

Intrakörper II:

(Quelle:

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

Ansprüche(11)

Ein Verfahren für Identifikation von Intrakörper Strukturgerüsten oder Intrakörpern wobei geeignete Wirtszellen mit einer Bibliothek transformiert werden, 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 Zeilen, welche ein lösliches und stabiles Intrakörper Strukturgerüst

exprimieren, mittels Nachweis des Markerproteins erlauben.

Das Verfahren des Anspruchs 2, worin das Markerprotein eine selektierbare Aktivität, insbesondere eine enzymatische Aktivität oder Fluoreszenz Aktivität aufweist.

Ein Verfahren zur Identifikation von Intrakörpern oder Intrakörper Strukturgerüsten umfassend 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 Marker System wobei dieses Marker System unter transkriptioneller Kontrolle des DNA-bindenden Proteins ist, wobei das DNA-bindende Protein, welches Transkription aktivieren kann, nur als Teil eines Fusionsproteins, welches für einen löslichen und stabilen Intrakörperteil kodiert, aktiv 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.

Ein Verfahren zur Identifikation von Intrakörper Strukturgerüsten oder Intrakörpern, wobei geeignete Wirtszellen mit einer Bibliothek transformiert werden, welche für Proteine, die einen Intrakörper und einen Teil eines Transaktivierungssystems umfassen, kodiert, wobei der eine Teil des Transaktivierungssystems nur als Teil eines Fusionsproteins, welches für einen löslichen und stabilen Intrakörperteil kodiert, aktiv ist, 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.

Das Verfahren des Anspruchs 4, worin die durch die Bibliothek kodierten Proteine eine Transkriptionsaktivierungsdomäne umfassen 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.

Das Verfahren des Anspruchs 4 oder 5, worin die zweiten Proteine eine DNA-bindende Domäne bzw. eine Transkriptionsaktivierungsdomäne umfassen und ein Protein, welches mit der konstanten Region des ersten durch die Bibliothek kodierten Proteins interagiert.

Das Verfahren der Ansprüche 4 bis 6, worin die Bibliothek für ein Protein kodiert, welches die Transkriptionsaktivierungsdomäne von GAL4 und Gal11P umfasst, und das zweite Protein umfasst die DNA-bindende Domäne von GAL4.

Das Verfahren der Ansprüche 1 bis 7, worin die Wirtszelle eine eukaryotische Zelle, bevorzugt eine Hefezelle ist.

Ein Verfahren zur Identifikation eines scFv mit einem definierten Strukturgerüst, welches in einer reduzierenden Umgebung stabil und löslich ist, umfassend a. Isolation eines scFv gemäss einem Verfahren der Ansprüche 1 bis 8, 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), welche für ein Strukturgerüst kodiert, 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.

Das Verfahren des Anspruchs 9, worin die Wirtszelle eine eukaryotische Zelle ist.

Das Verfahren des Anspruchs 9 oder 10, worin

die Wirtszelle eine Hefezeile ist.