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

(10) **DE 60 2004 009 036 T2** 2008.06.19

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 587 952 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 009 036.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NL2004/000067**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 706 386.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/067768**
(86) PCT-Anmeldetag: **29.01.2004**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **12.08.2004**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.10.2005**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **19.09.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.06.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***C12Q 1/37*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
03075319 31.01.2003 EP

(73) Patentinhaber:
Nederlandse Organisatie voor Toegepast-Natuurwetenschappelijk Onderzoek TNO, Delft, NL

(74) Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(72) Erfinder:
VERHEIJEN, Johan Hendrikus, NL-2651 TX Berkel en Rodenrijs, NL; HANEMAAIJER, Jan Roeland, NL-2215 NP Voorhout, NL

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

(54) Bezeichnung: **VERBESSERTES VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON PROTEOLYTISCHEN ENZYMEN**

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

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

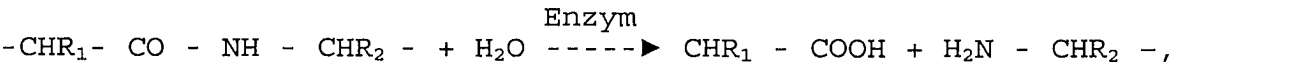
Beschreibung

[0001] Die Erfindung liegt auf dem Gebiet der Bestimmung oder Quantifizierung der Aktivität eines proteolytischen Enzyms in einer Probe, und sie betrifft Substrate, die dafür verwendet werden sollen, sowie ein Assay-Verfahren und ein Assay-Kit und eine Vorrichtung dafür.

[0002] Proteolytische Enzyme oder Proteasen katalysieren die Hydrolyse von Peptid-Bindungen in Proteinen oder Peptiden. Diese Enzyme treten in der Natur vom Virus bis hin zum Menschen auf, und sie haben zahlreiche unterschiedliche Funktionen. Sie sind an Verdauungsvorgängen beteiligt, sowohl auf der Ebene des Organismus (Enzyme des Verdauungstraktes, z.B. Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin) als auch auf der Ebene einzelner Zellen (lysosomale Enzyme, z.B. Cathepsine).

[0003] Sie spielen eine Rolle bei der Migration und Invasion sowohl von Mikroorganismen als auch von Zellen in multizellulären Organismen. In letzteren sind sie am Wachstum und Entwicklung beteiligt (z.B. Plasmin, Plasminogenaktivatoren und Matrix-Metalloproteasen). Neben diesen ersichtlichen Verdauungsvorgängen spielen proteolytische Enzyme in zahlreichen regulatorischen Netzwerken eine entscheidende Rolle, wie beispielsweise bei der Blutgerinnung, bei der Fibrinolyse, bei der Blutdruckregulation sowie bei der Prozessierung von Pro-Hormon und Wachstumsfaktor. Kürzlich ist entdeckt worden, dass Proteasen eine wichtige Rolle bei der zellulären Signalübertragung und beim programmierten Zelltod (Apoptose) spielen. Neben diesen (patho-)physiologischen Funktionen werden proteolytische Enzyme in zunehmendem Maße in der Biotechnologie verwendet, beispielsweise in Bereichen, die von der pharmazeutischen Synthese bis hin zur Herstellung von Lebensmitteln (z.B. Käse) reichen, und in sehr starkem Maße in Tensiden für die allgemeine und die spezielle Verwendung. Die Proteasen selbst können als Pharmazeutika verwendet werden (z.B. Plasminogenaktivatoren als thrombolytische Mittel), oder sie können das Zielmolekül für Wirkstoffe sein (z.B. HIV-Protease und Angiotensinumwandelndes Enzym).

[0004] Alle proteolytischen Enzyme katalysieren dieselbe Basisreaktion:



d.h. eine Peptidbindung wird unter milden Bedingungen hydrolysiert, üblicherweise bei einem pH-Wert von zwischen 5-8 und bei einer Temperatur von zwischen 25-40°C. Ohne Enzym sind wesentlich härtere Bedingungen erforderlich, wie beispielsweise ein Kochen in 6 M Salzsäure. Der Unterschied zwischen enzymatischer und nicht-enzymatischer Hydrolyse von Peptidbindungen ist nicht nur eine Frage der Bedingungen; enzymatische Vorgänge können sehr viel schneller sein, und sie sind im Allgemeinen sehr viel selektiver als eine nicht-enzymatische Hydrolyse.

[0005] Es sind Beispiele bekannt, in denen lediglich ein spezifisches Protein innerhalb einer Mischung hydrolysiert wird, und manchmal wird lediglich eine spezifische Peptidbindung innerhalb eines solchen Proteins angegriffen. Der allgemeine Mechanismus hinter dieser enormen Verbesserung von Wirksamkeit und Selektivität besteht darin, dass ein Enzym ein aktives Zentrum enthält, das üblicherweise 2 bis 3 Aminosäurereste betrifft, welche unmittelbar an dem katalytischen Schritt beteiligt sind, sowie zusätzlich oftmals mehrere erweiterte Substraterkennungsstellen, die zur Erkennung des Substrats oder der Peptidbindung beitragen und auf diese Weise dem Enzym Spezifität verleihen.

[0006] Die bekannten proteolytischen Enzyme können nahezu alle basierend auf ihrem katalytischen Mechanismus und den an der Katalyse beteiligten Aminosäureresten (Tabelle I) in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden.

[0007] Innerhalb jeder Klasse treten Enzyme auf, die unterschiedliche Substratspezifitäten und Eigenschaften aufweisen. Zahlreiche proteolytische Enzyme werden in Form eines inaktiven Proenzyms oder eines Zymogens synthetisiert. Die Aktivierung (die Umwandlung der inaktiven Proenzym-Form in das aktive proteolytische Enzym) ist in den meisten Fällen selbst ein proteolytischer Vorgang. Daher kann eine positive oder negative Rückkopplungsregultion auftreten, die für proteolytische Kaskaden wichtig ist, wie beispielsweise für solche, die bei der Blutgerinnung und der Apoptose vorkommen.

[0008] Aufgrund ihrer Beteiligung an vielen (patho-)physiologischen Vorgängen spielen proteolytische Enzyme eine Rolle bei zahlreichen Erkrankungen, und die Messung der Aktivität von bestimmten proteolytischen Enzymen kann für die Diagnose, Prognose oder bei der Verfolgung einer Therapie von Bedeutung sein (siehe Tabelle II). Die Verwendung von Verbindungen, die mit einer Proteaseaktivität interferieren, als Wirkstoffe bei

einer Vielzahl von Erkrankungen nimmt zu (z.B. Antikoagulantien, HIV-Wirkstoffe).

[0009] Aktivitätsmessungen von klinisch bedeutenden proteolytischen Enzymen befinden sich in allgemeiner Anwendung. In der klinischen Praxis werden insbesondere täglich Assays für mehrere Schlüsselenzyme verwendet, die an der Gerinnungskaskase und an der Fibrinolyse-Kaskade beteiligt sind.

[0010] Die Messung der Aktivität einer Protease unter Verwendung ihres natürlichen Substrats ist nicht immer möglich oder führt zu aufwendigen, komplizierten oder unspezifischen Assays, die für die Routineanwendung nicht geeignet sind. Die Entwicklung der Peptidsynthese hat zur Verwendung von synthetischen Peptiden (Derivaten) als Substrate für proteolytische Enzyme geführt. Insbesondere für zahlreiche Serin-Proteasen sind chromogene oder fluorogene Peptidsubstrate entwickelt worden. Diese Substrate sind oftmals kommerziell erhältlich und bilden die Basis für vollständige Assaykits. Die Entwicklung solcher Substrate für Serin-Proteasen ist verhältnismäßig einfach, da diese Enzyme die Sequenz, welche sich C-terminal von der zu hydrolysierenden Bindung befindet, nicht erkennen. Dieser C-terminale Teil kann durch eine chromogene oder fluorogene Abspaltungsgruppe, wie beispielsweise p-Nitroanilin (pNA), β-Naphtylamin (β-NA), Aminomethylcumarin (AMC) oder 7-Amino-4-trifluormethylcumarin (AFC), ersetzt werden. Zahlreiche kommerziell erhältliche Substrate und Assay-Kits basieren auf diesem Prinzip, und Assays, die solche Verfahren betreffen, können problemlos automatisiert werden.

[0011] In zahlreichen Fällen ist die Spezifität und Sensitivität, die mit diesen Peptidsubstraten erhalten wird, ausreichend, um den Nachweis und die Quantifizierung von physiologisch relevanten Konzentrationen von proteolytischen Enzymen in biologischen Flüssigkeiten oder Gewebeextrakten zu ermöglichen. Manchmal kann die Sensitivität weiter gesteigert werden, indem zwei gekoppelte Reaktionen verwendet werden, wie es für die Plasminogen-Aktivatoren beschrieben worden ist (Drapier et al. (1979) Biochimie 61, 463-471). Ähnliche Verfahren können auch für die Messung der Aktivität von Cystein-Proteasen verwendet werden. In den vergangenen Jahren sind zahlreiche Peptidsubstrate für die Kaspase-Familie der Cystein-Proteasen, die an der Apoptose beteiligt ist, entwickelt worden.

[0012] Die Messung der Aktivität von Metalloproteasen und Asparagin-Proteasen ist schwieriger. Diese Enzyme erkennen im Gegensatz zu Serin-Proteasen und Cystein-Proteasen die Aminosäuresequenz auf beiden Seiten der Bindung, die gespalten werden soll (P3-P2-P1 ^ P1'-P2'-P3') (**Fig. 1**).

[0013] Demgemäß können Substrate, in denen eine Nicht-Peptidbindung gespalten wird, wie beispielsweise die für die Bestimmung von Serin-Proteasen oder Cystein-Proteasen verwendeten chromogenen oder fluorogenen Substrate, nicht für die Bestimmung von Metalloproteasen oder Aspartyl-Proteasen verwendet werden.

[0014] Drei verschiedene Arten von synthetischen Peptidsubstraten zur Verwendung für die Messung dieser Enzyme existieren gegenwärtig: (1) Peptide, die lediglich die notwendige Erkennungssequenz für die Protease enthalten. In diesem Fall schließen sich der Hydrolyse physikochemische Verfahren wie HPLC oder Massenspektrometrie an; (2) Peptide, die an der Hydrolysestelle ein Peptidbindungsäquivalent enthalten, welches Schwefel enthält. Die anschließende Freisetzung einer Thiolatgruppe wird durch ein Farbreagenz verfolgt; (3) Peptide, die neben der Erkennungssequenz auch eine potentiell fluoreszente Gruppe zusammen mit einer Quenching-Gruppe enthalten. Wenn beide Gruppen in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander sind, wird die Fluoreszenz abgeschwächt (Quenching). Nach der Hydrolyse der spaltbaren Peptidbindung werden die fluoreszente Gruppe und der Quencher getrennt, und es wird eine Fluoreszenz beobachtet. Assays, die auf Prinzip (1) basieren sind im Allgemeinen aufwendig, sind schwierig einzustellen, erfordern ein spezielles Wissen und spezielle Ausrüstung, sind schwierig zu automatisieren und können nicht problemlos in kinetischer Weise durchgeführt werden. Assays, die auf den Prinzipien (2) und (3) basieren, werden verwendet, weisen jedoch eine begrenzte Sensitivität und Spezifizität auf.

[0015] Vor einigen Jahren wurde ein neues Prinzip zum Nachweis der Proteaseaktivität entwickelt (siehe EP 691 409). Bei diesem Prinzip wird ein Proenzym verwendet, das in einer solchen Weise modifiziert ist, dass seine normale Aktivierungserkennungsequenz ersetzt oder derart angepasst ist, dass sie von einer ausgewählten Protease gespalten werden kann. Die Spaltung dieser Sequenz führt zu einem aktiven Enzym, das unter Verwendung herkömmlicher Substrate nachgewiesen werden kann (**Fig. 2**). Sehr geeignete Proenzyme bei diesem Prinzip sind Proenzyme der Serin-Proteasefamilie und insbesondere Pro-Urokinase. Basierend auf Pro-Urokinase als Proenzym sind Assays für zahlreiche Matrix-Metalloproteasen (MMPs), Granzym B, verschiedene Cathepsine usw., entwickelt worden. Aufgrund der Beteiligung einer zweistufigen Reaktion sind sehr sensitive Assays entwickelt worden, die im Bereich von ng/ml oder sogar pg/ml messen. Die erste Gruppe von Substraten, die auf Pro-Urokinase basieren, wurde durch Ersetzen der üblichen 4 Aminosäurereste N-ter-

minal von der Aktivierungsstelle durch eine Erkennungssequenz aus 4 Resten erhalten, die von der Zielprotease erkennbar und spaltbar ist. Dieser Ansatz war bei zahlreichen Proteasen, wie beispielsweise MMPs, Granzym B und Cathepsinen erfolgreich.

[0016] Bei einigen Enzyme, wie beispielsweise bei dem TNFα-umwandelnden Enzym TACE (ADAM-17) und Aggrecanase (ADAM TS4) führte dieser Ansatz (Fig. 3a, Fig. 4a) zu sehr unwirksamen Substraten. Sehr viel bessere Substrate konnten durch Einbringen einer längeren Erkennungssequenz erhalten werden. Das Einbringen einer vollständigen Domäne aus dem natürlichen Domänensubstrat N-terminal von der Pro-Urokinaseaktivierungsstelle (Fig. 3b, Fig. 4b) führte zu sehr viel besseren Pro-Urokinasesubstraten. Dieser Ansatz führte zu verhältnismäßig wirksamen Substraten für die Aggrecanase (ADAM TS4) und für das TNFα-umwandelnde Enzym TACE (ADAM-17) (Fig. 3c, Fig. 4c).

[0017] Die Verwendung von Serin-Proteasen als Nachweisenzym weist bestimmte Vorteile auf, wie beispielsweise den leichten Nachweis des aktivierten Enzyms, die Stabilität des Proenzyms und die Verfügbarkeit von zahlreichen möglichen Kandidaten-Enzymen, was eine Optimierung für bestimmte Zwecke ermöglicht. Eine wesentliche Beschränkung wurde entdeckt; die Aminosäuresequenz im C-terminalen Teil der Spaltungsstelle kann nicht frei gewählt werden, sondern weist Einschränkungen auf, die auf strukturellen und mechanistischen Beschränkungen basieren, welche eng mit den Serin-Proteasen verbunden sind. Aufgrund dieser Einschränkungen hat sich die Entwicklung von wirksamen Substraten für mehrere Proteasen von Interesse als schwer durchführbar erwiesen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung beschreiben wir eine wesentliche Verbesserung bezüglich der Technologie mit modifizierten Proenzymen, die nicht durch die für Serin-Proteasen üblichen Beschränkungen eingeschränkt ist, und die im Prinzip eine Entwicklung von Substraten für eine beliebige Zielprotease ermöglicht.

[0018] Die Erfindung stellt ein verbessertes Verfahren zur Bestimmung einer Protease oder ihres Vorläufers nach der Aktivierung bereit, bei dem man eine Probe mit einem Ziel dieser Protease inkubiert, die proteolytische Spaltung des Ziels bestimmt und die daraus erhaltenen Daten korreliert, um die Protease zu bestimmen, wobei das Ziel eine modifizierte Pro-Kaspase ist, die eine Aktivierungsstelle umfasst, welche von der Protease spaltbar ist. Die proteolytische Spaltung der modifizierten Pro-Kaspase aktiviert die Pro-Kaspase und die resultierende Aktivität wird unter Verwendung eines geeigneten Substrats der aktivierte Pro-Kaspase bestimmt.

[0019] Die Probe kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus einer biologischen Flüssigkeit, einer Fraktion derselben, einem biologischen Gewebe, einem Extrakt desselben, einer Fraktion eines solchen Extrakts, einem Kulturmedium, das durch in vitro wachsende Zellen, Gewebe oder Organismen konditioniert ist, einem Extrakt eines solchen Kulturmediums und einer Fraktion eines solchen Kulturmediums. Die Organismen und/oder Zellen können von beliebigem Ursprung sein, wie z.B. Viren, Bakterien, Pilze (einschließlich Hefe) und Tiere. Die Erfindung ist gut bei Proben einsetzbar, die von Säugetieren stammen, insbesondere von Menschen, z.B. von Körperflüssigkeiten oder Zellextrakten.

[0020] Die zu untersuchende Protease kann eine beliebige Protease sein, wobei die Protease jedoch vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Serin-Proteasen, Cystein-Proteasen, Aspartyl-Proteasen und Metalloproteasen; noch stärker bevorzugt ist es, dass die Protease ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Aggrecanase (ADAM TS4), ADAM TS1, TACE (ADAM-17), BACE 1, BACE 2, HIV-Protease und Hepatitis C-Protease. Eine nicht erschöpfende Zusammenfassung von Proteasen, die möglicherweise für eine Messung von Interesse sein könnten, kann in Tabelle II gefunden werden.

[0021] Die modifizierte Pro-Kaspase kann von einer Pro-Kaspase abgeleitet werden, indem ihre Aktivitätsstelle durch eine Aktivitätsstelle ersetzt wird, die von der zu bestimmenden Protease spaltbar ist, wie beispielsweise durch Entfernen der Aktivitätsstelle und Einbringen (nicht notwendigerweise in derselben Position) einer Aktivierungsstelle, die von der zu bestimmenden Protease spaltbar ist. Alternativ dazu wird die modifizierte Pro-Kaspase von Pro-Kaspase abgeleitet, indem ihre Aktivierungsstelle verändert wird, so dass diese in Bezug auf ihr natürliches Substrat inaktiv ist, und eine Aktivierungsstelle (nicht notwendigerweise an derselben Position) eingebracht wird, die von der zu bestimmenden Protease spaltbar ist. Die modifizierte Pro-Kaspase ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Pro-Kaspase-1, Pro-Kaspase-3, Pro-Kaspase-7, Pro-Kaspase-8, Pro-Kaspase-9 und Pro-Kaspase-10.

[0022] Eine Ausführungsform der Erfindung, die besonders nützlich ist, ist ein Verfahren, bei dem die modifizierte Pro-Kaspase Pro-Kaspase-3 oder Pro-Kaspase-7 ist, und bei dem die Modifikation der Pro-Kaspase-3 oder der Pro-Kaspase-7 ein Ersetzen von D175 in der Wildtyp-Pro-Kaspase-3 oder von D198 in der Wildtyp-Pro-Kaspase-7 durch eine Sequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe von Sequenzen, die ähnlich sind

zur Aggrecanase-Erkennungssequenz von Aggrecan (GSDMELPLPRNITEGE^ARGSVILTVKPIFEEF), zur TACE-Erkennungssequenz von TNFα (GSPLAQA^VRSSSRSG) oder zur BACE-Erkennungssequenz des β-Amyloid-Vorläuferproteins (GSKTEEISEVNL^DAEFRHDS), wobei das Symbol ^ die Spaltungsstelle in dem physiologischen Ziel bezeichnet.

[0023] Das Kaspase-Substrat ist eine Verbindung, die eine Aminosäuresequenz umfasst, welche von Kaspase spaltbar ist und darüber hinaus einen Teil aufweist, der nach der Spaltung leicht nachzuweisen ist. Beispiele für solche Substrate sind in Tabelle IV zusammengefasst, und Sequenzen von einigen bekannten Kaspase-Substraten werden in Tabelle V aufgeführt. Vorzugsweise wird eine Verbindung verwendet, die die Aminosäuresequenz AspGluValAsp-pNA umfasst, wobei pNA p-Nitroanilid ist.

[0024] Die Erfindung stellt ferner die modifizierte Pro-Kaspase als solche bereit, insbesondere eine modifizierte Pro-Kaspase, die von einer Pro-Kaspase abgeleitet wird, indem ihre natürliche Aktivierungsstelle ersetzt wird, oder, indem eine Aminosäuresequenz in der Region ihrer natürlichen Aktivierungsstelle durch eine modifizierte Aktivierungsstelle ersetzt wird, welche durch eine Protease spaltbar ist, die sich von derjenigen unterscheidet, welche die unmodifizierte Pro-Kaspase aktiviert oder, alternativ dazu, durch Einbringen einer modifizierten Aktivierungsstelle in die natürliche Sequenz der Pro-Kaspase.

[0025] Vorzugsweise ist die modifizierte Pro-Kaspase von Pro-Kaspase-3 oder Pro-Kaspase-7 abgeleitet.

[0026] Die Erfindung stellt ferner ein Kit zur Bestimmung einer Protease oder ihres Vorläufers nach der Aktivierung in einer Probe bereit, dass eine modifizierte wie vorliegend definierte Pro-Kaspase zusammen mit den normalen Bestandteilen eines solchen Kits umfasst, wie beispielsweise Substrate für aktivierte Pro-Kaspase, Pufferlösungen, Standardpräparationen, Tenside, spezifischen Antikörper, Mikrotiterplatten und Instruktionen zur Verwendung. In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine Vorrichtung zur Bestimmung einer Protease oder ihres Vorläufers nach der Aktivierung in einer Probe bereit, die eine wie vorliegend definierte Pro-Kaspase umfasst.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0027] Fig. 1: Schematische Darstellung des Konzepts der Substraterkennung durch Proteasen im Allgemeinen; das für die Umwandlung des Substrats verantwortliche proteolytische Enzym umfasst die Aminosäurereste s3, s2, s1, S1', s2' und s3', die im gezeigten Beispiel an der Erkennung der Aminosäurereste P3, P, P1, P1', P2' und P3' beteiligt sind, welche die Erkennungsstelle für die Spaltung des Substrats bilden; die Proteasewirkung führt zur Spaltung der Peptidbindung zwischen den Resten P1 und P1'.

[0028] Fig. 2: Schematische Darstellung des Prinzips des Protease-Assays. Die zu bestimmende Protease wandelt ein Proenzym in ein aktives Enzym um. Das aktive Enzym wird anschließend durch Umwandlung eines Substrats zu einem nachweisbaren Produkt gemessen. Die Reaktion der Proenzym-Umwandlung und die Reaktion der Substratumwandlung (Detektion) können gleichzeitig in einem Inkubationsschritt durchgeführt werden, oder sie können in zwei aufeinanderfolgenden Inkubationen durchgeführt werden.

[0029] Fig. 3A: Struktur eines modifizierten Pro-Urokinasse-Zielsubstrats mit kurzer Erkennungs- und Aktivierungsstelle für das TNFα-umwandelnde Enzym (TACE).

[0030] Fig. 3B Konstruktion und Struktur einer modifizierten Pro-Urokinase mit erweiterter Erkennungs- und Spaltungsstelle für das TNFα-umwandelnde Enzym (TACE), die auf einer vollständigen Domäne von TNFα basiert. Die Reste 5-158 der Pro-Urokinase wurden durch die Reste 57-76 von Prä-Pro-TNFα ersetzt.

[0031] Fig. 3C Demonstration des TACE-Nachweises unter Verwendung der modifizierten Pro-Urokinase mit erweiterter TACE-Erkennungsstelle. Kulturmedium (100 µl), das etwa 0,6 µg/ml Pro-Urokinase enthielt, die wie in Fig. 3B beschrieben modifiziert worden war, wurde für 2 bis 24 Stunden bei 4 bis 37°C auf einer Mikrotiterplatte inkubiert, welche mit anti-Urokinase-Antikörper beschichtet war. Anschließend wurde die Platte gewaschen, und es wurden 0,8 mM Urokinase-Substrat pyroGlu-Gly-Arg-pNA in 100 ml 50 mM Tris HCl pH 7,6, 1,5 mM NaCl, 0,5 mM $CaCl_2$, 1 µM $ZnCl_2$ und wie oben beschrieben gereinigtes TACE zugegeben. Die Absorption wurde bei 405 nm nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 37°C gemessen. Die Aktivität wurde ausgedrückt als $1000 \cdot \Delta A_{405}$ geteilt durch das Quadrat der Inkubationszeit in Stunden.

[0032] Fig. 4A: Struktur einer modifizierten Pro-Urokinase mit kurzer Erkennungsstelle für Aggrecanase (ADAM TS4).

[0033] Fig. 4B Konstruktion und Struktur einer modifizierten Pro-Urokinase mit einer erweiterten Aggrecanase (ADAM TS4)-Erkennungsstelle und -Spaltungsstelle, die auf einer vollständigen IgD-Domäne von Aggrecan basiert. Die Reste 1-158 der Pro-Urokinase wurden durch die Reste 350-392 von Aggrecan ersetzt.

[0034] Fig. 4C Nachweis von Aggrecanase unter Verwendung der modifizierten Pro-Urokinase mit erweiterter Aggrecanase-Erkennungsstelle. Reaktionsbedingungen wie in Fig. 3C beschrieben, wobei entweder etwa 3 µg/ml (durchgezogene Linie, schwarze Balken) oder 30 µg/ml (gestrichelte Linie, offene Balken) der modifizierten Pro-Urokinase verwendet wurden. Die Aggrecanase-Aktivität konnte durch das chelatierende Mittel EDTA und den spezifischen Metalloprotease-Inhibitor Batimastat (BB94) (Brown P.D., 1994, Clinical trials of a low molecular weight matrix metalloproteinase inhibitor in cancer, Ann N Y Acad Sci. 6; 732: 217-21) inhibiert werden.

[0035] Fig. 5: Schematischer Überblick über die Struktur von Pro-Kaspasen. Pro-Kaspasen sind einzelkettige Polypeptide, die aus einer Pro-Domäne, einer großen Untereinheit, einer Verbindungseinheit (linker) und einer kleinen Untereinheit bestehen. Der entscheidende Schritt, der zur Aktivierung führt, ist eine Dimerisierung, die durch Spaltung in der Region der Verbindungseinheit ausgelöst werden kann. Die Spaltung der Pro-Domäne scheint weniger bedeutsam zu sein. Die Bereiche der Verbindungseinheit variieren hinsichtlich ihrer Größe zwischen den verschiedenen Pro-Kaspasen, und sie können bis zu einem Rest kurz sein. Die Spaltungsstellen, die zur Aktivierung führen, sind selbst durch Kaspasen spaltbar. Dies führt zu einer Kaskade von Aktivierungsreaktionen. Regelmäßig tritt eine Autoaktivierung auf. Die Figur stammt aus Cohen, G. M., Biochem J. (1997) 326, 1-16.

[0036] Fig. 6: Aktivität von Präparationen mit mutierter Urokinase mit einer Vielzahl von Sequenzen C-terminal von der Aktivierungssequenz.

[0037] Fig. 7A: Konstruktion eines Kassetten-Expressionsvektors für die einfache Konstruktion und Expression von modifizierten Pro-Kaspase-3-Molekülen.

[0038] Fig. 7B Konstruktion eines Expressionsvektors für modifizierte Pro-Kaspase-3 mit einer Erkennungs-/Spaltungsstelle für TACE unter Verwendung des Kassettenvektors von Fig. 7A und einer Gruppe von spezifischen Oligonukleotid-Verbindungseinheiten.

[0039] Fig. 8: Aufreinigung von bakteriell exprimierter modifizierter Pro-Kaspase-3 auf einer Nickel-Chelat-Säule.

[0040] Fig. 9: SDS-PAGE von bakteriellen Extrakten und gereinigten Fraktionen von modifizierten Versionen der Pro-Kaspase-3 und der Pro-Kaspase-7. Bahn 1 und Bahn 10 enthalten einen Molekulargewichtsmarker (Rainbow marker, Amersham Biosciences), Bahnen 2-8 sind Extrakte aus Bakterien, die mit einem Expressionsplasmid transformiert worden waren, das für modifizierte Pro-Kaspase-7 mit einer Aktivierungssequenz, die durch TACE erkennbar ist, kodierte, wobei diese vorliegend als Qz7.2TACE bezeichnet wird (siehe Beispiel 3), geerntet bei 90 Minuten (Bahnen 2, 3), 180 Minuten (Bahnen 4, 5) und 270 Minuten (Bahnen 6, 7), ohne (Bahnen 2, 4, 6) oder mit (Bahnen 3, 5, 7) IPTG. Bahn 9 ist Kontrollextrakt von Stamm Qz3, der unmodifizierte Wildtyp-Pro-Kaspase-3 exprimiert, bei 45 Minuten +IPTG, nach Reinigung auf einer Nickel-Chelat-Säule.

[0041] **Fig.** 10: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des Aggrecanase-Assays unter Verwendung von modifizierter Pro-Kaspase-3 mit einer Aggrecanase-Erkennungssequenz als Ziel.

[0042] **Fig.** 11: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des TACE-Aktivitätsassays unter Verwendung von modifizierter Pro-Kaspase-3 mit einer TACE-Erkennungssequenz als Ziel.

[0043] **Fig.** 12: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des BACE-Assays unter Verwendung von modifizierter Pro-Kaspase-3 als Ziel.

[0044] **Fig.** 13: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des TACE-Aktivitätsassays unter Verwendung von modifizierter Pro-Kaspase-3 mit einer TACE-Erkennungssequenz als Ziel nach Einfangen von TACE mit einem auf die Mikrotiterplatte geschichteten spezifischen monoklonalen Antikörper.

[0045] Die Erfindung kann verwendet werden, um katalytisch aktive Proteasen zu bestimmen, die an biotechnologisch oder (patho-)physiologisch interessanten Prozessen beteiligt sind. "Bestimmung einer Protease" bedeutet sowohl eine qualitative Analyse, d.h. der Nachweis des Vorhandenseins der Protease, insbesondere

ihrer Aktivität, als auch die quantitative Analyse, d.h. die Quantifizierung der Proteaseaktivität, die in einer Probe vorhanden ist.

[0046] Beispiele für interessante Proteasen sind in Tabelle II zusammengestellt. Diese Tabelle umfasst Proteasen mit etablierter klinischer oder biotechnologischer Relevanz, sowie auch Proteasen, die basierend auf dem gegenwärtigen Wissensstand an relevanten (patho-)physiologischen Prozessen beteiligt sein könnten. Die Erfindung offenbart Verfahren, die geeignet sind, um Mitglieder aller vier bekannten Protease-Familien (Serin-Proteasen, Cystein-Proteasen, Metalloproteasen und Aspartyl-Proteasen) zu untersuchen. Im Gegensatz zu der bestehenden Technologie offenbart die Erfindung Verfahren, um Proteasen mit einer beliebigen Zielerkennungssequenz zu untersuchen. In zahlreichen Fällen treten Proteasen in biologischen Flüssigkeiten nicht in der katalytisch aktiven Form auf, sondern in einer inaktiven Zymogen-Form oder Proenzym-Form. In solchen Fällen ist vor der Messung die Umwandlung in die aktive Form erforderlich. Abhängig von dem Zymogen kann die Umwandlung in eine aktive Protease durch einen beschränkten proteolytischen Verdau, durch Behandlung mit bestimmten Chemikalien oder durch milde Denaturierung durch Anwendung von Hitze oder z.B. Natriumdodecylsulfat, erreicht werden. Verfahren, die auf dieser Erfindung basieren, können sehr sensitiv und spezifisch sein, und sie können problemlos unter Verwendung einer allgemein verfügbaren Labor-Ausrüstung für die Automatisierung angepasst werden. Die Erfindung scheint am besten im Bereich der Biotechnologie, in Forschungslaboratorien zur tierischen oder menschlichen Gesundheit und in Krankenhäusern und klinischen Laboratorien und in pharmazeutischen Forschungslaboratorien einsetzbar zu sein. Andere Anwendungen können bei der Qualitätskontrolle in der pharmazeutischen oder nahrungsmittelverarbeitenden Industrie sein.

[0047] Die Erfindung verwendet ein Proenzym, welches durch ein oder mehrere spezifische proteolytische Ereignisse in ein aktives Enzym umgewandelt werden kann, als Zielsubstrat für die zu untersuchende Protease, und anschließend wird die Aktivität des aktiven Enzyms unter Verwendung einer im Stand der Technik bekannten Technologie nachgewiesen (**Fig. 2**). Die Erfindung betrifft insbesondere die Auswahl des Proenzyms. Obwohl zahlreiche Proenzyme als Ausgangspunkt für die Modifikation und Entwicklung eines Assays für eine bestimmte Protease ausgewählt werden können, weisen die meisten Proenzyme bestimmte Beschränkungen hinsichtlich der Sequenz auf, die modifiziert werden kann, und somit hinsichtlich der Proteasen, die gemessen werden können. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung beschreiben wir ein verbessertes Verfahren, das auf einer bestimmten Gruppe von Proenzymen basiert, welche diese Beschränkungen nicht aufweisen, wodurch die Entwicklung eines Assays für nahezu eine beliebige Protease unabhängig von deren Substratpräferenzen ermöglicht wird.

[0048] Die gegenwärtige Methodik basiert im Wesentlichen auf Proenzymen, die zur Familie der Serin-Proteasen gehören, obwohl sie sicherlich nicht auf diese Familie beschränkt ist. Die Aktivierungserkennungsstellen der meisten bekannten Proteasen aus der Familie der Serin-Proteasen zeigen eine gewisse Ähnlichkeit. Obwohl die Sequenz an der N-terminalen Seite der Aktivierungsstelle sehr variabel ist, weist die Sequenz auf der C-terminalen Seite der Aktivierungsstelle in einer großen Vielzahl von Proenzymen, die zur Familie der Serin-Proteasen gehören, einen hohen Grad an Ähnlichkeit auf (Tabelle III). Es scheint, dass geladene Aminosäurereste an den Positionen P1' oder P2' nicht toleriert werden. Des Weiteren scheint es eine starke Präferenz für aliphatische Aminosäureseitenketten zu geben, da an diesen Positionen bei einer Vielzahl von Serin-Proteasen fast ausschließlich Ile-, Val-, Leu- oder Ala-Reste vorkommen. Ferner scheint es an den Positionen P3' und P4' eine starke Einschränkung hinsichtlich der Sequenzvielfalt mit einer starken Präferenz für kleine ungeladene Aminosäurereste wie Gly zu geben. Die Einschränkung hinsichtlich der Sequenz scheint eng mit dem Aktivierungsmechanismus in dieser Familie von Proenzymen gekoppelt zu sein.

[0049] Die vorliegende Erfindung offenbart, dass modifizierte Pro-Kapasen ideale Kandidaten zur Verwendung als Ziel-Substrate für Proteasen sind. Pro-Kaspasen bilden eine Familie von Cystein-Protease-Proenzymen, die an der Apoptose beteiligt sind, dem regulierten Zelltod (**Fig. 5**). Die Kaspasen bilden eine Kaskade, in der eine aktive Kaspase eine (andere) Pro-Kaspase aktivieren kann, was zu einer Kettenreaktion in der Zelle führt, und im Zelltod resultiert. Des Weiteren zeigen zahlreiche Kaspasen eine autokatalytische Aktivierung ihrer Proenzym-Form. Kaspasen sind sehr spezifische Proteasen. Sie erkennen Sequenzen mit mehreren negativ geladenen Aminosäureresten wie Glu oder Asp und spalten C-terminal von solchen Sequenzen. Typische Erkennungssequenzen innerhalb der Kaspase-Familie sind in Tabelle IV zusammengefasst. Jedes Mitglied der Kaspase-Familie hat eine bestimmte Präferenz für eine bestimmte Sequenz, obwohl es ein beträchtliches Überlappen mit der Substratsequenz von anderen Kaspasen gibt. Die Aktivierungssequenz zahlreicher (wenn nicht aller) Pro-Kaspasen ist eine Sequenz, die selbst von einer oder von mehreren aktiven Kaspasen gespalten werden kann. Wegen ihrer Beteiligung an der Apoptose, einem Vorgang der wahrscheinlich an zahlreichen Erkrankungen wie beispielsweise Krebs beteiligt ist, sind eine große Vielzahl von Peptidsubstraten, die von Kaspasen spaltbar sind und die zur Freisetzung einer gefärbten oder fluoreszenten Gruppe führen, entwi-

ckelt worden und diese sind kommerziell verfügbar (Tabelle V).

[0050] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird offenbart, dass die Einbringung einer neuen, nicht natürlich vorkommenden Zielspaltungsstelle für eine Protease, die untersucht werden soll, in den normalen Aktivierungsbereich einer Pro-Kaspase zu einer modifizierten Pro-Kaspase führt, die von der gewählten Protease gespalten und aktiviert werden kann. Somit sind solche modifizierten Pro-Kaspasen ideal für die Verwendung als Nachweisenzyme zur Entwicklung von Assays für eine Vielzahl von Proteasen geeignet. Es wird ferner gezeigt, dass die neuen nicht natürlich vorkommenden Spaltungsstelle so gewählt werden können, dass sie beträchtlich hinsichtlich ihrer Länge und ihrer tatsächlichen Aminosäuresequenz variieren, ohne die Einschränkungen, wie sie für Serin-Proteasen im Stand der Technik gefunden wurden. Es wird jedoch angemerkt, dass weiterhin Sorge dafür getragen werden muss, dass die modifizierte Pro-Kaspase in der Lage ist, in eine aktive Kaspase aktiviert zu werden, welche in der Lage ist, ihre normale proteolytische Aktivität auszuüben. Die Bestimmung, ob die Modifikationen die Funktion der Kaspase intakt lassen, liegen im Bereich des Könnens des Fachmanns.

[0051] Die vorliegende Erfindung offenbart des Weiteren modifizierte Pro-Kaspasen, die verwendet werden können, um Proteasen nachzuweisen, die mit der bisherigen Methodik nicht oder nur mit großen Schwierigkeiten oder mit geringer Effizienz nachweisbar waren. Vorzugsweise ist die Modifikation der Pro-Kaspase derart, dass die normale Aktivierungsreaktion, beispielsweise durch andere Mitglieder der Kaspase-Familie oder durch Auto-Aktivierung verhindert wird. Dies kann erreicht werden, indem man die normale Aktivierungssequenz verändert oder sogar vollständig entfernt. Die neue Ziel-Aktivierungssequenz, die von der gewählten Protease erkannt und gespalten werden kann, kann die normale Aktivierungssequenz ersetzen, sie kann jedoch auch anderweitig in die Sequenz der Pro-Kaspase eingebracht werden. Die Stelle für die Einbringung einer Ziel-Sequenz ist nicht entscheidend, obwohl dafür gesorgt werden sollte, dass die Spaltung der modifizierten Pro-Kaspase weiterhin zur Bildung einer aktiven Kaspase führt. Die Überprüfung, ob eine solche Aktivität beibehalten wird, und die Anpassung der Insertionsstelle liegen wiederum im Bereich des Könnens des Fachmanns.

[0052] Neben den Modifikationen um die Aktivierungsstelle können weitere sekundäre Modifikationen eingebracht werden, die sich auf die Verbesserung der Eigenschaften der Pro-Kaspase oder der nach der Aktivierung gebildeten Kaspase für die bestimmte Anwendung richten. Nützliche sekundäre Modifikationen umfassen: Modifikationen, die die (thermale) Stabilität der Pro-Kaspase oder der aktivierten Kaspase erhöhen, die Resistenz gegenüber anderen Nicht-Ziel-Proteasen verleihen, die Resistenz gegenüber natürlich vorkommenden oder synthetischen Inhibitoren verleihen, die Reaktivität gegenüber Antikörpern oder Liganden verleihen, die bei der Expression und/oder Aufreinigung helfen oder Veränderungen, die die Aktivität der aktivierten Formen erhöhen oder die Aktivität der Pro-Form verringern. Im Allgemeinen (jedoch nicht immer) werden solche sekundären Modifikationen in einem anderen Teil der Kaspase liegen, und nicht in der Nähe der Aktivierungsstelle. Es ist ferner möglich, mehr als eine neue Aktivierungsstelle einzubringen, was dann zu einem Zielsubstrat führt, das für eine Vielzahl von Proteasen mit unterschiedlicher Substratspezifität verwendet werden kann.

[0053] Zahlreiche Mitglieder der Kaspase-Familie sind potentiell für eine Modifikation geeignet, die als Ziel für eine Protease verwendet werden kann. Insbesondere Kaspase-3 und Kaspase-7 sind sehr geeignet, da diese zwei Kaspasen sehr stabil und leicht durch bestehende Methoden herzustellen sind. Es scheint darüber hinaus, dass die Aktivierung von Pro-Kaspase-3 und Pro-Kaspase-7 entscheidend von der proteolytischen Spaltung in der Aktivierungsregion abhängt. Darüber hinaus gibt es sehr wirksame Substrate für diese Kaspasen (Tabelle V). Zum Nachweis der Kaspase-Aktivität sollten diese Substrate Aminosäuresequenzen aufweisen, die von der Kaspase, welche in dem Test verwendet wird (Tabelle V zeigt mehrere bekannte Sequenzen und die erkennenden Kaspasen), erkannt und gespalten werden. Am stärksten bevorzugt ist die Verwendung der Aminosäuresequenz DEVD (asp-glu-val-asp). Darüber hinaus sollte das gespaltene Substrat ein Signal für die Detektion ergeben. Dies kann beispielsweise erreicht werden, indem para-Nitroanilid, 7-Amino-4-trifluormethylcumarin, Aminomethylcumarin oder eine beliebige andere Verbindung, die Farbe, Fluoreszenz oder Lumineszenz erzeugt, direkt an den C-Terminus der Peptidsequenz geknüpft wird, welche durch die Kaspase erkannt wird. Dann werden diese Verbindungen als Ergebnis der Wirkung der Kaspase in die Testlösung freigesetzt, und das Vorhandensein dieser Verbindungen kann quantitativ nachgewiesen werden, z.B. durch Spektrophotometrie, Fluorimetrie oder Luminometrie. Andere Ausführungsformen, die zu einem qualitativen oder quantitativen Signal nach Spaltung durch die Kaspase führen, sind im Stand der Technik bekannt und können problemlos vom Fachmann in den erfindungsgemäßen Assay eingebaut werden. Solche Ausführungsformen können beispielsweise Antikörper verwenden, die spezifisch die aktive Form der Kaspase erkennen, sowie zelluläre Assays zum Nachweis der Kaspasewirkung.

[0054] Um eine neue Aminosäuresequenz, die eine neue erwünschte Zielspezifität für eine Protease verleiht, in eine bestehende Pro-Kaspase einzubringen, kann der Fachmann mehrere ihm bekannte Methoden anwenden. Insbesondere die rekombinante DNA-Technologie scheint eine attraktive Option zu sein. Eine cDNA-Sequenz, die für eine bestimmte Pro-Kaspase kodiert, muss verfügbar sein. Solche Sequenzen sind bekannt und können aus öffentlich zugänglichen Datenbanken erhalten werden. Eine solche cDNA-Sequenz kann anhand von bestehender Technologie erhalten werden, beispielsweise ausgehend von mRNA, die aus einer geeigneten Zelllinie oder aus einem Gewebe isoliert wurde, durch reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Primern, die mit Hilfe der bekannten Sequenz erstellt wurden. Zahlreiche alternative Verfahren sind im Stand der Technik bekannt, um eine spezifische cDNA-Sequenz zu erhalten. Die kodierende Sequenz kann angepasst werden, um die spätere Expression in Protein zu verbessern, und, um das spätere Einbringen von Veränderungen zu ermöglichen, die auf eine Veränderung der Aktivierungsspezifität der resultierenden Pro-Kaspase nach der Expression gerichtet sind. Ferner müssen ein geeigneter Promotor und andere regulatorische Sequenzen zugefügt werden, wie es im Stand der Technik bekannt ist. Die kodierende Sequenz oder die veränderte kodierende Sequenz wird in einen Vektor, wie beispielsweise in ein Plasmid oder in einen Virus, eingebracht, um das Einschleusen in ein Zellsystem für die Expression zu ermöglichen. Die Expression kann im Allgemeinen in einem eukaryotischen Tierzell-Expressionssystem oder in einem Hefe-Expressionssystem oder in prokaryontischen bakteriellen Expressionssystemen durchgeführt werden. Diese Systeme sind im Stand der Technik bekannt und in vielen Fällen in kommerzieller Form verfügbar. Nach dem Expressionsschritt sind im Allgemeinen Verfahren zur Freisetzung des exprimierten Proteins aus den Zellen oder zur Isolierung desselben aus dem Kulturmedium erforderlich. Sehr wahrscheinlich wird eine weitere Aufreinigung des exprimierten Proteins erforderlich sein. Zahlreiche Verfahren für diese Schritte sind im Stand der Technik bekannt.

[0055] Wenn ein Expressionsplasmid konstruiert wird, das die natürliche unmodifizierte kodierende Sequenz einer Pro-Kaspase enthält, können geeignete Modifikationen durch ein beliebiges bekanntes Verfahren der zielgerichteten Mutagenese oder durch neuere Verfahren, die eine Polymerasekettenreaktion umfassen, zugefügt werden. Um die Konstruktion einer großen Vielzahl von verschiedenen kodierenden Sequenzen zu erleichtern, die sich hinsichtlich der Sequenz unterscheiden, welche für die neue Aktivierungsstelle in dem exprimierten Protein kodiert, könnte es praktisch sein, einige weitere Veränderungen in die kodierende Sequenz einzubringen, die zu neuen Restriktionsstellen führen, welche verwendet werden können, um auf einfache und schnelle Weise durch Einbringen von synthetischen Oligonukleotiden zwischen diesen Restriktionsstellen zahlreiche verschiedene Modifikationen in die Aktivierungsstelle einzubringen. Diese zusätzlichen Veränderungen können entweder sogenannte stille Mutationen sein, welche die Aminosäuresequenz nicht verändern, oder es können Veränderungen sein, welche die Proteinsequenz verändern, jedoch keine nachteiligen Wirkungen auf die Funktion des Proteins haben. Ein weiterer Vorteil dieser Vorgehensweise, bei der neue Restriktionsschnittstellen eingebracht und anschließend Oligos eingesetzt werden, ist die geringere Möglichkeit für unerwünschte Sekundärmutationen, die während der Verfahren, die auf einer Polymerasekettenreaktion beruhen, auftreten können. Auf die gleiche Weise können weitere Modifikationen eingebracht werden, um die Eigenschaften der Pro-Kaspase zu verbessern. Eine solche modifizierte Pro-Kaspase kann Teil eines Assay-Kits sein, das alle notwendigen Materialien enthält, um eine oder mehrere Bestimmungen durchzuführen. Üblicherweise enthält ein solches Kit Behälter mit ausreichenden Mengen der modifizierten Pro-Kaspase, ein geeignetes Substrat, um die Kaspase-Aktivität nachzuweisen, eine geeignete Standardpräparation, um die zu messende Protease zu quantifizieren, sowie Materialien zur Herstellung von Pufferlösungen. Darüber hinaus kann ein Kit auch spezifische Antikörper enthalten, welche die zu untersuchende Protease erkennen, um die Spezifität des Assays durch spezifisches Quenching der Aktivität einer spezifischen Protease, einer interferierenden Protease oder durch spezifische Bindung einer Protease. Ein Kit kann darüber hinaus eine oder mehrere Assay-Platten enthalten, z.B. im üblichen Format mit 96 Vertiefungen, mit 384 Vertiefungen oder mit 1536 Vertiefungen. Es könnte vorteilhaft sein, stabilisierende Mittel zu der modifizierten Pro-Kaspase zu geben, um die Stabilität während des Transports und der Lagerung zu erhöhen. Solche stabilisierenden Mittel können andere Proteine, wie beispielsweise Albumin oder Gelatine, Kohlenhydrate, wie beispielsweise Mannitol, Antioxidantien, Tenside oder andere organische Chemikalien sein. Des Weiteren können anorganische Salze ebenfalls vorteilhafte Wirkungen auf die Stabilität haben. Praktischerweise ist die Pro-Kaspase in lyophilisierter Form vorhanden und muss durch Zusatz von Puffer oder Wasser kurz vor der Benutzung hergestellt werden. Darüber hinaus wird eine Beschreibung zugefügt, die angibt, wie die Nachweisreaktion durchzuführen ist, wie die Proben herzustellen sind, und wie die Aktivität zu berechnen ist. Andere Möglichkeiten zur Erhöhung der Spezifität, die im Stand der Technik bekannt ist, besteht darin, ein Immun-"Einfang"-Verfahren anzuwenden: zunächst wird die zu messende Protease unter Verwendung eines spezifischen, immobilisierten (monoklonalen oder polyklonalen) Antikörpers eingefangen, und es folgt die Messung der Aktivität der eingefangenen Protease. Alternativ dazu kann ein Kit oder eine Vorrichtung vom Messstäbchen (dipstick)-Typ sein, bei dem alle notwendigen Reagenzien einer trockenen Form auf einem Streifen oder auf einem Punkt des Materials immo-

bilisiert sind. Die nachfolgenden Beispiele sind lediglich Veranschaulichungen der Erfindung und schränken die Verwendbarkeit oder den Bereich der Erfindung nicht ein.

Beispiele

Beispiel 1: Einschränkungen von Proenzymen von Serin-Proteasen als Nachweisenzym

[0056] In diesem Beispiel werden die Einschränkungen bei Verwendung von Proenzymen aus der Familie der Serin-Proteasen als Nachweisenzym gezeigt. Proenzyme aus der Familie der Serin-Proteasen, wie beispielsweise Pro-Urokinase, haben eine Vielzahl von geeigneten Eigenschaften für eine Verwendung als Nachweisenzyme zur Messung der Aktivität von Proteasen: Die aktive Form der Serin-Proteasen wird problemlos mit chromogenen oder fluorogenen Peptidsubstraten gemessen; der Unterschied hinsichtlich der Aktivität zwischen Proenzym und aktivem Enzym ist im Allgemeinen hoch; die Enzyme sind im Allgemeinen stabil und können sehr spezifisch sein. Ein wesentlicher Nachteil der Verwendung von Mitgliedern aus der Familie der Serin-Proteasen als Nachweisenzyme sind die Sequenzeinschränkungen im C-terminalen Teil der Aktivierungssequenz. Der neu gebildete N-Terminus, der aus der Spaltung der Aktivierungssequenz resultiert, spielt eine wichtige Rolle bei der Erzeugung des aktiven Enzyms. Ein Vergleich dieser Sequenzen aus mehreren Mitgliedern der Familie der Serin-Proteasen (Tabelle II) zeigt eine starke Homologie in dieser Region, was auf eine Beteiligung in der Funktion hindeutet. Die Flexibilität hinsichtlich der Sequenz in dieser Region wurde bei der Pro-Urokinase ausführlicher untersucht. Die vollständige cDNA, die für die humane Pro-Urokinase kodiert, wurde in einen Expressionsvektor kloniert, der die Expression des Proteins in eukaryotischen Zellen ermöglicht (EP 691 409). Mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der Primer 5'-ACC ATC GAt AAC CAG CCC TGG-3' und 5'-CCG CCT cga gGT CTT TTG GCC-3' (Mutationen sind als Kleinbuchstaben gezeigt) wurden die beiden neuen, einzeln vorkommenden Restriktionsschnittstellen ClaI und XhoI eingebracht, welche den Bereich flankieren, der für die Aktivierungsstelle kodiert. Der resultierende Plasmidvektor wurde verwendet, um eine Vielzahl von für Pro-Urokinase kodierende Sequenzen zu konstruieren, die für Pro-Urokinase-Moleküle mit verschiedenen Aktivierungsstellen kodierten, indem das Plasmid mit ClaI und XhoI geschnitten wurde und zwei partiell komplementäre Oligonukleotide, welche für die erforderliche mutierte Aminosäuresequenz kodierten, eingebracht und ligiert wurden. Die Oligonukleotidpaare, die für die Konstruktion der verschiedenen Expressionsplasmide verwendet wurden, sind in Tabelle VI zusammengefasst. Die neu konstruierten Plasmide wurden in CHO-Zellen transfiziert, und das Medium der transient transfizierten Zellen wurde gesammelt. Die Konzentrationen der Pro-Urokinase-Varianten in den konditionierten Medien wurde durch eine ELISA bestimmt, der die Proteasedomäne des Moleküls erkannte, wodurch eine ähnliche Reaktion für alle Varianten sichergestellt wurde. Die Pro-Urokinase-Varianten wurden auf einer Platte "immun-eingefangen" (immuno-captured), die mit Antikörpern beschichtet war, welche sowohl Pro-Urokinase als auch aktive Urokinase erkennen und die Aktivität der letztgenannten nicht inhibieren und die Umwandlung der Proenzym-Form in die aktive Form nicht stören. Anschließend wurden die Pro-Urokinase-Varianten mit Plasmin aktiviert, und nach Waschen der Platte wurde die resultierende Urokinase-Aktivität durch Zugabe von Puffer und pyro-Glu-Gly-Arg-pNA (S2444, ein kommerziell erhältliches Urokinase-Substrat) bestimmt. Die Ergebnisse, die in **Fig. 6** zusammengefasst sind, zeigen, dass ein Ile-, Leu- oder Val-Rest an der Position P1' wichtig ist. An der Position P2' besteht ferner eine starke Präferenz für aliphatische Reste, wobei andere Reste toleriert werden, obwohl dies zu einer stark verringerten Aktivität führt. Das Vorhandensein von Gly an Position P3' und P4' scheint entscheidend zu sein. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Möglichkeit zur Veränderung in der Sequenz P1'-P4' sehr begrenzt ist, was es unmöglich macht, Pro-Urokinase und andere Mitglieder aus der Familie der Serin-Proteasen als Nachweisenzyme für solche Proteasen zu verwenden, die eine Erkennungssequenz aufweisen, welche bei Verwendung der direkten Aktivierungsmethode nicht mit den oben genannten Einschränkungen im Bereich P1'-P4' kompatibel ist.

Beispiel 2: Herstellung von modifizierter Pro-Kaspase-3 mit Aggrecanase- oder TACE-spezfischer Spaltungsstelle.

[0057] Es wurde von der ATCC eine für Kaspase-3 kodierende cDNA erhalten, die kloniert in einem Expressionsvektor vorlag, welcher eine für einen His-Anhang (His-tag) kodierende Sequenz aufwies, die eine schnelle Aufreinigung unter Verwendung von Ni-Chelat-Chromatographie ermöglichte, sowie regulatorische Sequenzen, die eine Expression in E. coli ermöglichten. Dieses Plasmid wurde als Basis für die Konstruktion von ähnlichen Plasmiden verwendet, die für eine Vielzahl von Kaspase-3-Varianten mit Modifikationen in ihrer Aktivierungssequenz kodierten. Um die schnelle Konstruktion von Varianten zu ermöglichen, wurden zwei neue stille Restriktionsschnittstellen durch PCR eingebracht (**Fig. 7a**). Nach einem Verdau mit BamHI und EcoRI kann eine neue kodierende Sequenz unter Verwendung von zwei Oligonukleotiden eingebracht werden. Um die Tauglichkeit von Kaspase-3 als Nachweisenzym zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Sequenzen ein-

gebracht, die für eine Aktivierungssequenz für Aggrecanase (ADAMTS-4) bzw. für TNFα-umwandelndes Enzym (TACE/ADAM 17) kodierten, wobei geeignete Oligonukleotide verwendet wurden (Fig. 7b und Tabelle VII). Sowohl Aggrecanase als auch TACE konnten bei Verwendung eines Substrates, das von einer Pro-Urokinase abgeleitet war, nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß gemessen werden. Die resultierenden Plasmide wurden verwendet, um E. coli (Stamm B121 (DE3) pLys) zu transformieren. Die Kulturen wurden bis zu einer OD von 0,45 bis 0,7 angezüchtet, auf 30°C abgekühlt und mit 1 mM IPTG induziert. Nach 45 Minuten Schütteln bei 30°C wurden die Zellen zentrifugiert (10 Minuten, 6000 UpM (ca. 5000 × g) bei 4°C) und entweder direkt verwendet oder bei –20°C eingefroren gelagert. Die Bakterien-Pellets wurden mit Lysepuffer (50 mM Tris HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) und Bugbuster™ (Novagen) gemischt, und bei 4°C inkubiert, wobei für 30 Minuten gerührt und bei 6000 UpM (ca. 5000 × g) für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert wurde.

[0058] Der Überstand wurde auf eine Nickel-Sepharose (Amersham Biosciences)-Säule aufgetragen (2 ml Säulenvolumen für 30-50 ml des ursprünglichen Kulturvolumen) und anschließend mit 20 Säulenvolumen 50 mM Tris HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol gewaschen (Waschpuffer) und mit Elutionspuffer (50 mM Tris HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert. Die Peakfraktionen wurden unter Verwendung einer PD-10-Säule (Amersham Biosciences) entsalzt, die mit 10 mM Tris HCl pH 7,0, 1,5 mM NaCl, 0,01 % (v/v) BRIJ 35-Puffer äquilibriert worden war (Fig. 8).

Beispiel 3: Herstellung von modifizierter Pro-Kaspase-7.

[0059] Wie es sinngemäß für die Pro-Kaspase-3 in Beispiel 2 beschrieben ist, wurden cDNA und Expressionsvektoren konstruiert, die für Varianten der Pro-Kaspase-7 kodierten und Sequenzen enthielten, die für Pro-Kaspase-7-Varianten mit Aktivierungssequenzen für TACE und Aggrecanase kodierten. Die Oligonukleotide zur Einbringung der neuen Aktivierungssequenzen waren exakt dieselben, die für die Pro-Kaspase-3-Varianten verwendet wurden (siehe Tabelle VII).

[0060] Die Transformation, Expression und Aufreinigung der Pro-Kaspase-7-Varianten wurde wie für die Pro-Kaspase-3-Varianten in Beispiel 2 beschrieben durchgeführt.

Beispiel 4: Charakterisierung von modifizierten Pro-Kaspasen

[0061] Die Gelelektrophorese zeigte, dass alle Kaspase-Varianten vornehmlich in der einzelkettigen Form von 32 kD vorlagen (Fig. 9). Die Kaspase-Aktivität wurde wie folgt gemessen: 10 µl (1-100 ng) gereinigte modifizierte Kaspase-3 oder Kaspase-7 mit einer Aggrecanase- oder TACE-spezifischen Spaltungsstelle (siehe Beispiel 2 und Tabelle VII) wurden mit 60 ml Assaypuffer (50 mM Tris HCl pH 7,6, 1,5 mM NaCl, 0,5 mM $CaCl_2$, 1 µM $ZnCl_2$, 0,01 % (v/v) BRIJ 35) und 10 µl gereinigte Aggrecanase (ADAMTS-4) oder TACE (ADAM-17) gemischt.

[0062] Nach einer Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurden 10 µl 100 mM DTT und 10 µl 8 mM DEVD-pNA (BioSource) zugegeben, und die A405 wurde nach 0 bis 6 Stunden Inkubation bei 37°C in einer Feuchtigkeitskammer gemessen. Die Assays wurden in Polystyrol-Flachboden-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt, und die Absorptionsmessungen wurden mit einem Titertek-Multiskan™-Plattenlesegerät durchgeführt. Es wurde eine geringe Hintergrundaktivität bei den Pro-Kaspase-3-Varianten und den Pro-Kaspase-7-Varianten nachgewiesen, die sehr wahrscheinlich durch das Vorhandensein geringer Mengen von kontaminierenden aktiven Formen verursacht wurde. Bei Inkubation der verschiedenen Pro-Kaspase-Varianten mit ihren entsprechenden Zielenzymen konnte eine klare Steigerung der Kaspase-Aktivität beobachtet werden.

Beispiel 5: Bestimmung der Aggrecanase-Aktivität unter Verwendung modifizierter Pro-Kaspasen

[0063] Protokoll zum Nachweis der Aggrecanase-Aktivität unter Verwendung von Pro-Kaspase-3- oder Pro-Kaspase-7-Varianten mit einer Aggrecanase-spaltbaren Aktivierungssequenz (siehe Beispiel 2 und Tabelle VII). Der Nachweis wird in zwei Schritten durchgeführt; im ersten Schritt wird die Pro-Kaspase-Variante mit ihrem Zielenzym inkubiert, und im zweiten Schritt wird die Menge der Pro-Kaspase-Variante, die in die aktive Kaspase-Variante umgewandelt wurde, durch Inkubation mit einem Kaspase-Substrat nachgewiesen.

[0064] Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurden mit 10 µl (1-100 ng) Pro-Kaspase-3- oder Pro-Kaspase-7-Variante und 60 µl Assaypuffer (50 mM Tris HCl, 1,5 mM NaCl, 0,5 mM $CaCl_2$, 1 µM $ZnCl_2$, 0,01 % (v/v) BRIJ35) gefüllt. 10 µl Aggrecanase, die wie angegeben in Assaypuffer verdünnt war, wurden zugesetzt. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden 10 µl 100 mM DTT und 10 µl 8 mM DEVD-pNA (Bio-

Source) in Wasser zugegeben. Die Platte wurde bei 37°C in einer Feuchtigkeitskammer für 0 bis 6 Stunden inkubiert, und die A405 wurde in regulären Intervallen unter Verwendung eines Titertek-Multiskan™-Plattenlesegeräts gemessen. Für jede Enzym-Konzentration wurde die Veränderung der Absorption gegen die Inkubationszeit aufgetragen (**Fig. 10a**). Die Steigungen dieser Kurven wurden gegen die Aggrecanase-Konzentration aufgetragen (**Fig. 10b**).

Beispiel 6: Bestimmung der Aktivität des TNFα-umwandelnden Enzyms unter Verwendung von modifizierten Pro-Kaspasen

[0065] Ähnlich wie für die Aggrecanase (Beispiel 5) beschrieben, wurden geeignete Pro-Kaspase-3- und Pro-Kaspase-7-Varianten mit gereinigtem TACE inkubiert, wobei ein Protokoll verwendet wurde, das ähnlich war zu dem, das in Beispiel 5 beschrieben ist. Die Ergebnisse sind in den **Fig. 11a**, **Fig. 11b** gezeigt.

Beispiel 7: Bestimmung von β-Amyloid-umwandelndem Enzym (BACE-1) unter Verwendung von modifizierten Pro-Kaspasen

[0066] Ähnlich wie für Aggrecanase und TACE beschrieben wurde eine Pro-Kaspase-3-variante erzeugt, die eine Sequenz enthielt, die von einem β-Amyloid-umwandelndem Enzym (BACE-1) spaltbar war (siehe Tabelle VII und **Fig. 7a** und **Fig. 7b**).

[0067] 10 µl gereinigte modifizierte Kaspase-3 mit einer für BACE-1 spezifischen Spaltung wurden mit 300 µl 10 mM Na-Acetat pH 5,1, 1,5 mM NaCl, 0,01 % (v/v) BRIJ35 und 10 µl BACE-1)-Enzym gemischt. Nach einer Aktivierung über Nacht bei Raumtemperatur wurden 10 µl 100 mM DTT, 10 µl 8 mM DEVD-pNA (BioSource) und 30 µl 100 mM Tris HCl pH 8,0, 1,5 mM NaCl, 0,01 % (v/v) BRIJ 35 zugesetzt, und die A405 wurde in regulären Intervallen nach 0 bis 6 Stunden Inkubation bei 37°C in einer Feuchtigkeitskammer gemessen. Die Assays wurden in Polystyrol-Flachboden-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt, und die Absorptionsmessungen wurden mit einem Titertek-Multiskan™-Plattenlesegerät durchgeführt.

[0068] Die Ergebnisse für den Nachweis der BACE-1-Aktivität sind in den **Fig. 12a** und **Fig. 12b** gezeigt.

Beispiel 8: Immun-"Einfang"-Assay für TACE

[0069] Für einige Proteasen oder Anwendungen ist ein Immun-"Einfang"-Format nützlich. In einem solchen Format wird die nachzuweisende Protease, die im Allgemeinen in einer biologischen Probe in geringer Konzentration und in Gegenwart einer Vielzahl von störenden Verbindungen, wie beispielsweise Salzen, anderen Proteasen, Proteaseinhibitoren, usw., vorliegt, spezifisch aus der biologischen Probe entfernt, wobei beispielsweise eine Mikrotiterplatte verwendet wird, die mit einem Antikörper beschichtet ist, der die Zielprotease spezifisch erkennt und an diese bindet. Nach Binden der Zielprotease an die Platte wird die Probe, welche die störenden Substanzen enthält, entfernt, die Platte kann (sofern erforderlich) gewaschen werden, und es kann eine eindeutig definierte Lösung aus gereinigten Komponenten zugesetzt werden. Eine solche Vorgehensweise hat mehrere Vorteile und wird regelmäßig für den Nachweis von nahe verwandten Proteasen mit überlappender Substratspezifität verwendet, wie beispielsweise bei der Familie der MMP-Proteasen.

[0070] Eine Mikrotiterplatte (Costar EIA/RIA, Flachboden, 8 Vertiefungen) wird über Nacht bei 4°C in Natriumcarbonatpuffer pH 9,6 mit 100 µl pro Vertiefung 10 µg/ml Ziege-Anti-Maus-IgG und 2 µg/ml monoklonalem Maus-Antikörper, der TACE erkennt, beschichtet. Nach viermaligem Waschen mit 0,01 M Naphosphat pH 7,0, 0,15 M NaCl, 0,05 % (v/v) wird die Platte als Immun-"Einfang"-Platte verwendet. Proben, die TACE enthalten, werden in die Platte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Einfangen wird die Platte geleert und gewaschen und anschließend mit 10 µl (1-100 ng) Pro-Kaspase-3-Variante mit TACE-Spaltungsstelle (siehe Tabelle VII) und 60 µl Assaypuffer befüllt und bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wird DEVD-pNA zugesetzt, und es wird erneut bei 37°C inkubiert; die Absorption wird nach 0 bis 6 Stunden Inkubation gemessen. Eine Auftragung der Absorption gegen die Inkubationszeit sowie der Absorption gegen die TACE-Konzentration ist in **Fig. 13A**, **Fig. 13B** gezeigt.

Tabelle I: Protease-Klassen

Name	EC-Nummer	Reste des	aktiven Z	entrums
Serin-Proteasen	3.4.21	Ser	His	Asp*
Cystein-Proteasen	3.4.22	Cys	His	Asp*
Asparagin-Proteasen	3.4.23	Asp	Asp	
Metalloproteasen	2.4.24	His	His	Me^{2+}**

* Asp nicht immer vorhanden
** His-Rest an der Chelatierung eines Metallions beteiligt. Metallion ist oftmals Zn^{2+}

Tabelle II: Einige klinisch bedeutende Proteasen

Protease	Beteiligt an	Erkrankungen
Faktor VIIa	Blutgerinnung	Blutung/Thrombolyse
Faktor IXa	Blutgerinnung	Blutung/Thrombolyse
Faktor Xa	Blutgerinnung	Blutung/Thrombolyse
APC	Blutgerinnung	Blutung/Thrombolyse
Thrombin	Blutgerinnung	Blutung/Thrombolyse
t-PA	Fibrinolyse/perizelluläre Proteolyse	
u-PA	Fibrinolyse/perizelluläre Proteolyse	Knochenabbau
Plasmin	Fibrinolyse/perizelluläre Proteolyse	Lungenemphysem
Trypsin	Verdau	Pankreatitis
Chymotrypsin	Verdau	Pankreatitis
Enterokinase	Verdau ()	Pankreatitis
Pepsin	Verdau	Pankreatitis
Cathepsin B, H, D	Lysosomaler Verdau	
Cathepsin K	Lysosomaler Verdau	Knochenabbau
Cathepsin G	Lysosomaler Verdau	Lungenemphysem
Cathepsin L	Lysosomaler Verdau	
Cathepsin V	Lysosomaler Verdau	
Cathepsin S	Lysosomaler Verdau	
Renin	Blutdruckregulation	Bluthochdruck
ACE	Blutdruckregulation	Bluthochdruck
MMPs	Invasion, Gewebeneubildung	Krebs, Arthritisentzündung
Elastase	Elastin-Abbau	Lungenemphysem
Cir	Komplement-Aktivierung	Entzündung
Cis	Komplement-Aktivierung	Entzündung
HIV-Protease	Virus-Zusammenbau	AIDS
Kaspasen	Apoptose	Krebs

Tabelle III: Beispiele für Proenzyme aus der Familie der Serin-Proteasen

Proenzym	Bei Aktivierung gespaltene Bindung
	P4-P3-P2-P1 ↑ P'_1-P'_2-P'_3-P'_4
Pro-Thrombin	Glu-Gly-Arg ↑ Ile-Val-Glu-Gly
Pro-Urokinase	Arg-Phe-Lys ↑ Ile-Ile-Gly-Gly
Trypsinogen	Asp-Asp-Lys ↑ Ile-Val-Gly-Gly
Chymotrypsinogen	Leu-Ser-Arg ↑ Ile-Val-Asn-Gly
Pro-Elastase	Val-Tyr-Arg ↑ Val-Val-Gly-Glu
Pro-Subtilisin	Ala-Gly-Lys ↑ Ser-Asn-Gly-Glu
Koagulationsfaktor V	Gly-Ile-Arg ↑ Ser-Phe-Arg-Phe
Koagulationsfaktor VII	Pro-Gln-Arg ↑ Ile-Val-Gly-Gly
Koagulationsfaktor IX	Asp-Phe-Thr-Arg ↑ Val-Val-Gly-Gly
Koagulationsfaktor X	Asn-Leu-Thr-Arg ↑ Ile-Val-Gly-Gly
Koagulationsfaktor XII	Ser-Met-Thr-Arg ↑ Val-Val-Gly-Gly
Koagulationsfaktor XI	Ile-Lys-Pro-Arg ↑ Ile-Val-Gly-Gly
Kallikrein	Thr-Ser-Thr-Arg ↑ Ile-Val-Gly-Gly
Plasminogen	Pro-Gly-Arg ↑ Val-Val-Gly-Gly
Cathepsin G	Ala-Gly-Glu ↑ Ile-Ile-Gly-Gly

[0071] Sequenzen wurden aus der Datenbank SWISS-PROT, GenBank oder PIR erhalten.

[0072]

Tabelle IV: Einige Substrat-Spaltungsstellen für verschiedene Kaspasen

Bevorzugte Sequenzen								
Kaspase-1	YEVD	↑	WEHD	↑	LEVD	↑	WVAD	↑
Kaspase-2	VDVAD	↑	DEHD	↑	LDESD	↑		
Kaspase-3	IETD	↑	DMQC	↑				
Kaspase-4	LEVD	↑	WEHD	↑	LEHD	↑	WVAD	↑
Kaspase-5	WEHD	↑	LEHD	↑	LEAD	↑		
Kaspase-6	VEID	↑	VEHD	↑	VKMD	↑	VNLD	↑
Kaspase-7	DEVD	↑						
Kaspase-8	IETD	↑	LEID	↑				
Kaspase-9	LEHD	↑	VEHD	↑				
Kaspase-10	IEAD	↑	AEVD	↑	VEHD	↑		

Tabelle V: Peptidsubstrate zum Nachweis der Kaspase-Aktivität

Substrat	Bevorzugte Kaspase
VAD-X	1
DEVD-X	3, 6, 7, 8
VEID-X	6, 8
IETD-X	8, 9, 10
WEHD-X	1, 4, 5
YVAD-X	1, 4, 5
VDVAD-X	2

[0073] X kann -pNA (para-Nitroanilid), -AFC (7-Amino-4-trifluormethylcumarin), -AMC (Aminomethylcumarin) oder eine beliebige andere chromogene oder fluorogene Abspaltungsgruppe sein.

Tabelle VI: Oligonukleotide, die für die Konstruktion der Pro-Urokinase-Varianten verwendet wurden

PRFK-IGGG	Sense	S R P R F K I G G G E F T T 5'- TCG AGG CCC CGC TTT AAG ATT GGC GGG GGA GAA TTC ACC ACC AT-3'
	A-sense	5'- C GAT GGT GGT GAA TTC TCC CCC GCC AAT CTT AAA GCG GGG CC - 3'
PRFK-IAGG	Sense	S R P R F K I A G G E F T T 5'- TCG AGG CCC CGC TTT AAG ATT GCC GGG GGA GAA TTC ACC ACC AT-3'
	A-sense	5'- C GAT GGT GGT GAA TTC TCC CCC GGC AAT CTT AAA GCG GGG CC - 3'
PRFK-IEGG	Sense	S R P R F K I E G G E F T T 5'- TCG AGG CCC CGC TTT AAG ATT GAA GGG GGA GAA TTC ACC ACC AT-3'
	A-sense	5'- C GAT GGT GGT GAA TTC TCC CCC TTC AAT CTT AAA GCG GGG CC - 3'
PRFK-AIGG	Sense	S R P R F K A I G G E F T T 5'- TCG AGG CCC CGC TTT AAG GCC ATT GGG GGA GAA TTC ACC ACC AT-3'
	A-sense	5'- C GAT GGT GGT GAA TTC TCC CCC AAT GGC CTT AAA GCG GGG CC - 3'
PRFK-ILGG	Sense	S R P R F K I L G G E F T T 5'- TCG AGG CCC CGC TTT AAG ATT CTT GGG GGA GAA TTC ACC ACC AT-3'
	A-sense	5'- C GAT GGT GGT GAA TTC TCC CCC AAG AAT CTT AAA GCG GGG CC - 3'
PRFK-LIGG	Sense	S R P R F K L I G G E F T T 5'- TCG AGG CCC CGC TTT AAG CTT ATT GGG GGA GAA TTC ACC ACC AT-3'
	A-sense	5'- C GAT GGT GGT GAA TTC TCC CCC AAT AAG CTT AAA GCG GGG CC - 3'
PRFK-IVGG	Sense	S R P R F K I V G G E F T T 5'- TCG AGG CCC CGC TTT AAG ATT GTG GGG GGA GAA TTC ACC ACC AT-3'
	A-sense	5'- C GAT GGT GGT GAA TTC TCC CCC CAC AAT CTT AAA GCG GGG CC - 3'
PRFK-VIGG	Sense	S R P R F K V I G G E F T T 5'- TCG AGG CCC CGC TTT AAG GTG ATT GGG GGA GAA TTC ACC ACC AT-3'
	A-sense	5'- C GAT GGT GGT GAA TTC TCC CCC AAT CAC CTT AAA GCG GGG CC - 3'
PRFK-DIGG	Sense	S R P R F K D I G G E F T T 5'- TCG AGG CCC CGC TTT AAG GAT ATT GGG GGA GAA TTC ACC ACC AT-3'
	A-sense	5'- C GAT GGT GGT GAA TTC TCC CCC ATT ATC CTT AAA GCG GGG CC - 3'

Tabelle VII: Oligonukleotidkassetten, die für die Konstruktion von Expressionsvektoren für modifizierte Kaspase verwendet wurden.

Aggrecanase (ADAM TS4)

```
              D   M   E   L   P   L   P   R   N   I   T   E   G
E ^ A   R
5'- GA TCC GAC ATG GAG CTC CCA CTG CCT CGA AAC ATC ACT GAG
GGT GAA GCC CGA
3'-       G CTG TAC CTC GAG GGT GAC GGA GCT TTG TAG TGA CTC
CCA CTT CGG GCT

 G   S   V   I   L   T   V   K   P   I   F   E
GGC AGC GTG ATC CTT ACC GTA AAG CCC ATC TTC GAG G     -3'
CCG TCG CAC TAG GAA TGG CAT TTC GGG TAG AAG CTC CTT AA-5'
```

TACE (TNFα-umwandelndes Enzym)

```
             P   L   A   Q   A ^ V   R   S   S   S   R
5'-GA TCC CCA TTG GCA CAG GCA GTT AGA TCT TCA TCA CGG G     -
3'
3'-      G GGT AAC GCT GTC CGT CAA TCT AGA AGT AGT GCC CTT AA-
5'
```

BACE (β-Amyloid-umwandelndes Enzym)

```
             K   T   E   E   I   S   E   V   N   L ^ D   A   E
F   R   H   D   S
5'-GA TCC AAA ACA GAA GAG ATC TCC GAA GTT AAC CTG GAC GCA GAG
TTT CGT CAT GAC TCA G     -3'
3'-      G TTT TGT CTT CTC TAG AGG CTT CAA TTG GAC CTG CGT CTC
AAA GCA GTA CTG AGT CTT AA-5'
```

[0074] Die dargestellten Oligonukleotidpaare wurden in Pro-Kaspase-3- oder Pro-Kaspase-7-Expressionsvektoren ligiert, die mit BamHI und EcoRI verdaut worden waren, wodurch Expressionsvektoren erhalten wurden, die für Pro-Kaspase-Varianten mit Spaltungsstellen/Aktivierungsstellen für ADAMTS4, TACE und BACE kodierten. Die Erkennungssequenzen der Proteine sind in Fettdruck über den Oligonukleotiden gezeigt, die Spaltungsstellen sind mit einem ^ angegeben. Siehe auch **Fig.** 7.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung einer Protease oder ihres Vorläufers nach der Aktivierung, bei dem man eine Probe mit einem Ziel dieser Protease inkubiert, die proteolytische Spaltung des Ziels bestimmt und die daraus erhaltenen Daten korreliert, um die Protease zu bestimmen, wobei das Ziel eine modifizierte Pro-Kaspase ist, die eine Aktivierungsstelle umfasst, welche von der Protease spaltbar ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die proteolytische Spaltung der modifizierten Pro-Kaspase die Pro-Kaspase aktiviert und bei dem die resultierende Aktivität unter Verwendung eines geeigneten Substrats der aktivierten Pro-Kaspase bestimmt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Probe ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer biologischen Flüssigkeit, einer Fraktion derselben, einem biologischen Gewebe, einem Extrakt desselben, einer Fraktion eines solchen Extrakts, einem Kulturmedium, das durch in vitro wachsende Zellen, Gewebe oder Organismen konditioniert ist, einem Extrakt eines solchen Kulturmediums und einer Fraktion eines solchen Kulturmediums.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Protease ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Serin-Proteasen, Cystein-Proteasen, Aspartyl-Proteasen und Metalloproteasen.

5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem die Protease ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Aggrecanase, ADAM T1, ADAM TS4, TACE, BACE, BACE 1, BACE 2, HIV-Protease und Hepatitis C-Protease.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die modifizierte Pro-Kaspase aus einer Pro-Kaspase abgeleitet wird, indem die Aktivierungsstelle durch eine Aktivierungsstelle ersetzt wird, die von der zu bestimmenden Protease spaltbar ist.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die modifizierte Pro-Kaspase von einer Pro-Kaspase abgeleitet wird, indem die Aktivierungsstelle entfernt wird und eine Aktivierungsstelle (nicht notwendigerweise an der gleichen Position) eingebracht wird, die von der zu bestimmenden Protease spaltbar ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, bei dem die modifizierte Pro-Kaspase von einer Pro-Kaspase abgeleitet wird, indem ihre Aktivierungsstelle verändert wird, so dass diese in Bezug auf ihr natürliches Substrat inaktiv ist, und eine Aktivierungsstelle (nicht notwendigerweise an der gleichen Position) eingebracht wird, die von der zu bestimmenden Protease spaltbar ist.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die modifizierte Pro-Kaspase ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pro-Kaspase-1, Pro-Kaspase-3, Pro-Kaspase-7, Pro-Kaspase-8, Pro-Kaspase-9 und Pro-Kaspase-10.

10. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem die modifizierte Pro-Kaspase Pro-Kaspase-3 oder Pro-Kaspase-7 ist, und bei dem die Modifikation der Pro-Kaspase-3 oder der Pro-Kaspase-7 ein Ersetzen von D175 in der Wildtyp-Pro-Kaspase-3 oder von D198 in der Wildtyp-Pro-Kaspase-7 durch eine Sequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Sequenzen GSDMELPLPRNITEGE^ARGSVILTVKPIFEEF, GSPLAQA^VRSSSRSG und GSKTEEISEVNL^DAEFRHDS, wobei das Symbol ^ die Spaltungsstelle in dem physiologischen Ziel bezeichnet.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 10, bei dem das Kaspase-Substrat eine Verbindung ist, welche die Aminosäuresequenz AspGluValAsp-pNA umfasst, wobei pNA p-Nitroanilid ist.

12. Modifizierte Pro-Kaspase, die von einer Pro-Kaspase abgeleitet wird, indem sie mit einer Erkennungsstelle ausgestattet wird, die von einer Protease spaltbar ist, welche sich von derjenigen unterscheidet, die die unmodifizierte Pro-Kaspase spaltet und aktiviert.

13. Modifizierte Pro-Kaspase nach Anspruch 12, bei der die Erkennungsstelle eine Aktivierungsstelle ist, die von einer Protease spaltbar ist, welche sich von derjenigen unterscheidet, die die unmodifizierte Pro-Kaspase aktiviert, wobei die Aktivierungsstelle die ursprüngliche Aktivierungsstelle der Pro-Kaspase ersetzt.

14. Modifizierte Pro-Kaspase nach Anspruch 13, die von Pro-Kaspase-3 oder von Pro-Kaspase-7 abgeleitet ist.

15. Kit zur Bestimmung einer Protease oder ihres Vorläufers nach der Aktivierung in einer Probe, das eine modifizierte Pro-Kaspase nach den Ansprüchen 12 bis 14 umfasst.

Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

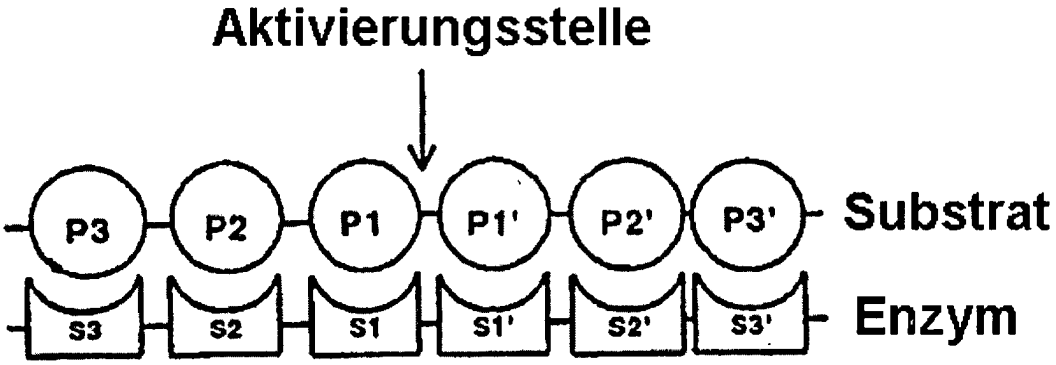


Fig. 2

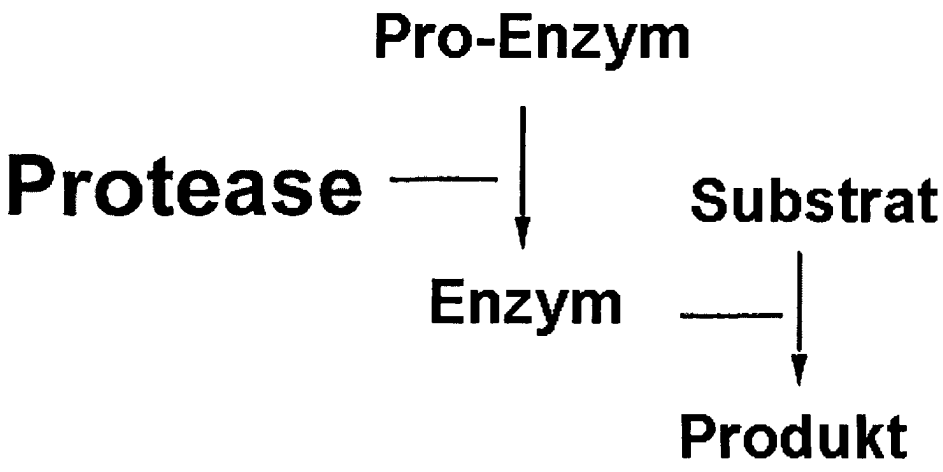


Fig. 3A

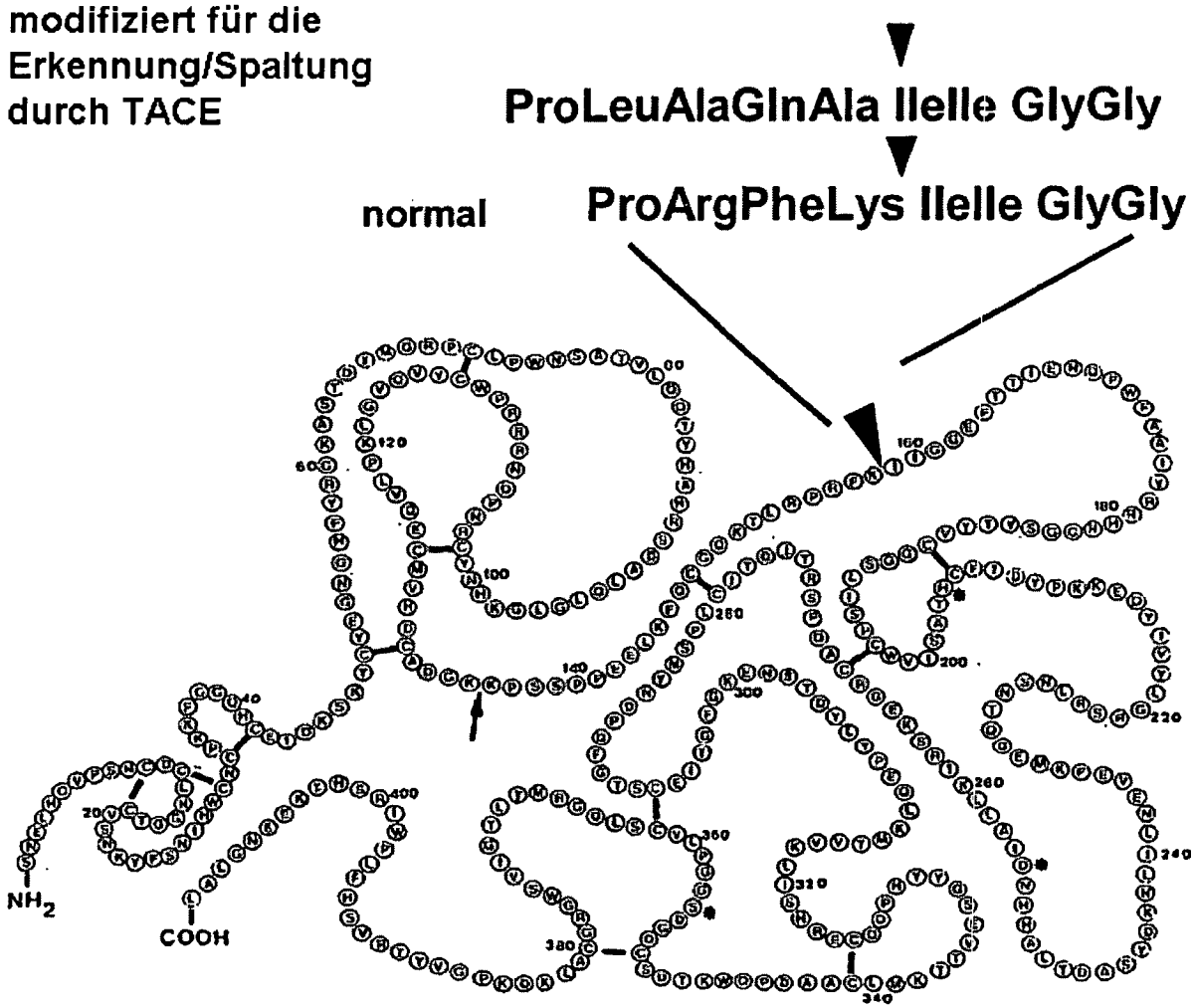

modifiziert für die Erkennung/Spaltung durch TACE
ProLeuAlaGlnAla IleIle GlyGly
normal
ProArgPheLys IleIle GlyGly
NH2
COOH

Fig. 3B

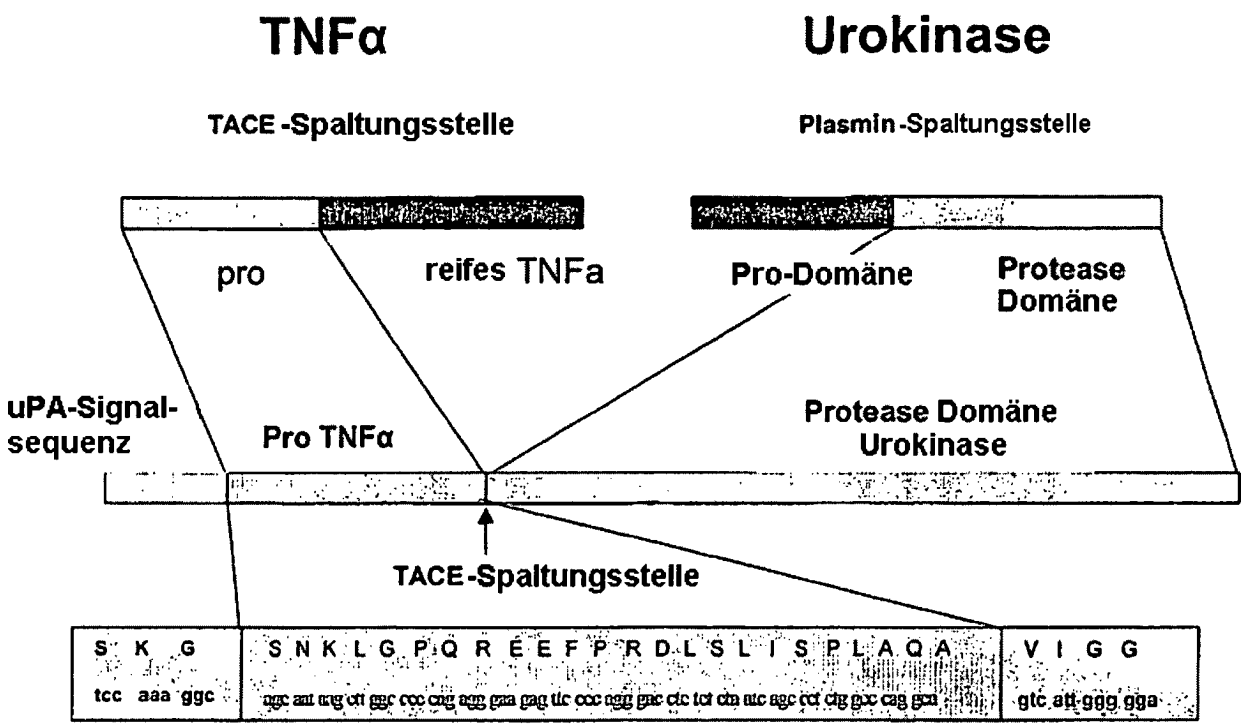

TNFα
Urokinase
TACE-Spaltungsstelle
Plasmin-Spaltungsstelle
pro
reifes TNFa
Pro-Domäne
Protease Domäne
uPA-Signal-sequenz
Pro TNFα
Protease Domäne Urokinase
TACE-Spaltungsstelle
S K G
tcc aaa ggc
S N K L G P Q R E E F P R D L S L I S P L A Q A
V I G G
gtc att ggg gga

Fig. 3C

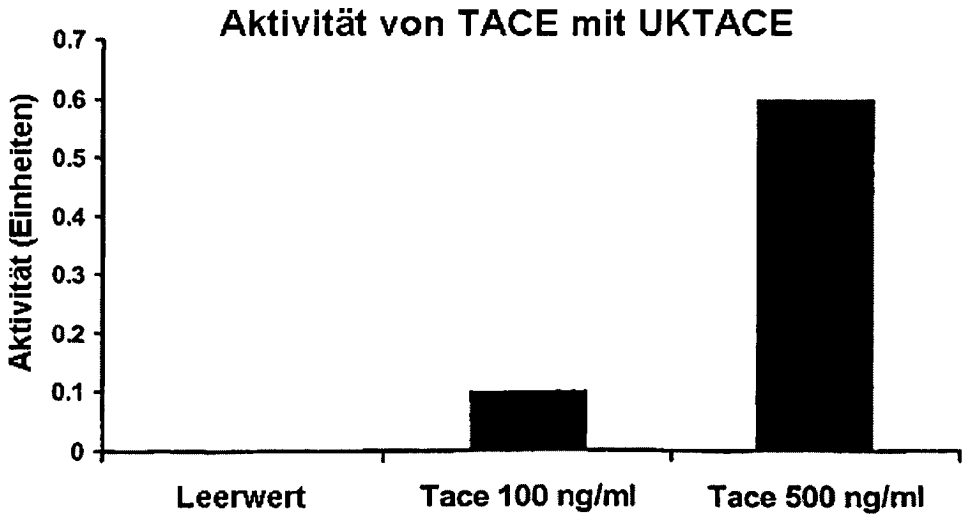

Aktivität von TACE mit UKTACE
Aktivität (Einheiten)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Leerwert
Tace 100 ng/ml
Tace 500 ng/ml

Fig. 4A

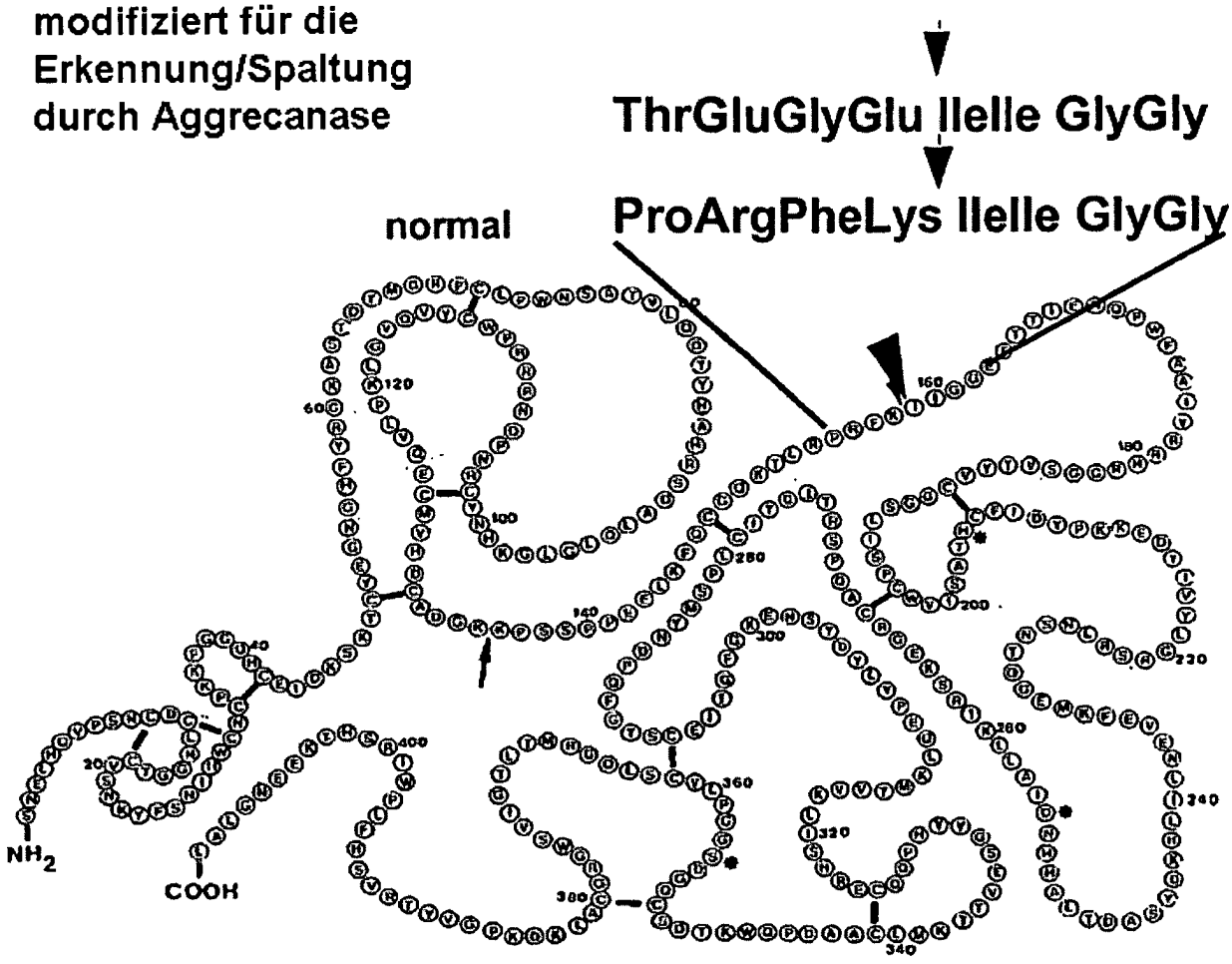

modifiziert für die
Erkennung/Spaltung
durch Aggrecanase
ThrGluGlyGlu IleIle GlyGly
normal
ProArgPheLys IleIle GlyGly
NH2
COOH

Fig. 4B

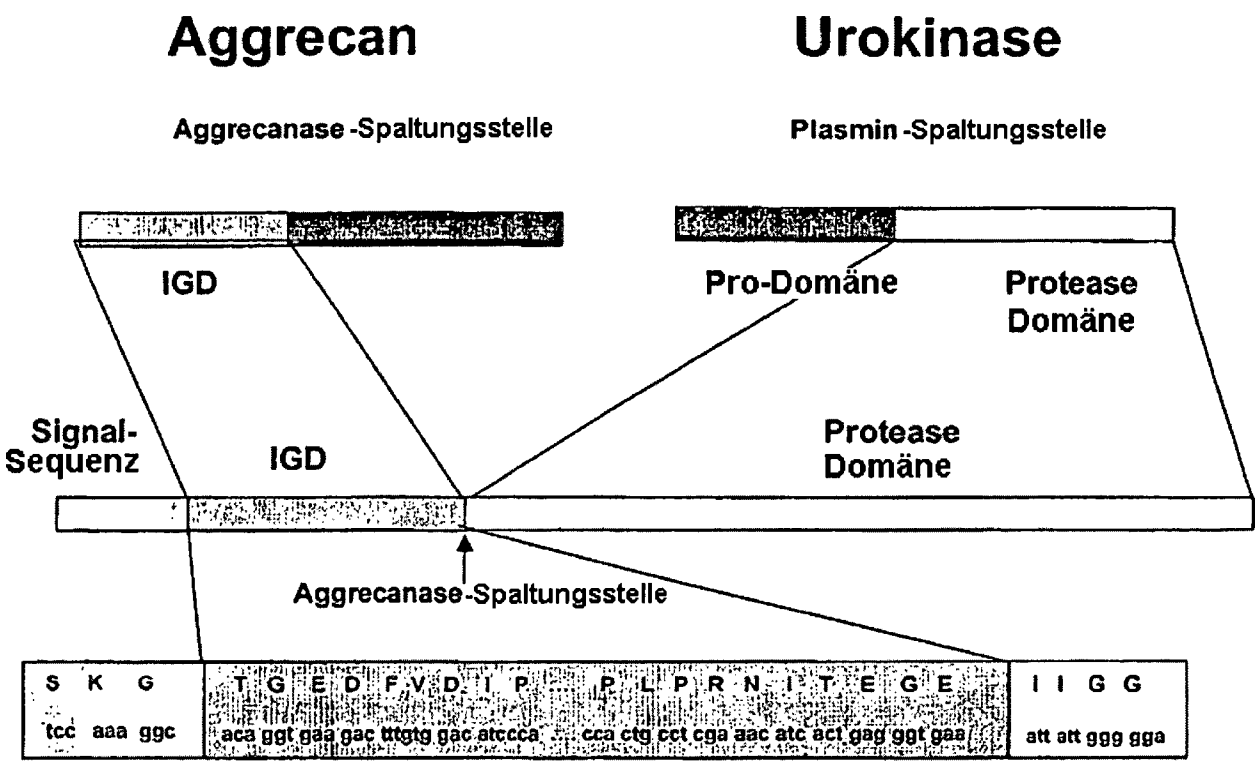
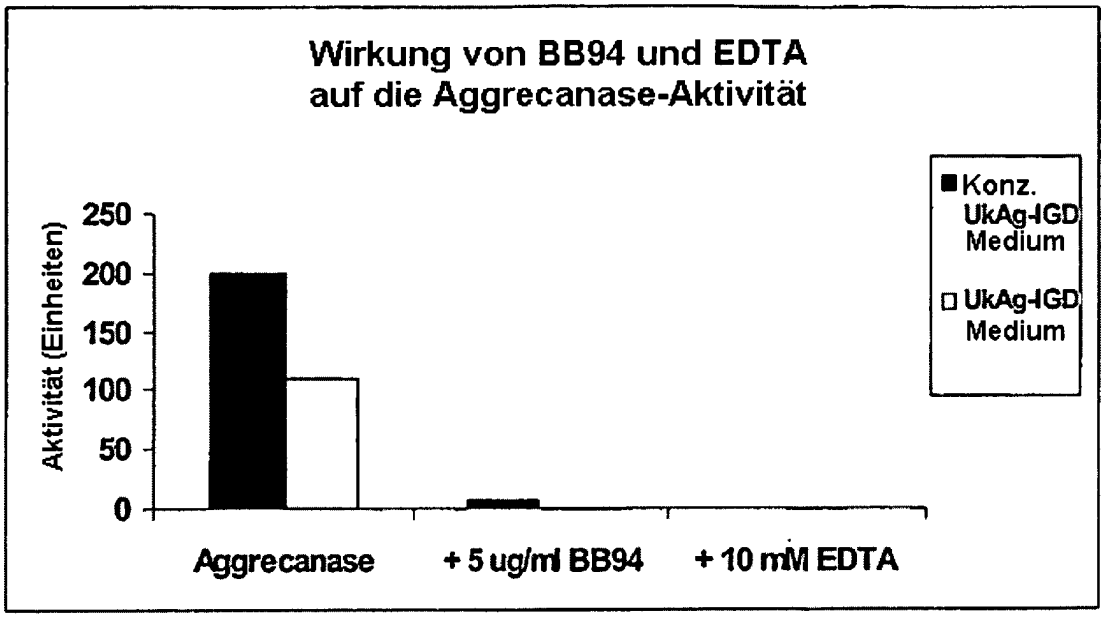

Aggrecan
Urokinase
Aggrecanase-Spaltungsstelle
Plasmin-Spaltungsstelle
IGD
Pro-Domäne
Protease Domäne
Signal-Sequenz
IGD
Protease Domäne
Aggrecanase-Spaltungsstelle
S K G
tcc aaa ggc
T G E D F V D I P P L P R N I T E G E
aca ggt gaa gac ttgtg gac atccca cca ctg cct cga aac atc act gag ggt gaa
I I G G
att att ggg gga

Fig. 4C


Wirkung von BB94 und EDTA
auf die Aggrecanase-Aktivität
Aktivität (Einheiten)
250
200
150
100
50
0
Aggrecanase
+ 5 ug/ml BB94
+ 10 mM EDTA
Konz. UkAg-IGD Medium
UkAg-IGD Medium

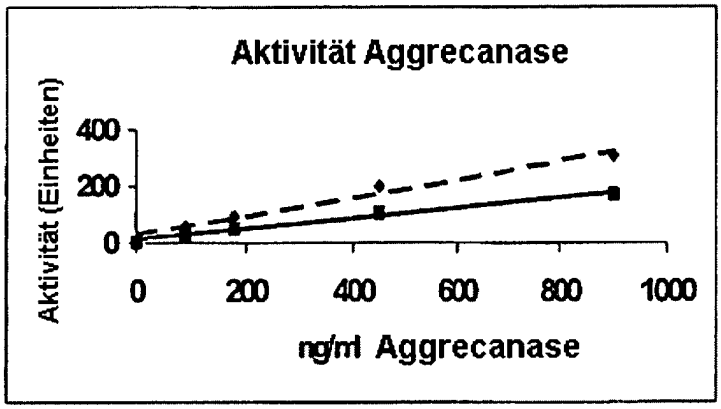

Aktivität Aggrecanase
Aktivität (Einheiten)
400
200
0
0
200
400
600
800
1000
ng/ml Aggrecanase

Fig. 5

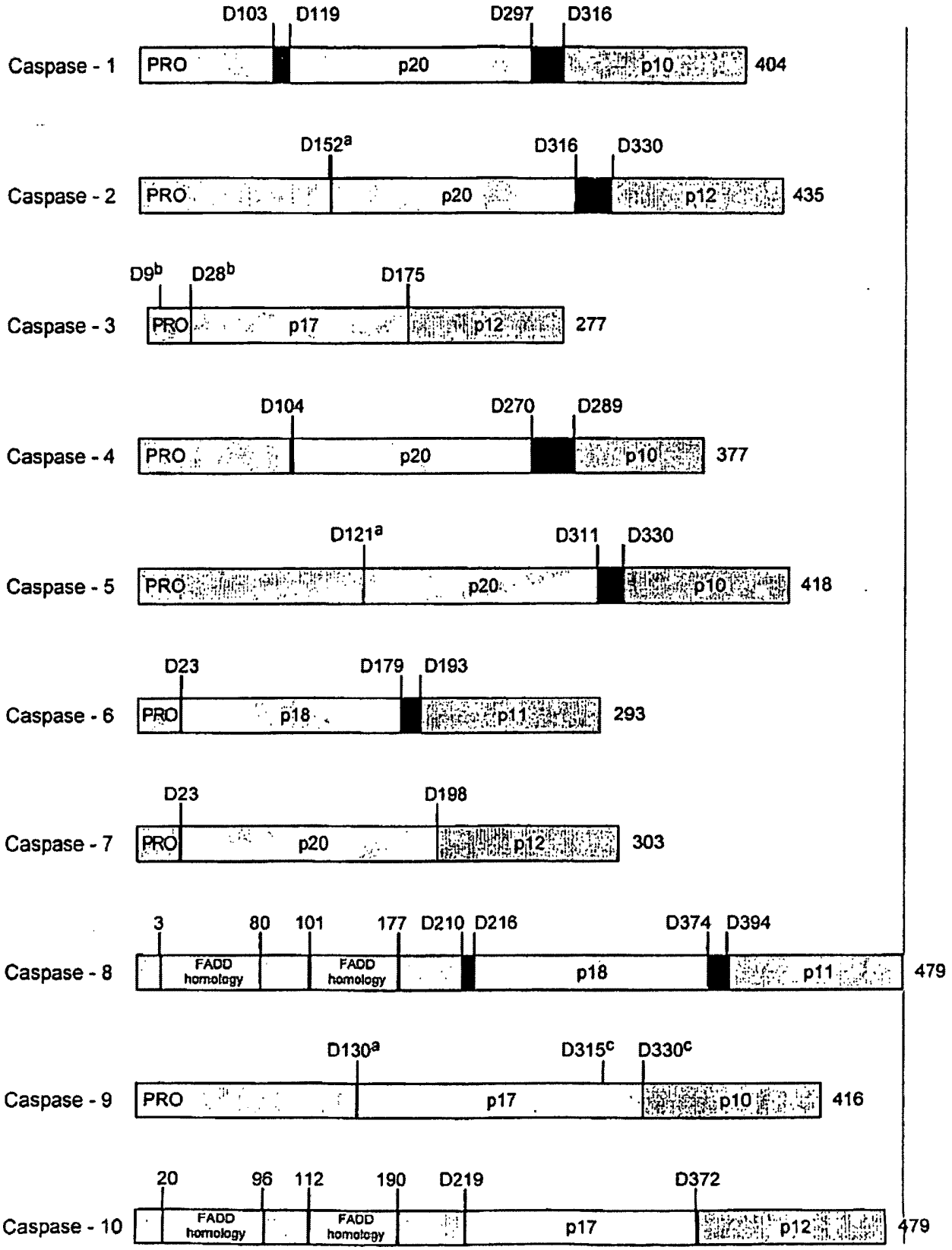

Caspase - 1
D103
D119
D297
D316
PRO
p20
p10
404
Caspase - 2
D152a
D316
D330
PRO
p20
p12
435
Caspase - 3
D9b
D28b
D175
PRO
p17
p12
277
Caspase - 4
D104
D270
D289
PRO
p20
p10
377
Caspase - 5
D121a
D311
D330
PRO
p20
p10
418
Caspase - 6
D23
D179
D193
PRO
p18
p11
293
Caspase - 7
D23
D198
PRO
p20
p12
303
Caspase - 8
3
80
101
177
D210
D216
D374
D394
FADD homology
FADD homology
p18
p11
479
Caspase - 9
D130a
D315c
D330c
PRO
p17
p10
416
Caspase - 10
20
96
112
190
D219
D372
FADD homology
FADD homology
p17
p12
479

Fig. 6

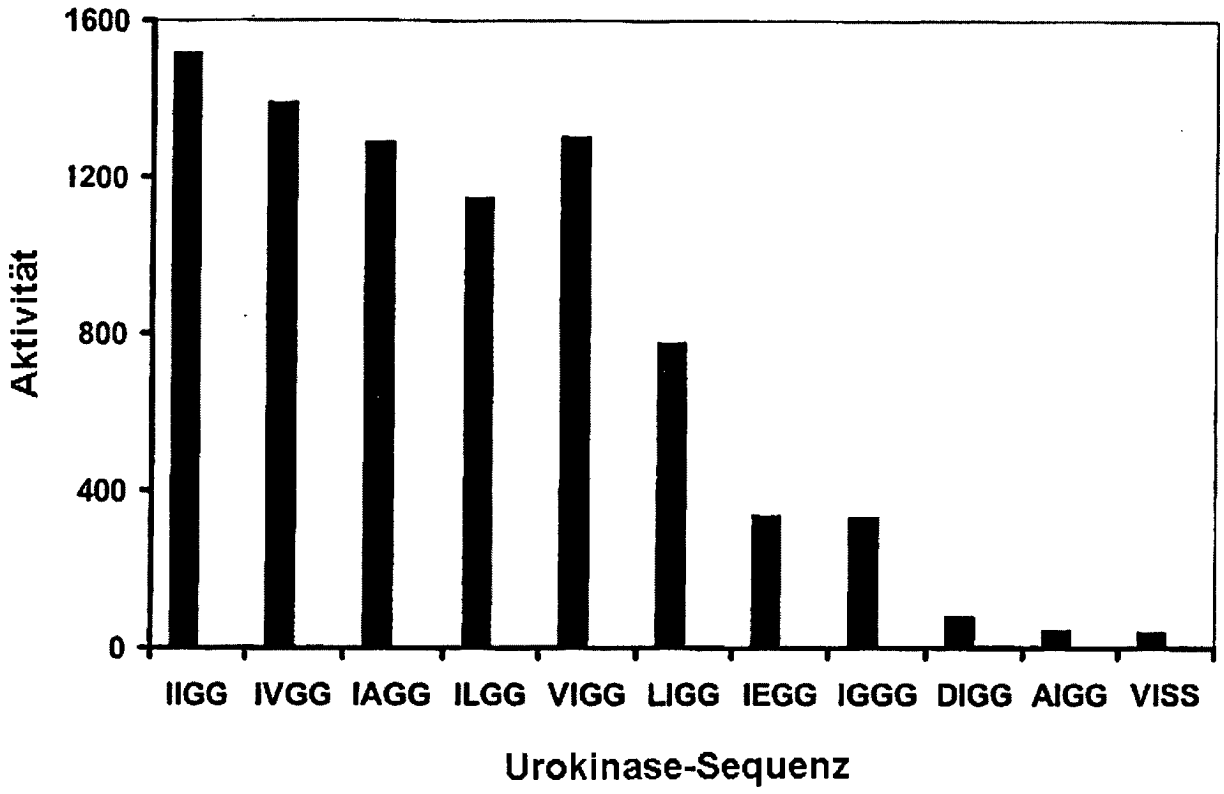

1600
1200
800
400
0
Aktivität
IIGG
IVGG
IAGG
ILGG
VIGG
LIGG
IEGG
IGGG
DIGG
AIGG
VISS
Urokinase-Sequenz

Fig. 7A

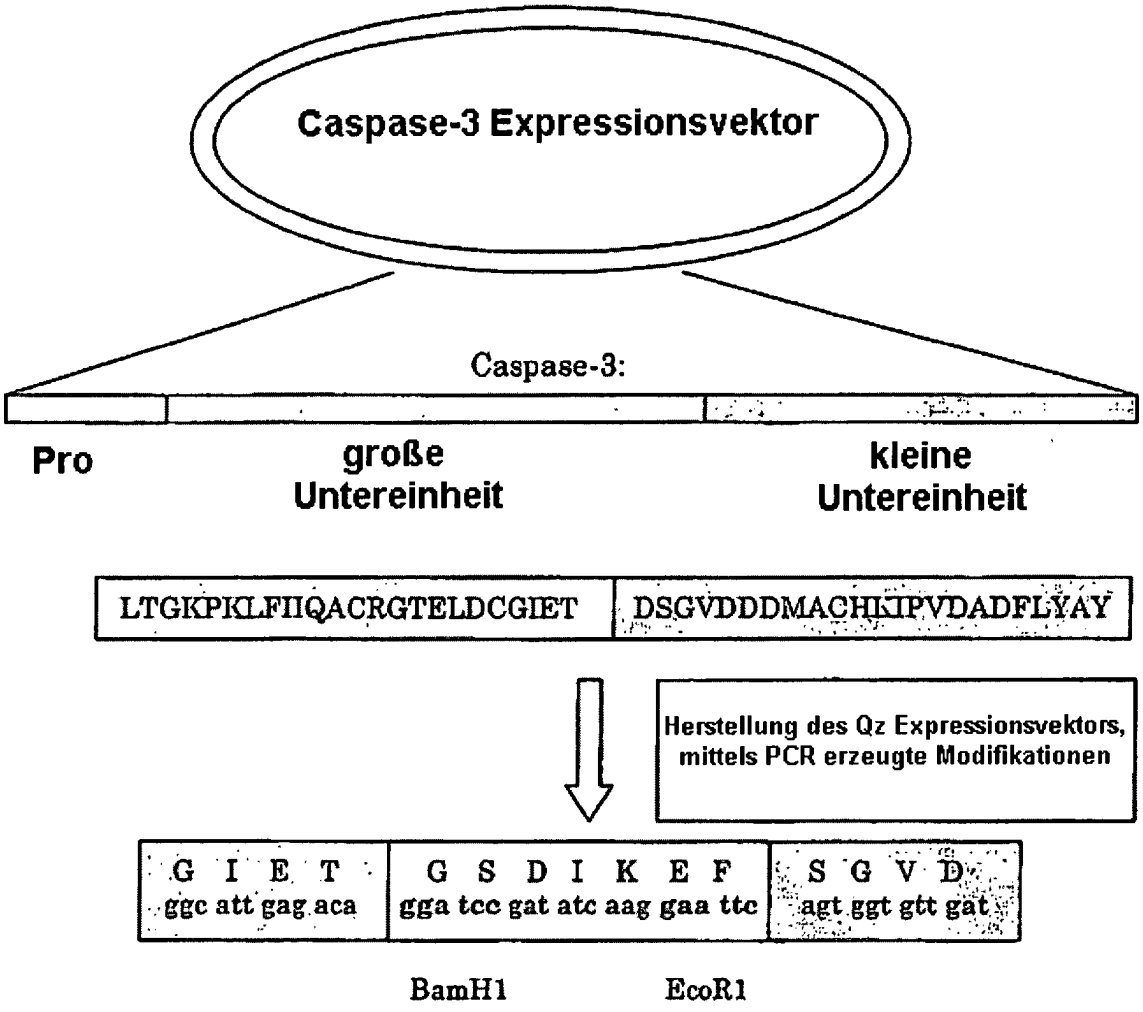

Caspase-3 Expressionsvektor
Caspase-3:
Pro
große Untereinheit
kleine Untereinheit
LTGKPKLFIIQACRGTELDCGIET
DSGVDDDMACHKIPVDADFLYAY
Herstellung des Qz Expressionsvektors, mittels PCR erzeugte Modifikationen
G I E T
ggc att gag aca
G S D I K E F
gga tcc gat atc aag gaa ttc
S G V D
agt ggt gtt gat
BamH1
EcoR1

Fig. 7B

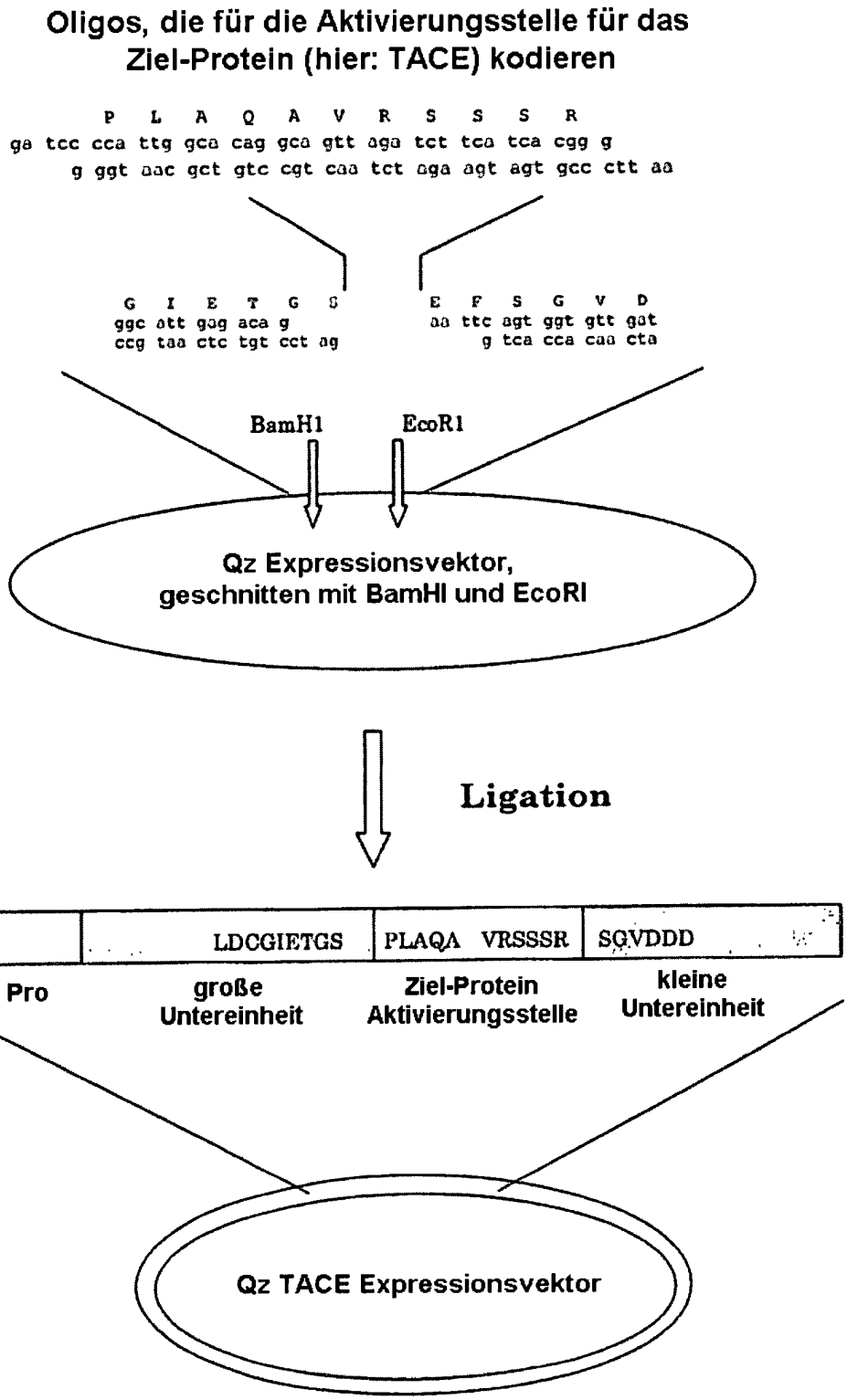

Oligos, die für die Aktivierungsstelle für das Ziel-Protein (hier: TACE) kodieren
P L A Q A V R S S S R
ga tcc cca ttg gca cag gca gtt aga tct tca tca cgg g
g ggt aac gct gtc cgt caa tct aga agt agt gcc ctt aa
G I E T G S
ggc att gag aca g
ccg taa ctc tgt cct ag
E F S G V D
aa ttc agt ggt gtt gat
g tca cca caa cta
BamH1
EcoR1
Qz Expressionsvektor, geschnitten mit BamHI und EcoRI
Ligation
LDCGIETGS
PLAQA VRSSSR
SGVDDD
Pro
große Untereinheit
Ziel-Protein Aktivierungsstelle
kleine Untereinheit
Qz TACE Expressionsvektor

Fig. 8

Reinigung von modifizierter Pro-Caspase 3 mit Aggrecanase-Spaltungsstelle

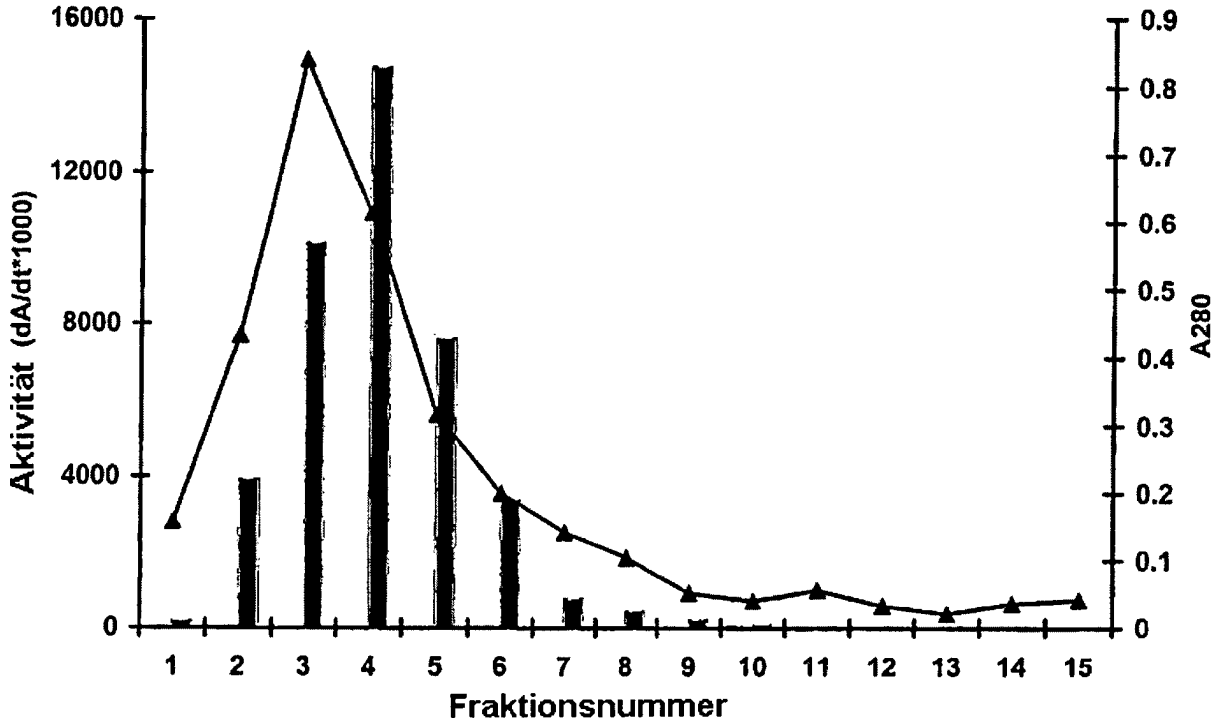


Fig. 9

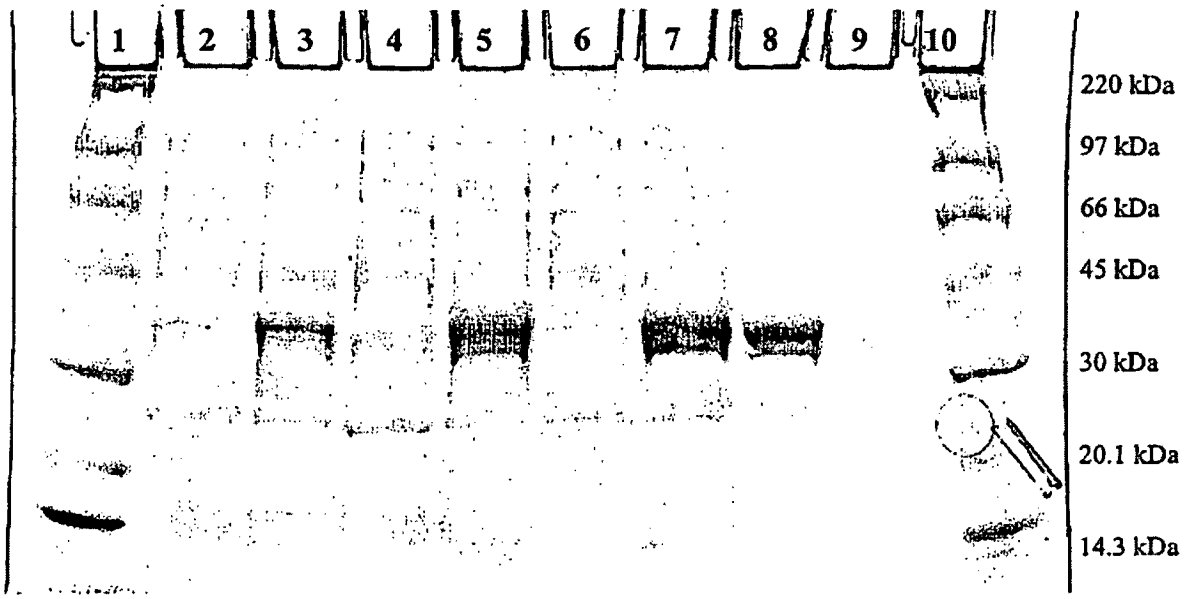


Fig. 10A

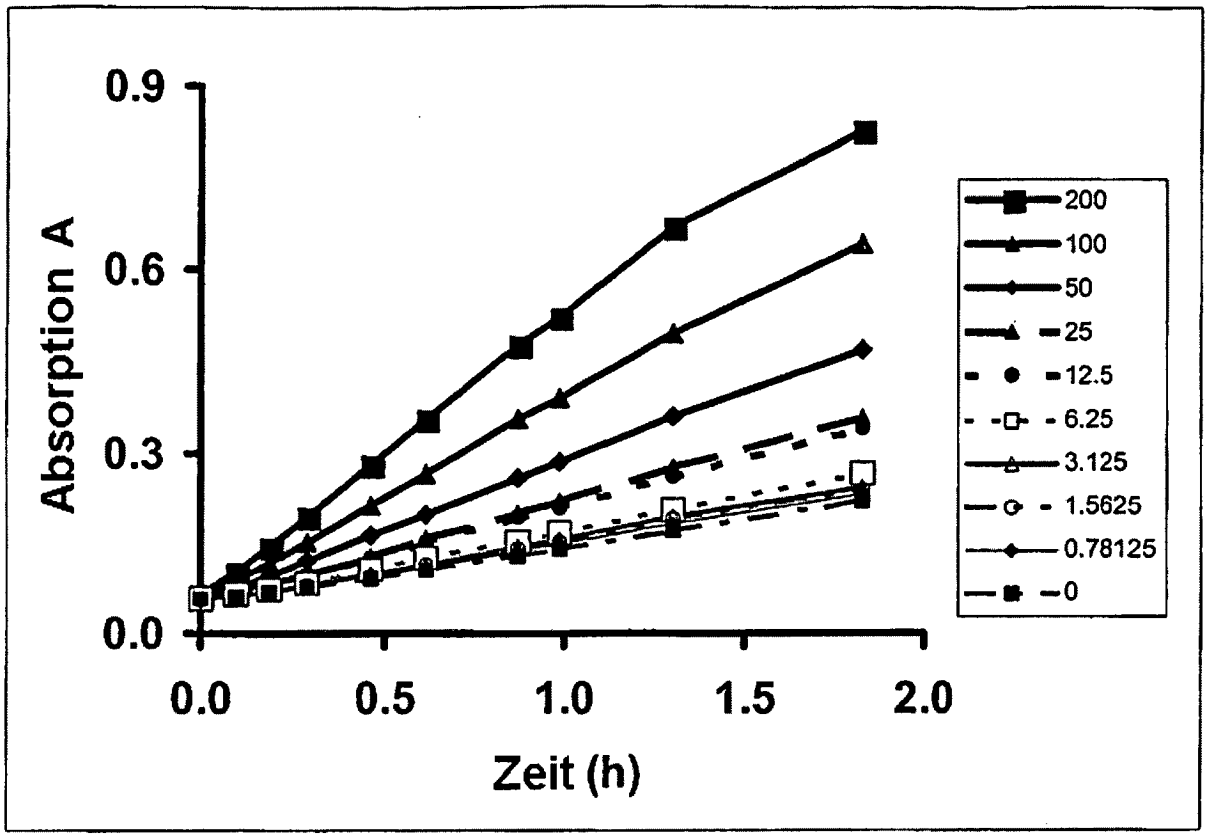


Fig. 10B

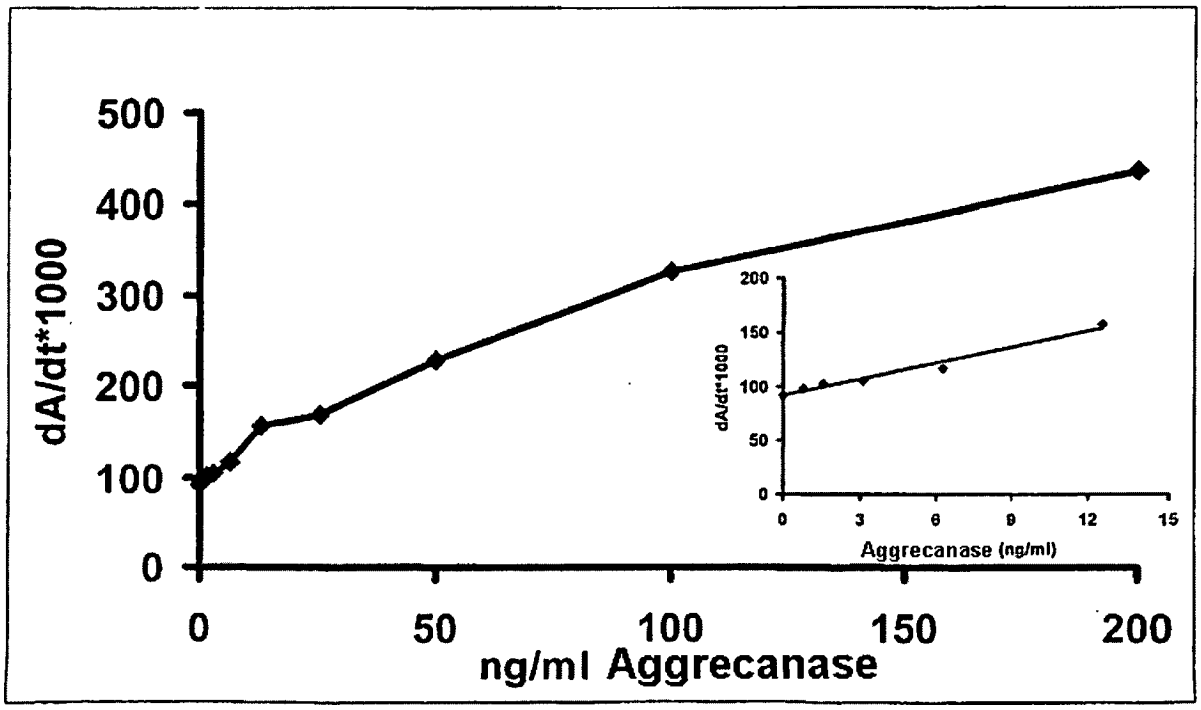


Fig. 11: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des TACE-Aktivitätsassays

Fig. 11A

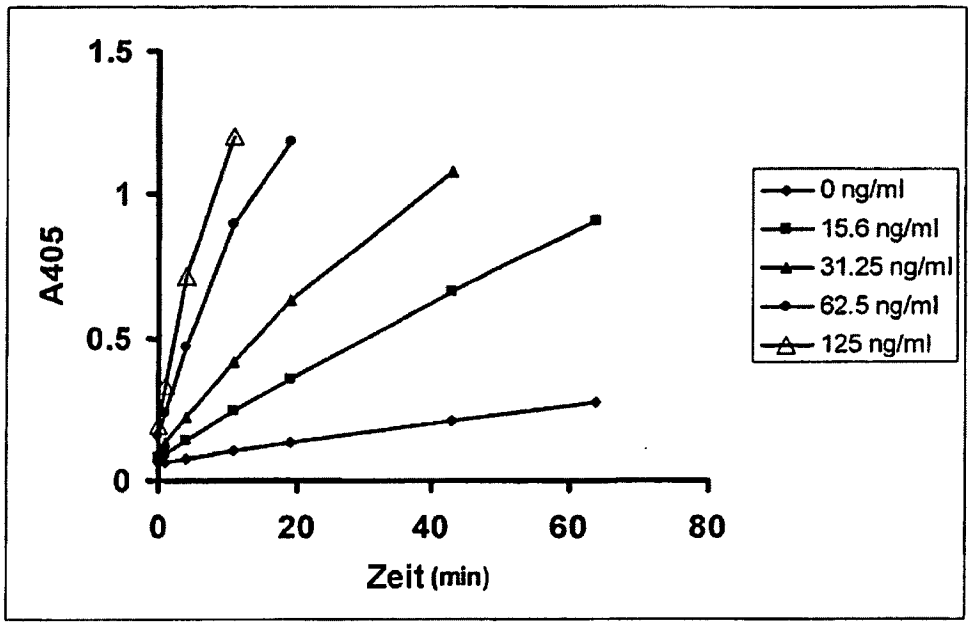


Fig. 11B

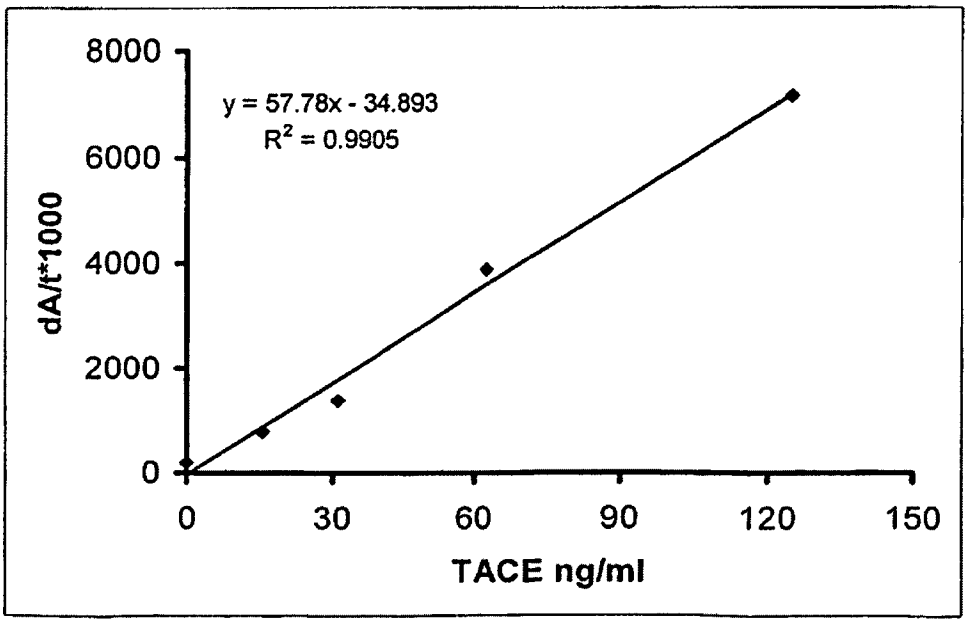


Fig. 12A

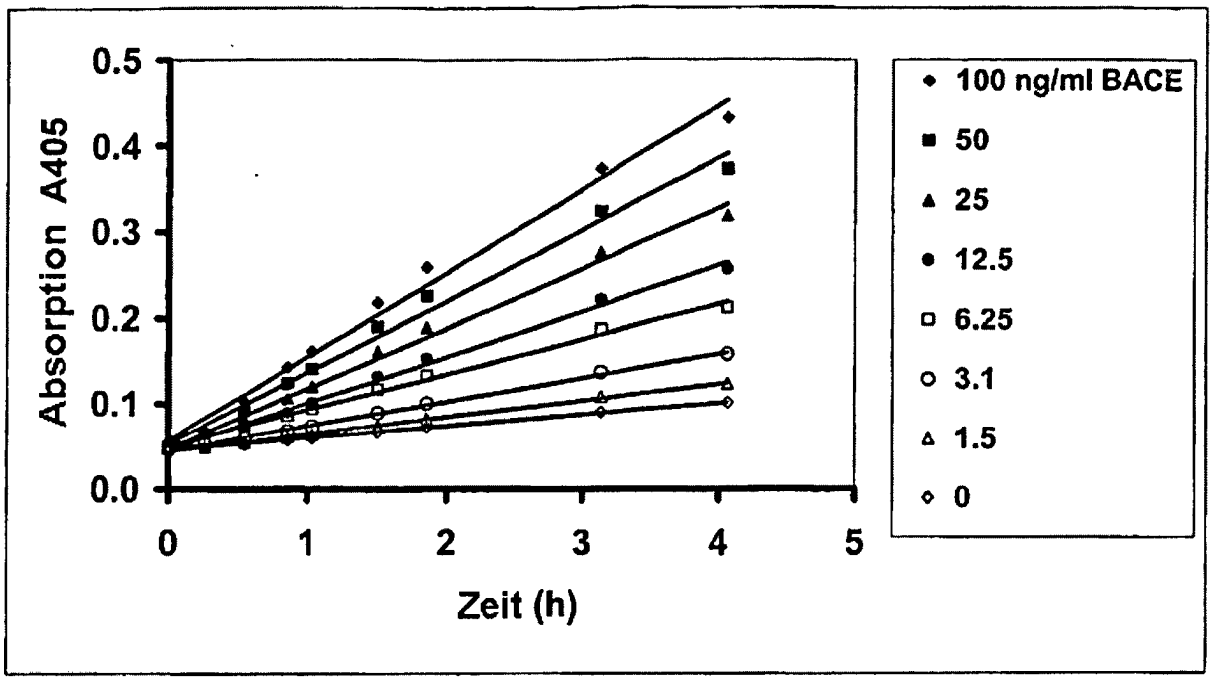


Fig. 12B

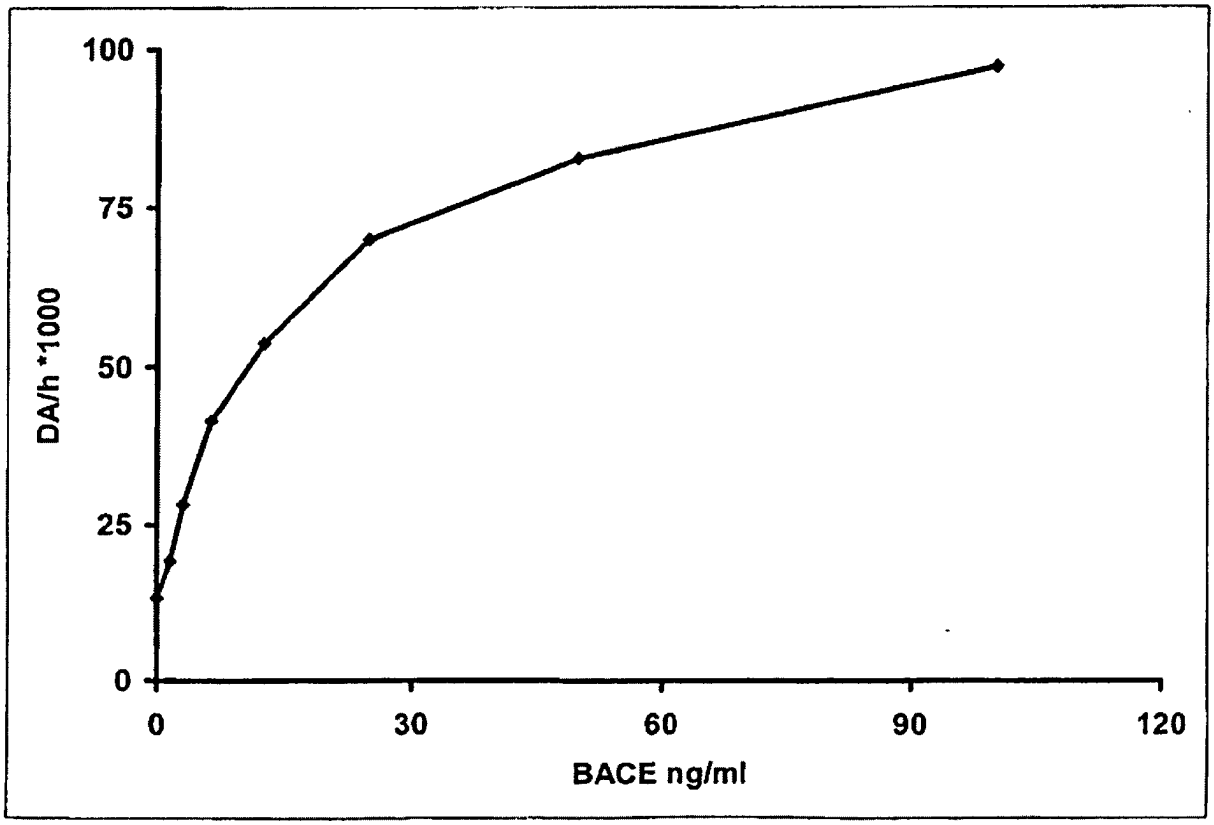


Fig. 13A

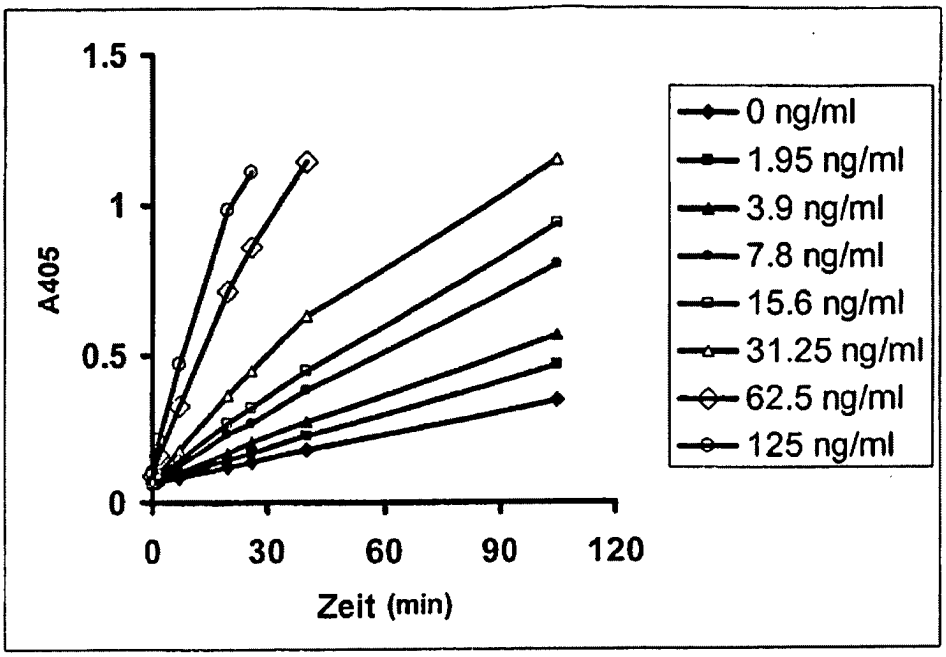


Fig. 13B

