

Intrakörper mit definierter struktur
("framework"), die in einer reduzierenden
umgebung stabil ist, und ihre verwendungen:

(Quelle:

<https://www.google.com/patents/DE60012980T2?cl=de>)

DE 60012980 T2:

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001]

Die vorliegende Erfindung betrifft
Einzelkettenfusionen von variablen Regionen
der schweren und leichten Ketten von
Antikörpern (scFv) und insbesondere solche
scFv mit einem definierten, stabilen
Strukturgerüst, welche innerhalb einer Zelle

(Intrakörper) exprimiert werden.

Stand der Technik

[0002]

Antikörper sind aufgrund ihrer hohen Affinität und Spezifität für ein Antigen und aufgrund ihrer relativ hohen in vitro und in vivo Stabilität bevorzugte Hilfsmittel der biochemischen und molekularbiologischen Forschung, der Diagnostik und für medizinische Anwendungen.

Antikörper bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, welche die variablen Regionen an ihren N-Termini aufweisen und welche über Disulfidbrücken verbunden sind.

Einzelkettenantikörper wurden durch Verknüpfung von Fragmenten der variablen Regionen der schweren und der leichten Ketten (scFv) hergestellt. Jede variable Domäne enthält drei Komplementarität-bestimmende Regionen (CDR), welche in ein Strukturgerüst

eingebettet sind. Diese CDRs sind für die Interaktion mit dem Antigen verantwortlich. Jede variable Region der schweren und leichten Kette enthält eine intradomänen Disulfidbrücke, welche gemäss Berichten für die Stabilität des Einzelkettenantikörpers wesentlich ist (Biocca et al., 1995; Derman et al., 1993). Das am häufigsten verwendete Verfahren zur Identifikation von Einzelkettenantikörpern, welche spezifische Epitope binden, ist das Phagendisplay und Variationen davon (für eine Übersicht siehe Hoogenbaom et al., 1958). Dieses Screening Verfahren bietet wesentliche Vorteile gegenüber konventionellen Verfahren wie Immunisierung oder Hybridomaverfahren, nämlich, dass es in der Lage ist monoklonale Einzelkettenantikörper innerhalb einer relative kurzen Zeit zu identifizieren.

[0003]

Einzelkettenantikörper, welche innerhalb einer Zelle exprimiert werden (z.B. Zytoplasma oder Nukleus) werden als Intrakörper bezeichnet. Wegen des reduzierenden Umfelds innerhalb der Zelle, werden Disulfidbrücken, welche als wesentlich für die Stabilität der Antikörper betrachtet werden, nicht ausgebildet. Daher wurde zuerst gedacht, dass Antikörperanwendungen nicht geeignet sind.

Aber es wurden verschiedene Fälle beschrieben, in welchen die Machbarkeit von Intrakörpern gezeigt wurde (Beerli et al., 1994; Biocca et al., 1994; Duan et al., 1994; Gargano und Cattaneo, 1997; Greenman et al., 1995; Martineau et al., 1998; Mhashiklar et al., 1995; Tavaladoraki et al., 1993). In diesen Fällen funktionieren Intrakörper durch z.B. blockieren des cytoplasmatischen Antigens und führen dadurch zur Hemmung seiner biologischen Aktivität.

[0004]

Bis heute stammen die Intrakörper meistens von monoklonalen Antikörpern ab, welche zuerst mittels klassischer Verfahren selektioniert wurden (z.B. Phagendisplay) und darauf auf ihre biologische Aktivität innerhalb der Zelle getestet wurden (Visintin et al., 1999). Obwohl erfolgreiche Intrakörper beschrieben sind (siehe oben), ist es bis heute absolut unvorhersehbar, ob ein solcher Intrakörper innerhalb der Zelle funktional ist (für eine Übersicht siehe Cattaneo, 1998; Cattaneo und Biocca, 1999). Die Gründe dafür liegen am wahrscheinlichsten in den unterschiedlichen Umgebungen: Phagendisplay und andere klassische Verfahren werden unter oxidierenden Verhältnissen durchgeführt und Disulfidbrücken werden daher ausgebildet, wohingegen Intrakörper unter reduzierenden Bedingungen funktionieren müssen. Dieses reduzierende Umfeld kann zu einer ungenügenden Löslichkeit des Intrakörpers

führen und daher bilden diese nicht-funktionale Aggregate. Die Löslichkeit eines Intrakörpers kann entweder durch Änderungen im Strukturgerüst (Knappik und Plückthun, 1995) oder in den CDRs (Kipriyanov et al., 1997; Ulrich et al., 1995) modifiziert werden.

[0005]

Die bisher bekannten Systeme sind jedoch hinsichtlich ihrer Anwendung zum Nachweis von intrazellulären Targets beschränkt. Daher besteht eine wachsende Nachfrage nach einer verlässlichen Technologie und einem System zur direkten Identifizierung von Intrakörpern, welche für ein Antigen spezifisch sind.

[0006]

In WO 99/36569 beschreiben Wittrup et al., ein Verfahren zur Darstellung von Proteinen und scFv an der Zellwand von Hefen unter

Verwendung eines hefeendogenen von Aga2p abstammenden Proteinfragments zur Lokalisation an der Zellwand. Protein und scFv Bibliotheken können durchsiebt werden, um interagierende Proteine zu identifizieren. Andere verwandte Systeme werden in BP 0 407 259 (Boquet et al., 1991) beschrieben. Diese Systeme sind dem Phagendisplay ähnlich, bei welchem die Protein oder Peptid Bibliotheken auch an der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese Verfahren können jedoch nicht für intrazelluläre Screenings verwendet werden, um Intrakörper zu identifizieren.

[0007]

Das Patentedokument JP 11000174 (Kyoko et al., 1999) beschreibt die Verwendung der Hefe *Pichia pastoris* zur Expression und Sekretion grosser Mengen von Fab Antikörperfragmenten. Diese Hefe ist berühmt für ihr hohes Sekretionsvermögen und wird daher bevorzugt für diese Anwendung gebraucht. Der sekretierte Antikörper kann durch Reinigung des

Überstandes geerntet werden. In EP 0 590 067, WO 92/22324, JP 060 30 778 , US 569 8435 , US 559 5889 , JP 10323879 wird ausserdem Hefe zur Produktion von sekretierten Proteinen oder Antikörpern verwendet. EP 0 698 097 und WO 94125591 offenbaren die Anwendung der Produktion und Sekretion von bloss der schweren Kette oder deren Fragmente für weitere Anwendungen. JP 0 902 0798 ; JP 051 05700 und JP 050 97704 beschreiben Verfahren der Hefeseekretion, um einen Hepatitisimpfstoff zu erhalten, wenn dieser Menschen oder generell an Organismen verabreicht wird.

[0008]

Aus WO 99/28502 ist bereits bekannt, Hefen für das Screening von Einzelkettenantikörpern zu verwenden. Diese Anmeldung offenbart die Verwendung einer DNA Konstruktebibliothek für

ein Einzelketten-Fusionsreagens eines monoklonalen Antikörpers. Diese scFv Bibliothek (darin als sFv Bibliothek bezeichnet) wird daraufhin für Screenings verwendet. Indes wurde gefunden, dass die Stabilität und Löslichkeit von Intrakörpern durch die Verwendung eines nicht spezifizierten Strukturgerüsts dramatisch variieren kann. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass es eine direkte Korrelation zwischen dem in vivo Verhalten und der in vitro Stabilität und Solubilität gibt. Daher ist die Verwendung von Bibliotheken von unterschiedlichen scFv Fragmenten, welche sich von mRNA ableiten, im Hinblick auf die Möglichkeit zur Identifizierung von CDR, welche eine hohe Affinität für das Antigen aufweisen, beschränkt, weil das entsprechende Strukturgerüst nicht genügend löslich ist und daher aggregiert und es somit unmöglich ist, diesen monoklonalen scFv zu selektionieren, obwohl die CDRs im Prinzip die notwendige hohe Affinität für das

Antigen aufweisen. Daher besteht immer noch eine Nachfrage nach verbesserten Antikörpern bzw. Intrakörpern.

[0009]

Die Publikation von Martineau P. et al., (J. Mol. Biol (1998) 280, 117–127) beschreibt ein System der genetischen Selektion für gefaltete und funktionale Antikörperfragmente in E. coli. Dieses System basiert auf den AMEF Mutanten des Enzyms β -Galaktosidase, welche inaktiv sind, aber bei Inkubation mit Antikörpern, welche gegen die Wildtyp β -Galaktosidase gerichtet sind, katalytisch sind. Die Autoren haben aus einer Phagenbibliothek Einzelkettenantikörper (scFv) gegen β -Galaktosidase isoliert und diese scFvs für ihre intrazelluläre Aktivität in Bakterien getestet.

[0010]

Antje Pörtner-Taliana et al., (Journal of Immunological Methods 238 (2000), 161–172) offenbaren die Verwendung des Two-Hybrid

Systems zur in vivo Selektion von Einzelkettenantikörpern in Hefe. Die Ausführbarkeit des Systems wird anhand eines Screens einer scFv Bibliothek, welche in einen Hefe Two-Hybrid Vektor kloniert ist, für Moleküle, welche sich gegen den Köder ATF-2 richten, ein Mitglied der CREB/ATF Familie der Transkriptionsfaktoren, gezeigt. Das System basiert auf der spezifischen Interaktion eines scFv mit seinem Antigen.

[0011]

Die zunehmenden Anwendungen von scFv, welche gegen intrazelluläre Ziele gerichtet sind, erhöhen die Nachfrage nach verlässlichen Verfahren zum Screening von Intrakörpern. Cytoplasmatische Ziele der scFv sind aufgrund der Instabilität der scFv unter reduzierenden Bedingungen und der Unvorhersagbarkeit der Intrakörperstabilität die anspruchvollsten

Anwendungen. Dieses Stabilitäts- und Löslichkeitsproblem kann durch den Gebrauch von definierten Strukturgerüsten, welche für die intrazelluläre Anwendung optimiert wurden, gelöst werden.

Offenbarung der Erfindung

[0012]

Ein Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist daher ein Verfahren zur Isolation von scFv oder Intrakörpern mit definiertem Strukturgerüst, welches unter reduzierenden Bedingungen stabil und löslich ist, zur Verfügung zu stellen.

[0013]

In einer ersten Ausführungsform umfasst das Verfahren zur Identifikation von Intrakörperstrukturgerüsten oder Intrakörpern die folgenden Schritte:

geeignete Wirtszellen werden mit einer Bibliothek transformiert, wobei diese Bibliothek ein Fusionsprodukt eines Intrakörpers mit einem

Markerprotein ist, wobei das Markerprotein nur aktiv ist als Teil eines Fusionsproteins, welches für einen löslichen und stabilen Intrakörperteil kodiert, danach werden die Zellen unter Bedingungen kultiviert, welche die Identifikation und Selektion von Zellen, welche ein lösliches und stabiles Intrakörper Strukturgerüst exprimieren, mittels Nachweis des Markerproteins (Aktivität) erlauben.

[0014]

Das Markerprotein weist bevorzugt eine selektierbare Aktivität, insbesondere eine enzymatische Aktivität oder Fluoreszenz Aktivität, auf.

[0015]

Eine weitere Ausführungsform des Verfahrens zur Identifikation von Intrakörpern oder Intrakörper Strukturgerüsten umfasst die folgenden Schritte:

Transformation von geeigneten Wirtszellen mit einer Bibliothek, welche ein Fusionsprodukt

einer Intrakörper Bibliothek und eines DNA-bindenden Proteins, welches Transkription aktivieren kann, ist, und einem Markersystem, wobei dieses Markersystem unter transkriptioneller Kontrolle des DNA-bindenden Proteins ist, und

Kultivierung dieser Zellen unter Bedingungen, welche die Identifikation und Selektion von Zellen, welche einen löslichen und stabilen Intrakörper exprimieren, mittels Nachweis des Readouts des Markersystems erlauben.

[0016]

In einer anderen Ausführungsform umfasst das Verfahren zur Identifikation von Intrakörper Strukturgerüsten oder Intrakörpern die folgenden Schritte:

geeignete Wirtszellen werden mit einer Bibliothek transformiert, welche für Proteine, die

einen Intrakörper und einen Teil eines Transaktivierungssystems umfassen, kodiert, und diese Zellen exprimieren zusätzlich ein zweites Protein, welches mindestens den zweiten Teil des Transaktivierungssystems umfasst, wobei dieses Transaktivierungssystem mit einem Marker verbunden ist, welcher das Überleben der Zellen ermöglicht, und diese Zellen überleben unter selektiven Bedingungen nur beim Vorhandensein einer Interaktion zwischen diesen zwei Proteinen über eine konstante Region des durch die Bibliothek kodierten Proteins.

[0017]

Die durch die Bibliothek kodierten Proteine umfassen bevorzugt eine Transkriptionsaktivierungsdomäne und die zweiten Proteine umfassen eine DNA-bindende Domäne oder die durch die Bibliothek kodierten Proteine umfassen eine DNA-bindende Domäne und die zweiten Proteine umfassen eine Transkriptionsaktivierungsdomäne.

[0018]

In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die zweiten Proteine eine DNA-bindende Domäne bzw. eine Transkriptionsaktivierungsdomäne und ein Protein, welches mit der konstanten Region des ersten durch die Bibliothek kodierten Proteins interagiert.

[0019]

In einer bevorzugteren Ausführungsform kodiert die Bibliothek für ein Protein, welches die Transkriptionsaktivierungsdomäne von GAL4 und Gal11P umfasst, und das zweite Protein umfasst die DNA-bindende Domäne von GAL4.

[0020]

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren, um einen scFv mit definiertem Strukturgerüst, welches in einer reduzierenden Umgebung stabil und löslich ist, zu erhalten, welches folgende Schritte umfasst:

- a. Isolation eines scFv gemäss einem Verfahren des ersten Gegenstandes der vorliegenden Erfindung,
- b. Bildung einer scFv Bibliothek mit unterschiedlichen Strukturgerüsten und konstanten CDRs mittels Einführung von Mutationen in mindestens eine DNA Sequenz des scFvs des Schritts a), und mittels Einführung dieser Mutationen in geeignete Expressionsvektoren,
- c. Transformation von Wirtszellen, welche in der Lage sind ein spezifisches bekanntes Antigen zu exprimieren, und welche nur beim Vorhandensein einer scFv-Antigen Interaktion mit dieser scFv Bibliothek überleben,
- d. die so transformierten Zellen werden unter Bedingungen kultiviert, welche zur Expression des Antigens und des scFV geeignet sind und ein Überleben der Zellen nur beim Vorhandensein einer Antigen-scFv

Interaktion ermöglichen,
e. der scFv, welcher in überlebenden Zellen
exprimiert wird und ein definiertes
Strukturgerüst aufweist, das unter
reduzierenden Bedingungen stabil und löslich
ist, wird identifiziert.

[0021]

Dieselben Verfahren können auch zum
Screening einer scFv Bibliothek für die
Identifikation von löslichen und stabilen
Strukturgerüsten angewendet werden, welche
z.B. als Ausgangsmaterialien für einen scFv
oder eine CDR Bibliothek verwendet werden
können.

[0022]

Die Intrakörper der vorliegenden Erfindung
können ausserdem als Mittel in der Therapie,
Diagnose oder Prävention von Krankheiten und
verschiedenen Anwendungen in Pflanzen wie

einem funktionalen „knock out“ einer spezifischen Proteinaktivität verwendet werden.

Die Intrakörper können als solche oder als DNA, welche für die scFv kodiert, verwendet werden.

[0023]

Im Rahmen des vorliegenden Textes werden die beiden Begriffe scFv und Intrakörper weitgehend als Synonyme verwendet, es ist jedoch zu beachten, dass während die Stabilität und Löslichkeit der Intrakörper (scFv) der vorliegenden Erfindung mit definiertem Strukturgerüst unter reduzierenden Bedingungen z.B. innerhalb einer Zelle, für die vorliegende Erfindung notwendig ist, die Anwendung dieser Intrakörper (scFv) etc. nicht auf Anwendungen innerhalb der Zelle eingeschränkt ist.

[0024]

Indem nur Aminosäureänderungen innerhalb der CDRs eingeführt werden, erhöht ein

Strukturgerüst gemäss der vorliegenden Erfindung, die Möglichkeit monoklonale Antikörper zu identifizieren, welche die gewünschte biologische Funktion der spezifischen Antigenerkennung zeigen, in einem ausserordentlichen Mass. Solche Änderungen in den CDRs der scFv können als zufällige Änderungen durchgeführt werden, welche das definierte Strukturgerüst, das für die cytoplasmatische Anwendung der Intrakörper geeignet ist, nicht ändern.

[0025]

Um Screenings von monoklonalen Einzelkettenantikörpern innerhalb der Zelle durchzuführen, muss man ein Strukturgerüst verwenden, welches an die Redoxumgebung des Zytoplasmas angepasst ist, Daher muss ein Strukturgerüst selbst bei Abwesenheit von Disulfidbrücken stabil und genügend löslich

sein. Für die meisten scFv ist jedoch bekannt, dass sie unter reduzierenden Bedingungen oder in Abwesenheit von Cystein, welches für die Bildung von Intradomänendisulfidbrücken verantwortlich ist, sich nicht in die richtig Struktur falten. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Erfindung verschiedene Strukturgerüste, welche identische CDRs aufweisen, verglichen und es wurden dramatische Unterschiede in ihrem in vivo Verhalten festgestellt. Mittels des erfinderischen Verfahrens kann das Strukturgerüst mit der besten Leistung, welches die definierten CDRs für die Antigenerkennung aufweist, selektioniert werden. Dieses Verfahren wird unter Verwendung eines Intrakörpers gegen ein bekanntes Antigen als Ausgangsmaterial durchgeführt. Der Linker, der zur Verbindung der variablen Regionen der schweren und leichten Kette verwendet wird, ist nicht kritisch. Er muss jedoch eine ausreichende Löslichkeit und Flexibilität verschaffen, um einen

angemessenen Kontakt und Faltung für die Interaktion zwischen den CDRs und dem Antigen sicherzustellen. Geeignete Linker haben eine typische Länge von ungefähr 5–60 Aminosäuren, gewöhnlich eine reguläre Abfolge von Glycin und von 1 bis 3 Serin, um die Löslichkeit zu erhöhen.

[0026]

Solch ein Verfahren zur Isolation eines scFv mit einem definierten Strukturgerüst, welches unter reduzierenden Bedingungen stabil und löslich ist, ist durch die folgenden Schritte definiert:

- a. eine scFv Bibliothek mit verschiedenen Strukturgerüsten und konstanten CDRs wird durch Mutation von mindestens einer DNA Sequenz eines scFv gegen ein bekanntes Antigen, welche für ein Strukturgerüst kodiert,

und durch Einführen dieser Mutationen in einen geeigneten Expressionsvektor gebildet,

b. Wirtszellen, die in der Lage sind ein spezifisches, bekanntes Antigen zu exprimieren und nur bei Anwesenheit einer Antigen-scFv Interaktion überleben, werden mit der scFv Bibliothek transformiert,

c. die derart transformierten Wirtszellen werden unter Bedingungen kultiviert, welche für die Expression des Antigens und des scFv geeignet sind und ein Überleben der Zellen nur bei Anwesenheit einer Antigen-scFv Interaktion erlauben,

d. der scFv, der in überlebenden Zellen exprimiert wird und ein definiertes Strukturgerüst, welches stabil und löslich ist unter reduzierenden Bedingungen, aufweist, wird isoliert.

[0027]

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Wirtszelle eine eukaryotische Zelle, insbesondere eine Hefezelle.

[0028]

Mittels des oben beschriebenen Verfahrens kann ein scFv mit einem definierten Strukturgerüst erhalten werden. Solch ein Strukturgerüst kann modifiziert werden, um spezifische Restriktionsstellen zu umfassen, welche das selektive Auswechseln von mindestens einer CDR erlauben. Bevorzugt befinden sich die Restriktionsstellen innerhalb des Strukturgerüsts, welches an die CDR angrenzt.

[0029]

Weiterhin wird ein Verfahren zur Herstellung einer DNA, welche für einen scFv mit einem Strukturgerüst, das für selektive Auswechslungen in der CDR Region geeignet ist, kodiert, beschrieben, wobei spezifische Restriktionsstellen in die Sequenz einer DNA,

welche für einen definierten, stabilen und löslichen scFv kodiert, mittels ortsspezifischer Mutagenese eingeführt werden, wobei diese Restriktionsstellen bevorzugt innerhalb des Strukturgerüsts liegen und wobei die Substitution der Nukleotide, um die Restriktionsstelle zu bilden, die Aminosäuresequenz nicht beeinflusst.

[0030]

Ein verbesserter scFv mit definiertem Strukturgerüst, welches unter reduzierenden Bedingungen stabil und löslich ist, kann auch mittels eines Verfahrens erhalten werden, wobei mindestens zwei Variationen von mindestens zwei unterschiedlichen Strukturgerüsten, welche unter reduzierenden Bedingungen stabil und löslich sind, bevorzugt Strukturgerüsten der vorliegenden Erfindung, kombiniert werden, um einen scFv mit definiertem Strukturgerüst zu ergeben.

[0031]

In einem solchen Strukturgerüst ist bevorzugt, dass mindestens eine der Variationen der CDR1 der variablen leichten Kette vorangeht und/oder mindestens eine der Variationen sich zwischen der CDR2 und der CDR3 der variablen schweren Kette befindet.

[0032]

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst der scFv mindestens zwei Variationen, welche der CDR1 der variablen leichten Kette vorangehen, und mindestens 2, bevorzugt mindestens 4 Variationen, welche sich zwischen der CDR2 und der CDR3 der variablen schweren Kette befinden, insbesondere ein scFv, welcher das Strukturgerüst, welches in der Seq. Id. Nr. 1 definiert ist, umfasst.

[0033]

Für ein zufälliges, spezifisches Auswechseln der CDRs in einem solchen Strukturgerüst können stille Änderungen, welche noch für die gleiche Aminosäuresequenzen kodieren aber andere Kodons verwenden, eingeführt werden, welche zur Bildung einmaliger Restriktionsstellen führen (siehe auch oben). Während die Restriktionsstellen irgendwo in der CDR/Strukturgerüstverbindungsregion liegen können, ist es bevorzugt, wenn diese im Strukturgerüst, welches jeder individuellen CDR angrenzt, liegen. Dadurch kann jede individuelle CDR mittels Einführen von zufälligen oder definierter Sequenzen ersetzt werden. Dies erlaubt die Selektion von neuen CDR im Intrakörper, welche eine hohe Affinität zum Antigen zeigen.

[0034]

Falls zusätzliche Sequenzen wie Lokalisationssignale oder Aktivierungsdomänen, in ein nicht definiertes Strukturgerüst eingeführt werden, welches aus

einer scFv Bibliothek stammt, ist es möglich, dass durch diese Modifikationen die biologische Aktivität – welche bis anhin vorhanden war – verloren geht z.B. der scFv wird unlöslich. Daher ist es von Vorteil, ein Strukturgerüst der vorliegenden Erfindung gegen ein bekanntes Antigen zu verwenden, und danach solche Modifikationen an verschiedenen Stellen in den Intrakörper einzuführen (N- und C-terminal oder innerhalb der kodierenden Sequenz des scFv) und für den Erhalt der ursprünglichen Funktion zu selektionieren. WO 99/28502 beschreibt verschiedene Möglichkeiten, um ein Lokalisierungssignal einzuführen. Die Aktivierungsdomäne, welche für Interaktionsscreenings mit einem Antigen verwendet wird, ist in WO 99/98502 beschrieben und wird am C- Terminus der scFv Bibliothek eingeführt. Es wurde nun gefunden, dass mittels des Verfahrens der vorliegenden Erfindung auch Strukturgerüste selektioniert werden können, welche zusätzliche Sequenzen

an verschiedenen Stellen akzeptieren z.B. die Aktivierungsdomäne am N-Terminus, welche sich hinsichtlich ihrer antagonistischen Funktion ähnlich verhalten wie ihre scFv Gegenstücke, die keine Aktivierungsdomäne aufweisen. Daher führt das N-terminale Einführen der Aktivierungsdomäne z.B. in ein Strukturgerüst, welches in den folgenden Beispielen beschrieben wird, nicht zu einer Verschlechterung der Antikörperfunktion.

[0035]

Ausgehend von einem Intrakörper der vorliegenden Erfindung mit einem definierten Strukturgerüst, welches unter reduzierenden Bedingungen stabil und löslich ist, können scFv bzw. Intrakörper enthaltende CDR Bibliotheken hergestellt werden.

[0036]

Ein geeignetes Verfahren zur Bildung einer CDR Bibliothek mit einem definierten Strukturgerüst, welches unter reduzierenden Bedingungen stabil und löslich ist, ist ein Verfahren, bei welchem DNA Sequenzen, welche einen scFv der vorliegenden Erfindung kodieren, verdaut werden, um mindestens eine CDR Sequenz durch eine modifizierte CDR zu ersetzen. Bevorzugt wird die modifizierte CDR durch zufällige Änderungen gebildet. Mittels dieses

[0037]

Verfahrens kann eine Bibliothek von Intrakörpern mit einem definierten Strukturgerüst, das unter reduzierenden Bedingungen stabil und löslich ist, und welche mindestens eine zufällige geänderte CDR aufweisen, gebildet werden.

[0038]

Die Intrakörper der vorliegenden Erfindung, welche CDR Bibliotheken enthalten, können

zum Screening und der Selektion von Klonen, die eine hohe Affinität zu einem Antigen aufweisen, verwendet werden. Solch ein Verfahren zum Screening für CDRs, die mit einem spezifischen Antigen interagieren, umfasst Wirtszellen, die mit einer Nukleinsäuresequenz, insbesondere mit einer DNA Sequenz, welche ein bekanntes Antigen kodiert, transformiert sind, und welche weiter transformiert sind mit einer zufälligen CDR Bibliothek mit einem definierten Strukturgerüst, welches unter reduzierenden Bedingungen stabil und löslich ist, wobei das Antigen und/oder der scFv mit einem Markersystem oder einem Teil des Markersystems verbunden sind, so dass, die Zellen bei Kultivierung unter selektiven Bedingungen nur bei Anwesenheit einer Antigen/scFv Interaktion überleben, dass die derart transformierten Zellen unter selektiven Bedingungen kultiviert werden und dass die überlebenden Zellen gezüchtet und die Intrakörper geerntet werden.

[0039]

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich beim Strukturgerüst um ein Strukturgerüst der vorliegenden Erfindung und die Zelle ist eine eukaryotische Zelle, insbesondere eine Hefezelle.

[0040]

In einer sehr bevorzugten Ausführungsform kodieren sowohl die DNA Sequenz, welche das Antigen kodiert, als auch die DNA Sequenz, die den scFv kodiert, ein chimäres Molekül mit dem Antigen bzw. dem scFv, und beide sind mit einem Teil eines Transkriptionsaktivierungssystems verbunden, welches mit einem Macker, der das Überleben ermöglicht, verbunden sind, bevorzugter ist das Antigen mit einer DNA bindenden Domäne fusioniert und der scFv ist mit einer Transkriptionsaktivierungsdomäne fusioniert

oder das Antigen ist mit einer Transkriptionsaktivierungsdomäne fusioniert und der scFv ist mit einer DNA bindenden Domäne fusioniert.

[0041]

Die Intrakörper, welche CDR Bibliotheken enthalten, können zum Screening und der Selektion von Klonen, die eine hohe Affinität zu einem Antigen aufweisen, verwendet werden.

Dies kann entweder durch Blockierung des intrazellulär lokalisierten Antigens in seiner biologischen Funktion erreicht werden oder mittels Prüfung für eine direkte Interaktion der CDRs, welche in das definierte Strukturgerüst eingebettet sind, mit dem Antigen. Direkte

Interaktion kann bevorzugt mittels eines transkriptionellen Read-out überwacht werden, bevorzugt mittels Expression des HIS3 Gens.

Die Zugabe von 3-Aminotriazol (3AT) zum Medium erlaubt die Selektion von CDRs mit einer höheren Affinität zum Antigen unter diesen vorbestimmten Bedingungen.

Wirtszellen, welche ein spezifisches, bekanntes

Antigen exprimieren können, überleben unter diesen Bedingungen nur in Anwesenheit einer Antigen-scFv-Interaktion, bevorzugt bei Anwesenheit einer ausreichend starken Antigen-scFv-Interaktion. Der Ausdruck ausreichend starke Antigen-scFv-Interaktion wie er hierin benützt wird, ist definiert als Protein-Protein Interaktion, welche einen mittels BIAcore gemessenen KD aufweist, welcher $> 1 \times 10^{-6}$ M ist, bevorzugt ein KD $> 1 \times 10^{-8}$ und noch bevorzugter ein KD $> 1 \times 10^{-10}$ M. Solch ein Selektionsschritt kann weiter angewendet werden, um mittels selektiver Änderungen der Aminosäuren in den CDR (bevorzugt CDR1 und CDR2 der leichten und schweren Kette) eine Affinitätsreifung durchzuführen und darauffolgender Selektion aus diesem Pool für Wachstum auf erhöhten 3AT Konzentrationen.

[0042]

Wie bereits oben erwähnt wurde, stammen die bisher bekannten und verwendeten scFv Bibliotheken aus der Isolation von mRNA, bevorzugt aus der Milz, von welcher bekannt ist, dass sie eine hohe Akkumulation von B Zellen aufweist und daher werden ungeordnete Antikörper exprimiert. Solch eine Bibliothek hat den Nachteil, dass sie vorselektioniert wurde (positive und negative Selektion), damit sie nicht mit Epitopen reagiert, welche im Organismus vorhanden sind. Dies garantiert, dass nur Antikörper, welche keine Autoimmunreaktion auslösen, reifen können und aktiviert werden. Aufgrund dieses Selektionsschritts sind jedoch nicht alle möglichen Aminosäurekombinationen in einer solchen „natürlichen“ scFv Bibliothek vorhanden. Für verschiedene in vitro und diagnostische Anwendungen werden Antikörper benötigt, welche mit Proteinen interagieren, welche zwischen den Arten konserviert sind. Aufgrund des Vorselektionsschrittes könnte es

schwierig sein in solch einer „natürlichen“ Bibliothek einen manoklonalen Antikörper gegen solche Proteine oder Peptide zu finden, der eine starke Interaktion mit diesen zeigt. Ausserdem sind die Strukturgerüste in solchen „natürlichen“ Bibliotheken nicht optimiert und daher führt eine ungenügende oder variable Löslichkeit und/oder Stabilität zu Problemen. Daher ist es von grossem Vorteil nur zufällige CDR Bibliotheken zu verwenden, welche ein Strukturgerüst der vorliegenden Erfindung umfassen und/oder ein Strukturgerüst umfassen, das mittels des Verfahrens der vorliegenden Erfindung erhältlich ist und einige oder, bevorzugt alle, möglichen Kombinationen der Aminosäuresequenz in diesen Regionen abdecken.

[0043]

Um die vorliegende Erfindung weiter zu beschreiben, wurde ein stabiles und lösliches Intrakörperstrukturgerüst mit definierten komplementaritätbestimmenden Regionen

(CDRs), welche gegen den intrazellulären Hefe Transkriptionsfaktor Gcn4p gerichtet sind, selektioniert. Dieses definierte Strukturgerüst wurde verwendet, um die CDRs durch zufällige Sequenzen zu ersetzen. Diese CDR Bibliotheken werden durchsiebt, um neue CDRs zu identifizieren, welche eine geforderte biologische Aktivität (in vivo Effekt der CDRs) hervorrufen:

a. Molekulare Interaktionen, welche natürlicherweise innerhalb der Zelle vorkommen (z.B. in menschlichen Zellen oder jeglichen anderen heterologen Zellen) werden in einer geeigneten Zelle, bevorzugt Hefe, wiederhergestellt, oder endogene Hefeinteraktionen werden verwendet. Ein darauffolgender Screen identifiziert CDRs, welche eine hohe Affinität aufweisen, aufgrund der Interferenz dieser CDRs mit der biologischen Aktivität der wiederhergestellten oder endogenen Moleküle. Solch ein

antagonistischer CDR könnte z.B. mittels Blockieren von zwei Proteinen, welche in Signalübermittlungswegen beteiligt sind, wirken.

b. Agonistische CDRs, welche eine geforderte biologische Aktivität in den wiederhergestellten oder endogenen Molekülen induzieren, werden selektioniert.

[0044]

Die zufälligen CDRs, welche in das stabile Strukturgerüst eingebettet sind, können weiter dazu verwendet werden, um Interaktionen der CDR mit einem Antigen mittels interaktionsscreenings zu identifizieren:

a. es konnte gezeigt werden, dass das ausgewählte Strukturgerüst mit einer Transkriptionsaktivierungsdamäne fusioniert werden kann und seine Funktion beibehält.

Dieser chimäre Intrakörper wird benutzt, um CDRs mit einer hohen Affinität gegen ein gegebenes Antigen, welches mit einer DNA bindenden Domäne oder einem Transkriptionsfaktor mit DNA bindender Aktivität fusioniert ist, zu selektionieren. Nach Interaktion des Antigens und der CDRs vermittelt die Transkriptionsaktivierungsdomäne Genexpression eines selektierbaren Markergens, was das Überleben dieser Zelle unter selektiven Bedingungen erlaubt.

b. Eine wiederhergestellte molekulare Interaktion basierend auf der Hybridtechnologie (Fusion des einen Partners mit einer Aktivierungsdomäne, des Anderen, falls nötig, mit einer DNA bindenden Domäne) kann mittels spezifischer CDRs mit hoher Affinität blockiert werden.

[0045]

Es wurde auch gefunden, dass unterschiedliche

Mutationen im Strukturgerüst aber konstante CDRs des Intrakörpers eine Wirkung auf sein in vivo Verhalten haben, indem diese die Stabilität und Löslichkeit des Intrakörpers verändern. Das Strukturgerüst steuert den Hauptanteil zur Stabilität und Löslichkeit eines Intrakörpers bei. Dennoch können gewisse Mutationen in den CDRs die Löslichkeit und Stabilität des Intrakörpers beeinflussen. Daher kann es von Vorteil sein, die zufälligen CDRs, welche in einem definierten Strukturgerüst eingebettet sind, mittels einer funktionellen Qualitätskontrolle vorzuselektionieren.

[0046]

Für alle Zwecke der vorliegenden Erfindung sind eukaryotische Zellen bevorzugt, wobei Hefezellen aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften beinhaltend z.B. rasches Wachstum, positive Selektion, Wachstumsselektion und effiziente Transformation und Selektion, besonders bevorzugt sind.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0047]

1A zeigt wie eine Qualitätskontrolle der scFv oder CDR Bibliothek durchgeführt werden kann.

[0048]

1B zeigt, dass die Löslichkeit der scFv Fusionsproteine mit der Aktivierung des Reportergens korreliert.

[0049]

2 zeigt das bessere in vivo Verhalten des optimierten Gal4 AD- Ω -graft scFv verglichen mit einer anderen λ -graft genannten Variante

[0050]

3A zeigt den in vivo Einfluss von verschiedenen scFv Fragmenten auf die Genexpression eines Gcn4p abhängigen LacZ Reportergens.

[0051]

3B zeigt das in vivo Verhalten von verschiedenen scFv Fragmenten, welche in Hefe exprimiert werden, in einem Two-hybrid Versuch.

[0052]

4 zeigt Wachstumsselektion von Zellen, welche unterschiedliche scFv Fragmente exprimieren, in einem Two-hybrid Versuch.

[0053]

5A zeigt, dass die N-terminale Fusion einer konstanten Domäne (Gal11P-Gal4AD) an einen Einzelkettenantikörper dessen Wirkung auf die Genexpression eines Gcn4p abhängigen LacZ Reporters nicht wesentlich verändert.

[0054]

5B zeigt, dass die Einführung von zwei einzigartigen Restriktionsstellen in einen Einzelkettenantikörper dessen Wirkung auf die Genexpression eines LacZ Reporters nicht verändert.

[0055]

6 zeigt Western Blot Analysen der Löslichkeit von verschiedenen Gcn4p bindenden scFv Fragmenten, welche in Hefe exprimiert werden.

Weg(e) zur Ausführung der Erfindung
Qualitätskontrolle der scFv und CDR
Bibliotheken

[0056]

Der Begriff „Qualitätskontrolle“ definiert einen Versuch, welcher die Selektion eines stabilen und löslichen Intrakörpers aus einer scFv Bibliothek erlaubt.

[0057]

Zu diesem Zwecke wird eine Fusion der scFv Bibliothek mit einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (in diesem Fall Gal4AD) und einer konstanten Region (in diesem Fall Gal11P Aminosäuren 263–352) hergestellt. Die Stabilität des Fusionsproteins hängt von der Stabilität und der Löslichkeit des

scFv Teils ab. Die konstante Gal11P Domäne interagiert mit der Dimerisierungsdomäne von Gal4 (Reste 58–97, Teil der Gal4 DNA Bindungsdomäne (DBD)) (Barberis et al., 1995).

[0058]

Diese Bibliothek wird in Hefezellen transformiert, welche die Gal4 DBD (Reste 1–100) exprimieren, die an den Promoter eines selektierbaren Markergens (z.B. HIS3/LacZ) bindet. Wachstum der Wirtszellen wird nur vermittelt, wenn der getestete Intrakörper die verlangte Löslichkeit und Stabilität zeigt und daher über Gal11P ausreichend mit der Gal4 DBD interagieren kann (siehe 1A).

Löslichkeit korreliert mit Genaktivierung

[0059]

Das Wirkprinzip des Qualitätskontrollsystems wie es in der vorliegenden Erfindung

beschrieben ist, wurde unter Verwendung von gut charakterisierten scFvs gezeigt. Diese besitzen in wesentlichen identische antigenbindende Eigenschaften aber unterschiedliche in vitro Stabilitäten. Die verschiedenen scFv Fragmente wurden als Gal11F-Gal4AD Fusionsproteine exprimiert. Die Gal4 Dimerisierungsdomäne (Reste 58–97) wurde an den C-Terminus von LexA fusioniert und in den Reporterstamm YDE173, der Reportergene unter Kontrolle von 6x LexA Bindungsstellen enthält (siehe unten), transformiert.

[0060]

Wie oben erwähnt wurde, hängt die intrazelluläre Stabilität und Löslichkeit des Gal11p-Gal4AD-scFv Fusionsproteins vom scFv Teil ab. Daher können nur stabile und lösliche scFv Fusionsproteine, welche ausreichend mit LexA-Gal4 (58–97) interagieren, die Reportergenexpression aktivieren (z.B. β -Galaktosidase).

[0061]

Das wt Allel von Gal11 interagiert nicht mit der Gal4 Dimerisierungsdomäne (Reste 58–97). Eine Fusion irgend eines scFv mit dem Gal11 wt Allel ist daher nicht in der Lage das Reporter-gen zu aktivieren und dient als Negativkontrolle. Dies wurde unter Verwendung eines Gal11wt-Gal4AD-scFv Fusionskonstrukts gezeigt (siehe 1B).

[0062]

Weder der Köder (LexA-Gal4(58–97)) noch das scFv Fusionsprotein alleine aktivieren die Reporter-genexpression.

[0063]

Nur zwei aus sechs getesteten scFv Fragmenten waren genügend stabil und löslich, um die Reporter-genexpression in unserem Qualitätskontrollsystem zu aktivieren. Der Strukturgerüst stabilisierte λ -Graft und der κ -Graft sind die stabilsten Varianten. Dieses Resultat korreliert völlig mit der

Fraktionierungsanalyse, in welcher nur der λ - und der κ -Graft in der löslichen Fraktion gefunden wurden (siehe 6).

scFv Fragmente, welche cytoplasmatisch in Hefen exprimiert werden.

[0064]

Geeignete scFv Fragmente sind z.B. der anti-GCN4 Wildtyp scFv, welcher ursprünglich mittels Ribosomen-Display aus einer Bibliothek, die aus einer immunisierten Maus hergestellt wurde, erhalten wurde (Hanes et al., 1998). Das Antigen war eine Doppel Prolin Mutante des Gcn4p Leuzin Zipper, welche 7P14P (dies zeigt an, dass die Positionen 7 und 14 der Leuzin Zipper Domäne zu Prolin mutiert wurden) genannt wird und in Lösung ein zufällige Wendel bildet (Leder et al., 1999). Das scFv Fragment verhindert die Dimerisierung des Wildtyp Gcn4p Doppelwendelpeptids in vitro

(Berger et al., 1999) wie es auch das Wildtyp Monomer in einer zufälligen Wendelkonformation bindet. Das anti-GCN4 scFv Fragment, welches im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung als „Wildtyp“ bezeichnet wird, weist eine gemessene Dissoziationskonstante vom Leuzin Zipper Peptid von $4 \cdot 10^{-11}$ M auf (Hanes et al., 1998).

[0065]

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden verschiedene Mutanten dieses scFv untersucht.

Neben dem Wildtyp anti-GCN4, eine destabilisierte Variante des anti-GCN4 Wildtyps, welche die H-R66K Mutation (bezeichnet als anti-GCN4 (H-R66K) trägt, die als Beispiel für ein Gcn4p bindendes scFv Fragment mit im wesentlichen identischen

Antigenbindungseigenschaften aber mit einer leicht verminderten in vitro Stabilität diente (siehe unten). Der Arg Rest an der Position H-66 (Numerierung gemäss Kabat et al., 1991) ist in grosser Entfernung von der

antigenbindenden Tasche und bildet
gewöhnlich eine Doppelwasserstoffbrücke zu
Asp H-86. Vorher wurde gezeigt, dass im Levän
scFv Bindungsfragment A48 Arg an der Position
H-66 zu einer erhöhten Proteinstabilität als Lys
führt (Proba et al., 1998; Wörn und Plückthun.,
1998a). Desweiteren wurde eine Val-Ala Variante
des anti-GCN4 scFv Fragments getestet
(bezeichnet als anti-GCN4(SS--), in welcher
beide Intradomänen-Disulfidbrücken durch
Val-Ala Paare ersetzt wurden (L-C23V,
L-C88A, H-C22V, H-C92A). Es wurde vorher
gezeigt, dass diese Mutationen verglichen mit
der reduzierten Dithiol Form des 4D5 scFv
Fragments, das p185HER2 bindet, zu einer
leichten Stabilisierung führen und es wurde
spekuliert, dass diese das Verhalten von
Intrakörpern verbessern könnten (Wörn und
Plückthun, 1998b).

[0066]

Zwei zusätzliche Varianten wurden hergestellt, indem die anti-GCN4 CDR Henkel (Komplementaritätsbestimmende Region) in ein anderes Strukturgerüst gepflanzt wurden (Jones et al., 1986). Als Akzeptor Strukturgerüst wurde das sogenannte „hybrid“ scFv ausgewählt (Wörn und Plückthun, 1999). Dieses Akzeptor Strukturgerüst besteht aus der VL Domäne des 4D5 scFv Fragments und der VH Domäne des A48++(H2) scFv Fragments. Es wurde rationell aus einer Reihe von stabilisierten Domänen konstruiert und zeichnet sich durch seine ausserordentliche Stabilität, die mittels Denaturierungsmittel induzierter Gleichgewichtsentfaltung gezeigt wurde, und einer grossen Expressionausbeute aus (Wörn und Plückthun, 1999). Zwei CDR-verpflanzte Varianten mit den anti-GCN4 scFv CDRs und dem „hybrid“ scFv Strukturgerüst wurden mittels Totalgensynthese hergestellt. Da der anti-GCN4 Wildtyphenkel Donor eine λ leichte Kette trägt

während das „hybrid“ Akzeptorstrukturgerüst eine κ leicht Kette trägt, stellte sich die Henkelverpflanzung nicht als einfach dar. Daher wurden zwei unterschiedliche Varianten konstruiert, eine eher „ κ ähnliche“ (als κ -graft bezeichnet) und die andere eher „ λ ähnliche“ (als λ -graft bezeichnet). Diese zwei Varianten unterscheiden sich nur in sieben Resten in der VH-VL, Grenzflächenregion, die möglicherweise die Orientierung der zwei Domänen zueinander beeinflusst. Das Ampicillin bindende scFv Fragment AL5 (A. Kreber et al., nicht publiziert) diene als Negativkontrolle für ein Fragment, das Gcn4p nicht bindet.

Anti-GCN4 scFv Fragmente hemmen das Transaktivierungspotential von Gcn4p

[0067]

Der anti-GCN4 scFv wurde zuerst von verschiedenen Hefevektoren, welche GAL1 und ADH-angetriebene Promotoren beinhalten, exprimiert und auf seine biologische Aktivität

getestet. Zusätzlich wurde das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) vom SV40 grossen T-Antigen N-terminal an den anti-GCN4 scFv fusioniert. Von den getesteten Kombinationen zeigte der anti-GCN4 scFv die grösste biologische Wirkung, wenn er unter Verwendung des pESBA-Act Expressionsvektors (siehe Beispiele) mit dem TRP1 Selektionsmarker und dem 2 μ Origin vom Actin-1 Promoter ohne ein NLS exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Dieser Vektor wurde daraufhin für alle weiteren Experimente verwendet.

[0068]

Die in vivo Wirkung der Expression der verschiedenen scFv Fragmente auf die GCN4 abhängige LacZ Expression ist in der 3A dargestellt. Das Reporterkonstrukt (YAdM2xGCN4-150) enthielt zwei Gcn4p

Bindungsstellen an der Position –150 relativ zu der TATA Box und wurde ins Hefegenom integriert. Relative β -Galaktosidaseaktivität (Rel. β -gal. Aktivität) angetrieben durch endogenes Gcn4p wurde willkürlich als 100% gesetzt. AL5 ist ein Ampicillin bindendes scFv Fragment und diente als Negativkontrolle. Neben dem anti-GCN4 Wildtyp (wt), wurden eine destabilisierte Punktmutation [anti-GCN4(H-R66K)], eine cysteinfreie Variante des anti-GCN4 Wildtyp (anti-GCN4(SS--)) und zwei stabilisierte Strukturgerüstvarianten von anti-GCN4 (κ -graft und λ -graft) getestet, Der stabilisiert λ -graft war der aktivste Intrakörper während die destabilisierte H-R66K Punktmutation und die cysteinfreie Variante von anti-GCN4 verglichen mit dem anti-GCN4 Wildtyp eine verringerte Aktivität zeigten. Es wird angenommen, dass die verringerte Aktivität des κ -graft durch seine schwache Bindungsaktivität zu erklären ist (siehe Tabelle 1). Die destabilisierte Punktmutation anti-GCN4.

(H-R66K) war weniger wirksam hinsichtlich der Hemmung der GCN4 abhängigen Reporterogenaktivität im Vergleich mit dem Wildtyp scFv. Das Muster der Gcn4p Transaktivierungshemmung war äusserst wiederholbar und würde bei Verwendung eines anderen Versuchsverfahrens, in welchem die β -Galaktosidase Aktivität nach Zerstörung der Zellen durch Glasskugeln oder Frier-Auftau Zyklen zur Lyse gemessen wurde und Normierung der β -Galaktosidase Aktivität zur Proteinkonzentration (Escher und Schaffner, 1997) (Daten nicht gezeigt), bestätigt.

Tabelle 1 Bild nicht verfügbar

Die Gal4 AD-scFv Fusionsproteine verhalten sich in einem Two Hybrid Versuch gemäss ihrer in vitro Stabilität und ihrem in vivo Verhalten

[0069]

Die erfolgreiche Interaktion zwischen dem Antigen und den Komplementaritätsbestimmenden Regionen

(CDR) im Two Hybrid Versuch, welcher die LacZ Expression als Reporter gen überwacht, ist in der 3B dargestellt. Der Reporterstamm YDE173 wurde verwendet. Stamm YDE173 wurde am 11. Februar 2000 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSZM, Braunschweig Deutschland, unter der Nummer DSM 13333 hinterlegt. YDE173 stammt vom Hefestamm JFY5 ab (Mata $ura3-52$ $his3\Delta200$ $leu2\Delta1$ $trp1\Delta63$ $lys2\Delta385$), der am genomischen $his3$ Lokus das Reporterplasmid pDE200 integriert hat, das sechs LexA Bindungsstellen enthält, die die entgegengesetzt orientierten Reportergene $HIS3$ und $LacZ$ kontrollieren.

[0070]

Dieselben scFv Fragmente wie in 3A wurden verwendet aber an die Gal4 Transkriptionsaktivierungsdomäne fusioniert und

koexprimiert mit dem GCN4 Leuzin Zipper (Aminosäuren 245-285), welcher C-Terminal an LexA fusioniert ist, der als Köder für den Two Hybrid Versuch dient. Das unspezifische AL5 Kontroll scFv Fusionskonstrukt war nicht in der Lage mit dem LexA-GCN4-Leuzin Zipper zu interagieren und hat daher das LacZ Reporter gen nicht aktiviert. Die Gal4 Aktivierungsdomäne fusioniert an die stabilisierte λ -Graft Variante zeigte die stärkste Wirkung als aktivierender Intrakörper, gefolgt vom anti-GCN4 Wildtyp und der destabilisierten Punktmutation anti-GCN4 (H-R66K). Dagegen zeigten der äusserst stabile aber schwach bindende κ -Graft und der cysteinfreie anti-GCN4 (SS--) keine signifikante Reporter genexpression im Two Hybrid Format. Dieselben Resultate wurden in einem X-Gal Plattenversuch erhalten (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das in vivo Verhalten der verschiedenen Gal4 AD-scFv Fusionsvarianten hinsichtlich der

Aktivierung des LacZ Reportergens im Two Hybrid Format umgekehrt mit dem Hemmungsmuster der Gcn4p abhängigen LacZ Expression korreliert (vergleiche 3A und 3B).

Interaktion zwischen dem Antigen und den verschiedenen scFv's, welche an eine Transkriptionsaktivierungsdomäne fusioniert sind, erlaubt Wachstumsselektion in einem Two Hybrid Versuch

[0071]

Da das integrierte Reporterkonstrukt nicht nur ein LacZ Reportergen, sondern auch das HIS3 Gen enthält, ist es für die Wachstumsselektion auf Platten, welche kein Histidin enthalten, geeignet. Ausserdem ist es möglich durch Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von 3-Aminotriazol (3-AT), welches ein kompetitiver Inhibitor des HIS3 Genprodukts ist, das Wachstum der Hefezellen in Abhängigkeit von der Stärke der Interaktion zwischen Köder/Antigen und Gal4 AD-scFv zu hemmen

(unterdrücken).

[0072]

Das experimentelle Vorgehen, das zu den in der 4 gezeigten Resultaten führte, war wie folgt: Eine serielle 5-fach Verdünnung ausgehend von ungefähr 10'000 Hefezellen, welche den GCN4 Leuzin Zipper (Aminosäuren 245-285) fusioniert mit LexA und ein Gal4-AD scFv Fusionsprotein coexprimieren, wurden tröpfchenweise auf Drop out Platten (-Trp/-Leu/-His), welche unterschiedliche Konzentrationen 3-AT enthalten, aufgetragen. Wachstum wurde nach 48h, 72h und 120h kontrolliert.

[0073]

Die Zeilen in der 4 sind wie folgt:

1. Gal4-AD λ -Graft
2. Gal4-AD ALS
3. Gal4-AD κ -Graft
4. Gal4-AD anti-GCN4 (SS--)
5. Gal4-AD anti-GCN4 Wildtyp
6. Gal4-AD anti-GCN4 (H-R66K)
7. LexA-Gal11 Fusionsprotein dient als positive Kontrolle
- 8.

Leere Vektoren.

[0074]

Das Wachstum der Hefestämme, welche den Köder/Antigen (lexA-GCN4 Leuzin Zipper) zusammen mit einer Gal4-AD scFv Fusion coexprimieren, wurde über fünf Tage kontrolliert. Als Kontrolle wurde auf Platten ohne 3-AT kein offensichtlicher

Wachstumsunterschied zwischen den Gal4 AD-scFv Fusionsvarianten beobachtet. Schon 20 mM 3-AT war ausreichend, um das Wachstum der Zellen, die mit dem scFv (Gal4 AD-AL5), der als negativen Kontrolle diente, transformiert waren, zu unterdrücken. In Übereinstimmung mit den Resultaten, welche die β -Galaktosidase Expression beobachten, erlaubten die Gal4 AD Fusionen mit der κ -Graft Variante, anti-GCN4 (SS--), und anti-GCN4 (H-R66K) kein Wachstum in Anwesenheit von

20mM 3-AT. Zellen, die die λ -Graft Variante und den anti-GCN4 Wildtyp exprimieren, waren in der Lage in Anwesenheit von bis zu 80 mM 3-AT innerhalb von 5 Tagen zu wachsen, mit einem klaren Vorteil für das λ -Graft stabilisierte Strukturgerüst über die Zeit. Eine Konzentration von 100 mM 3-AT war ausreichend, um Wachstum von Zellen, welche Gal4 AD-anti-GCN4 Wildtyp exprimieren, zu verhindern. Erst nach fünf Tagen erschienen in den höchst konzentrierten Punkten einige, wohingegen Zellen, welche die λ -Graft Gal4 AD-scFv Fusionsvariante exprimieren, klar wuchsen.

Die N-terminale Fusion von konstanten Domänen an den λ -Graft scFv interferiert nicht mit dessen biologischer Aktivität

[0075]

Gal11P (Reste 263–352) und die Gal4 Aktivierungsdomäne wurden an den N-Terminus des λ -Graft scFv (Gal11P-Gal4AD

λ -Graft scFv) fusioniert. Ihre biologische Aktivität hinsichtlich der Hemmung der Gcn4p abhängigen Genaktivierung wurde verglichen mit dem λ -Graft alleine. Wie in der 5A gezeigt, behinderte die Fusion einer konstanten Domäne an den scFv die hemmende Aktivität auf die Gcn4p abhängige Genaktivierung nicht.

Einführung von spezifischen Restriktionsstellen

[0076]

Um die CDR3 VH (GLFDY) mit einer zufälligen Peptidbibliothek auswechseln zu können, wurden zwei einzigartige Restriktionsstellen (BglIII und XhoI), die an diese hypervariable Region angrenzen, mittels stiller Mutagenese eingeführt. Diese stillen Änderungen beeinflussten die Aminosäuresequenz des Antikörpers nicht und haben daher das in vivo Verhalten der λ -Graft Variante nicht verändert.

[0077]

Die Bedeutung der CDR3 hypervariablen Region (de Wildt et al., 1997; Hemminki et al.,

1998) für die spezifische Erkennung des Antigens (GCN4 Leuzin Zipper) wurde durch Einführung eines zusätzlichen Alanins N-terminal zu der CDR3 (AGLFDY) der variablen schweren Kette gezeigt. Diese λ -Graft + Ala Variante war nicht in der Lage, die Expression eines Gcn4p abhängigen Reportergens im Hefestamm YAdM 2xGCN4-150 zu hemmen und war auch nicht in der Lage, die Reporterexpression im Two Hybrid Format unter Verwendung des Stammes YDE173 zu aktivieren (Daten nicht gezeigt).

Beide Graft Varianten sind im Hefezytoplasma löslich

[0078]

Die Löslichkeit der verschiedenen Gcn4p scFv Bindungsfragmente in Hefe wurde mittels Western Blot Analyse getestet. Nur im Fall der λ - und κ -Graft Variante konnten signifikante

Mengen lösliches Protein in ungereinigten Zellextrakten nachgewiesen werden. (6).

[0079]

Alle anderen anti-GCN4 scFv Fragmente schienen im wesentlichen vollständig unlöslich zu sein, wobei die Menge an unlöslichem scFv mit abnehmender in vitro Stabilität ein wenig zunahm. Man muss jedoch warnen, dass das genaue Verhältnis von löslichem zu unlöslichem Protein für die unterschiedlichen scFv Varianten nicht unbedingt das in vivo vorhandene Verhältnis widerspiegelt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der verschiedenen anti-GCN4 Varianten während der Probenzubereitung präzipitiert sein könnte, obwohl eine schonendes Zellaufschlussverfahren verwendet wurde, mittels Verwendung des Y-PERTM Hefe Protein Extraktians Reagens von Pierce.

Verbesserung des Strukturgerüsts

[0080]

Variationen im Strukturgerüst, bevorzugt isoliert gemäss einem Verfahren der vorliegenden Erfindung, können kombiniert werden, um weitere Strukturgerüste zu bilden, die in einer reduzierenden Umgebung stabil und löslich sind. Diese resultierenden Strukturgerüste zeigen ein verbessertes in vivo Verhalten verglichen mit Strukturgerüsten, die nur eine Variation enthalten. Ein Strukturgerüst, welches sechs Variationen vereinigt ist in der Seq. Id. Nr. 1 definiert.

Beispiele

Konstruktion von CDR-verpflanzten anti-GCN4 scFv Fragmenten

Klonierung, Expression und Reinigung von scFv Fragmenten

[0081]

Alle scFv Fragmente waren in einer VL-VH Orientierung mit einem 20-mer Linker (GGGGSGGGGSGGGGSSGGGS) und einem C-terminalen His5-Schwanz.

[0082]

Die in Hefe exprimierten scFv Fragmente wurden in den pESBA-Act Expressionsvektor kloniert. Der pES-BA-Act Vektor ist ein *Saccharomyces cerevisiae* – *E. coli* Shuttle Vektor. Er enthält einen bakteriellen Ursprung der Replikation und das amp Resistenzgen. Ausserdem enthält er das Hefe TRP1 Gen zur Transformationsselektion in *S. cerevisiae*. Er ist ausgelegt für hohe Proteinexpression in Hefe und weist daher den 2 μ Ursprung der Replikation auf, der die hohe Kopienzahl in *S. cerevisiae* sicherstellt. Zusätzlich enthält er den starken konstitutiven Actin Promoter und die GAL11 Transkriptionsterminierungssequenz, die durch eine Mehrfachklonierungsstelle getrennt sind, die Restriktionsstellen für NcoI (diese deckt das Translationsstartkodon ATG ab), ApaI, StuI, drei Translationsstapsignale in allen drei Leserastern und eine SalI Stelle enthält.

[0083]

Alle scFv Fragmente wurden via die Bsp1201 und StuI Restriktionsstellen kloniert und trugen einen C-terminalen His5-Schwanz. Zwei Aminosäuren (Gly-Pro), welche die Bsp1201 Stelle kodieren, mussten am N-Terminus nach dem Start Met einbezogen werden.

Fusion der Gal4 AD N-terminal an die verschiedenen Antikörpervarianten

[0084]

Die Gal4 Aktivierungsdomäne wurde mittels der Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von pGAD424 (Clontech) als Vorlage amplifiziert. Beide Primer (stromaufwärts

Primer:

5'-CCATGGGCCCAAGCTTTGCAAAGATGGAT
AAAG-3' (Seq. Id. Nr. 2, stromabwärts Primer:

5'-TTTGGGCCCGAAGA

ACCGCCACCACCAGAACCGCCTCCACCAGA
GCCACCAGCACCAGGCCTGATCTCTTT

TTTTGGGTTTGGTG-3', Seq. Id. Nr. 3] enthalten eine Apal Stelle, welche geeignet ist, um das Gal4 Aktivierungsdomänen (AD) Polypeptid, beinhaltend das SV40 T-Antigen nukleäre Lokalisationssignal, N-terminal zu den verschiedenen scFv's im Kontext von pESBA Act zu klonieren. Die Aktivierungsdomäne und die Einzelkettenantikörper sind durch einen (GGGS)₃ Linker, der durch den stromabwärts Primer kodiert wird, getrennt.

N-terminale Fusion von Gal11wt und Gal11p an die Gal4 Aktivierungsdomäne (AD)-scFv Fusion

[0085]

Gal11wt und Gal11p wurden beide unter Verwendung der folgenden Primer amplifiziert:

stromaufwärts Primer:

5'-CATGCCATGGTTCCTCAACAGCAGCAAAT
GCAAC-3' (Seq. Id. Nr. 4), stromabwärts

Primer:

5'-CATGCCATGGCGCTAGCCAAAGCTTGGA
TTTTTCTCAGG-3' (Seq. Id. Nr. 5), die beide

eine NcoI Stelle enthalten. Die PCR Produkte, welche die Aminosäuren 263-352 kodieren; wurden in die NcoI Stelle von pESBA-Act2 Gal4(AD)-scFv Fusionskonstrukten (oben beschrieben) eingefügt: Dies bildete eine „in-frame“ Fusion des jeweiligen Gal11 Allels mit Gal4(AD)-scFv. Die korrekte Orientierung des Gal11 Inserts wurde durch Verdau mit dem einzigartigen Enzym NheI überpüft.

LexA Fusion

[0086]

Der GCN4 Leuzin Zipper (Aminosäuren 245–285) wurde mittels PCR mit Primern, welche eine EcoRI Stelle zum bequemen Klonieren stromabwärts von den LexA Aminosäuren 1–202 enthalten, amplifiziert. Dies führt zu pAdM018, ein Ars Cen Plasmid mit dem LEU2 Selektionsmarker, welches das Fusionsprotein unter Kontrolle des ADH Promoters exprimiert.

Einführen einer BglII und XhoI Stelle
angrenzend an die CDR3 von VH

[0087]

Um die CDR3 der variablen schweren Kette einfach auswechseln zu können, wurden zwei einzigartige Restriktionsstellen, die an die CDR3 VH angrenzen, mittels stiller Mutagenese eingeführt ohne die Primärstruktur des Gal4 AD- λ -Graft scFv zu ändern. Diese stillen Punktmutationen wurden durch PCR unter Verwendung des λ -Graft als Vorlage eingeführt. In einer ersten Runde wurden zwei getrennte PCR Reaktionen unter Verwendung der Primer #2421 mit #2487 und #2786 mit #2488 durchgeführt, was zu überlappenden PCR Produkten führte. Diese zwei Produkte dienten als Vorlage für die zweite Runde der PCR mit dem äusseren Primer #2421 und #2488 enthaltend eine SpeI und SalI Stelle. Das Endprodukt wurde in den Gal4 AD- λ -Graft unter Verwendung von SpeI und SalI subkloniert.

Direktes intrazelluläres Screening für neue CDRs, die mit dem Antigen interagieren.

[0088]

Die ersten drei Aminosäuren (GLF) der CDR3 der variablen schweren Kette des Strukturgerüst stabilisierten λ -Graft scFv, der an die Gal4 Aktivierungsdomäne fusioniert ist (Gal4 AD- λ -Graft), wurden mittels eines auf PCR basierenden Verfahrens, welches von Reiter et al., beschrieben wurde, zufällig verändert. Die beiden letzten Reste (D und Y) der CDR3 wurden wegen ihrer Konservierung und struktureller Wichtigkeit nicht zufällig verändert (Chothia und Lesk, 1987). Eine λ -Graft scFv-Gal4 AD Bibliothek, welche potentiell 8000 verschiedene CDR3 Varianten der variablen schweren Kette kodiert, wurde erhalten. Die Sequenzanalyse von sechs zufällig ausgewählten Bibliotheksklonen zeigte die Anwesenheit von zufälligen CDR3 Sequenzen an den erwarteten Positionen.

[0089]

Der Hefestamm YDE173, der das HIS3 und LacZ Reportergen unter Kontrolle von 6 LexA Bindungsstellen enthält (siehe oben), wurde mit dem Vektor, der den GCN4 Leuzin Zipper (Aminosäuren 245–285) fusioniert an LexA exprimiert, und der Bibliothek kotransformiert und auf selektiven Drop-out Platten (-Trp/-Leu/-His) enthaltend 60 mM 3-AT zur

Wachstumsselektion ausplattiert. Wenn ein scFv Fragment aus der CDR3 Bibliothek mit einer geeigneten CDR3 Sequenz das an LexA fusionierte Leuzin Zipper Antigen bindet, wird ein Komplex gebildet, der die Transkription des HIS3 Reportergens aktiviert und Histidin unabhängiges Wachstum der Hefezellen wiederherstellt. Nach 3 Tagen wurden gewachsene Kolonien genommen und auf den gleichen selektiven Drop-out Platten ausplattiert. Zellen, die auch nach der zweiten Selektion noch wuchsen, wurden auf X-gal Platten auf β -Galaktasidase Aktivität analysiert.

Die Bibliotheksplasmid DNA wurde aus β -Gal positiven Klonen extrahiert und die Region der CDR3 der variablen schweren Kette wurde sequenziert: Wir fanden viermal die ursprüngliche λ -Graft CDR3 Aminosäuresequenz und 3 vollständig neue CDR3 Sequenzen, welche für den GCN4 Leuzin Zipper spezifisch sind. Die vier identifizierten scFv Klone, welche die ursprüngliche CDR3 Sequenz enthalten, verhielten sich ununterscheidbar vom λ -Graft, wohingegen die drei Klone mit den geänderten CDR3 Sequenzen weniger wirksam waren hinsichtlich der Aktivierung des LacZ Reportergens.

[0090]

Diese Resultate zeigen die Durchführbarkeit eines direkten intrazellulären Screenings für neue CDRs, die in einem definierten scFv Strukturgerüst, das unter reduzierenden Bedingungen stabil und löslich ist, eingebettet

sind.

Das in vivo Verhalten eines definierten Intrakörpers kann mittels zufälliger Mutagenese optimiert werden

[0091]

Die Strukturgerüst stabilisierte λ -Graft Variante wurde mittels PCR, wie durch Sambrook et al. beschrieben, zufällig mutiert, um statistisch Aminosäureänderungen entlang des Strukturgerüsts des Intrakörpers einzuführen.

Der Hefestamm YDE173 wurde mit dieser zufällig mutierten scFv Bibliothek, welche an die Aktivierungsdomäne von Gal4 fusioniert ist, und dem Plasmid, das das spezifische Antigen (Aminosäuren 245–258 des GCN4 Leuzin Zipper) fusioniert an LexA exprimiert, cotransformiert und auf Drop-out Platten enthaltend 80 mM 3-AT wachsen gelassen. Sechs Kandidaten Klone wurde ausgewählt, von denen jeder eine einzige Aminosäureänderung im Strukturgerüst

aufweist. Alle sechs mutierten Strukturgerüste zeigten ein verbessertes in vivo Verhalten verglichen mit der λ -Graft Variante, was durch Messung der β -Galakto-sidase Aktivität bestätigt und quantifiziert wurde. Unter der Annahme, dass unterschiedliche Aminosäureänderungen, welche das Verhalten des Intrakörpers verbessern, sich additiv verhalten, haben wir alle sechs Mutationen in einem Strukturgerüst vereint, das an die Gal4 Aktivierungsdomäne fusioniert wurde, und haben es mit der Strukturgerüst stabilisierten λ -Graft Variante hinsichtlich der Aktivierung des LacZ Reportergens verglichen, 2 zeigt, dass dieses neue Strukturgerüst, welches alle sechs Punktmutationen vereint (Ω -graft), ein beinahe 30 % besseres in vivo Verhalten verglichen mit der ursprünglichen λ -Graft Variante aufweist.

Bemerkenswert ist, dass diese sechs Aminosäuresubstitutionen angehäuft sind; zwei davon (E \rightarrow K und L \rightarrow K) gehen der CDR1 der variablen leichten Kette voran und die

verbleibenden vier (N→D, G→C, K→E, T→S) befinden sich zwischen der CDR2 und CDR3 der variablen schweren Kette.

Integration eines Reportergens in das Chromosom von *Saccharomyces cerevisiae*

[0092]

Das integrierende Reparterplasmid pAB183 stammt von pJP161 ab (Barberis et al., 1995), indem zwei Gcn4p Bindungsstellen an der Position 150 stromaufwärts von der TATA Box des GAL1 Promoters kloniert wurden. Die Gcn4p Bindungsstellen wurden durch anlagern von zwei komplementären Oligonukleotiden, welche eine 5' SphI und 3' Sall kompatible Überhangssequenz aufweisen, gebildet. Die Oligonukleotide sind wie folgt:

5'-CCTATGACTCATCCAGTTATGACTCATCG-
3' (Seq. Id. Nr. 6);
5'-TCGACGATGAGTCATAACTGG

RTGAGTCATAGGCATG-3' (Seq. Id. Nr. 7). Dieses Reporterplasmid wurde an der Apal Stelle linearisiert und in den genomischen Hefelokus *ura3* des Stammes JPY5 (Barberis et al., 1995) integriert was zu YAdM2xGCN4-150 führte. Stamm YAdM2xGCN4-150 wurde am 11. Februar 2000 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH DSZM, Braunschweig Deutschland, unter der Nummer DSM13332 hinterlegt. Vier unabhängige Hefetransformanden wurden in einen funktionalen Versuch getestet und alle zeigen die gleiche GCN4 abhängige Reporterogenaktivität. Einer der Klone (YAdM2xGCN4-150) wurde für alle folgenden Experimente ausgewählt und wird als Wildtyp bezeichnet.

[0093]

Der Reporterstamm, der für die Two Hybrid Versuche verwendet wurde, weist ein integriertes Reporterkonstrukt auf, welches einen bidirektionellen Promoter mit sechs LexA

Bindungsstellen, die die LacZ und HIS3
Expression antreiben, auf.

Serielle Verdünnung und tröpfcheweises
auftragen von Hefezellen

[0094]

Hefezellen wurden mittels der Lithiumazetat
Methode gemäss Standardprotokollen
transformiert. Transformanden wurden über
Nacht bei 30°C in Drop-out Medium (-Trp/-Leu)
wachsen gelassen. Die gesättigten Kulturen
wurden in Drop-out Medium auf eine OD600 =
0.7 verdünnt. und wieder für mindestens eine
Verdoppelungszeit inkubiert. Ausgehend von
einer ungefähren Konzentration von 10⁶
Zellen/ml wurde jede Kultur seriell in Wasser
(Verdünnungsfaktor 5) verdünnt und 10µl jeder
Verdünnung wurde tröpfchenweise auf Drop-out
Platten (-Trp/-Leu/-His), die 0 mM, 20 mM, 40
mM, 60 mM, 80 mM oder 100 mM 3-Aminotriazol
enthalten, aufgetragen. Sechs verschiedene
Verdünnungen jedes Transformanden wurde

tröpfchenweise auf Drop-out Platten aufgetragen. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert und nach 48 h, 72 h und 100 h abgelesen.

In vivo Analyse der scFv Fragmente: Expression der scFv Fragmente in Hefe und der β -Galaktosidase Reparterversuch

[0095]

Der β -Galaktosidase Versuch in Lösung wurde unter Verwendung von permeabilisierten Zellen wie beschrieben durchgeführt (Kaiser et al., 1994, Escher und Schaffner 2997). Die Aktivität wurde auf die Anzahl der Zellen, die untersucht wurden, normiert.

Western Blot Analyse der anti-GCN4 scFv Fragments

[0096]

Die Löslichkeit der verschiedenen anti-GCN4 scFv Fragmente wurde mittels Western Blot analysiert. Fünf ml Kulturen wurden bei 30°C auf eine optische Dichte von ungefähr 2–3 wachsen gelassen. Zellen wurden auf gleiche Zelldichte normiert, pelletiert und Gesamtzellprotein wurde mit Y-PERTM Hefeproteinextraktions Reagens von Pierce, bei welchem es sich um eine schonende Detergenzformulierung handelt, die eine sanfte Isolation von löslichen Proteinen erleichtert, extrahiert. Lösliche und unlösliche Fraktionen wurden mittels Zentrifugation getrennt (13000 rpm, 10 Min, 4°C). Proben des löslichen und unlöslichen ungereinigten Zellextrakts wurde einer SDS-PAGE unterworfen und gemäss Standardverfahren auf PVDF Membranen übertragen. ScFv Fragmente mit einem His5 Schwanz wurden mit einer anti-His5 scFv AP Fusion wie beschrieben (Lindner et al., 1997) und mit dem Chemoluminiszenz Phosphatase Substrat CSPD von Boehringer Mannheim nachgewiesen. Um vernünftige

Intensitäten auf dem Western Blot zu erhalten, mussten in der löslichen Fraktion ungefähr 5 Mal höhere Proteinkonzentrationen verwendet werden verglichen mit der unlöslichen Fraktion und die Blots wurden für verschiedene Zeitspannen exponiert. Daher ist ein direkter Vergleich nur zwischen allen löslichen bzw. allen unlöslichen Proben aussagekräftig.

[0097]

Während in der vorliegenden Anmeldung bevorzugte Ausführungen der Erfindung beschrieben sind, ist klar darauf hinzuweisen, dass die Erfindung nicht auf diese beschränkt ist und auch in anderer Weise innerhalb des Umfangs der folgenden Ansprüche ausgeführt werden kann.

Zitierte Referenzen

Barberis,A., Pearlberg,J., Simkovich,N., Farrell,S., Reinagel,P., Bamdad,C., Sigal,G. and

Ptashne, M. (1995) Contact with a component of the polymerase II holoenzyme suffices for gene activation. *Cell*, 81, 359–368.

Beerli, R.R., Wels, W. and Hynes, N.E. (1994) Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation. *J Biol Chem*, 269, 23931–6.

Berger, C., Weber-Bornhauser, S.,
Eggenberger, J., Hanes, J., Plückthun, A. and
Bosshard, H.R. (1999)

Antigen recognition by conformational selection.
FEBS Lett., 450, 149–153.

Biocca, S., Pierandrei-Amaldi, P., Campioni, N. and
Cattaneo, A. (1994) Intracellular immunization
with cytosolic recombinant antibodies.
Bio/Technology, 12, 396–9.

Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M.,
Pierandrei-Amaldi, P. and Cattaneo, A. (1995)
Redox state of single chain Fv fragments targeted
to the endoplasmic reticulum, cytosol and

mitochondria. *Bio/Technology*, 13, 1110–5.

Cattaneo, A. (1998) Selection of intracellular antibodies. *Bratisl Lek Listy*, 99, 413–8.

Cattaneo, A. and Biocca, S. (1999) The selection of intracellular antibodies. *Trends In Biotechnology*, 17, 115–21.

Derman, A.I., Prinz, W.A., Belin, D: and Beckwith, J. (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, 262, 1744–7.

De Wildt, R.M., Ruytenbeek, R., von Venrooij, W.J., and Hoet, R.M. (1997). Heavy chain CDR3 optimization of a germline encoded recombinant antibody fragment predisposed to bind the U1A protein, *Protein Eng.*, 10, 835–841.

Duan, L., Bagasra, O., Laughlin, M.A., Oakes, J.W. and Pomerantz, R.J. (1994) Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-Rev single-chain antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

of the United States of America, 91, 5075–9.

Escher, D. and Schaffner, W. (1997) Gene activation at a distance and telomeric silencing are not affected by yeast histone H1. *Mol. Gen. Genet.*, 256, 456–461.

Freund, C., Ross, A., Guth, B., Plückthun, A. and Holak, T.A. (1993) Characterization of the linker peptide of the single-chain Fv fragment of an antibody by NMR spectroscopy. *FEBS Lett.*, 320, 97–100.

Gargano, N. and Cattaneo, A. (1997) Rescue of a neutralizing anti-viral antibody fragment from an intracellular polyclonal repertoire expressed in mammalian cells. *FEBS Lett.*, 414, 537–40.

Ge, L., Knappik, A., Pack, P., Freund, C. and Plückthun, A. (1995) Expressing antibodies in *Escherichia coli*. In *Antibody Engineering* (2nd edn). Borrebaeck, C.A.K. (ed.), Oxford University Press, pp 229–266.

Greenman, J., Jones, E., Wright, M.D. and Barclay,

A.N. (1996) The use of intracellular singlechain antibody fragments to inhibit specifically the expression of cell surface molecules. *J Immunol Methods*, 194, 169–80.

Hanes,J., Jermutus,L., Weber-Bornhauser,S., Bosshard,H.R. and Plückthun,A. (1998) Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14130–14135.

Hemminki,A., Niemi,S., Hoffren,AM., Hakalahti,L., Soderlund,H., and Takkinen,K. (1998). Specific improvement of a recombinant anti-testosterone Fab fragment by CDR3 mutagenesis and phage display selection. *Protein Eng.*, 11, 311–319.

Hoogenboom, H.R., de Bruine, A.P., Hufton, S.E., Hoet, R.M., Arends, J.W. and Roovers, R.C. (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, 4, 1–20.

Jones,P.T., Dear,P.H., Foote,J., Neuberger,M.S. and

Winter,G. (1985) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321, 522–525.

Kabat,E.A., Wu,T.T., Perry,H.M., Gottesman,K.S. and Foeller,C. (1991) Variable region heavy chain sequences. In *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. NIH Publication No. 92–3242, National Technical Information Service (NTIS).

Kaiser,C., Michaelis,S. and Mitchell,A. (1994) Assay of β -galactosidase in yeast. In *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, pp. 169–173.

Kipriyanov, S.M., Moldenhauer, G., Martin, A.C., Kupriyanova, O.A. and Little, M. (1997) Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity. *Protein Engineering*, 10, 445-53.

Knappik,A., Krebber,C. and Plückthun,A. (1993)

The effect of folding catalysts on the in vivo folding process of different antibody fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 11, 77–83.

Knappik, A. and Plückthun, A. (1995) Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Engineering*, 8, 81–9.

Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H.R. and Plückthun, A. (1997) Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J. Immunol. Meth.*, 201, 35–55.

Kyoko, T., Toshifumi, Y., Toshiro, T. and Tomoyasu, R. (1999) Production of antibody Fab fragment using yeast JP11000174.

Martineau, P., Jones, P. and Winter, G. (1998) Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *Journal of Molecular Biology*, 280, 117–27.

Mhashilkar, A.M., Bagley, J., Chen, S.Y., Szilvay, A.M., Helland, D.G. and Marasco, W.A. (1995) Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies. *EMBO Journal*, 14, 1542–51.

Leder, L., Berger, C., Bornhauser, S., Wendt, H., Ackermann, F., Jelesarov, I. and Bosshard, H.R. (1995) Spectroscopic, calorimetric, and kinetic demonstration of conformational adaptation in peptide-antibody recognition. *Biochemistry*, 34, 16509–16518.

Lindner, P., Bauer, K., Krebber, A., Nieba, L., Kremmer, E., Krebber, C., Honegger, A., Klinger, B., Mocikat, R. and Plückthun, A. (1997) Specific detection of histagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions. *BioTechniques*, 22, 140–149.

Pace, C.N. (1990) Measuring and increasing protein stability. *Trends Biotech.*, 8, 93-98.
Proba, K., Wörn, A., Honegger, A. and Plückthun, A.

(1998) Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. *J. Mol. Biol.*, 275, 245–253.

Reiter, Y., Schuck, P., Boyd, L.F. and Plaksin, D. (1999). An antibody single-domain phage display library of a native heavy chain variable region: Isolation of functional single-domain VH molecules with a unique interface. *J. Mol. Biol.* 290, 685–698.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual, second edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, 289, 113–130.

Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A, and Galeffi, P. (1993) Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically

protected from virus attack. *Nature*, 366, 469–72.

Ulrich, H.D., Patten, P.A., Yang, P.L., Romesberg, F.E. and Schultz, P.G. (1995) Expression studies of catalytic antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 11907–11.

Visintin M., Tse E., Axelson H., Rabbitts T.H. and Cattaneo A. (1999) Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 11723–11728.

Wörn, A. and Plückthun, A. (1998a) Mutual stabilization of VL, and VH in single-chain antibody fragments, investigated with mutants engineered for stability. *Biochemistry*, 37, 13120–13127.

Wörn, A. and Plückthun, A. (1998b) An intrinsically stable antibody scFv fragment can tolerate the loss of both disulfide bonds and fold correctly. *FEBS Lett.*, 237, 357–361.

Wörn,A. and Plückthun,A. (1999) Different equilibrium stability behavior of scFv fragments: Identification, classification and improvement by protein engineering. *Biochemistry*, 38, 8739–8750.