



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 103 24 447 A1 2004.12.30

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 103 24 447.6

(51) Int Cl.⁷: C07K 2/00

(22) Anmeldetag: 28.05.2003

C07K 1/00, C12Q 1/00

(43) Offenlegungstag: 30.12.2004

(71) Anmelder:

Scil Proteins GmbH, 06120 Halle, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

WO 99/16 873 A1

WO 01/04 144 A2

Biochemistry. 1994, Jun 14, 33(23):7300-8 (Abstr);

J Mol Recognit. 2000 Jul-Aug, 13(4):167-87

(Abstr);

Nat Struc Biol. 1997 Oct, 4(10):805-9 (Abstr);

<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/data/scop.b.e.ca.html> (rech. am 10.03.04);

(74) Vertreter:

PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR,
80801 München

(72) Erfinder:

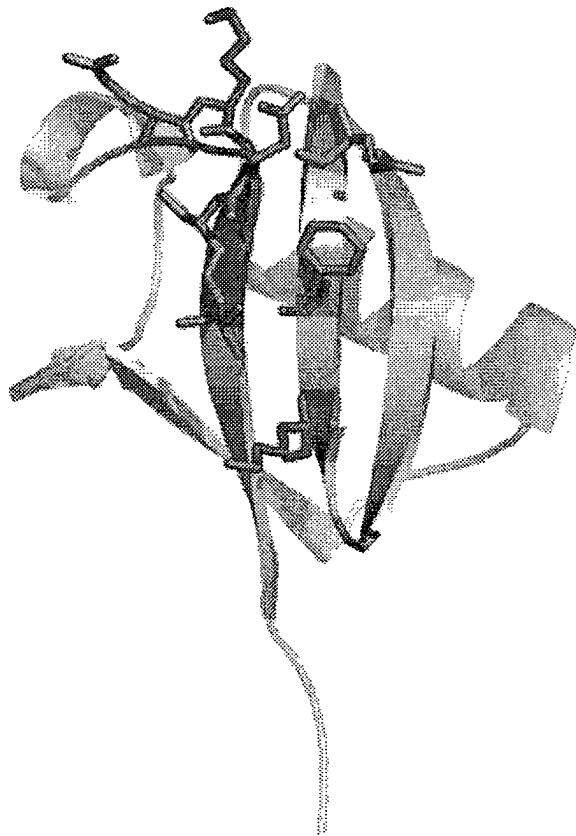
Fiedler, Markus, Dr., 06114 Halle, DE; Rudolph,
Rainer, Dr., 06120 Halle, DE; Fiedler, Ulrike, Dr.,
06114 Halle, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Generierung künstlicher Bindungsproteine auf der Grundlage von Ubiquitin**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von modifizierten Proteinen der Protein-Superfamilie "ubiquitin-like proteins", Proteinen, die ein Ubiquitin-artiges Faltungsmotiv aufweisen sowie Fragmente oder Fusionsproteinen hiervon, wobei das Protein aufgrund dieser Modifikation eine vorher nicht vorhandene Bindungsaffinität gegenüber einem vorbestimmten Bindungspartner aufweist, sowie ein gemäß diesem Verfahren erhältliches Protein und dessen Verwendung.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von modifizierten Proteinen der Protein-Superfamilie „ubiquitin-like proteins“, Proteinen, die ein Ubiquitin-artiges Faltungsmotiv aufweisen sowie Fragmenten oder Fusionsproteinen hiervon, wobei das Protein aufgrund dieser Modifikation eine vorher nicht vorhandene Bindungsaaffinität gegenüber einem vorbestimmten Bindungspartner aufweist, sowie ein gemäß diesem Verfahren erhältliches Protein und dessen Verwendung.

Stand der Technik

[0002] Ubiquitin ist ein kleines, monomeres und zytosolisches Protein, das – in seiner Sequenz hochkonserviert – von den Protozoen bis zu den Vertebraten in allen bekannten eukaryotischen Zellen vorkommt. Es spielt im Organismus eine grundlegende Rolle bei der Regulation des kontrollierten Abbaus zelleigener Proteine. Hierbei werden die zum Abbau bestimmten Proteine beim Durchlaufen einer Enzymkaskade kovalent mit Ubiquitin oder Polyubiquitin-Ketten verknüpft und aufgrund dieser Markierung selektiv abgebaut. Nach neueren Erkenntnissen spielt Ubiquitin bzw. die Markierung von Proteinen mit Ubiquitin auch bei anderen zellulären Prozessen, wie beim Import mancher Proteine oder deren Genregulation eine wichtige Rolle (Marx, 2002).

[0003] Neben der Aufklärung seiner physiologischen Funktion ist Ubiquitin vor allem wegen seiner strukturellen und proteinchemischen Eigenschaften Objekt der Forschung. Die Polypeptidkette des Ubiquitins besteht aus 76 Aminosäuren, die in einer äußerst kompakten alphasubunit-beta-Struktur gefaltet sind (Vijay-Kumar, 1987): Nahezu 87 % der Polypeptidkette sind durch Wasserstoffbrücken an der Ausbildung der Sekundärstrukturelemente beteiligt. Als prominente Sekundärstrukturen können drei-einhalb alpha-helikale Windungen sowie ein aus fünf Strängen bestehendes, antiparalleles beta-Faltblatt gelten. Die charakteristische Anordnung dieser Elemente – ein zu einer Oberfläche des Proteins exponiertes antiparalleles beta-Faltblatt, welches auf seiner Rückseite von einer senkrecht darüber liegenden alpha-Helix bedeckt wird, – gilt generell als sogenanntes Ubiquitin-artiges Faltungsmotiv. Ubiquitin ist daher namensgebend für die entsprechende Protein-Superfamilie („ubiquitin-like proteins“) bzw. Protein-Familie („ubiquitin-related Proteins“) (Murzin et al., 1995), welche Proteine wie z. B. SUMO-1 (Müller et al., 2001), FAU (Michiels et al., 1993), NEDD-8 (Kumar et al., 1993), UBL-1 (Jones und Candino, 1993) und GDX (Filippi et al., 1990), die dieses Motiv und einen hohen Identitätsgrad zu Ubiquitin in ihrer Primärsequenz aufweisen, umfassen. Ein weiteres Merkmal der Struktur ist ein ausgeprägter hydrophober Bereich im Inneren des Proteins zwischen alpha-Helix und beta-Faltblatt.

[0004] Die künstliche Herstellung von Ubiquitin ist aufgrund der geringen Größe sowohl durch chemische Synthese, als auch mittels biotechnologischer Verfahren möglich. Wegen der günstigen Faltungseigenschaften kann Ubiquitin bei der gentechnischen Gewinnung mit Hilfe von Mikroorganismen wie z. B. *Escherichia coli* in verhältnismäßig großen Mengen wahlweise im Zytosol oder dem periplasmatischen Raum produziert werden. Letztere Strategie ist aufgrund des im Periplasma vorherrschenden oxidierenden Milieus gewöhnlich der Produktion sekretorischer Proteine vorbehalten. Die einfache und effiziente bakterielle Herstellung ermöglicht die Verwendung von Ubiquitin als Fusionspartner für andere herzustellende Fremdproteine, deren Produktion problematisch ist. Durch die Fusion mit Ubiquitin kann eine verbesserte Löslichkeit und damit eine verbesserte Ausbeute erzielt werden. Der in der vorliegenden Erfindung realisierte Ansatz, Ubiquitin als universelles künstliches Bindungsprotein bereitzustellen, ermöglicht eine völlig neuartige Ausnutzung seiner proteinchemischen Eigenschaften.

[0005] Unter denjenigen Proteinen, deren natürliche Funktion für künstliche Anwendungen – etwa in der Biotechnologie, der Bioanalytik oder der Medizin – genutzt wird, nehmen Antikörper (d. h. die Immunglobuline) eine herausragende Stellung ein. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur spezifischen, nicht-kovalenten Bindung annähernd jeder beliebigen Substanz stellen sie für nahezu jede biowissenschaftliche Anwendung, die eine Erkennung, Bindung oder Abtrennung von Liganden, Rezeptoren oder sonstigen Zielmolekülen erfordert, das wichtigste Werkzeug dar. Die in den letzten Jahren entwickelten Methoden zur funktionellen Biosynthese von Antikörperfragmenten in *E. coli* haben die Anwendbarkeit der Immunglobuline zudem erweitert, gleichzeitig jedoch auch Schwierigkeiten und Grenzen sichtbar gemacht.

[0006] Neben den im Prinzip auch durch konventionelle proteinchemische Methoden erhältlichen F_{ab} - und F_v -Fragmenten (Skerra und Plückthun, 1988) konnten mit Hilfe gentechnischer Methoden und aufgrund des modularen Aufbaus der Immunglobuline diverse künstliche Konstrukte entwickelt werden (Überblick in Dübel und Kontermann, 2001). Hervorzuheben sind hier Single-Chain F_v -Fragmente (scFv) (Bird et al., 1988), disulfidverbrückte F_v -Fragmente (dsFv) (Brinkmann et al., 1993) sowie bivalente (Carter et al., 1992) bzw. bispezifische (z. B. Diabodies, Holliger et al., 1993) Antikörperfragmente. Für die Diagnostik und den Einsatz in der

Therapie können durch genetische Fusion der rekombinanten Ig-Fragmente mit Effektormodulen bifunktionelle Proteine erhalten werden. So stehen u. a. Fusionen mit der Alkalischen Phosphatase (Muller et al., 1999) und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP; Griep et al., 1999) zur Verfügung. Fusionen von Antikörperfragmenten mit Radioisotopen oder zytotoxischen Substanzen sind für die Krebsbehandlung von potentiell großer Bedeutung (Immunotoxine; Reiter und Pastan, 1998). Dabei wird die selektive Bindung entsprechender Ig-Fragmente an spezifische Oberflächenproteine auf Tumorzellen für die ortsgerichtete Applikation von Therapeutika ausgenutzt (Tumor Targeting).

[0007] Die Methoden zur Herstellung von Antikörperfragmenten in *E. coli* ermöglichen jedoch nicht nur deren Bereitstellung für Diagnostik und Therapie in ausreichender Qualität und Quantität, sondern auch die einfache und schnelle Modifikation ihrer protein- und immunochemischen Eigenschaften. Die leichte Handhabbarkeit eines bakteriellen Wirts erlaubt die unkomplizierte Veränderung der vektorkodierten Gene des Fremdproteins mit molekularbiologischen Standardmethoden. Durch gezieltes Antibody Engineering (Kontermann und Dübel, 2001) können so Antikörperfragmente z. B. hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität oder ihrer Wirtsverträglichkeit optimiert werden. Ebenso lassen sich spezifische Antikörper bzw. deren Fragmente gegen so unterschiedliche Zielsubstanzen wie niedermolekulare Strukturen oder z. B. Proteine künstlich d. h. außerhalb des Immunsystems herstellen. Bei solchen evolutiven Verfahren werden durch die Einführung von Zufallsmutationen synthetische Bibliotheken von Antikörperfragmenten hergestellt, die in ihrem Umfang dem menschlichen Repertoire nahe kommen können (Knappik et al., 2000). Durch geeignete Selektionsstrategien wie dem Phage Display oder dem Ribosome Display (Winter, 1998, Hoogenboom et al., 1998; Hanes et al., 2000) werden im Erfolgsfall funktionelle Ig-Fragmente mit der gewünschten Bindungseigenschaft isoliert. Auf diese Weise ist es z. B. auch möglich, Bindeproteine für solche Antigene zu erhalten, die bei einer klassischen Immunisierung toxische Effekte oder nur eine schwache Immunantwort hervorrufen würden.

[0008] Trotz der genannten Erfolge und Möglichkeiten, die das Antibody Engineering bietet, können bestimmte Nachteile die praktische Verwendung von Antikörpern limitieren. So ist die Bereitstellung ausreichender Mengen problematisch: Die Produktion funktioneller Antikörper findet in eukaryotischen Zellkultursystemen – einem äußerst kostenintensiven Verfahren – statt. Weiterhin stehen die aufgrund ihrer Größe geringe Gewebe penetration der Antikörpermoleküle bzw. deren lange Verweildauer im Serum (langsame Blut-clearance) vielen therapeutischen Anwendungen entgegen. Kleinere Fragmente von Antikörpern wie scF_v oder F_{ab}-Fragmente (s. o.) lassen sich zwar bakteriell und damit prinzipiell kostengünstiger herstellen, aufgrund ihrer ungünstigen Faltungseigenschaften und der notwendigen Ausbildung mehrerer Disulfidbrücken liegen die Ausbeuten der rekombinanten Produktion allerdings oft unter dem gewünschten Niveau. Weiterhin sind rekombinante Antikörperfragmente oftmals instabiler und weisen eine geringere Bindungsaktivität im Vergleich zum parentalen Antikörper auf.

[0009] Um solche Einschränkungen zu umgehen wird versucht, das Prinzip der Antikörperbindung – nämlich die Bindung mittels einer hypervariablen oberflächenexponierten Region, lokalisiert auf einem konservierten Proteingerüst – auf andere Proteine zu übertragen (Skerra, 2000). D.h. es werden vornehmlich variable Schleifen (Loops) variiert, um eine künstliche Bindungseigenschaft zu generieren. Dabei wird im allgemeinen von natürlichen Bindungsproteinen wie z. B. Lipocalinen (Beste et al., 1999) oder der Fibronectin Typ III-Domäne (Koide et al., 1998) ausgegangen, deren Bindungsstellen – analog zu Antikörpern – aus flexiblen „Loop“-Strukturen gebildet werden und deren Modifikation die Erkennung von anderen als den natürlichen Liganden ermöglicht.

[0010] Alternativ hierzu wird gemäß WO 01/04144 bei beta-Faltblatt-Strukturproteinen, die per se keine Bindungsstelle aufweisen, eine solche künstlich auf der Proteinoberfläche generiert. Durch eine solche de novo generierte, künstliche Bindungsstelle (s. u.) können z. B. Varianten des γ-Kristallins – einem Strukturprotein der Augenlinse – erhalten werden, die mit vorher definierten Substanzen mit quantifizierbarer Affinität und Spezifität wechselwirken. Im Unterschied zu der oben beispielhaft angeführten Modifikation vorhandener und aus flexiblen „Loop“-Strukturen gebildeter Bindungsstellen, werden diese gemäß WO 01/04144 de novo auf der Oberfläche von beta-Faltblättern erzeugt. Die WO 01/04144 beschreibt jedoch lediglich die Veränderung vergleichsweise großer Proteine zur Erzeugung von neuen Bindungseigenschaften. Aufgrund deren Größe sind die Proteine gemäß WO 01/04144 auf gentechnischer Ebene nur durch vergleichsweise aufwendige Methoden modifizierbar. Bei den bisher offenbarten Proteinen wurde prozentual auch nur ein verhältnismäßig kleiner Anteil der gesamten Aminosäuren verändert, um die Gesamtstruktur des Proteins zu erhalten. Demnach steht auch ein nur relativ kleiner Bereich der Proteinoberfläche zur Verfügung, der zur Erzeugung vorher nicht vorhandener Bindungseigenschaften genutzt werden kann. Weiterhin offenbart die WO 01/04144 experimentell lediglich die Erzeugung einer Bindungseigenschaft an niedermolekulare, kleine Moleküle jedoch nicht an größere Moleküle wie z. B. Proteine.

Aufgabenstellung

[0011] Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Proteine mit neuen, vorher nicht vorhandenen Bindungsaffinitäten zu ausgewählten Bindungspartnern bereitzustellen, die obige Nachteile nicht aufweisen. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, Ersatzmoleküle für Antikörper zu schaffen, welche jedoch die oben erwähnten Nachteile von Antikörpern nicht aufweisen.

[0012] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Bereitstellung von modifizierten Proteinen gemäß Anspruch 1 gelöst, die weitgehend auf der Proteinstruktur des Ubiquitins basieren und die an ihrer Oberfläche eine künstlich generierte Bindungsstelle aufweisen.

[0013] Anspruch 1 betrifft ein durch Substitution, Insertion, Deletion, chemische Modifikation oder Kombinationen hiervon modifiziertes Protein, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Proteinen der Protein-Superfamilie „ubiquitin-like proteins“, Proteinen, die ein Ubiquitinartiges Faltungsmotiv aufweisen sowie Fragmenten oder Fusionsproteinen hiervon, wobei das Protein aufgrund dieser Modifikation eine vorher nicht vorhandene Bindungsaffinität gegenüber einem vorbestimmten Bindungspartner aufweist, erhältlich durch folgendes Verfahren:

- a) Auswählen eines zu modifizierenden Proteins;
- b) Bestimmen eines Bindungspartners;
- c) Auswählen von Aminosäuren in einem oberflächenexponierten Bereich des Proteins, der mindestens einen Beta-Faltblattstrang des Beta-Faltblattbereichs und wahlweise Nicht-Beta-Faltblattbereiche beinhaltet;
- d) Modifizieren der ausgewählten Aminosäuren durch Substitution, Insertion, Deletion und/oder chemische Modifikation;
- e) Inkontaktrbringen des modifizierten Proteins mit dem in Schritt b) bestimmten Bindungspartner;
- f) Ermitteln derjenigen Proteine, die eine Bindungsaffinität gegenüber dem in Schritt b) vorbestimmten Bindungspartner aufweisen.

[0014] Weiterhin hat die vorliegende Erfindung die Aufgabe, entsprechende Verfahren zur Gewinnung von oben genannten Ubiquitin-basierten modifizierten Proteinen bereitzustellen. Dies wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren gemäß Anspruch 30 gelöst.

[0015] Modifikationen von Aminosäuren des nicht oberflächenexponierten Kernbereichs des Ubiquitins sind bereits bekannt (Finucane et al., Biochemistry, Vol. 38, No. 36, 1999 oder Lazar et al., Protein Science (1997), 6:1167–1178). Die dort vorgenommenen Änderungen betreffen Positionen, die aufgrund der Lokalisation im hydrophoben Kern nicht an Bindungen beteiligt sind, da sie dem Lösungsmittel oder möglichen Bindungspartnern nicht zugänglich sind.

[0016] Im folgenden soll erläutert werden, was unter dem Begriff „vorher nicht vorhandene Bindungseigenschaft“ bzw. *de novo* generierte, künstliche Bindungsstelle in dieser Erfindung verstanden wird. Hierunter ist zu verstehen, dass das modifizierte Protein an dem modifizierten Bereich vorher keine Bindungseigenschaft zu einem vorbestimmten Bindungspartner oder einem natürlichen Bindungspartner von Ubiquitin aufweist. Als Mindestwert für das Vorliegen einer quantifizierbaren Bindungseigenschaft d.h der Affinität, mit welcher der Partner gebunden wird, kann erfindungsgemäß eine Dissoziationskonstante für den gebildeten Komplex von $K_D = 10^{-5}$ M oder kleiner angesehen werden. Ab einem Wert von 10^{-5} M kann von einer quantifizierbaren Bindungsaffinität ausgegangen werden. Bevorzugt ist je nach Anwendung ein Wert von 10^{-6} M bis 10^{-12} M, weiterhin bevorzugt 10^{-7} bis 10^{-11} M für z. B. chromatographische Anwendungen oder 10^{-9} bis 10^{-12} M für z. B. diagnostische oder therapeutische Anwendungen.

[0017] Unter Modifikation sind erfindungsgemäß Substitutionen von Aminosäuren, Insertionen, Deletionen oder chemische Modifikationen zu verstehen.

[0018] Als zu modifizierende Proteine kommen erfindungsgemäß Proteine der Superfamilie "ubiquitin-like proteins" in Frage. Diese Superfamilie umfasst erfindungsgemäß die in Murzin et al. (1995) aufgezählten Untergruppen. Hierzu gehören bspw. die Protein-Familien "ubiquitin-related proteins", „UBX domain“, „GABA-RAP-like“, „RAS-binding domain“ etc. Bevorzugt werden Proteine der Protein-Familie "ubiquitin-related proteins" eingesetzt. Erfindungsgemäß sind auch solche Proteine umfasst, die ein Ubiquitin-artiges Faltungsmotiv aufweisen. Beispiele hierfür sind SUMO-1, FAU, NEDD-8, UBL-1 und GDX.

[0019] Die Proteine der genannten Familie und Superfamilie sind in der Regel hochkonserviert. Bspw. weist Ubiquitin nach bisherigen Erkenntnissen in allen Säugern die identische Aminosäuresequenz auf. Ubiquitin

aus Hefe weist lediglich eine Abweichung in drei Aminosäuren davon auf. Humanes Ubiquitin bzw. Ubiquitin aus Säugern besteht aus 76 Aminosäuren und hat die eingangs beschriebene Struktur.

[0020] Erfidungsgemäß sollte das zu modifizierende Protein eine mindestens 30 %ige, bevorzugt mindestens 40%ige oder 50%ige, weiterhin bevorzugt mindestens 60%, mindestens 70%, mindestens 80%, mindestens 90% , oder mindestens 95 %ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zu humanem Ubiquitin aufweisen, wobei das Protein ein Ubiquitinartiges Faltungsmotiv aufweist.

[0021] Erfidungsgemäß sind auch Fragmente der genannten Proteine umfasst, solange sie das eingangs beschriebene Ubiquitin-artige Faltungsmotiv beinhalten, sowie Fusionen der genannten Proteine mit anderen Proteinen. Im Fall solcher Fragmente und Fusionsproteine sind im Rahmen dieser Erfidung Aminosäurepositionsangaben so zu verstehen, dass diese sich immer auf die entsprechende Position in humanem Ubiquitin beziehen. Beispiele für Fusionspartner sind (Reporter-)Enzyme, Toxine oder andere Bindungsproteine etc. Weiterhin ist die chemische Kopplung bspw. mit niedermolekularen Substanzen wie Biotin, Digoxigenin, fluoreszierenden und/oder lumeniszierenden Stoffen etc. möglich.

[0022] Im Fall von Fusionsproteinen kann erfidungsgemäß ein fusioniertes Protein modifiziert werden. Erfidungsgemäß ist aber auch umfasst, dass ein Teil nach Modifikation oder Selektion anfusioniert wird. Dies kann jeweils nach dem Fachmann bekannten Verfahren geschehen.

[0023] Gemäß der vorliegenden Erfidung ist das Protein, das zur Herstellung des modifizierten Proteins ausgewählt wird, bevorzugt humanes Ubiquitin oder Ubiquitin anderen Ursprungs, bspw. ein anderes Säuger-Ubiquitin.

[0024] Humanes bzw. Säuger-Ubiquitin weist, wie eingangs erwähnt, 76 Aminosäuren auf. Die Aminosäuren der fünf Betastränge, die zu Bildung des antiparallelen beta-Faltblatts beitragen, sind erfidungsgemäß entsprechend der Struktur IUBQ in der PDB-Datenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/index.html>) die folgenden Aminosäurepositionen:

Erster (aminoterminaler) Strang: 2 bis 7; zweiter Beta-Faltblattstrang: 12 bis 16; dritter Strang: 41 bis 45; vierter Strang: 48 bis 49; fünfter (carboxyterminaler) Strang: 66 bis 71. Die Lage der Stränge bei Aufsicht auf das Faltblatt (Aminotermminus unten, Carboxyterminus oben) von links nach rechts ist: 2., 1., 5., 3., 4. Strang, wobei die Polypeptidkette zwischen 1. und 5. Strang die alpha-Helix bildet.

Auswahl und Modifikation der zu modifizierenden Aminosäuren:

[0025] Ausgehend von entsprechenden Strukturdaten wie sie z. B. in der Protein Data Bank™ (Berman et al., 2000; <http://www.rcsb.org/pdb>) frei verfügbar sind, können mittels rechnergestützter Analyse die Positionen solcher Aminosäuren im Ubiquitin-Proteingehüst lokalisiert werden, deren Seitenketten oberflächenexponiert d. h. dem Lösungsmittel oder einem potentiellen Bindungspartner zugewandt sind. Weiterhin können durch rechnergestützte Analyse solche Aminosäuren im Ubiquitin identifiziert werden, deren zufällige Substitution vermutlich keinen oder nur einen geringen negativen Effekt auf die Stabilität des Proteingerüstes haben könnte. Diese Informationen können einen ersten Anhaltspunkt für die Eignung jeder einzelnen Aminosäure als Element einer Bindungsstelle darstellen, was dann einer Überprüfung in der Praxis bedarf. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfidung wurden bspw. aufgrund ihrer Oberflächenexposition und der Toleranz der Gesamtstruktur gegenüber ihrem zufälligen Austausch die Aminosäuren an den Positionen 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65 und 66 ausgewählt. Die genannten Positionen befinden sich in räumlicher Nähe zueinander am Beginn des ersten aminoterminalen beta-Faltblattstrangs (Pos. 2, 4, 6) sowie im Loop (Pos. 62, 63) bzw. am Beginn des carboxyterminalen beta-Faltblattstrangs (Pos. 64, 65, 66) und bilden mit ihren Aminosäureseitenketten einen zusammenhängenden Bereich auf der Oberfläche des Ubiquitins (**Abb. 1**). Durch zufällige Aminosäure-Substitutionen („Randomisierung“) in dem analysierten Bereich kann so – analog zu der Antigen-Bindungsstelle von Antikörpern – ein hypervariabler oberflächenexponierter Bereich auf der weiterhin intakten Proteinstruktur des Ubiquitins generiert werden.

[0026] Mit Hilfe der ProSAll-Software („Protein Structure Analysis“; Procyon Biosciences, Salzburg) konnte bspw. die Proteinstabilität von 10^4 Varianten im Vergleich zum Ubiquitin (WT) und einer gleichgroßen Stichprobe von Varianten, bei denen die Reste eines „Kontrollepitopes“ (randomisierte Positionen 24, 28, 31, 32, 35, 37, 38, 39) substituiert wurden, bestimmt werden. Dabei weisen ca. 19 % der in silico generierten Varianten, die im Bereich der Bindungsstelle zufällig substituiert worden waren, eine mindestens so hohe Stabilität wie Ubiquitin (WT) auf, während ca. 90 % stabiler als die Träger des „Kontrollepitopes“ waren (**Abb. 2**). Dieses rechnergestützte Ergebnis kann dann als Hinweis für die Auswahl geeigneter Aminosäuren dienen.

[0027] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wurden – ausgehend von den verfügbaren Strukturdaten des humanen Ubiquitins – zunächst acht Aminosäurepositionen im Bereich der zu generierenden Bindungsstelle ausgewählt. Durch zufällige Veränderungen der Primärsequenz in diesem Bereich (Random-Mutagenese) und anschließende spezifische Auswahl (Selektion) wurden solche Varianten gewonnen, welche die gewünschte Bindungsaktivität für ein vorgegebenes Hapten oder Antigen bzw. allgemein einen vorbestimmten Bindungspartner aufweisen. Obwohl den erhaltenen modifizierten Proteinen auf diese Weise eine de novo Bindungseigenschaft verliehen wird, bleiben sie hinsichtlich Struktur und proteinchemischen Eigenschaften weitestgehend mit dem Ausgangsprotein identisch. Damit weisen sie Vorteile wie z.B. geringe Größe, hohe Stabilität, kostengünstige Herstellung sowie einfache Modifizierbarkeit, gepaart mit hoher Affinität und Spezifität für einen vorher definierten Liganden auf. Die Eignung des Ubiquitins als Gerüststruktur für die Generierung künstlicher Bindungsproteine war dabei nicht vorhersehbar, da 1.) die Toleranz des Gerüsts gegenüber den umfangreichen Aminosäure-Austauschen aufgrund der geringen Größe des Ubiquitins nicht zu erwarten war und 2.) die Funktionalität der künstlichen Bindungsstelle unter Einbeziehung des als starr und unflexibel angesehenen beta-Faltblatts nicht von vornherein gegeben scheint.

[0028] Unter Antigen ist erfindungsgemäß eine Substanz zu verstehen, die von einem Antikörper gebunden wird. Der Begriff Antigen umfasst Haptene, Peptide, Proteine, Zucker, DNA etc. Aus dem Roche Lexikon Medizin (4. Auflage; <http://www.gesundheit.de/roche>) geht folgende Definition für Antigen und Hapten hervor, die für die vorliegende Erfindung übernommen wird:

Antigen (AG): Bezeichnung für jede Substanz, die vom Immunsystem als fremd ("not self") erkannt wird. Löst meist eine Immunreaktion aus, die zur Immunität führt (= "Immunogen"); im Fall der Allergie (= "Allergen") bzw. Atopie ("Atopigen") ist diese übersteigert. Das AG löst eine humorale (Antigen-Antikörper-Reaktion) u./oder zellvermittelte Abwehrreaktion (s.u. Immunität) aus. Wird das AG vom Immunsystem geduldet (Immuntoleranz), wird es auch als "Tolerogen" bezeichnet. Antigen wirksam sind v.a. komplexe u. größermolekulare Stoffe (Eiweißkörper, Polysaccharide, Nucleotide u. zahlreiche synthetische Verbindungen) mit chemisch charakterisierten Gruppierungen (Determinante), die für die Immunantwort verantwortlich sind. Unterschieden als 1) meist höhermolekulares Voll-AG, das allein in der Lage ist, eine Immunreaktion auszulösen, 2) als niedermolekulares Hapten (= Halbantigen), das erst nach Kopplung an ein größeres Trägermolekül als Immunogen wirkt. Bezeichnet z.B. als xeno-, allo- oder isogenes, autologes AG; Auto-, Hetero-, Transplantations-, Tumor-, Virus-AG.

Hapten: einfache, niedermolekulare chemische Verbindung, die für die Spezifität eines Antigens (AG) verantwortlich bzw. durch ihre Struktur (Determinante) zur spezifischen Bindung des Antikörpers befähigt ist, im Gegensatz zum Voll-AG aber keine Allergie erzeugt. Wird nach Bindung an einen als Carrier bezeichneten Eiweißkörper zum Vollantigen (Antigen).

[0029] Es wird hervorgehoben, daß es mit Hilfe der vorliegenden Erfindung auch möglich ist, Varianten des Ubiquitin zu erzeugen, die eine Bindungseigenschaft gegenüber nicht immunogenen Substanzen als Bindungspartnern, wie z. B. Tumor-Markern, aufweisen.

[0030] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt eine Modifikation, bevorzugt eine Substitution, zumindest teilweise an zwei oder mehreren in der Primärsequenz direkt benachbarten Aminosäuren, wobei sich die in der Tertiärstruktur benachbarten Aminosäuren weiterhin bevorzugt zumindest teilweise in einem Beta-Faltblattstrang des Proteins befinden. Normalerweise geht jeder Austausch einer Aminosäure in einem Protein mit einer Beeinträchtigung der Stabilität des Proteins einher. Einzelaustausche können gegebenenfalls noch aufgrund der Einwirkung benachbarter Aminosäuren ohne weitgehende Destabilisierung verkraftet werden. Bei einer Veränderung eines ganzen Bereichs, also z.B. einer strukturellen Einheit, bestehend aus mehreren benachbarten Aminosäuren, kann von einem stabilisierenden Einfluss der unmittelbar benachbarten Aminosäuren nicht mehr ausgegangen werden. Dementsprechend wurden im Stand der Technik bisher auch nur nicht direkt benachbarte Aminosäuren des Ubiquitins modifiziert. Es war überraschend, dass bei einer solch tiefgreifenden Veränderung von Bereichen des Proteins durch Modifikation von direkt benachbarten Aminosäuren die Stabilität des Proteins nicht wesentlich nachließ. Überraschend und nicht zu erwarten war allein schon die Tatsache, dass zwei direkt benachbarte Aminosäuren in Ubiquitin oder Proteinen mit Ubiquitin-artigem Faltungsmotiv austauschbar sind, ohne die Stabilität und Struktur des Proteins zu beeinträchtigen.

[0031] Die Modifikation direkt benachbarter Aminosäuren hat weiterhin insbesondere im Fall des relativ kleinen Ubiquitins den Vorteil, dass eine derartige Modifikation gentechnisch leichter zu realisieren ist, als dies bei nicht direkt benachbarten Aminosäuren der Fall ist. Gemäß dieser Ausführungsform kann damit eine erleichterte Erzeugung einer großen Anzahl von modifizierten Proteinen sowohl auf Protein-Ebene als auch auf DNA-Ebene bereitgestellt werden.

[0032] Bevorzugt beträgt die Anzahl der Substitutionen direkt benachbarter Aminosäuren 2 bis 10, bevorzugter 2 bis 8 in der Primärsequenz direkt benachbarte Aminosäuren, weiterhin bevorzugt 3 bis 7 oder 4 bis 6 in der Primärsequenz direkt benachbarte Aminosäuren.

[0033] Wenn in der Primärsequenz direkt benachbarte Aminosäuren substituiert werden, kann ein Teil dieser Aminosäuren in den Bereich eines Beta-Faltblattstrangs reichen. Dieser in den Bereich eines beta-Faltblattstrangs hineinreichende Teil kann eine Länge von zwei oder mehr Aminosäuren, bevorzugt zwei oder drei Aminosäuren, aufweisen. Der Bereich direkt benachbarter Aminosäuren liegt somit am Anfang oder Ende eines Beta-Faltblattstrangbereichs, der bevorzugt etwa 2 bis 3 Aminosäuren lang ist.

[0034] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden 5 oder mehr direkt benachbarte Aminosäuren modifiziert, vorzugsweise substituiert, wobei zwei oder mehr, bevorzugt zwei oder drei, direkt benachbarte Aminosäuren den Anfang oder das Ende eines beta-Faltblattstrangbereichs bilden. Als Obergrenze für die Gesamtanzahl direkt benachbarter modifizierter Aminosäuren können in diesem Fall bevorzugt 8, 9 oder 10 Aminosäuren angesehen werden, besonders bevorzugt 8 Aminosäuren.

[0035] Im Fall der Modifikation direkt benachbarter Aminosäuren in einem beta-Faltblattstrang des Ubiquitins sind diese Aminosäuren in der Regel dann alle oberflächenexponiert, wenn sich diese Aminosäuren am Anfang oder am Ende eines Beta-Faltblattstrangs befinden. In diesem Fall kann angenommen werden, dass dann alle Aminosäuren an der Generierung der neuen Bindungseigenschaft beteiligt sind.

[0036] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden zur Erzeugung eines Bereichs mit neuen Bindungseigenschaften solche Aminosäuren modifiziert, die einen zusammenhängenden Bereich auf der Oberfläche des Proteins bilden. Dadurch kann ein zusammenhängender Bereich mit einer zuvor nicht vorhandenen Bindungseigenschaft erzeugt werden. Unter "zusammenhängendem Bereich" ist erfindungsgemäß Folgendes zu verstehen: Aminosäuren wechselwirken aufgrund der Ladung, Raumstruktur und Hydrophobizität/Hydrophilizität ihrer Seitenketten auf entsprechende Weise mit ihrer Umgebung. Die Umgebung kann das Lösungsmittel, i.A. Wasser, oder andere Moleküle sein, z.B. räumlich benachbarte Aminosäuren. Mittels der Strukturinformation des Proteins sowie entsprechender Software kann die Oberfläche des Proteins dargestellt werden. Z. B kann der Grenzbereich zwischen den Atomen des Proteins und dem Lösungsmittel so visualisiert werden, einschließlich der Information, wie dieser Grenzbereich strukturiert ist, welche Oberflächenabschnitte für das Lösungsmittel zugänglich sind oder wie die Ladungsverteilung auf der Oberfläche beschaffen ist. Ein zusammenhängender Bereich kann bspw. durch eine solche Visualisierung mittels einer geeigneten Software erkannt werden. Derartige Methoden sind dem Fachmann bekannt. Grundsätzlich steht erfindungsgemäß auch der gesamte oberflächenexponierte Bereich als zusammenhängender Bereich auf der Oberfläche für eine Modifikation zur Erzeugung neuer Bindungseigenschaften zur Verfügung. Bevorzugt kann eine Modifikation zu diesem Zweck auch den α -Helixbereich umfassen.

[0037] Varianten des Ubiquitin-Proteingerüsts, die sich durch Aminosäure-Austausche im Bereich der de novo generierten, künstlichen Bindungsstelle vom parentalen Protein und voneinander unterscheiden, können durch gezielte Mutagenese der entsprechenden Sequenzabschnitte erzeugt werden. Dabei können Aminosäuren mit bestimmten Eigenschaften wie z. B. Polarität, Ladung, Löslichkeit, Hydrophobizität oder Hydrophilizität durch Aminosäuren mit entsprechenden anderen Eigenschaften ersetzt bzw. substituiert werden. Der Ausdruck „Mutagenese“ umfasst neben Substitutionen auch Insertionen und Deletionen. Auf Proteinebene können die Modifikationen auch durch chemische Veränderung der Aminosäureseitenketten nach dem Fachmann bekannten Verfahren vorgenommen werden.

[0038] Als Ausgangspunkt zur Mutagenese der entsprechenden Sequenzabschnitte kann bspw. die cDNA von humanem Ubiquitin dienen, die mit dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt, verändert und vervielfältigt werden kann. Zur ortsgerichteten Veränderung des Ubiquitins in relativ kleinen Bereichen der Primärsequenz (ca. 1 – 3 Aminosäuren) stehen kommerziell erhältliche Reagenzien und Verfahren zur Verfügung („Quick Change“, Stratagene; „Muta-Gene Phagemid in vitro Mutagenesis Kit“, Biorad). Zur ortsspezifischen Mutagenese größerer Bereiche stehen dem Fachmann besondere Ausführungen z. B. der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Verfügung. Dabei kann beispielsweise eine Mischung synthetischer Oligodesoxynukleotid, die an den gewünschten Positionen degenerierte Basenpaar-Zusammensetzungen aufweisen, zur Einführung der Mutation verwendet werden. Dies kann auch durch die Verwendung von natürlicherweise nicht in genetischer DNA vorkommenden Basenpaaranaloga wie z. B. Inosin erreicht werden.

[0039] Der zufällige Austausch von Aminosäuren gemäß einem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung an den Positionen 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65 und 66 des Ubiquitins kann besonders leicht durch PCR erfolgen,

da die genannten Positionen sich nahe des Amino- bzw. Carboxyterminus des Proteins befinden. Dementsprechend liegen die zu manipulierenden Codons am 5'- bzw. 3'-Ende des entsprechenden cDNA-Stranges. So entspricht das erste für eine mutagene PCR-Reaktion eingesetzte Oligodesoxynukleotid in seiner Sequenz – abgesehen von den Codons der zu mutierenden Positionen 2, 4, und 6 – dem kodierenden Strang für den Aminoterminus des Ubiquitins. Das zweite Oligodesoxynukleotid entspricht demgemäß – bis auf die Codons der zu mutierenden Positionen 62, 63, 64, 65 und 66 – zumindest teilweise dem nicht-kodierenden Strang für die Polypeptidsequenz des Carboxyterminus. Mit beiden Oligodesoxynukleotiden kann eine Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der für das Ubiquitin-Proteingerüst kodierenden DNA-Sequenz als Matrize durchgeführt werden.

[0040] Im weiteren kann das erhaltene Amplifizierungsprodukt unter Verwendung flankierender Oligodesoxynukleotide, die z. B. Erkennungssequenzen für Restriktions-Endonukleasen einführen, einer erneuten Polymerase-Kettenreaktion zugeführt werden. Die erhaltenen synthetischen DNA-Moleküle können nach der Hydrolyse mit den geeigneten Restriktions-Endonukleasen mit entsprechend vorbereiteten Nukleinsäuresequenzen von z.B. Klonierungs- oder Expressionsvektoren ligiert d. h. verknüpft werden. Derartige Vorgehensweisen und Systeme sind dem Fachmann bekannt. Erfindungsgemäß bevorzugt wird die erhaltene Genkassette in ein Vektorsystem verbracht, das für die Verwendung in nachfolgenden Selektionsverfahren für die Isolierung von Varianten des Ubiquitins mit Bindungseigenschaften für ein vorher bestimmtes Hapten oder Antigen geeignet ist.

[0041] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden nur Aminosäurepositionen zur Bildung einer neuen Bindungseigenschaft modifiziert, die nicht zu Bereichen gehören, die bei unmodifiziertem Ubiquitin an Bindungen an natürlichen Ubiquitin-Bindungspartnern beteiligt sind. Dadurch kann gewährleistet werden, dass nicht lediglich bereits vorhandene Bindungseigenschaften des Ubiquitins verändert werden.

[0042] Die Bereiche zur Modifikation können grundsätzlich danach ausgewählt werden, ob sie für einen möglichen Bindungspartner zugänglich sein können, und ob die Gesamtstruktur des Proteins vermutlich gegenüber einer Modifikation Toleranz zeigen wird.

[0043] Gemäß der vorliegenden Erfindung können bei dem Protein, bevorzugt Ubinuitin aus Säugern, mindestens 15% der in Betasträngen befindlichen Aminosäuren, vorzugsweise mindestens 20%, weiterhin bevorzugt mindestens 25%, modifiziert, bevorzugt substituiert, werden, um eine vorher nicht vorhanden Bindungseigenschaft zu erzeugen. Maximal sind dabei bevorzugt etwa 40% der in Betasträngen befindlichen Aminosäuren, weiterhin bevorzugt, maximal etwa 35% und noch bevorzugter etwa 30% modifiziert, bevorzugt substituiert.

[0044] Gemäß einem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wurden bspw. 6 der 24 in Betasträngen befindlichen Aminosäuren modifiziert, um eine Bindungseigenschaft zu einem vorbestimmten Bindungspartner zu erzeugen. Die Wahl einer größeren Anzahl von Aminosäuren für Modifikationen gibt die Möglichkeit, eine größere Bibliothek von Proteinen mit Bindungsaffinität zu generieren, so dass die Wahrscheinlichkeit, dass eines dieser modifizierten Proteine eine quantifizierbare und/oder hohe Bindungsaffinität zu einem vorbestimmten Bindungspartner aufweist, zunimmt.

[0045] Weiterhin kann neben einer Modifikation in Betasträngen auch eine Modifikation in anderen oberflächenexponierten Bereichen des Proteins erfolgen, bevorzugt bspw. in Loop-Bereichen. Diese modifizierten Bereiche können neben den modifizierten Bereichen in den Betasträngen ebenfalls an der neu generierten Bindung beteiligt sein.

[0046] Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können mindestens 6, bevorzugt mindestens 8, oberflächenexponierte Aminosäuren eines Ubiquitins, bevorzugt Säuger- oder humanes Ubiquitin, modifiziert sein, wobei eine Substitution als Modifikation bevorzugt ist. Diese mindestens 6 oberflächenexponierten modifizierten Aminosäuren bilden dann den Bereich mit Bindungsaffinität zu dem vorbestimmten Bindungspartner. Dabei ist besonders bevorzugt, wenn sich mindestens 4, bevorzugt mindestens 6, weiterhin bevorzugt mindestens 8 der oberflächenexponierten Aminosäuren in einem beta-Faltblatt-Bereich, d.h. in einem Beta-Faltblattstrang oder verteilt auf mehrere Betastränge befinden. Weiterhin ist bevorzugt, dass mindestens 5 der modifizierten, bevorzugt substituierten, Aminosäuren sich in direkter Nachbarschaft in der Primärsequenz zueinander befinden.

[0047] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind in dem Protein Ami-

nosäuren in mindestens zwei, bevorzugt genau zwei, der fünf Betastränge modifiziert, um eine neue Bindungseigenschaft zu generieren. Ebenfalls bevorzugt ist eine Modifikation in drei oder vier der fünf Betastränge zur Erzeugung einer zuvor nicht vorhandenen Bindungseigenschaft gegenüber einem ausgewählten Bindungspartner.

[0048] Besonders bevorzugt ist, wenn Aminosäuren in dem aminoterminalen und dem carboxyterminalen Strang modifiziert werden, vorzugsweise substituiert, um neue Bindungseigenschaften zu generieren. Bevorzugt ist dabei weiterhin, wenn zusätzlich Aminosäuren in dem an den carboxyterminalen beta-Faltblattstrang angrenzenden Loop modifiziert werden, vorzugsweise substituiert werden.

[0049] Besonders bevorzugt ist eine Modifikation, vorzugsweise Substitution, an den folgenden Positionen eines Säuger-Ubiquitins, vorzugsweise humanem Ubiquitin: 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65, 66. Diese Aminosäuren bilden einen zusammenhängenden, oberflächenexponierten Bereich auf der Oberfläche des Ubiquitins, der sich zur Generierung von modifizierten Proteinen mit einer vorher nicht vorhandenen Bindungsaffinität gegenüber einem Bindungspartner als besonders geeignet erwies.

[0050] Die Substitution von Aminosäuren zur Erzeugung neuer Bindungseigenschaften kann erfindungsgemäß mit beliebigen Aminosäuren erfolgen, d.h. bei der Modifikation zur Erzeugung neuer Bindungseigenschaften muss nicht darauf geachtet werden, dass die Aminosäuren eine ähnliche chemische Eigenschaft bzw. eine ähnliche Seitenkette aufweisen wie die ausgetauschten Aminosäuren, sondern es stehen hierfür beliebige Aminosäuren zur Verfügung.

[0051] Gemäß dieser Erfindung können als Proteine, die zur Erzeugung vorher nicht vorhandener Bindungsaffinitäten gegenüber ausgewählten Bindungspartnern modifiziert werden, schon vor dieser Modifikation andere Modifikationen wie Substitutionen, Insertionen, Deletionen und/oder chemische Modifikationen aufweisen, so dass biologische und/oder proteinchemische Funktionen des Proteins ausgeschaltet sind. Bspw. können so von vornherein die Bindungseigenschaften von Ubiquitin an seine natürlichen Bindungspartner ausgeschaltet werden.

[0052] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wurden Bspw. bei humanem Ubiquitin die Positionen 44, 48, 54, 70, 72 und 75 substituiert und die Aminosäure 76 deletiert. Dadurch konnten unter Beibehaltung der Struktur und Stabilität von Ubiquitin ein Protein bereitgestellt werden, das keine Funktionen des Ubiquitins mehr ausführen kann.

[0053] Insgesamt erhält man, wenn man ein solches bereits vormodifiziertes Ubiquitin dazu verwendet, neue, vorher nicht vorhandene Bindungseigenschaften zu erzeugen, bevorzugt ein Ubiquitin, bei dem insgesamt mindestens 10, bevorzugt mindestens 15 Aminosäuren des Wildtyp-Ubiquitins oder generell eines Säuger-Ubiquitins ausgetauscht sind. Gemäß einem Ausführungsbeispiel konnte so ein modifiziertes Ubiquitin erhalten werden, dass unter Beibehaltung seiner ursprünglichen Struktur 14 Substitutionen und eine Deletion aufwies. Bezogen auf die Gesamtzahl der Aminosäuren des Ubiquitins entspricht dies einem Prozentsatz von etwa 20%. Dies war äußerst überraschend und nicht zu erwarten, da üblicherweise bereits ein sehr viel geringerer Prozentsatz genügt, um die Faltung des Proteins zu stören.

[0054] Der Schritt der Modifikation der ausgewählten Aminosäuren erfolgt erfindungsgemäß bevorzugt durch Mutagenese auf Gennebene durch Random-Mutagenese, d.h. einem zufälligen Austausch der ausgewählten Aminosäuren. Bevorzugt erfolgt die Modifikation in Schritt d) mittels gentechnischer Verfahren zur Veränderung einer zu dem entsprechenden Protein gehörenden DNA. Bevorzugt erfolgt die Expression des Proteins dann in prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen.

[0055] Ein modifiziertes Protein kann erfindungsgemäß ebenfalls bevorzugt durch chemische Synthese hergestellt werden. Bei dieser Ausführungsform sind dann die Schritte c) bis d) des Anspruch 1 in einem Schritt realisiert.

Selektion bzw. Ermittlung der Aminosäuren mit Bindungsaffinität zu einem vorbestimmten Bindungspartner:

[0056] Nach Erstellen einer Proteinbibliothek durch Modifikation ausgewählter Aminosäuren werden die modifizierten Proteine erfindungsgemäß mit einem vorbestimmten Bindungspartner in Kontakt gebracht, um ggf. eine Bindung der Partner aneinander zu ermöglichen, wenn eine Bindungsaffinität besteht.

[0057] Das Inkontaktbringen erfolgt erfindungsgemäß bevorzugt mittels eines geeigneten Präsentations- und

Selektionsverfahrens wie dem Phage-Display-, Ribosomal Display-, mRNA-Display- oder Cell-Surface-Display-, Yeast Surface Display- oder Bacterial Surface Display-Verfahren, bevorzugt mittels des Phage-Display-Verfahrens.

[0058] Das Ermitteln, ob das modifizierte Protein eine quantifizierbare Bindungsaffinität zu einem vorbestimmten Bindungspartner aufweist, kann erfindungsgemäß bevorzugt durch eines oder mehrere der folgenden Verfahren erfolgen: ELISA, Plasmon-Oberflächenresonanz-Spektroskopie, Fluoreszenz-Spektroskopie, FACS, Isothermale Titrationskalorimetrie und Analytische Ultrazentrifugation.

[0059] Als Beispiel für ein erfindungsgemäßes Selektionsverfahren für Varianten des Ubinuitins mit Bindungseigenschaften ist im Folgenden eine auf diese Anwendung adaptierte Form des Phage Display-Verfahrens beschrieben. Ebenso können z. B. Verfahren zur Präsentation auf Bakterien (Bacterial Surface Display; Daugherty et al., 1998) oder Hefezellen (Yeast Surface Display; Kieke et al., 1997) bzw. zellfreie Selektionssysteme wie das Ribosome Display (Haues und Plückthun, 1997; He und Taussig, 1997) Anwendung finden. Hierbei wird eine transiente physikalische Verknüpfung von Geno- und Phänotyp durch die Kopplung der Proteinvariante mit der dazugehörigen mRNA über das Ribosom erreicht.

[0060] Beim hier beschriebenen Phage Display-Verfahren werden rekombinante Varianten des Ubiquitins auf filamentösen Phagen präsentiert, während die kodierende DNA der präsentierten Variante gleichzeitig in einzelsträngiger Form im Phagenkapsid verpackt vorliegt. So können im Zuge einer Affinitätsanreicherung Varianten mit bestimmten Eigenschaften aus einer Bibliothek selektiert und deren genetische Information durch die Infektion geeigneter Bakterien amplifiziert bzw. einem weiteren Anreicherungszyklus zugeführt werden. Die Präsentation des mutierten Ubiquitins auf der Phagenoberfläche wird durch die genetische Fusion mit einer aminoterminalen Signalsenuenz – bevorzugt der PelB-Signalsequenz – und einem Hüll- oder Oberflächenprotein des Phagen – bevorzugt die carboxyterminale Fusion mit dem Hüllprotein pIII oder einem Fragment hiervon – erreicht. Weiterhin kann das kodierte Fusionsprotein noch weitere funktionelle Elemente enthalten, wie z. B. ein Affinitätsanhänger oder ein Antikörper-Epitop für den Nachweis und/oder die affinitätschromatographische Reinigung oder eine Protease-Erkennungssequenz für die spezifische Spaltung des Fusionsproteins im Verlauf der Affinitätsanreicherung. Des Weiteren kann sich zwischen dem Gen für die Ubiquitin-Variante und dem kodierenden Bereich für das Phagenhüll-Protein oder dessen Fragment z. B. ein Amber-Stopcodon befinden, welches in einem geeigneten Suppressorstamm während der Translation zum Teil durch den Einbau einer Aminosäure überlesen wird.

[0061] Der bakterielle Vektor, der für das Selektionsverfahren im Zuge der Isolierung von Varianten des Ubiquitins mit Bindungseigenschaften für ein vorher bestimmtes Hapten oder Antigen geeignet ist und in den die Genkassette für das beschriebene Fusionsprotein inseriert wird, wird als Phasmid bezeichnet. Dieser weist u. a. die intergenische Region eines filamentösen Phagen (z. B. M13 oder fI) oder eines Teils hiervon auf, was bei Superinfektion der phagemid-tragenden Bakterienzelle mit Helferphagen wie z. B. M 13K07 zum Verpacken eines geschlossenen Strangs der Phasmid-DNA in eine Phagenhülle führt. Die so entstandenen Phagemide werden vom Bakterium sekretiert und präsentieren die jeweilige kodierte Ubiquitin-Variante – aufgrund deren Fusion mit dem Hüllprotein pIII oder dessen Fragment – auf dessen Oberfläche. Durch das Vorhandensein von nativen pIII-Hüllproteinen im Phagemid, bleibt dessen Fähigkeit geeignete Bakterienstämme erneut zu infizieren und damit die Möglichkeit zur Vermehrung der entsprechenden DNA, erhalten. Damit wird die physikalische Verknüpfung zwischen dem Phänotyp der Ubiquitin-Variante – d. h. deren potentielle Bindungseigenschaft – und deren Genotyp gewährleistet. Im vorliegenden Beispiel wird das dafür konstruierte Phasmid pMUBI-1 (**Abb. 3**) für die Insertion der kodierenden Sequenzen von Ubiquitin-Varianten und zur Gewinnung von Phagemiden verwendet.

[0062] Gewonnene Phasmide können hinsichtlich der Bindung der auf ihnen präsentierten Ubiquitin-Variante an vorbestimmte Haptene oder Antigene mittels dem Fachmann bekannten Methoden selektiert werden. Hierzu können die präsentierten Ubiquitin-Varianten transient an z. B. auf Mikrotiterplatten gebundene Zielsubstanz immobilisiert werden und nach Abtrennung nicht-bindender Varianten spezifisch eluiert werden. Die Elution erfolgt bevorzugt mit basischen Lösungen wie z. B. 100 mM Triethylamin. Alternativ kann die Elution unter sauren Bedingungen, Proteolyse oder die direkte Zugabe infizierbarer Bakterien erfolgen. Die so gewonnenen Phagemide können reamplifiziert werden und durch aufeinanderfolgende Zyklen von Selektion und Amplifikation Ubiquitin-Varianten mit Bindungseigenschaften für ein vorher bestimmtes Hapten oder Antigen angereichert werden.

[0063] Die weitere Charakterisierung der auf diese Weise gewonnenen Ubiquitin-Varianten kann als Phagemid d. h. in Fusion mit dem Phagen oder nach Umlonierung der entsprechenden Genkassette in einen geeig-

neten Expressionsvektor als lösliches Protein erfolgen. Die entsprechenden Methoden sind dem Fachmann bekannt oder in der Literatur beschrieben. Die Charakterisierung kann z.B. die Ermittlung der DNA- und damit der Primärsequenz der isolierten Varianten umfassen. Weiterhin kann die Affinität und die Spezifität der isolierten Varianten z. B. mittels immunologischen Standardmethoden wie ELISA oder Plasmon-Oberflächenresonanz-Spektroskopie, Fluoreszenz-Spektroskopie, FACS, Isothermale Titrationskalorimetrie oder Analytische Ultrazentrifugation ermittelt werden. Hinsichtlich der Stabilitätsanalyse sind dem Fachmann z. B. spektroskopische Methoden in Verbindung mit chemischer oder physikalischer Entfaltung bekannt.

[0064] Bevorzugt schließt sich an den Schritt der Ermittlung der Proteine mit einer Bindungsaffinität gegenüber einem vorbestimmten Bindungspartner noch ein Schritt der Isolierung und/oder Anreicherung des ermittelten Proteins an.

[0065] Erfindungsgemäß und insbesondere nach dem gerade beschriebenen Verfahren können generell Varianten des Ubiquitins mit Bindungsaffinität für einen vorher bestimmten Bindungspartner wie ein Hapten oder Antigen isoliert werden.

[0066] Bevorzugt handelt es sich bei dem Bindungspartner um einen biologischen Rezeptor, bevorzugt humarer GLP-1 Rezeptor, humaner PTH Rezeptor, oder ein Ligand oder eine Domäne hiervon, ein Tumormarker, Zytokine, Interleukine, Tumor Necrose Factor Alpha (TNF- α), Glycoprotein RezeptorIIb/IIIa (GPIIb/IIIa), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Ep-CAM, Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA), HER2, ein Immunglobulin oder ein Teil hiervon, bspw. ein gesamter Antikörper, ein F_c-Teil von z. B. humanem Immunglobulin M oder ein Bereich eines Antikörpers im Bereich der Antigenbindungsstelle oder ein Hormon, bspw. Hydrocortison.

[0067] Es ist ein besonderer Vorteil, dass die modifizierten Proteine oder Ubiquitine der vorliegenden Erfindung sowohl Haptene, also kleine Moleküle, als auch Antigene, also große Moleküle, wie Proteine quantifizierbar binden können. Durch diese Variabilität der erfindungsgemäßen modifizierten Proteine werden somit universell für eine große Breite von Bindungspartnern mögliche neu erzeugte Bindungspartner bereitgestellt.

[0068] Die Proteine der vorliegenden Erfindung können weiterhin zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung sowie zur Trennung und Isolierung des entsprechenden Bindungspartners verwendet werden.

[0069] Eine weitere Anwendung liegt in der Diagnose und Behandlung von Krankheiten, an denen der entsprechende Bindungspartner beteiligt ist.

[0070] Wie bereits erwähnt, betrifft die vorliegende Erfindung auch die gezielte Veränderung einzelner Aminosäurepositionen, die außerhalb der de novo generierten, künstlichen Bindungsstelle liegen. So können z. B. Positionen, welche im natürlichen Ubiquitin mit Aminosäuren besetzt sind, die für dessen biologische Funktion verantwortlich sind, mit anderen Aminosäuren besetzt werden. Auf diese Weise wird ein – hinsichtlich seiner biologischen Funktionen, die z. B. die Wechselwirkung mit Enzymen der Ubiquitinilierungs-Kaskade betreffen, – inaktives Ubiquitin-Proteingerüst erhalten, welches jedoch hinsichtlich seiner Struktur und der proteinchemischen Eigenschaften weitestgehend mit dem Ausgangsprotein identisch ist. Dies kann z. B. durch die Bestimmung der Expressionsrate in *E. coli*, die Analyse der Stabilität mit spektroskopischen Methoden wie Fluoreszenz- oder Zirkulärem Dichroismus-Messung in Verbindung mit chemischer oder physikalischer Entfaltung oder die Detektion in immunologischen Standard-Tests wie ELISA erfolgen.

[0071] Beispielsweise kann durch die Substitutionen Arg54 und Arg72 jeweils zu Leu die Interaktion zum Ubiquitin-aktivierendem Enzym E1 unterbunden werden (Burch und Haas, 1994). Weiterhin sind die Aminosäuren Lys48 sowie Val70 bis Gly76 u. a. an der Wechselwirkung mit dem Ubiquitin-konjugierendem Enzym E2 beteiligt, was durch entsprechende Substitutionen unterbunden wird (Miura et al., 1999). Ferner erfolgt die Verknüpfung von Ubiquitin mit für den proteolytischen Abbau bestimmte Proteine bzw. die kovalente Verknüpfung zu Polyubiquitin-Ketten selektiv über die Reste Gly75 und Gly76 und kann durch entsprechende Substitutionen verhindert werden. Schließlich verhindern die Austausche Ile44Ala und Val70Ala weitestgehend den Kontakt von Ubiquitin zur 26S-Protease und damit die Degradation von Ubiquitin-markierten Proteinen (Beat et al., 1996). In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung dient dementsprechend ein modifiziertes Ubiquitin-Proteingerüst mit den Substitutionen Ile44Ala, Lys48Arg, Arg54Leu, Val70Ala, Arg72Leu, Gly75Ala sowie mit der Deletion von Gly76 als Ausgangspunkt für die Gewinnung von modifizierten Ubiquitin mit neuen Bindungseigenschaften. Dieses modifizierte Ubiquitin-Proteingerüst ist hinsichtlich seiner Struktur und seiner proteinchemischen Eigenschaften, d.h. Stabilität, Faltung, Produzierbarkeit in *E. coli*, Wechselwirkung mit anti-Ubiquitin Antiseren etc. weitestgehend mit Ubiquitin identisch, was mit den oben genannten Methoden determiniert

wurde.

[0072] Es war überraschend, dass die in den verschiedenen Zitaten getrennt genannten Modifikationen in einem einzigen Ubiquitin zusammengefasst werden konnten, ohne dessen Struktur oder Stabilität wesentlich zu verändern.

[0073] Überraschenderweise ist es mit dem beschriebenen Ansatz, der dieser Erfindung zugrunde liegt, möglich, modifizierte Proteine auf der Basis von Ubiquitin zu gewinnen, die zum einen neu generierte Bindungseigenschaften aufweisen und andererseits weitestgehend die proteinchemischen Eigenschaften des Ubiquitins besitzen. Dabei weisen die Ubiquitin-basierten modifizierten Proteine Dissoziationskonstanten von vorzugsweise 10^{-6} M oder kleiner, bspw. 10^{-6} – 10^{-12} M auf, die mit denen von Antikörpern bzw. deren Fragmenten vergleichbar sind. Weiterhin gelingt es erstaunlicherweise, modifizierte Proteine mit spezifischen Bindungseigenschaften wahlweise gegen große Moleküle wie Proteine oder auch kleiner Moleküle wie Haptene oder Hormone zu generieren. Dabei können die vorher definierten Zielsubstanzen oder Zielsubstanzklassen mit hoher Selektivität gebunden werden. Die beobachtete Funktionalität der de novo generierten, künstlichen Bindungsstelle hinsichtlich Affinität und Spezifität war nicht von vornherein zu erwarten, da sich weite Bereiche der Bindungsstelle in dem im allgemeinen als starr und unflexibel angesehenen beta-Faltblatt befinden. Im Gegensatz hierzu werden natürliche universelle Bindungsstellen – wie z. B. die von Antikörpern – durch flexible Bogen- („Loop-“) Strukturen ausgebildet.

[0074] Überraschend ist weiterhin, dass das im vorliegenden Fall verwendete Ubiquitin-Proteingerüst die realisierten tiefgreifenden Veränderungen der Primärsenzenz offensichtlich toleriert, ohne dass die Faltung der Polypeptidkette beeinträchtigt wird. Dies ist nicht nur im Hinblick auf die Anzahl der Aminosäure-Austausche – ca. 20 % der Sequenz des Wildtyp-Ubiquitins konnten verändert werden – unerwartet, sondern auch aufgrund der Lage der veränderten Positionen im Proteingerüst. So war z. B. eine Toleranz gegenüber Austauschen innerhalb des im allgemeinen als starr und unflexibel angesehenen Beta-Faltblattes nicht *a priori* zu erwarten, insbesondere von direkt benachbarten Aminosäuren nicht.

[0075] Ausgehend von den erhaltenen mutierten DNA-Sequenzen der Ubiquitin-basierten modifizierten Proteine, lassen sich diese mittels bekannten gentechnischen Methoden herstellen. Bevorzugt ist dabei – aufgrund der geringen Kosten und der hohen Ausbeute – die Produktion in einem prokaryontischen Wirt, was die mögliche Verwendung von eukaryontischen oder zellfreien Systemen jedoch nicht ausschließt. Im allgemeinen wird nach Insertion der DNA-Sequenz in einen geeigneten Expressionsvektor und der Transfektion, Transfektion oder Infektion entsprechender Organismen das zellfremde modifizierte Protein durch das bakterielle Transkriptions-/Translationssystem synthetisiert. Hierbei kann das Herstellungsverfahren auf einzelne modifizierte Proteine mit den neuen Bindungseigenschaften angepasst werden. So kann z. B. bei der Verwendung von *E. coli* als Wirt das Ubiquitin-basierte modifizierte Protein mittels einer geeigneten Signalsequenz in den periplasmatischen Raum sekretiert werden oder im Cytosol hergestellt werden. Wenn das modifizierte Protein dieser Erfindung in der Zelle nicht gefaltet wird und aggregiert, ist ebenso die funktionelle Rückfaltung aus solchen Einschlußkörpern möglich. Zellfreie Systeme können z. B. bei Varianten mit niedriger Expressionsrate oder toxischem Effekt auf den Wirtsorganismus vorteilhaft sein. Geeignete gentechnische Verfahren zur Herstellung bzw. Reinigung rekombinanter Proteine sind dem Fachmann bekannt und in der Literatur beschrieben (z. B. Sambrook et al., 2001).

[0076] Dementsprechend ist es möglich, Ubiquitin-basierte modifizierte Proteine mit neuer Bindungsaffinität durch die Generierung einer künstlichen Bindungsstelle bereitzustellen, deren hochvariable Oberfläche die molekulare Erkennung vorher festgelegter Liganden wie z. B. Haptene, Peptide, Proteine und anderer Makromoleküle oder kleinere Moleküle wie bspw. Hormone erlaubt.

[0077] Darüber hinaus können aufgrund der vielfältigen Oberflächeneigenschaften des randomisierten Bereiches mittels geeigneter Selektionsmethoden auch Ubiquitin-basierte modifizierte Proteine mit anderen Eigenschaften als Bindungseigenschaften erhalten werden. Dies kann z. B. eine neue, vorher nicht vorhandene katalytische Aktivität für eine vorher definierte chemische Reaktion sein. Diese Eigenschaft ergibt sich bspw., wenn der Bindungspartner ein Molekül oder Übergangszustand ist, das/der von dem modifizierten Protein derart gebunden wird, dass dadurch die jeweilige Reaktion katalysiert wird.

[0078] Die vorliegende Erfindung beinhaltet auch die Bereitstellung von Ubiquitin als Gerüstmolekül zur Einführung neuer, vorher nicht vorhandener Bindungseigenschaften.

[0079] Weiterhin kann gemäß dieser Erfindung eine Genbibliothek in Schritt d) des Verfahrens erstellt wer-

den, z.B. mittels Random-Mutagenese. Die vorliegende Erfindung umfasst gemäß einer Ausführungsform auch derartig hergestellte Genbibliotheken. Insbesondere sind solche Genbibliotheken umfasst, die aus humanem Ubiquitin erstellt wurden, das an den Aminosäurepositionen 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65 und 66 substituiert wurde.

[0080] Weiterhin kann das Proteingerüst außerhalb der künstlichen Bindungsstelle gerichtet modifiziert werden, um dem modifizierten Protein zusätzliche Funktionen zu verleihen. Dies kann z. B. die Einführung zusätzlicher oder der Austausch einzelner Aminosäuren oder Peptide – bevorzugt am Amino- und Carboxyterminus – beinhalten, um Proteinkonjugate durch chemische Kopplung mit geeigneten Reagenzien zu erhalten. Solche Fusionen können auch mittels gentechnischer Methoden direkt durch die Verknüpfung des Gens des modifizierten Proteins mit dem des Fusionspartners hergestellt werden. Dies wird – im Vergleich zu den Antikörpern – dadurch vereinfacht, dass lediglich ein Fremdgen und daher nur eine Polypeptidkette durch den bakteriellen Wirt exprimiert bzw. funktionell gefaltet werden muß. Solche Fusionspartner können Enzyme, Cytotoxine, Bindungs- und Multimerisierungsdomänen oder auch modifizierte Proteine mit derselben bzw. unterschiedlicher Bindungsspezifität sein.

[0081] Den durch die vorliegende Erfindung bereitgestellten Ubiquitin-basierten modifizierten Proteinen eröffnet sich – analog zu den Antikörpern und deren Fragmenten – ein breites Anwendungsspektrum. Dies umfasst diagnostische und therapeutische Anwendungen sowie chromatographische Verfahren. So können Zielsubstanzen in beliebigen bioanalytischen Tests wie ELISA, Western-Blot o. ä. direkt nachgewiesen werden. Weiterhin eignen sich die erfindungsgemäß modifizierten Proteine, die z. B. Immunglobuline binden und mit einem Enzym oder Fluorophor konjugiert sind, als universelle sekundäre Reportermoleküle in geeigneten Testsystmen. Bevorzugte Anwendung finden die Ubiquitin-basierten modifizierten Proteine aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften im therapeutischen Einsatz wie z. B. der Behandlung von Tumor- oder Infektionserkrankungen. Hierbei können Effekte, die auf der Rezeptor- oder Ligandenblockade durch spezifische Bindung des modifizierten Proteins beruhen, ausgenutzt werden. Ebenso können modifizierte Proteine mit den neuen Bindungseigenschaften, die an Oberflächenproteine auf Tumorzellen binden, durch Konjugation mit geeigneten Effektoren solche Zellen gerichtet zerstören bzw. entsprechende Prä-Toxine selektiv im Tumorgewebe aktivieren.

Ausführungsbeispiel

[0082] Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Beispielen und beigefügten Abbildungen detaillierter erläutert, wobei

[0083] **Abb.** 1 einen Bereich der de novo generierten, künstlichen Bindungsstelle auf der Oberfläche des Wildtyp-Ubiquitins (PDB-Code: 1ubi) zeigt;

[0084] **Abb.** 2 die Ergebnisse der rechnergestützte Analyse der Proteinstabilität von jeweils 10^4 Varianten, die an Positionen 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65, 66 zufällig substituiert wurden, im Vergleich zum Ubiquitin (WT) und einem Kontrollepitop darstellt;

[0085] **Abb.** 3 den Phasmidvektor pMUBI-1 für die Verwendung bei der Selektion von Ubiquitin-basierten modifizierten Proteinen mit neuen Bindungseigenschaften erklärt;

[0086] **Abb.** 4 die Vorgehensweise bei der Konstruktion einer Bibliothek von Ubiquitin-Varianten erläutert;

[0087] **Abb.** 5 das Ergebnis eines ELISA-Experimentes zum Nachweis der Bindung eines selektierten Ubiquitin-basierten modifizierten Proteins an das entsprechende Protein zeigt;

[0088] **Abb.** 6 das Ergebnis eines ELISA-Experimentes zum Nachweis der Bindungsspezifität eines selektierten Ubiquitin-basierten modifizierten Proteins an das entsprechende Hapten darstellt.

[0089] **Abb.** 1: Kristallstruktur des Wildtyp-Ubiquitins (PDB-Code: 1ubi; Vijay-Kumar et al., 1987) mit der künstlich generierten Bindungsstelle auf der Oberfläche. Die dreidimensionale Darstellung der Sekundärstruktur-Elemente wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific, San Francisco) realisiert. Die Reste, die in der beispielhaft hergestellten Bibliothek zufällig substituiert werden sollen, umfassen die Positionen 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65, 66 und sind mit ihren Seitenketten dargestellt.

[0090] **Abb.** 2: Generierung einer Bindungsstelle auf der Oberfläche des Wildtyp-Ubiquitins (PDB-Code: 1ubi). Die Reste, die in der herzustellenden Bibliothek zufällig substituiert werden sollen (in hellgrau dargestell-

te Positionen 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65, 66), wurden durch rechnergestützte Analyse hinsichtlich ihrer Exposition zum Lösungsmittel und des stabilisierenden bzw. destabilisierenden Effekts, den ein Aminosäure-Austausch an den entsprechenden Positionen haben könnte, ausgewählt. Mit Hilfe der Software ProSAII wurde dann die Proteinstabilität von jeweils 10^4 Varianten im Vergleich zum Ubiquitin (WT) und einer gleichgroßen Stichprobe von Varianten, bei denen die Reste eines „Kontrollepitopes“ (in dunkelgrau dargestellte Positionen 24, 28, 31, 32, 35, 37, 38, 39) substituiert worden waren, bestimmt. Als Maß für die Stabilität ist dabei der Wert der kombinierten C^α/C^β -Potentiale („zp-comb“) angegeben. Dabei wiesen ca. 19% der in silico generierten Varianten, die im Bereich der Bindungsstelle zufällig substituiert worden waren, eine mindestens so hohe Stabilität wie Ubiquitin (WT) auf, während ca. 90% stabiler als die Träger des „Kontrollepitopes“ waren. Die Generierung einer Bindungsstelle durch zufällige Aminosäure-Substitutionen in dem analysierten Bereich sollte demnach von der Proteinstruktur des Ubiquitin toleriert werden, ohne deren Stabilität nachhaltig zu beeinflussen. Diese rechnerische Methode bietet eine Hilfe bei der Wahl geeigneter oberflächsexponierter Aminosäuren.

[0091] **Abb. 3:** Der Phasmidvektor pMUBI-1 für die Verwendung bei der Selektion von MUBI-Varianten durch phage-display. pMUBI-1 wird zur Herstellung von Phagenbibliotheken verwendet und kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetrazyklin-Promotor/Operators ($tet^{P/O}$) für ein Fusionsprotein aus der PelB-Signalsequenz, dem Gen für die Ubiquitin-Variante, MyCUT-Tag und einem C-terminalen Fragment des Phagenhüllproteins (AS 253–406, delta gpIII). Amber bezeichnet die Position des Amber-Stopcodons im Fusionsgen. Die Insertion der mutierten Genkassette des MUBI erfolgt über die beiden SfiI-Schnittstellen. fllg, bla^P, tetR, Ori, ColE1 und Cat- bezeichnen die intergenische Region des Phagen fl, das Tetrazyklin-Repressoren unter Kontrolle des β -Lactamase-Promotors, den Replikationsursprung und das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen.

[0092] **Abb. 4:** Vorgehensweise bei der Konstruktion einer Bibliothek von Ubiquitin-Varianten.

[0093] **Abb. 5:** Bindung von SPU-1-D10 aus der Selektion gegen recGLP1-R an die rekombinant hergestellte aminoterminale Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors im ELISA. Eine entsprechende Anzahl von Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte wurde über Nacht bei 4 °C mit recGLP1-R bzw. mit BSA oder der rekombinant hergestellte aminoterminale Domäne des humanen PTH Rezeptors (recPTH-R) belegt. Verbleibende Bindungsplätze wurden durch Inkubation mit 3% BSA in PBS mit 0,5% Tween (2 h, RT) abgesättigt. SPU-1-D10 wurde in Konzentrationsreihen in PBST 0,1 für 90 min bei 30 °C appliziert. Gebundenes modifiziertes Protein wurde mit anti-Ubiquitin Antiserum (1 : 10 in PBST 0,1, 60 min bei 30 °C) und anti-Kaninchen Antikörper (1 : 2000 in PBST 0,1, 60 min bei 30 °C) konjugiert mit Peroxidase detektiert. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des ImmunoPure-Kits von Pierce. Zwischen den Schritten wurde dreimal mit PBST 0,1- vor dem chromogenen Nachweis zusätzlich 3 × mit PBS – gewaschen. Die Signalintensität wurde nach Abstoppen der Farbreaktion mit H₂SO₄ bei 405 nm detektiert und gegen die jeweilige Konzentration des modifizierten Proteins aufgetragen. Die Ermittlung des K_D-Wertes unter Gleichgewichtsbedingungen erfolgte durch nicht-lineare Regression.

[0094] **Abb. 6:** Bindung von SPU-3-H13 aus der Selektion gegen Hydrocortison an Steroide im ELISA. Je- weils drei Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte wurden Hydrocortison-, Testosteron- und Östradiol-BSA Konjugat bzw. mit BSA belegt und mit SPU-3-H13 (4 μ M) bzw. mit dem im Bereich der Bindungsstelle nicht veränderten Ubiquitin-Proteingerüst (50 μ M) jeweils in PBST 0,1 inkubiert (90 min bei 30 °C). Der Bindungsnachweis erfolgte mit Ni-NTA/Peroxidase Konjugat (1 : 500 in PBST 0,1, 60 min bei 30 °C) und mit Hilfe des ImmunoPure-Kits von Pierce. Blocking und Waschen: s. **Abb. 5**. Die Signalintensität wurde nach Abstoppen der Farbreaktion mit H₂SO₄ bei 405 nm detektiert und die Mittelwerte von drei Messungen aufgetragen.

Beispiel 1: Bereitstellung eines synthetischen Ubiquitin-Gens für die Selektion von modifizierten Proteinen mit neu erzeugter Bindungsaffinität

[0095] Die gentechnischen Arbeiten wurden sofern nicht anders angegeben nach dem Fachmann geläufigen Standardprotokollen wie z. B. von Sambrook et al. (2001) durchgeführt.

[0096] Für die Herstellung der DNA-Sequenz (Seq-ID No. 1) für ein modifiziertes Ubiquitin-Proteingerüst mit den Substitutionen Ile44Ala, Lys48Arg, Arg54Leu, Val70Ala, Arg72Leu, G1y75Ala sowie mit der Deletion von G1y76 als Ausgangspunkt für die Gewinnung von künstlichen Bindungsproteinen wurde folgendermaßen vorgegangen: Für die Gensynthese wurde eine PCR-Reaktion in einem Volumen von 50 μ l durchgeführt, in dem jeweils 2,5 μ l der sechs Oligodesoxynukleotide (Seq-ID No. 2, Seq-ID No. 3, Seq-ID No. 4, Seq-ID No. 5, Seq-ID No. 6, Seq-ID No. 7; jew. 0,1 μ M), die in ihrer Basenpaarabfolge insgesamt das zu synthetisierende Gen repräsentierten, als Templates vorlagen. Die Sequenzen der eingesetzten Oligodesoxynukleotide entsprachen dabei jeweils 40 bis 50 Basenpaar langen Abschnitten des kodierenden bzw. nicht-kodierenden

DNA-Stranges des künstlichen Gens und überlappten alternierend an ihren 3'- und 5'-Enden mit ca. 15 Basen. Zusätzlich enthielt der Ansatz jeweils 2,5 µl flankierende Primer (Seq-ID No. 8, Seq-ID No. 9; 10 µM) sowie 5 µl 10 × Taq-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100), 3 µl 25 mM MgCl₂ und 4 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Nach Auffüllen mit H₂O wurde der Reaktionsansatz im Thermozykler zwecks Denaturierung für 2 min auf 94 °C erhitzt. Dann wurden 2,5 U der Taq-Polymerase (Promega) in der Hitze zugegeben (Hot Start) und das PCR-Programm gestartet. In 25 Zyklen wurde für je 1 min bei 94 °C, 1 min bei 55 °C und für 1,5 min bei 72 °C inkubiert. Eine abschließende Inkubation erfolgte für 5 min bei 72 °C.

[0097] Das gewünschte PCR-Produkt wurde mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese identifiziert und aus dem Ansatz mit Hilfe des MinElute Reaction Cleanup-Kit (Qiagen) gereinigt. 1,0 ng der isolierten DNA wurden als Template für eine zweite Amplifizierung verwendet, die diesmal unter Verwendung der Pfu-Polymerase (Promega) ebenfalls in einem Volumen von 50 µl realisiert wurde. Dazu wurden 5 µl des mitgelieferten 10 × Pfu-Puffers (200 mM Tris/HCl, pH 8,8, 20 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 mg/ml BSA) sowie 4 µl dNTP-Mix verwendet und mit H₂O aufgefüllt. Zusätzlich enthielt der Ansatz flankierende Primer (Seq-ID No. 8, Seq-ID No. 9; 10 µM) zur Einführung geeigneter Schnittstellen. Das gewünschte PCR-Produkt wurde mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese isoliert und mit Hilfe des Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kits (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in den Klonierungsvektor pCR®4Blunt-TOP-PO® inseriert. Mit dem entsprechenden Ligations-Reaktionsansatz wurden mitgelieferte chemisch kompetente Zellen transformiert und auf einer Agar-Platte mit LB/Amp/Kan-Medium ausplattiert. Die Platte wurde für 16 h bei 37 °C bebrütet und gewachsenen Kolonien hinsichtlich des erwünschten Ligationsproduktes analysiert. Dazu wurde Plasmid-DNA im Mini-Maßstab mit Hilfe des Plasmid-Isolierungskits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers präpariert und einem Restriktionsverdau mit den DNA-Endonukleasen NdeI und XhoI (New England Biolabs), deren Erkennungssequenzen durch die flankierenden Primer in das PCR-Produkt eingeführt worden waren, unterworfen. Mit Plasmiden, die das erwartete Schnittmuster aufwiesen, wurde im Bereich der inserierten Gen-Kassette mit Hilfe der Taq DNA-Polymerase eine DNA-Sequenzanalyse durchgeführt. Dabei wurde der CycleReader™ AutoDNA Sequencing Kit (Fermentas) nach Angaben des Herstellers sowie 0,5 µg Plasmid-DNA und 1,0 pmol des entsprechenden fluoreszenzmarkierten Primers verwendet. Der dabei neusynthetisierte DNA-Strang wurde während der Polymerasereaktion markiert und durch den Einbau von Di-desoxynukleotiden statistisch, aber basenspezifisch terminiert. Die entstandenen fluoreszierenden DNA-Fragmente wurden anschließend in einem Liquor-Sequenzierautomaten durch Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese aufgetrennt und als Bandenmuster für A, C, G, T in benachbarten Spuren sichtbar gemacht.

[0098] Genkassetten mit korrekter DNA-Sequenz wurden durch präparativen NdeI/XhoI-Restriktionsverdau aus dem Klonierungsvektor pCR®4Blunt-TOP-PO® herausgeschnitten und durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Die Insertion des Gens für das modifizierte Ubiquitin-Proteingerüst erfolgte in den Expressionsvektor pET20B(–) (Novagen) für die Produktion des entsprechenden Proteins bzw. in den Phasmid-Vektor pMUBI-1 zur Konstruktion einer Bibliothek von Ubiquitin-Varianten.

Beispiel 2: Herstellung einer Bibliothek von Ubiquitin-Varianten

[0099] Zur zufälligen ortsgerichteten Mutagenese von 8 Kodons am Amino- bzw. Carboxyterminus des synthetischen Ubiquitin-Gens wurden zwei aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen durchgeführt. Der erste Amplifizierungsschritt fand unter Verwendung der Pfu-Polymerase (Promega) in einem Volumen von 10 × 50 µl statt. Dazu wurden pro Ansatz 5 µl des mitgelieferten 10 × Pfu-Puffers sowie 4 µl dNTP-Mix verwendet und mit H₂O aufgefüllt. Weiterhin enthielt der Ansatz jeweils 2,5 µl flankierende Primer (Seq-ID No. 10, Seq-ID No. 11; 10 µM) zur Einführung der gewünschten Basenpaar-Austausche. Als Template wurden 1,0 ng pMUBI-1 verwendet, der das nicht-mutierte synthetische Ubiquitin-Gen trug. Nach Zugabe von 2,5 U der Pfu-Polymerase (s. o.) wurde in 25 Zyklen für je 1 min bei 94 °C, 1 min bei 60 °C und für 1,5 min bei 72 °C inkubiert. Eine abschließende Inkubation erfolgte für 5 min bei 72 °C. Für den selektiven Abbau der eingesetzten Matrizen-DNA, wurden pro Reaktionsansatz 10 U DpnI zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das gewünschte PCR-Produkt wurde mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese und dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) isoliert.

[0100] Der zweite Amplifizierungsschritt wurde in einem 1.000 µl-Ansatz durchgeführt, wobei ca. 1,0 ng des in der ersten PCR-Reaktion gewonnenen Produktes eingesetzt und die Taq-Polymerase verwendet wurden. Der Reaktionsansatz wurde – adaptiert auf das 20fache Volumen – wie oben ausgeführt aus 10 × Taq-Puffer, 25 mM MgCl₂, dNTP-Mix sowie den flankierenden Primern (Seq-ID No. 12, Seq-ID No. 13; 10 µM), die an ihren 5'-Enden biotinyliert waren und jeweils nicht miteinander kompatible Erkennungssequenzen für die Endonuklease SfiI trugen. Nach Auffüllen mit H₂O wurden 2,5 U der Taq-Polymerase in der Hitze zugegeben

(s. o.) und das PCR-Programm gestartet. In 25 Zyklen wurde für je 1 min bei 94 °C, 1 min bei 60 °C und für 1,5 min bei 72 °C inkubiert. Eine abschließende Inkubation erfolgte für 5 min bei 72 °C.

[0101] Die darauf folgende Spaltung des erhaltenen Amplifizierungsproduktes erfolgte direkt im PCR-Reaktionsansatz. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 4.000 µl die komplette PCR-Reaktionslösung mit entsprechenden Volumen des mitgelieferten 10 × Puffer II (100 mM Tris/HCl, pH 7,9, 100 MgCl₂, 500 mM NaCl, 10 mM Dithiothreitol), 10 × BSA-Lösung und H₂O gemischt. Weiterhin wurden 4.000 U des Restriktionsenzymes SfiI (New England Biolabs) zugegeben und für 16 h bei 50 °C inkubiert. Die DNA wurde aus dem Ansatz mit Hilfe des MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen) isoliert und in 400 µl sterilem H₂O aufgenommen. Zur Abtrennung von nicht SfiI-geschnittenem PCR-Produkt wurde die isolierte DNA mit dem gleichen Volumen „Binding-Solution“ (Dynal), das 1,0 mg/ml magnetische Kugelchen mit oberflächengekoppeltem Streptavidin („Dynabeads Kilobase Binder“) enthielt, gemischt und für 4,5 h auf einem Rollenmischer bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Kugelchen mit eventuell noch vorhandener biotinylierter DNA wurden präzipitiert, während komplett mit SfiI gespaltene DNA, die keine biotinylierten Enden mehr aufweisen sollte, im Überstand verblieb und über Nacht gefällt wurde. Das so erhaltene mit SfiI gespaltene und an den gewünschten Positionen mutagenisierte Ubiquitin-Gen wurde in sterilem H₂O gelöst, nochmals mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) entsalzt und wies schließlich eine Konzentration von 200 fmol/µl in H₂O auf.

[0102] Zur Vorbereitung des Empfängervektors wurde das Phasmid pMUBI-1 nach Herstellerangaben mit SfiI geschnitten und das größere (Vektor-)Fragment mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese und dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) isoliert. Um intramolekulare Ligation zu verhindern wurden seine 5'-Enden dephosphoryliert. Hierfür wurden 0,5 U der Alkalische Phosphatase aus Shrimp (Pandalus borealis) sowie der mitgelieferte Puffer in einem Gesamtvolumen von 200 µl verwendet. Die Mischung wurde für 90 min bei 37 °C inkubiert, die DNA aus dem Ansatz mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) isoliert und nochmals entsalzt (QIAquick PCR Purification Kit). Die DNA des Vektorfragments wies schließlich eine Konzentration von 50 fmol/µl in H₂O auf.

[0103] Zur Ligation wurden 1,6 pmol des PCR-Fragments und 8,0 pmol des Vektorfragments von pMUBI-1 in Gegenwart von 2 U T4 DNA-Ligase (GibcoBRL) in einem Gesamtvolumen 1.600 µl (50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5 % (w/v) PEG-8.000) für drei Tage bei 16 °C inkubiert. Nach Erhitzen des Ansatzes auf 65 °C für 15 min wurde die DNA gefällt. Dazu wurden jeweils 100 µl der Reaktionslösung mit 100 µl Ethanol sowie 10 µl 5 M NaAc, pH 3,0 gemischt und für 16 h bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde zentrifugiert (60 min, 12.500 g), mit Ethanol (70 % v/v, -20 °C) gewaschen, erneut zentrifugiert und die präzipitierte DNA schließlich in 60 µl sterilem H₂O gelöst. Zur Elektroporation wurde das Gene Pulser® II-System (Biorad) sowie Küvetten mit Elektrodenabstand von 1,0 mm (Biozym) bei 4 °C im Kühlraum verwendet. Mit jeweils 3,5 µl der oben erhaltenen Lösung wurden elektrokompetente *E. coli* XL1Blue (Stratagene) nach Angaben des Herstellers transformiert. Die erhaltene Zensususpension wurde auf fünf Agarplatten (20 × 20 cm) mit LB/Chloramphenicol-Medium ausplattiert. Die Platten wurden für 16 h bei 37 °C bebrütet und die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die konstruierte Bibliothek enthielt demnach 2,8 × 10⁷ unabhängige Klone von denen jeder 10.000fach in der Bibliothek vorliegen sollte. Die Kolonien wurden dann mit insgesamt 100 ml SOC-Medium mit 10 % (v/v) Glycerin abgeschwemmt und in Aliquots á 1,0 ml bei -80 °C gelagert. Von den erhaltenen Klonen wurde mit Hilfe des DNA-Miniprep Kits der Firma Qiagen von 12 willkürlich ausgewählten der Phasmid-Vektor isoliert und die DNA-Senzenz im Bereich des mutagenisierten Ubiquitin-Gens analysiert. Dabei wiesen alle Klone funktionelle Sequenzen – d. h. keine Verschiebung des Leserasters durch Insertionen oder Deletionen – sowie qualitativ völlig unterschiedliche Substitutionen an den mutagenisierten Positionen auf. Zufällige Austausche außerhalb der mutagenisierten Bereiche waren nicht vorhanden.

Beispiel 3: Darstellung von Ubiquitin-Varianten auf der Phagenoberfläche und Selektion von Ubiquitin-Varianten gegen Proteine und Haptene

[0104] Für die Produktion von Phagemiden mit oberflächen-präsentierten Varianten des mutierten Ubiquitins wurden 100 ml 2 × YT/Chloramphenicol-Medium mit 1,0 ml der in Beispiel 2 erhaltenen Glycerin-Kultur inkuliert und für 16 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Mit 10 ml dieser stationären Kultur wurde 112 × YT/Chloramphenicol-Medium angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,4 geschüttelt. Dann erfolgte die Infektion mit 10¹³ cfu M13KO7-Helperphagen und eine Inkubation bei 37 °C ohne Schütteln für 30 min. Nach Zugabe von 50 mg/l Kanamycin wurde für 30 min bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt und dann die Genexpression auf pMUBI-1 durch Einstellen der Kultur auf 0,2 mg/l Anhydro-Tetrazyklin (Stammlösung: 2,0 mg/ml in DMF) induziert. Die Inkubatortemperatur wurde dann auf 26 °C erniedrigt und die Kultur für 16 h bei 220 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden schließlich durch Zentrifugation (30 min, 12.000 g, 4 °C) sedimentiert und verworfen während der Überstand filtriert (0,45 µm) wurde. Die enthaltenen Phagemide wurden durch

Zugabe von $\frac{1}{4}$ Volumen 20 % (w/v) PEG 6.000, 2,5 M NaCl und Inkubation für 1 h auf Eis gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 12.000 g, 4 °C) präzipitiert. Die Phagemide wurden dann in 4 ml steriles eiskaltem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) gelöst, für 30 min auf Eis gelagert und zentrifugiert (30 min, 12.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde mit $\frac{1}{4}$ Volumen 20 % (w/v) PEG 6.000, 2,5 M NaCl versetzt, die Phagemide erneut durch Inkubation für 1 h auf Eis gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 12.000 g, 4 °C) präzipitiert. Die Phagemide wurden dann wiederum in 4 ml steriles eiskaltem PBS gelöst, für 30 min auf Eis gelagert und zentrifugiert (30 min, 12.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde 1 : 1 mit 4 % (w/v) Rinderserum-Albamin (BSA) in PBS gemischt, für 30 min auf einem Rollenmischer bei RT inkubiert und dann direkt für die Affinitätsanreicherung verwendet.

[0105] Als Affinitätsmatrix für die Isolierung von Phagemiden mit oberflächenpräsentierten Ubiquitin-Varianten, die vorher definierte Zielsubstanzen binden sollten, wurden jeweils 24 Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte mit der entsprechenden Substanz beschichtet. Als Zielsubstanzen diente die rekombinant hergestellte aminoterminale Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors (recGLP1-R; Bazarsuren et al., 2002), der F_c-Teil von humanem Immunglobulin M (F_c-IgM) sowie an BSA gekoppeltes Hydrocortison (HC), die über Nacht bei 4 °C an der Mikrotiter-Platte immobilisiert wurden.

[0106] Unbelegte Bindungsplätze an der Oberfläche der Mikrotiter-Platte wurden durch Inkubation der Vertiefungen mit jeweils 400 µl 4 % BSA in PBS für 90 min bei RT geblockt. Dann wurden pro Vertiefung 100 µl der vorbereiteten Phagemid-Lösung pipettiert und für 90 min bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Ungebundene Phagemide wurden dann durch zweimaliges Waschen mit PBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST 0,05), zweimalige Inkubation mit 400 µl 4 % BSA in PBS für 5 min und zweimaliges Waschen mit PBS sowie kräftiges Ausklopfen entfernt. An die Affinitätsmatrix gebundene Phagemide wurden schließlich mit Hilfe von 100 µl 100 mM Triethylamin pro Vertiefung und Inkubation für 10 min bei RT eluiert. Die Lösungen mit den eluierten Phagemiden wurden – getrennt nach den jeweiligen Zielsubstanzen – vereinigt und durch Zugabe von $\frac{1}{2}$ Volumen 1 M Tris/HCl, pH 7,4 sofort neutralisiert. Die jeweils erhaltene Lösung wurde zur Infektion von *E. coli* XL1Blue zu 20 ml einer Kultur mit einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,4 überführt und für 30 min bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Die Vertiefungen der Mikrotiter-Platte wurden erneut gewaschen (5 × PBST 0,05, 1 × PBS) und jeweils 100 µl einer Kultur von *E. coli* XL1Blue mit einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,4 zugegeben. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 30 min wurden diese Zellen mit den vorher infizierten vereinigt. Die jeweilige Zensususpension wurden auf einer Agarplatte (20 × 20 cm) mit LB/Chloramphenicol-Medium ausplattiert und enthielten gewöhnlich zwischen 10⁵ und 10⁷ koloniebildende Klone. Die Platte wurden für 16 h bei 37 °C bebrütet, die gewachsenen Kolonien mit 10 ml SOC-Medium mit 10 % (v/v) Glycerin abgeschwemmt und in Aliquots á 1,0 ml bei –80 °C gelagert.

[0107] Zur wiederholten Phagenproduktion und erneuten Zyklen der Affinitätsanreicherung wurde das beschriebene Verfahren wiederholt, wobei für die Anzucht der Bakterienzellen jeweils zehnfach geringere Kulturvolumina verwendet und stringentere Waschbedingungen (2. Runde: 3 × Waschen mit PBST 0,1, dreimalige Inkubation mit 4 % BSA in PBS für 5 min und 3 × Waschen mit PBS; 3. Runde: 6 × Waschen mit PBST 0,1, dreimalige Inkubation mit 4 % BSA in PBS für 5 min und 3 × Waschen mit PBS) gewählt wurden.

Beispiel 4: Isolierung und Charakterisierung von monoklonalen Phagemiden mit spezifischer Bindung an die Zielsubstrate (Einzelphagen-ELISA)

[0108] Von den nach der 3. Runde der Affinitätsanreicherung an recGLP1-R, F_c-IgM sowie HC erhaltenen Kolonien wurden jeweils 96 zufällig ausgewählt und im Einzelphagen-ELISA hinsichtlich ihrer Bindung an das entsprechende Antigen bzw. Hapten analysiert. Dazu wurden je 300 µl 2 × YT/Chloramphenicol-Medium mit einer Einzelkolonie inkuliert und für 18 h bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Mit jeweils 80 µl dieser stationären Kultur wurden 4 ml 2 × YT/Chloramphenicol-Medium angeimpft und für 4 h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Um paralleles Arbeiten zu ermöglichen wurden hierzu 4 „Deep-Well“-Platten (Qiagen; jeweils 24 Vertiefungen) verwendet. Nach Infektion der XL1Blue-Zellen mit jeweils ca. 10¹¹ cfu M13KO7-Helferphagen wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren 30 min bei 37 °C und 180 rpm erfolgte die Zugabe von 50 mg/l Kanamycin. Dann wurde für 30 min bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt und die Genexpression auf pMUBI-1 durch Einstellen der Kultur auf 0,2 mg/l Anhydro-Tetrazyklin (Stammlösung: 1,0 mg/ml in DMF) induziert. Die Inkubatortemperatur wurde dann auf 22 °C erniedrigt und die Kultur für 16 h bei 180 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden schließlich durch Zentrifugation (30 min, 5.000 g, 4 °C) sedimentiert und die Überstände in frische „Deep-Well“-Platten überführt. Die enthaltenen Phagemide wurden durch Zugabe von 1 Volumen 20 % (w/v) PEG 6.000, 2,5 M NaCl und Inkubation für 1 h auf Eis gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 5.000 g, 4 °C) präzipitiert. Die Phagemide wurden dann in 1,0 ml steriles eiskaltem PBS gelöst und 1 : 1 mit 6 % BSA in PBST 0,1 gemischt und für 1 h bei RT inkubiert.

[0109] Zur Durchführung des ELISA wurde pro zu analysierendem monoklonalem Phagemid jede eine Mikroplatten-Vertiefung über Nacht bei 4 °C mit Antigen- und eine mit BSA-Lösung belegt. Zur Absättigung verbliebener Bindungsstellen an der Plastikoberfläche wurde dann jede Vertiefung für 2 h mit 3 % BSA (w/v) PBST 0,5 geblockt. Die Vertiefungen wurden danach dreimal mit PBST 0,1 gespült und ausgeklopft. Anschließend wurden je 100 µl der oben hergestellten Phagemid-Lösung in die entsprechenden Vertiefungen der Platte pipettiert.

[0110] Nach einer Inkubationsdauer von zwei Stunden wurde dreimal mit PBST 0,1 gewaschen. Für den Nachweis von gebundenen Phagemiden wurde ein anti-M13 Antikörper-Peroxidase Konjugat (Amersham Pharmacia Biotech) im Verhältnis 1 : 5.000 in PBST 0,1 verdünnt und je 100 µl davon jeder Vertiefung zugesetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wurden die Vertiefungen dreimal mit PBST 0,1, dann dreimal mit PBS gespült. Schließlich wurden jeweils 100 µl des ImmunoPure-Kits (Pierce) hinzugefügt und die Farbreaktion dann nach 15 min durch Zugabe von 100 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgte mit Hilfe eines Sunrise Remote Readers (Tecan) bei 450 nm.

[0111] Die DNA von Ubiquitin-Varianten aus Phagemiden, die im ELISA ein relativ starkes Bindungssignal an das jeweilige Antigen – nicht aber an BSA – zeigten (jeweils ca. 20), wurde mit Hilfe des Primer Seq-ID No. 14 und dem oben beschriebenen Verfahrens sequenziert. Ein Teil der analysierten DNA-Sequenzen wiesen Verschiebungen des Leserasters oder Amber-Stopcodons auf und wurden daher nicht weiter verwendet. Beispielsweise sind Aminosäure-Substitutionen von Ubiquitin-Varianten, die auf diese Weise erhalten und weiter analysiert wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Aminosäure-Substitutionen im Bereich der de novo generierten Bindungsstelle von Ubiquitin-basierten modifizierten Proteinen nach Selektion gegen unterschiedliche Zielsubstanzen.

Selektion	Pos. 2:	Pos. 4:	Pos. 6:	Pos. 62:		Pos. 63:	Pos. 64:	Pos. 65:		Pos. 66:
				Gln	Phe			Glu	Ser	
SPU ¹	—	Gln	Phe	Lys	Gln	Lys	Glu	Ser	Thr	
SPU-1-D10	RecGLP1-R	Ser	Phe	Pro	Tyr	Ser	Lys	Pro	Ser	
SPU-2-A7	F _c -IgM	Ser	Leu	Pro	Pro	Pro	Gly	Arg	Asn	
SPU-3-H13	HC	Gly	Gly	Lys	Phe	Phe	Val	Thr	Asn	

¹SPU: Ubiquitin-Proteingerüst ohne Substitutionen in der Bindungstasche

Beispiel 5: Herstellung und Reinigung der Ubiquitin-basierten modifizierten Proteine

[0112] Die Charakterisierung der proteinchemischen Eigenschaften von selektierten Ubiquitin-Varianten aus Phagemiden mit relativ starkem Bindungssignal im ELISA und mit funktioneller DNA-Sequenz erfolgte nach der Klonierung des entsprechenden Gens in den Expressionsvektor pET20B(–) (s. o.). Dies ermöglichte die rekombinante Herstellung der jeweiligen Variante mittels E. coli BL21/PUBS sowie deren Einschritt-Reinigung durch Immobilisierte Metalchelat Affinitäts-Chromatographie (IMAC) mit Hilfe eines carboxyterminal fusionierten Hexahistidin-Peptids.

[0113] Für die rekombinante Herstellung der Ubiquitin-basierten modifizierten Proteine mit neuen Bindungseigenschaften wurden 50 ml 2 × YT/Amp/Kan-Medium mit einer entsprechenden Einzelkolonie inkuliert und für 16 h bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurden 1,5 l 2 × YT/Amp/Kan-Medium im Verhältnis 1 : 50 angeimpft und bis zum Erreichen einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Nach Induktion der Fremdgen-Expression durch Zugabe von 1 mM/l α-D-Isopropyl Thiogalaktosid (IPTG) wurde für weitere 3 h bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (30 min, 5.000 g, 4 °C) sedimentiert und in 40 ml NPI-20 (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch halbstündige Inkubation mit 200 µg/ml Lysozym und 500 U Benzonase bei RT sowie fünfmaligem Pulsen mit Ultraschall für jeweils 15 s. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30 min, 15.000 g, 4 °C) sedimentiert und der Überstand, der das lösliche Gesamtzellprotein enthielt, konnte direkt für eine darauffolgende IMAC eingesetzt werden.

[0114] Die Chromatographie erfolgte an einer ÄKTA™-Explorer FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia Biotech) unter Verwendung einer 5 ml HiTrap Chelating HP Säule (Amersham Pharmacia Biotech) bei RT und einer Flussgeschwindigkeit von 5 ml/min. Die Säule wurde zunächst mit 5 Säulenvolumen NPI-20 äquilibriert, woraufhin das Gesamtzellprotein über die Säule geleitet wurde. Nicht-gebundenes Protein wurde durch Spülen mit 30 Säulenvolumen NPI-20 ausgewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 20 mM bis 250 mM Imidazol in insgesamt 20 Säulenvolumen wobei das Eluat in Fraktionen á 2,5 ml aufgefangen wurde. Die Fraktionen, welche die gereinigte Ubiquitin-Variante enthielten, wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert und vereinigt. Die erzielten Ausbeuten der gereinigten rekombinanten Ubiquitin-Varianten lagen dabei zwischen 10 und 30 mg/l Kulturvolumen.

Beispiel 6: Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Ubiquitin-basierten modifizierten Proteinen mit neuen Bindungseigenschaften

[0115] Die Bindung der jeweils selektierten Ubiquitin-Varianten, die wie in Beispiel 5 beschrieben gereinigt worden waren, an recGLP1-R, F_c-IgM sowie HC wurde im ELISA entweder mit einem Ni/NTA-Peroxidase Konjugat (Qiagen) oder mit einem anti-Ubiquitin Antiserum (Sigma) aus Kaninchen nachgewiesen. Dazu wurden Mikrotiterplatten-Vertiefung über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden Antigen und z. B. BSA für den Nachweis unspezifischer Bindung belegt und zur Absättigung verbliebener Bindungsstellen 2 h mit 3 % BSA (w/v) PBST 0,5 geblockt. Die Platte wurden dann dreimal mit PBST 0,1 gespült und ausgeklopft. Anschließend wurde je 100 µl der Lösung des jeweiligen gereinigten modifizierten Proteins in PBST 0,1 in Konzentrationsabstufungen (von unverdünnt bis zur Verdünnung 1 : 16) in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Nach einer Inkubationsdauer von zwei Stunden wurde dreimal mit PBST 0,1 gespült. Für den Nachweis des gebundenen modifizierten Proteins wurde das Ni/NTA-Peroxidase Konjugat im Verhältnis 1 : 500 bzw. das anti-Ubiquitin Antiserum im Verhältnis 1 : 10 in PBST 0,1 verdünnt und je 100 µl davon jeder Vertiefung zugesetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT erfolgte entweder direkt die Detektion des Ni/NTA-Peroxidase Konjugats (s. u.) bzw. die Inkubation mit einem anti-Kaninchen Antikörper konjugiert mit Peroxidase (1 : 2.500 in PBST 0,1) für eine Stunde bei RT. Zur Detektion wurden die Vertiefungen dreimal mit PBST 0,1, dann dreimal mit PBS gespült. Schließlich wurden jeweils 100 µl ImmunoPure-Kits (Pierce) hinzu pipettiert und die Farbreaktion dann nach 15 min durch Zugabe von 100 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgte mit Hilfe eines Sunrise Remote Readers (Tecan) bei 450 nm. Die aus erhaltenen Werte der Absorptionsintensität wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Sigma Plot“ ausgewertet. Dazu wurde die jeweils gemessene Extinktion gegen die entsprechende eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen und die erhaltene Kurve mit Hilfe der Formel (1) durch nicht-lineare Regression angepaßt.

$$y = \frac{a * x}{(b + x)}$$

[0116] Unter der Annahme eines Assoziations/Dissoziations-Gleichgewichtes zwischen dem immobilisierten Antigen und dem modifizierten Protein ist dabei:

x = Konzentration des eingesetzten modifizierten Proteins

y = Konzentration des Antigen/modifiziertes Protein-Komplexes (hier indirekt über die enzymatische Aktivität des Reporterenzymes gemessen)

a = Gesamtkonzentration des immobilisierten Antigens

b = Dissoziationskonstanten (K_D)

[0117] Beispielhaft sind in Abb. 5 die aus einem solchen ELISA-Experiment erhaltenen Bindungskurven der Ubiquitin-Variante SPU-1-D10, welche aus der Affinitätsanreicherung an recGLP1-R gemäß Beispiel 3 und 4 erhalten worden war, dargestellt. Die für die einzelnen selektierten Ubiquitin-basierten modifizierten Proteine mit neuen Bindungseigenschaften erhaltenen Bindungsdaten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Dissoziationskonstanten von Komplexen aus selektierten Ubiquitin-basierten modifizierten Proteinen und unterschiedlichen Zielsubstanzen.

Modifiziertes Protein	Zielsubstanz	Apparenter K_D -Wert
SPU-1-D10	recGLP1-R	166 \pm 0,06 nM
SPU-2-A7	F _c -IgM	9,4 \pm 0,9 μ M
SPU-3-H13	HC	10,7 \pm 1,0 nM

[0118] Weiterhin wurden einzelne modifizierte Proteine hinsichtlich der Spezifität ihrer Bindung überprüft. Dazu wurden ELISA-Experimente mit einer einzelnen geeigneten Konzentration der modifizierten Proteine wie oben beschrieben durchgeführt. Dabei wurden entsprechende Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit dem Zielsubstrat sowie mit strukturell ähnlichen Substanzen belegt. Beispielhaft sind in **Abb. 6** die aus einem solchen ELISA-Experiment erhaltenen Bindungskurven der Ubiquitin-Variante SPU-2-H13, welche aus der Affinitätsanreicherung an HC gemäß Beispiel 3 und 4 erhalten worden war, dargestellt.

Literatur:

- Bazarsuren, A., Grauschoff, U., Worny, M., Reusch, D., Hoffmann, E., Schaefer, W., Panrner, S. und Rudolph, R. (2002) In vitro folding, functional characterization, and disulfide pattern of the extracellular domain of human GLP-1 receptor. *Biophys. Chem.* 96, 305–318.
- Beal, R., Devereaux, Q., Xia, G., Rechsteiner, M. und Pickart, C. (1996) Surface hydrophobic residues of multi-ubiquitin chains essential for proteolytic targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 861–866.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. und Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Res.*, 28, 235–242.
- Beste, G., Schmidt, F. S., Stibora, T. und Skerra, A. (1999) Small antibody-like proteins with predescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1898–1903.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, R., Lee, S. M., Pope, H. S., Riordan, G. S. und Whitlow, M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423–426.
- Burch, T. J. und Haas, A. L. (1994) Site-directed mutagenesis of Ubiquitin. Differential roles for Arginine in the interaction with Ubiquitin-activating enzyme. *Biochemistry* 33, 7300–7308.
- Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S. H., Lee, B. und Pastan, I. (1993) A recombinant immunotoxin containing a disulfide stabilized Fv-Fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7538–7542.
- Carter, P., Kelley, R. F., Rodrigues, M. L., Snedecor, B., Covarrubias, M., Velligan, M. D., Wong, W. L. T., Rowland, Kotts, C. E., Carver, M. E., Yang, M., Bourell, J. H., Shepard, H. M. und Henner, D. (1992) High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. *Biotechnology* 10, 163–167.
- Daugherty, P. S., Chen, G., Olsen, M. J., Iverson, B. L. und Georgiou, G. (1998) Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Eng.* 11, 825–832.
- Dübel, S. und Kontermann, R. E. (2001) Recombinant Antibodies. In: Kontermann, R. und Dübel, S. (Hrsg.) „Antibody Engineering.“ Springer Verlag, Heidelberg.
- Filippi, M., Tribioli, C. und Toniolo, D. (1990) Linkage and sequence conservation of the X-linked genes DX253 (P3) and DDX254E (GdX) in mouse and man. *Genomics* 7, 453–457.
- Griep, R. A., van Twisk, C., van der Wolf, J. M. und Schots, A. (1999) Fluobodies: green fluorescent single-chain Fv fusion proteins. *J. Immunol. Methods* 230, 121–130.
- Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H. R. und 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.
- Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A. und Plückthun, A. (2000) Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nature Biotechnology* 18, 1287–1292.
- He, M. und Taussig, M. J. (1997) Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Res.* 25, 5132–5134.
- Holliger, P., Prospero, T. und Winter, G. (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibodies. *Proc. Natl. Sci. USA* 90, 6444–6448.
- Hoogenboom, H. R., de Bruine, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J. W. und Roovers, R. C. (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4, 1–20.
- Jones, D. und Candido, E. P. (1993) Novel ubiquitin-like ribosomal protein fusion genes from the nematodes

- Caenorhabditis elegans and Caenorhabditis briggsae. *J. Biol. Chem.* 268, 19545–195451.
- Kieke, M. C., Cho, B. K., Boder, E. T., Kranz, D. M. and Wittrup, K. D. (1997) Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Eng.* 10, 1303–1310.
- Knappik, A., Ge, S., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A. and Virnekäs, B. (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.*, 296, 57–86.
- Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. and Koide, S. (1998) The fibronectin type III domain as scaffold for novel binding proteins. *J. Mol. Biol.* 284, 1141–1151.
- Kumar, S., Yoshida, Y. and Noda, M. (1993) Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 393–399.
- Marx, J. (2002) Ubiquitin lives up to its name. *Science* 297, 1792–1794.
- Michiels, L., Van der Rauwelaert, E., Van Hasselt, F., Kas, K. and Merregaert, J. (1993) Fau cDNA encodes a ubiquitin-like-S30 fusion protein and is expressed as an antisense sequence in the Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus. *Oncogene* 8, 2537–2546.
- Miura, T., Klaus, W., Gsell, B., Miyamoto, C. and Senn, H. (1999) Characterization of the binding interface between Ubiquitin and class I human Ubiquitin-conjugating enzyme 2b by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J. Mol. Biol.* 290, 213–228.
- Muller, B.H., Chevrier, D., Boulain, J.-C and Guesdon, J.-L. (1999) Recombinant singlechain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate for one-step immunodetection in molecular hybridization. *J. Immunol. Methods* 227, 177–185.
- Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2001) SUMO, ubiquitins mysterious cousin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 202–210.
- Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T. and Chothia C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 247, 536–540.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Skerra, A. and Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038–1041.
- Skerra, A. (2000) Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *J. Mol. Recog.* 13, 167–187.
- Reiter, Y. and Pastan, I. (1998) Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. *Trends Biotechnol.* 16, 513–520.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E. and Cook, W. J. (1987) Structure of Ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 194, 531–544.
- Winter, G. (1998) Synthetic human antibodies and a strategy for protein engineering. *FEBS Lett.* 430, 92–94.
- Wintrode, P. L., Makhadze, G. I. and Privalov, P. L. (1994) Thermodynamics of Ubiquitin unfolding. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 18, 246–253.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.

Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

Patentansprüche

1. Durch Substitution, Insertion, Deletion, chemische Modifikation oder Kombinationen hiervon modifiziertes Protein, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Proteinen der Protein-Superfamilie „ubiquitin-like proteins“, Proteinen, die ein Ubiquitin-artiges Faltungsmotiv aufweisen sowie Fragmenten oder Fusionsproteinen hiervon, wobei das Protein aufgrund dieser Modifikation eine vorher nicht vorhandene Bindungsaffinität gegenüber einem vorbestimmten Bindungspartner aufweist, erhältlich durch folgendes Verfahren:
 - a) Auswählen eines zu modifizierenden Proteins;
 - b) Bestimmen eines Bindungspartners;
 - c) Auswählen von Aminosäuren in einem oberflächenexponierten Bereich des Proteins, der mindestens einen Beta-Faltblattstrang des Beta-Faltblattbereichs und wahlweise Nicht-Beta-Faltblattbereiche beinhaltet;
 - d) Modifizieren der ausgewählten Aminosäuren durch Substitution, Insertion, Deletion und/oder chemische Modifikation;
 - e) Inkontaktbringen des modifizierten Proteins mit dem in Schritt b) bestimmten Bindungspartner;
 - f) Ermitteln derjenigen Proteine, die eine Bindungsaffinität gegenüber dem in Schritt b) vorbestimmten Bindungspartner aufweisen.
2. Protein nach Anspruch 1, wobei das Protein, das zur Modifikation ausgewählt wird, der Protein-Familie „ubiquitin-related proteins“ angehört.

3. Protein nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Protein, das zur Modifikation ausgewählt wird, eine mindestens 30%ige Aminosäuresequenzidentität zu humanem Ubiquitin und ein Ubiquitin-artiges Faltungsmotiv aufweist.
4. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Protein, das zur Modifikation ausgewählt wird, ein Ubiquitin-artiges Faltungsmotiv aufweist, und bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt wird, bestehend aus SUMO-1, FAU, NEDD-8, UBL-1 und GDX.
5. Protein nach Anspruch 1, wobei dass das Protein, das zur Modifikation ausgewählt wird, humanes Ubiquitin oder ein anderes Säuger-Ubiquitin ist.
6. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Modifikation, bevorzugt eine Substitution, zumindest teilweise an in der Primärsequenz direkt benachbarten Aminosäuren erfolgt.
7. Protein nach Anspruch 6, wobei die Anzahl der Modifikationen, bevorzugt Substitutionen, von direkt in der Primärsequenz benachbarten Aminosäuren 2 bis 8 direkt benachbarte Aminosäuren, weiterhin bevorzugt 3 bis 7 oder 4 bis 6 direkt benachbarte Aminosäuren, beträgt.
8. Protein nach Anspruch 6 oder 7, wobei ein Teil der in der Primärsequenz direkt benachbarten substituierten Aminosäuren in einem Anfangs- oder Endbereich eines beta-Faltblattstrangs liegt, wobei dieser Teil eine Länge von zwei oder mehr Aminosäuren, bevorzugt zwei oder drei Aminosäuren, aufweist.
9. Protein nach einem der Ansprüche 6 bis 8, wobei 5 oder mehr direkt in der Primärsequenz benachbarte Aminosäuren modifiziert, bevorzugt substituiert, werden, wovon zwei oder mehr, bevorzugt zwei oder drei, direkt benachbarte Aminosäuren den Anfang oder das Ende eines Beta-Faltblattstrangbereichs bilden.
10. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Modifikation solcher Aminosäuren vorgenommen wird, die einen zusammenhängenden Bereich auf der Oberfläche des Proteins bilden.
11. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei Aminosäuren an solchen Positionen modifiziert werden, die nicht zu Bereichen gehören, die bei einem Wildtyp-Ubiquitin an Bindungen zu Ubiquitin-Bindungspartnern beteiligt sind.
12. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens 25% der in Betasträngen befindlichen Aminosäuren des Proteins, bevorzugt des Ubiquitins, modifiziert sind.
13. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine Modifikation von Aminosäuren auch in Loop-Bereichen des Proteins erfolgt.
14. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich um humanes Ubiquitin oder ein hierzu homologes Protein handelt, und mindestens 8 oberflächenexponierte Aminosäuren des Ubiquitins modifiziert, bevorzugt substituiert, sind, so dass diese modifizierten Aminosäuren den Bereich mit Bindungsaffinität zu dem Bindungspartner bilden.
15. Protein nach Anspruch 14, wobei sich mindestens sechs der acht oberflächenexponierten Aminosäuren in einem Bereich des Proteins befinden, der dem beta-Faltblatt-Bereich zuzuordnen ist.
16. Protein nach Anspruch 14 oder 15, wobei sich mindestens 5 der modifizierten, bevorzugt substituierten, Aminosäuren in direkter Nachbarschaft in der Primärsequenz zueinander befinden.
17. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei Aminosäuren modifiziert sind, die sich in dem aminoterminalen Beta-Faltblattstrang und/oder in dem carboxyterminalen Beta-Faltblattstrang des Proteins befinden.
18. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei weiterhin Aminosäuren modifiziert sind, die sich in dem an den carboxyterminalen Beta-Faltblattstrang anschließenden Loop befinden.
19. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das modifizierte Protein humanes Ubiquitin ist, welches an den Positionen 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65 und 66 substituiert, deletiert, insertiert und/oder chemisch modifiziert, bevorzugt substituiert, wurde.

20. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Protein, das zur Modifikation ausgewählt wird, bereits Insertionen, Deletionen, Substitutionen und/oder chemische Modifikationen aufweist, so dass biologische und/oder proteinchemische Funktionen des Proteins ausgeschaltet oder neu generiert werden.

21. Protein nach Anspruch 20, wobei bei dem Protein nach Modifikation insgesamt mindestens 10, bevorzugt mindestens 15 Aminosäuren des Ubiquitins ausgetauscht sind.

22. Protein nach Anspruch 20 oder 21, wobei das Protein, das zur Veränderung durch Substitution, Insertion und/oder Deletion ausgewählt wird, humanes Ubiquitin ist, welches an einer oder mehreren der folgenden Positionen substituiert ist: 44, 48, 54, 70, 72, 75, und bei der die Aminosäureposition 76 deletiert ist, so dass das Ubiquitin weitgehend keine Wechselwirkung mit seinen natürlichen Bindungspartnern mehr aufweist.

23. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in Schritt d) durch Random-Mutagenese ein zufälliger Austausch der ausgewählten Aminosäuren erfolgt.

24. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in Schritt e) das Inkontaktbringen mit dem vorbestimmten Bindungspartner mittels eines geeigneten Selektionsverfahrens erfolgt, wie dem Phage-Display-, Ribosomal Display-, mRNA-Display- oder Cell-Surface-Display-Verfahren, Yeast Surface Display, Bacterial Surface Display, bevorzugt mittels des Phage-Display-Verfahrens.

25. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt f) die Ermittlung der Proteine mit einer Bindungsaaffinität zu dem vorbestimmten Bindungspartner durch eines oder mehrere der folgenden Verfahren erfolgt: ELISA, Plasmon-Oberflächenresonanz-Spektroskopie, Fluoreszenz-Spektroskopie, FACS, Isothermale Titrationskalorimetrie oder Analytische Ultrazentrifugation.

26. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, erhältlich dadurch, dass sich an Schritt f) ein Schritt der Isolierung und/oder Anreicherung des ermittelten Proteins mit Bindungsaaffinität zu dem vorbestimmten Bindungspartner anschließt.

27. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Bindungspartner ein Antigen oder ein Hapten ist.

28. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Bindungspartner ein biologischer Rezeptor, bevorzugt humaner GLP-1 Rezeptor, humaner PTH Rezeptor, oder ein Ligand oder eine Domäne hiervon ist, ein Tumormarker, Cytokine, Interleukine, Tumor Necrose Factor Alpha (TNF- α), Glycoprotein RezeptorIIb/IIIa (GPIIb/IIIa), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Ep-CAM, Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA), HERZ, ein Immunglobulin oder ein Teil hiervon, bspw. ein gesamter Antikörper, ein F_c-Teil von z. B. humanem Immunglobulin M oder ein Bereich eines Antikörpers im Bereich der Antigenbindungsstelle oder ein Hormon, wie Hydrocortison, ist.

29. Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bindungsaaffinität, ausgedrückt in K_D, zu dem vorbestimmten Bindungspartner 10⁻⁶ M bis 10⁻¹² M, weiterhin bevorzugt 10⁻⁸ bis 10⁻¹² M oder 10⁻⁹ bis 10⁻¹² M, beträgt.

30. Verfahren zur Herstellung eines durch Substitution, Insertion, Deletion, chemische Modifikation oder Kombinationen hiervon modifizierten Proteins, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Proteinen der Protein-Superfamilie „ubiquitin-like proteins“, Proteinen, die ein Ubiquitin-artiges Faltungsmotiv aufweisen sowie Fragmenten oder Fusionsproteinen hiervon, wobei das Protein aufgrund dieser Modifikation eine vorher nicht vorhandene Bindungsaaffinität gegenüber einem vorbestimmten Bindungspartner aufweist, mit den Schritten:

- a) Auswählen eines zu modifizierenden Proteins;
- b) Bestimmen eines Bindungspartners;
- c) Auswählen von Aminosäuren in einem oberflächenexponierten Bereich des Proteins, der mindestens einen beta-Faltblattstrang des Beta-Faltblattbereichs und wahlweise Nicht-Beta-Faltblattbereiche beinhaltet;
- d) Modifizieren der ausgewählten Aminosäuren durch Substitution, Insertion, Deletion und/oder chemische Modifikation;
- e) Inkontaktbringen des modifizierten Proteins mit dem in Schritt b) bestimmten Bindungspartner,
- f) Ermitteln derjenigen Proteine, die eine Bindungsaaffinität gegenüber dem in Schritt b) vorbestimmten Bindungspartner aufweisen.

31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die Schritte c) bis d) durch chemische Synthese des modifizierten Proteins realisiert werden.
32. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die Modifikation in Schritt d) mittels gentechnischer Veränderung einer zu dem entsprechenden modifizierten Protein zugehörigen DNA erfolgt, und die Expression des Proteins in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtsorganismen oder in vitro erfolgt.
33. Verfahren nach Anspruch 30, wobei in Schritt d) eine Genbibliothek erstellt wird.
34. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung sowie zur Trennung und Isolierung des entsprechenden Bindungspartners, mittels an sich bekannter Verfahren, wie Chromatographie oder Adsorptions-Technologie.
35. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 zur Diagnose und Behandlung von Krankheiten, an denen der entsprechenden Bindungspartner direkt oder indirekt beteiligt ist.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Abb. 1

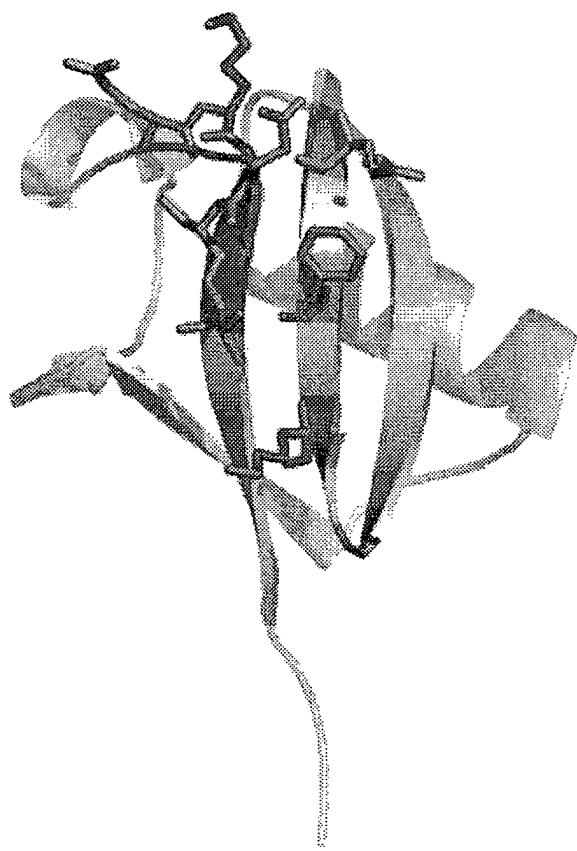


Abb. 2

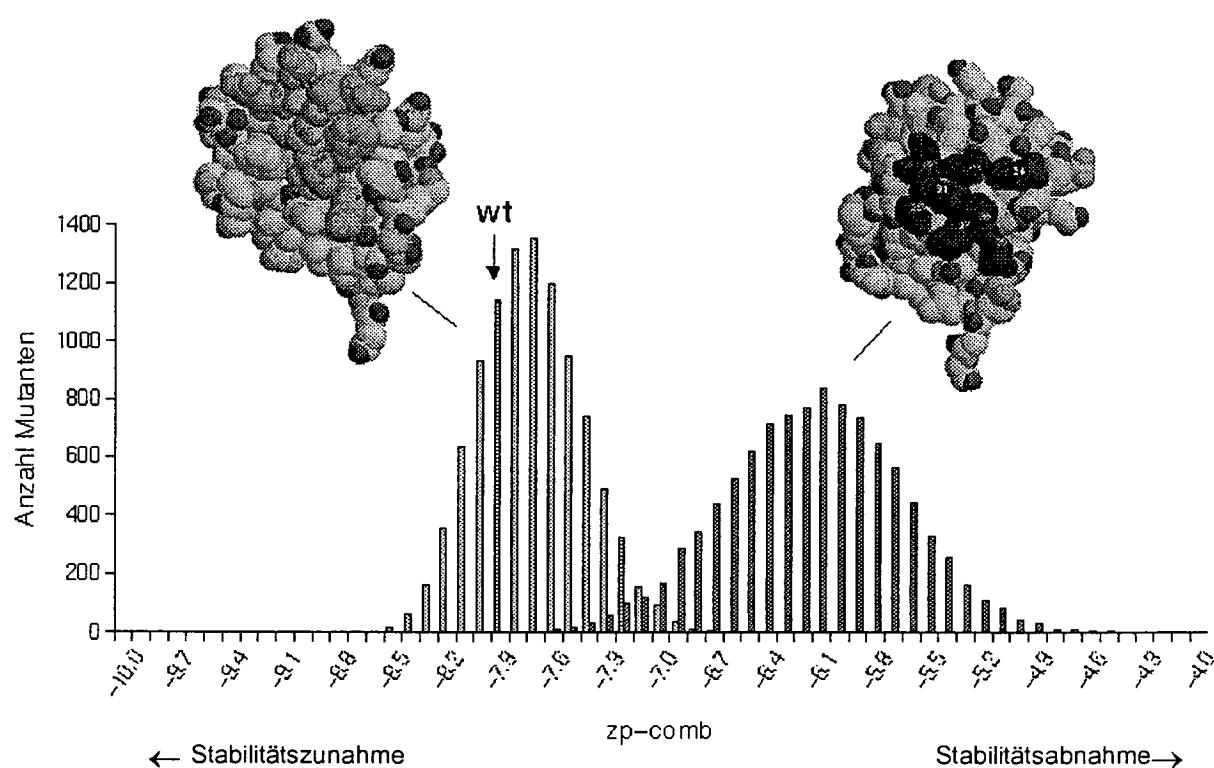


Abb. 3

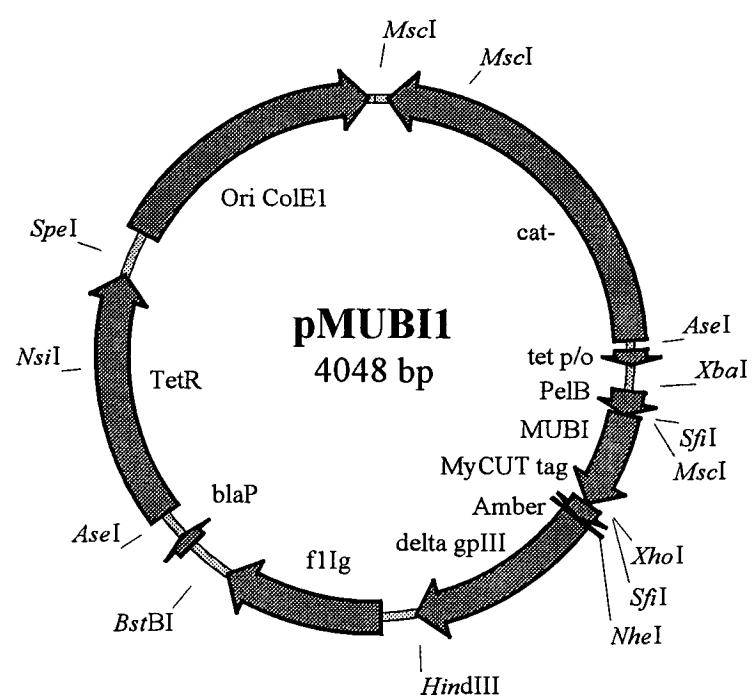


Abb. 4

Abb. 5

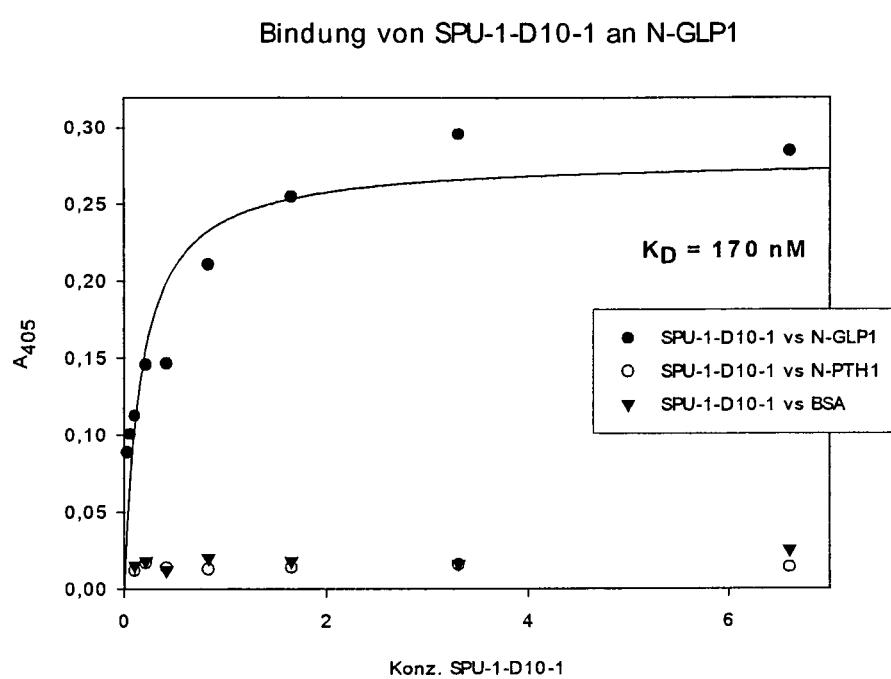


Abb. 6

Bindung von SPU-3-H13-O an Hydrocortison, Testosteron, Östradiol und BSA (Trägerprotein) - Nachweis mit Ni-NTA/POD

