin
D	Asp	Asparaginsäure
N	Asn	Asparagin
B	Asx	Asn und/oder Asp
C	Cys	Cystein
X	Xaa	unbekannt oder andere

[0019] Es wird betont, dass die durch Formeln hierin dargestellten Aminosäuresequenzen eine links-nach-rechts Orientierung in der konventionellen Richtung vom Aminoterminus zum Carboxyterminus aufweisen. Zudem wird der Begriff "Aminosäurerest" dahingehend breit definiert, die Aminosäuren zu umfassen, die in der Korrespondenztabelle aufgelistet sind sowie modifizierte und seltene Aminosäuren, wie die, die in 37 CFR 1.822 (b) (4) aufgelistet sind. Des Weiteren wird betont, dass ein Strich am Anfang oder Ende einer Aminosäuresequenz eine Peptidbindung zu einer weiteren Sequenz von einem oder mehreren Aminosäureresten anzeigt oder eine kovalente Bindung zu einer aminoterminalen Gruppe wie NH_2 oder Acetyl oder zu einer carboxyterminalen Gruppe wie COOH.

[0020] Rekombinantes DNA (rDNA)-Molekül: ein durch das operatives Verbinden von zwei DNA-Segmenten hergestelltes DNA-Molekül. Somit ist ein rekombinantes DNA-Molekül ein Hybrid-DNA-Molekül, umfassend mindestens zwei Nukleotidsequenzen, die normalerweise nicht zusammen in der Natur zu finden sind. rDNA's, die keinen gemeinsamen biologischen Ursprung aufweisen, d. h., evolutionär unterschiedlich sind , werden als "heterolog" bezeichnet.

[0021] Vektor: Ein rDNA-Molekül, das zur autonomen Replikation in einer Zelle in der Lage ist, und an das ein DNA-Segment, z. B., ein Gen oder Polynukleotid, operativ gebunden sein kann, um die Replikation des damit verbundenen Segments zu bewirken. Vektoren, die in der Lage zur Dirigierung der Expression von Genen sind, die für ein oder mehrere Polypeptide kodieren, werden hierin als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Besonders wichtige Vektoren ermöglichen die Klonierung von cDNA (komplementäre DNA) aus mRNAs, die unter Verwendung einer reversen Transkriptase hergestellt wurden.

[0022] Rezeptor: Ein Rezeptor ist ein Molekül, wie ein Protein, Glycoprotein und Ähnliches, das spezifisch (nicht zufällig) an ein anderes Molekül binden kann.

[0023] Antikörper: Der Begriff Antikörper in seinen verschiedenen grammatischen Formen wird hierin verwendet, um Immunglobulinmoleküle und immunologisch aktive Anteile von Immunglobulinmolekülen, d. h., Moleküle, die eine antikörperverbindende Stelle oder ein Paratop enthalten, bezeichnen. Beispielhafte Antikörpermoleküle sind intakte Immunglobulinmoleküle, im Wesentlichen intakte Immunglobulinmoleküle und Anteile eines Immunglobulinmoleküls, einschließlich der auf dem Fachgebiet als Fab, Fab', $F(ab')_2$ und F(v) bekannten Anteile.

[0024] Antikörperverbindungsstelle: Eine Antikörperverbindungsstelle ist der strukturelle Anteil eines Antikörpermoleküls, der aus variablen und hypervariablen Regionen von schweren und leichten Ketten besteht, die spezifisch ein Antigen binden (damit immunreagieren). Der Begriff immunreagieren in seinen verschiedenen Formen bedeutet eine spezifische Bindung zwischen einem Molekül, das eine antigene Determinante enthält, und einem Molekül, das eine Antikörperverbindungsstelle enthält, wie ein Gesamtantikörpermolekül oder ein Teil davon.

[0025] Monoklonaler Antikörper: Ein monoklonaler Antikörper in seinen verschiedenen grammatischen Formen bezeichnet eine Population von Antikörpermolekülen, die nur eine Spezies von Antikörperverbindungsstelle enthalten, die in der Lage ist, mit einem bestimmten Epitop zu immunreagieren. Ein monoklonaler Antikörper zeigt somit typischerweise eine einzelne Bindungsaffinität für jegliches Epitop, mit denen er immunreagiert. Ein monoklonaler Antikörper kann somit ein Antikörpermolekül enthalten, das eine Vielzahl von Antikörperverbindungsstellen aufweist, wobei jede für ein verschiedenes Epitop immunspezifisch ist, z. B., ein bispezifscher monoklonaler Antikörper. Obwohl ein monoklonaler Antikörper historisch durch Immortalisierung einer klonal reinen Immunglobulin-sezernierenden Zelllinie hergestellt wurde, kann eine monoklonal reine Population von Antikörpermolekülen auch durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung hergestellt werden.
[0026] Fusionspolypeptid: Ein Polypeptid, das aus mindestes zwei Polypeptiden und einer verbindenden Sequenz besteht, um die beiden Polypeptide als ein zusammenhängendes Polypeptid zu verbinden. Die in einem Fusionspolypeptid verbundenen zwei Polypeptide werden typischerweise aus zwei unabhängigen Quellen abgeleitet, und daher umfasst ein Fusionspolypeptid zwei verbundene Polypeptide, die normalerweise nicht in der Natur verbunden zu finden sind.
[0027] Stromaufwärts: In der Richtung entgegen der Richtung der DNA-Transkription und daher von 5' zu 3' auf dem nichtkodierenden Strang oder 3' zu 5' auf der mRNA.
[0028] Stromabwärts: Weiter entlang einer DNA-Sequenz in der Richtung der Sequenztranskription oder des Auslesens, d. h., in einer 3'- zu 5'-Richtung entlang dem nichtkodierenden Strang der DNA oder in 5'- zu 3'-Richtung entlang des RNA-Transkripts.
[0029] Cistron: Eine Sequenz von Nukleotiden in einem DNA-Molekül, das für eine Aminosäuresequenz kodiert und stromaufwärts und stromabwärts gelegene DNA-Expressionskontrollelemente umfasst.
[0030] Leader-Polypeptid: Eine kurze Aminosäuresequenz an dem Aminoende eines Polypeptids, die das Polypeptid durch die innere Membran trägt oder dirigiert und so seine ggf. spätere Sezernierung in den periplasmatischen Raum oder gegebenenfalls darüber hinaus gewährleistet. Das Leadersequenz-Peptid wird normalerweise entfernt bevor das Polypeptid aktiv wird.
[0031] Leserahmen: Eine bestimmte Sequenz von aufeinander folgenden Nukleotidtriplets (Kodons), die in der Translation verwendet wird. Das Leseraster hängt von der Lokalisierung des translationsinitiierenden Kodons ab.

B. Verfahren zur Herstellung von Antikörpermolekülen oder Bibliotheken von Antikörnermolekülen

1. Allgemeine Vorgehensweise

[0032] Die vorliegende Erfindung verwendet ein System für die simultane Klonierung und Screening (Untersuchung) ausgewählter Liganden-Bindungsspezifitäten aus Genrepertoiren unter Verwendung eines einzigen Vektorsystems. Dieses System stellt die Verbindung von Klonierungs- und Untersuchungsverfahren zur Verfügung und hat zwei Voraussetzungen. Erstens, dass die Expression der Polypeptidketten eines heterodimeren Rezeptors in einem in vitro Expressionsvektor, wie E. coli, eine Koexpression der zwei Polypeptidketten benötigt, damit ein funktioneller heterodimerer Rezeptor ausgebildet werden kann, um einen Rezeptor herzustellen, der einen Liganden bindet. Zweitens, dass die Untersuchung isolierter Mitglieder der Bibliothek auf eine ausgewählte Liganden-Bindungskapazität ein Mittel benötigt, um die Bindungskapazität eines exprimierten Rezeptormoleküls mit einem einfachen Mittel zu korrelieren, um das Gens zu isolieren, das das Mitglied aus der Bibliothek kodiert.
[0033] Die Verbindung der Expression und der Untersuchung wird durch die Kombination des Zielens eines Fusionsproteins in das Periplasma einer bakteriellen Zelle erreicht, um das Zusammenbauen eines funktionellen Rezeptors zu ermöglichen und das Zielen eines Fusionsproteins auf den Mantel eines filamentösen Phagenpartikels während des Phagenzusammenbaus, um ein einfaches Untersuchen des Bibliotheksmitglieds von Interesse zu ermöglichen. Periplasmatisches Zielen wird durch die Gegenwart einer Sezernierungssignaldomäne in einem Fusionsprotein dieser Erfindung zur Verfügung gestellt. Das Zielen auf einen Phagenpartikel wird durch die Gegenwart einer filamentösen Phagenmantelproteinmembranankerdomäne in einem Fusionsprotein dieser Erfindung zur Verfügung gestellt.
[0034] Die vorliegende Erfindung kann auch in Kombination mit einem Verfahren zur Herstellung einer Bibliothek von DNA-Molekülen verwendet werden, wobei jedes DNA-Molekül ein Cistron zur Expression eines Fusionsproteins auf der Oberfläche eines filamentösen Phagenpartikels umfasst. Das Verfahren umfasst die Schritte des (a) Ausbildens einer Ligationsmischung durch das Kombinieren (i) eines Repertoires von Genen, die variable Kettenpolypeptide von Immunglobulinen kodieren und (ii) einer Vielzahl von DNA-Expressionsvektoren in linearer Form, die angepasst sind, um ein Fusionsprotein-exprimierendes Cistron auszubilden, in einem Ligationspuffer und (b) das Aussetzen der Mischung zu Ligationsbedingungen für eine Zeitraum, der ausreicht, damit das Repertoire an Genen operativ mit der Vielzahl von Vektoren verbunden (ligiert) wird, um die Bibliothek auszubilden.

[0035] In diesem Verfahren befindet sich das Repertoire der Polypeptid-kodierenden Gene in der Form doppelsträngiger (ds) DNA und jedes Mitglied des Repertoires hat kohäsive Termini, die zur gerichteten Ligation angepasst sind. Zusätzlich sind die Mehrzahl der DNA-Expressionsvektoren jeweils lineare DNA-Moleküle mit stromaufwärts und stromabwärts gelegenen kohäsiven Termini, die (a) zum direktionalen Empfangen der Polypeptidgene in einem. gemeinsamen Leseraster angepasst sind, und (b) operativ an jeweils stromaufwärts und stromabwärts gelegene translatierbare DNA-Sequenzen. Die stromaufwärts gelegene translatierbare DNA-Sequenz kodiert ein Sezernierungssingal, vorzugsweise ein pelB-Sezernierungssignal, und die stromabwärts gelegene translatierbare DNA-Sequenz kodiert einen filamentösen Phagenmantelproteinmembrananker, wie er hierin für ein Polypeptid dieser Erfindung beschrieben wird. Die translatierbaren DNA-Sequenzen sind auch operativ an jeweils stromaufwärts und stromabwärts gelegene DNA-Expressionskontrollsequenzen gebunden, wie sie für einen DNA-Expressionsvektor definiert sind, der hierin beschrieben wird.
[0036] Die so hergestellte Bibliothek kann zur Expression und Untersuchung der Fusionsproteine verwendet werden, die durch die resultierende Bibliothek von Cistrons kodiert werden, die in der Bibliothek durch die Expressions- und Untersuchungsverfahren, die hierin beschrieben werden, präsentiert werden.

2. Herstellung von Genreaertoiren

[0037] Ein Genrepertoir ist eine Ansammlung verschiedener Gene, vorzugsweise Polypeptidkodierender Gene (Polypeptidgene), und können aus natürlichen Quellen isoliert sein oder künstlich hergestellt werden. Bevorzugte Genrepertoire bestehen aus konservierten Genen. Besonders bevorzugte Genrepertoire umfassen eines oder beide Gene, die für Polypeptide kodieren, die sich zusammengesetzt werden können, um ein funktionelles dimeres Rezeptormolekül auszubilden.
[0038] Ein Genrepertoire, das in der Durchführung der vorliegenden Erfindung nützlich ist, enthält mindestens 10^3, vorzugsweise mindestens 10^4, mehr bevorzugt mindestens 10^5 und am meisten bevorzugt mindestens 10' verschiedene Gene. Verfahren zur Beurteilung der Diversität eines Repertoires an Genen sind den Fachleuten auf dem Gebiet wohl bekannt.
[0039] Vorzugsweise wird der Rezeptor ein heterodimeres Polypeptid sein, das in der Lage ist, einen Liganden zu binden, wie ein Antikörpermolekül oder ein immunologisch aktiver Teil davon, der durch eines der Mitglieder einer Familie (Repertoire) von konservierten Genen kodiert wird, d. h., Gene, die eine konservierte Nukleotidsequenz von mindestens 10 Nukleotiden in Länge enthalten.
[0040] Ein Gen kann unter Verwendung verschiedener Verfahren dahingehend identifiziert werden, dass es zu einem Repertoire an konservierten Genen gehört. Zum Beispiel kann ein isoliertes Gen unter Verwendung der durch Southern, J. Mol. Biol., 98: 503 (1975) beschriebenen Verfahren als Hybridisierungssonde unter geringen Stringenzbedingungen verwendet werden, um andere Mitglieder des Repertoires von konservierten Genen nachzuweisen, die in genomischer DNA vorhanden sind. Wenn das als Hybridisierungssonde verwendete Gen an multiple Restriktionsendonukleasefragmente des Genoms hybridisiert, ist dieses Gen ein Mitglied eines Repertoires an konservierten Genen.
[0041] Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen Verfahren zur Herstellung neuer Antikörpermoleküle durch die Herstellung diverser Bibliotheken von Antikörpern und anschließender Untersuchung der Bibliotheken auf gewünschte Bindungspezifitäten. Das Verfahren involviert die Herstellung von Bibliotheken von heterodimeren Immunglobulinmolekülen in der Form von Phagemid-Bibliotheken unter Verwendung degenerierter Oligonukleotide und Primerverlängerungsreaktionen, um die Degenerierungen in die CDR-Regionen der variablen Domänen der variablen schweren und leichten Immunglobulinketten einzubringen und die mutagenisierten Polypeptide auf der Oberfläche des Phagemids zu präsentieren. Danach wird das Display-Protein auf die Fähigkeit hin untersucht, an ein ausgewähltes Antigen zu binden.
[0042] Des Weiteren können die Bibliotheken der Gene, die die schweren und leichten Immunglobulinketten kodieren, gekreuzt werden, um Zufallspaarungen von Spezies der schweren und leichten Ketten auszubilden, was zu größeren Anzahlen einzigartiger Heterodimere führt. Solche Kreuzungen können in einer Reihe von Arten, wie hierin im Weiteren beschrieben, durchgeführt werden, einschließlich (1) dem Kreuzen einer einzelnen schweren Kette mit einer Bibliothek von leichten Ketten, (2) dem Kreuzen einer einzelnen leichten Kette mit einer Bibliothek von schweren Ketten, (3) dem Kreuzen einer zufällig gewählten leichten oder schweren Kette mit einer einzelnen schweren oder leichten Kette, (4) jeweils dem Kreuzen einer zufällig gewählten leichten oder schweren Kette mit einer schweren oder leichten Kettenbibliothek, und (5) jeweils dem Kreuzen einer zufällig gewählten leichten oder schweren Kette mit einer zufällig gewählten schweren oder leichten Kette. Andere Permutationen sind auch offensichtlich.
[0043] Die zufällige Wahl (Randomizing) bedeutet im Allgemeinen die Herstellung einer Bibliothek von leichten (oder schweren) Kettengenen durch Mutagenese von einer oder mehreren CDR-Regionen in der variablen Domäne einer ausgewählten leichten oder schweren Kette wie hierin des Weiteren hierin beschrieben wird.
[0044] Eine besonders bevorzugte Permutation der oben beschriebenen Verfahren zur Herstellung eines Antikörperrepertoires ist durch die Verwendung zufällig gewählter leichter Kettengene, die mit einer Bibliothek von

schweren Ketten gekreuzt werden und insbesondere mit einer zufällig gewählten schweren Kettenbibliothek gekreuzt werden. Eine weitere besonders bevorzugte Ausführungsform ist die Verwendung der "universellen leichten Kette", die in SEQ ID NR: 62 gezeigt wird, die hierin des Weiteren als einzelne leichte Kette in der Kreuzung mit einer schweren Kettenbibliothek beschrieben wird. Eine bevorzugte verwandte Ausführungsform ist die Verwendung einer zufällig gewählten universellen leichten Kette mit einer schweren Kette oder einer schweren Kettenbibliothek. Andere bevorzugte Verfahren werden hierin auch beschrieben.

3. Phagemid-Display-Proteine

[0045] Die Darstellung des heterodimeren Immunglobulinmoleküls als ein Display-Protein auf einem Phagemid kann auf jeglichem der Oberflächenproteine des filamentösen Phagenpartikels erfolgen, obwohl insbesondere die Display-Proteine, die das Gen III- oder Gen VIII-Protein, wie hierin beschrieben, umfassen bevorzugt sind. Die Verwendung des Gen III- oder Gen VIII-Proteins als ein Display-Protein auf einem filamentösen Phagen wurde hierin ausgiebig an anderer Stelle beschrieben.

[0046] Besonders bevorzugte Display-Proteine sind Fusionen, die die Verwendung des Phagenpartikelmembranankers involvieren, der aus Gen III oder Gen VIII abgeleitet ist und an eine schwere oder leichte Immunglobulinkette wie hierin beschrieben fusioniert ist. In dieser Ausführungsform wird ein Polypeptid, das mindestens eine variable CDR-Domäne einer schweren oder leichten Immunglobulinkette enthält, an die Membrankerdomäne des Gen III- oder Gen VIII-Proteins des Phagens fusioniert. Vorzugsweise wird eine vollständige variable Domäne einschließlich aller CDR's fusioniert.

[0047] Wenn die variable Region einer schweren oder leichten Immunglobulinkette verwendet wird, kann das Fusionsprotein eine oder mehrere der komplementbestimmenden Regionen CDR1, CDR2 oder CDR3 umfassen. Unter Verwendung des Kabat-Immunglobulinaminosäuresequenz-Positionsnummerierungssystems sind die CDRs der leichten Kette die folgenden: CDR1 (Reste 23–35), CDR2 (Reste 49–57) und CDR3 (Reste 88–98); und die CDRs der schweren Kette sind wie folgt: CDR1 (Reste 30–36), CDR2 (Rest 49–66) und CDR3 (Reste 94–103). Siehe Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5. Ed., NIH, (1991).

[0048] Wenn ein CDR eines Immunglobulin-Fusions-Display-Proteins mutiert wird, können einige, die meisten oder alle der CDRs entfernt und durch neue, durch Mutagenese eingeführte, einzubringende Sequenzen substituiert werden. CDRs sind sehr anpassungsfähig in Bezug auf Einfügungen variabler Größe ohne das Zerstören der Fähigkeit des Immunglobulins zur Zusammensetzung und Präsentation der neuen zufällig positionierten und ausgewählten Aminosäuresequenz.

[0049] In einer Ausführungsform kann ein Phagen-Display-Protein dahingehend entwickelt werden, dass es mehrere Bindungsstellen enthält. Zum Beispiel können unter Verwendung der schweren Kette des Immunglobulins in beispielhafter Weise Bindungsstellen unabhängig voneinander durch die Verfahren dieser Erfindung hergestellt werden in eine oder mehrere der CDRs, die als CDR1, CDR2 und CDR3 bezeichnet werden. Zusätzlich kann man Bindungsstellen in eine CDR der schweren Kette und eine CDR einer leichten Kette einführen, in mehrere schwere und leichte Ketten-CDRs und ähnliche Kombinationen.

[0050] In einer anderen Ausführungsform wird das Phagen-Display-Protein dahingehend entwickelt, Stabilisierungseigenschaften zusätzlich zu der Stabilisierung zu umfassen, die durch die native Struktur des Display-Proteins zur Verfügung gestellt wird. In dieser Hinsicht können Cysteinreste durch das Oligonukleotide kodiert werden, so dass Disulfidbrücken ausgebildet werden können. Die Positionierung der Cysteinreste kann variiert werden, so dass eine Kringelstruktur von ungefähr 5 bis 20 Aminosäureresten ausgebildet wird.

[0051] Ein bevorzugtes Phagemid-Display-Protein verwendet einen filamentösen Phagenanker, der an ein Polypeptid der variablen Domäne der schweren Immunglobulinkette fusioniert ist und die leichte Kette assoziiert (setzt sich zusammen) mit der schweren Kette während der Expression, um den präsentierten heterodimeren Rezeptor auszubilden, wie hierin im Weiteren beschrieben wird.

4. Oligonukleotide

[0052] Die Herstellung eines heterodimeren Immunglobulinmoleküls gemäß der vorliegenden Erfindung involviert die Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden, die entwickelt wurden, um zufällige Mutationen in ausgewählte CDR-Regionen der variablen Domäne der schweren oder leichten Kette einzuführen. Des Weiteren hat die hierin beschriebene Oligonukleotidstrategie die besonderen Vorteile der Herstellung einer extrem großen Population verschiedener zufällig gewählter Bindungsstellen in einer einzelnen Reaktion durch die Verwendung degenerierter Polypeptide.

[0053] Das mutagenisierte Oligonukleotid generiert das die Aminosäuresequenz kodierende Gen des Immunglobulin-CDRs zufällig und das anschließende Screening des exprimierten Phagemid-Display-Proteins auf ausgewählte Bindungsspezifitäten wird wie hierin beschrieben und des Weiteren in den Beispielen durchgeführt.

[0054] Es werden verschiedene Oligonukleotidentwicklungen verwendet, um eine Bindungsstelle mit variie-

renden Längen herzustellen, die ein CDR umfasst. In diesem Fall wurden eine Serie von 4, 5, 6, 8, 10 oder 16 aufeinanderfolgender Aminosäurereste zufällig in die CDR-Region der variablen Domäne des Immunglobulins durch ein degeneriertes Oligonukleotid eingeführt.

[0055] Die allgemeine Struktur eines Oligonukleotids zur Verwendung in den vorliegenden Verfahren hat die allgemeine Formel ANB, wobei A und B homologe Regionen als Regionen des Immunglobulinpolypeptidgens definieren, die die CDR-Region flankieren, in welcher die Mutagenese eingeführt werden soll und N definiert die Region der Degeneration, in welche variable Aminosäurereste eingeführt werden durch die Präsentation aller möglichen Kombinationen von Nukleotidtriplets unter Verwendung der vier Basen A, T, G und C.

[0056] Die Anzahl der Nukleotide für jede Region (A, B oder N) kann stark variieren, aber N muss in Triplets vorkommen, um den Leserahmen des Display-Proteins zu erhalten. Typischerweise sind die Regionen A und B von ausreichender Länge, um eine Hybridisierungsspezifität mit dem Template während der Primerverlängerungsreaktion zu vermitteln. Somit sind die Regionen A und B typischennreise jeweils mindestens 6 Nukleotide lang und vorzugsweise jeweils mindestens 9 Nukleotide in Länge; obwohl sie bis zu 50 Nukleotide Länge aufweisen können. Die N's sind typischerweise von einer stark variablen Länge, die typischennreise von 3 bis 24 Aminosäurereste in Länge kodieren.

[0057] Wenn das Display-Protein ein Immunglobulin ist, dann sind die Homologien in den Regionen A und B auf die Immunglobulingerüstregionen (framwork regions FR) gerichtet, die das CDR flankieren, in welches die Bindungsstelle einzufügen ist.

[0058] Somit können in einer Ausführungsform die Verfahren der Erfindung ein Oligonukleotid involvieren, das als ein Primer zur Induktion einer Mutagenese in einer CDR eines Gens der schweren oder leichten Immunglobulinketten nützlich ist. Das Oligonukleotid hat 5'- und 3'-Termini und umfasst:

i) eine Nukleotidsequenz von ungefähr 6 bis 50 Nukleotiden in Länge an dem 3'-Terminus, die in der Lage ist, an eine erste Gerüstregion des Immunglobulingens zu hybridisieren;

ii) eine Nukleotidsequenz von ungefähr 6 bis 50 Nukleotiden in Länge in dem 5'-Terminus, die in der Lage ist, an eine zweite Gerüstregion des Immunglobulingens zu hybridisieren; und

iii) eine Nukleotidsequenz zwischen besagten 5'- und 3'-Termini gemäß der Formel:

$[NNK]_n$,

worin n eine ganze Zahl von 3 bis 24 ist, N ist unabhängig von den anderen jegliches Nukleotid, K ist G oder T, und worin besagte 3'- und 5'- terminale Nukleotidsequenzen eine Länge von ungefähr 6 bis 50 Nukleotide aufweisen oder ein Oligonukleotid mit einer dazu komplementären Sequenz aufweist. Vorzugsweise ist n 4, 5, 6, 8, 10 oder 16.

[0059] Die Wahl der Gerüstregionen hängt von dem CDR ab, in welches die Bindungsstelle eingeführt werden soll. Somit werden z. B. für eine Insertion in CDR3 die 3'- und 5'-Regionen der Oligonukleotide so ausgewählt, dass sie komplementär in der Nukleotidsequenz zu dem kodierenden Strang sind, der FR4 und FR3 definiert, die jeweils CDR3 flankieren, wobei das Oligonukleotid komplementär zu dem nicht-kodierenden (anti-sense)-Strang der Template-DNA ist.

[0060] Des Weiteren variiert die Gerüstregionsequenz abhängig davon, ob eine schwere oder – leichte Immunglobulinketten-CDR-Region durch die vorliegenden Verfahren mutagenisiert wird.

[0061] Ein bevorzugtes und beispielhaftes CDR für das Einfügen einer Bindungsstelle ist die CDR3 der schweren oder leichten Immunglobulinkette. Beispielhafte schwere und leichte Immunglobulinkettenpolypeptide werden durch den Phagemidvektor pC3AP313, wie hierin beschrieben, exprimiert.

[0062] Bevorzugte sind menschliche heterodimere Immunglobulinmoleküle und daher ist das zu mutagenisierende Immunglobulin in bevorzugten Ausführungsformen und das dazu komplementäre Oligonukleotid von menschlicher Abstammung.

[0063] Oligonukleotide, die in den vorliegenden Verfahren verwendet werden, die besonders für die Herstellung mutagenisierter oder leichter Ketten-CDRs bevorzugt sind, werden in den Beispielen beschrieben. Wie hierin beschrieben, kann die Strategie zur Mutagenisierung durch Polymerasekettenreaktionsamplifikation stark variieren. Zwei unterschiedliche Strategien werden im Detail beschrieben, die sich in dem Oligonukleotid unterscheiden, welches die degenerierten Nukleotide einführt. Somit können degenerierte PCR-Primer entwickelt werden, die kodierend oder nicht-kodierend sind, abhängig davon, ob sie stromaufwärts oder stromabwärts des PCR-Primers vorliegen. Ein Primer kann auch so hergestellt werden, dass er komplementär zu solchen ist, die hierin beschrieben sind, und funktionell äquivalent ist.

[0064] In ähnliche Weise können Gerüstsequenzen in der Länge variieren, während der Grad der Mutation zu dem CDR erhalten bleibt, wie beschrieben in dem Beispiel der Oligonukleotidprimerpools KV6R und k10, die hierin beschrieben werden. Somit kann ein Oligonukleotid aus variierenden 5'- und 3'-Termini bestehen, und einer variierenden Menge degenerierter Tripletnukleotide, wie hierin beschrieben.

[0065] Bevorzugte Oligonukleotide zur Mutagenisierung einer leichten Kette werden in den Beispielen be-

schrieben und umfassen die Oligonukleotidprimerpools KV4R, k8, KVSR, k9, KV6R, k10, KV10R, p313K380Vb, p313K310OVb und p313K3160Vb. Wie ein Fachmann auf dem Gebiet zu schätzen weiß, können andere Nukleotide verwendet werden.

[0066] Die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung verwendeten Oligonukleotide können durch eine Reihe von chemischen Reaktionen, wie wohl bekannt ist, synthetisiert werden. Ein exzellenter Überblick ist "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach", Ed. M.J. Gait, JRL Press, New York, NY (1990). Geeignete synthetische Verfahren umfassen z. B. die Phosphotriester- oder Phosphodiester-Verfahren, siehe Narang et al., Meth. Enzymol., 68: 90, (1979); US-Patent Nr. 4,356,270; und Brown et al., Meth. Enzymol., 68: 109, (1979). Die Aufreinigung von synthetisierten Oligonukleotiden zur Verwendung in der Primerverlängerung und PCR-Rektionen ist wohl bekannt. Sie z. B. Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York (1987). Oligonukleotide zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung werden kommerziell durch Operon Technologies, Alameda, CA synthetisiert.

5. Primverlängerunasreaktionen

[0067] Die Begriffe "Polynukleotid" und "Oligonukleotid" werden hierin in Bezug auf Primer, Sonden und Nukleinsäurefragmente oder Segmente, die durch Primerverlängerung synthetisiert werden, verwendet und sind als ein Molekül definiert, umfassend zwei oder mehr Deoxyribonukleotide oder Ribonukleotide, vorzugsweise mehr als drei. Seine exakte Größe wird von vielen Faktoren abhängen, welche wiederum von den letztendlichen Verwendungsbedingungen abhängen.

[0068] Der Begriff "Primer", wie hierin verwendet, bezeichnet ein Polynukleotid, egal ob aus einer Nukleinsäurerestriktionsverdaureaktion aufgereinigt oder synthetisch hergestellt, welches in der Lage ist, als ein Initiationspunkt einer Nukleinsäuresynthese zu fungieren, wenn unter Bedingungen gestellt, in welchen die Synthese eines Primerverlängerungsproduktes, welches komplementär zu einem Nukleinsäurestrang ist, induziert wird, d. h., in der Gegenwart von Nukleotiden und einem Mittel zur Polymerisation wie z. B. einer DNA-Polymerase, reversen Transkriptase und Ähnlichem und bei einer geeigneten Temperatur und pH. Der Primer ist vorzugsweise einzelsträngig für maximale Effizienz, kann aber alternativ dazu in doppelsträngiger Form vorliegen. Wenn doppelsträngig, wird der Primer zuerst behandelt, um ihn von seinem komplementären Strang abzutrennen, bevor er verwendet wird, um Verlängerungsprodukte herzustellen. Vorzugsweise ist der Primer ein Polydeoxyribonukleotid. Der Primer muss ausreichend lang. sein, um die Synthese der Verlängerungsprodukte in der Gegenwart der Polymerisationsagenzien einzuleiten. Die exakten Längen der Primer werden von vielen Faktoren abhängen, einschließlich der Temperatur und der Quelle des Primers. Zum Beispiel enthält, abhängig von der Komplexität der Zielsequenz, ein Polynukleotidprimer typischennreise 15 bis 25 oder mehr Nukleotide, obwohl er auch weniger Nukleotide enthalten kann. Kurze Primermoleküle benötigen im Allgemeinen kühlere Temperaturen, um ausreichend stabile Hybridkomplexe mit dem Template auszubilden.

[0069] Die hierin verwendeten Primer sind dahingehend ausgewählt, um "im Wesentlichen" komplementär zu den verschiedenen Strängen von jeder spezifischen Sequenz zu sein, die synthetisiert oder hergestellt werden soll. Dieses bedeutet, dass der Primer ausreichend komplementär sein muss, um nicht zufällig mit seinem jeweiligen Templatestrang zu hybridisieren. Daher kann die Primersequenz die genaue Sequenz des Templates reflektieren oder auch nicht. Zum Beispiel kann ein nicht-komplementäres Nukleotidfragment an dem 5'-Ende des Primers befestigt sein, wobei der Rest der Primersequenz im Wesentlichen komplementär zu dem Strang ist. Solche nicht-komplementären Fragmente kodieren typischerweise für eine Endonukleaserestriktionsschnittstelle. Alternativ dazu können nichtkomplementäre Basen oder längere Sequenzen in dem Primer verteilt sein, unter der Voraussetzung, dass die Primersequenz eine ausreichende Komplementärität mit der Sequenz des Stranges hat, der synthetisiert oder amplifiziert werden soll, um nicht zufällig damit zu hybridisieren und dadurch ein Verlängerungsprodukt unter Polynukleotidsynthetesebedingungen auszubilden.

[0070] Primer zur Verwendung in den Verfahren in der vorliegenden Erfindung können auch eine DNA-abhängige RNA-Polymerasepromotersequenz oder ihr Komplement enthalten. Siehe z. B. 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, Sambrook et al. Eds: Cold Spring Harbor, NY (1989).

[0071] Wenn ein Primer, der einen DNA-abhängigen RNA-Polymerasepromoter enthält, verwendet wird, wird der Primer an den zu amplifizierenden Polynukleotidstrang hybridisiert und der zweite Polynukleotidstrang des DNA-abhängigen RNA-Polymerasepromoters wird vervollständigt unter Verwendung eines induzierenden Mittels wie der E. coli DNA-Polymerase I oder dem Klenow-Fragment der E. coli DNA-Polymerase. Das Anfangsnukleotid wird durch das Alternieren zwischen der Herstellung eines RNA-Polynukleotids und dem DNA-Polynukleotid amplifiziert.

[0072] Primer können auch eine Templatesequenz oder Replikationsinitiationsstelle für eine RNA-gerichtete RNA-Polymerase enthalten. Typische RNA-gerichtete RNA-Polymerasen umfassen die QB-Replikase, die durch Lizardi et al., Biotechnology, 6: 1197–1202 (1988) beschrieben wird. RNA-gerichtete Polymerasen produzieren eine große Anzahl von RNA-Strängen aus einer kleinen Anzahl von Template-RNA-Strängen, die

eine Templatesequenz oder Replikationsinitationsstelle enthalten. Diese Polymerasen ergeben typischerweise eine einmillionenfache Amplifikation des Templatestranges, wie durch Kramer et al., J. Mol. Biol., 89: 719–736 (1974) beschrieben wurde.

[0073] Die Wahl einer Nukleotidsequenz eines Primers hängt von Faktoren ab, wie dem Abstand der Nukleinsäure von der Region des Gens des Display-Proteins, in welche eine Bindungsstelle eingeführt wird, seine Hybridisierungsstelle auf der Nukleinsäure relativ zu einem zweiten zu verwendenden Primer und Ähnlichem.

[0074] Die PCR-Reaktion wird unter Verwendung von jeglichem geeigneten Verfahren durchgeführt. Im Allgemeinen wird sie in einer gepufferten, wässrigen Lösung vorgenommen, d. h., einem PCR-Puffer, vorzugsweise bei einem pH von 7–9, am meisten bevorzugt ungefähr 8. Vorzugsweise wird ein molarer Überschuss des Primers mit dem Puffer, der den Templatestrang enthält, vermischt. Ein großer molarer Überschuss von ungefähr 10^4 : 1 von Primer zu Template ist bevorzugt, um die Effizienz des Verfahrens zu verbessern.

[0075] Der PCR-Puffer enthält auch die Deoxyribonukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP und eine Polymerase, die typischennreise thermostabil ist, alles in geeigneten Mengen zu Primerverlängerungs (Polynukleotidsynthese) - Reaktion. Die resultierende Lösung (PCR-Mischung) wird auf ungefähr 90 Grad Celsius (90°C)–100°C für ungefähr 1 bis 10 Minuten erhitzt, vorzugsweise von 1 bis 4 Minuten. Nach dieser Erhitzungsperiode wird die Lösung auf 54 °C kühlen gelassen, was für eine Primerhybridisierung bevorzugt ist. Die Synthesereaktion kann von Raumtemperatur bis zu einer Temperatur erfolgen, bei der die Polymerase (Induzierungsagens) nicht mehr effizient funktioniert. Somit wird, z. B., wenn eine DNA-Polymerase als induzierendes Agens verwendet wird, die Temperatur im Allgemeinen nicht mehr als ungefähr 40°C sein. Ein beispielhafter PCR-Puffer umfasst das Folgende: 50 Mm KCl, 10 Mm Tris-HCl, pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,001 % (Gew./Vol.) Gelatine, 200 Mikromolar (µM) DATP, 200 µM DTTP, 200 µM DCTP, 200 µM DGTP und 2,5 Einheiten Thermus aquaticus DNA-Polymerase I (US-Patent Nr. 4,889,819) pro 100 Mikroliter Puffer. Beispielhafte PCR-Amplifikationen wurden unter Verwendung des in den Beispielen beschriebenen Puffersystems durchgeführt.

[0076] Das induzierende Agens kann jegliche Verbindung oder ein System sein, welches funktionieren wird, um die Synthese von Primerverlängerungsprodukten zu ergeben, einschließlich Enzyme. Geeignete Enzyme für diesen Zweck umfassen z. B. E. coli DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment von E. coli DNA-Polymerase I, T4 DNA-Polymerase, andere verfügbare DNA-Polymerasen, reverse Transkriptase und andere Enzyme, einschließlich hitzestabiler Enzyme, die die Kombination der Nukleotide in geeigneter Weise erleichtern, um die Primerverlängerungsprodukte auszubilden, die komplementär zu dem jeweiligen Nukleinsäurestrang sind. Im Allgemeinen wird die Synthese an dem 3'-Ende von jedem Primer beginnen und sich in der 5'-Richtung entlang des Templatestranges fortsetzen bis die Synthese terminiert wird, wodurch Moleküle verschiedener Länge hergestellt werden. Es können Induzierungsagenzien vorhanden sein, welche die Synthese an dem 5'-Ende initiieren und in der obigen Richtung unter Verwendung des gleichen wie hierin beschriebenen Verfahrens weiterführen.

[0077] Ein induzierendes Agens kann auch eine Verbindung oder ein System sein, welches funktionieren wird, um die Synthese von RNA-Primerverlängerungsprodukten zu ergeben, einschließlich Enzyme. In bevorzugten Ausführungsformen kann das induzierende Agens eine DNA-abhängige RNA-Polymerase sein wie die T7 RNA-Polymerase, die T3 RNA Polymerase oder die SP6 RNA-Polymerase sein. Diese Polymerasen produzieren ein komplementäres RNA-Polynukleotid. Die hohe Umsetzungsrate der RNA-Polymerase amplifiziert das Ausgangspolynukleotid, wie es durch Chamberlin et al., The Enzymes, Ed. P. Boyer, S. 87–108, Academic Press, New York (1982), beschrieben wird. Ein weiterer Vorteil der T7 RNA-Polymerase ist, dass Mutationen in die Polynukleotidsynthese eingeführt werden können durch das Ersetzen eines Teils der cDNA mit einem oder mehreren mutagenen Oligodeoxynukleotiden (Polynukleotiden) und das direkte Transkribieren des teilweise fehlbesetzten Templates, wie zuvor beschrieben durch Joyce et al., Nuc. Acids Res., 17: 711– 722 (1989). Amplifikationssysteme, die auf Transkription basieren, wurden durch Gingeras et al., in PCR Protocols. A Guide to Methods and Apolications S. 245–252, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990) beschrieben.

[0078] Wenn das induzierende Agens eine DNA-abhängige RNA-Polymerase ist und somit Ribonukleotidtriphosphate einbaut, werden ausreichende Mengen ATP, CTP, GTP und UTP zur Primerverlängerungsreaktionsmischung hinzugemischt und die resultierende Lösung wird wie oben beschrieben behandelt.

[0079] Der neu synthetisierte Strang und sein komplementärer Nukleinsäurestrang bilden ein doppelsträngiges Molekül aus, welches in den folgenden Schritten des Verfahrens verwendet werden kann, wie sie für die PCR bekannt sind.

[0080] Die PCR wird typischerweise durch einen Thermozyklus durchgeführt, d .h., die wiederholte Erhöhung und Verringerung der Temperatur einer PCR-Reaktionsmischung innerhalb eines Temperaturbereiches, dessen untere Grenze ungefähr 10 °C bis ungefähr 40 °C beträgt und dessen obere Grenze ungefähr 90 °C bis 100 °C beträgt. Das Erhöhen und Verringern kann kontinuierlich sein, ist aber vorzugsweise in Phase mit den Zeiträumen relativer Temperaturstabilität bei jeder der Temperaturen, die eine Polynukleotidsynthese, Denaturierung und Hybridisierung favorisieren.

[0081] PCR-Amplifikationsverfahren werden im Detail in den US-Patenten NRs. 4,683,192, 4,683,20, 4,800,159 und 4,965,188 beschrieben sowie zumindestens in einigen Texten, einschließlich "PCR Technology:

Principles and Applications for DNA Amplification", H. Erllich, Ed., Stockton Press, New York (1989); und "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis et al., Eds., Academic Press, San Diego, California (1990).

[0082] Die PCR kann durchgeführt werden, um zwei verschiedene PCR-Reaktionsprodukte in einem Verfahren zu ligieren, das als überlappende PCR oder crossover-PCR bezeichnet wird. Dieses Verfahren wird verwendet, um schwere und leichte Ketten-PCR-Reaktionsprodukte zu verbinden und wird hierin beschrieben. In dem überlappenden PCR-Verfahren ist es einfach, die Mutagenese eines CDRs durch das Herstellen entweder des 3'-Primers oder des 5'-Primers als dem degenerierten Oligonukleotid in dem Primerpaar einzuführen. Beide Verfahren werden in den Beispielen beschrieben.

[0083] Weitere bevorzugte PCR-Reaktionen unter Verwendung der Oligonukleotide und der Verfahren dieser Erfindung werden in den Beispielen beschrieben.

6. Phasen-Display-Vektoren

[0084] Die zufällige Mutagenese von CDRs in einer variablen (V)-Region und Screeningverfahren, wie sie durch Barbas et al., Proc. Natl. Acad: Sci.. USA, 89: 4457–4461 (1992) beschrieben werden, werden zur Herstellung von Antikörperbibliotheken verwendet, die verschiedene Bindungsstellenspezifitäten mit den hierin beschriebenen Verbesserungen enthalten.

[0085] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung zur Herstellung von Antikörpermolekülen involvieren die Verwendung von Phagen-Display-Vektoren, bedingt durch deren Vorteil des zur Verfügungstellens eines Mittels zur Untersuchung einer sehr großen Population von exprimierten Display-Proteinen und dadurch die Lokalisierung eines oder mehrerer spezifischer Klone, die für eine gewünschte Bindungsreaktivität kodieren.

[0086] Die Verwendung von Phagen-Display-Vektoren leitet sich von der zuvor beschriebenen Verwendung kombinatorischer Bibliotheken von Antikörpermolekülen ab, die auf Phagemiden basieren. Die kombinatorischen Bibliotheksproduktions- und Manipulationsverfahren wurden ausgiebig in der Literatur beschrieben und werden hierin nicht im Detail wiedergegeben, außer solchen Merkmalen, die notwendig sind, um die einzigartigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung zu machen und zu verwenden. Jedoch involvieren die Verfahren im Allgemeinen die Verwendung eines filamentösen Phagen (Phagemid) Oberflächenexpressionsvektorsystems zur Klonierung und Exprimierung von Antikörperspezies der Bibliothek.

[0087] Es wurden verschiedene Phagemidklonierungssysteme zur Herstellung kombinatorischer Bibliotheken durch andere beschrieben. Siehe z. B. die Herstellung von kombinatorischen Antikörperbibliotheken auf Phagemiden, wie beschrieben durch Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci.. USA, 88: 4363–43366 (1991), Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci.. USA, 88: 7978– 7982 (1991); Zebedee et al., Proc. Natl. Acad. Sci.. USA, 88: 11120–11123 (1991); Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci.. USA, 89: 4457–4461 (1992); und Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci.. USA, 89: 3576–3580 (1992).

a. Phasen-Display-Vektor-Struktur

[0088] Ein bevorzugter Phagemid-Vektor der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinantes DNA (rDNA)-Molekül, das eine Nukleotidsequenz enthält, die für ein Fusionspolypeptid kodiert und in der Lage ist, dieses zu exprimieren, das in der Richtung vom Amino- zum Carboxy-Terminus (1) eine prokaryontische Sekretionssignaldomäne, (2) ein heterologes Polypeptid, das eine variable Region einer schweren oder -leichten Immunglobulinkette definiert, und (3) eine Membranankerdomäne eines filamentösen Phagen exprimiert. Der Vektor umfasst DNA-Expresionskontrollsequenzen zur Exprimierung des Fusionspolypeptids, vorzugsweise prokaryontische Kontrollsequenzen.

[0089] Der filamentöse Phagenmembrananker ist vorzugsweise eine Domäne des cpIII- oder cpVI– II Mantelproteins, das in der Lage ist, mit der Matrix eines filamentösen Phagenpartikels zu assoziieren, wodurch das Fusionspolypeptid auf der Phagenoberfläche eingebaut wird.

[0090] Bevorzugte Membrananker für den Vektor sind aus den filamentösen Phagen M13, f1, fd und einem äquivalenten filamentösen Phagen zu gewinnen. Bevorzugte Membranankerdomäen sind in den Mantelproteinen zu finden, die durch Gen III und Gen VIII kodiert werden. Die Membranankerdomäne eines filamentösen Phagenmantelproteins ist ein Teil der Carboxy-teminalen Region des Mantelproteins und umfasst eine Region von hydrophoben Aminosäureresten zur Überbrückung einer Lipiddoppelmembran und eine Region von geladenen Aminosäureresten, die normalerweise auf der cytoplasmatischen Oberfläche der Membran zu finden ist und verlängert sich weiter von der Membran weg.

[0091] In dem Phagen f1 umfasst die Membran-überbrückende Region des Gen VIII-Mantelproteins die Reste Trp-26 bis Lys-40 und die cytoplasmatische Region umfasst die Carboxy-terminalen 11 Reste von 41 bis 52 (Ohkawa et al., J. Biol. Chem., 256: 9951–9958, 1981). Ein beispielhafter Membrananker würde aus den Resten 26 bis 40 von cpVIII bestehen. Somit wird die Aminosäuresequenz einer bevorzugten Membranankerdomäne aus dem Mantelprotein des Gens VIII des filamentösen M13 Phagen abgeleitet (auch als cpViii oder CP

8 bezeichnet). Gen VIII-Mantelprotein ist auf einem gereiften filamentösen Phagen in der Mehrzahl der Phagenpartikel mit typischerweise ungefähr 2500 bis 3000 Kopien des Mantelproteins vorhanden.

[0092] Zusätzlich wird die Aminosäuresequenz einer anderen bevorzugten Membrananker domäne aus dem Mantelprotein des Gen III des filamentösen M13Phagen (auch als cpIII bezeichnet) abgeleitet. Das Gen III Mantelprotein ist auf einem gereiften filamentösen Phagen an einem Ende des Phagenpartikels mit typischerweise ungefähr 4 bis 6 Kopien des Mantelproteins vorhanden.

[0093] Für detaillierte Beschreibungen der Struktur von filamentösen Phagenpartikeln, deren Mantelproteine und Partikelzusammensetzung, siehe die Übersichten 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).

[0094] Das Sekretionssignal ist eine Leader-Peptiddomäne eines Proteins, das das Protein auf die periplasmatische Membran von gram-negativen Bakterien zielt. Ein bevorzugtes Sekretionssignal ist ein pelB-Sekretionssignal. Die vorausgesagten Aminosäuresequenzen der Sekretionssignaldomäne der zwei pelB-Genproduktvarianten von Erwinia carotova werden in Lei et al. Nature. 331: 543-546 (1988) beschrieben.

[0095] Die Leader-Sequenz des pelB-Proteins wurde zuvor als ein Sekretionssignal für Fusionsproteine verwendet (Better et al., Science, 240: 1041–1043 (1988); Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci.. USA, 86: 5728–5732 (1989); and Mullinax et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8095–8099 (1990)). Aminosäuresequenzen für andere Sekretionssignalpolypeptiddomänen aus E. coli. die in dieser Erfindung nützlich sind, werden in Oliver, Eschericia coli und Salmonella Typhimurium, Niedhard, F.C. (Ed.), American Society für Microbiology, Washington, D.C., 1: 56–69 (1987), beschrieben.

[0096] DNA-Expressionskontrollsequenzen umfassen einen Satz an DNA-Expressionssignalen zur Exprimierung eines strukturellen Genprodukts und umfassen sowohl 5'- als auch 3'-Elemente, wie wohl bekannt ist, die operativ an das Cistron gebunden sind, so dass das Cistron in der Lage ist, ein strukturelles Genprodukt zu exprimieren. Die 5'-Kontrollsequenzen definieren einen Promoter zur Initiierung der Transkription und eine Ribosomenbindungstelle, die operativ mit dem 5'-Terminus der stromaufwärts gelegenen translatierbaren DNA-Sequenz verbunden ist.

[0097] Die 3'-Kontrollsequenzen definieren mindestens ein Terminations (Stop)-Kodon im Leseraster mit und operativ verbunden mit dem heterologen Fusionspolypeptid.

[0098] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst der in dieser Erfindung verwendete Vektor einen prokaryontischen Replikationsursprung oder ein Replikon, d. h., eine DNA-Sequenz mit der Fähigkeit, die autonome Replikation und die Aufbewahrung des rekombinanten DNA-Moleküls extrachromosomal in einer prokaryontischen Wirtszelle, wie einer bakteriellen Wirtszelle, die hiermit transformiert ist, zu dirigieren. Solche Replikationsursprünge sind auf dem Gebiet wohl bekannt. Bevorzugte Replikationsursprünge sind solche, die in dem Wirtsorganismus effizient sind. Eine bevorzugte Wirtszelle ist E. coli. Ein bevorzugter Stamm von E. coli ist der supE-Stamm, bei dem ein Stopp-Kodon als Glutamin (Q) translatiert wird. Zur Verwendung eines Vektors in E. coli ist ein bevorzugter Replikationsursprung der ColE1, der in pBR322 zu finden ist, und eine Reihe von anderen gewöhnlichen Plasmiden.

[0099] Auch bevorzugt ist der p15A Replikationsursprung, der auf pACYC und seinen Derivaten zu finden ist. Das ColE1- und p15A-Replikon wurden ausgiebig in der Molekularbiologie verwendet und sind auf einer Reihe von Plasmiden verfügbar und werden zumindestens durch Sambrook et al., in "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", 2. Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) beschrieben.

[0100] Die ColE1- und p15A-Replikons sind besonders für die Verwendung in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung bevorzugt, bei der zwei "binäre" Plasmide verwendet werden, da jedes von ihnen die Fähigkeit hat, die Replikation des Plasmids in E. coli zu dirigieren, während das andere Replikon in einem zweiten Plasmid in der gleichen E. coli-Zelle vorhanden ist. In anderen Worten, ColE1- und p15A sind sich nicht gegenseitig störende Replikons, die die Aufbewahrung von zwei Plasmiden in dem gleichen Wirt ermöglichen (siehe z. B. Shambrook et al., supra, auf den Seiten 1.3–1.4). Diese Eigenschaft ist besonders wichtig, wenn binäre Vektoren verwendet werden, weil eine einzelne Wirtszelle, die eine Phagenreplikation erlaubt, die unabhängige und gleichzeitige Replikation von zwei getrennten Vektoren unterstützen muss, z. B., wenn ein erster Vektor ein schweres Kettenpolypeptid exprimiert und ein zweiter Vektor ein leichtes Kettenpolypeptid exprimiert und es wünschenswert ist, dass die Vermischung von Bibliotheken von schweren und leichten Kettengenen alle möglichen Kombinationen der schweren und leichten Ketten kombiniert.

[0101] Zusätzlich können solche Ausführungsformen, die ein prokaryontisches Replikon umfassen, auch ein Gen umfassen, dessen Expression einen Selektionsvorteil, wie eine Medikamentenresistenz gegen einen bakteriellen Wirt, der damit transformiert ist, vermittelt. Typische bakterielle Medikamentenresistenzgene sind solche, die Resistenz gegen Ampicillin, Tetracyclin, Neomycin/Kanamycin oder Chloramphenicol vermitteln. Die Vektoren enthalten typischerweise auch gut handhabbare Restriktionsschnittstellen zum Einfügen von translatierbaren DNA-Sequenzen. Beispielhafte Vektoren sind die Plasmide pUC8, pUC9, PBR322 und pBR329, die von BioRad Laboratories, (Richmond, CA) verfügbar sind und pPL und pKK223, die von Pharmacia, (Piscataway, NJ) verfügbar sind.

[0102] Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das in der Lage ist,

eine andere Nukleinsäure, mit welcher es operativ verbunden ist, zwischen zwei verschiedenen genetischen Umgebungen zu transportieren. Bevorzugte Vektoren sind solche, die zur autonomen Replikation in der Lage sind und zur Expression von strukturellen Genprodukten, die in den DNA-Segmenten vorhanden sind, an welche sie operativ gebunden sind. Vektoren enthalten daher vorzugsweise die Replikons und Selektionsmarker, die zuvor beschrieben wurden.

[0103] Wie hierin in Bezug auf die DNA-Sequenzen oder -Segmente verwendet, bedeutet der Begriff "operativ verbunden" dass die Sequenzen oder Segmente, vorzugsweise durch konventionelle Phosphodiesterbindungen, in einem einzigen DNA-Strang kovalent verbunden wurden, egal ob in einzel- oder doppelsträngiger Form, in einer Weise, so dass die Sequenzen in der Lage sind, in dem Vektor zu funktionieren, d. h., exprimiert zu werden. Die Wahl des Vektors, an welchen eine Transkriptionseinheit oder eine Kassette dieser Endung operativ gebunden wird, hängt direkt, wie auf den Gebiet wohlbekannt ist, von den gewünschten funktionellen Eigenschaften ab, z. B., Vektorreplikation und Proteinexpression und der zu transformierenden Wirtszelle, wobei diese Einschränkungen inhärent auf dem Gebiet der Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle sind.

[0104] In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor zur Koexpression von zwei Cistrons, die darin enthalten sind, in der Lage, wie einem schweren Kettengen und einem leichten Kettengen. Die Koexpression wurde in einer Reihe von Systemen erzielt und muss daher nicht auf ein besonderes Design eingeschränkt sein, so lange ausreichende relative Mengen der zwei Genprodukte hergestellt werden, um eine Zusammensetzung und Expression eines funktionellen Heterodimers zu ermöglichen. Bevorzugte Vektoren, die zur Koexpression in der Lage sind, werden hierin beschrieben.

[0105] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein DNA-Expressionsvektor zur leicht handhabbaren Manipulation in der Form eines filamentösen Phagenpartikels hergestellt, der ein Genom gemäß den Lehren der vorliegenden Erfindung verkapselt. In dieser Ausführungsform enthält ein DNA-Expressionsvektor zusätzlich eine Nukleotidsequenz, die einen Replikationsursprung eines filamentösen Phagen definiert, so dass der Vektor nach der Präsentation der geeigneten genetischen Komplementierung als filamentöser Phage in einzelsträngiger Replikationsform replizieren kann und in filamentöse Phagenpartikel verpackt wird. Diese Eigenschaft ermöglicht die Fähigkeit des DNA-Expressionsvektors, in Phagenpartikel zur anschließenden Segregation des Partikels und des darin enthaltenen Vektors verpackt zu werden, weg von anderen Partikeln, die eine Population von Phagenpartikeln umfassen.

[0106] Ein Replikationsursprung eines filamentösen Phagen ist eine Region des Phagengenoms, wie wohlbekannt ist, die Stellen zu Initiierung der Replikation, Termination der Replikation und Verpackung der replikativen Form, die durch Replikation hergestellt wird, definiert (siehe z. B. Rasched et al., Microbiol. Rev., 50: 401–427, 1986; und Horiuchi, J. Mol. Biol., 188: 215–223, 1986). Ein bevorzugter Replikationsursprung eines filamentösen Phagen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist ein Replikationsursprung des Phagen M13, f1 oder fd (Short et al., Nucl. Acids Res., 16: 7583–7600, 1988).

[0107] Ein bevorzugter DNA-Expressionsvektor zur Klonierung, Mutagenese und Exprimierung eines Phagemid-Display-Proteins dieser Erfindung ist der dicistronische Phagemidexpressionsvektor pC3AP313, der hierin beschrieben wird. pC3AP313 ist in der Lage, sowohl das Phagemid-Display-Protein, das eine schwere Kettenfusion enthält wie auch die leichte Kette zu koexprimieren.

[0108] Es wird betont, dass, bedingt durch den genetischen Code und seine entsprechenden Redundanzen, viele Polynukleotidsequenzen hergestellt werden können, die eine vorgeschlagene Aminosäuresequenz der variablen Region der schweren oder leichten Immunglobulinketten kodieren können. Somit betrifft die Erfindung solche alternativen Polynukleotidsequenzen, die die Eigenschaften der Redundanz des genetischen Codes und dazu komplementäre Sequenzen beinhalten.

[0109] Insoweit wie der Expressionsvektor zur Herstellung eines menschlichen monoklonalen Antikörpers dieser Erfindung von einer Wirtszelle getragen wird, die mit der Expression des Antikörpers kompatibel ist, betrifft die Erfindung eine Wirtszelle, die einen Vektor oder ein Polynukleotid dieser Erfindung enthält. Eine bevorzugte Wirtszelle ist, wie hierin beschrieben, E. coli.

[0110] Der bevorzugte Phagemidexpressionsvektor in der Form des Plasmids, das ein Phagemid-Display-Protein dieser Erfindung herstellt, wurde nach den Voraussetzungen des Budapester Vertrags bei der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MKD, hinterlegt. Der Phagemidexpressionsvektor pC3AP313 hat die ATCC-Zugangs-Nummer 75408 und umfasst ein bevorzugtes Gen, das die variable Polypeptiddomäne einer leichten Immunglobulinkette kodiert.

b. Verwendung von Phagemid-Display-Vektoren, um Antikörperbibliotheken herzustellen

[0111] Ein Phagemidvektor zur Verwendung hierin ist ein rekombinantes DNA-(RDNA)-Molekül, das eine Nukleotidsequenz enthält, die für ein Antikörper-abgeleitetes heterodimeres Protein auf der Oberfläche des Phagemids in der Form eines Phagemid-Display-Proteins kodiert und in der Lage ist, dieses zu exprimieren. Ein beispielhafter bevorzugter Phagemidvektor ist das Plasmid pC3AP313, das in den Beispielen beschrieben wird.

[0112] Das Verfahren zur Herstellung eines heterodimeren Immunglobulinmoleküls involviert im Allgemeinen (1) das Einführen eines Gens von Interesse, das für eine schwere oder leichte V-Ketten-Region kodiert, in den Phagemiddisplay-Vektor; (2) das Einführen einer zufallsgenerierten Bindungsstelle in den Phagemid-Display-Proteinvektor durch Primerverlängerung mit einer Oligonukleotid-enthaltenden Region mit Homologie zu einer CDR des Antikörper-V-Region-Gens und enthaltend Regionen der Degeneration zur Herstellung zufällig gewählter kodierender Sequenzen, wie hierin beschrieben, um eine große Population von Displayvektoren auszubilden, die jeweils in der Lage sind, verschiedene putative Bindungsstellen zu exprimieren, die auf einem Phagemidoberflächen-Display-Protein dargestellt werden; (3) das Exprimieren des Display-Proteins und der Bindungsstelle auf der Oberfläche eines filamentösen Phagenpartikels, und (3) das Isolieren (screening) des oberflächenexprimierten Phagenpartikels unter Verwendung von Affinitätstechniken wie dem Schwenken von Phagenpartikels gegen ein ausgewähltes Antigen, wodurch eine oder mehrere Spezies an Phagemid isoliert werden, die ein Display-Protein enthalten, das eine Bindungsstelle enthält, die an ein ausgewähltes Antigen bindet.

[0113] Als eine weitere Charakterisierung der hergestellten Antikörperbindungsstelle wird die Nukleotid- und korrespondierende Aminosäuresequenz des Gens, das die zufällig gewählte CDR kodiert, durch Nukleinsäuresequenzierung bestimmt. Die primäre Aminosäuresequenzinformation stellt eine wesentliche Information bezüglich der Reaktivität der Bindungsstelle zur Verfügung.

[0114] Eine beispielhafte Herstellung einer Antikörperbindungsstelle in der CDR3 der variablen Domänen der schweren und leichten Ketten eines Immunglobulinheterodimers wird in den Beispielen beschrieben. Die Isolierung eines bestimmten Vektors, der in der Lage ist, eine Antikörperbindungsstelle von Interesse zu exprimieren, involviert die Einführung des dicistronischen Expressionsvektors, der in der Lage ist, das Phagemid-Display-Protein in einer Wirtszelle zu exprimieren, die die Expression von filamentösen Phagengenen und den Zusammenbau von Phagenpartikeln erlaubt. Typischerweise ist der Wirt E. coli. Danach wird ein Helferphagengenom in die Wirtszelle eingeführt, das den Phagemidexpressionsvektor enthält, um die genetische Komplementierung zur Verfügung zu stellen, die notwendig ist, damit Phagenpartikel zusammengesetzt werden.

[0115] Die resultierende Wirtszelle wird kultiviert, damit es ermöglicht wird, die eingeführten Phagengene und Display-Proteingene zu exprimieren und damit die Phagenpartikel zusammengesetzt und aus der Wirtszelle entlassen werden können. Die abgesetzten Phagenpartikel werden dann aus dem Wirtszellkulturmedium geerntet (gesammelt) und auf wünschenswerte Antikörperbindungseigenschaften untersucht. Typischerweise werden die geernteten Partikel zur Bindung mit einem ausgewählten Antigen "geschwenkt (panning)". Die stark bindenden Partikel werden dann gesammelt und die einzelnen Spezies von Partikeln werden klonal isoliert und des Weiteren auf die Bindung des Antigens untersucht. Phagen, welche eine Bindungsstelle der gewünschten Antigenbindungsspezifität zur Verfügung stellen, werden ausgewählt.

[0116] Es werden eine Reihe verschiedener Permutationen zur Manipulation eines Phagemid-Display-Vektors zur Durchführung der vorliegenden Erfindung hierin beschrieben, aber die Erfindung ist darauf nicht eingeschränkt.

[0117] Die Erfindung beschreibt in einer Ausführungsform ein Verfahren zur Herstellung einer Antikörperverbindungsstelle in einem Polypeptid von entweder der schweren oder der leichten Kette eines Heterodimers, das die Induktion einer Mutagenese in einer komplementbestimmenden Region eines Gens der schweren oder leichten Immunglobulinkette umfasst, welches das Amplifizieren eines CDR-Anteils des Immunglobulingens durch PCR unter Verwendung eines PCR-Primeroligonukleotids dieser Erfindung umfasst, zur Einführung einer zufällig gewählten Mutagenese in dem CDR-Anteil.

7. Universelle leichte Kette

[0118] Die vorliegende Endung beschreibt auch die Entdeckung von leichten Immunglobulinketten, welche die Fähigkeit haben, in ein funktionelles Heterodimer mit jeglichen einer Reihe von schweren Ketten zu komplexieren und diese werden daher als universelle leichte Ketten bezeichnet, um deren Fähigkeit zur Verwendung mit einer Vielzahl schwerer Ketten zu betonen.

[0119] Von besonderer Nützlichkeit ist die Einfachheit und Vielfalt in der Herstellung großer Antikörperrepertoire unter Verwendung einer universellen leichten Kette. In einem Ansatz wird eine universelle leichte Kette mit einer schweren Kettenbibliothek, wie einer zufällig gewählten schweren Kette gekreuzt. In einer besonderen Ausführungsform wird eine. schwere Kette von bevorzugter Spezifität durch CDR-Mutagenese zufallsgeneriert und die resultierende schwere Kettenbibliothek wird mit einer universellen leichten Kette gekreuzt, um ein Antikörperrepertoire auszubilden, welches dann auf wünschenswerte Bindungsaffinitäten hin untersucht wird. Dieser Ansatz ermöglicht die Optimierung einer bekannten schweren Kette, um eine verbesserte Bindungsspezifität herzustellen. Die Verwendung einer universellen leichten Kette erhöht die Anzahl von Kombinationen, die funktionelle heterodimere Antikörpermoleküle zur Verfügung stellen.

[0120] In einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung einer universellen leichten Kette als ein Gerüst zur Mutagenese, um eine Bibliothek modifizierter universeller leichter Kettengene zu er-

geben. Diese leichte Kettenbibliothek kann verwendet werden, um eine bekannte schwere Kette zu optimieren oder sie kann mit der Bibliothek einer schweren Kette, wie hierin beschrieben, gekreuzt werden.

[0121] Eine universelle leichte Kette ist ein Polypeptid einer leichten Immunglobulinkette, das mindestens ein CDR umfasst und die Fähigkeit hat, mit einer wesentlichen Vielzahl von schweren Ketten in einer Bibliothek von schweren Ketten zu komplexieren. Unter "wesentlicher Vielzahl von schweren Ketten in einer Bibliothek von schweren Ketten" ist zu verstehen, dass die universelle leichte Kette mit mindestens 0,1% der Spezies der schweren Ketten in einer Bibliothek von schweren Ketten komplexiert, vorzugsweise mit mindestens 1 % und mehr bevorzugt mit mindestens 10% der Spezies von schweren Ketten in einer Bibliothek von schweren Ketten.

[0122] Eine bevorzugte universelle leichte Kette hat die Sequenzeigenschaften der Polypeptidsequenz der leichten Kette, die in SEQ ID NR: 62 gezeigt wird, oder der Sequenz, die durch das Gen der leichten Kette in Plasmid p6F, das in Beispiel 8B1 beschrieben wird, kodiert. Unter Sequenzeigenschaften ist zu verstehen, dass das exprimierte leichte Kettenprotein in einer ähnlichen Weise, wie die in SEQ ID NR: 62 gezeigte Kette, funktioniert. Ähnlichkeit ist dort angezeigt, wo das exprimierte Gen der leichten Kette funktionell mit den gleichen oder den im Wesentlichen gleichen schweren Kettengenen assoziiert, um ein Heterodimer herzustellen, das ein Antigen mit der gleichen oder im Wesentlichen der gleichen Immunaffinität immunkomplexiert, wie ein Heterodimer; das sich mit der leichten Kette, die in SEQ ID NR: 62 gezeigt wird, ausbildet. Vorzugsweise umfasst eine universelle leichte Kette eine Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NR: 62 gezeigt wird.

[0123] Somit betrifft die Erfindung in einer Ausführungsform die Herstellung eines heterodimeren Immunglobulin (Antikörper)-Moleküls, das Polypeptide der variablen Domäne der schweren und der leichten Kette aufweist, unter Verwendung eines Gens einer universellen leichten Kette in einer Kreuzung mit einer Bibliothek von Genen der schweren Kette, gefolgt durch Expression und Screening gemäß der vorliegenden Erfindung. Das Verfahren umfasst die Schritte: a) des Kombinierens eines Gens einer leichten Immunglobulinkette mit variabler Domäne, die eine Sequenz mit den Sequenzeigenschaften der in SEQ ID NR: 62 gezeigten leichten Kette umfasst, mit einem oder mehreren Genen der schweren Immunglobulinketten mit variabler Domäne, um eine kombinatorische Genbibliothek von schweren und leichten Immunglobulinketten auszubilden, wobei besagtes Kombinieren das operative Verbinden besagten Gens der leichten Kette mit einem der besagten Gene der schweren Kette in einem Vektor umfasst, der in der Lage ist, besagte Gene der schweren und leichten Kette zu koexprimieren; b) der Expression der kombinatorischen Genbibliothek, um eine kombinatorische Antikörperbibliothek exprimierter Polypeptide der schweren und leichten Kette auszubilden; und c) des Auswählens von Spezies besagter kombinatorischer Antikörperbibliothek auf die Fähigkeit hin, ein ausgewähltes Antigen zu binden.

[0124] In bevorzugten Ausführungsformen ist die schwere Kettenbibliothek, die in dem vorgenannten Verfahren. verwendet wird, eine zufällig gewählte schwere Kettenbibliothek mit einer mutierten CDR-Domäne. In bevorzugten Ausführungsformen hat das Gen der leichten Kette des Immunglobulins, das in dem vorgenannten Verfahren verwendet wird, die Sequenzeigenschaften des leichten Kettengens in SEQ ID NR: 62.

[0125] In einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung einer universellen leichten Kette in den Mutagenese-Verfahren, um eine leichte Kettenbibliothek gemäß der vorliegenden Erfindung auszubilden. Die Mutagenese der leichten Kette in dieser Weise kann durch eine Reihe von Wegen durchgeführt werden, die im Detail in den Beispielen beschrieben werden.

Beispiele

[0126] Die folgenden Beispiele, die sich auf diese Erfindung beziehen, sind illustrativ und sollten natürlich nicht dahingehend konstruiert werden, dass sie die Erfindung spezifisch einschränken. Zudem werden solche Variationen der Erfindung, die nun bekannt oder später entwickelt worden sind, welche in das Betätigungsfeld eines Fachmanns auf diesem Gebiet fallen, dahingehend berücksichtigt, dass sie in den Umfang der vorliegenden Erfindung, wie er hiernach beansprucht wird, fallen.

1. Herstellung von Phagemid-Display Fab schweren und leichten Kettenheterodimeren, die an synthetische Haptenkoniugate binden.

[0127] In der Durchführung dieser Erfindung, um die Expression von Fab-Antikörpern mit Anti-Hapten-Bindungsstellen zu erhalten, werden die Fabs, die auf der Phagenoberfläche exprimiert werden, die schweren (Fd, bestehend aus V_H und C_H1) und die leichten (kappa) Ketten (V_L, C_L) von Antikörpern zuerst auf das Periplasma von E. coli zum Zusammenbau heterodimerer Fab-Moleküle gerichtet. In diesem System ist das erste Cistron, das ein periplasmatisches Sekretionssignal (pelB-Leader) kodiert, operativ an das Fusionsprotein Fdcpiii gebunden. Das zweite Cistron, das eine zweite pelB-Leadersequenz kodiert, ist operativ an eine leichte kappa Kette gebunden. Die Gegenwart des pelB-Leaders erleichtert die koordinierte aber getrennte Sekretion der beiden Fusionsproteine, die die native sowie semisynthetische Bindungsstelle und die leichte Kette enthal-

ten, aus dem bakteriellen Zytoplasma in den periplasmatischen Raum.

[0128] In diesem Prozess wird jede Kette durch die pelB-Leadersequenz in den periplasmatischen Raum transportiert, die anschließend gespalten wird. Die schwere Kette war in der Membran durch die cpIII-Membranankerdomäne verankert, während die leichte Kette in das Periplasma sezerniert wurde. Fab-Moleküle wurden durch die Bindung der schweren Kette mit den löslichen leichten Ketten gebildet. Zusätzlich ermöglichen die in dieser Erfindung verwendeten Expressionsvektoren die Herstellung löslicher Fab-Heterodimere, wie in Beispiel 5C beschrieben.

A. Herstellung eines dicistronischen Expressionsvektors pComb3 der in der Lage ist, ein Phagemid-Fab-Display-Protein zu exprimieren

[0129] Der Pcomb3-Phagemidexpressionsvektor dieser Erfindung wird verwendet, um die Anti-Haptenantikörper zu exprimieren. Die Antikörper Fd-Kette, umfassend variable (V_N) und konstante (C_H1 Domänen der schweren Kette wurden mit der C-terminalen Domäne des' Bakteriophagen III (3) Mantelproteins fusioniert. Gen III des filamentösen Phagen kodiert ein kleineres 406-Reste Phagenmantelprotein, cpIII (cp3), welches vor der Extrusion in dem Phagenzusammenbauprozess auf einer bakteriellen Membran exprimiert wird und auf der inneren Membran akkumuliert, die in das Periplasma von E. coli zeigt.

[0130] Der als Pcomb3 bezeichnete Phagemidvektor ermöglichte sowohl den Oberflächen-Display wie auch lösliche Formen von Fabs. Der Vektor wurde ursprünglich entwickelt für die Klonierung von kombinatorischen Fab-Bibliotheken, wie beschreiben durch Barbas et al., Methods. A Companion to Methods in Enzymology, 2: 119–124 (1991).

[0131] Die Xho I- und Spe I-Schnittstellen wurden zur Klonierung der vollständigen PCRamplifizierten schweren Ketten (Fd)-Sequenzen zur Verfügung gestellt. Eine Aat II-Restriktionsschnittstelle ist auch vorhanden, die die Insertion von Xho I/Aat II Verdauungsprodukten der PCR-Produkte ermöglicht. Die Sac I- und Sba I-Schnittstellen wurden zur Klonierung von PCR-amplifizierten leichten Antikörperketten dieser Erfindung zur Verfügung gestellt. Die Klonierungsschnittstellen waren mit zuvor beschriebenen Maus- und menschlichen PCR-Primern kompatibel, wie beschrieben durch Huse et al., Science, 246: 1275–1281 (1989) und Persson et al., Proc. Natl. Acad. Sci.. USA, 88: 2432–2436 (1991). Die Nukleotidsequenz des pelB, einer Leadersequenz zum Dirigieren des exprimierten Proteins in den periplasmatischen Raum, war wie die von Huse et al., supra. beschriebene.

[0132] Der Vektor enthielt auch eine Ribosomen-Bindungsstelle, wie beschrieben durch Shine et al., Nature, 254: 34 (1975). Die Sequenz des Phagemidvektors, pBluescript, der ColE1- und F1-Ursprünge und ein beta-Lactamase-Gen umfasst, wurde zuvor durch Short et al., Nuc. Acids Res., 16: 7583–7600 (1988) beschrieben und hat die GenBank Zugangsnummer 52330 für die vollständige Sequenz.

[0133] Zusätzliche Restriktionsschnittstellen Sal I, Acc I, Hinc II, Cla I, Hind III, Eco RV, Pst I und Sma I, die zwischen den Xho I- und Spe I-Positionen des leeren Vektors lokalisiert waren, wurden aus einem 51 Basenpaar langem „Stuffer"-Fragment von Pbluescript, wie durch Short et al., supra beschrieben, abgeleitet. Eine Nukleotidsequenz, die eine flexible 5 Aminosäuren lange Zwischensequenz kodiert, die keine eindeutige sekundäre Struktur aufweist, wurde zwischen die Fab- und cp3-Nukleotiddomänen gesetzt, so dass die Wechselwirkung in dem exprimierten Fusionsprotein minimiert wurde.

[0134] Somit bestand der resultierende kombinatorische Vektor Pcomb3 aus einem DNA-Molekül, das zwei Kassetten aufweist, um ein Fusionsprotein Fd/cp3 und ein lösliches Protein, die leichte Kette, zu exprimieren. Der Vektor enthielt auch Nukleotidsequenzen für die folgenden operativ verbundenen Elemente, die in einer 5'- zu 3'-Richtung aufgelistet sind: eine erste Kassette, bestehend aus LacZ-Promoter/Operatorsequenzen; eine Not I-Restriktionsschnittstelle; eine Ribosomenbindungsstelle; eine pelB-Leadersequenz; eine Abstandsregion; eine Klonierungsregion, die von 5'-Xho- und 3'-Spe 1-Restriktionsschnittstellen umgeben ist; die Zwischensequenz; die Sequenzen, die den Bakteriophagen cp3 kodieren, gefolgt von einem Stopkodon; einer Nhe I-Restriktionsschnittstelle, die zwischen den beiden Kassetten lokalisiert ist; eine zweite lacZ-Promotor/Operatorsequenz, gefolgt von einer ExpressionskontrollribosomenBindungsstelle; einer pelB-Leadersegeuenz; einer Abstandsregion; einer Klonierungsregion, die von 5'-Sac I- und 3'-Xba 1-Restriktionsschnittstellen umgeben ist, gefolgt von Expressionskontrollstopsequenzen und einer zweiten Not I-Restriktionsschnittstelle.

[0135] In dem oben gezeigten Expressionsvektor wurden die Fd/cp3-Fusions- und leichten Kettenproteine unter die Kontrolle von separaten lac-Promoter/Operatorsequenzen gestellt und in dem periplasmatischen Raum durch pelB-Leadersequenzen zum funktionellen Zusammenbau auf der Membran gerichtet. Der Einschluss der Phagen F1-intergenen Region in dem Vektor ermöglichte die Verpackung von einzelsträngigem Phagemid mit Hilfe eines Helferphagen. Die Verwendung einer Helferphagensuperinfektion ermöglichte die Expression von zwei Formen von cp3. Entsprechend war die normale Phagenmorphogenese durch Kompetition zwischen der Fd/cp3-Fusion und dem nativen cp3 des Helferphagen zur Einbindung in das Virion gestört. Das resultierende verpackte Phagemid trug natives cp3, welches zur Infektion notwendig ist und das kodierte

Fab-Fusionsprotein, welches zur Selektion präsentiert wird. Eine Fusion mit der C-terminalen Domäne war, bedingt durch den Phagemidansatz notwendig, da die Fusion mit der infektiösen N-terminalen Domäne die Wirtszelle resistent gegen eine Infektion machen würde.

[0136] Der oben beschriebene Pcomb3-Expressionsvektor bildet das Hauptkonstrukt des Fab-Display-Phagemid-Expressionsvektors, der unten beschrieben wird und in dieser Erfindung für die Herstellung von menschlichen Anti-Hapten Fab-Antikörpern verwendet wird. Der Oberflächendisplay-Phagemid-Expressionsvektor pC3AP313 wurde bei der ATCC am 2. Februar 1993 hinterlegt. Der hinterlegte Vektor hat die ATCC-Hinterlegungs-Nummer 75408 erhalten. Der pC3AP313-Expressionsvektor enthielt das Bakteriophagengen III und Sequenzen der schweren und leichten Ketten mit variabler Domäne zur Kodierung menschlicher Fab-Antikörper gegen Tetanustoxoid. Die kodierenden Nukleotidsequenzen des DNA-Stranges der Anti-Tetanustoxoid-schweren und -leichten Ketten mit variablen Domänen in pC3AP313 sind jeweils in der Sequenzauflistungen unter SEQ ID NR: 1 und 2 aufgelistet. Der Leserahmen der Nukleotidsequenzen für die Translation in Aminosäuresequenzen fängt an der Nukleotidposition 1 für beide, die variablen Domänen der leichten und schweren Ketten von pC3AP313, an. Die Tetanustoxoid-spezifischen Sequenzen wurden ursprünglich aus dem Screening von kombinatorischen Bibliotheken des Phagen Lambda Vektors mit schweren und leichten Antikörperketten erhalten, die aus den peripheren Blutlymphozyten eines Individuums abgeleitet wurden, das mit Tetanustoxoid, wie durch Persson et al., supra beschrieben, immunisiert wurde. Klon 3 wurde aus dem Bibliotheks-Screening ausgewählt und die schweren und leichten Kettensequenzen wurden dann jeweils durch Restriktionsverdau mit Xho I/Spel und Sacl/Xba I isoliert und in einen ähnlich verdauten Pcomb3-Vektor ligiert. Das Ligationsverfahren in der Herstellung von Expressionsvektorbibliotheken und die anschließende Expression der Anti-Hapten Fab-Antikörpern wird, wie in Beispiel 2 beschrieben, durchgeführt.

2. Auswahl von menschlichen Anti-Hapten-Antikörpern aus semisynthetischen leichten und schweren Kettenbibliotheken

A. Herstellung von zufallig gewählten Positionen innerhalb der CDR3 der leichten Kette eines Phagemid-Fab-Display-Proteins, das durch einen dicistronischen Expressionsvektor hergestellt wird

1) PCR mit kodierenden degenerierten Oligonukleotidprimern

[0137] Semisynthetische menschliche Fab-Bibliotheken, in denen sowohl die CDR3 der schweren wie auch der leichten Kettendomänen zufallsgeneriert waren, wurden konstruiert, auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen präsentiert und auf die Bindung an drei Hapten-Konjugate selektiert. Der Phagemidexpressionsvektor pC3AP313, der schwere und leichte Kettensequenzen zur Kodierung eines menschlichen Antikörpers enthält, der mit Tetanustoxin immunreagiert, wurde als ein Template zur PCR verwendet.

[0138] Leichte Kettenbibliotheken mit einer CDR3, die in vorbestimmten Aminosäurepositionen zufallsgeneriert worden war, wurden unter Verwendung des überlappenden PCR-Amplifikationsprotokolls hergestellt, das hierin beschrieben wird. In den Bibliotheken wurden Oligonukleotidprimerpools entwickelt, um in der Ausbildung von CDR3 in Längen von 8, 9 und 10 Aminosäuren zu resultieren, die mit den natürlich vorkommenden Kringellängen in Menschen korrespondieren. Die Diversität wurde auf die Kabat-Positionen 92–96 eingeschränkt, da die verbleibenden vier Positionen in der Natur hochkonserviert sind.

[0139] Um das 5'-Ende der leichten Kette von Gerüst 1 bis zum Ende von Gerüst 3 von pC3AP313 zu amplifizieren, wurden die folgenden Primerpaare verwendet. Der 5'-kodierende (sense) Oligonukleotidprimer KEF mit der Nukleotidsequenz 5'GAATTCTAAACTAGCTAGTCG3' (SEQ ID NR: 3) hybridisierte mit dem nicht-kodierenden Strang der leichten Kette, der mit der Region 5' korrespondiert und den Anfang von Gerüst 1 enthält. Der 3'- nicht-kodierende (antisense) Oligonukleotidprimer KV12B mit der Nukleotidsequenz 5'ATACTGCTGACAGTAATACAC3' (SEQ ID NR: 4) hybridisierte an den kodierenden Strang der leichten Kette, die mit dem 3'-Ende der Gerüst 3-Region korrespondiert. Die Oligonukleotidprimer wurden durch Operon Technologies, Alameda, CA, synthetisiert. Die Begriffe „kodierend" oder „sense", die in dem Kontext von Oligonukleotidprimern verwendet werden, identifizieren einen Primer, der die gleiche Sequenz wie der DNA-Strang aufweist, die eine schwere oder leichte Kette kodiert und die an den nicht-kodierenden Strang hybridisiert. In ähnlicher Weise identifiziert der Begriff „nicht-kodierend" oder „antisense" einen Primen, der komplementär zu dem kodierenden Strang ist und somit an diesen hybridisiert.

[0140] Für überlappende PCR wurde jeder Ansatz von PCR-Reaktionen in einer 100 Mikroliter (µl) Reaktion durchgeführt, die 1 Mikrogramm (µg) von jedem der jeweils paarweisen Oligonukleotidprimer enthält, die oben aufgelistet werden, 8 µl, 2,5 mM dNTP's (DATP, DCTP, DGTP, DTTP), 1 µl Taq-Polymerase, 10 ng Template pC3AP313 und 10 µl 10 × PCR-Puffer, der kommerziell gekauft wurde (Promega Biotech, Madison, WI). Es wurden dann fünfunddreißig Runden der PCR-Amplifikation in einem Perkin-Elmer Cetus 9600 GeneAmp PCR-System Thermocycler durchgeführt. Der Amplifikationszyklus bestand aus einem Denaturieren bei 94 Grad C (94°C) für 1 Minute, dem Verbinden bei 47°C für 1 Minute, gefolgt von der Verlängerung bei 72°C für

2 Minuten. Um ausreichende Mengen an Amplifikationsprodukt zu erhalten, wurden 15 identische PCR-Reaktionen durchgeführt.

[0141] Die resultierenden PCR-Amplifikationsprodukte wurden dann auf einem 1,5%igen Agarosegel unter Verwendung von Standardelektroelutionstechniken Gel-aufgereinigt, wie beschrieben in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Sambrook et al., Eds., Cold Spring Harbor, NY (1989). In Kürze, nach der Gelelektrophorese wurde die Region des Gels, das die DNA-Fragmente von vorgewählter Größe enthält, ausgeschnitten, in eine Dialysemembnan elektroeluiert, mit Ethanol gefällt und in einem Puffer resuspendiert, der 10 millimolar (mM) Tris-HCl [Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid] bei pH 7,5 und 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) bei einer endgültigen Konzentration von 50 Nanogramm/Milliliter (ng/ml) enthält.

[0142] Die aufgereinigten Amplifikationsprodukte wurden dann in einer überlappenden Verlängerungs-PCR-Reaktion mit den Produkten der zweiten PCR-Reaktion verwendet, beide wie unten beschrieben werden, um die beiden Produkte in rekonstruierte leichte Ketten mit variabler Domäne zu rekombinieren, die die mutagenisierte dritte Domäne der komplementbestimmenden Region (CDR3) enthalten.

[0143] Die zweite PCR-Reaktion resultierte in der Amplifikation der leichten Kette von dem 3'-Ende der Gerüstregion 3, verlängert bis zum Ende der konstanten Region der leichten Kette. Um diese Region zu amplifizieren zur Kodierung einer Zufallssequenz von 4 Aminosäureresten in dem CDR3 mit einer Gesamtlänge von 8 Aminosäuren wurden die folgenden Primerpaare verwendet. Der 5'-kodierende Oligonukleotidprimerpool, der als KV4R bezeichnet wird, hatte die durch die folgende Formel bezeichnete Nukleotidsequenz, 5'TATTACTGTCAGCAGTATNNKNNKNNKNNKACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG3' (SEQ ID NR: 5), worin N A, C, G oder T sein kann und K entweder G oder T ist. Der 3'-nicht-kodierende Primer T7B hybridisierte an den kodierenden Strang an dem 3'-Ende der konstanten Domäne der leichten Kette mit der Sequenz 5'AATACGACTCACTATAGGGCG3' (SEQ ID NR: 6). Das 5'-Ende des Primerpools ist komplementär zu dem 3'-Ende von Gerüst 3, das durch die komplementäre Nukleotidsequenz des Oligonukleotidprimers KV12B dargestellt wird, und das 3'-Ende des Primerpools ist komplementär zu dem 5'-Ende von Gerüst 4. Die Region zwischen den beiden spezifizierten Enden des Primerpools wird durch eine 12er NNK-Degeneration dargestellt. Die zweite PCR-Reaktion wurde auf dem pC3AP313-Vektor in einer 100 µl-Reaktion, wie oben beschrieben, durchgeführt, enthaltend 1 µg von jedem der Oligonukleotidprimer. Die resultierenden PCR-Produkte kodierten eine diverse Population von vier mutagenisierten Aminosäureresten in einer CDR3 der leichten Kette mit einer Gesamtzahl von 8 Aminosäureresten. In dem resultierenden CDR3 wurden die 4 mutagenisierten Aminosäurerestpositionen auf der aminoterminalen Seite durch 3 Aminosäurereste abgegrenzt, die unverändert gelassen wurden, Gln-Gln-Tyr und auf der carboxyterminalen Seite durch einen Thr Aminosäurerest. Die Produkte wurden dann, wie oben beschrieben, Gel-aufgereinigt.

[0144] Ein alternativer Oligonukleotidpool zur Herstellung von 4 zufallsgenerierten Aminosäureresten in einem CDR3. mit 8 Aminosäureresten wurde als k8 bezeichnet und hat die Formel 5'TATTACTGTCAGCAGTATNNKNNKNNKNNKACTTTCGGCGGAGGGACC3' (SEQ ID NR: 7). Dem k8-Primer fehlten 9 Nukleotide von dem 3'-Ende von KV4R.

[0145] Einhundert Nanogramm der Gel-aufgereinigten Produkte aus den ersten und zweiten PCR-Reaktionen wurden dann mit 1 µg von jeweils den KEF- und T7B-Oligonukleotidprimern als ein Primerpaar in einer endgültigen PCR-Reaktion vermischt, um ein vollständiges Fragment der leichten Kette durch überlappende Verlängerung auszubilden. Die PCR-Reaktionsmischung enthielt auch 10 µl 10 × PCR-Puffer, 1 µl Taq-Polymerase und 8 µl 2,5 Mm DNTP'S, wie oben beschrieben.

[0146] Um ausreichende Mengen an Amplifikationsprodukt zu erhalten, wurden 15 identische überlappende PCR-Amplifikationen durchgeführt. Die resultierenden Fragmente der leichten Kette, die bei Gerüst 1 anfangen und bis an das Ende der konstanten Region der leichten Kette weitergehen, enthielten somit eine zufallsmutagenisierte CDR3-Region zur Kodierung von 4 neuen Aminosäureresten. Die Amplifikationsprodukte des leichten Kettenfragments aus den 15 Reaktionen wurden zuerst gesammelt und dann wie oben vor deren Einbringung in den pC3AP313 Oberflächendisplayphagemidexpressionsvektor Gel-aufgereinigt, um eine Bibliothek, wie sie in Beispiel 4A beschrieben wird, auszubilden. Die Bibliothek der leichten Kette mit einem CDR3 von 8 Aminosäuren, die aus den Amplifikationen mit entweder KV4R oder k8 resultieren, wurde als K8 bezeichnet.

[0147] Um ein zufällig gewähltes CDR3 der leichten Kette zur Kodierung eines CDR3 herzustellen, das eine Gesamtzahl von 9 Aminosäuren aufweist, in dem 5 Aminosäurereste zufallsgeneriert sind, wurde der KV5R-Primer mit dem 3'-Primer T7B, wie zuvor beschrieben, verwendet. Der KV5R hat die Formel 5'TATTACTGTCAGCAGTATNNKNNKNNKNNKNNKACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG3' (SEQ ID NR: 8), worin N A, C, G oder T ist und K ist G oder T.

[0148] Ein alternativer Oligonukleotidpool zur Herstellung von 5 zufallsgenerierten Aminosäureresten in einem CDR3 mit 9 Aminosäureresten wurde als k9 bezeichnet und hat die Formel 5'TATTACTGTCAGCAGTATNNKNNKNNKNNKNNKACTTTCGGCGGAGGGACC3' (SEQ ID NR: 9), worin N A, C, G oder T ist und K ist G oder T. Dem k9-Prmer fehlten 9 Nukleotide von dem 3'-Ende von KV5R.

[0149] Die resultierenden PCR-Produkte von Amplifikationen mit entweder KV5R oder k9 kodierten eine di-

verse Population von 5 mutagenisierten Aminosäureresten in einem CDR3 der leichten Kette mit einer Gesamtzahl von 9 Aminosäureresten. In dem resultierenden CDR3 wurden die 5 mutagenisierten Aminosäurerestpositionen auf der aminoterminalen Seite durch 3 Aminosäuren abgegrenzt, die unverändert gelassen wurden, Gln-Gln-Tyr, und auf der carboxyterminalen Seite durch einen Thr-Aminosäurerest. Die Bibliothek der leichten Kette mit einem CDR3 von 9 Aminosäuren, die aus dieser Amplifikation resultiert, wurde als K9 bezeichnet.

[0150] Um ein zufallsgeneriertes CD3 der leichten Kette herzustellen zur Kodierung eines CDR3 mit einer Gesamtzahl von 10 Aminosäuren, in welcher 6 Aminosäurereste zufallsgeneriert sind, wurde der KV6R-Primer mit dem 3'-Primer T7B, wie zuvor beschrieben, verwendet. Der KV6R-Primer hat die Formel 5'GATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATNNKNNKNNKNNKNNKNNKACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG3' (SEQ ID NR: 10), worin N A, C, G oder T ist und K ist G oder T.

[0151] Ein alternativer Oligonukleotidpool zur Herstellung von 6 zufallsgenerierten Aminosäureresten in einem CDR3 mit 10 Aminosäureresten wurde als k10 bezeichnet und hat die Formel 5'TATTACTGTCAGCAGTATNNKNNKNNKNNKNNKNNKACTTTCGGCGGAGGGACC3', worin N A, C, G oder T ist und K ist G oder T (SEQ ID NR: 11). Der k10-Primer wurde an beiden der 5'- und 3'-Enden des KV6R-Primers um jeweils 12 und 9 Nukleotide gekürzt.

[0152] Die resultierenden PCR-Produkte aus Amplifikationen mit entweder KV6R oder k10 kodierten eine diverse Population von 6 mutagenisierten Aminosäureresten in einem CDR3 der leichten Kette mit einer Gesamtzahl von 10 Aminosäureresten. Die Bibliothek der leichten Kette mit einem CDR3 von 10 Aminosäureresten, die aus dieser Amplifikation resultiert, wurden als K10 bezeichnet. In dem resultierenden CDR3 wurden die 6 mutagenisierten Aminosäurerestepositionen auf der aminoterminalen Seite durch 3 Aminosäurereste abgegrenzt, die unverändert gelassen wurden, Gln-Gln-Tyr, und auf der carboxyterminalen Seite durch einen Thr-Aminosäurerest.

[0153] Um ein zufallsgeneriertes CDR3 der leichten Kette herzustellen, zur Kodierung eines CDR3, das eine Gesamtzahl von 10 Aminosäureresten aufweist, in welchem alle 10 Aminosäurereste zufallsgeneriert sind, wurde der KV10R-Primer mit dem 3'-Primen T7B, wie zuvor beschrieben, verwendet. Der KV10R-Primer hat die Formel 5'GATTTTGCAGTGTATTACTGTNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG3' (SEQ ID NR: 12), worin N A, C, G oder T ist und K ist G oder T.

[0154] Die resultierenden PCR-Produkte kodierten eine diverse Population von 10 mutagenisierten Aminosäureresten in einem CDR3 der leichten Kette mit einer Gesamtzahl von 10 Aminosäureresten. Die Bibliothek der leichten Kette mit einem CDR3 von 10 Aminosäuren, die aus dieser Amplifikation resultierte, wurde als K10' bezeichnet.

2) PCR mit nicht-kodierenden degenerierten Oliponukleotidarimern

[0155] Zusätzliche semisynthetische menschliche Fab-Bibliotheken, in welchen sowohl die CDR3 der schweren und der leichten Kette zufallsgeneriert sind, wurden konstruiert, auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen präsentiert und auf die Bindung an drei Hapten-Konjugate hin ausgewählt. Ein anderer Weg zur Einführung zufallsgenerierter Nukleotide in eine Template-DNA-Sequenz zur Kodierung von Aminosäuresubstitutionen oder -additionen war es, nicht-kodierende degenerierte Primer zu verwenden, anstatt der Verwendung kodierender degenerierter Oligonukleotidprimer, wie oben in Beispiel 2A1 beschrieben. Die kodierende (sense) Degeneration hat die Formel 5'-NNK-3', wobei N entweder A, C, G oder T sein kann und K ist entweder G oder T. Zur Verwendung in den Verfahren dieser Erfindung hatten die nicht-kodierenden (antisense) Oligonukleotidprimer, die in überlappenden PCR-Prozeduren verwendet wurden, die Degenerationsformel 5'-MNN-3', die in konventioneller 5'- zu 3'-Richtung geschrieben ist, worin M entweder A oder C ist. In 3'- 5-Richtung geschrieben, hatte das nicht-kodierende Oligonukleotid die Formel 3'-NNM-5', welches die komplementäre Sequenz zu der kodierenden Formel 5'-NNK-3' ist. Somit stellten die nicht-kodierenden Oligonukleotidprimer, die in den Verfahren dieser Erfindung verwendet wurden, die Möglichkeit des Einbringens der gleichen kodierenden Sequenzdegenerationen, wie die kodierenden Oligonukleotidprimer zur Verfügung. In anderen Worten, die gleiche semisynthetische Bibliothek mit einer bestimmten CDR-zufallsgenerierten Anordnung kann durch Verwendung einer überlappenden PCR mit vorgewählten kodierenden oder nicht-kodierenden Primern erhalten werden. Die Verwendung eines nicht-kodierenden Primers setzt auch die Verwendung von verschiedenen überlappenden Primern, wie hierin beschrieben, voraus.

[0156] Die resultierenden PCR-Produkte wurden auch aus dem Phagemidexpressionsvektor PC3AP313 hergestellt, der Sequenzen der schweren und leichten Kette enthält, die für einen menschlichen Antikörper kodieren, der mit Tetanustoxin immunreagiert.

[0157] Bibliotheken der leichten Kette mit zufällig gewählten CDR3 in vorgewählten Aminosäurepositionen wurden unter Verwendung der hierin beschriebenen überlappenden PCR-Amplifikationsprotokolle hergestellt. In diesen Bibliotheken wurden die Oligonukleotidprimerpools so hergestellt, dass sie in der Ausbildung von CDR3 in Längen von 8, 10 oder 16 Aminosäuren in Länge resultieren. Für alle drei Bibliotheken wurde das

CDR3 vollständig unter Verwendung der nicht-kodierenden Degeneration 5'-MNN-3' zufallsgeneriert, die komplementär zu der kodierenden Degeneration 5'-NNK-3' war, wie in den in Beispiel 2A1 beschriebenen Primern verwendet.

[0158] Um das 5'-Ende der leichten Kette von Gerüst 1 bis zum Ende des CDR3 von pC3AP313 zu amplifizieren und die degenerierten Nukleotidsequenzen in die amplifizierte DNA einzubauen, wurden die folgenden Primerpaare verwendet. Der 5'-kodierende (sense) Oligonukleotidprimer KEF mit der Nukleotidsequenz 5'GAATTCTAAACTAGCTAGTCG3' (SEQ ID NR: 3) hybridisierte an den nicht-kodierenden Strang der leichten Kette, der mit der 5'-Region korrespondiert und den Anfang von Gerüst 1 umfasst. Drei separate nichtkodierende (antisense) Oligonukleotidprimerpools wurden entwickelt, um CDR3-Bibliotheken der leichten Kette mit 8, 10 oder 16 zufallsgenerierten Aminosäureresten herzustellen. Die degenerierten Oligonukleotide überlappten mit dem 3'-Ende der Gerüstregion 3 bis zum CDR3 in dem 5'-Ende der Gerüstregion 4.

[0159] Der als p313K380Vb bezeichnete Primerpool zum Einbringen von 8 zufallsgenerierten Aminosäureresten hatte die nicht-kodierende Nukleotidsequenz, die in der 5'- zu 3'-Richtung geschrieben ist, 5'GTTCCACCTTGGTCCCTTGGCCGAAMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNACAGTAGTACACTGCAAAATC3', worin M entweder A oder C ist und N A, C, G oder T sein kann (SEQ ID NR: 13). Die aus dieser Amplifikation hergestellte Bibliothek von leichten Ketten wurde als CDR3-LCNC8 bezeichnet. Der als p313K3100Vb bezeichnete Primerpool zum Einbringen von 10 zufallsgenerierten Aminosäureresten hatte die nicht-kodierende Nukleotidsequenz, die in der 5'- zu 3'-Richtung . geschrieben ist, 5'GTTCCACCTTGGTCGCTTGGCCGAAMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNACAGTAGTACACTGCAAAATC3', worin M entweder A oder C ist und N A, C, G oder T sein kann (SEQ ID NR: 14). Die aus dieser Amplifikation hergestellte Bibliothek von leichten Ketten wurde als CDR3-LCNC10 bezeichnet. Der als p313K3160Vb bezeichnete Primerpool zum Einbringen von 16 zufallsgenerierten Aminosäuren hatte die nicht-kodierende Nukleotidsequenz, die in in der 5'- zur 3'-Richtung geschrieben ist, 5'GTTCCACCTTGGTCCCTTGGCCGAAMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNACAGTAGTACACTGCAAAATC3', worin M entweder A oder C ist und N A, C, G oder T sein kann (SEQ ID NR: 15). Die durch diese Amplifikation hergestellte Bibliothek von leichten Ketten wurde als CDR3-LCNC16 bezeichnet.

[0160] Drei separate erste PCR-Amplifikationen wurden dann mit dem KEF-Primer durchgeführt, der mit jedem der drei nicht-kodierenden degenerierten Primer, die oben aufgelistet sind, gepaart wurde. Die Amplifikationen wurden wie in Beispiel 2A1 beschrieben durchgeführt.

[0161] Die zweite PCR-Amplifikation resultierte in der Amplifikation der leichten Kette von dem 5'-Ende der Gerüstregion 4, verlängert bis zu dem Ende der konstanten Region der leichten Kette. Das als p313KF40F bezeichnete 5'-kodierende Oligonukleotid hatte die Nukleotidsequenz 5'TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAC3' (SEQ ID NR: 16). Dieser Primer begann an dem 5'-Ende der Gerüstregion 4 und stellte eine überlappende Region mit der korrespondierenden Region in den degenerierten Oligonukleotidprimern zur Verfügung. Der 3'-nicht-kodierende Primer T7B hybridisierte an den kodierenden Strang an dem 3'-Ende der konstanten Domäne der leichten Kette und hatte die Sequenz 5'AATACGACT-CACTATAGGGCG3' (SEQ ID NR: 6). Die zweite PCR-Reaktion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

[0162] Für die überlappende PCR wurden 100 ng der Amplifikationsprodukte aus den ersten und zweiten Reaktionen nach der Aufreinigung zusammengeführt und eine dritte Runde PCR wurde unter Verwendung des Primerpaares KEF und T7B wie oben beschrieben durchgeführt, um ein vollständiges Fragment der leichten Kette durch überlappende Verlängerung auszubilden. Die Amplifikationsprodukte des leichten Kettenfragments aus 15 parallelen Reaktionen wurden zuerst gesammelt und dann wie oben beschrieben Gel-aufgereinigt, bevor diese in den pC3AP313 Oberflächen-Display-Phagemid-Expressionsvektor eingebracht wurden, um eine Bibliothek wie in Beispiel 4A beschrieben auszubilden. Die resultierenden semisynthetischen Bibliotheken von leichten Ketten kodierten ein CDR3 von 8, 10 oder 16 zufällig gewählten Aminosäuren.

[0163] Die Formulierungen für verschiedene Oligonukleotidprimer für leichte Ketten, die auf den einzelnen Oligonukleotidprimern basieren, die hierin vorgestellt werden, werden in den Ansprüchen gezeigt und haben die korrespondierenden SEQ ID NRs: von 26 bis 31.

B. Herstellung von zufällig gewählten Positionen innerhalb des CDR3 der schweren Kette eines Phagemid-Fab-Disalay-Proteins, das durch einen dicistronischen Expressionsvektor hergestellt wird

[0164] Es wurden auch Bibliotheken von schweren Ketten mit zufällig gewählten CDR3 in Längen von 5, 10 und 16 Aminosäuren unter Verwendung des pC3AP313 Oberflächendisplayexpressonsvektors als PCR-Template hergestellt. Die resultierenden Bibliotheken, die, wie unten beschrieben, hergestellt wurden, wurden dann mit den K8, K9 und K10 Bibliotheken von leichten Ketten, die in Beispiel 2A1 hergestellt wurden, gekreuzt. Die CDR3 der schweren Kette (HCDR3) mit 10 Aminosäureresten ist ungefähr von der durchschnittlichen Länge, die in menschlichen Antikörpern verwendet wird. Es wurden, basierend auf einem vorangegangenen Bericht über die genetische Diversität, in dieser Region CDR3 mit 5 und 16 Aminosäureresten ausgewählt, um jeweils

für kurze und lange CDRs repräsentativ zu sein. Die vollständige Zufallsgenerierung unter Verwendung einer NNK- oder NNS-Degeneration ergab Bibliotheken, die als 5, 10 und 16 bezeichnet werden.

[0165] Alternativ dazu wurde die vorletzte Position des HCDR3 als Asparaginsäure festgelegt, was zu Bibliotheken führte, die jeweils als G, F und E bezeichnet wurden, mit CDR3s von 5, 10 und 16 Aminosäureresten. Die erste Position der F- und E-Bibliotheken wurde auch als Glycinrest fixiert, der durch das Tripletkodon GGT kodiert wird. Die vorletzte Asparaginsäure, Kabatposition 101, ist in 75 % der menschlichen Antikörper konserviert, wie beschrieben durch Kabat et al., supra. Von der Kabat 101-Position wird angenommen, dass sie strukturell bedeutend für die Stabilisierung der Immunglobulinkringelstruktur ist, wie beschrieben durch Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901–917 (1987).

[0166] Die folgenden Amplifikationen wurden zur Herstellung der G-, F- und E-Bibliotheken von schweren Ketten durchgeführt. Die erste PCR-Reaktion resultierte in der Amplifikation der Region des Fragments der schweren Kette in dem pC3AP313-Phagemid, die an der Gerüstregion 1 anfängt und sich bis zu dem Ende der Gerüstregion 3 verlängert, welche 5'- zu CDR3 lokalisiert ist. Die degenerierten Primerpools, die zur Verwendung mit dem pC3AP313-Template entwickelt wurden, resultierten in der Retention eines konservierten Asparaginsäurerestes in der vorletzten Position in dem CRD3 für alle drei Längen der hergestellten CDR3. Die Retention des Asparaginsäurerestes in dieser Position ist für die Verwendung in dieser Erfindung bevorzugt, da die exprimierten Proteine, die diesen Rest enthalten, höhere Affinitätsbindungseigenschaften aufzeigen.

[0167] Um das 5'-Ende der schweren Kette von Gerüst 1 bis zum Ende von Gerüst 3 zu amplifizieren, wurden die folgenden Primerpaare verwendet. Der 5'-kodierende Oligonukleotidprimer FTX3 mit der Nukleotidsequenz 5'GCAATTAACCCTCACTAAAGGG3' (SEQ ID NR: 17) hybridisierte an den nicht-kodierenden Strang der schweren Kette, der zu der 5'-Region davon korrespondiert und umfasst den Anfang von Gerüst 1. Der 3'-nicht-kodierende Oligonukleotidprimer BFR3U mit der Nukleotidsequenz 5'TCTCCCACAGTAATACACGGCCGT3' (SEQ ID NR: 18) hybridisierte an den kodierenden Strang der schweren Kette, der mit dem 3'-Ende der Gerüst 3-Region korrespondiert. Die Oligonukleotidprimer wurden durch Operon Technologies synthetisiert.

[0168] Die PCR-Reaktion wurde wie in Beispiel 2A1) beschrieben durchgeführt. Die resultierenden PCR-Amplifkationsprodukte wurden dann wie beschrieben Gel-aufgereinigt und in einer überlappenden PCR-Reaktion mit den Produkten der zweiten PCR-Reaktion verwendet, beide wie unten beschrieben, um die zwei Produkte in rekonstruierte schwere Ketten, die mutagenisierte CDR3s enthalten, zu rekombinieren.

[0169] Die zweite PCR-Reaktion resultierte in der Amplifikation der schweren Kette von dem 3'-Ende der Gerüstregion 3, sich verlängernd bis zum bis zu dem Ende der C_H1-Region. Um diese Region zur Kodierung einer Sequenz mit 5 Zufallsaminosäuren mit einer Asparaginsäure in der vierten Position in dem CDR3 zu amplifizieren, wurden die folgenden Primerpaare verwendet. Der 5'-kodierende Oligonukleotidprimerpool, der als HCDRD5 bezeichnet wird, hatte die durch die folgende Formel dargestellte Nukleotidsequenz 5'GCCGTGTATTACTGTGCGAGANNKNNKNNKGACNNKTGGGGCCAAGGGACCACGGTC3' (SEQ ID NR: 19), worin N A, C, G oder T sein kann und K ist entweder G oder T. Das 5'-Ende des Primerpools ist komplementär zu dem 3'-Ende von Gerüst 3, das durch die komplementäre Nukleotidsequenz des Oligonukleotidprimers BFR3U dargestellt wird, und das 3'-Ende des Primerpools ist komplementär zu dem 5'-Ende von Gerüst 4. Die Region zwischen den beiden spezifizierten Enden des Primerpools wird durch eine 12-er Degeneration von 4 NNK-Triplets dargestellt plus eine Sequenz, die einen konservierten Asparaginsäurerest eine Position vom Ende des CDR3 kodiert. Der 3-nicht-kodierende Oligonukleotidprimer R3B mit der Nukleotidsequenz 5'TTGATATTCACAAACGAATGG3' (SEQ ID NR: 20) hybridisierte an den kodierenden Strang der schweren Kette, der mit dem 3'-Ende von C_H1 korrespondiert.

[0170] Die Sequenz 5'-NNK-3' stellt die kodierende Strangsequenz mit der komplementären Sequenz 3'-NNM-5' in dem Primer wie in der 3'- zur 5'-Richtung gelesen dar. Somit ist in dem Primer wie unten aufgelistet die nicht-kodierende Strangsequenz 5'-MNN-3' wie in der 5'- zur 3'-Richtung gelesen. Die kodierende Tripletsequenz 5'-NNK-3' wurde entwickelt, um die Herstellung schädlicher Stopkodons zu verhindern. Das einzige Stopkodon, das aus der Expression von NNK resultieren könnte, wäre eine entsprechende Mutation, die unterdrückt wird, wenn das Phagemid in einer entsprechend unterdrückenden Wirtszelle exprimiert wird, vorzugsweise in dem E. coli supE-Stamm.

[0171] Die zweite PCR-Reaktion wurde dann auf dem pC3AP313 in einer 100 µl-Reaktion wie oben beschrieben durchgeführt, enthaltend ein 1 µg von jedem der Oligonukleotidprimer HCDRD5 und R3B. Die resultierenden PCR-Produkte kodierten eine diverse Population von mutagenisierten CDR3 von fünf Aminosäureresten in Länge mit einem konservierten Asparaginsäurerest in der vierten Aminosäureposition in dem CDR3. Die Produkte wurden dann wie oben beschrieben Gel-aufgereinigt.

[0172] Einhundert Nanogramm von Gel-aufgereinigten Produkten aus den ersten und zweiten PCR-Reaktionen wurden dann mit 1 µg von jeweils den FTX3- und R3B-Oligonukleotidprimern als Primerpaar in einer endgültigen PCR-Reaktion vermischt, um ein vollständiges. Fragment der schweren Kette durch überlappende Verlängerung auszubilden. Die PCR-Reaktionsmischung enthielt auch 10 µl 10 × PCR-Puffer, 1 µl Taq-Polymerase und 8 µl 2,5 mM DNTP'S wie oben beschrieben. Die PCR-Reaktion wurde wie zuvor beschrieben

durchgeführt.

[0173] Um ausreichende Menge an Amplifikationsprodukt zu erhalten, wurden 15 identische PCR-Reaktionen durchgeführt. Die resultierenden Fragmente der schweren Ketten begannen an Gerüst 1 und verlängerten sich bis zum Ende von C_H1 und hatten ein zufällig mutagenisiertes CDR3 zur Kodierung von 5 Aminosäureresten mit einem konservierten Asparaginsäurerest. Die Amplifikationsprodukte des Fragments der schweren Kette der 15 Reaktionen wurden zuerst gesammelt und wie oben beschrieben vor deren Einbringung in einen verdauten pC3AP313 Oberflächen-Display-Phagemid-Expressionsvektor Gel-aufgereinigt, um eine Bibliothek wie in Beispiel 4B beschrieben auszubilden. Die resultierende CDR3 zufallsgenerierte Phagemidbibliothek von schweren Ketten wurde als Bibliothek G bezeichnet.

[0174] Zusätzlich zur Zufallsgenerierung der CDR3 in pC3AP313 zur Expression von 5 Aminosäureresten wurden PCR-Amplifikationen zur Exprimierung einer CDR3 durchgeführt, die 10 Aminosäurereste enthält. Zwei separate PCR-Amplifikationen wurden wie oben beschrieben durchgeführt mit der einzigen Ausnahme, dass in der zweiten Reaktion der 5'-kodierende degenerierte Primen, der als HCDRD10 bezeichnet wird, verwendet wurde, um 10 Aminosäurereste zu kodieren, die das CDR der schweren Kette umfasst. Der degenerierte 5'-kodierende Primer, der hier verwendet wurde, wurde entwickelt, um die erste Aminosäureposition eines Glycinrestes in dem pC3AP313-Template zu erhalten und einen konservierten Asparaginsäurerest in der neunten Aminosäureposition einzubringen. Der HCDRD10- Primer hatte die Formel: 5'GCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGTNNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKGACNNKTGGGGCCAAGGGACCACGGTC3' (SEQ ID NR: 21), worin N A, C, G oder T ist und K, G oder T ist. Die Aminosäuresequenzen, die das CDR3 umfassen, das durch die Verwendung des HCDRD10-Primers kodiert wird, hatten einen Asparaginsäurerest, der in der neunten Position des CDR3 konserviert war. Die resultierenden Produkten wurden gesammelt und wie oben beschrieben aufgereinigt vor dem Einfügen in einen verdauten pC3AP313 Oberflächen-Display-Phagemid-Expressions-Vektor, um eine Bibliothek wie in Beispiel 4B beschrieben auszubilden. Die resultierende CDR3 zufallsgenerierte Phagemidbibliothek von schweren Ketten wurde als Bibliothek F bezeichnet.

[0175] Es wurden auch PCR-Amplifikationen unter Verwendung des Templates pC3AP313 zur Expression eines zufallsgenerierten CDR3 durchgeführt, das 16 Aminosäurereste enthält. Der für diese Amplifikation verwendete degenerierte 5'-kodierende Primen wurde entwickelt, um die erste Aminosäureposition eines Glycinrestes in dem pC3AP313-Template zu erhalten und einen konservierten Asparaginsäurerest in der 15. Aminosäureposition einzubringen. Zwei separate PCR-Amplifikationen wurden wie oben für das CDR3 mit 5 Aminosäuren beschrieben ausgeführt, mit der einzigen Ausnahme, dass in der zweiten Reaktion der 5'-kodierende degeneriert Primer, der als HCDRD16 bezeichnet wird, verwendet wurde, um 16 zufall gewählte Aminosäurereste zu kodieren, der die folgende Formel hatte: 5'GCCGT-GTATTACTGTGCGAGAGGTNNKNNKNNKNN-KNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKGACNNKTGGGGCCAAGGGACCACGGTC3' (SEQ ID NR: 22), worin N A, C, G oder T ist und K, G oder T ist. Die Aminosäuresequenzen, die das CDR3 umfassen, das durch die Verwendung des HCDRD16-Primers kodiert wurde, hatten eine Asparaginsäure in Position 15 konserviert. Die resultierenden Produkte wurden gesammelt und wie oben beschrieben vor dem Einfügen in einen verdauten pC3AP313 Oberflächen-Display-Phagemid-Expressions-Vektor aufgereinigt, um eine Bibliothek wie in Beispiel 4B beschrieben auszubilden. Die resultierende Phagemidbibliothek wurde als Bibliothek E bezeichnet.

[0176] Wie oben beschrieben wurden die resultierenden zufallsgenerierten CDR3 der schweren Ketten von verschiedenen Längen mit einem konservierten Asparaginsäurerest in der vorletzten Position, die aus pC3AP313 amplifiziert worden waren, aufgereinigt, verdaut und zurück in pC3AP313 ligiert zur Herstellung von separaten Expressionsbibliotheken wie in Beispiel 4B beschrieben.

[0177] In ähnlichen überlappenden PCR-Amplifikationen wurden Bibliotheken von schweren Ketten mit vollständig zufallsgenerierten CDR3 in Längen von 5, 10 oder 16 hergestellt. Der degenerierte Oligonukleotid hergestellt. Der degenerierte Oligonukleotidpool zur Herstellung der CDR3-HC5-Bibliothek hatte die Nukleotidformel: 5'GTGTATTATTGTGCGAGANNSNNSNNSNNSTGGGGCCAAGGGACCACG3', worin N entweder A, C, G oder T sein kann und S ist entweder G oder C (SEQ ID NR: 23). Die resultierende Bibliothek wurde als CDR3-HC5 bezeichnet. Der degenerierte Oligonukleotidpool zur Herstellung der CDR3-HC10-Bibliothek hatte die Nukleotidformel 5'GTGTATTATTGTGCGAGANNSNNSNNS-NN-SNNSNNSNNSNNSNNSTGGGGCCAAGGGACCACG3', worin N entweder A, C, G oder T sein kann und S ist entweder G oder C (SEQ ID NR: 24). Die resultierende Bibliothek wurde als CDR3-HC10 bezeichnet. Der degenerierte Oligonukleotidpool zur Herstellung der CDR3-HC16-Bibliothek, die als 7ECDR3 bezeichnet wird, hatte die Nukleotidformel: 5'GTGTATTATTGTGCGAGANNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNS-NNSNNSNNSNNSNNSNNSTGGGGCCAAGGGACCACG3', worin N entweder A, C, G oder T sein kann und S ist entweder G oder C (SEQ ID NR: 25). Die resultierende Bibliothek wurde als CDR3-HC16 bezeichnet. Wie oben beschrieben wurden die resultierenden vollständig zufallsgenerierten CDR3 der schweren Kette von verschiedenen Längen, die aus pC3AP313 amplifiziert worden waren, dann aufgereinigt, verdaut und zurück in einen verdauten pC3AP313-Expressionsvektor ligiert zur Herstellung einer wie in Beispiel 4B beschriebenen Expressionsbibliothek.

3. Herstellung von Expressionsvektorbibliotheken der schweren und leichten Kette mit einer universellen leichten Kette

A. Gekreuzte zufällig gewählte schwere Kettenbibliotheken mit einer universellen leichten Kette

[0178] Um exprimierte menschliche Fab-Antikörperbibliotheken zu erhalten, die eine Population von zufälligen schweren Kettenfragmenten und eine einzelne universelle leichte Kette umfassen, zu erhalten, werden gekreuzte Phagemidbibliotheken konstruiert. Die Bibliotheken ermöglichen die Expression von rekombinanten menschlichen Fab-Antikörpern mit einer Population von zufälligen schweren Ketten und einer einzelnen universellen leichten Kette zur Selektion auf Fab-Antikörper, die vorgewählte Liganden mit hoher Affinität binden. Bibliotheken, in denen schwere Ketten zufällig generiert sind, werden wie in Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci.. USA, 88: 7978–7982 (1991) beschrieben hergestellt. Der pC3AP313-Vektor, der eine universelle leichte Kette enthält, wird mit Xho I und Spe I verdaut, um die natürliche schwere Kette von pC3AP313 zu entfernen und sie mit Xho I- und Spe I-Verdauen der zufallsgenerierten schweren Kettenbibliothek zu ersetzen. Alternativ dazu werden Bibliotheken, in welchen schwere Ketten zufällig sind, durch Verdau des p6F-Vektors, der in Beispiel 8 beschrieben wird, der eine verschiedene universelle leichte Kette enthält, mit Xho I- und Spe I hergestellt, um die p6F-natürliche schwere Kette zu entfernen und sie mit Xho I- und Spe I-Verdauen einer zufälligen schweren Kettenbibliothek zu ersetzen. Um die Gegenwart der zufällig gewählten schweren Ketten und einer universellen leichten Kette zu verifizieren, werden zufällig ausgewählte Klone aus jeder gekreuzten Bibliothek sequenziert.

B. Gekreuzte zufällige CDR-Bibliotheken von schweren Ketten mit einer universellen leichten Kette

[0179] Alternativ dazu können exprimierte menschliche Fab-Antikörperbibliotheken, die eine Population zufälliger CDR in schweren Kettenfragmenten und eine einzelne universelle leichte Kette umfassen, durch die Konstruktion von gekreuzten Phagemidbibliotheken erhalten werden. Die Bibliotheken ermöglichen die Expression von rekombinanten menschlichen Antikörpern mit zufälligen CDR schweren Ketten und einer einzelnen universellen leichten Kette für die Selektion von Fab-Antikörpern, die vorgewählte Liganden mit hoher Affinität binden.
[0180] Bibliotheken, in welchen die CDR3-Region der schweren Kette zufallsgeneriert ist, werden wie in Beispiel 4B beschrieben hergestellt.
[0181] Alternativ dazu wird die CDR1- oder CDR2-Region der schweren Kette durch die in Beispiel 4B gelehrten Verfahren zufallsgeneriert. Zusätzlich wird eine Bibliothek von schweren Ketten mit einer oder mehreren zufallsgenerierten CDR-Regionen, die hergestellt wurden, um eine noch größere Diversität in den schweren Ketten CDR3-Regionen zu generieren, mitumfasst. Der pC3AP313-Vektor, der die universelle leichte Kette enthält, wird mit Xho I und Spe I verdaut, um die pC3AP313 natürliche schwere Kette zu entfernen und die Xho I- und Spe I- Verdaue von zufälligen schweren Kettenbibliotheken werden zufällig (gekreuzt) in dem verdauten pC3AP31 V-Vektor kombiniert, um eine Population von Vektoren auszubilden, die die universelle leichte Kette und eine der zufallsgenerierten schweren Kette aus der Bibliothek von schweren Ketten aufweisen. Gekreuzte Bibliotheken werden somit durch die Kombination einer universellen leichten Kette mit einer zufallsgenerierten schweren Kettenbibliothek hergestellt. Um die Gegenwart von zufällig gewählten schweren Ketten und einer einzelnen universellen leichten Kette zu verifizieren, werden zufällig ausgewählte Klone von jeder gekreuzten Bibliothek sequenziert.

4. Herstellung von Bibliotheken von schweren und leichten Kettenexaressions-Vektoren mit zufallsgenerierter CDR3

A. Leichte Kettenbibliotheken

[0182] Die leichten Ketten mit zufällig gewählten CDR3 aus den überlappenden PCR-Amplifikationen unter Verwendung sowohl der kodierenden wie auch der nicht-kodierenden degenerierten Oligonukleotidprimer, die in Beispiel 2A hergestellt wurden, wurden dann separat in den pC3AP313-Pcomb3-basierenden monovalenten Fab-Phagen-Display-Vektor eingeführt, der wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt wurde. Die PCR-Produkte, die aus jeder der Amplifikationen resultieren, die in Beispiel 2A hergestellt wurden, wurden separat in einen Phagemidexpressionsvektor eingefügt, um Phagemidbibliotheken herzustellen. Wie unten beschrieben wurden die in Beispiel 2A hergestellten resultierenden Gelaufgereinigten leichten Ketten PCR CDR3-zufallsgenerierten Produkte mit Restriktionsenzymen verdaut und separat in den pC3AP313-Phagemidexpressionsvektor ligiert, der in ähnlicher Weise verdaut worden war.
[0183] Zur Herstellung von Phagemidbibliotheken zur Expression der PCR-Produkte der leichten Kette, die in Beispiel 2A hergestellt worden waren, wurden die PCR-Produkte separat mit Sac I und Aat II verdaut und

separat mit einem ähnlich verdauten pC3AP313-Phagemidexpressions ligiert, der wie in Beispiel beschrieben hergestellt wurde. Der Verdau des pC3AP313-Vektors mit Sac I und Aat II entfernte die Nukleotidsequenzregion, die mit dem 5'-Ende der nativen variablen Domäne der leichten Kette beginnt bis zu dem Anfang von Gerüst 4. Die Ligation resultierte somit in der operativen Verbindung des leichten Kettengerüsts 1 bis zu den zufallsgenerierten CDR3-PCR-Produkten mit der nativen Gerüst 4-Domäne, die in dem pC3AP313-Vektor vorhanden ist. Die Expression der resultierenden Bibliotheken von leichten Kette war unter der Kontrolle eines LacZ-Promoters und der pelB-Leadersequenz.

[0184] Es wurden Phagemidbibliotheken zur Expression jeder der Fabs mit einem zufallsgenerierten CDR3 der leichten Kette dieser Erfindung in den folgenden Verfahren hergestellt. Um zirkularisierte Vektoren, die die PCR-Produkteinfügung enthalten, auszubilden, wurden 640 ng der verdauten PCR-Produkte mit 2 µg des linearisierten pC3AP313-Phagemidvektors vermischt und die Ligation wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter Verwendung von 10 Einheiten BRL-Ligase (Gaithersburg, MD) in BRL-Ligasepuffer in einem Reaktionsvolumen von 150 µl durchgeführt. Fünf separate Ligationsreaktionen wurden durchgeführt, um die Größe der Phagenbibliothek mit zufallsgenerierten CDR3 zu erhöhen. Nach den Ligationsreaktionen wurde die zirkularisierte DNA bei –20 °C für 2 Stunden durch das Vermischen von 2 µl von 20 mg/ml Glycogen, 15 µl 3 M-Natriumacetat bei pH 5,2 und 300 µl Ethanol gefällt. Das DNA wurde dann 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 transformiert, um eine Phagenbibliothek zu ergeben. Die Gesamtausbeute aus der PCR-Amplifikation und der Transformationsprozedur, die hierin beschrieben wird, betrug ungefähr 10^8 unabhängige Transformanten.

[0185] Die Bibliotheken von leichten Ketten mit zufallsgenerierten CRD3 von 4, 5, 6 und 10 Aminosäureresten (jeweils in einem CDR3 von 8, 9, 10 und 10 Aminosäureresten), die aus den PCR-Produkten resultieren, die mit den kodierenden degenerierten Primerpools erhalten wurden, wurden jeweils K8, K9, K10 und K10' genannt. Die Bibliotheken von leichten Ketten mit CDR3 von 8, 10 und 16 Aminosäureresten, die aus den PCR-Produkten resultieren, die mit den nicht-kodierenden degenerierten Primerpools erhalten wurden, wurden jeweils CDR3-LCNC8, CDR3-LCNC10 und CDR3-LCNC16 genannt.

B. Bibliotheken von schweren Ketten

[0186] Die schweren Ketten mit zufallsgenerierten CDR3, die in Beispiel 2B aus überlappenden PCR-Amplifikationen hergestellt wurden, wurden dann separat in den monovalenten Fab-Phagen-Display-Vektor Pcomb3, der wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt worden war, eingeführt. Die PCR-Produkte, die aus jeder der Amplifikationen, die in Beispiel 2B hergestellt worden waren, wurden separat in einen Phagemidexpressionsvektor eingeführt, um Phagemidbibliotheken herzustellen. Wie unten beschrieben wurden die resultierenden Gel-aufgereinigten PCR-Fragmente der leichten Kette, die in Beispiel 2B hergestellt worden waren, mit den Restriktionsenzymen verdaut und separat in den pC3AP313-Phagemidexpressionsvektor ligiert, der in ähnlicher Weise verdaut worden war.

[0187] Zur Herstellung von Phagemidbibliotheken zur Exprimierung der PCR-Produkte der schweren Kette, die in Beispiel 2B hergestellt worden waren, wurden die PCR-Produkte mit Xho I und Spe I verdaut und separat mit einem ähnlich verdauten pC3AP313-Phagemidexpressionsvektor, der wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt worden war, ligiert. Der Verdau des pC3AP313-Vektors mit Xho I und Spe I entfernte die native Nukleotidsequenzregion, die an dem 5'-Ende der variablen Domäne der schweren Kette beginnt bis zum Beginn der konstanten Region der schweren Kette C_H1. Die Ligation resultierte somit in der operativen Verbindung des Gerüsts I bis zu den zufallsgenerierten CDR3-PCR-Produkten mit der nativen C_H1-Domäne, die in dem pC3AP313-Vektor vorhanden ist. Die Expression der resultierenden Bibliotheken der schweren Kette war unter der Kontrolle eines LacZ-Promoters und einer pelB-Leadersequenz.

[0188] Phagemidbibliotheken zur Expression von jeder der Fabs mit zufallsgenerierten CDR3 der schweren Kette dieser Erfindung wurden wie oben beschrieben für die leichte Kette hergestellt. Die Gesamtausbeute aus der PCR-Amplifikation und der Transformationsprozedur, die hierin beschrieben wird, betrug ungefähr 10^8 unabhängig Transformanten.

[0189] Die Bibliotheken der schweren Kette mit CDR3 von 5, 10 oder 16 Aminosäureresten in Länge, die aus den erhaltenen PCR-Produkten resultieren, die eine Asparaginsäure in der vorletzten Position beibehalten, wurden jeweils als G, F und E bezeichnet. Die Bibliotheken der schweren Kette mit vollständig zufallsgenerierten CDR3 von 5, 10 oder 16 Aminosäureresten in Länge wurden jeweils als CDR3-HC5, CDR3-HC10 und CDR3-HC16 bezeichnet.

C. Gekreuzte Bibliotheken der schweren und leichten Kette

[0190] Um exprimierte menschliche Fab-Antikörper mit sowohl zufallsgenerierten schweren wie auch leichten

Kettenfragmenten zu erhalten, wurden gekreuzte Phagemidbibliotheken konstruiert. Die Bibliotheken ermöglichten die Expression von rekombinanten menschlichen Fab-Antikörpern mit schweren und leichten Ketten, in welchen die CDR3 in beiden selektiv zufallsgeneriert worden waren, zur Selektion von Fab-Antikörpern, die synthetische Haptene mit hoher Affinität binden. Bibliotheken, in welche beide CDR3 zufallsgeneriert worden waren, wurden durch Verdau der leichten Kettenbibliotheken mit Xho I und Spe I hergestellt, die in Beispiel 4A hergestellt worden waren, um die natürliche schwere Kette von pC3AP313 zu entfernen und sie mit Xho I- und Spe I-Verdauen der synthetischen schweren Kettenbibliotheken zu ersetzen, die in Beispiel 4B hergestellt worden waren. Neun gekreuzte Bibliotheken wurden durch die Kombination der K8, K9 und K10 leichten Kettenbibliotheken mit den G, F und E schweren Kettenbibliotheken hergestellt. Zusätzlich, um die Rolle der leichten Ketten CDR3 zu untersuchen, wurde die schwere Kettendomäne eines zuvor ausgewählten Klons, der einen Fab-Antikörper kodiert, der als F22 bezeichnet wird, der mit Fluorescein reagiert, mit den leichten Kettenbibliotheken K8, K9 und K10 gekreuzt. Die gekreuzte Bibliotheken wurden durch das erste Auflisten der leichten Kettenbibliothek, getrennt von der schweren Kettenbibliothek durch einen Schrägstrich, z. B., K8/F, bezeichnet. Alle resultierenden gekreuzten Bibliotheken bestanden aus mindestens 10^8 unabhängigen Transformanten außer für K9/F22 und K8/F22, die 10'-Transformanten enthalten. Die als K10/E bezeichnete Bibliothek bestand aus Fab-Fragmenten, bei denen 20 Positionen zufallsgeneriert worden waren. Damit die gekreuzten Bibliotheken "vollständig" sind, d. h., bei denen alle möglichen Bestandteile vorhanden sind (Kombinationen von schweren und leichten Kettenbibliotheksbestandteilen) würden mehr als 10^{30}-Transformanten notwendig sein. Um die gezielte Mutagenese der leichten und schweren Ketten CDR3 zu verifizieren, wurden ausgewählte Klone aus jeder nicht-gekreuzten Bibliothek vor dem Kreuzen sequenziert.

[0191] Die anderen leichten Kettenbibliotheken K10', CDR3-LCN8, CDR3-LCNC10 und CDR3-LCND16 werden in ähnlicher Weise mit all den schweren Kettenbibliotheken gekreuzt, die in Beispiel 4B hergestellt werden, um zusätzliche gekreuzte Bibliotheken mit verschiedenen Längen an CDR3 mit verschiedenen zufallsgenerierten Aminosäureresten auszubilden.

D. Gekreuzte Bibliotheken mit einer CDR3-zufallsgenerierten schweren Kette und einer einzelnen universellen leichte Kette

[0192] Um exprimierte menschliche Fab-Antikörper mit zufallsgenerierten schweren und universellen leichten Kettenfragmenten zu erhalten, werden gekreuzte Phagemidbibliotheken hergestellt. Die Bibliotheken ermöglichen die Expression von rekombinanten menschlichen Fab-Antikörpern mit schweren Ketten, in welchen die CDR3 zufallsgeneriert ist, für die Selektion von Fab-Antikörper, die vorgewählte Liganden mit hoher Affinität binden. Die Bibliotheken ermöglichen auch die Expression von rekombinanten menschlichen Fab-Anitkörpern mit einer einzelnen universellen leichten Kette für die Selektion von Fab-Antikörpern, die vorgewählte Linganden mit hoher Affinität binden. Bibliotheken, in denen CDR3 der schweren Kette zufallsgeneriert sind, werden durch Verdau der universellen leichte Kette mit Xho I und Spe I hergestellt, um die natürliche schwere Kette von pC3AP313 zu entfernen und diese mit Xho I- und Spe I-Verdauen der synthetischen schweren Kettenbibliotheken, die in Beispiel 4B hergestellt werden, zu ersetzen. Gekreuzte Bibliotheken werden durch Kombination einer universellen leichten Kette 6F mit der in SEQ ID NR: 62 gezeigten Nukleotidsequenz mit all den schweren Kettenbibliotheken, die in Beispiel 4B hergestellt werden, hergestellt, um gekreuzte Bibliotheken auszubilden, die verschiedene Längen von schweren Ketten CDR3 mit variierenden zufallsgenerierten Aminosäureresten und einer einzelnen universellen leichten Kette aufweisen.

5. Auswahl von Anti-Hapten-Fab-Antikörpern, die auf einem Phagen exprimiert werden

A. Herstellung von einem Phagen. der semisynthetische Fab-Heterodimere exprimiert

[0193] Nach der Transformation, um Phagen zu isolieren, die Fabs exprimieren, die mit synthetischen Haptenen reaktiv sind, wurde ein Schwenken („panning") auf zielsynthetischen Haptene wie in Beispiel 5B unten beschrieben durchgeführt.

[0194] Es wurden zuerst Phagen hergestellt, auf denen die semisynthetischen Farb-Antikörper zur Selektion von synthetischen Haptenen exprimiert waren. Drei ml SOC-Medium (SOC wurde durch Vermischen von 20 Gramm (g) Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt und 0,5 g NaCl in 1 Liter Wasser hergestellt, Anpassung des pHs auf 7,5 und Zumischen von 20 ml Glucose kurz vor der Verwendung, um die Expression der schweren Kettendomäne zu induzieren, die auf dem Phagenmantelprotein 3 (Fd-cpiii) verankert ist und dem löslichen leichten Kettenheterodimer), wurden mit ausgewählten Phagenbibliotheken vermischt und die Kultur wurde bei 220 Upm für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Dann wurden 10 ml SB (SB wurde durch Vermischen von 30 g Trypton, 20 g Hefeextrakt und 10 g Mops-Puffer pro Liter mit einem auf 7 angepassten pH hergestellt), enthaltend 20 µg/ml Carbenicillin und 10 µg/ml Tetracyclin, vermischt und die Mischung wurde bei 300 Upm für eine weitere Stunde geschüttelt. Diese resultierende Mischung wurde zu 100 ml SB gemischt, das 50 µg/ml Carbenicillin und 10

µg/ml Tetracyclin enthält und für 1 Stunde geschüttelt, wonach Helfer-Phagen VCSM13 (10^{12} pfu) zugemischt wurde und die Mischung für weitere 2 Stunden geschüttelt wurde. Nach dieser Zeit wurden 70 µg/ml Kanamycin hinzugefügt und bei 30°C über Nacht aufbewahrt. Die geringere Temperatur resultierte in einer besseren Heterodimereinbringung auf der Oberfläche des Phagen. Der Überstand wurde durch Zentrifugation (4000 Upm für 15 Minuten in einem JA10-Rotor bei 4°C) aufgeklart. Phagen wurden Mischen von 4 % (Gew./V) Polyethylenglycol 8000 und 3 % (Gew./V) NaCl präzipitiert und auf Eis für 30 Minuten aufbewahrt, gefolgt durch Zentrifugation (9000 Upm für 20 Minuten in einem JA10- Rotor bei 4°C). Phagenpellets wurden in 2 ml PBS resuspendiert und für drei Minuten mikrozentrifugiert, um Debris zu pelletieren, in frische Reagenzgläser transferiert und bei – 22°C für weitere Untersuchungen wie unten beschrieben gelagert.

[0195] Zur Bestimmung des Titers der Kolonie-bildenden Einheiten (colony forming units, cfu), wurden Phagen (verpackte Phagemide) in SB verdünnt und 1 µl wurde verwendet, um 50 µl frische (A_{OD600} = 1) E. coli XL1-Blue-Zellen zu infizieren, die in SB wachsen gelassen wurden, das 10 µg/ml Tetracyclin enthält. Phagen und Zellen wurden bei Raumtemperatur für 15 Minuten aufbewahrt und dann direkt auf LB/Carbenicillin-Platten plattiert.

B. Selektion der Phaaemid-präsentierten semisynthetischen Fab-Heterodimere

1) Mehrfaches Schwenken der Phagenbibliothek mit Phagemid Fab präsentierten synthetischen Bindungsstellenoroteinen

[0196] Die in Beispiel 4A, 4B und 4C hergestellten Phagenbibliotheken wurden wie hierin beschrieben auf Mikrotiterplatten geschwenkt, die mit den synthetischen Haptenkonjugatzielmolekülen beschichtet worden waren. Es wurden drei synthetischen Haptene zur Untersuchung auf verbesserte hochaffine Antikörper mit entweder einer zufallsgenerierten schweren oder leichten Kettendomäne oder beiden ausgewählt.

[0197] Die in **Fig.** 1 gezeigten und jeweils als 1, 2 und 3 markierten Konjugate waren Fluorescein-BSA (Fl-BSA), S-BSA, ein Analogon für die Auswahl katalytischer Antikörper, die eine Decarboxylierungsreaktion katalysieren und GBSA, das ähnlich zu den anderen beiden Haptenen ist, aber ein flaches aromatisches Ringsystem enthält und nicht den anionischen Charakter der anderen Haptene aufweist. Konjugat 1 wurde durch Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci.. USA, 89: 4457–4461 (1992) beschrieben. Konjugate 2 und 3 wurden kürzlich durch Lewis et al., Reports, 1019–1021 (1991) beschrieben. Die Reagenzien wurden bei einer Konzentration von 40 µg/ml in dem Beschichtungspuffer, 0,1 M Bicarbonat bei pH 8,6 verwendet.

[0198] Die beschriebene Schwenkprozedur war eine Abwandlung der ursprünglich durch Parmley et al., Gene, 73: 305–318 (1988) beschriebenen. Diesem Verfahren, das unten für eine Herstellung beschrieben wird, wurde für jede der Phagenherstellungen für alle Bibliotheken gefolgt, die zur Verwendung in dieser Erfindung hergestellt worden waren. Da die Haptene an BSA konjugiert waren, wurde selektiver Druck ausgeübt, um auf Haptenbindung und gegen BSA-Bindung zu selektieren. Dieses wurde durch das Resuspendieren des Phagen in TBS erreicht, das vor der Selektion 1 % BSA enthält, und durch Alternieren von 3 % BSA und 2 % nicht-fetter trockener Milch, wodurch die Mikrotiterplatte bei jeder Runde der Selektion blockiert wird.

[0199] Vertiefungen auf einer Mikrotiterplatte (Costar 3690) wurden separat über Nacht bei 4 °C mit den oben hergestellten aufgereinigten Zielkonjugaten beschichtet. Die Vertiefungen wurden zwei Mal mit Wasser gewaschen und durch vollständiges Füllen der Vertiefung mit 3 % (gew./v) Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) in PBS und Inkubieren der Platte bei 37 °C für 1 Stunde blockiert. Die blockierende Lösung wurde durch Schütteln entfernt, 50 µm von jeder der oben hergestellten Phagenbibliotheken (typischerweise 10^{11} cfu) wurden zu jeder Vertiefung hinzugefügt und die Platte wurde für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

[0200] Phagen wurden entfernt und die Platte wurde einmal mit Wasser gewaschen. Jede Vertiefung wurde dann 10 mal mit TBS/Tween (50 mM Tris-HCl bei pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 % Tween 20) über einen Zeitraum von 1 Stunde bei Raumtemperatur gewaschen, dann rauf und runter pipettiert, um die Vertiefung zu waschen, wobei die Vertiefung jeweils vollständig mit TBS/Tween zwischen den Waschungen gefüllt war. Die Platte wurde noch einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und anheftender Phage wurde durch den Zusatz von 50 µm Elutionspuffer (0,1 M HCl, angepasst auf pH 2,2 mit festem Glycin, enthaltend 1 mg/ml BSA) zu jeder Vertiefung und Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten eluiert. Der Elutionspuffer wurde mehrere Male rauf und runter pipettiert, entfernt und mit 3 µm 2 M Tris-Base pro 50 µm des verwendeten Elutionspuffers neutralisiert. Der eluierte Phage wurde verwendet, um 2 ml frische (OD_{600} = 1) E. coli XL1-Blue-Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur zu infizieren, wonach 10 ml SB, enthaltend 20 µg/ml Carbenicillin und 10 µg/ml Tetracyclin, hinzugefügt wurden. Aliquote von 20, 10 und 1/10 µl wurden zur Plattierung entfernt, um die Anzahl von Phagen (verpackten Phagemiden) zu bestimmen, die von der Platte eluiert wurden. Die Kultur wurde für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt, wonach sie zu 100 ml SB hinzugefügt wurde, enthaltend 50 µg/ml Carbenicillin und 10 µg/ml Tetracyclin und für 1 Stunde geschüttelt. Helferphage VCSM13 (10^{12} pfu) wurde dann hinzugefügt und die Kultur wurde für weitere 2 Stunden geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden 70 µg/ml Kanamycin hinzugefügt und die Kultur wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert. Phagenherstellung und weiteres Schwenken wurde

wie oben beschrieben wiederholt.

[0201] Nach jeder Runde des Schwenkens, wurde die Prozentausbeute des Phagen bestimmt, wobei % Ausbeute – (Anzahl an eluiertem Phagen/Anzahl an eingesetzten Phagen) × 100.

[0202] Das endgültige Phagen-Output-Verhältnis wurde durch das Infizieren von 2 ml XL1-Blue-Zellen in der logarithmischen Phase wie oben beschrieben und das Plattieren von Aliquoten auf selektiven Platten bestimmt. Nach dem Waschen und der Säureelution aus der ersten Runde des Schwenkens wurden die Phagen-präsentierten Fab-Bibliotheken dann in anschließenden Runden des Schwenkens kombiniert, um die Klone mit höchster Affinität durch kompetitive Bindung aus der Sammlung an Bibliotheken zu identifizieren. Durch Sequenzieren der selektiven Binder wurde dann die Quellbibliothek der Klone bestimmt.

[0203] Aus dieser Prozedur wurden Klone aus jeder der Fab-Bibliotheken auf deren Fähigkeit hin, an deren jeweiligen ausgewählten synthetischen Ziele zu binden, selektiert. Die geschwenkten Phagenoberflächenbibliotheken wurden dann zur weiteren Charakterisierung wie in Beispiel 5C beschrieben in solche umgewandelt, die lösliche semisynthetische Fab-Antikörper exprimieren.

C. Herstellung von löslichen Fab-präsentierten Bindungsstellen Proteinen

[0204] Um die Spezifität der semisynthetischen Fab-Antikörper weiter zu charakterisieren, die auf der Oberfläche von Phagen wie oben exprimiert werden, wurden lösliche Heterodimere hergestellt und in ELISA-Assays auf synthetischen Konjugat-Ziel-beschichteten Platten und durch kompetitiven ELISA mit sich erhöhenden Konzentrationen des löslichen Kompetitorproteins wie unten beschrieben analysiert.

[0205] Um lösliche Fabs herzustellen, die aus schweren und leichten Ketten (d. h. Heterodimeren) bestehen, wurde Phagemid-DNA aus positiven Klonen, die oben in Beispiel 5B selektiert worden waren, isoliert und mit Spe I und Nhe I verdaut. Der Verdau mit diesen Enzymen produzierte kompatible kohäsive Enden. Das 4,7 kb DNA-Fragment, dem der gIII-Anteil fehlte, wurde Gel-aufgereinigt (0,6 % Agarose) und selbst-ligiert. Die Transformation von E. coli XL1-Blue setzte die Isolierung von Rekombinanten voraus, denen das gIII-Fragment fehlte. Es wurden Klone auf das Entfernen des gIII-Fragments durch Xho I/Xba I-Verdau hin überprüft, was zu einem 1,6 kb-Fragment führen sollte. Die Klone wurden in 100 ml SB bei 37°C wachsen gelassen, das 50 µg/ml Carbenicillin und 20 mM $MgCl_2$ enthielt, bis eine OD_{600} von 0,2 erreicht war. Es wurde IPTG (1 mM) hinzugefügt und die Kultur wurde über Nacht bei 30°C wachsen gelassen (Wachstum bei 37°C führt nur zu einer leichten Verringerung der Heterodimerausbeute). Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 Upm 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 Sonifizierung auf Eis (2–4 Minuten bei 50 % Belastung) lysiert. Debris wurde durch Zentrifugation bei 14000 Upm in einem JA20-Rotor bei 4°C für 15 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde direkt zur ELISA-Analyse verwendet und bei -20°C gelagert. Für die Untersuchung einer größeren Anzahl von Klonen stellten 10 ml-Kulturen eine ausreichende Menge der semisyntetischen Fab-Antikörper zur Analyse zur Verfügung. In diesem Fall wurden Sonifizierungen in 2 ml Puffer durchgeführt.

[0206] Die oben hergestellten löslichen Heterodimere wurden wo dieses anwendbar war wie in Beispiel 6 durch ELISA untersucht,.

6. Charakterisierung von löslichen semisynthetischen Fab-Heterodimeren

A. ELISA

[0207] Vorläufige ELISA-Assays wurden durchgeführt, um zuerst die Bindungsspezifität der geschwenkten Phagen semisynthetischen Fab-Antikörper gegenüber synthetischen Haptenen zu charakterisieren. Für den ELISA wurden 1 µm/Vertiefung der synthetischen Haptene, die in Beispiel 5B hergestellt worden waren, separat in einzelne Vertiefungen einer Mikrotiterplatte überführt und bei 4°C über Nacht aufbewahrt, um es der Haptenlösung zu ermöglichen, an die Wände der Vertiefung zu binden. Nach dem Aufbewahrungszeitraum wurden die Vertiefungen einmal mit PBS gewaschen und danach mit einer Lösung von 3 % BSA aufbewahrt, um nicht-spezifische Positionen in den Vertiefungen zu blockieren. Die Phagen wurden bei 37°C für 1 Stunde aufbewahrt, nach welcher Zeit die Platten umgedreht wurden und geschüttelt wurden, um die BSA-Lösung zu entfernen. Lösliche Fab-Heterodimere, die die semisynthetischen Fab-Heterodimere exprimieren, die in Beispiel 5C hergestellt worden waren, wurden separat zu jeder Vertiefung hinzugegeben und bei 37°C für 1 Stunde aufgewahrt, um die Immunreaktionsprodukte auszubilden. Nach dem Aufbewahrungszeitraum wurden die Vertiefungen 10 mal mit PBS gewaschen, um ungebundenen löslichen Antikörper zu entfernen und dann mit einem sekundären Ziege-anti-Mensch FAB, das an alkalische Phosphatase konjugiert ist, aufbewahrt, das in verdünnter PBS mit 1 % BSA aufbewahrt worden war. Die Vertiefungen wurden bei 37°C für 1 Stunde aufgewahrt, wonach die Vertiefungen mit PBS 10 mal gewaschen wurden, gefolgt von der Entwicklung mit p-Nitrophenylphosphat.

[0208] Nach 5 Runden der Selektion, wie beschrieben in Beispiel 5B, und Umwandlung des Phagemids von

der Oberflächenpräsentationsform zur löslichen Antikörper-produzierenden Form, waren 20 von 20 Klonen, die auf die Bindung mit dem Fluoresceinkonjugat (1) selektiert worden waren, 18 von 20, die auf die Bindung des Konjugats S-BSA (2) und 1 von 20, das auf die Bindung des Konjugats C-BSA (3) selektiert worden waren, positiv in der ELISA-Analyse. Alle Klone aus F22-abgeleiteten Bibliotheken waren auch nach Selektion auf die Bindung an Konjugat 1 positiv.

[0209] Kreuzreaktivitäten der gereinigten Klone wurden durch ELISA untersucht und werden in **Fig.** 2 gezeigt. Die Antigene, die in dem ELISA verwendet wurden, die von links nach rechts in **Fig.** 2 gezeigt werden, sind das ursprüngliche pC3AP313-spezifische Tetanustoxin (nach oben gestreifter Balken), das FI-BAS-Konjugat (schwarzer Balken), BSA (horizontaler Balken), das S-BSA-Konjugat (nach unten gestreifter Balken) und das C-BSA-Konjugat (weißer Balken). Die Klone F22, P2, S4 und S10 waren für das Konjugat spezifisch, auf das sie selektiert worden waren. Klon S4 behielt einige Reaktivität zu dem ursprünglichen Antigen Tetanustoxoid bei. Die Klone S2 und C15 waren stärker in der Bindung. Die Selektion gegen die Bindung an BSA war wirksam, wie durch die eingeschränkte Reaktivität des Fab gegenüber diesem Antigen angezeigt.

B. Affinitätscharakterisierung

[0210] Die Affinitäten von verschiedenen aufgereinigten Klonen wurden durch Oberflächenplasmonresonanz untersucht. Nur beobachtetes monomeres Fab, wie durch Gelfiltration beurteilt, wurde beobachtet, im Gegensatz zu einem kürzlichen Bericht einer Einzelkettenantikörperdimerisierung, wie beschrieben durch Griffiths et al., EMBO J., 12: 725–734 (1993). Die Bestimmung von An- und Abgangsaffinitätskonstanten, jeweils k_{on} und k_{off}, für ausgewählte Klone, wurde unter Verwendung des Biacore-Instruments von Pharmacia Biosensor (Piscataway, NJ, gemäß den Anweisungen des Herstellers) durchgeführt. Das FI-BSA-Konjugat wurde in 10 mM Acetatpuffer bei pH 2,5 immobilisiert, um 600 Resonanzeinheiten auf einem CM5-Biacore-Sensorchip zu ergeben Die k_{on} und k_{off} wurden durch Standardanalyse in PBS jeweils bei Flussraten von 5 und 8 µl/Min. bestimmt, wie beschrieben durch Altschun et al., Biochem., 31: 6298–6304 (1992).

[0211] Eine Kompilierung der kintischen und Gleichgewichtskonstanten wird in Tabelle I gezeigt. Alle Kd's näherten sich dem nanomolaren Bereich. Klon P2, der stark von F22-abgeleiteten Bibliotheken selektiert worden war, hatte eine leicht geringere Affinität als der Elternklon. Die Affinität von F22 für das FI-BSA-Konjugat durch Oberflächenplasmonresonanz ist in großer Übereinstimmung mit der Affinität, die durch eine kompetitive Analyse bestimmt wurde.

Klon	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	K_a (M^{-1})	Kd (nM)
F22	$6,4 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^7$	34
P2	$2,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^7$	80
S2	$2,8 \times 10^5$	$8,0 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^7$	29
S4	$4,0 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^7$	56
S10	$3,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^7$	37

C. Sequenzbestimmung der Proteine mit Bindungsstelle

[0212] Eine Nukleinsäuresequenzierung wurde auf doppelsträngiger DNA unter Verwendung der Sequenaee 1.0 (USB, Cleveland, OH) durchgeführt, die die spezifischen löslichen synthetischen Hapten-bindenden Fab-Heterodimere dieser Erfindung kodiert, die oben charakterisiert ist.

[0213] Die Sequenzen der CDR3-Regionen aus den ausgewählten Antikörpern werden in Tabelle 2 und 3 gezeigt. Auf der linken Seite beider Tabellen sind ausgewählte Antikörper (werden als der Klon bezeichnet) und die Anti-Hapten-Konjugatnummer 1, 2 oder 3, auf die die Antikörper untersucht wurden, aufgelistet. Die nächste Spalte von links nach rechts ist entweder die Aminosäuresequenz der schweren (HCDR3 in Tabelle 2) und leichten Ketten CDR3 (LCDR3 in Tabelle 3) des bezeichneten Klons. Die SEQ ID Nrs sind benachbart zu jeder der schweren und leichten Kettensequenzen aufgelistet. Die letzte Spalte in jeder Tabelle zeigt die Bezeichnung der gekreuzten leichten und schweren Kettenbibliothek, aus der der Klon abgeleitet und selektiert worden war. In allen Fällen wird die leichte Kette zuerst aufgelistet, gefolgt von der schweren Kettenbibliothek oder keine, wenn anwendbar.

Tabelle 2

Klon/Konjugat	HCDR3	SEQ ID NO	Bibliothek
FL3/1	GWSRWSGLDW	32	K10/F
FL18/1	SSTKIMRLDT	33	K9/F
FL19/1	GMFRRGFYDR	34	F
FL12/1	GVRNNFGRWHWVWDS	35	E
FL13/1	GRAVRGSRKRVLGYDR	36	E
FL15+1/1	GRPGVVRRRIAPRMDI	37	K9/E
FL17/1	GPKGVFPRWGMASFDR	38	K10/E
F22/1	GVNLFRVRNSRPHLDM	39	16
P2/1	GVNLFRVRNSRPHLDM	39	K9/F22
P3/1	GVNLFRVRNSRPHLDM	39	K9/F22
P4/1	GVNLFRVRNSRPHLDM	39	K9/F22
P5/1	GVNLFRVRNSRPHLDM	39	K10/F22
P6/1	GVNLFRVRNSRPHLDM	39	K10/F22
P7/1	GVNLFRVRNSRPHLDM	39	K10/F22
	GVNLFRVRNSRPHLDM	39	K10/F22
S4/2	GLRGSRGFDR	40	K10/F
S10/2	GSWLRGPYDM	41	
S12/2	GTLGEGGYDR	42	K10/F
S2/2	GWRSSRGVVWVFSGDA	43	K10/E
C13/3	GDWGWFTRVATWRPDV	44	K10/E

Tabelle 3

Klon/Konjugat	LCDR3	SEQ ID NO	Bibliothek
FL3/1	QQYLPGGRYT	45	K10/F
FL18/1	QQYRVEGQT	46	K9/F
FL19/1	QQYGGSPW	47	F
FL12/1	QQYGGSPW	47	E
FL13/1	QQYGGSPW	47	E
FL15+1/1	QQYSRHRFT	48	K9/E
FL17/1	QQYRYPLIWT	49	K10/E
F22/1	QQYGSSLWT	50	16
P2/1	QQYTRPGVT	51	K9/F22
P3/1	QQYSFKNWT	52	K9/F22
P4/1	QQYGYRKWT	53	K9/F22
P5/1	QQYTPRRGAT	54	K10/F22
P6/1	QQYTPRVGHT	55	K10/F22
P7/1	QQYKYGRGMT	56	K10/F22
	QQYKYGRGMT	56	K10/F22
S4/2	QQYGKKQWT	57	K10/F
S10/2	QQYVRRSGT	58	
S12/2	QQYGKRSPVT	59	K10/F
S2/2	QQYARATGLT	60	K10/E
C13/3	QQYSRFVSRT	61	K10/E

[0214] Eine Reihe von Eigenschaften sind sofort beim Betrachten der Aminosäuresequenz der ausgewählten Klone, der Bibliotheken, von denen sie abgeleitet worden sind und dem synthetische Hapten, auf das sie selektiert wurden, offensichtlich. Keine Klone, die aus Bibliotheken abgeleitet worden waren, die eine HCDR3-Länge von 5 enthielten, überlebten die kompetitive Selektion. Des Weiteren wurden keine Klone, die aus den Bibliotheken mit nur einer leichten Kettenvariation abgeleitet wurden, selektiert. Alle Klone wurden aus schweren Kettenbibliotheken abgeleitet, in denen die ersten und vorletzten Reste jeweils als Gly oder Asp fixiert worden waren. Klon FL18 enthielt ein Serin (S) in der ersten Position, das wahrscheinlich ein Artefakt der Synthese und des Zusammenbaus ist und ist das Ergebnis einer einzelnen Basenänderung (GGT zu AGT). Dies wurde in früheren Untersuchungen der Bibliotheken E und F festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen an, dass die Vollständigkeit einer semisynthetischen Fab-Bibliothek nicht notwendigerweise mit der Qualität von Antikörpern korreliert, die aus ihr abgeleitet werden können. Die Bibliotheken K8, CDR3-HC5 und G enthielten alle ausreichend Mitglieder, um als 99 % vollständig erachtet zu werden und doch überlebten keine Klone von diesen Bibliotheken die kompetitive Selektion. Tatsächlich wurden die meisten Klone aus den gekreuzten Bibliotheken abgeleitet, die am unvollständigsten waren, aber wahrscheinlich am meisten strukturell verschieden. Diese Ergebnisse betonen die Tatsache, dass eine evolvierte Verbindungsstelle neu entwickelt werden

kann, was am besten mit einer eher ausgiebigen Mutation erreicht werden kann als mit einer geringeren. Dieses Argument kann vielleicht die Klone mit geringer Affinität erklären, die durch die Zufallsgenerierung von 5 Resten isoliert worden waren, wie kürzlich durch Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227: 381–388 (1992) berichtet.

[0215] Es gibt Anhaltszeichen für die Selektion einer Konsensussequenz in den Klonen. Zum Beispiel ist in der achtzehnten Position von HCDR3 der Klone S4, S10 und S12 ein aromatischer Rest. Deren korrespondierenden leichten Ketten enthalten jeweils das basische Doublet KK, RR und KR. Des Weiteren wird eine Sequenzähnlichkeit in den Klonen S4 und S2 festgestellt, die sich in der Länge unterscheiden, aber sehr ähnliche carboxyterminale HCDR3-Regionen enthalten. Klon S10 und S2 wurden jeweils 3 und 2 mal aufgefunden, identisch auf der Nukleotidebene nach Sequenzierung von 7 Klonen.

[0216] Die Untersuchung der Rolle von LCDR3 in dem zuvor ausgewählten Klon F22 offenbarte, dass eine deutlich unterschiedliche Sequenz in dieser Region im Vergleich zu dem Ausgangsklon toleriert werden kann. Der predominante Klon war P2, von dem festgestellt wurde, dass er 5 mal identisch auf der Aminosäureebebe unter 10 sequenzierten Klonen vorhanden war. Von diesem Klon wurde festgestellt, dass er durch 4 einzelne Nukleotidsequenzen kodiert wurde. Natürlich vorkommende murine und menschliche kappa leichte Ketten CDR3-Regionen zeigen eine starke Konservierung von Pro an der Kabatposition 95. Keiner der Klone, die aus den semisynthetischen Bibliotheken abgeleitet worden waren, enthält Prolin (P) in dieser Position. Dieses zeigt an, dass Prolin für andere als strukturelle Gründe konserviert ist oder dass es eine Editierung dieser Sequenz auf einer anderen Ebene gibt.

[0217] Somit kann eine Reihe von Anti-Hapten-semisynthetischen Fab-Antikörpern direkt aus semisynthetischen Antikörperbibliotheken selektiert werden, die durch Zufallsgenerierung von 1 oder 2 CDR-Regionen abgeleitet werden, spezifisch in der schweren und leichten Ketten CDR3. Wie natürlich vorkommende Antikörper auch zeigten semisynthetische Antikörper verschiedene Grade an Kreuzreaktivität. Bibliotheken mit größerer struktureller Diversität, solche mit mehr zufallsgenerierten Resten, waren funktionell besser als vollständige aber strukturell eingeschränkte Bibliotheken. Jedoch wurde die Diversität in der schweren Ketten CDR3 in dem Ausmaße eingeschränkt, dass die vorletzte Position, die als Asparaginsäure fixiert ist, die Qualität der Bibliothek verbessert und die strukturelle Rolle dieses Restes hervorhebt. Kein solches Phänomen wurde bis jetzt in dem CDR3 der leichten Kette beobachtet, obwohl 4 Positionen in dieser Region noch zu untersuchen sind.

7. Herstellung einer dicistronischen Expressionsvektorbibliothek, die in der Lage ist, ein Phagemid-Fab-Displayprotein zu exprimieren, das aus menschlichen Anti-Schilddrüsen (Thymus)-Peroxidase-Antikörper-leichten- und schweren Kettenbibliotheken abgeleitet ist:

A. Herstellung von Lymphozyten mRNA

[0218] Schildrüsen(Thymus)gewebe wurde aus einem Patienten mit Hashimoto's Thyroiditis gewonnen, das Anti-Schildrüsen-Peroxidase-Antikörper enthält und die Schilddrüsenlymphozyten wurden aus dem Schilddrüsengewebe isoliert, wie beschrieben in Atherton et al., Immunolay, 55: 271–279 (1985). RNA wurde dann aus den frisch isolierten Zellen extrahiert (Hexham et al., Autoimmunitv, 12: 135–141 (1992) und Hexham et al., Autoimmunitiv, 14: 169–172 (1992)). Die Analyse des Hashimoto-Patientenserum durch ELISA (Schardt et al., J. Immunol. Methods, 55: 155–168 (1982)) zu dem Zeitpunkt der Operation zeigte die Gegenwart großer Mengen an Thymusperoxidase (TPO)-Antikörpern an, primär des IgG/kappa-Typs.

B. Herstellung von Thymusperoxidase-Antikörperbibliotheken der schweren und leichten Kette in dem Lambdaphagen

[0219] Schwere und leichte Ketten-Thymusperoxidase-Antikörperbibliotheken wurden zuerst in dem Lambdaphagen hergestellt, wie beschrieben in Hexham et al., Autoimmunitv, 12: 135– 141 (1992), unter Verwendung der Lymphozyten mRNA, die in Beispiel 7A isoliert worden war. Die Lambdaphagenbibliotheken der schweren und leichten Ketten wurden in Phagemidbibliotheken durch ein in vivo Ausschneideverfahren (Short et al., supra) unter Verwendung eines interferenzresistenten M13-Helferphagen VCSM13 (Stratagene, La Jolla, Californien) umgewandelt.

[0220] Nach dem Ausschneiden der Lambdaphagenbibliothek, die die leichte Kette kodiert, wurden elf Klone zufällig zur weiteren Analyse ausgewählt. Die DNA wurde isoliert und die Nukleotidsequenzen durch das Dideoxykettenterminationsverfahren (Sauger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 74: 5463–5467 (1977)) unter Verwendung der Sequenase 2.0 (United States Biochem) bestimmt.

C. Herstellung der Thymus-Peroxidase-Antikörperbibliotheken der schweren und leichten Ketten in Pcomb3

[0221] Die in Beispiel 7B identifizierten schwere und leichte Ketten Antikörper-kodierenden Sequenzen wur-

den aus dem aufgeschnittenen Phagemidvektor entfernt und in den monovalenten Fab-Phagen-Display-Vektor Pcomb3 eingeführt. Die schweren und leichten Kettensequenzen wurden jeweils durch Restriktionsverdau mit Xho I/Spe I und Sac I/Xba I isoliert und in einen ähnlich verdauten Pcomb-Vektor ligiert. Die Ligationsprozedur in der Herstellung der Expressionsvektorbibliotheken wurde wie in Beispiel 2 beschrieben durchgeführt. Die primäre Bibliothek enthielt 10^5 unabhängige Klone. Zwölf Klone wurden zufällig selektiert und durch Restriktionsverdau der DNA mit Not I analysiert. 83 % der untersuchten Klone enthielten das 2,5 kb-Insertfragment, das mit einem Fab-enthaltenden Vektor konsistent ist.

8. Selektion von Anti-Thymus-Peroxidase-Fab-Antikörpern, die auf einem Phagen exprimiert werden

A. Herstellung von Phagen, die Fab-Heterodimere exprimieren

[0222] Phagen, die Fabs exprimieren, die mit Thymus-Peroxidase (TPO) reaktiv sind, wurden wie in Beispiel 2 beschrieben unter Verwendung der Expressionsvektorbibliothek hergestellt, die in Beispiel 7c hergestellt worden war, um eine Phagenbibliothek auszubilden, die Phagen mit Fab-Display-Protein enthält.

B. Selektion von Phagemid-präsentierten Fab-Heterodimeren

1) Mehrfaches Waschen der Phagenbibliothek mit Phagemid Fab-präsentierten Bindungsstellenproteinen

[0223] Die in Beispiel 8A hergestellte Phagenbibliothek wurde wie in Beispiel 5B1 auf Mikrotiterplatten geschwenkt, die mit TPO-Zielmolekülen beschichtet waren, um Phagemidpräsentierte Anti-TPO-Fab-Heterodimere zu isolieren. Aufeinanderfolgende Runden des Schwenkens auf TPO-beschichteten ELISA-Platten resultierte in der Anreicherung von einem ungefähr 10^4-Fachen. Runde 1 des Schwenkens ergab eine Rückgewinnung von 2×10^3 koloniebildenden Einheiten (colony forming units), (cfu); Runde 2 ergab eine Rückgewinnung von $3{,}2 \times 10^3$ cfu; Runde 3 ergab eine Rückgewinnung von $>10^6$ cfu; und Runde 4 ergab eine Rückgewinnung von >10' cfu. Die geschwenkten Phagenoberflächenexpressionsklone wurden dann in Klone umgewandelt, die lösliche Fab-Antikörper exprimieren, wie in Beispiel 5C für die weitere Charakterisierung beschrieben.

9. Charakterisierung von löslichen Fab-Heterodimeren

A. ELISA

[0224] ELISA-Assays wurden durchgeführt, um die Bindungsspezifität von einzelnen gewaschenen Phagen-Fab-Antikörpern mit TPO zu charatkerisieren. Ein ELISA wurde wie in Beispiel 6A beschrieben durchgeführt, mit TPO anstatt der synthetischen Haptene als dem Targetmolekül, und das Fab wurde mit Anti-Mensch IgG (Fab), das an alkalische Phosphatase konjugiert war (Sigma, St. Louis, Missouri), nachgewiesen.

[0225] Nach 4 Runden der Selektion, wie beschrieben in Beispiel 8B1 und Umwandlung der Phagemidform von der Oberflächenpräsentationsform zur löslichen Antikörper-produzierenden Form wurden 17 von 24 Klonen auf die Bindung an TPO positiv in der ELISA-Analyse selektiert. Kreuzreaktivitäten aufgereinigter Klone mit irrelevanten Proteinen wurden durch ELISA, wie in Beispiel 6A beschrieben, untersucht. Die in dem ELISA verwendeten Antigene hatten einen Bereich von Konzentrationen von menschlichem TPO, menschlichem Thyroglobulin (RSR Ltd., Cardiff, CF2 7HE), menschlicher Myeloperoxidase (Sigma, St. Louis, Missouri) und Rinderlactoperoxidase (Sigma, St. Louis, Missouri). Die Bindung der Fabs an TPO-beschichtete Platten wurden durch menschliches TPO inhibiert, jedoch wurde keine Inhibierung mit menschlichem Thyroglobulin (bis zu 100 nM), menschlicher Myeloperoxidase (bis zu 200 nM) oder Rinderlactoperoxidase (bis zu 10 µM) festgestellt.

B. Affinitätscharakterisierung

[0226] Die Affinitäten von verschiedenen aufgereinigten Klonen wurden durch Inhibierungs-ELISA mit verschiedenen Konzentrationen an TPO als dem Kompetitor abgeschätzt. Die Affinitätskonstanten von 6F, 7F und 10l wurden jeweils geschätzt als $8{,}0 \times 10^8$, $8{,}0 \times 10^8$ und $0{,}3 \times 10^9$ M^{-1}.

[0227] Somit wurden drei unterschiedliche neue hochaffinite (ungefähr 10^{-9} M^{-1}) Anti-TPO-Fab-Antikörper direkt aus einer Pcomb3 Phagen-Display-kombinatorischen Bibliothek selektiert. Diese Fabs, die als 6F, 7F und 10l bezeichnet werden, wurden mit einer relativen Häufigkeit von 12 : 4 : 1 aus einer angereicherten Population des Phagens erhalten, wobei Fab 10l die höchste Affinität für TPO aufweist.

C. Sequenzbestimmung der Bindungsstellenproteine

[0228] Die Nukleotidsequenz der spezifischen löslichen TPO-bindenden Fab-Heterodimere dieser Erfindung wurde bestimmt. Die Nukleotidsequenz des Anti-TPO monoklonalen Antikörpers 2G4 (Horimoto et al., Autoimmunitv, 14: 1–7 (1992) und Hexham et al., Autoimmunitv, 14: 169–172 (1992)) und die SP-Serie der rekombinanten Anti-TPO-Antikörper (Portolano et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 179: 372–377 (1991), Portolano et al., J. Clin. Invest., 90: 720–26 (1992) und Portolano et al., J. Immunol., 150: 880–887 (1993)) wurde auch bestimmt. Nukleinsäuresequenzierung wurde auf doppelsträngiger DNA unter Verwendung der Sequenase 2.0 (USB, Cleveland, OH) durchgeführt. Die Primen SEQGb, SEQKb und der M13 reverse Primer wurden, wie in Hexham et al., Autoimmunitv, 12: 135–141 (1992) beschrieben, verwendet.

[0229] Die Sequenzanalyse und Datenbasenrecherchen wurden unter Verwendung der SERC Segnet facility auf einem Silicon Graphics Crimson durchgeführt, der die GCG-Programme laufen lässt (Devereux, et al., Nucl. Acids Res., 12: 387–395 (1984)). Variable Regionensequenzen wurden identifiziert und unter Verwendung des FASTA-Programms analysiert, um die Genbank- und EMBL-Datenbasen zu recherchieren und durch direkten Vergleich mit bekannten Sequenzen (Kabat et al., supra).

[0230] Die Sequenzen der CDR-Regionen von Anti-TPO-Antikörpern werden in den Tabellen 4 und 5 gezeigt. Auf der linken Seite von beiden Tabellen sind die Anti-TPO-Antikörper (bezeichnet als der Klon) aufgelistet. Die nächste Spalte von links nach rechts ist entweder die Aminosäuresequenz der schweren CDRs (HCDR in Tabelle 4) oder der leichten Ketten CDRs (LCDR in Tabelle 5) des bezeichneten Klons. Die SEQ ID NOs, die zu der kompletten Aminosäuresequenz, wie in der Sequenzauflistung aufgelistet, korrespondieren, sind benachbart zu jeder der schweren und leichten Ketten-Aminosäuresequenzen in den Tabellen 4 und 5 aufgelistet.

Tabelle 4

Klon	HCDR1	HCDR2	HCDR3	SEQ ID NO
10I	SYAMT	SPSANGDFAYYADSVKG	AGRILGVVLWYSLYYGFDV	63
6F	SHDIN	WITNRGTTSRYAQKFQG	GAGAGGTW	64
SP1.2	GHYMH	WISPNRGATRFAQKFQG	TRTAYYGMDV	65

Tabelle 5

Klon	LCDR1	LCDR2	LCDR3	SEQ ID NO
10I	RASSNISSYIN	AASSLQS	QQSYSTPFT	66
6F	RASQRISSYIN	AASSLQS	QQSYSTPYT	67
SP1.2	RASENISSYIN	AASTLQS	QQTYSSPFT	68
SP1.4	RASQTIGTYIN	TASTLQS	QQSYSTPWT	69
SP1.5	RASQNIGKYIN	GTSTLQS	QQSYSTPWT	70

[0231] Die Analyse der Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der HC- und LC- variablen Regionen von 6F, 7F und 10I ermöglichte, dass die meisten der Vkappa VN, JH, Kkappa und DH-Gene auf das Keimbahngen zurückgeführt werden konnten, von dem sie abgeleitet wurden. Eine überraschende Eigenschaft dieser Antikörper ist, dass fünf von ihnen (6F, 10I und die drei gezeigten SP-Antikörper) anscheinend Vkappal leichte Ketten haben, die durch das gleiche vk02- oder vk012-Keimbahngen kodiert werden (Pargent et al., Eur. J. Immunol., 21: 1821–1827 (1991)). Vk02 hat eine kodierende Region, die nicht unterscheidbar ist von der von vk012 und daher ist die Zuordnung der Antikörper leichten Ketten zu jeder der beiden Keimbahngene gleich zulässig. Die leichten Ketten von 6F und 10I teilen jeweils 98,9 % und 99,6 % Nukleotididentität mit dem vk01/012-Keimbahngen. Die anderen Anti-TPO-Antikörper (2G4 und 7F) verwenden leichte Kettengene, die jeweils die größte Homologie, 87 und 97 %, mit dem kv325-Keimbahngen aufweisen (Radoux et al., J. Exp. Med., 164: 2119–2124 (1986)). Das kv325-Keimbahngen ist auch eine universelle leichte Kette und ist

die leichte Kettensequenz, die in SEQ ID NO 2 gezeigt wird.

[0232] Um die Frage eines Fehlers in der Repräsentation der leichten Kette in der Thymus-Peroxidase-Antikörperbibliothek zu adressieren, wurden elf Klone zufällig aus der Bibliothek vor der Antigenselektion ausgewählt und die Nukleotidsequenz bestimmt. Die Daten deuten an, dass alle elf leichten Kettensequenzen voneinander unterschiedlich sind und von den Anti-TPO-Fab leichten Kette Aminosäuresequenzen. Die elf Klone wurden aus drei unterschiedlichen Kappa-Genfamilien abgeleitet, was eine diverse Bibliothek anzeigt. Die Analyse der elf Sequenzen zeigte, dass 2 (1 %) vk02/012 und dass 4 (36 %) kv325 verwendeten, was ähnliche Häufigkeiten sind, wie die, die in den Anti-gp120-Antikörpern erhalten werden, die auch hierin beschrieben werden. Da die vk02/012- und kv325-Gene nur 3 der 45–50 Keimbahn-Kappagene ausmachen, scheint es, dass diese Gene in einer höheren Häufigkeit vorhanden sind, als der erwarteten Häufigkeit in der nicht-selektierten Bibliothek. Dieses könnte durch das Design der PCR-Primer bedingt sein, jedoch wird die vk02/012-Keimbahn-leichte Kette auch stark in der SP-Serie der Anti-TPO-Antikörpern präsentiert, welche unter Verwendung anderer PCR-Primer abgeleitet wurden. Zusätzlich sind die vk02/012- und kv325-leichten Ketten häufig in menschlichen Hybridomzellen präsent, die aus Antigenen gegen verschiedene nicht eigene Antigene abgeleitet werden. Dies kann als eine Überpräsentierung der vk02/012- und kv325-leichten Ketten in Antikörperproduzierenden Zellen in sowohl normalen wie auch Autoimmunzellen interpretiert werden.

[0233] Die nativen leichten Ketten von zwei der Antikörpern, 6F und 10I, verwenden das gleiche Keimbahn-Vkappa-Gen, vk02/012, wie die SP-Familie von Anti-TPO-Autoantikörpern. Das vk02/012-Gen wird auch in verschiedenen anderen Autoantikörpern exprimiert, einschließlich den Acetylcholinrezeptor-Antikörpern und Rhemafaktoren.

[0234] Leichte und schwere Kettenpaare, die aus Hybridomzellen abgeleitet sind, zeigen eine in vivo Paarung, während rekombinante Antikörper, die wie hierin beschrieben hergestellt wurden, beides, die in vivo und die in vitro Paarung aufzeigen. Um die Häufigkeit des Vorkommens der vk02/012- und vk 325-leichten Ketten in bekannten leichten Ketten zu bestimmen, wurden Nukleotidsequenzdatenbasen mit der variablen Region der Keimbahn untersucht, die Abschnitte von vk02/012 und vk325 kodieren. Fünf von sieben menschlichen Hybridomantikörpern bekannter Spezifität, die die kv02/012-leichte Kette enthalten, waren Autoantikörper. Neunzehn von 24 Antikörpern mit der kv325-leichten Kette bekannter Spezifität waren Autoantikörper. Die Hybridomzellantikörper gegen nicht eigene Antigene zeigten einen weiten Bereich an Spezifitäten einschließlich Haemophilus influenzae (kv02/012), Hepatitis B-Virus (kv02/012), Neisseria meningitides (kv325), menschlicher Cytomegalovirus (kv325) und HIV (kv325). Somit enthalten in vivo Paarungen, wie durch Hybridomantikörper dargestellt, auch eine hohe Häufigkeit der kv02/012- und kv325-leichten Kette. Des Weiteren war in einer diversen nicht-Antigen-selektierten Probe von 34 Kappa leichten Kettengenen, die aus peripheren Blutlymphozyten durch PCR amplifiziert worden waren (Marks et al., Eur. J. Immunol., 21: 985–991 (1991)), vk02/012 viermal repräsentiert. In früheren Studien muriner Reaktionen auf das Hapten NPN und in der menschlichen Reaktion auf das HIV-1 gp120 Protein wurde eine deutliche Promiskuität der Paarung von leichten Ketten mit einer bestimmten schweren Kette beobachtet. Zusammengenommen und unter der gegebenen Überrepräsentation von Autoantikörpern in der Datenbasis indizieren diese Ergebnisse, dass die Expression der k02/012-leichten Kette hoch ist, nicht nur in autoimmunen, sondern auch in normalen Immunreaktionen. Das vk02/012 kann daher als eine viel verwendete "Plastik" leichte Kette oder eine "universelle" leichte Kette angesehen werden, die mit verschiedenen schweren Ketten kombinieren kann, wobei die Spezifität durch die schwere Kette diktiert wird.

[0235] Die native leichte Kette in dem pC3AP313 Phagemidexpressionsvektor, die an Tetanustoxoid binden kann, kv325, wurde in Antikörpern gegen Fremdantigene wie den Cytomegalovirus und Digoxin identifiziert. Mit dem Verfahren und Repertoire des Klonierens und Sequenzierens wurde die pC3AP313 leichte Kette in hoher Häufigkeit beobachtet. Zum Beispiel wurde die leichte Kette in dem nicht-mutierten Gen in einem Antikörperbindungs-Hepatitis B-Antigen gefunden und war in einem Anti-Thymusglobliun-Antikörper leicht mutiert. Der Vergleich von 33 Antikörpern, die an das HIV-1-Oberflächenglycoprotein gp120 binden, zeigte, dass nicht weniger als 13 der Antikörper die pC3AP313 leichte Kette als das nächste leichte Ketten-Keimbahngen aufwiesen.

[0236] Somit wurden die native pC3AP313 leichte Kette und die native 6F leichte Kette als universelle leichte Ketten abgestempelt, bedingt durch deren hohe Repräsentation in Fab-Antikörperheterodimeren, die im Klonierungsrepertoire erhalten wurden. Die pC3AP313-und 6F-leichten Ketten sind jeweils die menschlichen Keimbahngene Humkv325 und Humkv02/012, und verhalten sich als eine universelle leichte Ketten V Region in Kombination mit verschiedenen J-Regionen in der Paarung mit einem weiten Bereich von verschiedenen schweren Ketten der Fab-Fragmente. Die leichten Ketten zeigen somit ein plastisches Verhalten dahingehend, dass; wenn in Kombination mit schweren Ketten, diese an eine große Breite an Antigenen binden, und die Spezifität und Affinität nicht durch die Gegenwart der universellen leichten Kette abgebrochen wird. Die Aminosäure der leichten Kette ist einzigartig in dieser Hinsicht und spielt daher eine wichtige Rolle in der Verwendbarkeit rekombinanter Antikörperbibliotheken aus natürlichen und synthetischen Quellen.

[0237] Die Fähigkeit menschliche Anti-Hapten-Antikörper herzustellen, die entweder die native pC3AP313

kodierte universelle leichte Kettensequenz oder eine solche weiter zufallsmutierte Sequenz aufweisen, um die Spezifität und Affinität der Heterodimerbindung zu verbessern, kann wesentlich in der Entwicklung von katalytischen Antikörpern als pharmazeutische Mittel sein.

[0238] Zudem ist die Fähigkeit, einzelne gekreuzte Bibliotheken mit nativen/nativen schweren und leichten Ketten CDR-Domänen, nativen schweren und zufallsgenerierten leichten Ketten CDR-Domänen, zufallsgenerierten schweren und nativen leichten Ketten CDR-Domänen und letztendlich beiden zufallsgenerierten schweren und leichten Ketten CDR-Domainen zu generieren, ein wertvolles Verfahren, das durch diese Erfindung zur Verfügung gestellt wird, um neue und verbesserte Fab-Heterodimere mit neuen und verbesserten Spezifitäten und Affinitäten durch Expression ausgewählter Klone aus diesen Bibliotheken zur Verfügung zu stellen.

10. Hinterlegung von Materialien

[0239] Das folgende Plasmid wurde an oder vor dem 2. Februar 1993, bei der American Type Culture Collection, 1301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC) hinterlegt:

Material	ATCC-Hinterlegungs-Nr.
Plasmid pC3AP313	ATCC 75408

[0240] Diese Hinterlegungen wurden unter den Bestimmungen des Budapester Vertrags bezüglich der internationalen Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für den Zweck der Patentanmeldung und der darunter fallenden Regularien (Budapester Vertrag) getätigt. Dieses sichert die Aufbewahrung einer lebenden Plasmidhinterlegung für 30 Jahre vom Tage der Hinterlegung. Die Hinterlegung wird durch die ATCC unter den Bedingungen des Budapester Vertrags verfügbar gemacht, welche sicherstellen, dass die permanente und nicht eingeschränkte Verfügbarkeit der Nachkommen der lebenden Plasmide an die Öffentlichkeit nach der Erteilung des jeweiligen US-Patents oder nach Offenlegung an die Öffentlichkeit einer jeglichen US- oder ausländischen Patentanmeldung, was davon jeweils zuerst kommt, sichergestellt ist, und stellt die Verfügbarkeit der Nachkommen an jemanden sicher, der gemäß dem U.S. Commissioner of Patents and Trademarks dazu gemäß 35 U.S.C. §122 und den Regeln des Commissioners berechtigt ist (einschließlich 37 CFR §1.14 mit besonderem Bezug auf 886 OG 638). Der Anmelder der vorliegenden Erfindung hat sich bereit erklärt, dass, wenn die Plasmidhinterlegung sterben sollte oder verloren gehen sollte oder bei der Kultivierung unter geeigneten Bedingungen zerstört werden sollte, es sofort auf Bekanntmachung hin mit einer lebenden Spezies des gleichen Plasmids ersetzt werden wird. Die Verfügbarkeit des hinterlegten Plasmids sollte nicht als eine Lizenz zur Durchführung der Erfindung entgegen der Rechte, die von einer Regierungsbehörde im Einklang mit ihren Patentgesetzen erteilt werden, ausgelegt werden.

[0241] Die vorausgegangene schriftliche Beschreibung wird als ausreichend erachtet, um einen Fachmann auf dem Gebiet dahingehend zu ermächtigen, die Erfindung zu praktizieren. Die vorliegende Erfindung ist nicht eingeschränkt bezüglich des Umfangs des hinterlegten Plasmids, da die hinterlegte Ausführungsform als einzelne Illustration eines Aspekts der Erfindung vorgesehen ist und jegliche Plasmidvektoren, die funktionell äquivalent sind, innerhalb des Umfangs dieser Erfindung liegen. Die Hinterlegung von Material ist kein Eingeständnis dafür, dass die schriftliche Beschreibung, die hierin enthalten ist, nicht ausreichend ist, die Durchführung aller Aspekte dieser Erfindung zu ermöglichen, einschließlich des besten Weges dazu, noch ist sie bezüglich einer Einschränkung des Umfanges der Ansprüche auf die spezifische Illustration, die es darstellt, auszulegen. Tatsächlich sind verschiedene Modifikationen der Erfindung zusätzlich zu denen, die gezeigt und hierin beschrieben werden, für die Fachleute auf dem Gebiet aus der vorgenannten Beschreibung offensichtlich und fallen innerhalb des Umfangs der beigefügten Ansprüche.

Sequenzauflistung

(1) Allgemeine Information:
(i) Anmelder: The SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE
(II) Titel der Erfindung: Verfahren zur Herstellung von Antikörperbibliotheken mit universellen oder zufällig gewählten Immunglobulin leichten Ketten
(iii) Anzahl der Sequenzen: 70
(iv) Korrespondenzadresse:
(A) Adressat: The Scripps Research Institute
(B) Straße: 10666 North Torrey Pines Road, TPC8
(C) Stadt: La Jolla
(D) Staat: CA
(E) Land: USA
(F) Postleitzahl: 92037

(v) Computerlesbare Form:
(A) Art des Mediums: Diskette
(B) Computer: IBM PC-kompatibel
(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS
(D) Software: Patentln Release #1.0, Version #1.25
(vi) Aktuelle Anmeldedaten:
(A) Anmeldenummer:
(B) Anmeldetag: 01.09.1995
(C) Klassifizierung:
(vii) Vorherige Anmeldedaten:
(A) Anmeldenummer: US 08/174,674
(B) Anmeldedatum: 28.12.1993
(vii) Vorherige Anmeldedaten:
(A) Anmeldenummer: US 07/826,623
(B) Anmeldedatum: 27.01.1992
(vii) Vorherige Anmeldedaten:
(A) Anmeldenummer: US 07/954,148
(B) Anmeldedatum: 30.09.1992
(vii) Vorherige Anmeldedaten:
(A) Anmeldenummer: US 08/012,566
(B) Anmeldedatum: 02.02.1993
(viii) Anwalt/Agenteninformation:
(A) Name: Fitting, Thomas
(B) Registrierungsnummer: 34,163
(C) Referenz/Aktennummer: TSRI 409.1 (PC)
(ix) Telekommunikationsinformation:
(A) Telefon:619-554-2937
(B) Telefax:619-554-6312
(2) Information für SEQ ID Nr:1:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 687 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein

CTCGAGCAGT CTGGGGCTGA GGTGAAGAAG CCTGGGTCCT CGGTGAAGGT CTCCTGCAGG

GCTTCTGGAG GCACCTTCAA CAATTATGCC ATCAGCTGGG TGCGACAGGC CCCTGGACAA

GGGCTTGAGT GGATGGGAGG GATCTTCCCT TTCCGTAATA CAGCAAAGTA CGCACAACAC

TTCCAGGGCA GAGTCACCAT TACCGCGGAC GAATCCACGG GCACAGCCTA CATGGAGCTG

AGCAGCCTGA GATCTGAGGA CACGGCCATA TATTATTGTG CGAGAGGGGA TACGATTTTT

GGAGTGACCA TGGGATACTA CGCTATGGAC GTCTGGGGCC AAGGGACCAC GGTCACCGTC

TCCGCAGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG CACCCTCCTC CAAGAGCACC

TCTGGGGGCA CAGCGGCCCT GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG

GTGTCGTGGA ACTCAGGCGC CCTGACCAGC GGCGTGCACA CCTTCCCGGC TGTCCTACAG

TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCTCCAGCAG CTTGGGCACC

CAGACCTACA TCTGCAACGT GAATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA CAAGAAAGCA

GAGCCCAAAT CTTGTGACAA AACTAGT

(2) Information für SEQ ID Nr:2:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 646 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:2:

GAGCTCACGC AGTCTCCAGG CACCCTGTCT TTGTCTCCAG GGGAAAGAGC CACCCTCTCC

TGCAGGGCCA GTCACAGTGT TAGCAGGGCC TACTTAGCCT GGTACCAGCA GAAACCTGGC

CAGGCTCCCA GGCTCCTCAT CTATGGTACA TCCAGCAGGG CCACTGGCAT CCCAGACAGG

TCCAGTGGCA GTGGGTCTGG GACAGACTTC ACTCTCACCA TCAGCAGACT GGAGCCTGAA

GATTTTGCAG TGTACTACTG TCAGCAGTAT GGTGGCTCAC CGTGGTTCGG CCAAGGGACC

AAGGTGGAAC TCAAACGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGTCT TCATCTTCCC GCCATCTGAT

GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCCTCTGTT GTGTGCCTGC TGAATAACTT CTATCCCAGA

GAGGCCAAAG TACAGTGGAA GGTGGATAAC GCCCTCCAAT CGGGTAACTC CCAGGAGAGT

GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC TACAGCCTCA GCAGCACCCT GACGCTGAGC

AAAGCAGACT ACGAGAAACA CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG TCACCCATCA GGGCCTGAGT

TCGCCCGTCA CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTTAAT TCTAGA

(2) Information für SEQ ID Nr:3:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 21 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:3:
GAATTCTAAA CTAGCTAGTC G
2) Information für SEQ ID Nr:4:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 21 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:4:
ATACTGCTGA CAGTAATACA C
2) Information für SEQ ID Nr:5:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 57 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:5:

TATTACTGTC AGCAGTATNN KNNKNNKNNK ACTTTCGGCG GAGGGACCAA GGTGGAG

(2) Information für SEQ ID Nr:6:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 21 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:6:

AATACGACTC ACTATAGGGC G

(2) Information für SEQ ID Nr:7:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 21 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:7:

TATTACTGTC AGCAGTATNN KNNKNNKNNK ACTTTCGGCG GAGGGACC

(2) Information für SEQ ID Nr:8:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 60 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:8:

TATTACTGTC AGCAGTATNN KNNKNNKNNK NNKACTTTCG GCGGAGGGAC CAAGGTGGAG

(2) Information für SEQ ID Nr:9:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 51 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:9:

TATTACTGTC AGCAGTATNN KNNKNNKNNK NNKACTTTCG GCGGAGGGAC C

(2) Information für SEQ ID Nr:10:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 75 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel

(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:10:

GATTTTGCAG TGTATTACTG TCAGCAGTAT NNKNNKNNKN NKNNKNNKAC TTTCGGCGGA GGGACCAAGG TGGAG

(2) Information für SEQ ID Nr:11:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 54 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:11:

TATTACTGTC AGCAGTATNN KNNKNNKNNK NNKNNKACTT TCGGCGGAGG GACC

(2) Information für SEQ ID Nr:12:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 75 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:12:

GATTTTGCAG TGTATTACTG TNNKNNKNNK NNKNNKNNKN NKNNKNNKNN KTTCGGCGGA GGGACCAAGG TGGAG

(2) Information für SEQ ID Nr:13:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 70 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:13:

GTTCCACCTT GGTCCCTTGG CCGAAMNNMN NMNNMNNMNN MNNMNNMNNA CAGTAGTACA CTGCAAAATC

(2) Information für SEQ ID Nr:14:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 76 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:14:

GTTCCACCTT GGTCCCTTGG CCGAAMNNMN NMNNMNNMNN MNNMNNMNNM NNMNNACAGT AGTACACTGC AAAATC

(2) Information für SEQ ID Nr:15:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 94 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:15:

GTTCCACCTT GGTCCCTTGG CCGAAMNNMN NMNNMNNMNN MNNMNNMNNM NNMNNNMNNMN NMNNMNNMNN MNNACAGTAG TACACTGCAA AATC

(2) Information für SEQ ID Nr:16:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 25 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:16:

TTCGGCCAAG GGACCAAGGT GGAAC

(2) Information für SEQ ID Nr:17:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 22 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:17:

GCAATTAACC CTCACTAAAG GG

(2) Information für SEQ ID Nr:18:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 24 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr.18:

TCTCGCACAG TAATACACGG CCGT

(2) Information für SEQ ID Nr:19:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 57 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr.19:

GCCGTGTATT ACTGTGCGAG ANNKNNKNNK GACNNKTGGG GCCAAGGGAC CACGGTC

(2) Information für SEQ ID Nr:20:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 21 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr.20:

TTGATATTCA CAAACGAATG G

(2) Information für SEQ ID Nr:21:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 72 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr.21:

GCCGTGTATT ACTGTGCGAG AGGTNNKNNK NNKNNKNNKN NKNNKGACNN KTGGGGCCAA GGGACCACGG TC

(2) Information für SEQ ID Nr:22:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 90 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:22:

GCCGTGTATT ACTGTGCGAG AGGTNNKNNK NNKNNKNNKN NKNNKNNKNN KNNKNNKNNK NNKGACNNKT GGGGCCAAGG GACCACGGTC

(2) Information für SEQ ID Nr:23:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 51 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein

(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:23:

GTGTATTATT GTGCGAGANN SNNSNNSNNS NNSTGGGGCC AAGGGACCAC G

(2) Information für SEQ ID Nr:24:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 66 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:24:

GTGTATTATT GTGCGAGANN SNNSNNSNNS NNSNNSNNSN NSNNSNNSTG GGGCCAAGGG ACCACG

(2) Information für SEQ ID Nr:25:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 84 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:25:

GTGTATTATT GTGCGAGANN SNNSNNSNNS NNSNNSNNSN NSNNSNNSNN SNNSNNSNNS NNSNNSTGGG GCCAAGGGAC CACG

(2) Information für SEQ ID Nr:26:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 17 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:26:

TATACTGTCA GCAGTAT

(2) Information für SEQ ID Nr:27:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 30 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:27:

GATTTTGCAG TGTATTACTG TCAGCAGTAT

(2) Information für SEQ ID Nr:28:

(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 27 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:28:

ACTTTCGGCG GAGGGACCAA GGTGGAG

(2) Information für SEQ ID Nr:29:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 18 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:29:

ACTTTCGGCG GAGGGACC

(2) Information für SEQ ID Nr:30:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 25 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:30:

GTTCCACCTT GGTCCCTTGG CCGAA

(2) Information für SEQ ID Nr:31:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 21 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: einzel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: cDNA
(iii) Hypothetisch: Nein
(iv) Anti-Sense: Nein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:31:

ACAGTAGTAC ACTGCAAAAT C

(2) Information für SEQ ID Nr:32:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:32:

Gly Trp Ser Arg Trp Ser Gly Leu Asp Trp

1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:33:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:33:

Ser Ser Thr Lys Ile Met Arg Leu Asp Thr

1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:34:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:34:

Gly Met Phe Arg Arg Gly Phe Tyr Asp Arg

1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:35:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 15 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:35:

Gly Val Arg Asn Asn Phe Gly Arg Trp His Trp Val Trp Asp Ser

1 5 10 15

(2) Information für SEQ ID Nr:36:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 16 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:36:

Gly Arg Ala Val Arg Gly Ser Arg Lys Arg Val Leu Gly Tyr Asp Arg

1 5 10 15

(2) Information für SEQ ID Nr:37:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 16 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein

(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:37:

Gly Arg Pro Gly Val Val Arg Arg Arg Ile Ala Pro Arg Met Asp Ile

1 5 10 15

(2) Information für SEQ ID Nr:38:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 16 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:38:

Gly Pro Lys Gly Val Phe Pro Arg Trp Gly Met Ala Ser Phe Asp Arg

1 5 10 15

(2) Information für SEQ ID Nr:39:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länger 16 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:39:

Gly Val Asn Leu Phe Arg Val Arg Asn Ser Arg Pro His Leu Asp Met

1 5 10 15

(2) Information für SEQ ID Nr:40:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:40:

Gly Leu Arg Gly Ser Arg Gly Phe Asp Arg

1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:41:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:41:

Gly Ser Trp Leu Arg Gly Pro Tyr Asp Met

1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:42:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure

(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:42:

Gly Thr Leu Gly Glu Gly Gly Tyr Asp Arg

1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:43:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 16 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:43:

Gly Trp Arg Ser Ser Arg Gly Val Val Trp Val Phe Ser Gly Asp Ala

1 5 10 15

(2) Information für SEQ ID Nr:44:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 16 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:44:

Gly Asp Trp Gly Trp Phe Thr Arg Val Ala Thr Trp Arg Pro Asp Val

1 5 10 15

(2) Information für SEQ ID Nr:45:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:45:

Gln Gln Tyr Leu Pro Gly Gly Arg Tyr Thr

1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:46:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 9 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:46:

Gln Gln Tyr Arg Val Glu Gly Gln Thr

1 5

(2) Information für SEQ ID Nr:47:
(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 8 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:47:

Gln Gln Tyr Gly Gly Ser Pro Trp

1 5

(2) Information für SEQ ID Nr:48:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 8 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:48:

Gln Gln Tyr Ser Arg His Arg Phe Thr

1 5

(2) Information für SEQ ID Nr:49:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:49:

Gln Gln Tyr Arg Tyr Pro Leu Ile Trp Thr

1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:50:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 19 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:50:

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Trp Thr

1 5

(2) Information für SEQ ID Nr:51:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 9 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:51:

Gln Gln Tyr Thr Arg Pro Gly Val Thr

1 5

(2) Information für SEQ ID Nr:52:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 9 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:52:

Gln Gln Tyr Ser Phe Lys Asn Trp Thr

1 5

(2) Information für SEQ ID Nr:53:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 9 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:53:

Gln Gln Tyr Gly Tyr Arg Lys Trp Thr

1 5

(2) Information für SEQ ID Nr:54:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:54:

Gln Gln Tyr Thr Pro Arg Arg Gly Ala Thr

1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:55:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:55:

Gln Gln Tyr Thr Pro Arg Val Gly His Thr

1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:56:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:56:

Gln Gln Tyr Lys Tyr Gly Arg Gly Met Thr

1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:57:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 9 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:57:

Gln Gln Tyr Gly Lys Lys Gln Trp Thr

1 5

(2) Information für SEQ ID Nr:58:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 9 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:58:

Gln Gln Tyr Val Arg Arg Ser Gly Thr

1 5

(2) Information für SEQ ID Nr:59:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:59:

Gln Gln Tyr Gly Lys Arg Ser Pro Val Thr

1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:60:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:60:

Gln Gln Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Leu Thr

1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:61:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 10 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein

(v) Fragmenttyp: internal
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:61:

Gln Gln Tyr Ser Arg Phe Val Ser Arg Thr
1 5 10

(2) Information für SEQ ID Nr:62:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 280 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(c) Strang: doppel
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: DANN (genomisch)
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:62:

GAGCTCACCC AGTCTCCATC CTCCCTGTCT GCATCTGTAG GAGACAGAGT
CACCATCACT TGCCGGGCAA GTCAGCGCAT TAGCAGCTAT TTAAATTGGT
ATCAGCAGGA ACCAGGGGAA GCCCCTAAGC TCCTGATCTA TGCTGCATCC
AGGTTTGCAA AGTGGGGTCC CATCAAGGTT CAGTGGCAGT GGATCTGGGA
CAGATTTCAC TCTCACCATC AGCAGTCTGC AACCTGAAGA TTTTGCAACT
TACTACTGTC AACAGAGTTA CAGTACCCCG

(2) Information für SEQ ID Nr:63:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 124 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:63:

Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
1 5 10 15

Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr Ala Met Thr Trp
20 25 30

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Pro Ser
35 40 45

Ala Asn Gly Asp Phe Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
50 55 60

Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Lys His Thr Leu Phe Leu Gln Met His
65 70 75 80

Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Gly
85 90 95

Arg Ile Leu Gly Val Val Leu Trp Tyr Ser Leu Tyr Tyr Gly Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

(2) Information für SEQ ID Nr:64:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 118 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:64:

```
Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
1               5                  10                  15

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Asn Ser His Asp Ile Asn
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile
        35                  40                  45

Thr Asn Arg Gly Thr Thr Ser Arg Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg
    50                  55                  60

Val Thr Met Thr Arg Asp Ala Ser Ile Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu
65                  70                  75                  80

Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly
                85                  90                  95

Ala Gly Ala Gly Gly Thr Trp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Thr Val Ile Val Ser Ser
        115
```

(2) Information für SEQ ID Nr:65:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 119 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:65:

```
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly His
            20                  25                  30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Ser Pro Asn Arg Gly Ala Thr Arg Phe Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Gly Leu Arg Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Thr Thr Arg Thr Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115
```

(2) Information für SEQ ID Nr:66:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 107 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:66:

```
Glu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1               5                  10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Ile Asn
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
        35                  40                  45

Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe
                85                  90                  95

Cys Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) Information für SEQ ID Nr.67:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 107 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr.67:

```
Glu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1               5                  10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Ser Tyr Ile Asn
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Glu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
        35                  40                  45

Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe
                85                  90                  95

Cys Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) Information für SEQ ID Nr.68:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 109 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:68:

```
Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Glu Gly
1               5                  10                  15

Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Ser Arg Tyr
            20                  25                  30

Ser Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Ser Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Gly Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Ser Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Cys Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) Information für SEQ ID Nr:69:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 109 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:69:
(2) Information für SEQ ID Nr:69:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 109 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:69:

```
Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Tyr
            20                  25                  30

Ile Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Thr Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Cys Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) Information für SEQ ID Nr:70:
(i) Sequenzeigenschaften:
(A) Länge: 110 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(ii) Molekültyp: Protein
(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr:70:

```
Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Gly Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Lys
            20                  25                  30

Tyr Ile Asn Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
                85                  90                  95

Trp Thr Phe Cys Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105                 110
```

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zur Herstellung einer universellen leichten Kette zur Verwendung in einer Antikörperverbindungsstelle in einem Polypeptid, wobei das Verfahren die Mutagenese einer komplementbestimmenden Region (CDR, complementarity determining region) eines Gens der leichten Immunglobulinkette umfasst, das die in SEQ ID NO: 62 gezeigte Sequenz umfasst, durch das Amplifizieren eines CDR-Anteils des Immunglobulingens durch Polymerase – Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) unter Verwendung eines PCR-Primen Oligonukleotids, wobei besagtes Oligonukleotid 3'- und 5'-Termini aufweist und dieses:
a) eine Nukleotidsequenz an besagtem 3'-Terminus, die in der Lage ist, an eine erste Gerüstregion eines Immunglobulingens zu hybridisieren;
b) eine Nukleotidsequenz an besagtem 5'-Terminus, die in der Lage ist, an eine zweite Gerüstregion eines Immunglobulingens zu hybridisieren; und
c) eine Nukleotidsequenz zwischen besagten 3'- und 5'-Termini gemäß der Formel:

$[NNK]_n$,

worin N unabhängig von den anderen jegliches Nukleotid sein kann, K ist G oder T, und n ist 3 bis ungefähr 24, wobei besagte 3'- und 5'- terminale Nukleotidsequenzen eine Länge von ungefähr 6 bis 50 Nukleotide aufweisen oder ein Oligonukleotid mit einer dazu komplementären Sequenz aufweist, umfasst.

2. Das Verfahren von Anspruch 1, worin besagter 5'-Terminus die Nukleotidsequenz 5'-TATACTGTCAGCAGTAT-3' (SEQ ID NR: 26) oder 5'-GATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTAT-3 (SEQ ID NR: 27) oder ein Oligonukleotid mit einer dazu komplementären Sequenz aufweist.

3. Das Verfahren von Anspruch 1, worin besagter 3'-Terminus die Nukleotidsequenz 5'-ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG-3' (SEQ ID NR: 28) oder 5'-ACTTTCGGCGGAGGGACC-3' (SEQ ID NR: 29) oder

ein Oligonukleotid mit einer dazu komplementären Sequenz aufweist.

4. Das Verfahren von Anspruch 1, worin n 4, 5, 6, 10 oder 16 ist.

5. Das Verfahren von Anspruch 1, worin besagtes Immunglobulin menschlich ist.

6. Das Verfahren von Anspruch 1, worin besagtes CDR CDR3 ist.

7. Das Verfahren von Anspruch 1, worin besagtes Oligonukleotid die Formel: 5'-GATTTTGCAGTGTAT-TACTGT$[NNK]_{10}$TTCGCCGGAGGGACCAAGGTGGAG-3' (SEQ ID NR: 12) oder ein Oligonukleotid mit einer dazu komplementären Sequenz aufweist.

8. Das Verfahren von Anspruch 1, das zusätzlich die Schritte:
a) des Isolierens der amplifizierten CDR zur Ausbildung einer Bibliothek von Genen mutagenisierter leichter Immunglobulinketten;
b) des Exprimierens der isolierten Bibliothek von Genen mutagenisierter leichter Ketten in Kombination mit einem oder mehreren Genen einer schweren Kette, um eine kombinatorische Antikörperbibliothek exprimierter schwerer und leichter Kettengene auszubilden; und
c) des Selektierens der Spezies aus der besagten kombinatorischen Antikörperbibliothek auf die Fähigkeit hin, ein ausgewähltes Antigen zu binden, umfasst.

9. Das Verfahren von Anspruch 8, worin besagtes eines oder mehrere Gene der schweren Immunglobulinkette eine Bibliothek von Genen der schweren Kette ist.

10. Das Verfahren von Anspruch 1, worin besagter 5'-Terminus die Nukleotidsequenz 5'-GTTC-CACCTTGGTCCCTTGGCCGAA-3' (SEQ ID NR: 30) oder ein Oligonukleotid mit einer dazu komplementären Sequenz aufweist.

11. Das Verfahren von Anspruch 1, worin besagter 3'-Terminus die Nukleotidsequenz 5'-ACAGTAGTA-CACTGCAAAATC-3' (SEQ ID NR: 31) oder ein Oligonukleotid mit einer dazu komplementären Sequenz aufweist.

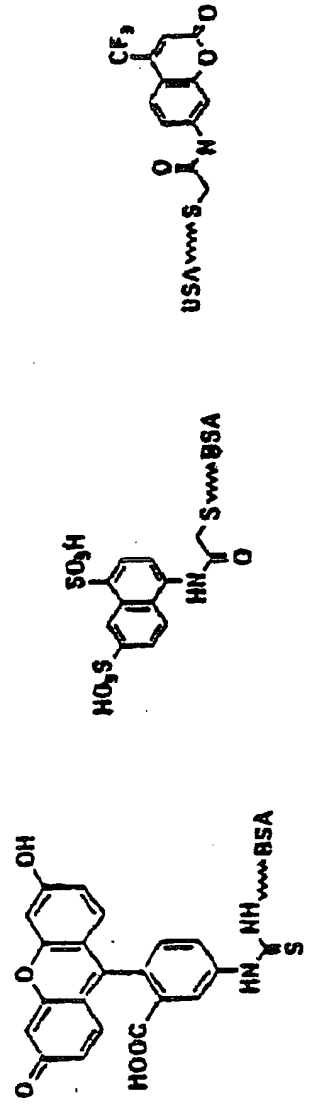
12. Das Verfahren von Anspruch 1, worin n 8, 10 oder 16 ist.

13. Ein Verfahren zur Herstellung eines heterodimären Immunglobulinmoleküls mit Polypeptiden der variablen Immunglobulindomäne von schweren und leichten Ketten umfassend die Schritte:
a) des Kombinierens eines Gens einer leichten Immunglobulinkette mit variabler Domäne, die eine Sequenz mit den Sequenzeigenschaften der in SEQ ID NR: 62 gezeigten leichten Kette umfasst, mit einem oder mehreren Genen der schweren Immunglobulinketten mit variabler Domäne, um eine kombinatorische Genbibliothek von schweren und leichten Immunglobulinketten auszubilden, wobei besagtes Kombinieren das operative Verbinden besagten Gens der leichten Kette mit einem der besagten Gene der schweren Kette in einem Vektor umfasst, der in der Lage ist, besagte Gene der schweren und leichten Kette zu koexprimieren;
b) der Expression der kombinatorischen Genbibliothek, um eine kombinatorische Antikörperbibliothek exprimierter Polypeptide der schweren und leichten Kette auszubilden; und
c) des Auswählens von Spezies besagter kombinatorischer Antikörperbibliothek auf die Fähigkeit hin, ein ausgewähltes Antigen zu binden.

14. Das Verfahren von Anspruch 13, worin besagtes eines oder mehrere Gene der schweren Immunglobulinkette eine Bibliothek von Genen der schweren Kette ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

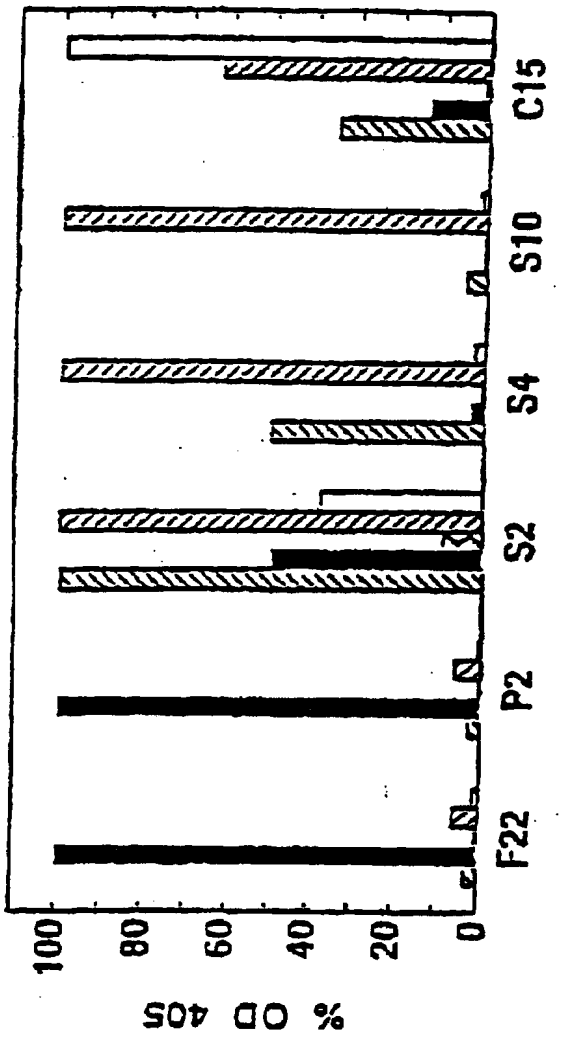


1 = F1-BSA

2 = S-BSA

3 = C-BSA

FIGUR 1



FIGUR 2