



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103539851 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201310381691. X

A61K 38/17(2006. 01)

(22) 申请日 2004. 05. 27

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 31/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

10324447. 6 2003. 05. 28 DE

(62) 分案原申请数据

200480014610. 1 2004. 05. 27

(71) 申请人 塞尔蛋白质股份有限公司

地址 德国哈雷

(72) 发明人 马库斯·菲德勒 乌尔丽克·菲德勒

雷纳·鲁道夫

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 彭鲲鹏 郑斌

(51) Int. Cl.

C07K 14/47(2006. 01)

C07K 14/435(2006. 01)

C07K 1/107(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/74(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书2页 说明书35页

序列表14页 附图6页

(54) 发明名称

基于泛素蛋白的人工结合蛋白的生产

(57) 摘要

本发明涉及修饰的“泛素样蛋白”超家族的蛋白质、具有泛素样折叠的蛋白质及其片段或融合蛋白。作为所述修饰的结果,所述蛋白质对预定的结合伴侣具有之前并不存在的结合亲和力。本发明也涉及生产和使用所述蛋白质的方法。

1. 经修饰的泛素蛋白的制备方法,其具有以下步骤:
 - a. 提供待修饰的泛素蛋白;
 - b. 确定作为结合伴侣的抗原;
 - c. 替换如 a 中定义之泛素蛋白的氨基酸 62、63、64、65 和 66,并且进一步替换选自如 a 中定义之泛素的第 2、4、6 位之氨基酸的氨基酸;
 - d. 使该经修饰的泛素蛋白与步骤 b 中预先确定的所述结合伴侣接触;
 - e. 鉴定这样的经修饰泛素蛋白,其与 b 中预先确定的所述结合伴侣具有以 K_D 定义的 $10^{-5}M$ 至 $10^{-12}M$ 的结合亲和力。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述待修饰的泛素蛋白具有一级氨基酸序列 SEQ ID NO. 35 或者由 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 15 编码的一级氨基酸序列。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述结合伴侣是生物受体、肿瘤标记物、细胞因子、白介素、生长因子、激酶、整合素、人血清白蛋白、T 细胞和 B 细胞抗原、免疫球蛋白或其部分、糖、毒素、酶或激素。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述结合伴侣选自 G 蛋白偶联受体、人 GLP-1 受体、人 PTH 受体、EGF 受体、HER2、HER3、VEGF/R1-4、Ep-CAM、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、肿瘤坏死因子 β (TNF- β)、IL-2、IL-6、IL-11、IL-12、NGF (神经生长因子)、ProNGF、BMP、EGF、MIA、MIA-2、FGF、血管内皮生长因子 (VEGF)、PDGF、P1GF、IGF、糖蛋白受体 IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)、CD4、CD11、CD14、CD16、CD20、CD22、CD25、CD34、CD47、CD56、CD83、CD154、CTLA-4、免疫球蛋白 G、E、M、人免疫球蛋白 M 的 Fc 部分或抗原结合位点区域中的抗体片段、Lewis Y、Lewis X、霉菌毒素或氢化可的松。
5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中所述结合伴侣是 TNF α 、VEGF、GLP-1、IgM、IgM-Fc 或氢化可的松。
6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中步骤 c 中的修饰通过基因工程改变属于对应经修饰蛋白质之 DNA 来进行,或者其中经修饰的蛋白质通过化学合成来制备。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述经修饰的蛋白质在原核宿主生物体或真核宿主生物体中或者在无细胞系统中表达。
8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中步骤 c 中:
 - i. 位置 2 替换为 Gln、Ser、Gly、Tyr、Arg、Leu 或 Phe;
 - ii. 位置 4 替换为 Phe、Leu、Gly、Cys、Ala、Arg 或 Trp;
 - iii. 位置 6 替换为 Lys、Pro、Asn、Ile、Ala、Trp 或 Val;
 - iv. 位置 62 替换为 Gln、Tyr、Pro、Phe、Asn、Met、Arg、Ser 或 Gly;
 - v. 位置 63 替换为 Lys、Ser、Pro、Phe、Leu 或 His;
 - vi. 位置 64 替换为 Glu、Lys、Gly、Val、Ser、Gln 或 Asp;
 - vii. 位置 65 替换为 Ser、Pro、Arg、Thr、Trp、Gly 或 Leu;或
 - viii. 位置 66 替换为 Thr、Ser、Asn、Gln、Ser、Ile 或 Gly。
9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在步骤 c 中建立基因文库。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中在步骤 c 中经选择之氨基酸的随机替换通过随机诱变进行。
11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在步骤 d 中通过合适的选择方法进行与预定结合

伴侣的接触。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中通过以下来进行与预定结合伴侣的接触:噬菌体展示、核糖体展示、mRNA 展示、CIS 展示、细胞表面展示方法、酵母表面展示或细菌表面展示方法。

13. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在步骤 e 中通过一种或更多种以下方法检测与预定结合伴侣具有结合亲和力的蛋白质:ELISA、等离子体表面共振光谱、荧光光谱、FACS、等温滴定量热法或分析超离心。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中在步骤 e 后是分离与预定结合伴侣具有结合亲和力的经检测之蛋白质的步骤。

15. 根据权利要求 1 所述的方法,其中针对所述经修饰泛素蛋白的结合亲和力、结合特异性和 / 或其他蛋白质化学性质如稳定性、溶解度或产率,所述经修饰泛素蛋白用原本已知的方法成熟。

16. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述经修饰的泛素蛋白以位点特异性和共价方式连接到相同或不同特异性的蛋白质上并因而获得双价或双特异性蛋白质。

17. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述经修饰的泛素蛋白以位点特异性和共价方式连接到一种或更多种具有不同生物活性的蛋白质上并因而获得双功能蛋白质。

18. 根据权利要求 1 所制备的经修饰的泛素蛋白通过原本已知的方法如层析或吸附技术用于检测、定量测定、分开和 / 或分离对应结合伴侣的用途。

19. 根据权利要求 1 所制备的经修饰的泛素蛋白在制备用于诊断、预防或治疗疾病的药物中的用途,其中对应结合伴侣直接或间接参与所述疾病。

基于泛素蛋白的人工结合蛋白的生产

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 5 月 27 日、申请号为“200480014610.1”、发明名称为“基于泛素蛋白的人工结合蛋白的生产”的中国专利申请的分案申请,原申请是国际申请 PCT / EP2004 / 005730 的中国国家阶段申请。

[0002] 本发明涉及修饰的“泛素样蛋白”蛋白超家族的蛋白质、具有泛素样折叠基序的蛋白质及其片段或其融合蛋白,其中,作为这种修饰的结果,所述蛋白质对预定的结合伴侣(binding partner)具有之前并不存在的结合亲和力。本发明也涉及制备和使用这些蛋白质的方法。

[0003] 泛素是小的、单体胞浆蛋白,其序列高度保守,并在从原生动物到脊椎动物的所有已知真核细胞中存在。机体中,它在细胞内蛋白的受控降解调节中起决定性作用。为此目的,经过酶级联传递,预定要降解的蛋白质与泛素或聚泛素链共价连接并因为这种标记而选择性降解。根据最近的结果,泛素或泛素对蛋白质的标记也分别在其它细胞过程如几种蛋白质的输入或其基因调节中发挥重要作用(Marx, 2002)。

[0004] 除了其生理功能的阐明以外,泛素成为一种研究对象主要是因为其结构和蛋白质化学特性。泛素的多肽链由折叠成非常致密的 α / β 结构的 76 个氨基酸组成(Viiay-Kumar, 1987);多肽链的几乎 87% 以氢键方式参与形成二级结构元件。至于重要的二级结构,可以提到三个半 α -螺旋转角和由四条链组成的反平行 β 片层。这些元件的特征性排列——反平行 β 片层暴露于蛋白质表面,所述表面的背侧包装有垂直于其上面的 α 螺旋——一般认为是所谓的泛素样折叠基序。因此,泛素分别用于命名蛋白质超家族(“泛素样蛋白”)或蛋白质家族(“泛素相关蛋白”)(Murzin et al., 1995),其中包含蛋白质如 SUMO-1(Müller et al., 2001)、FAU(Michiels et al., 1993)、NEDD-8(Kumar et al., 1993)、UBL-1(Jones und Candino, 1993) 和 GDX(Filippi et al., 1990),它们具有这种基序并且其一级序列与泛素高度一致。另一个结构特征是位于蛋白质内部 α 螺旋和 β 片层之间的显著疏水区域。

[0005] 因为其较小,可以通过化学合成和生物技术方法来进行泛素的人工制备。由于其有利的折叠性质,可通过基因工程用诸如大肠杆菌(*Escherichia coli*)的微生物相对大量的在胞浆或周质间隙(periplasmic space)生产泛素。因为周质区主要是氧化性环境,后一种策略通常用于生产分泌性蛋白。由于简单有效的细菌制备方法,泛素可用作生产有困难的其它待制备外源蛋白的融合伴侣。通过与泛素融合,可实现更高的溶解性,进而实现更高的产量。本发明实施的提供泛素作为通用人工结合蛋白的方法考虑到其蛋白质化学特性的全新利用。

[0006] 在天然功能被人工应用的蛋白质中间——例如应用于生物技术、生物分析或医药——抗体(即免疫球蛋白)占主要地位。它们可以特异地非共价结合几乎任何可能物质的能力使它们成为需要识别、结合或分离配体、受体或其它目标分子的几乎每个生物科学应用中最重要工具。近年开发的在 *E. coli* 中功能性生物合成抗体片段的方法进一步扩展了免疫球蛋白的可能用途,但同时也显示了其难点所在和局限性。

[0007] 除了 F_{ab} 和 F_v 片段(Skerra und Plückthun, 1988)也主要能用常规蛋白质化学

方法获得以外,通过基因工程的方法并由于免疫球蛋白的模块结构(见综述:Dübel und Kontermann, 2001)可以开发不同的人工构造物,值得注意的包括单链Fv片段(scFv)(Bird et al., 1988)、二硫桥连接的Fv片段(dsFv)(Brinkmann et al., 1993)以及双价(Carter et al., 1992)和双特异性抗体片段(例如diabodies, Holliger et al., 1993)。为了诊断和用于治疗,可通过重组Ig片段与效应子模块的基因融合获得双功能蛋白质。因此,其中可以得到与碱性磷酸酶(Muller et al., 1999)和绿色荧光蛋白(GFP; Griep et al., 1999)的融合体。抗体片段与放射性同位素细胞毒性物质的融合体对于癌症治疗很是重要(免疫毒素; Reiter和Pastan, 1998)。在此情况下,各Ig片段与肿瘤细胞上特异性表面蛋白的选择性结合被用于治疗药的位点特异性应用(肿瘤靶向治疗)。

[0008] 然而,在大肠杆菌中制备抗体片段的方法不仅能够以足够的质和量供诊断和治疗,而且能够简单而快速的修饰其蛋白质和免疫化学特性。细菌宿主操作简单,使得可以用标准分子生物学方法直接改变载体编码的外源蛋白基因。通过靶向抗体工程(Kontermann和Dübel, 2001)可以优化抗体片段的结合亲和力或宿主相容性。另外,特异性抗体或其片段也可分别人工制备,即在免疫系统之外制备,它们针对最不同的目标物质,如低分子量结构或蛋白质。通过这些进化方法,可以通过引入与人抗体系统接近的随机诱变制备合成抗体片段库(Knappik et al., 2000)。使用合适的选择策略如噬菌体展示或核糖体展示(Winter, 1998, Hoogenboom et al., 1998; Hanes et al., 2000),可以成功分离具有预期结合特性的功能性Ig片段。照这样,例如也可以获得针对经典免疫接种中诱发毒性作用或仅有弱免疫应答的抗原的结合蛋白。

[0009] 尽管有抗体工程提供的上述成绩和可能性,某些缺点将限制抗体的实际用途。因此,提供足量抗体是一个问题:在真核细胞培养系统中进行功能性抗体生产是极其消耗成本的方法。另外,分别由于其大小和血清中长保留时间(血液清除慢)而导致的抗体分子低组织穿透能力妨碍了很多治疗应用。尽管可在细菌中制备更小的抗体片段如scF_v或F_{ab}片段(见上文)并因而基本成本较低,然而由于其不利的折叠性质和需要形成几个二硫键,重组生成的产率低于预期水平。此外,与母体抗体相比,重组抗体片段经常稳定性较差并显示较低结合活性。

[0010] 为了克服这些限制,尝试将抗体结合原理——即通过位于保守性蛋白骨架上的暴露于表面的超变区来结合——赋予其它蛋白质(Skerra, 2000)。这意味着改变大量可变环以产生人工结合特性。为此目的,通常天然结合蛋白质如lipocalin(Beste et al., 1999)或III型纤连蛋白结构域(Koide et al., 1998)作为从柔性“环”结构形成结合位点的出发点——以类似于抗体的方式——这种结构的修饰能识别与天然配体不同的配体。

[0011] 另外,根据W001 / 04144,在原本缺乏结合位点的 β 片层结构蛋白中在蛋白质表面人工产生这种结构。通过这种新生的人工结合位点(见下文),可以获得例如 γ -crystallin——眼睛晶状体结构蛋白——的变化形式,它可以可定量的亲和力和特异性与之前定义的物质相互作用。与已经存在并从以上举例说明的柔性“环”结构而形成的结合位点修饰相比较,这些结构是根据W001 / 04144在 β 片层表面新生的。然而,W001 / 04144仅描述改变较大蛋白以产生新结合特性。由于其大小,根据W001 / 04144的蛋白质仅可以通过较费劲的方法在基因工程水平上进行修饰。此外,在公开的蛋白质中仅占全部氨基酸较小百分比的部分被修饰,以维持蛋白质的整体结构。因此,只有蛋白质表面的较小

区域可用于产生之前不存在的结合特性。而且, W001 / 04144 在实验水平上只公开了对小的、低分子量分子产生了结合特性, 并没有公开较大分子如蛋白质的情况。

[0012] 因此, 本发明的一个目的是提供对所选择结合伴侣具有之前不存在的新结合亲和性、不表现出上述缺点的蛋白质。本发明的另一个目的是创建替代抗体却不表现抗体上述缺点的分子。

[0013] 根据本发明, 通过提供根据权利要求 1 的修饰蛋白实现这个目的, 所述修饰蛋白主要基于起始蛋白例如泛素的蛋白结构, 并且在其表面带有人工产生的结合位点。

[0014] 具体地, 根据本发明提供选自“泛素样蛋白”超家族的蛋白质、具有泛素样折叠基序的蛋白质及具有泛素样折叠基序的其片段或其融合蛋白的蛋白质, 其中由于所述蛋白质的至少一个表面暴露区域中的一个或多个氨基酸修饰, 所述表面暴露区域包括 β 片层区域的至少一个 β 片层链和任选的非 β 片层区域, 该蛋白质表现出与预定结合伴侣具有之前不存在的结合亲和性, 同时保留泛素样折叠基序。

[0015] 因此, 本发明涉及通过对选自“泛素样蛋白”蛋白超家族的蛋白质、具有泛素样折叠基序及具有泛素样折叠基序的其片段或其融合蛋白的蛋白质通过替换、插入、缺失、化学修饰或其组合加以修饰的蛋白质, 其中由于这种修饰该蛋白质表现出与预定结合伴侣具有之前不存在的结合亲和性, 这种蛋白质可经以下方法获得:

[0016] a) 选择待修饰蛋白;

[0017] b) 确定结合伴侣;

[0018] c) 选择该蛋白质的至少一个表面暴露区域中的氨基酸, 所述表面暴露区域包括 β 片层区域的至少一个 β 片层链和任选的非 β 片层区域;

[0019] d) 经替换、插入、缺失和 / 或化学修饰来修饰所选择氨基酸, 同时保留泛素样折叠基序;

[0020] e) 使修饰后蛋白与步骤 b) 中确定的结合伴侣接触;

[0021] f) 检测与步骤 b) 中确定的结合伴侣有结合亲和力的蛋白质。

[0022] 此外, 本发明的一个目的是提供制备上述基于泛素的修饰蛋白的各方法以及这些修饰蛋白的用途。

[0023] 因此, 本发明还描述制备选自“泛素样蛋白”蛋白超家族蛋白的蛋白质、具有泛素样折叠基序的蛋白质及具有泛素样折叠基序的其片段或其融合蛋白的蛋白质的方法, 其中由于一种或多种修饰该蛋白质表现出与预定结合伴侣具有之前不存在的结合亲和性, 这种蛋白质可经以下方法获得:

[0024] a) 选择待修饰蛋白;

[0025] b) 确定结合伴侣;

[0026] c) 选择该蛋白质的至少一个表面暴露区域中的氨基酸, 所述表面暴露区域包括 β 片层区域的至少一个 β 片层链和任选的非 β 片层区域;

[0027] d) 优选经替换、插入、缺失和 / 或化学修饰来修饰所选择氨基酸, 同时保留泛素样折叠基序;

[0028] e) 使修饰后蛋白质与步骤 b) 中确定的结合伴侣接触;

[0029] f) 检测与步骤 b) 中确定的结合伴侣有结合亲和力的蛋白质。

[0030] 因此本发明提供分别对具有本申请所定义的泛素样折叠基序的蛋白质或多肽进

行修饰而制备的蛋白质或多肽。这些包括“泛素样蛋白”蛋白超家族的蛋白质,具有泛素样折叠基序的所有蛋白质以及具有泛素样折叠基序的这些蛋白质的片段或融合蛋白。分别从这些蛋白质或多肽出发,分别修饰原蛋白质或多肽中的一个或多个氨基酸。这些修饰具体包含氨基酸替换,但也包含一个或多个氨基酸的插入和缺失以及氨基酸的化学修饰。这些修饰在待修饰蛋白的至少一个表面暴露区域进行。至少一个氨基酸的修饰包含 β 片层区域的至少一个 β 片层链,其中 β 片层链必须位于结合伴侣或配体可接近的蛋白质表面,这些结合伴侣或配体分别能与该修饰蛋白以可测的亲合力结合。在本发明另一个实施方案中,除了改变 β 片层区域的 β 片层链,非 β 片层区域也被修饰,优选它们暴露于表面,以影响具体是增加与预定结合伴侣的结合亲和力并因而增强特异性。

[0031] 本领域技术人员可使用原本已知的修饰一个或多个氨基酸的不同技术。这些将在下面更详细描述。此外可参考出版物 Ausubel et al., 1994 以及 Sambrook et al., 1989。

[0032] 已经知道泛素非表面暴露的核心区氨基酸的修饰 (Finucane et al., Biochemistry, Vol. 38, No. 36, 1999 或 Lazar et al., Protein Science(1997), 6 : 1167-1178)。其中所作改变是针对不参与结合的位置,因为它们定位于疏水核心而不能与溶剂或可能的结合伴侣接近。

[0033] 在下面的内容中,术语“之前不存在的结合特性”和新生的人工结合位点的意思在本发明中将分别被解释。这些术语意思是指修饰蛋白之前不表现出在修饰区与预定结合伴侣或泛素的天然结合伴侣具有结合特性。在本发明的另一个实施方案中,选择与预定结合伴侣不具有结合亲和性的待修饰蛋白。结合伴侣也可定义为与根据本发明修饰的蛋白质具有可测量的亲和力的配体。作为存在可定量结合特性即伴侣结合亲和性的最小值,根据本发明可以认为形成复合体的解离常数为 $K_D=10^{-5}M$ 或更小。 $10^{-5}M$ 或更小的值可以认为是可定量的结合亲和力。根据应用,优选 $10^{-6}M$ 到 $10^{-12}M$ 的值,对于例如层析应用优选 $10^{-7}M$ 到 $10^{-11}M$,或对于例如诊断或治疗应用优选 $10^{-9}M$ 到 $10^{-12}M$ 。进一步优选的结合亲和力是 $10^{-7}M$ 到 $10^{-10}M$,优选到 $10^{-11}M$ 。确定结合亲和力的方法原本已知,在下文中进一步描述。

[0034] 根据本发明的修饰意思是指氨基酸替换、插入、缺失或化学修饰。

[0035] 作为根据本发明的待修饰蛋白,可以使用“泛素样蛋白”超家族的蛋白质。根据本发明,这个超家族包含 Murzin 等人 (1995) 列出的亚组。这些例如包括“泛素相关蛋白”、“UBX 结构域”、“GABARAP 样”、“RAS 结合结构域”蛋白家族等。优选使用“泛素相关蛋白”蛋白家族的蛋白质。根据本发明也包含具有泛素样折叠基序的那些蛋白质。这些蛋白质的实例是 SUMO-1、FAU、NEDD-8、UBL-1 和 GDX 以及 Rub1、APG8、ISG15、URM1、HUB1、Elongin B、PLIC2(N 端结构域)、人 Parkin(N 端结构域)。

[0036] 来自泛素样蛋白超家族的根据本发明可使用的蛋白质已被高度表征。仅举例来说,可以参考以下因特网站点:<http://bip.weizmann.ac.il/scop/index.html>。根据这个站点,泛素样蛋白家族定义为包括泛素相关蛋白家族的超家族。此超家族所有成员的主要特征是反平行排列的 β 片层并且这些蛋白质被分成 α 段和 β 段。折叠定义为 β -Grasp 并因而为泛素样的。核心区定义如下: $\beta(2)-\alpha-\beta(2)$,其中数字表示链数目并且全部链形成 β 片层。混合 β 片层排列是 2143,意思是如果从顶部从左向右看片层时链的位置(氨基端在底部,羧基端在顶部)。因此泛素样蛋白成员的特征是暴露于蛋白质一个表面的反平行 β 片层,在所述表面背侧包装有垂直于其上面的 α 螺旋。这种泛素样折叠基

序是根据本发明可使用并修饰的蛋白质的特征,并明确区分该家族成员与其它蛋白质。根据此定义,本发明也包含 PLIC-2 的泛素样 N 端结构域和 parkin 的泛素样结构域。

[0037] 根据称作比对的序列比较或从结构角度考虑,本领域技术人员能初步判断蛋白质是否是泛素样蛋白超家族的成员。最后证据自然总是由结构分析提供,例如 X 射线晶体衍射或多维核磁共振谱的结构分析。近来,使用遗传算法的结构分析也能提供良好预测。

[0038] 关于泛素超家族的进一步信息可在例如 Larsen et al. 2002 的出版物中发现。此外,也可参考 Buchberger et al., 2001。Buchberger 描述了典型 β -Grasp 折叠作为具有 β - β - α - β - β - α - β 二级结构组成的泛素样蛋白的特征,即在 21534 的排列中的“混合片层”形式的 5 个 β 链排列。在此方面,必须指出在一级序列上 UBX 与例如泛素没有显著同源性 (Buchberger et al., 2001),但尽管有这种事实,由于其三维结构与例如泛素的相同,因此 UBX 也归类于泛素样蛋白。在此方面也应该提到,在泛素中 48 和 49 位氨基酸有时候也被当作额外 β 链 (Vijay-Kumar, 1987)。这第五条链在泛素结构中位于螺旋之后并给出对“混合片层”的 21534 的排列,然而该链仅由两个氨基酸组成,很容易怀疑这种两个氨基酸的链是否能被称为 β 片层链。然而如上解释,根据 Buchberger 等人 (2001),也可以毫无疑问的将具有 21534 排列的蛋白质归类于泛素样蛋白超家族。对于本发明,选择上文更详细描述的定义 2143 用于泛素中 β 链的排列。

[0039] 上述家族和超家族的蛋白质通常高度保守。根据现有知识,例如泛素在所有哺乳动物中具有相同氨基酸序列。酵母的泛素与该序列仅有三个氨基酸不同。人泛素或哺乳动物泛素分别由 76 个氨基酸组成,并具有开始部分描述的结构。

[0040] 根据本发明,待修饰蛋白的氨基酸序列与被修饰的起始蛋白例如人泛素应该具有至少 30%、优选至少 40% 或 50%、进一步优选至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 或至少 95% 一致性,其中无论如何都具有如上详细定义的泛素样折叠基序。

[0041] 根据本发明,也包括上述蛋白质的片段,只要这些片段包含上述泛素样折叠基序,同样还包括上述蛋白质与其它蛋白质的融合体。在这些片段和融合蛋白的情况下,本发明框架内提及的氨基酸位置总是指人泛素中的对应位置。融合伴侣的实例是 (报告) 酶、毒素或其它结合蛋白等。而且,例如可以进行与低分子量物质如生物素、地高辛配基、荧光和 / 或发光物质等的化学偶联。

[0042] 在融合蛋白的情况下已经融合的蛋白质可根据本发明修饰。然而,修饰或选择后融合的片段也包含在本发明内。在每种情况下,这可以根据本领域技术人员已知的方法实现。

[0043] 根据本发明,选用于制备修饰蛋白的蛋白质优选是人泛素或其他来源的泛素,例如另一种哺乳动物泛素。因此,本发明将在下面具体用人泛素作为例子来描述。将用几个实例来描述人泛素的修饰,以获得也可被称为突变蛋白 (mutein) 并显示与预定结合伴侣具有之前不存在的结合亲和力的蛋白质。作为哺乳动物泛素,具体使用哺乳动物领域里啮齿类、家养动物和农用动物的泛素。如果已知根据本发明制备的蛋白质的使用领域,即如果修饰蛋白例如将用作治疗人类疾病的药物组合物,可优选人蛋白质作为待修饰的起始蛋白;这同样适用于相应的使用领域。应该指出,下面给出的解释仅以举例方式基于人泛素。在这种详细说明和所述实例的基础上,本领域技术人员可根据本发明修饰具有泛素特异性折叠基序的其他蛋白质。因此,本发明不限于人泛素或一般意义的泛素。在此方面的说明

和解释应认为是本发明的示例性实施方案,然而它们是特别优选的。

[0044] 如上所述,人和哺乳动物泛素分别有 76 个氨基酸。四个 β 链中助于形成反平行 β 片层的氨基酸是根据本发明并根据 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb/index.html>) 中的 1UBQ 结构的以下氨基酸位置:

[0045] 第一链(氨基端):2-7;第二个 β 片层链:12-16;第三链:41-45;第四链(羧基端):66-71。如果从顶部(氨基端在底部,羧基端在顶部)从左向右看片层,则链的位置是:第二、第一、第四、第三链,其中第一和第四链之间的多肽链形成 α 螺旋。

[0046] 选择和修饰待修饰氨基酸:

[0047] 基于对应的结构数据,例如可从 Protein Data Bank™(Berman et al., 2000; <http://www.rcsb.org/pdb>) 免费获得的那些数据,可通过计算机分析来定位起始蛋白如泛素蛋白质骨架中侧链暴露于表面即朝向溶剂或潜在的结合伴侣的那些氨基酸的位置。而且,可通过计算机分析来鉴定起始蛋白如泛素中随机替换可能对蛋白骨架的稳定性没有或仅有很小的负面影响的那些氨基酸。这些信息可提供关于每个氨基酸作为结合位点元件的适用性的初步指征,还需要进一步的实验验证。在本发明的优选实施方案中,例如选择人泛素中的 2、4、6、62、63、64、65 和 66 位氨基酸,因为它们暴露于表面且整体结构耐受它们的随机替换。所提到的位置在空间上相互临近,分别位于第一个氨基端 β 片层链的起始(2、4、6 位)以及环中(62、63 位)或在羧基端 β 片层链的起始(64、65、66 位),并以其氨基酸侧链形成泛素表面的连续区域(图 1)。因此,通过在分析区域中的随机氨基酸替换(“随机化”)可以——以类似于抗体的抗原结合位点的方式——在泛素的完整蛋白质结构上产生表面暴露的超变区。

[0048] 使用 ProSAIL 软件(“Protein Structure Analysis”;Proceryon Biosciences, Salzburg),可确定相对于泛素(WT)的例如 10^4 种变体和相同数目的、“对照表位”残基(随机位置 24、28、31、32、35、37、38、39)被替换的变体的随机所取样品的蛋白质稳定性。在此情况下,计算机产生的结合位点区被随机替换的变体中约 19% 具有与泛素(WT)至少同样高的稳定性,而约 90% 比携带“对照表位”的那些更稳定(图 2)。这种计算机产生的结果因而可用作选择合适氨基酸的基础。

[0049] 根据优选实施方案——从人泛素的可用结构数据出发——首先选择待产生的结合位点区中 8 个氨基酸位置。通过随机改变此区域的一级序列(随机诱变)和随后经特异性选择,可以获得表现出分别与预定半抗原或抗原或一般的预定结合伴侣具有期望结合活性的变体。尽管如此获得的修饰蛋白被赋予全新的结合特性,它们仍保持与起始蛋白在结构和蛋白质化学性质上的高度一致性。因此,它们提供优点,如尺寸小、高稳定性、成本有效的制备,还容易修饰并对之前预定配体同时具有高亲和力和特异性。在此方面,不能期望泛素作为产生人工结合蛋白的骨架结构的适用性,因为 1) 因为泛素较小,不能期望骨架对广泛氨基酸替换的耐受性和 2) 预先不能看出涉及 β 片层的人工结合位点的功能性,其中片层被认为是硬的和非柔性的。

[0050] 根据本发明,抗原应指由抗体结合的物质。术语抗原包含半抗原、肽、蛋白质、糖、DNA 等。从 Roche Lexikon Medizin(4th edition; <http://www.gesundheit.de/roche>),可以获得抗原和半抗原的以下定义,它们也用于本发明:

[0051] 抗原 (AG):指被免疫系统识别为外来的(“非自身”)的任何物质。在多数情况

下启动导致免疫的免疫反应(=“免疫原”);分别在变态反应(=“变应原”)和特异反应(=“特应原”)的情况下,这种免疫反应被过度放大。AG 诱导体液防御反应(抗原-抗体反应)和/或细胞防御反应(见下文免疫性)。如果 AG 被免疫系统耐受(免疫耐受),也称为“耐受原”。作为抗原有效的主要是复杂的和较高分子量的物质(蛋白质体、多糖、核苷酸和很多合成化合物),它们具有负责免疫应答的化学可鉴定的功能结构(决定簇)。分类成 1) 完全 AG,多数高分子量抗原,自身可引起免疫反应,2) 低分子量半抗原(半抗原),仅在偶联到较大载体分子后作为免疫原。表示为例如异种的、同种异体的或同基因的、自体同源的 AG;自体的、异体的、移植、抗肿瘤病毒 AG。

[0052] 半抗原:简单的低分子量化合物,与抗原(AG) 特异性有关,或由于其结构(决定簇)而能特异性结合抗体,但与完全 AG 相比不能产生变态反应。在结合到称为载体的蛋白质后变成完全抗原(抗原)。

[0053] 应该指出,使用本发明也能产生对作为结合伴侣的非免疫原性物质如肿瘤标志物具有结合特性的泛素变体。

[0054] 在本发明的优选实施方案中,至少部分在一级序列直接临近的两个或多个氨基酸处进行修饰,优选替换,其中在三级结构中互相直接临近的氨基酸进一步优选至少部分定位于蛋白质的 β 片层链中。一般来说,蛋白质中氨基酸的每个替换伴随蛋白质稳定性的降低。由于临近氨基酸的影响,单个替换多数能被耐受,没有大幅度的去稳定作用。然而,如果整个区域即例如由几个临近氨基酸组成的结构实体被改变,不再能期望直接临近氨基酸所致的稳定作用。因此,直到如今,在现有技术中只有泛素的不互相直接临近的氨基酸被修饰。令人惊奇的是:在通过修饰直接临近的氨基酸而导致该蛋白区域如此宽范围区域改变后,该蛋白质的稳定性没有大大降低。泛素或具有泛素样折叠基序的蛋白质中两个直接临近的氨基酸可以被替换而对蛋白质的稳定性和结构没有不利影响,单独这种事实是令人惊奇的并且不能被预料。

[0055] 特别是在较小的泛素的情况下,修饰直接临近氨基酸的优点还在于:与修饰不相互直接临近氨基酸的情况相比,通过基因工程更容易制备这种修饰。因此,根据这个实施方案,可以在蛋白质和 DNA 水平上提供大量修饰蛋白的简化产生方法。

[0056] 优选的,直接临近氨基酸的替换数目是 2-10 个一级序列中互相直接临近的氨基酸,更优选 2-8 个,进一步优选 3-7 个或 4-6 个一级序列中互相直接临近的氨基酸。

[0057] 如果一级序列中互相直接临近的氨基酸被替换,这些氨基酸的一部分可以延伸到 β 片层链区域。延伸到 β 片层链区域的这部分的长度可以是两个或更多个氨基酸,优选两个或三个氨基酸。因此直接临近氨基酸的区域位于 β 片层链区域的开始或末端,优选长度为具有约 2-3 个氨基酸。

[0058] 在另一个优选实施方案中,修饰优选替换 5 个或更多个直接临近氨基酸,其中两个或更多个、优选两个或三个直接临近氨基酸形成 β 片层链区域的开始或末端。在此情况下,优选 8、9 或 10 个氨基酸、特别优选 8 个氨基酸可作为直接临近修饰氨基酸总数的上限。

[0059] 在修饰泛素 β 片层链中直接临近氨基酸的情况下,如果这些氨基酸位于 β 片层链区域的开始或末端,这些氨基酸一股全部暴露于表面。在此情况下,可以认为所有氨基酸参与产生新结合特性。

[0060] 在本发明的优选实施方案中,修饰一些氨基酸以产生具有新结合特性的区域,它

们形成蛋白质表面的连续区域。这样,可以产生具有之前不存在的结合特性的连续区域。根据本发明的“连续区域”表示如下:由于电荷、空间结构和侧链的疏水性/亲水性,氨基酸与其环境以相应方式相互作用。环境可以是溶剂,一股是水,或其它分子,例如空间临近的氨基酸。通过有关蛋白质的结构信息以及各自的软件,可以表征蛋白质表面。例如,蛋白质和溶剂的原子之间的界面区域可以这样显示,其中包括有关此界面区域结构如何形成、哪些表面区域可被溶剂接近或表面上电荷如何分布的信息。例如可以通过使用合适软件显示这种类型来展现连续区域。这些方法是本领域技术人员公知的。根据本发明,整个表面暴露区域基本上也可用作待修饰产生新结合特性的表面连续区域。优选的,为此目的修饰也可包含 α 螺旋区域。

[0061] 包含 β 片层区域的至少一个 β 片层链的蛋白质的至少一个表面暴露区域中的氨基酸修饰是关键的。 β 片层结构定义为是基本片层样的且几乎完全伸展。与由多肽链不间断片段形成的 α 螺旋比较, β 片层可由多肽链的不同区域形成。这样,一级结构中远离的区域可以互相紧密靠近。 β 片层通常长度为 5-10 个氨基酸,并且具有几乎完全伸展的构象。 β 链互相非常靠近,以至于一条链上的 C=O 基团和另一条链上的 NH 基团形成氢键,反之亦然。 β 片层可由几条链形成并具有片层样结构,其中 C α 原子的位置交替在片层样平面的上下。氨基酸侧链服从这种模式并且因此交替指向顶部或底部。根据 β 链取向,片层分为平行片层和反平行片层。根据本发明,两者都可被突变,用于制备要求保护的蛋白质。

[0062] 为了诱变 β 片层结构,选择蛋白质中靠近表面的 β 片层区域。通过可用的 X 射线晶体衍射结构可以识别表面暴露的氨基酸。如果没有晶体结构,可尝试根据可用的一级结构通过计算机分析预测表面暴露的 β 片层区域和单个氨基酸位置的可接近性 (www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html) 或建立三维蛋白质结构模型 (www.expasy.ch/swissmo/SWISS-MODEL.html), 如此获得有关潜在的表面暴露氨基酸的信息。

[0063] 然而也可以对 β 片层进行诱变,其中可以省略耗时的氨基酸位置预选择。编码 β 片层的 DNA 区域从其 DNA 环境中分离,经历随机诱变并随后重新整合入之前从中去除的编码蛋白质的 DNA 中。随后是选择具有期望结合特性的突变体的过程。

[0064] 在本发明的另一个实施方案中,如上所述选择接近表面的 β 片层区域并鉴定这些选择区域内待诱变的氨基酸位置。然后将如此选择的氨基酸位置在 DNA 水平上进行诱变,所述诱变通过定点诱变进行,即编码特定氨基酸的密码子被编码另一个预先选择的特定氨基酸的密码子替换,或者这种替换在随机诱变环境中进行,其中待替换的氨基酸位置是确定的,但编码新的、未确定氨基酸的密码子不确定。

[0065] 表面暴露的氨基酸可接近周围溶剂。与模式三肽 Gly-X-Gly 中氨基酸可接近程度比较,如果蛋白质中氨基酸的可接近程度超过 8%,则氨基酸称为表面暴露的。这些蛋白质区域或单个氨基酸位置也分别是可能结合伴侣的优选结合位点,这些位点根据本发明进行选择。此外,可参考 Connolly et al., 1983 和 Shrake et al., 1973, 它们全部公开内容引入本申请中作为参考。

[0066] 新生的人工结合位点区域因氨基酸替换而与母体蛋白不同或互相不同的泛素蛋白骨架变化可通过定向诱变各自的序列片段而产生。在此情况下,具有某些特性如极性、电荷、溶解性、疏水性或亲水性的氨基酸可以分别被具有各自其它特性的氨基酸取代或替换。

除了这些替换,术语“诱变”也包含插入和缺失。也可根据本领域技术人员已知的方法通过化学改变氨基酸侧链而在蛋白质水平进行修饰。

[0067] 作为各序列片段诱变的起点,例如可以使用泛素样蛋白的 cDNA,它们可以用本领域技术人员已知的方法制备、改变和扩增。对于泛素的一级序列的较小区域(约 1-3 个氨基酸)中的位点特异性改变,有现有的商品化试剂和方法(“Quick Change”, Stratagene; “MutaGene Phagemid in vitro Mutagenesis Kit”, Biorad)。对于较大区域的定点诱变,本领域技术人员可用例如聚合酶链式反应(PCR)的具体实施方案。为此目的,在期望位置具有简并碱基对组成的合成寡聚脱氧核苷酸的混合物可用于例如引入突变。通过使用不天然存在于基因组 DNA 中的碱基对类似物如肌苷也可以实现此目的。

[0068] β 片层区域的一或多个 β 片层链以及任选的非 β 片层区域的诱变出发点例如可以是泛素样蛋白的 cDNA 或基因组 DNA。另外,编码所述蛋白质的基因也可以经合成制备。

[0069] 原本已知的不同方法可用于产生诱变,它们是定点诱变方法、随机诱变方法、通过 PCR 的诱变方法或其它相当的方法。

[0070] 在本发明的优选实施方案中,待诱变的氨基酸位置被预先确定。根据待修饰蛋白和/或根据所选结合伴侣进行待修饰氨基酸的选择。在每种情况下,一般建立不同突变体的文库并用原本已知的方法筛选。如果已有待修饰蛋白的足够结构信息,自然特别容易进行待修饰氨基酸的预先选择。然而,即使没有这些结构信息,用使用随机诱变并随后选择的方法也可以改变具有泛素样折叠基序的蛋白质,使之具有分别对预定配体或结合伴侣的结合亲和力。

[0071] 定向诱变以及更长序列片段诱变的方法,例如通过 PCR、通过化学诱变或用细菌增殖菌株,也属于现有技术,可以根据本发明使用。

[0072] 在本发明的一个实施方案中,通过组装携带氨基酸密码子 NNK 的 DNA 寡核苷酸进行诱变。然而应该明白也可使用其它密码子(三联体)。

[0073] 突变以维持 β 片层结构的方式进行。一般来说,诱变发生在暴露于蛋白质表面的稳定的 β 片层区域之外。它包含定点诱变和随机诱变。包含一级结构中较小区域(约 3-5 个氨基酸)的定点诱变可以用 Stratagene(QuickChange) 或 BioRad(Mutagene Phagemid in vitro mutagenesis kit)(cf. US-A-5,789,166;US-A-4,873,192) 的商品化试剂盒产生。

[0074] 如果要对更广泛区域进行定点诱变,必须制备 DNA 盒,其中待诱变区域通过组装含有突变和未变化位置的寡核苷酸而获得(Nord et al.,1997;McConnell 和 Hoess,1995)。可通过在增殖菌株中扩增或通过 PCR 扩增(易错 PCR)(例如 Pannekoek et al.,1993) 引入随机诱变。为此目的,使用错误率增加的聚合酶。为分别增强引入的诱变程度或合并不同突变,可通过 DNA 改组(Stemmer,1994) 合并 PCR 片段中的突变。有关酶的这些诱变策略的综述在 Kuchner 和 Arnold(1997) 的综述中提供。为在选定 DNA 区域进行这种随机诱变,也必须构建用于诱变的 DNA 盒。

[0075] 根据本发明的一个实施例,泛素的第 2、4、6、62、63、64、65 和 66 位氨基酸的随机替换可特别容易的用 PCR 方法进行,因为所提及位置位于靠近所述蛋白质氨基或羧基末端的位置。因此,待操作密码子位于相应 cDNA 链的 5' 和 3' 末端。因此用于诱变 PCR 反应的第一个寡聚脱氧核苷酸——除了第 2、4 和 6 位待突变密码子以外——对应编码泛素氨基端

链的序列。因此第二个寡聚脱氧核苷酸——除了第 62、63、64、65 和 66 位待突变密码子以外——至少部分对应羧基端多肽序列的非编码链。通过这两个寡聚脱氧核苷酸,可用编码泛素蛋白骨架的 DNA 序列作模板进行聚合酶链式反应。

[0076] 另外,所得扩增产物可加到另一个用旁侧寡聚脱氧核苷酸的聚合酶链式反应中,旁侧寡聚脱氧核苷酸可引入例如限制性内切酶的识别位点。用适当的限制性内切酶水解后,所得的合成 DNA 分子可被连接即连到相应准备的例如克隆或表达载体的核酸序列上。这些方法和系统对本领域技术人员已知。那些系统例如是来自 Novagen (Madison, WI)、IBA (Göttingen) 或 New England Biolabs (Beverly, MA) 的商品;根据本发明优选将所得基因盒导入适用于随后选择程序的载体系统中,以分离与预定半抗原或抗原具有结合特性的泛素变体。

[0077] 根据本发明的优选实施方案,只修饰不属于未修饰泛素中参与连接到泛素的天然结合伴侣的区域的氨基酸位置,以产生新的结合特性。这确保只有泛素中已经存在的结合特性不改变。

[0078] 基本上可以根据它们能否被可能的结合伴侣接近和蛋白质的整体结构是否可能显示对修饰的耐受性而选择修饰区域。

[0079] 在蛋白质中,优选来自哺乳动物的泛素中, β 链上氨基酸的至少 15%、优选至少 20%、进一步优选至少 25% 可以根据本发明被修饰,优选替换,以产生之前不存在的结合特性。最大优选 β 链上氨基酸的约 40%、进一步优选最大约 35%,甚至更优选约 30% 被修饰,优选替换。

[0080] 根据本发明的一个实例,例如 β 链上 24 个氨基酸中的 6 个被修饰,以产生与预定结合伴侣的结合特性。选择更大数目的氨基酸进行修饰提供产生具有结合亲和力的蛋白质的更大文库的可能性,以至于增加这些修饰蛋白质中的一个与预定结合伴侣具有可定量和 / 或高结合亲和力的可能性。

[0081] 此外,除了 β 链修饰,也可对蛋白质中的其它表面暴露区域进行修饰,优选例如在环区域。除了 β 链中的修饰区域外,这些修饰区域也可参与新产生的结合。

[0082] 根据本发明的另一个优选实施方案,泛素优选哺乳动物或人泛素中至少 6 个、优选至少 8 个表面暴露氨基酸可以被修饰,其中修饰优选是替换。这些至少 6 个表面暴露的氨基酸然后形成与预定结合伴侣具有结合亲和力的区域。在此方面,特别优选至少 4 个、优选至少 6 个、进一步优选至少 8 个表面暴露的氨基酸位于 β 片层区域,即位于一个 β 片层链或分布于几个 β 链。进一步优选至少 5 个修饰优选替换的氨基酸在一级序列上互相直接临近。

[0083] 在本发明的另一个优选实施方案中,在所述蛋白质的四个 β 链中至少两个、优选恰好两个链内的氨基酸被修饰以产生新结合特性。也优选在所述四个 β 链中的三或四个中进行修饰,以产生与选定结合伴侣的之前不存在的结合特性。

[0084] 特别优选氨基端和羧基端链中的氨基酸被修饰,优选被替换,以产生新结合特性。在此方面,还优选临近羧基端 β 片层链的环中的氨基酸被修饰,优选被替换。

[0085] 特别优选在哺乳动物泛素或人泛素中的以下位置进行修饰,优选替换:2、4、6、62、63、64、65、66。这些氨基酸在泛素表面形成连续的表面暴露区域,发现其特别适于产生与结合伴侣具有之前不存在的新结合特性的修饰蛋白。

[0086] 根据本发明可用任何期望氨基酸进行氨基酸替换以产生新结合特性,即如果进行修饰以产生新结合特性,不必考虑所述氨基酸是否分别具有与被替换氨基酸相似的化学特性或侧链,因此任何期望氨基酸可用于此目的。

[0087] 根据本发明,作为被修饰以产生与选定结合伴侣具有之前不存在的结合特性的蛋白质,可以显示其它修饰如替换、插入、缺失和 / 或化学修饰,以关闭或新加这种修饰之前蛋白质的生物学和 / 或蛋白质化学功能。因此,举例来说,泛素与其天然结合伴侣的结合特性可以被关闭。

[0088] 因此,在本发明的一个实施方案中,使用人泛素变体,其中第 45 位氨基酸苯丙氨酸被色氨酸替换。这样,与泛素比较,可以提供由于替换而改进分光光度特性的蛋白质,同时维持泛素的结构和稳定性。

[0089] 在本发明的另一个实施方案中,例如人泛素的第 44、48、54、70、72 和 75 位被替换,第 76 位氨基酸缺失。这样,可以提供不再行使泛素天然功能而仍维持泛素结构和稳定性的蛋白质。

[0090] 如果这种类型的已经预修饰的泛素用于产生之前不存在的结合特性,最后优选获得一种泛素,其中野生型泛素或一般的哺乳动物泛素中总共至少 10 个、优选至少 15 个氨基酸被替换。根据一个实施例,这样可以获得具有 14 个替换和 1 个缺失而仍维持其原始结构的修饰泛素。基于泛素的氨基酸总数,这对应于约 20% 的百分比。这是非常令人惊奇的并且不能预料,因为通常非常低的百分率已经足以扰乱所述蛋白质的折叠。

[0091] 选定氨基酸的修饰步骤根据本发明优选通过随机诱变在遗传水平上诱变来进行,即随机替换选定氨基酸。优选的是,步骤 d) 的修饰通过基因工程方法改变属于各蛋白质的 DNA 进行。优选的是,然后在原核或真核生物中进行所述蛋白质的表达。

[0092] 根据本发明,修饰蛋白还优选通过化学合成而制备。在这种实施方案中,在一个步骤中进行权利要求 1 的步骤 c) 到 d)。

[0093] 分别选择并确定与预定结合伴侣具有结合亲和力的氨基酸

[0094] 通过修饰选定氨基酸而建立蛋白质文库以后,根据本发明使所述修饰蛋白与预定结合伴侣接触,如果存在结合亲和力,任选地使得可以与所述伴侣互相结合。

[0095] 根据本发明的接触优选通过适合的展示和选择方法如噬菌体展示、核糖体展示、mRNA 展示或细胞表面展示、酵母表面展示或细菌表面展示方法进行,优选通过噬菌体展示方法进行。为充分公开,也参考以下参考文献:Hoess, Curr. Opin. Struct. Biol. 3(1993), 572-579; Wells and Lowmann, Curr. Opin. Struct. Biol. 2(1992), 597-604; Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins-A Laboratory Manual(1996), Academic Press。上述方法对本领域技术人员已知,可根据包括其中修饰的本发明使用。

[0096] 根据本发明优选的可以通过以下一种或多种方法确定所述修饰蛋白与预定结合伴侣是否具有可定量的结合亲和力:ELISA、等离子体表面共振光谱、荧光光谱、FACS、等温滴定量热法和分析超离心。

[0097] 作为根据本发明的显示结合特性的泛素变体的筛选方法实例,下面描述适于本应用的一种类型的噬菌体展示方法。以相同方式,例如展示到细菌 (Bacterial Surface Display; Daugherty et al., 1998) 或酵母细胞 (Yeast Surface Display; Kieckhefer et al., 1997) 的方法或无细胞选择系统如核糖体展示 (Hanes and Plückthun, 1997; He and

Taussig,1997) 或反式展示 (Odegrip et al.,2003) 或 mRNA 展示可以被应用。在后者的情况下,通过将蛋白质变体经由核糖体偶联到适当的 mRNA 上而实现基因型和表型的短暂物理联系。

[0098] 在此处描述的噬菌体展示方法中,重组泛素变体展示在丝状噬菌体上,同时所展示变体的编码 DNA 以单链形式包装在噬菌体包膜中。因此在亲和富集的框架中,可以从文库中选择具有某种特性的变体,其遗传信息可以分别通过感染合适的细菌或加到另一个富集循环得以扩增。可以通过基因融合到氨基端信号序列——优选 PelB 信号序列——和噬菌体的衣壳蛋白或表面蛋白——优选是羧基端融合到衣壳蛋白 pIII 或其片段上,实现将突变泛素在噬菌体表面的展示。此外,编码的融合蛋白还可以含有功能性元件,如便于通过亲和层析检测和 / 或纯化的亲和标签或抗体表位,或便于在亲和富集过程中特异性切割融合蛋白的蛋白酶识别序列。

[0099] 另外,琥珀终止密码子可以存在例如于泛素变体基因和噬菌体衣壳蛋白或其片段的编码区之间,部分由于引入一个氨基酸而在合适的抑制菌株中的翻译过程中该终止密码子不被识别。

[0100] 适用于分离与预定半抗原或抗原具有结合特性的泛素变体选择方法的、并且所述融合蛋白的基因盒插入其中的细菌载体被称为噬粒。其中,它含有丝状噬菌体(例如 M13 或 f1) 的基因间区域或其部分,在通过辅助噬菌体如 M13K07 而进行携带所述噬粒的细菌细胞超数感染的情况下,所述基因间区域或其部分导致将闭合链的噬粒 DNA 包装到噬菌体衣壳中。这样产生的噬粒被细菌分泌并展示编码的各泛素变体——由于它与衣壳蛋白 pIII 或其片段融合——到其表面。天然 pIII 衣壳蛋白存在于噬粒中,使得它保留重新感染合适细菌株的能力以及因此扩增对应 DNA 的可能性。因此而确保泛素变体表型——即其潜在结合特性——和其基因型之间的实际联系。在本实施例中,为此目的已经构建的噬粒 pMUBI-1(图 3) 用于插入泛素变体的编码序列并用于制备噬粒。

[0101] 通过本领域技术人员已知的方法可根据所展示的泛素变体与预定半抗原或抗原的结合来选择所得噬粒。为此目的,所展示泛素变体可以暂时固定于例如与微滴定板结合的靶物质,并可以在分离非结合变体后被特异性洗脱。优选碱性溶液如 100mM 三乙胺进行洗脱。作为替代方案,也可在酸性条件下、经蛋白水解或直接加入受感染细菌来进行洗脱。通过选择和扩增与预定半抗原或抗原具有结合特性的泛素变体的连续循环,如此所得噬粒可以被重新扩增并富集。

[0102] 以噬粒形式即与噬菌体融合的形式,或克隆相应基因盒到合适的表达载体中后以可溶性蛋白形式,可以对如此所得的泛素变体进行进一步表征。适当的方法对本领域技术人员已知或已在文献中描述。表征例如可包含确定 DNA 序列和随后确定分离变体的一级序列。此外,例如可以通过标准免疫学方法如 ELISA 或等离子体表面共振光谱、荧光光谱、FACS、等温滴定量热法或分析超离心,检测所分离变体的亲和力和特异性。关于稳定性分析,例如与化学或物理解折叠相关的光谱学方法对本领域技术人员已知。

[0103] 在另外使用的核糖体展示方法中,泛素变体通过无细胞转录 / 翻译系统制备并作为与相应 mRNA 以及核糖体结合的复合体展示。为此目的,如上所述的 DNA 文库用作基础,其中变体基因以与用于表达和蛋白生物合成的相应调节序列的融合体形式存在。由于在基因文库的 3' 端缺失终止密码子以及合适的实验条件(低温、高 Mg^{2+} 浓度),由新生蛋白、mRNA

和核糖体组成的三元复合体在体外转录 / 翻译期间被维持。

[0104] 可以根据展示于其上的泛素变体与预定半抗原或抗原的结合通过本领域技术人员已知的方法选择这些复合体。为此目的,展示到核糖体复合体上的泛素变体分别可以被暂时固定到例如与微滴定板结合的靶物质上或者可以在溶液中结合以后再被结合到磁性颗粒上。分离出非结合变体之后,通过破坏核糖体复合体而使具有结合活性的变体的遗传信息可以以 mRNA 形式被特异性洗脱。优选 50mM EDTA 进行洗脱。如此获得的 mRNA 可以被分离并用合适的方法(逆转录反应)逆转录成 DNA,如此所得的 DNA 可被再扩增。

[0105] 通过体外转录 / 翻译、选择和扩增的连续循环,可以富集与预定半抗原或抗原具有结合特性的泛素变体。

[0106] 克隆相应基因盒到合适表达载体中后,可以如上述可溶性蛋白形式进一步表征如此所得的泛素变体。适合的方法对本领域技术人员已知或已在文献中描述。

[0107] 优选地,步骤(d)即检测与预定结合伴侣具有结合亲和力的蛋白质的步骤之后是分离和 / 或富集所述检测蛋白质的步骤。

[0108] 根据本发明修饰并具有泛素样折叠基序的蛋白质表达之后,可用原本已知的方法对它们进行进一步纯化和富集。所选方法依赖于几种本领域技术人员原本已知的因素,例如所用表达载体、宿主生物、目标使用领域、蛋白质大小和其它因素。对于简化的纯化,根据本发明修饰的蛋白质可以与对分离材料具有更高亲和力的其它肽序列融合。优选地,选择这些融合应注意对所述泛素蛋白的功能没有不利影响或由于引入特异性蛋白切割位点而能在纯化之后得以分离。这些方法也是本领域技术人员原本已知的。

[0109] 根据本发明,具体根据上面刚刚描述的方法,与预定结合伴侣如半抗原或抗原具有结合亲和力的泛素变体一般可以被分离。

[0110] 作为根据本发明提供的所述修饰蛋白的结合伴侣,可以使用所有生物学和医学活性的和相关的分子。可能的结合伴侣将在下面以示例方式描述。然而应该注意,多种其它可能的配体可以加到这个列表中。与抗体和抗原之间的关系相似,潜在结合伴侣的列表可进一步用潜在配体完成。

[0111] 优选地,结合伴侣是生物受体,优选 G 蛋白偶联受体(GPCR;例如人 GLP-1 受体、人 PTH 受体)或 EGF 受体、HER2、HER3、VEGF/R1-4、Ep-CAM 或其配体或结构域、肿瘤标志物(前列腺特异性膜抗原(PSMA))、细胞因子(肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、肿瘤坏死因子 β (TNF- β))、白介素(例如 IL-2/IL-6、IL-11、IL-12)、生长因子(例如 NGF(神经生长因子)和其前体、ProNGF、BMP、EGF、MIA、MIA-2、FGF、血管内皮生长因子(VEGF)、PDGF、PIGF、IGF)、激酶、整合素(例如糖蛋白受体 IIb/IIIa(GPIIb/IIIa))、HSA(人血清白蛋白)、F4 丝束蛋白(fimbrin)、T 和 B 细胞抗原,优选 CD4、CD11、CD14、CD16、CD20、CD22、CD25、CD34、CD47、CD56、CD83、CD154、CTLA-4;免疫球蛋白或其部分,例如完整抗体(例如免疫球蛋白 G、E、M)、例如人免疫球蛋白 M 的 Fc 部分或抗原结合位点区域中的抗体片段;或糖(Lewis Y、Lewis X);或毒素,例如霉菌毒素;或激素,例如氢化可的松。

[0112] 本发明的具体优点在于修饰蛋白或泛素在细胞内、外环境中都有活性,即在细胞内和外都可以结合它们相应的结合伴侣。

[0113] 特别有利的是本发明的修饰蛋白或泛素可以可定量的方式结合半抗原即小分子和抗原即大分子如蛋白质。通过根据本发明的修饰蛋白的这种可变性,因此完全可以为各

种结合伴侣提供可能的新产生的结合伴侣。

[0114] 本发明的蛋白质还可用于检测和定量测定以及分离和提取对应的结合伴侣。

[0115] 另一个应用是诊断和治疗对应结合伴侣参与的疾病。

[0116] 正如已经提到的,本发明也涉及定向改变位于新生的人工结合位点以外的单个氨基酸位置。这样,例如,由与天然泛素的生物功能相关的氨基酸占据的位置可被其它氨基酸占据。这样可获得一种泛素蛋白骨架,其中其生物功能如和泛素化级联反应的酶相互作用是无活性的,但其结构和蛋白质化学特性与起始蛋白大体一致。这可以通过以下方法进行,例如测定大肠杆菌中的表达速率、用光谱学方法如荧光或圆二色性测量并结合化学或物理解折叠分析其稳定性、或用标准免疫学测试如 ELISA 来检测。

[0117] 例如通过将 Arg54 和 Arg72 替换成 Leu,可以阻断与泛素活化酶 E1 的相互作用 (Burch and Haas,1994)。另外,在所有氨基酸中,氨基酸 Lys48 以及 Val70 到 Gly76 参与与泛素连接酶 E2 的相互作用,该相互作用通过适当替换而消除 (Miura et al.,1999)。另外,泛素与预定要经历蛋白水解性降解的蛋白质的连接或与多聚泛素链的共价且选择性的连接分别通过残基 Gly75 和 Gly76 发生,并可以用适当替换而消除。最后,替换 Ile44Ala 和 Val70Ala 大体消除了泛素与 26S 蛋白酶的接触和泛素标记的蛋白质的降解 (Beal et al.,1996)。因此,在本发明的优选实施方案中,携带替换 Ile44Ala、Lys48Arg、Arg54Leu、Val70Ala、Arg72Leu、Gly75Ala 以及缺失 Gly76 的修饰泛素蛋白骨架用作制备具有新结合特性的修饰泛素的起始点。经上述方法测定,这种修饰泛素蛋白骨架与泛素在结构和蛋白质化学特性上大体一致,所述蛋白质化学特性即稳定性、折叠、大肠杆菌中的生成、与泛素抗血清的相互作用等。

[0118] 令人惊奇的是,在不同文献记录中分别提到的修饰可以被合并到一种泛素中,而基本不改变其结构或稳定性。

[0119] 令人惊奇的,通过本发明中所述方法可以在蛋白质具有泛素样折叠基序的基础上获得修饰蛋白,所述蛋白质一方面显示新产生的结合特性,另一方面在很大程度上具有泛素的蛋白质化学特性。在此方面,基于泛素的修饰蛋白的解离常数优选为 10^{-6} M 或更低,例如 10^{-6} M- 10^{-12} M,这分别与抗体或其片段的解离常数相当。另外,令人惊奇的,可以产生具有特异性结合特性的修饰蛋白,其任选的针对大分子如蛋白质,或者也针对小分子如半抗原或激素。之前定义的靶物质或靶物质类可以被高选择性地结合。新生的人工结合位点关于亲和力和特异性的所观察到的功能不能被提前预料,因为广泛区域的结合位点位于一般认为刚性和非柔性的 β 片层中。另一方面,天然的通用结合位点——如抗体的结合位点——由柔性的“环”结构形成。

[0120] 还令人惊奇的是,用于本发明情况的泛素蛋白骨架明显耐受一级序列的大幅度改变,而对多肽链折叠没有任何不利影响。不仅氨基酸替换数目在预料之外——野生型泛素约 20% 的序列可被改变——而且由于改变位置位于蛋白质骨架上。因此,举例来说,对通常被认为是刚性和非柔性的 β 片层中的、具体是直接临近氨基酸的替换的耐受性不能事先被预料。

[0121] 从所得的基于泛素的修饰蛋白的突变 DNA 序列起始,可以通过已知的基因工程方法制备所述的修饰蛋白。在此方面,优选在原核宿主中进行生产——因为低成本和高产量——然而不排斥使用真核或无细胞系统。通常,在将 DNA 序列插入合适的表达载体并转

化、转染或感染适当生物体后,外来修饰蛋白被细菌转录/翻译系统合成。为此目的,制备方法可适用于具有新结合特性的单个修饰蛋白。因此,如果例如大肠杆菌用作宿主,基于泛素的修饰蛋白可以借助合适的信号序列分泌到周质间隙,或者可在细胞溶质中制备。如果本发明修饰蛋白不在细胞内折叠而聚集,也可以对这些包含体进行功能性重折叠。无细胞系统是有利的,例如对于具有低表达速率或对宿主生物有毒性作用的变体。分别制备和纯化重组蛋白的合适的基因工程方法对本领域技术人员已知并且已经在文献中描述(如 Sambrook et al., 2001)。

[0122] 因此,可以通过产生人工结合位点提供具有新结合亲和力的基于泛素的修饰蛋白,这些蛋白质的高度可变的表面使得可以分子识别预定配体如半抗原、肽、蛋白质和其它大分子或较小分子例如激素。

[0123] 此外,由于随机区域的可变表面特性,通过合适的选择方法也可以获得具有不同于结合特性之其它特性的基于泛素的修饰蛋白。这些例如包括对于预定化学反应的之前不存在的新催化活性。举例来说,如果结合伴侣是与修饰蛋白以催化对应反应的方式结合的分子或过渡态,则获得了这种特性。

[0124] 因此,本发明包含提供作为骨架分子的分子如泛素,以引入之前不存在的新结合特性。

[0125] 此外,根据本发明,例如通过随机诱变的方法,可以在所述方法的步骤 d) 中建立基因文库 (genetic library)。根据其中一个实施方案,本发明也包含如此制备的基因文库。具体包含由在氨基酸位置 2、4、6、62、63、64、65 和 66 替换的人泛素而建立的基因文库。

[0126] 此外,可以在人工结合位点以外以定向方式修饰蛋白质骨架以赋予修饰蛋白质其它功能。这可以包括例如引入额外的氨基酸或替换单个氨基酸或肽——优选在氨基和羧基末端——以通过与合适试剂化学偶联而获得蛋白质结合物。这种融合体也可以用基因工程方法连接所述修饰蛋白和融合伴侣的基因而直接制备。与抗体相比,这被简化,因为仅一个外源基因被细菌宿主表达,因而仅一条多肽链分必须被功能性折叠。这些融合伴侣分别可以是酶、细胞毒素、结合和多聚化结构域以及具有相同或不同结合特异性的修饰蛋白。

[0127] 根据本发明提供的具有典型泛素折叠基序的修饰蛋白可以位点特异性和共价的方式连接到具有相同或不同特异性的蛋白质上,如此分别获得与一个或多个结合伴侣的双价或双特异性结合特性。

[0128] 因此,例如由上述方法获得的并结合相同抗原的两个相同泛素变体可以用本领域技术人员已知的方法经单个外加的半胱氨酸残基以位点特异性的方式彼此共价连接。与单价的蛋白质比较,根据经验这些双价结合蛋白的特征在于具有更强的表观结合(亲和效应)。

[0129] 以相同方式,两个结合不同抗原的泛素变体可用适当方法相互连接,由此获得双特异性结合分子。为了选择性形成这些异二聚体,可以使用由带正或负电的氨基酸组成并且每个都融合到融合伴侣的羧基端的多肽。如果使用带相反电荷的氨基酸,这些所谓多离子标签将选择性经历相互之间的静电相互作用,并以预期的 1 : 1 比率互相连接不同特异性的结合蛋白。在癌症治疗中,这些双特异性药剂可与免疫系统的效应细胞接触,寻找适当的表面结构例如肿瘤细胞,从而以定向方式破坏后者。

[0130] 此外,由上述选择方法之一分离的泛素变体因此已经表现出与特异性抗原的结合

特性,它们可以被修饰以进一步增强其亲和力和/或特异性。为此目的,可以在结合位点之内和/或之外产生新的定向和/或随机氨基酸替换。这种成熟(maturation)操作的适当方法对本领域技术人员已知。使已经获得的泛素变体成熟可包含亲和力和特异性但不限于这些。可以改进的其它蛋白质特性例如是稳定性、溶解性和原核生产水平。在本发明范围内,例如通过在结合位点内定向替换两个氨基酸,泛素变体与免疫球蛋白 M 的 F_c 部分的亲和力以此方式增加 10 倍。

[0131] 本发明提供的基于泛素的修饰蛋白——以与抗体及其片段类似的方式——发现有广泛的应用领域。这包含诊断和治疗应用以及层析方法。因此,可以诸如 ELISA、Western 印迹等的任何生物分析测试直接检测靶物质。此外,根据本发明修饰的结合例如免疫球蛋白并偶联到酶或荧光基团的蛋白质适于用作适当测试系统中的通用二级报告分子。由于其有利特性,发现基于泛素的修饰蛋白优选用于治疗用途,例如用于治疗肿瘤或传染性疾病。这样,可以利用基于受体或配体被特异性结合所述修饰蛋白阻断的作用。相似的,结合肿瘤细胞的表面蛋白的具有新结合特性的修饰蛋白由于与合适的效应子偶联,分别可以定向方式破坏这些细胞或选择性活化肿瘤组织中的适当的前毒素。

[0132] 因此对于根据本发明修饰并选择的蛋白质,可以有广泛的潜在应用。它们不仅可用于医学-制药领域,而且可用于营养和食品工业、营养补充剂、化妆品、医学和非医学诊断和分析等的分析领域。应用领域自然依赖于所选结合伴侣的类型。

[0133] 在人和兽医治疗和预防领域,可用原本已知的方法制备制药有效的药剂。根据盖伦制剂,这些组合物可以通过静脉内、腹膜内、肌内、皮下、透皮或其它给药方法施用。药物制剂的类型依赖于待治疗疾病类型、疾病严重程度、待治疗患者和医学领域技术人员已知的其它因素。可以胃肠道外经注射给药,或者用其它常用方法经灌输、系统性的、经直肠给药。

[0134] 所述组合物适于含有治疗有效剂量。给药剂量的量依赖于待治疗机体、疾病类型、患者年龄和体重以及其它原本已知的因素。

[0135] 所述组合物可含有原本已知的辅剂。这些例如包括稳定剂、表面活性剂、盐、缓冲剂、着色剂等。

[0136] 药物组合物可以是液体制剂、乳膏、局部用洗剂、气溶胶,粉剂、颗粒、片剂、栓剂或胶囊形式,乳液或脂质体制剂形式。所述组合物优选是无菌、无致热源且等渗的,并含有制药常用的且可接受的原本已知的添加剂。另外,参考美国药典的规定。

[0137] 提供以下实例以进一步说明本发明。本发明具体以泛素修饰为例说明。然而本发明不限于此,以下实施例只是表明基于以上说明书的本发明的可实施性。为充分公开本发明,也参考本申请和附件中引用的文献,它们的全部内容都引入本申请作为参考。

附图说明

[0138] 下面将参考实施例及附图更详细描述本发明,其中

[0139] 图 1 表示在野生型泛素(PDB 码:lubi)表面上的新生的人工结合位点区域;

[0140] 图 2 表示与泛素(WT)和对照表位比较在 2、4、6、62、63、64、65、66 位随机替换的 10⁴ 个变体中的每一个的蛋白质稳定性的计算机分析结果;

[0141] 图 3 说明用于选择具有新结合特性的基于泛素的修饰蛋白的噬粒载体 pMUBI-1;

[0142] 图 4 说明构建泛素变体文库的过程；

[0143] 图 5 表示检测经噬菌体展示选择的基于泛素的修饰蛋白与对应蛋白的结合的 ELISA 实验结果；

[0144] 图 6 表示检测经核糖体展示选择的基于泛素的修饰蛋白与对应蛋白的结合的 ELISA 实验结果；

[0145] 图 7 表示检测经核糖体展示选择的基于泛素的修饰蛋白与对应蛋白的结合的 BIACORE 实验结果；

[0146] 图 8 表示检测经噬菌体展示选择的基于泛素的修饰蛋白与对应半抗原的结合特异性的 ELISA 实验结果；

[0147] 图 9 表示检测经噬菌体展示选择的、针对其抗原经二次诱变而获得的基于泛素的结合蛋白 SPU-3-A7 变体与 IgM F_c 的改进结合的 ELISA 实验结果；

[0148] 图 10 表示使用双马来酰亚胺己烷经单个羧基端半胱氨酸残基位点特异性、共价偶联两个基于泛素的蛋白质的实验结果。

[0149] 图 1：在表面上具有人工产生的结合位点的野生型泛素 (PDB 码:lubi；Vijay-Kumar et al.,1987) 的晶体结构。用 PyMOL 程序 (DeLano Scientific, San Francisco) 进行二级结构元件的三维显示。作为实例制备的文库中待随机替换的残基包含 2、4、6、62、63、64、65、66 位并用其侧链表示。

[0150] 图 2：在野生型泛素 (PDB 码:lubi) 表面产生结合位点。经计算机分析分别根据其溶剂的暴露和稳定或去稳定作用选择待制备文库中待随机替换的残基 (2、4、6、62、63、64、65、66 位,用浅灰色表示),其中可以在各自位置有氨基酸替换。然后用 ProSAII 软件确定 10⁴ 个变体中的每个的蛋白质稳定性,与泛素 (WT) 和相同数目的随机采取的变体样品——其中“对照表位”的残基 (24、28、31、32、35、37、38、39 位,用暗灰色表示) 被替换——作比较。将组合的 C^α/C^β 势的值 (“zp-comb”) 标注为稳定性的量度。计算机产生的结合位点区被随机替换的变体中约 19% 具有与泛素 (WT) 至少同样高的稳定性,而约 90% 比携带“对照表位”的那些更稳定。泛素的蛋白质结构应该耐受分析区域中经随机氨基酸替换的结合位点的产生,其稳定性不受严重影响。这种计算机方法辅助选择合适的表面暴露的氨基酸。

[0151] 图 3：用于通过噬菌体展示选择 MUBI 变体的噬粒载体 pMUBI-1。pMUBI-1 用于制备噬菌体文库并在四环素启动子 / 操纵子 (tet^p / ^o) 的转录调控下编码 PelB 信号序列、泛素变体基因、MyCUT 标签和噬菌体衣壳蛋白的 C 端片段 (aa253-406, Δ gpIII) 的融合蛋白。“琥珀”表示融合基因中琥珀终止密码子的位置。通过两个 SfiI 限制位点插入 MUBI 的突变基因盒。f1lg、bla^p、tetR、Ori、ColEI 和 Cat 分别表示噬菌体 f1 的基因间区、在 β-内酰胺酶启动子控制下的四环素阻遏蛋白基因、复制起点和氯霉素乙酰转移酶基因。

[0152] 图 4：构建泛素变体噬菌体展示文库的过程。

[0153] 图 5：在 ELISA 中用噬菌体展示经针对 recGLP1-R 选择获得的泛素变体 SPU-1-D10 与重组制备的人 GLP-1 受体的氨基端结构域的结合。分别用 recGLP1-R 和 BSA 或重组制备的人 PTH 受体 (recPTH-R) 的氨基酸结构域充满适当数目的微滴定板孔,4℃ 过夜。与含 0.5% Tween 的 3% BSA / PBS 孵育以饱和剩余结合位点 (2 小时,室温 (RT))。加入系列稀释于 PBST0.1 中 SPU-1-D10 并在 30℃ 保温 90 分钟。用泛素抗血清 (1 : 10 稀释于 PBST0.1,

30℃ 60 分钟) 和偶联过氧化物酶的兔抗体 (1 : 2000 稀释于 PBST0.1, 30℃ 60 分钟) 检测结合的修饰蛋白。用 Pierce 的 ImmunoPure 试剂盒进行检测。步骤之间用 PBST0.1 进行三次洗涤——在显色检测之前再进行三次 PBS 洗涤。用 H_2SO_4 终止颜色反应后在 405nm 检测信号强度并对相应的修饰蛋白浓度作图。通过非线性回归确定平衡条件下的 K_D 值。

[0154] 图 6 : 在 ELISA 中通过核糖体展示选择而获得的泛素变体 SPW-11-A1 对 VEGF 的结合。本实验使用如图 5 所述相同的方法。通过非线性回归确定平衡条件下的 K_D 值。

[0155] 图 7 : 在 BIACORE 中通过核糖体展示选择而获得的泛素变体 SPU-11-58 对 VEGF 的结合。首先将 VEGF 固定于 CM5 芯片的通道表面同时参比通道保持未负载。对于不同浓度 SPU-11-58 的应用, 在每种情况下获得结合事件的净信号。所有溶液的注射时间是在 35 μl / min 流速下 2 分钟。不同浓度 SPU-11-58 (1.3 μM 、0.65 μM 、0.325 μM 、0.163 μM 、0.081 μM) 的结合信号在注射起始时重叠。每次测量后用 10mM HCl 以 15s 脉冲而再生表面。用 BIAevaluation software3.1(Biacore) 测定平衡条件下的 K_D 值。

[0156] 图 8 : 在 ELISA 中经针对氢化可的松选择而获得的泛素变体 SPW-3-H13 对类固醇的结合。分别用与 BSA 偶联的氢化可的松、睾酮和雌二醇或用 BSA 每种充满微滴定板的三个孔, 并分别与 SPW-3-H13 (4 μM) 或与结合区未改变的泛素蛋白骨架 (50 μM) 在 PBST0.1 中一起孵育 (30℃ 90 分钟)。用 Ni-NTA / 过氧化物酶偶联物 (1 : 500 稀释于 PBST0.1, 30℃ 60 分钟) 并用 Pierce 的 ImmunoPure 试剂盒进行检测。封闭和洗涤见图 5。用 H_2SO_4 终止颜色反应后在 405nm 检测信号强度并用三次测量的平均值作图。

[0157] 图 9 : 经定点随机诱变方式的亲和成熟后在 ELISA 中比较泛素变体 SPU-2-A7 和 SPU-2A7 (62 / 63) 与 F_cIgM 的结合。使用如图 5 中的相同实验方法。通过非线性回归确定平衡条件下的 K_D 值。

[0158] 图 10 : 通过 SDS-PAGE 分析经单个羧基端半胱氨酸残基定点共价偶联的两个基于泛素的蛋白质。加入 20 μl 每种未偶联蛋白 (泳道 1) 以及偶联反应后的样品 (泳道 2)。电泳后凝胶用考马斯亮蓝染色。大小标准物 (泳道 M) 的分子量以 kDa 表示。

[0159] 实施例 1 : 提供合成泛素基因用于选择具有新产生结合亲和力的修饰蛋白

[0160] 用本领域技术人员已知的标准方法如 Sambrook et al., (2001) 中的那些方法进行基因工程操作。

[0161] 为制备编码具有替换 Ile44Ala、Lys48Arg、Arg54Leu、Val70Ala、Arg72Leu、Gly75Ala 以及缺失 Gly76 的修饰泛素蛋白骨架的 DNA 序列 (Seq ID No. 1), 以作为制备人工结合蛋白的起始点, 使用以下操作步骤: 为合成基因, 在 50 μl 体积中进行 PCR 反应, 其中碱基对序列合起来表示待合成基因的六种寡聚脱氧核苷酸 (Seq ID No. 2、Seq ID No. 3、Seq ID No. 4、Seq ID No. 5、Seq ID No. 6、Seq ID No. 7, 每种 0.1 μM) 作为模板, 每种 2.5 μl 。所用的每种寡聚脱氧核苷酸序列分别对应人工基因的编码和非编码链的片段, 长度为 40-50 个碱基对并在其 3' 和 5' 端大约重叠 15 个碱基。此外, 样品中含旁侧引物 (Seq ID No. 8、Seq ID No. 9, 10 μM), 每种 2.5 μl ; 以及 5 μl 10 $\times$ Taq 缓冲液 (100mM Tris / HCl pH9.0, 500mM KCl, 1% (v / v) Triton X-100)、3 μl 25mM MgCl_2 和 4 μl dNTP-Mix (dATP、dCTP、dGTP、dTTP, 每种 2.5mM)。用水补足体积后在热循环仪中加热反应样品到 94℃ 变性 2 分钟。然后在加热过程中加入 2.5U Taq 聚合酶 (Promega) (热启动) 并开始 PCR 程序。反应保温 25 个循环, 每个循环是 94℃ 1 分钟、55℃ 1 分钟和 72℃ 1.5 分钟。最后在 72℃ 保温 5 分钟。

[0162] 预期 PCR 产物通过分析琼脂糖凝胶电泳鉴定并用 MinElute Reaction Cleanup 试剂盒 (Qiagen) 从样品中纯化。1.0ng 分离的 DNA 作为第二轮扩增的模板,这次使用 Pfu 聚合酶 (Promega),体积仍是 50 μ l。为此目的,使用 5 μ l 提供的 Pfu 缓冲液 (200mM Tris / HCl, pH8.8, 20mM MgCl₂, 100mM KCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 1% (v / v) Triton X-100, 1mg / ml BSA) 以及 4 μ l dNTP 混合物并用水补足体积。此外,样品中含旁侧引物 (Seq ID No. 8、Seq ID No. 9, 10 μ M) 以引入合适的限制性位点。预期 PCR 产物通过制备性琼脂糖凝胶电泳分离并用 Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning 试剂盒 (Invitrogen) 根据制造商的说明插入到克隆载体 pCR®4Blunt-TOPO® 中。提供的化学感受态细胞用适当的连接反应样品转化并铺到含 LB / amp / kan 培养基的琼脂平板上。37°C 培养平板 16 小时并分析生长菌落中是否有预期连接产物。为此目的,用 Qiagen 公司的质粒提取试剂盒根据制造商说明小规模制备质粒 DNA,并用 DNA 限制性内切酶 NdeI 和 XhoI (New England Biolabs) 进行限制性消化,其中限制性内切酶的识别序列通过旁侧引物引入 PCR 产物中。用 Taq DNA 聚合酶对插入基因盒的区域中具有预期切割模式的质粒进行序列分析。为此目的,根据制造商说明使用 CycleReader™ AutoDNA Sequencing 试剂盒 (Fermentas) 以及 0.5 μ g 质粒 DNA 和 1.0pmol 各荧光标记引物。在聚合酶反应期间新合成的 DNA 链被标记,通过引入双脱氧核苷酸在统计学上但以碱基特异性方式终止。然后所得荧光 DNA 片段通过聚丙烯酰胺 - 尿素凝胶电泳在液体测序装置中分离,并在临近泳道中显示为对应于 A、C、G、T 的条带模式。

[0163] 具有正确 DNA 序列的基因盒通过制备性 NdeI / XhoI 限制性消化从克隆载体 pCR®4Blunt-TOPO® 上切割并通过制备性琼脂糖凝胶电泳分离。将编码修饰泛素蛋白骨架的基因插入表达载体 pET20B(-) (Novagen) 以产生相应蛋白,或插入质粒载体 pMUBI-1 以构建泛素变体的文库。

[0164] 实施例 2:制备泛素变体文库

[0165] 为分别随机定点诱变合成泛素基因的氨基和羧基端 8 个密码子,连续进行两次 PCR 反应。第一个扩增步骤在 10 $\times$ 50 μ l 体积中使用 Pfu 聚合酶 (Promega)。为此目的,每个样品使用 5 μ l 提供的 10 $\times$ Pfu 缓冲液以及 4 μ l dNTP 混合物并用水补足体积。另外,每个样品含有 2.5 μ l 旁侧引物 (Seq ID No. 10、Seq ID No. 11, 10 μ M) 以引入预期碱基对替换。使用携带非突变合成泛素基因的 1.0ng pMUBI-1 作为模板。加入 2.5U Pfu 聚合酶 (见上文) 以后进行 25 个保温循环,其中每个循环是 94°C 1 分钟、60°C 1 分钟和 72°C 1.5 分钟。最后在 72°C 保温 5 分钟。为选择性降解模板 DNA,每个反应样品中加入 10UDpnI 并在 37°C 保温 1 小时。通过制备性琼脂糖凝胶电泳和 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 分离期望的 PCR 产物。

[0166] 第二个扩增步骤在 1,000 μ l 样品体积中进行,其中使用约 1.0ng 第一轮 PCR 反应产物并使用 Taq 聚合酶。吸取反应样品——调整到 20 倍体积——如上述由 10 $\times$ Taq 缓冲液、25mM MgCl₂、dNTP 混合物以及旁侧引物 (Seq ID No. 12、Seq ID No. 13, 10 μ M) 组成,其中旁侧引物在 5' 端被生物素化并且每种分别携带不相互兼容的 SfiI 内切酶识别序列。用水补足体积后,在加热状态下 (见上文) 加入 2.5U Taq 聚合酶并开始 PCR 程序。进行 25 个保温循环,其中每个循环是 94°C 1 分钟、60°C 1 分钟和 72°C 1.5 分钟。最后在 72°C 保温 5 分钟。

[0167] 随后直接在 PCR 反应样品中切割所得扩增产物。为此目的,在总体积 4,000 μ l 中

全部 PCR 反应溶液与相应体积的提供 10× 缓冲液 II (100mM Tris / HCl, pH7.9, 100mM MgCl_2 , 500mM NaCl, 10mM 二硫苏糖醇)、10×BSA 溶液和水混合。接着加入 4,000U 限制酶 SfiI (New England Biolabs) 并在 50℃ 保温 16 小时。用 MinElute Reaction Cleanup 试剂盒 (Qiagen) 提取 DNA 然后重悬于 400 μl 无菌水中。为分离未被 sfiI 切割的 PCR 产物, 提取的 DNA 与含有 1.0mg / ml 磁珠的等体积 “Binding Solution” (Dynal) 混合并在旋转混合器上室温 (RT) 保温 4.5 小时, 其中在磁珠表面偶联链亲合素 (“Dynabeads Kilobase Binder”)。沉淀带有任选的仍存在生物素化的 DNA 的珠子, 同时完全被 SfiI 切割而不再具有生物素化末端的 DNA 保留在上清液中并沉淀过夜。在期望位置诱变并被 SfiI 切割的如此所得泛素基因溶于无菌水中, 再用 QIAquick PCR Purification 试剂盒 (Qiagen) 脱盐, 最后得到浓度 200fmol / μl 的水溶液。

[0168] 为制备受体载体, 根据制造商说明用 SfiI 切割质粒 pMUBI-1 并用制备性琼脂糖凝胶电泳和 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) 分离较大 (载体) 片段。为避免分子内连接, 对 5' 端去磷酸化。为此目的, 0.5U 来自虾 (*Pandalus borealis*) 的碱性磷酸酶以及所提供缓冲液用于总体积 200 μl 中。在 37℃ 保温混合物 90 分钟, 用 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) 分离样品中的 DNA 并再次脱盐 (QIAquick PCR Purification Kit)。载体片段 DNA 最后以浓度 50fmol / μl 溶于水中。为连接, 1.6pmol 所述 PCR 片段和 8.0pmol pMUBI-1 载体片段在 2U T4DNA 连接酶 (GibcoBRL) 存在下在总体积 1,600 μl (50mM Tris / HCl, pH7.6, 10mM MgCl_2 , 1mM ATP, 1mM DTT, 5% (w / v) PEG-8,000) 中 16℃ 保温 3 天。65℃ 加热样品 15 分钟后沉淀 DNA。为此目的, 每种 100 μl 反应溶液与 100 μl 乙醇以及 10 μl 15M NaAc, pH3.0 混合并在 -20℃ 保持 16 小时。随后离心 (60 分钟, 12,500g), 用乙醇 (70% v / v, -20℃) 洗涤样品, 再次离心, 最后沉淀 DNA 溶于 60 μl 无菌水中。

[0169] 为了电穿孔, 在 4℃ 冷室中使用 Gene Pulser® II 系统 (Biorad) 以及电极间距 1.0mm 的小杯 (Biozym)。用每种 3.5 μl 以上所得溶液根据制造商说明转化电转化感受态大肠杆菌 XL1Blue (Stratagene)。所得细胞悬液铺到 5 个含 LB / 氯霉素培养基的琼脂板 (20×20cm) 上。37℃ 培养平板 16 小时并计数生长菌落。发现所构建文库包括 2.8×10^7 个独立克隆, 其中每种克隆在文库中存在 10,000 个。然后用总体积 100ml 含 10% (v / v) 甘油的 SOC 培养基刮取菌落并分成 1.0ml 小份保存于 -80℃。随机选取其中 12 个克隆, 用 Qiagen 公司的 DNA Miniprep Kit 提取质粒载体, 并分析诱变泛素基因区域的 DNA 序列。所有这些克隆都具有功能性序列——即没有插入或缺失引起的读码框移动——以及在诱变位置性质完全不同的替换。不存在诱变区以外的随机替换。

[0170] 实施例 3: 制备噬菌体表面的泛素变体并选择针对蛋白和半抗原的泛素变体

[0171] 为生产在表面展示突变泛素的噬粒变体, 100ml 2xYT / 氯霉素培养基接种 1.0ml 由实施例 2 获得的甘油培养物, 并在 37℃ 和 220rpm 下培养 16 小时。用 10ml 这种静止期培养物接种 1 升 2xYT / 氯霉素培养基, 并在 37℃ 和 220rpm 振荡直到细胞密度达到 $\text{OD}_{600}=0.4$ 。用 10^{13} cfu 的 M13K07 辅助噬菌体感染, 不摇动情况下 37℃ 培养 30 分钟。加入 50mg/l 卡那霉素后在 37℃ 和 220rpm 振荡样品, 然后通过调节无水四环素 (贮液: 2.0mg/ml DMF 溶液) 到 0.2mg/l 诱导 pMUBI-1 上的基因表达。然后降低培养箱温度到 26℃, 并 220rpm 振荡培养 16 小时。最后细胞通过离心 (30 分钟, 12,000g, 4℃) 沉淀并丢弃, 同时过滤上清液 (0.45 μm)。加入 1/4 体积 20% (w/v) PEG6000、2.5M NaCl 并在冰上保温 1 小时沉淀所含

噬粒,随后离心沉淀(30分钟,12,000g,4℃)。然后将噬粒溶于4ml冰冷PBS(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mMNa₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄)中,在冰上保持30分钟并离心(30分钟,12,000g,4℃)。向上清液加入1/4体积20%(w/v)PEG6000,2.5M NaCl,冰上保温1小时再次沉淀噬粒并离心沉淀(30分钟,12,000g,4℃)。然后再将噬粒溶于4ml冰冷PBS中,在冰上保持30分钟并离心(30分钟,12,000g,4℃)。上清液与溶于PBS中的4%(w/v)牛血清白蛋白(BSA)1:1混合,旋转混合器上在室温保温30分钟,然后直接用于亲和富集。

[0172] 作为分离表面展示泛素变体的噬粒的亲基质,其中泛素变体应结合之前定义的靶物质,用各物质分别包被微滴定板的每24个孔。作为使用的靶物质,重组制备的人GLP-1受体的氨基端(recGLP1-R;Bazarsuren et al.,2002)、人免疫球蛋白M的F_c部分(F_cIgM)以及与BSA偶联的氢化可的松(HC)在微滴定板上4℃固定过夜。

[0173] 每孔加入400 μl溶于PBS中的4%BSA并室温保温90分钟,从而封闭微滴定板表面上的未被占据的结合位点。然后吸取100 μl所制备噬粒溶液到每孔中并室温(RT)保温90分钟。然后通过用含0.05%(v/v)Tween20的PBS(PBST0.05)洗涤两次,与400 μl 4%溶于PBS的BSA保温两次每次5分钟并用PBS洗涤两次同时用力拍击,从而去除未结合噬粒。最后用100 μl100mM三乙胺/孔室温保温10分钟洗脱与亲和基质结合的噬粒。合并含洗脱噬粒的溶液——每种分别依赖于各自靶物质——并立即加入1/2体积1M Tris/HCl, pH7.4而中和。每种情况下获得的溶液转移到20ml细胞密度OD₆₀₀=0.4的培养物中,以感染Ecoli XL1 Blue,并在37℃220rpm振荡30分钟。再次洗涤微滴定板孔(5×PBST 0.05, 1×PBS)并每孔加入100 μl细胞密度OD₆₀₀=0.4的E.coli XL1 Blue。37℃保温30分钟后,将这些细胞与那些之前感染的细胞合并。各细胞悬液铺到含LB/氯霉素培养基的琼脂板(20×20 cm)上并且悬液一股含有10⁵-10⁷的形成菌落的克隆。37℃培养平板16小时,用10 ml含10%(v/v)甘油的SOC培养基刮取形成的菌落,并以1.0ml等份保存于-80℃。

[0174] 为重复生产噬菌体和新亲和富集循环,选择少10倍的细菌细胞培养物体积和更严谨的洗涤条件(第二轮:3次PBST洗涤,三次与溶于PBS中的4%BSA保温5分钟和3次PBS洗涤;第三轮:6次PBST 0.1洗涤,三次同样溶于PBS中的4%BSA保温5分钟和3次PBS洗涤)重复所述方法。

[0175] 实施例4:分离和表征与靶物质具有特异性结合的噬粒(单噬菌体ELISA)

[0176] 经第三轮针对recGLP1-R、Fc IgM以及HC的亲和富集后,从每种所得的克隆中随机选择96个并用单相ELISA(single phase ELISA)分析与各抗原或半抗原的结合。为此目的,每个单菌落接种300 μl 2xYT/氯霉素培养基并在37℃和220 rpm下振荡培养18小时。用80 μl每种静止期培养物接种4 ml 2xXT/氯霉素培养基并在37℃和180rpm下振荡培养4小时。为了可以进行平行操作,为此目的使用4个“Deep Well”板(Qiagen,每个有24个孔)。用10¹¹cfu M13K07辅助噬菌体感染XL1 Blue细胞后,在37℃保温30分钟。在37℃和180 rpm下再保温30分钟后,加入50 ml/1卡那霉素。然后继续在37℃和220 rpm下振荡30分钟,并通过调节无水四环素(贮液:1.0 mg/mlDMF溶液)到0.2 mg/1诱导pMUBI-1上的基因表达。然后降低培养箱温度到22℃,并在180 rpm振荡培养16小时。最后离心沉淀细胞(30分钟,5,000 g,4℃),上清液转移到新“Deep Well”板中。加入1体积20%(w/v)PEG6,000,2.5 M NaCl并在冰上保温1小时沉淀所含噬粒,随后离心沉淀(30分钟,5,000g,4℃)。然后将噬粒溶于1.0ml冰冷无菌PBS中,与溶于PBST 0.1的6%BSA以

1:1 混合,并在 RT 保温 1 小时。

[0177] 为进行 ELISA,每个待分析单克隆噬粒的一个微滴定板孔在 4℃ 充满抗原——一个孔充满 BSA 溶液。为饱和塑料表面的剩余结合位点,每个孔用含 3% BSA(w/v) 的 PBST 0.5 封闭。随后用 PBST 0.1 漂洗孔三次并拍掉。然后吸取 100 μ l 上面制备的每种噬粒溶液到板上各孔中。保温 2 小时后,用 PBST 0.1 洗涤三次。为检测结合噬粒,将 M13 抗体过氧化物酶偶联物 (Amersham Pharmacia Biotech) 以 1:5,000 稀释于 PBST0.1 中,并取 100 μ l 加到每个孔中。室温保温 1 小时后用 PBST 0.1 漂洗孔三次,然后用 PBS 漂洗三次。最后吸取 100 μ l ImmunoPure Kit(Pierce) 加入到孔中,并在 15 分钟后通过加入 100 μ l 2M H₂SO₄ 终止颜色反应。用 Sunrise Remote Reader(Tecan) 在 450 nm 测量消光。

[0178] 来自在 ELISA 中对各抗原——但不对 BSA——显示较强结合信号(约 20)的噬粒的泛素变体的 DNA 用引物 Seq ID No. 14 和上述方法测序。部分所分析 DNA 序列表现出读码框移动或琥珀终止密码子并因此不再使用。如此获得并进一步分析的泛素变体的氨基酸替换在表 1 中示例性列出。

[0179] 表 1:经噬菌体展示针对不同靶物质选择后基于泛素的修饰蛋白中新生的结合位点区域的氨基酸替换。

[0180]

	选择	位置: 2:	位置: 4:	位置: 6:	位置: 62:	位置: 63:	位置: 64:	位置: 65:	位置: 66:
SPU ⁺	--	Gln	Phe	Lys	Gln	Lys	Glu	Ser	Thr
SPU-1-D10	RecGLP1-R	Ser	Phe	Pro	Tyr	Ser	Lys	Pro	Ser
SPU-2-A7	P ₂ IgM	Ser	Leu	Pro	Pro	Pro	Gly	Arg	Asn
SPU-3-H13	HC	Gly	Gly	Lys	Phe	Phe	Val	Thr	Asn
SPU-15-G7	TNF α	Tyr	Cys	Asn	Asn	Leu	Ser	Trp	Gln
SPU-15-E1	TNF α	Gln	Ala	Ile	Met	Phe	Gln	Thr	Ser

SPU:

[0181] 实施例 5:在体外转录 / 翻译系统中制备泛素变体并通过核糖体展示选择针对蛋白质的泛素变体

[0182] 根据 Schaffitzel et al., (2001) 提供表达构建体用于体外转录 / 翻译并通过核糖体展示选择结合蛋白。然后,与此比较,本实例中不使用抗体片段文库,而使用与实施例 2 所述类似的泛素变体文库。这些文库之一基于编码修饰泛素蛋白骨架的 DNA 序列 (SEQ ID No. 1) 制备,所述修饰泛素蛋白骨架具有替换 Ile44Ala、Lys48Arg、Arg54Leu、Val70Ala、Arg72Leu、Gly75Ala 以及缺失 Gly76。第二个文库基于编码具有替换 Phe45Trp 的修饰泛素蛋白骨架的 DNA 序列 (SEQ ID No. 15) 制备。

[0183] 第一步,分别基于 Seq ID No. 1 或 Seq ID No. 15 根据实施例 2 用 PCR 方法制备代表 8 个密码子突变的文库的泛素变体的合成基因。这在 50 μ l 体积中用 Pfu 聚合酶 (Promega) 进行。为此目的,使用 5 μ l 提供的 10 $\times$ Pfu 缓冲液以及 4 μ l dNTP 混合物并用水补足体积。进而,样品含有 2.5 μ l 每种旁侧引物 (Seq ID No. 16、Seq ID No. 17 用于基于 Seq ID No. 1 的文库,Seq ID No. 18、Seq ID No. 19 用于基于 Seq ID No. 15 的文库;10 μ M) 以引入预期碱基对替换。使用携带非突变合成泛素基因 Seq ID No. 1 或 Seq ID No. 15 的 1.0ng 每种质粒 DNA 作为模板。加入 2.5U Pfu 聚合酶以后进行 25 个保温循环,其中每个循环是 94℃ 1

分钟、65℃ 1 分钟和 72℃ 1.5 分钟。最后在 72℃ 保温 5 分钟。用制备性琼脂糖凝胶电泳和 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 提取期望 PCR 产物。

[0184] 包含噬菌体 M13 包膜蛋白 III 的一部分、在体外翻译过程中将新生蛋白推出核糖体通道因而使泛素变体最佳展示的间隔区经两个连续 PCR 反应合成。这首先在总体积 50 μ l 中使用 5 μ l 所提供的 10 $\times$ Pfu 缓冲液、4 μ l dNTP 混合物和适当量的水进行。进而，样品含有 2.5ml 每种旁侧引物 (Seq ID No. 20、Seq ID No. 21, 10 μ M) 以及 1.0ng 噬菌体 M13 的 DNA。加入 2.5U Pfu 聚合酶以后进行 25 个保温循环，其中每个循环是 94℃ 1 分钟、65℃ 1 分钟和 72℃ 1.5 分钟。最后在 72℃ 保温 5 分钟。期望 PCR 产物用制备性琼脂糖凝胶电泳和 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 提取并用作第二轮 PCR 反应的模板。这在 50 μ l 体积中用 Pfu 聚合酶 (Promega) 进行。为此目的，使用 5 μ l 提供的 10 $\times$ Pfu 缓冲液以及 4 μ l dNTP 混合物并用水补足体积。进而，样品含有 2.5 μ l 每种旁侧引物 (Seq ID No. 22、Seq ID No. 21, 10 μ M) 以引入预期碱基对替换。使用 1.0ng 前一轮 PCR 反应的每种 DNA 作为模板。加入 2.5U Pfu 聚合酶以后进行 25 个保温循环，其中每个循环是 94℃ 1 分钟、55℃ 1 分钟和 72℃ 1.5 分钟。最后在 72℃ 保温 5 分钟。用制备性琼脂糖凝胶电泳和 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 提取期望 PCR 产物。

[0185] 在以下步骤中，代表 8 个密码子被突变的文库的合成泛素变体基因被融合到由连接 PCR 反应制备的间隔区 DNA 上。这在 50 μ l 体积中用 Pfu 聚合酶 (Promega) 进行。为此目的，使用 5 μ l 提供的 10 $\times$ Pfu 缓冲液以及 4 μ l dNTP 混合物并用水补足体积。进而，样品含有 2.5 μ l 每种旁侧引物 (Seq ID No. 23、Seq ID No. 21, 10 μ M)。使用 500ng 来自前一轮 PCR 反应的文库 DNA 和 500ng 间隔区 DNA 作为模板。加入 2.5U Pfu 聚合酶以后进行 25 个保温循环，其中每个循环是 94℃ 1 分钟、55℃ 1 分钟和 72℃ 1.5 分钟。最后在 72℃ 保温 5 分钟。用制备性琼脂糖凝胶电泳和 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 提取期望 PCR 产物。

[0186] 在最后步骤中，通过进一步 PCR 反应引入用于体外转录 / 翻译反应的适当调节序列 (T7 启动子、核糖体结合位点)，即得线性表达构建体。反应在 500 μ l 样品体积中进行，其中使用约 500ng 前面 PCR 反应中获得的产物和 Taq 聚合酶。反应样品——调整到 10 倍体积——根据实施例 2 吸取 10 $\times$ Taq 缓冲液、25mM MgCl₂、dNTP 混合物以及旁侧引物 (Seq ID No. 24、Seq ID No. 21, 10 μ M)。用水补足体积后加入 2.5UTaq 聚合酶并开始 PCR 程序。进行 25 个保温循环，其中每个循环是 94℃ 1 分钟、65℃ 1 分钟和 72℃ 1.5 分钟。最后在 72℃ 保温 5 分钟。期望 PCR 产物用制备性琼脂糖凝胶电泳和 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 提取并可直接用于体外转录 / 翻译反应。

[0187] 为进行体外转录 / 翻译反应，根据制造商说明使用 RTS100E. coli Kit (Roche Cat. No. 3186148)。为此目的，用移液器仔细混合 24.0 μ l E. coli 裂解物、20.0 μ l 反应混合物、24.0 μ l 氨基酸混合物 (无甲硫氨酸)、2.0 μ l 甲硫氨酸、10.0 μ l 反应缓冲液 (10 $\times$)、2.0 μ l MgAc (500mM)、2.0ml Anti-ssrA DNA (200 μ M) 以及 20.0 μ l 各 DNA 文库 (0.5—1.0 μ g)，并在 30℃ 或 37℃ 保温 60 分钟。以下步骤分别在冷室或冰上进行。样品在冰上冷却 5 分钟，加入 400 μ l 含 3% BSA 的 WBT (50mM Tris/HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 50mM MgAc, 0.1% Tween20)。该缓冲液任选的含有 2.5mg/ml 肝素 (Sigma)。在 4℃ 以 13,000rpm 离心 5 分钟沉淀样品中的不溶部分，其中由泛素变体、对应 mRNA 和核糖体组成的三元复合体保

留在上清液中。

[0188] 作为分离三元复合体的亲和基质,其中所述的三元复合体具有展示到表面上并应该结合预定靶物质的泛素变体,用对应物质包被微滴定板的两个孔。重组制备的生长因子 VEGF 作为所用靶物质于 4℃ 在微滴定板上固定过夜。通过每个孔用 400 μ l 含 3% BSA 的 WBT 在室温保温 90 分钟,从而封闭微滴定板表面的未结合位点。除去封闭液后,每孔加入 250 μ l 含来自体外转录 / 翻译反应的三元核糖体复合体的溶液并在 4℃ 和 50rpm 下保温 60 分钟。然后通过用例如 WBT (300 μ l / 孔, 3 分钟, 4℃, 50rpm) 洗涤 5 次并用力拍击而除去未结合复合体。通过 100ml EB (50mM Tris / HCl (pH7.5), 1.5M NaCl, 20mM EDTA) / 孔——该缓冲液任选的含有 50 μ g / ml 酵母 RNA (Sigma)——并在 4℃ 和 50rpm 下保温 5 分钟而最后将结合所述亲和基质的复合体分成 mRNA、蛋白质和核糖体亚基。

[0189] 尽可能快的在室温并根据制造商说明使用 Qiagen 的 RNAeasy 试剂盒 (Cat. Nr. 74104) 从所得悬液中分离 RNA。在此情况下,最后步骤中用 30 μ l 无 RNA 酶的水洗脱 RNA。为降解可能随之携带的线性表达构建体 DNA,将所得 RNA 溶液用 DNaseI (Invitrogen) 处理。为此目的,加入 3 μ l DNase 缓冲液 (10 $\times$) 和 3 μ l DNase I (1U / μ l) 并在室温保温 15 分钟。然后加入 3 μ l 125mM EDTA 并在 65℃ 保温 10 分钟以灭活 DNase。经逆转录反应互补所得 RNA。为此目的,首先 8.5 μ l 所述 RNA 与 0.5 μ l 寡聚脱氧核苷酸 T7te (Seq ID No. 21; 100 μ M) 和 4.0 μ l dNTP (每种 2.5mM) 混合并在 65℃ 保温 5 分钟,然后放置冰上 1 分钟。接着加入 4.0 μ l RT 缓冲液 (5 $\times$)、1.0 μ l DTT (0.1M)、1.0 μ l RNasin (Promega) 和 1.0 μ l SS 逆转录酶 III (200U / μ l, Invitrogen) 作为另外组分,并在 55℃ 保温 60 分钟。

[0190] 逆转录反应的反应样品直接用于 PCR,以重新扩增被富集泛素变体的遗传信息以及重新引入调节序列以进行新的选择循环。为此目的,用 Expand High Fidelity PCR 系统 (Roche) 在总体积 50 μ l 中进行连续两轮 PCR 反应。为此目的,使用 5 μ l 提供的 10 $\times$ 缓冲液 (包括 15mM $MgCl_2$) 以及 4 μ l dNTP 混合物并用水补足体积。进而,样品含有 2.5 μ l 每种旁侧引物 (Seq ID No. 23 和 Seq ID No. 21, 10 μ M) 以及 2.5 μ l 二甲基亚砜 (DMSO)。使用 2.5 或 5.0 μ l 前述 PCR 反应物作为模板。加入 0.75 μ l 聚合酶混合物 (3.5U / μ l) 以后进行 25 个保温循环,其中每个循环是 94℃ 15 秒、50℃ 30 秒和 72℃ 1.0 分钟。最后在 72℃ 保温 7 分钟。期望 PCR 产物用制备性琼脂糖凝胶电泳和 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 提取并可直接用于第二个 PCR 反应。因此,使用 5 μ l 提供的 10 $\times$ 缓冲液 (包括 15mM $MgCl_2$) 以及 4 μ l dNTP 混合物并用水补足体积。进而,所述批次含有 2.5 μ l 每种旁侧引物 (Seq ID No. 24 和 Seq ID No. 21, 10 μ M)。使用前述 PCR 反应的总 DNA 作为模板。加入 0.75 μ l 聚合酶混合物 (3.5U / μ l) 以后进行 25 个保温循环,其中每个循环是 94℃ 15 秒、50℃ 30 秒和 72℃ 1.0 分钟。最后在 72℃ 保温 7 分钟。期望 PCR 产物用制备性琼脂糖凝胶电泳和 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 提取并可直接用于新选择循环的体外转录 / 翻译中。

[0191] 作为替代方案,将各基因克隆入表达载体 pET20B(-) (见上文)。这样使得可以分析所得泛素变体的 DNA 序列、在 E. coli 中重组制备所述变体并用羧端融合的六组氨酸肽进行固定化金属螯合亲和层析 (IMAC) 一步纯化所述变体 (见下文)。以此方式获得并进一步分析的泛素变体的氨基酸替换在表 2 中示例性列出。

[0192] 表 2: 用核糖体展示方法经针对不同靶物质选择后基于泛素的修饰蛋白的新产生

结合位点区域的氨基酸替换。

[0193]

	选择	位置: 2:	位置: 4:	位置: 6:	位置: 62:	位置: 63:	位置: 64:	位置: 65:	位置: 66:
SPU ⁺		Gln	Phe	Lys	Gln	Lys	Glu	Ser	Thr
SPU-11-RD3/1	VEGF	Arg	Arg	Ala	Arg	His	Gly	Thr	Ser
SPU-11-A8	VEGF	Leu	Leu	Trp	Ser	Leu	Ser	Gly	Ile
SPU-11-58	VEGF	Leu	Leu	Trp	Arg	Ser	Asp	Leu	Asn
SPW-11-A1	VEGF	Phe	Trp	Val	Gly	His	Gln	Arg	Gly

SPU⁺: 结合口袋中没有替换的泛素蛋白质骨架

[0194] 实施例 6: 制备并纯化基于泛素的修饰蛋白

[0195] 将各基因克隆到表达载体 pET20B(-) 中 (见上文) 后, 表征在 ELISA 中显示较强结合信号并具有功能性 DNA 序列的噬菌粒中选择的泛素变体的蛋白质化学特性。这使得可以用 E. coli BL21 / pUBS 重组制备自变体并用羧端融合的六组氨酸肽进行固定化金属螯合亲和层析 (IMAC) 一步纯化所述变体。

[0196] 为重组制备具有新结合特性的基于泛素的修饰蛋白, 用各单菌落接种 50ml 2xYT / amp / kan 培养基, 并在 37°C 和 220rpm 下振荡 16 小时。用这种预培养物接种 1.5 升 2xYT / amp / kan 培养基并在 37°C 和 220rpm 下培养, 直到细胞密度达到 OD₆₀₀=0.5。加入 1mM / 1 α-D- 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导外来基因表达后, 继续在 37°C 和 220rpm 下振荡 3 小时。然后离心沉淀细胞 (30 分钟, 5,000g, 4°C) 并重悬于 40ml NPI-20 (50mM NaH₂PO₄, pH8.0, 300mM NaCl, 20mM 咪唑) 中。通过与 200 μg / ml 溶菌酶和 500U benzonase 于室温保温半小时并 15 秒超声脉冲重复 5 次, 从而破碎细胞。离心沉淀细胞碎片 (30 分钟, 15,000g, 4°C), 含总可溶性蛋白的上清液可直接用于随后的 IMAC。

[0197] 用 5ml HiTrap Chelating HP 柱 (Amersham Pharmacia Biotech) 在 ÄKTA™ Explorer FPLC 装置 (Amersham Pharmacia Biotech) 上在室温和 5ml / min 流速下进行层析。首先, 用 5 倍柱体积的 NPI-20 平衡柱子, 随后使总细胞蛋白流过柱子。用 30 倍柱体积的 NPI-20 漂洗从而洗去未结合蛋白。用 20nM-250mM 咪唑的线性梯度在总共 20 个柱体积中进行洗脱, 并以每份 2.5ml 收集洗脱液。通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析含纯化泛素变体的组分并合并。所得重组泛素变体的产率为 10-30mg / 1 培养物体积。

[0198] 实施例 7: 表征具有新结合特性的基于泛素的修饰蛋白的结合特性

[0199] 在 ELISA 中用 Ni / NTA 过氧化物酶偶联物 (Qiagen) 或用兔抗泛素血清 (Sigma) 检测在每种情况下针对 recGLP1-R、F_cIgM 和 HC 而选择并如实施例 6 纯化的泛素变体的结合。为此目的, 用各抗原和例如 BSA 充满微滴定板孔并 4°C 过夜以检测非特异性结合, 并用含 3% (w / v) BSA 的 PBST0.5 封闭 2 小时以饱和剩余结合位点。然后用 PBST0.1 漂洗板子三次并拍掉。而后, 向每个板孔加入 100 μl 含一系列浓度 (从未稀释到 1:16 稀释) 的各修饰纯化蛋白的 PBST0.1 溶液。保温 2 小时后用 PBST0.1 漂洗三次。为检测结合的修饰蛋白, Ni / NTA 过氧化物酶偶联物以 1:500 稀释度或泛素抗血清以 1:10 稀释度分别稀释于 PBST0.1 中, 并向每个孔中加入每种 100 μl。RT 保温 1 小时后, 直接检测 Ni / NTA 过氧化物酶偶联物 (见下文), 或与兔抗体过氧化物酶偶联物 (1:2500 稀释于 PBST0.1 中) RT 保温 1 小时。为了检测, 用 PBST0.1 漂洗孔三次, 然后用 PBS 漂洗三次。最后加入 100 μl

ImmunoPure kit,然后在 15 分钟后加入 100ml2M H_2SO_4 终止颜色反应。然后用 Sunrise Remote Reader (Tecan) 在 450nm 测量消光值。用“Sigma Plot”计算机程序评估所得吸光强度值。为此目的,每种情况下测量的消光值对所用的相应蛋白浓度作图,并用式 (1) 的非线性回归对所得曲线进行拟合。

[0200]

(1)

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

[0201] 其中假定固定抗原和修饰蛋白之间的结合 / 解离平衡是 :

[0202] x = 所用修饰蛋白浓度

[0203] y = 抗原 / 修饰蛋白复合体的浓度 (此处通过报告酶活性间接测量)

[0204] a = 固定化抗原总浓度

[0205] b = 解离常数 (K_D)

[0206] 从泛素变体 SPU-1-D10 的这种类型的 ELISA 实验获得的结合曲线示例性表示于图 5,其中泛素变体 SPU-1-D10 根据实施例 3 和 4 通过噬菌体展示从对 recGLP1-R 的亲亲和富集中获得。另外,图 6 中是泛素变体 SPW-11A1 的结合曲线,其中泛素变体 SPW-11A1 根据实施例 5 通过核糖体展示从对 VEGF 的亲亲和富集中获得。针对具有新结合特性的单独选择的基于泛素的修饰蛋白获得的结合数据总结于表 3。

[0207] 为定量分析泛素变体与预定抗原的结合,也使用 BIACORE3000 系统 (Biacore)。为了这种表面等离子体共振 (SPR) 测量,将能固定分析物的载体 (传感器芯片) 定位到装置内,并使之与集成于内部的微流系统 (Integrated μ Fluidic Cartridge, IFC) 结合。这使得连续流体可以从缓冲液贮库流过芯片表面,并类似于在溶液中检测与分析物载体的结合。

[0208] 首先为了测量,根据制造商说明用 NHS / EDC 偶联通过伯氨基将靶分子例如 VEGF 偶联到传感器芯片 CM5 (Biacore) 的羧甲基葡聚糖表面上。在 25°C、35 μ l / min 的连续缓冲液流中进行测量。使用补充 0.005% P-20 去污剂 (Biacore) 的 PBS (过滤除菌并脱气) 作为工作缓冲液和蛋白质溶剂。由于产生 SPR 信号,经样品环注射的不同浓度泛素变体与固定化 VEGF 的相互作用可以被检测。信号被定量为依赖于时间的所谓共振单位 (RU),并所产生的相应结合曲线,。用 BIAevaluation software (Version 3.1; Biacore) 评估所得结合曲线,并确定解离常数 (K_D) 值。由这种 BIACORE 实验获得的泛素变体 SPU-11-58 的结合曲线示例性表示于图 7,所述泛素变体 SPU-11-58 根据实施例 5 通过核糖体展示得自针对 VEGF 的亲亲和富集。针对具有新结合特性的单独选择的基于泛素的修饰蛋白获得的结合数据总结于表 3。

[0209] 表 3: 所选基于泛素的修饰蛋白和不同靶物质的复合体的解离常数

[0210]

修饰蛋白	靶物质	表观K _D 值
SPU-1-D10 ¹	recGLP1-R	166 ± 0.06 nM
SPU-2-A7 ²	F _c IgM	9.4 ± 0.9 μM
SPU-3-H13 ²	HC	10.7 ± 1.0 nM
SPU-11-RD3/1 ²	VEGF	25 μM
SPU-11-A8 ²	VEGF	70 nM
SPU-11-58 ²	VEGF	50 nM
SPW-11-A1 ²	VEGF	1.2 ± 0.1 μM
SPU-15-G7 ²	TNFα	< 1.0 μM
SPU-15-E1 ²	TNFα	< 1.0 μM

[0211] ¹ 用 ELISA 分析; ² 用 BIACORE 分析

[0212] 此外,评估单个修饰蛋白的结合特异性。为此目的,用单个适当浓度的修饰蛋白如上述进行 ELISA 实验。为此目的,用靶物质以及结构相似物质充满微滴定板的各孔。由这种 ELISA 实验获得的泛素变体 SPU-3-H13 的结合曲线示例性表示于图 8,其中所述泛素变体 SPU-3-H13 根据实施例 3 和 4 得自对 HC 的亲富集。

[0213] 实施例 8:用定点二次突变改进基于泛素的结合蛋白的结合特性

[0214] 基于对 F_cIgM 表现出全新结合特性的泛素变体 SPU-2-A7 建立一种通用的亲和成熟策略。这包含首先在 DNA 水平上在新生的结合位点中选定位置的新随机替换以及随后 96 个各变体的平行表达、纯化和结合分析。通过使用这种“96 格式”可以将此策略转移到实验室机器人上并因此进行高通量变体分析。

[0215] 为此目的,在两个平行样品中通过 PCR 随机突变两个位置 (62 和 63 以及 64 和 65) 中每一个的密码子。对应的每个反应在 50 μl 中进行,其中使用约 1.0ng 插入 pET20B(-) 中的 SPU-2-A7 基因并使用 Taq 聚合酶。如实施例 2 所述从 10×Taq 缓冲液、25mM MgCl₂、dNTP 混合物以及旁侧序列 (Seq ID No. 12, Seq ID No. 25 用于突变位置 62 和 63,或 Seq ID No. 12, Seq ID No. 26 用于突变位置 64 和 65; 10 μM) 吸取反应样品。用水补足体积后加入 2.5U Taq 聚合酶并开始 PCR 程序。进行 25 个保温循环,其中每个循环是 94℃ 1 分钟、55℃ 1 分钟和 72℃ 1.5 分钟。最后在 72℃ 保温 5 分钟。用制备性琼脂糖凝胶电泳和 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 提取期望 PCR 产物。分别代表对应位置 62 / 63 或 64 / 65 突变的 SPU-2-A7 文库的所得 DNA 片段被进行制备性 NdeI / XhoI 限制性切割并再用制备性琼脂糖凝胶电泳分离。将修饰的 SPU-2-A7 的基因文库插入表达载体 pET20B(-) (Novagen, 参见实施例 1) 以生产对应蛋白。

[0216] 转化电转感受态 E. coli 例如 Nova-Blue 或 BL-21 细胞后,获得表达质粒形式的、含所得每个文库中一个克隆遗传信息的单菌落。用 96 个这些单菌落每个接种 300 μl 2xYT / amp / kan 并在 37℃ 和 220rpm 下振荡过夜。用 100 μl 每种所述培养物接种 96×4ml 2xYT / amp / kan 并在 37℃ 和 220rpm 下培养,直至细胞密度达到 OD₆₀₀=0.5。为此目的,每种情况使用 4 个 24 孔培养板 (Qiagen)。加入 1mM / L α-D- 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导外来基因表达后,继续在 37℃ 和 180rpm 下振荡 3 小时,或 30℃ 和 180rpm 过夜。

然后离心沉淀细胞 (30 分钟, 4,000g, 4℃), 弃上清液。用物理裂解 (迅速冻融) 或化学裂解 (去污剂) 以及加入溶菌酶 (200gg / ml) 和 benzonase (最终体积中 10U / ml) 的方法进行细胞破碎。通过使用 Qiagen 的 BioRobot9600Kit 或者手工操作的真空工段 (vacuum station) (QIAvac96, Qiagen) 从所得细胞总蛋白中纯化 SPU-2-A7 的变体。在与实施例 7 中实验方法对应的 ELISA 实验中以定性方式分析所得蛋白质溶液与 F_cIgM 的结合。

[0217] 为分别验证这些基因的功能性或分析所得替换, 对在 ELISA 中显示较强结合信号的 SPU-2-A7 的变体进行 DNA 测序。以重组方式在 1.5L 规模制备有前景的候选物, 并用融合到羧基端的六组氨酸肽经固定化金属整合亲和层析纯化。为定量亲和力, 如实施例 7 所述进行不依赖于浓度的 ELISA, 与已进行成熟的泛素变体 SPU-2-A7 相比较。从这种 ELISA 实验中获得的泛素变体 SPU-2-A7 以及 SPU-2-A7 (62 / 63) 的结合曲线示例性表示于图 9。由于 $K_D=1.0M$, 这种亲和成熟的变体表现出与 SP-2-A7 相比提高 10 倍的结合强度。

[0218] 实施例 9: 用双 - 马来酰亚胺试剂经单个羧端半胱氨酸残基定点偶联两个相同的基于泛素的蛋白质

[0219] 用双 - 马来酰亚胺己烷 (BMH, Pierce) 经特意为此目的引入的半胱氨酸残基连接两个相同的泛素变体。首先, 为此目的在读码框 3' 端, 即在六组氨酸肽之后的蛋白羧基端, 在脯氨酸之前引入半胱氨酸的适当密码子。这样, 最后的脯氨酸应该保护所得蛋白在生产和纯化期间免受蛋白水解性降解。根据制造商说明使用 Quick Change™ Site-directed Mutagenesis 试剂盒 (Stratagene) 并使用寡聚脱氧核苷酸 Seq ID No. 27 和 Seq ID No. 28 以及作为模板的泛素变体基因 (Seq ID No. 15) 将相应碱基对插入 pET20B(-) 中。通过 DNA 测序分析所得克隆, 具有携带预期插入物的表达质粒的菌落根据实施例 6 用于重组生产和纯化。

[0220] 纯化蛋白用含 1mM EDTA 和 5mM β -巯基乙醇的 PBS 透析, 并在 PBS、1mM EDTA 用作反应缓冲液的以下偶联反应中以约 1mg / ml 浓度使用。为此目的, 首先将蛋白质溶液调节到 100mM 二硫苏糖醇 (DTT) 并在室温保温 1 小时从而还原游离的半胱氨酸残基。此后, 用 PD10Sephadex G-25M 柱 (Amersham Biosciences) 分离还原剂, 这被加入两倍摩尔过量的偶联剂 (贮液: 100mM BMH 的 DMSO 溶液) 并在室温保温 1 小时。再用 PD10 柱分离过量 BMH。为仅分离可能存在的单反应的偶联剂, 等摩尔量的新鲜还原蛋白再次加入由此获得的偶联样品中。这个第二次偶联步骤在室温下进行 2 小时。

[0221] 通过 SDS-PAGE (图 10) 分析由此方法获得的偶联样品并估算偶联度。对于上述方法, 其约为 40%。

[0222] 本发明还涉及以下项:

[0223] 1. 一种蛋白质, 选自“泛素样蛋白”蛋白超家族的蛋白质、具有泛素样折叠基序的蛋白质及具有泛素样折叠基序的其片段或其融合蛋白, 其中由于所述蛋白质的至少一个表面暴露区域中的一个或多个氨基酸修饰, 所述表面暴露区域包括 β 片层区域的至少一个 β 片层链和任选的非 β 片层区域, 所述蛋白质显示与预定结合伴侣的之前不存在的结合亲和力, 同时保留泛素样折叠基序。

[0224] 2. 根据项 1 的蛋白质, 其中选用于修饰的蛋白质与人泛素具有至少 30% 的氨基酸序列一致性、具有泛素样折叠基序和 / 或属于“泛素相关蛋白”蛋白家族。

[0225] 3. 根据项 1 或 2 的蛋白质, 其中选用于修饰的蛋白质具有泛素样折叠基序并优选

自 SUMO-1、FAU、NEDD-8、UBL-1、Rub1、APG8、ISG15、URM1、HUB1、GDX、Elongin B、PLIC2(N 端结构域)、人 Parkin(N 端结构域)。

[0226] 4. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中所述蛋白质是人泛素或另一种哺乳动物泛素。

[0227] 5. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中所述修饰包含蛋白质表面上 5-10 个氨基酸、优选 6-8 个氨基酸的连续区域,其中优选其 2-4 个氨基酸位于表面暴露的 β 片层。

[0228] 6. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中第一和第四个 β 片层链在表面暴露的氨基酸上被修饰,任选的另外在哺乳动物泛素中非 β 片层区域的 62-65 位氨基酸区域修饰。

[0229] 7. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中所述修饰是至少部分位于一级序列的直接临近或非直接临近的氨基酸上的替换、插入、缺失、化学修饰或其组合,并包含一个或多个氨基酸,优选替换,其中优选的是,一级序列中不临近的修饰氨基酸在二级结构中形成对所述结合伴侣的优选连续结合区域。

[0230] 8. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中一级序列中直接临近的氨基酸的修饰,优选替换的数目是 2-8 个直接临近氨基酸,进一步优选 3-7 个或 4-6 个或 2-4 个直接临近的氨基酸。

[0231] 9. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中在一级序列中互相直接临近的修饰氨基酸的一部分位于 β 片层链的起始或末端区域,其中这部分长度是两个或多个氨基酸,优选两个或三个氨基酸。

[0232] 10. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中在一级序列中互相直接临近的 5 个或更多个氨基酸被修饰,优选替换,其中一个、两个或更多个,优选两个或三个直接临近的氨基酸形成 β 片层链区域的起始或末端。

[0233] 11. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中对那些氨基酸进行修饰形成所述蛋白质表面上的连续区域。

[0234] 12. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中被修饰的那些位置的氨基酸不属于根据项 1 的野生型蛋白质中参与结合泛素的天然结合伴侣的区域。

[0235] 13. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中在所述蛋白质,优选泛素的 β 链上存在的至少 25%氨基酸被修饰。

[0236] 14. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中氨基酸修饰还在所述蛋白质的环区域进行。

[0237] 15. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中所述蛋白质是人泛素或其同源蛋白,并且其中泛素的至少 8 个表面暴露的氨基酸被修饰,优选替换,使得这些修饰氨基酸包含与所述结合伴侣具有结合亲和力的区域。

[0238] 16. 根据项 15 的蛋白质,其中所述 8 个表面暴露氨基酸中的至少 6 个位于所述蛋白质上确定为 β 片层区域的区域。

[0239] 17. 根据项 15 或 16 的蛋白质,其中所述修饰的,优选替换的氨基酸中至少 5 个在一级序列上互相直接临近。

[0240] 18. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中被修饰氨基酸位于所述蛋白质的氨基端 β 片层链和 / 或位于羧基端 β 片层链。

[0241] 19. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中另外被修饰氨基酸位于羧基端 β 片层链后的环中。

[0242] 20. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中所述修饰蛋白是在位置 2、4、6、62、63、64、65 和 66 被替换、缺失、插入和 / 或化学修饰的人泛素,其中优选替换。

[0243] 21. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中选用于修饰的蛋白质已经具有插入、缺失、替换和 / 化学修饰,使得所述蛋白质的生物学和 / 或蛋白质化学功能已经被消除或新产生。

[0244] 22. 根据项 21 的蛋白质,其中在修饰后的蛋白质中泛素的总共至少 10 个、优选至少 15 个氨基酸已经被替换。

[0245] 23. 根据项 21 或 22 的蛋白质,其中选用于经替换、插入和 / 或缺失而改变的蛋白质是在一个或多个下述位置:44、48、54、70、72、75 被替换并且 76 位氨基酸缺失的人泛素,所述泛素大体上不再显示与其天然结合伴侣的相互作用。

[0246] 24. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中所述蛋白质是 45 位苯丙氨酸替换成色氨酸的人泛素。

[0247] 25. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中经随机诱变对选定氨基酸进行了随机替换。

[0248] 26. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中所述结合伴侣是抗原或半抗原。

[0249] 27. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中以 K_D 表示的、与预定结合伴侣的结合亲和力是 10^{-6}M – 10^{-12}M ,更优选 10^{-8}M – 10^{-12}M 或 10^{-9}M – 10^{-12}M 。

[0250] 28. 一种蛋白质,选自“泛素样蛋白”蛋白超家族的蛋白质、具有泛素样折叠基序的蛋白质及具有泛素样折叠基序的其片段或其融合蛋白,其中由于一个或多个修饰,所述蛋白质显示与预定结合伴侣的之前不存在的结合亲和力,同时保留泛素样折叠基序,这种蛋白质可以通过以下方法获得:

[0251] a) 选择待修饰蛋白质;

[0252] b) 确定结合伴侣;

[0253] c) 选择该蛋白质表面暴露区域的氨基酸,其中所述表面暴露区域包括 β 片层区域的至少一个 β 片层链和任选的非 β 片层区域;

[0254] d) 优选经替换、插入、缺失和 / 或化学修饰来修饰所选氨基酸,同时保留泛素样折叠基序;

[0255] e) 使修饰后蛋白质与步骤 b) 中确定的结合伴侣接触;

[0256] f) 检测与步骤 b) 中预定的结合伴侣有结合亲和力的蛋白质。

[0257] 29. 根据前述项中一项或多项的蛋白质,其中所述蛋白质以位点特异性和共价方式连接到相同或不同特异性的蛋白质上并因而分别显示双价或双特异性结合特性。

[0258] 30. 根据前述项中一项或多项的蛋白质的制备方法,所述蛋白质选自“泛素样蛋白”蛋白超家族的蛋白质、具有泛素样折叠基序的蛋白质及具有泛素样折叠基序的其片段或其融合蛋白,其中由于在所述蛋白质的至少一个表面暴露区域中的一个或多个修饰,所述区域包括 β 片层区域的至少一个 β 片层链和任选的非 β 片层区域,所述蛋白质显示与预定结合伴侣的之前不存在的结合亲和力,同时保留泛素样折叠基序,该方法包括以下步骤:

- [0259] a) 选择待修饰蛋白质；
- [0260] b) 确定结合伴侣；
- [0261] c) 选择该蛋白质表面暴露区域的氨基酸，其中所述表面暴露区域包括 β 片层区域的至少一个 β 片层链和任选的非 β 片层区域；
- [0262] d) 经替换、插入、缺失和 / 或化学修饰来修饰所选氨基酸，同时保留泛素样折叠基序；
- [0263] e) 使修饰后蛋白质与步骤 b) 中确定的结合伴侣接触；
- [0264] f) 检测与步骤 b) 中预定的结合伴侣有结合亲和力的蛋白质。
- [0265] 31. 根据项 30 的方法，其中通过化学合成修饰蛋白而进行步骤 c) 到 d)。
- [0266] 32. 根据项 31 的方法，其中步骤 d) 的修饰通过如下方法进行：通过基因工程改变属于对应修饰蛋白的 DNA，并在原核或真核宿主生物体中或体外表达所述蛋白质。
- [0267] 33. 根据项 30 的方法，其中在步骤 d) 中建立基因文库。
- [0268] 34. 根据前述项中一项或多项的方法，其中在步骤 d) 中经随机诱变进行对选定氨基酸的随机替换。
- [0269] 35. 根据前述项中一项或多项的方法，其中在步骤 e) 中通过合适的选择方法进行与预定结合伴侣的接触，所述合适选择方法优选噬菌体展示、核糖体展示、mRNA 展示、CIS 展示或细胞表面展示方法、酵母表面展示、细菌表面展示，特别优选噬菌体展示方法。
- [0270] 36. 根据前述项中一项或多项的方法，其中在步骤 f) 中通过一种或多种以下方法检测与预定结合伴侣具有结合亲和力的蛋白质：ELISA、等离子体表面共振光谱、荧光光谱、FACS、等温滴定量热法或分析超离心。
- [0271] 37. 根据前述项中一项或多项的方法，其中在步骤 f) 后是分离和 / 或富集与预定结合伴侣具有结合亲和力的检测蛋白质的步骤。
- [0272] 38. 根据前述项中一项或多项的方法，其中针对所述蛋白质的结合亲和力、结合特异性和 / 或其它蛋白质化学特性如稳定性、溶解性或产率，所述蛋白质用原本已知的方法成熟。
- [0273] 39. 根据前述项中一项或多项的方法，其中所述蛋白质以位点特异性和共价方式连接到相同或不同特异性的蛋白质上并因而获得双价或双特异性蛋白质。
- [0274] 40. 根据前述项中一项或多项的蛋白质用于检测、定量测定、分离和 / 或提取对应结合伴侣的用途，其中使用原本已知的方法，如层析或吸附技术。
- [0275] 41. 根据前述项中一项或多项的蛋白质的用于诊断、预防和治疗疾病的用途，所述疾病中对应结合蛋白直接或间接参与。
- [0276] 参考文献：
- [0277] Ausubel, F. M., Brent, R., Kinston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1994): Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc.
- [0278] Bazarsuren, A., Grauschopf, U., Wozny, M., Reusch, D., Hoffmann, E., Schaefer, W., Panzner, 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.

- [0279] Beal, R. , Deveraux, Q. , Xia, G. , Rechsteiner, M. und Pickart, C. (1996) Surface hydro-phobic residues of multiubiquitin chains essential for proteolytic targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 861-866.
- [0280] Berman, H. M. , Westbrook, J. , Feng, Z. , Gilliland, G. , Bhat, T. N. , Weissig, H. , Shindya-lov, I. N. und Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Res.* , 28, 235-242.
- [0281] 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.
- [0282] 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. *Sci-ence* 242, 423-426.
- [0283] 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.
- [0284] Brinkmann, U. , Reiter, Y. , Jung, S. H. , Lee, B. und Pastan, I. (1993) A recombinant im-munotoxin containing a disulfide stabilized Fv-Fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7538-7542.
- [0285] Buchberger A, Howard MJ, Proctor M, Bycroft M, National Library of Medicine, *J Mol Biol.* 2001 Mr 16 ;307(1) ;17-24.
- [0286] 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.
- [0287] Connolly, M. L. (1983) " Solvent-Accessible Surfaces of Proteins and Nucleic Acids" *Sci-ence*, 221, 709-713.
- [0288] M. und Henner, D. (1992) High level Escherichia coli expression and production of a bi-valent humanized antibody fragment. *Biotechnology* 10, 163-167.
- [0289] 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.
- [0290] Dübel, S. und Kontermann, R. E. (2001) Recombinant Antibodies. In : Kontermann, R. und
- [0291] Dübel, S. (Hrsg.) , , Antibody Engineering. "Springer Verlag, Heidelberg.
- [0292] Filippi, M. , Tribioli, C. und Toniolo, D. (1990) Linkage and sequence conservation of the X-linked genes DX253(P3) and DXS254E(GdX) in mouse and man. *Genomics* 7, 453-457.
- [0293] 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.

[0294] 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.

[0295] Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A. und Plückthun, A. (2000) Picomolar affinity anti-bodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nature Biotechnology* 18, 1287-1292.

[0296] 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.

[0297] Holliger, P., Prospero, T. und Winter, G. (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibodies. *Proc. Natl. Sci. USA* 90, 6444-6448.

[0298] Hoogenboom, H. R., de Bruine, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J. W. und Roo-vers, R. C. (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4, 1-20.

[0299] 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.

[0300] Kieke, M. C., Cho, B. K., Boder, E. T., Kranz, D. M. und Wittrup, K. D. (1997) Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Eng.* 10, 1303-1310.

[0301] Knappik, A., Ge, S., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wille, J., Plückthun, A. und Virek, 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.

[0302] Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. und Koide, S. (1998) The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J. Mol. Biol.* 284, 1141-1151.

[0303] Kuchner, O. and Arnold, F. H. (1997) Directed evolution of enzyme catalysts. *TIBTECH* 15, 523-530.

[0304] Kumar, S., Yoshida, Y. und Noda, M. (1993) Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 393-399.

[0305] Larsen CN, Wang H., National Library of Medicine; *J Proteome Res.* 2002 Sep-Oct; 1(5): 411-9.

[0306] Marx, J. (2002) Ubiquitin lives up to its name. *Science* 297, 1792-1794.

[0307] McConell S. and Hoess R. H. (1995) Tendamistat as a scaffold for conformationally constrained phage peptide libraries. *J. Mol. Biol.* 250, 460-470.

[0308] Michiels, L., Van der Rauwelaert, E., Van Hasselt, F., Kas, K. und 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.

[0309] Miura, T., Klaus, W., Gsell, B., Miyamoto, C. und Senn, H. (1999) Characterization of the binding interface between Ubiquitin and class I human Ubiquitin-conjugating enzyme2b by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J. Mol. Biol.* **290**, 213228.

[0310] Muller, B. H., Chevrier, D., Boulain, J.-C und Guesdon, J.-L. (1999) Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate for one-step immunodetection in molecular hybridization. *J. Immunol. Methods* **227**, 177-185.

[0311] Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S. (2001) SUMO, ubiquitins mysterious cousin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 202-210.

[0312] Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T. und Chothia C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **247**, 536-540.

[0313] Nord K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M. and Nygren, P. A. (1997) ;Binding proteins selected from combinatorial libraries of an beta-helical bacterial receptor domain. *Nat. Biotechnol.* **8**, 772-777.

[0314] Odegrip, R., Coomber, D., Eldridge, B., Herderer, R., Kuhlman, P. A., Ullman, C., Fitz-Gerald, K. und McGregor, D. (2003) CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes. *PNAS* **101**, 28062810.

[0315] Pannckoek, H., van Meijer M., Schleef, R. R., Loskutoff, d. J. and Barbas, C. F. (1993) :Functional display of human plasminogen-activator inhibitor1 (PAI-1) on phages :Novel perspectives for structure-function analysis by error-prone DNA synthesis. *Genet* **128**, 135-140.

[0316] Reiter, Y. und Pastan, I. (1998) Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. *Trends Biotechnol.* **16**, 513-520.

[0317] Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. F. (1989) :Molecular Cloning :A laboratory manual. Cold spring Harbor. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

[0318] Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (2001) "Molecular Cloning : A Laboratory Manual" 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[0319] Shrake, A. and Rupley, J. A. (1973) Environment and Exposure to Solvent of Protein Atoms. Lysozyme and Insuline. *J. Mol. Biol.* **79**, 351-371.

[0320] Skerra, A. und Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1041.

[0321] Schaffitzel, C., Zahnd, C., Amstutz, P., Luginbühl, B. und Plückthun, A.

(2001) In vitro selection and evolution of protein-ligand interactions by ribosome display. In :Protein-Protein Interactions, A Molecular Cloning Manual, E. Golemis, Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, pp. 535-567.

[0322] Skerra, A. (2000) Engineered protein scaffolds for molecular recognition. J. Mol. Recognit. 13, 167-187.

[0323] Stemmer, W. P. C. (1994) :Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. Nature 370, 389-391.

[0324] Vijay-Kumar, S. , Bugg, C. E. und Cook, W. J. (1987) Structure of Ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. J. Mol. Biol. 194, 531-544.

[0325] Winter, G. (1998) Synthetic human antibodies and a strategy for protein engineering. FEBS Lett. 430, 92-94.

[0326] Wintrode, P. L. , Makhatadze, G. I. und Privalov, P. L. (1994) Thermodynamics of Ubiquitin unfolding. Proteins Struct. Funct. Genet. 18, 246-253.

[0001]

<110> 塞尔蛋白质股份有限公司

<120> 基于泛素蛋白的人工结合蛋白的生产

<130> P17437

<150> DE 103 24 447.6

<151> 2003-05-23

<160> 35

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 291

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码修饰泛素蛋白骨架的DNA序列

<400> 1

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60

atggccatgc aaatcttcgt taaaaccctg acgggaaaga ctatcaccct ggaggtagaa 120

ccgtccgaca ccacgaaaa tgtcaaagct aaaatccaag acaaagaagg aattccacct 180

gaccagcaac gcctagcttt cgcaggacga caactagagg acgggctcac cctgtctgac 240

tacaacatcc aaaaagaatc caccctccac ctggcactcc tctcgcgggc c 291

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 模板

<400> 2

atgcaaatct tcgttaaaac cctgacggga aagactatca ccctggaggt 50

<210> 3

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 模板

<400> 3

[0002]

ggatttttagc tttgacattt tcgatgggtgt cggacgggttc tacctccagg gtg	53
<210> 4	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 模板	
<400> 4	
gtcaaagcta aaatccaaga caaagaagga attccacctg accagcaacg cct	53
<210> 5	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 模板	
<400> 5	
gggtgagccc gtcctctagt tgtcgtcctg cgaaagctag gcgttgctgg	50
<210> 6	
<211> 50	
<212> DNA	
<213>	
<220>	
<223>	
<400> 6	
gacgggctca cctgtctga ctacaacatc caaaaagaat ccaccctcca	50
<210> 7	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 模板	
<400> 7	
gagtgtctgc agcaggagtg ccagggtggag ggtggattc	39
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

[0003]

<223> 引物

<400> 8

gatatacata tgcaaattctt cg

22

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 9

gtggtgctcg agtgctcg

18

<210> 10

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> misc_特征

<222> (20)..(21)

<223> a, g, c 或 t

<220>

<221> misc_特征

<222> (26)..(27)

<223> a, g, c 或 t

<220>

<221> misc_特征

<222> (32)..(33)

<223> a, g, c 或 t

<400> 10

ccagccggcc atggccatgn nkatcnnkgt tnnkaccctg acgggaaaga ctatc

55

<210> 11

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

[0004]

<221> misc_特征
<222> (23)..(24)
<223> a, g, c 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (29)..(30)
<223> a, g, c 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (32)..(33)
<223> a, g, c 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (35)..(36)
<223> a, g, c 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (26)..(27)
<223> a, g, c 或 t

<400> 11
caggaggagt gccaggtgga gmnmmmmnn mnnmmngatg ttgtagtcag acagg 55

<210> 12
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 12
gttattactc gcggcccagc cggccatggc catg 34

<210> 13
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 13
gagtttttgt tcggcctcga gggcccgcag gaggagtgcc aggtggag 48

[0005]

<210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 14
 accactccct atcagtgata gag

23

<210> 15
 <211> 228
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 作为文库基础的修饰泛素序列

<400> 15
 atgcagatct tcgtgaagac cotgacoggc aagaccatca ctctggaggt ggagcccagt 60
 gacaccatcg aaaatgtgaa ggccaagatc caagataaag aaggcattcc ccccgaccag 120
 cagaggctca tctgggcagg caagcagctg gaagatggcc gcactcttct tgactacaac 180
 atccagaaaag agtcgaccct gcacctggtc ctccgcctga ggggcggc 228

<210> 16
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<220>
 <221> misc_特征
 <222> (19)..(20)
 <223> a, c, g 或 t

<220>
 <221> misc_特征
 <222> (25)..(26)
 <223> a, c, g 或 t

<220>
 <221> misc_特征
 <222> (31)..(32)
 <223> a, c, g 或 t

<400> 16

[0006]

gaaggagata tacatatggn katcnnkggt nnkaccctga cgggaaagac tatc 54

<210> 17
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_特征
<222> (23)..(24)
<223> a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (26)..(27)
<223> a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (29)..(30)
<223> a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (32)..(33)
<223> a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (35)..(36)
<223> a, c, g 或 t

<400> 17
caggaggagt gccaggtgga gmnmmnnmmnn mnnmmngatg ttgtagtcag acagg 55

<210> 18
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_特征
<222> (19)..(20)
<223> a, c, g 或 t

[0007]

<220>
<221> misc_特征
<222> (25)..(26)
<223> a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (31)..(32)
<223> a, c, g 或 t

<400> 18
gaaggagata tacatatggn katcnnkggt nnkaccotga ccggcaagac catc 54

<210> 19
<211> 61
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_特征
<222> (23)..(24)
<223> a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (26)..(27)
<223> a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (29)..(30)
<223> a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (32)..(33)
<223> a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (35)..(36)
<223> a, c, g 或 t

<400> 19

[0008]

caggaggagt gccaggtgga gmnmmmmnnn mnnmngatg ttgtagtcag aaagagtgcg 60

g 61

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 20

caccaccacc accaccacc tctgtcaat gct 33

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 21

ggccaccgcg tgaaggtgag cctcagtagc gacag 35

<210> 22

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 22

ctggcactcc tctgcgggc cctcgagcac caccaccacc accac 45

<210> 23

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 23

agaccacaac ggtttccttc tagaaataat tttgtttaac ttttaagaagg agatatacat 60

atg 63

<210> 24

<211> 42

[0009]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 24
atacgaaatt aatacgactc actatagggg gacccacaac gg 42

<210> 25
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_特征
<222> (32)..(33)
<223> a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (35)..(36)
<223> a, c, g 或 t

<400> 25
caggaggagt gccaggtgga gattcctacc mnnmngatg ttgtagtcag acagg 55

<210> 26
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_特征
<222> (26)..(27)
<223> a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (29)..(30)
<223> a, c, g 或 t

<400> 26
caggaggagt gccaggtgga gattmnnmnn cggcgggatg ttgtagtcag acagg 55

[0010]

<210> 27
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡聚脱氧核苷酸

<400> 27
ctcgagcacc accaccacca ccactgtccg tgagatccgg ctgctaacaa agccc 55

<210> 28
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡聚脱氧核苷酸

<400> 28
gggctttggtt agcagccgga tctcacggac agtgggtggg gtgggtggggtgc tcgag 55

<210> 29
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 泛素变体文库的构建

<400> 29
gttattactc gggcccagc cggccatggc catg 34

<210> 30
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 泛素变体文库的构建

<220>
<221> misc_特征
<222> (20)..(21)
<223> a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_特征
<222> (26)..(27)
<223> a, c, g 或 t

[0011]

<220>
<221> misc_特征
<222> (32)..(33)
<223> a, c, g 或 t

<400> 30
ccagcgggcc atggccatgn nkacnnkgt tnnkaccctg acgggaaaga ctatc 55

<210> 31
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 泛素变体文库的构建

<220>
<221> MISC_特征
<222> (24)..(24)
<223> 任何氨基酸

<220>
<221> MISC_特征
<222> (26)..(26)
<223> 任何氨基酸

<220>
<221> MISC_特征
<222> (28)..(28)
<223> 任何氨基酸

<220>
<221> MISC_特征
<222> (84)..(88)
<223> 任何氨基酸

<400> 31

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Xaa Ile Xaa Val Xaa Thr Leu Thr Gly
20 25 30

Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val
35 40 45

Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg

[0012]

50	55	60
Leu Ala Phe Ala Gly Arg Gln Leu Glu Asp Gly Leu Thr Leu Ser Asp		
65	70	75 80
Tyr Asn Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu His Leu Ala Leu Leu Leu Arg		
	85	90 95
Ala Leu Glu Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asn Leu Tyr Phe		
100	105	110
Gln Gly		

<210> 32
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 泛素变体文库的构建

<400> 32
 atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60
 atggccatgc aaatcttcgt taaaaccctg acgggaaaga ctatcacctt ggaggtagaa 120
 ccgtccgaca ccatcgaaaa tgtcaaagct aaaatccaag acaaagaagg aattccacct 180
 gaccagcaac gcttagcttt cgcaggacga caactagagg acgggctcac cctgtctgac 240
 tacaacatcc aaaaagaatc caccctccac ctggcactcc tctgcggggc cctcgaggcc 300
 gaacaaaaac tcattctcaga agagaatctg tatttccagg gctag 345

<210> 33
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 泛素变体文库的构建

<220>
 <221> misc_特征
 <222> (16)..(17)
 <223> a, c, g 或 t

<220>
 <221> misc_特征

[0013]

<222> (19)..(20)
 <223> a, c, g 或 t

<220>
 <221> misc_特征
 <222> (22)..(23)
 <223> a, c, g 或 t

<220>
 <221> misc_特征
 <222> (25)..(26)
 <223> a, c, g 或 t

<220>
 <221> misc_特征
 <222> (28)..(29)
 <223> a, c, g 或 t

<400> 33
 agactgatgt tgtagnnmnn mnnmnnmnnm gaggtggacc gtgaggagga c 51

<210> 34
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 泛素变体文库的构建

<400> 34
 gaggtggacc gtgaggagga cgcccgggag ctccggcttg tttttgag 48

<210> 35
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 35

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
 35 40 45

[0014]

Gln	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Thr	Leu	Ser	Asp	Tyr	Asn	Ile	Gln	Lys	Glu
50							55							60	
Ser	Thr	Leu	His	Leu	Val	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly				
65							70							75	

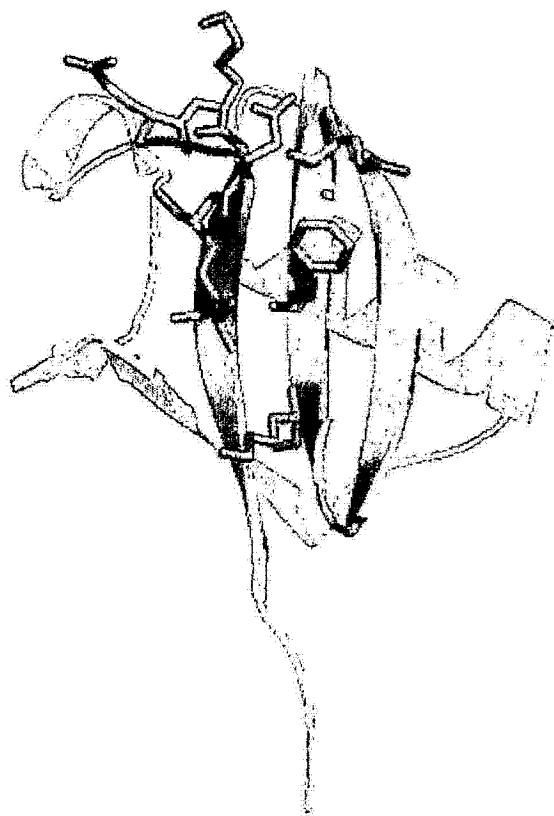


图 1

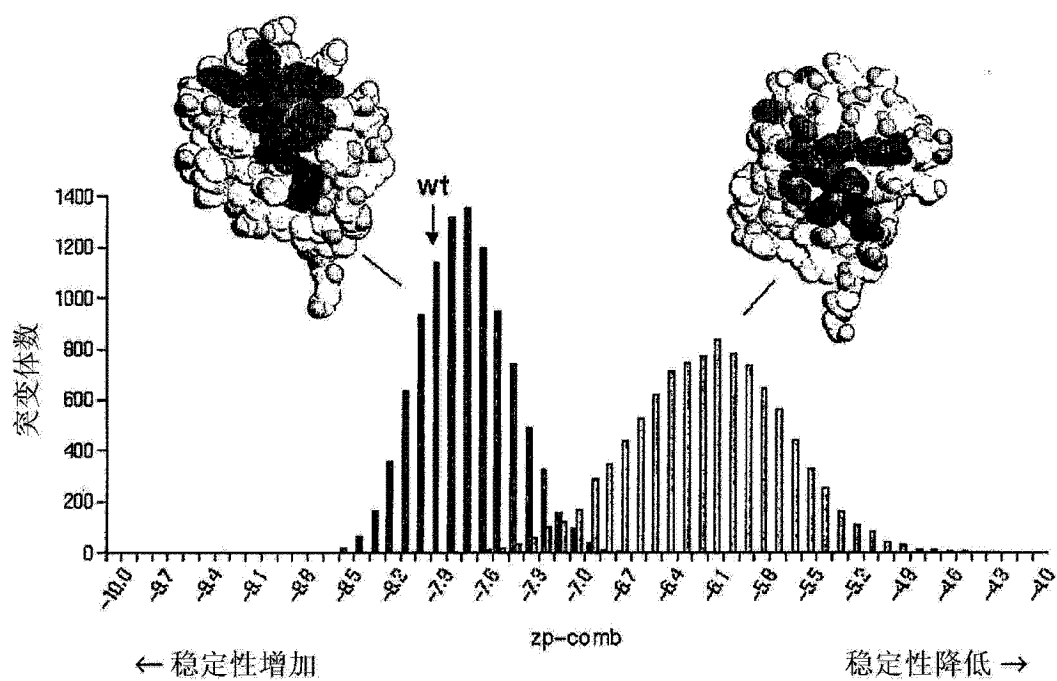


图 2

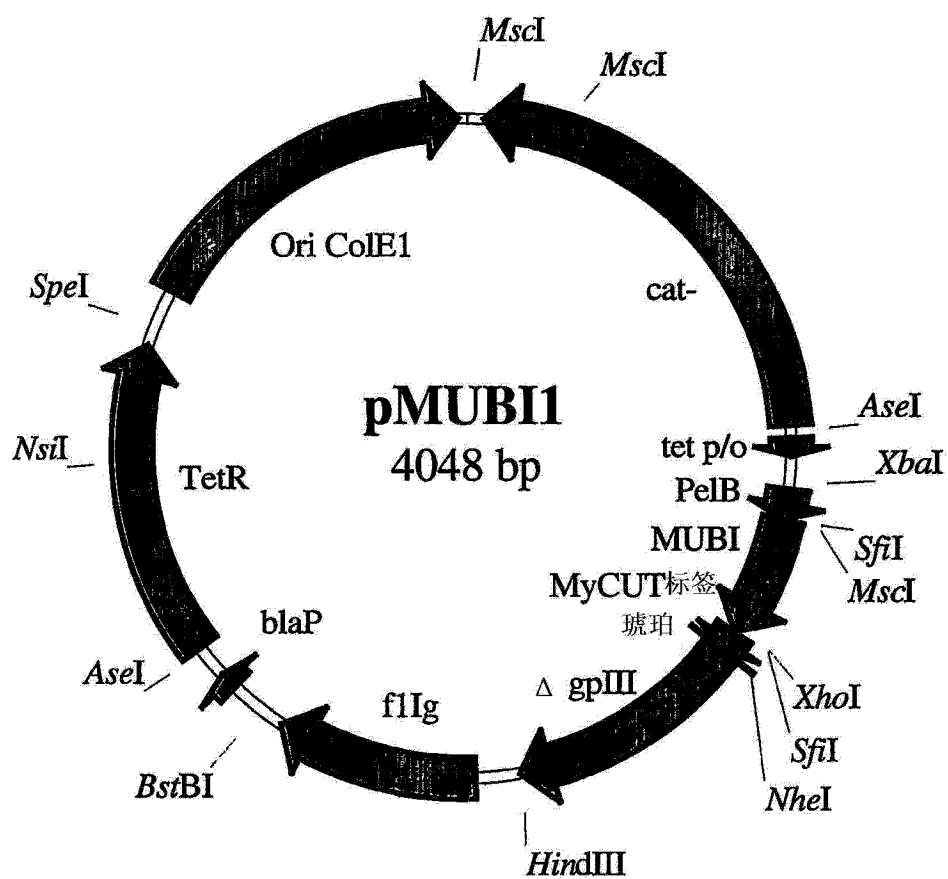


图 3

```

=====Sfil=====
Seq-ID No. 29  GTTATTACTCGCGGCCCGCCAGCCGGCCATGGCCCATG
Seq-ID No. 30  CCAGCCGGCCATGGCCCATGNNKATCNNKGTNNKACCCCTGACGGGAAAGACTATC
ATGAATACCTATTGCCTACGGAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGGGCCCGCCATGGCCATGCAAAATCTTGGTTAAACCCCTGACGGGAAAGACTATCACCCCTGGAGGTA
TACTTTATGATAACGGATGCCGTGGCGACCTAACAAATAGCGCGCGGTGGCCGGTACGGTACGTTTAGAAGCAATTTGGGACTGCCCTTTCTGATAGTGGGACCTCCAT
MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaGlyLeuLeuLeuAlaAlaGlnProAlaMetAlaMetXxxIleXxxValXxxThrLeuThrGlyLysThrIleThrLeuGluVal
PelB →          泛素 →
GAACCTCCGACACCATCGAAATGTCAAAGTTAAATCCAAAGACAAAGAAAGAAATTCACCTGACCAGCAACGCCCTAGCTTTCGCAGGACGACAACACTAGAGGACGGGCTCACCCCTG
CTTGGCAGGCTGTGGTAGCTTTACAGTTTCGATTTCTGTTTCTCCTTAAGTGGACTGGTCGTTGCGGATCGAAAGCGTCCCTGCTGTGATCTCCTGCCGAGTGGGAC
GGAC
GluProSerAspThrIleGluAsnValLysAlaLysIleGlnAspLysGluGlyIleProPpoAspGlnGlnArgLeuAlaPheAlaGlyArgGlnLeuGluAspGlyLeuThrLeu
TCTCGACTACAACATCCAAAGAATCCACCTCCACCTCCACCTCCAGCGCCCTCGAGGCCGACAAAACTCATCTCAGAGAGAATCTGTATTCCAGGGCTAG Seq-ID
No. 32
AGACTGATGTTGTAGGTTTTCCTTAGGTGGGAGGTGGACCGTGAGGAGGACGCCCGGAGCTCCGGCTTGTGTTTGTAGTAGAGTCTTCTCTTAGACATAAAGGTCCCGATC
SerAspTyrAsnIleXxxXxxXxxXxxLeuHisLeuAlaLeuLeuLeuArgAlaLeuGluAlaGluGlnLysLeuIleSerGluGluAsnLeuTyrPheGlnGlyStp
No. 31
AGACTGATGTTGTAGNNNNNNNNNNNNNNNNMGAGGTGGACCGTGAGGAGGAC Seq-ID No. 33
GAGGTGGACCGTGAGGAGGACGCCCGGAGCTCCGGCTGTTTTTGAG Seq-ID No. 34
=====Sfil=====

```

SPU-1-的结合

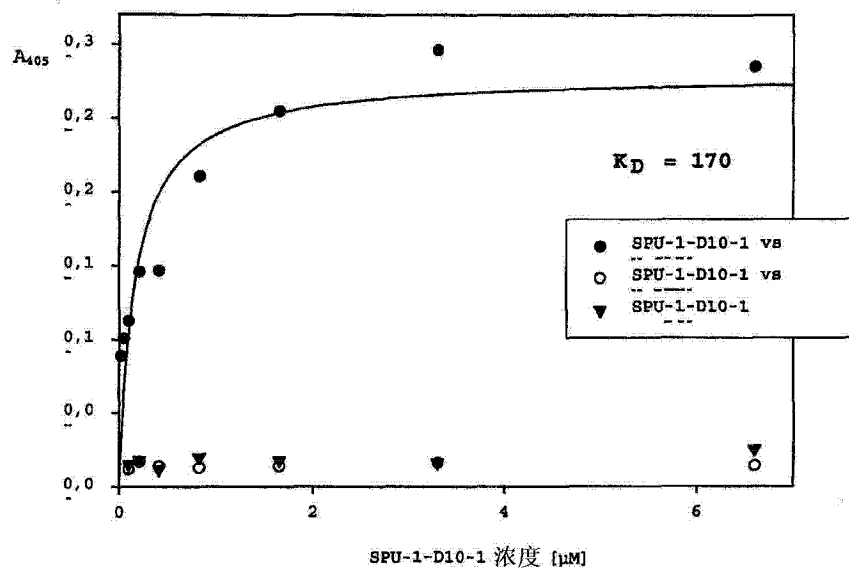


图 5

SPW-11-A1 与 hVEGF 的结合

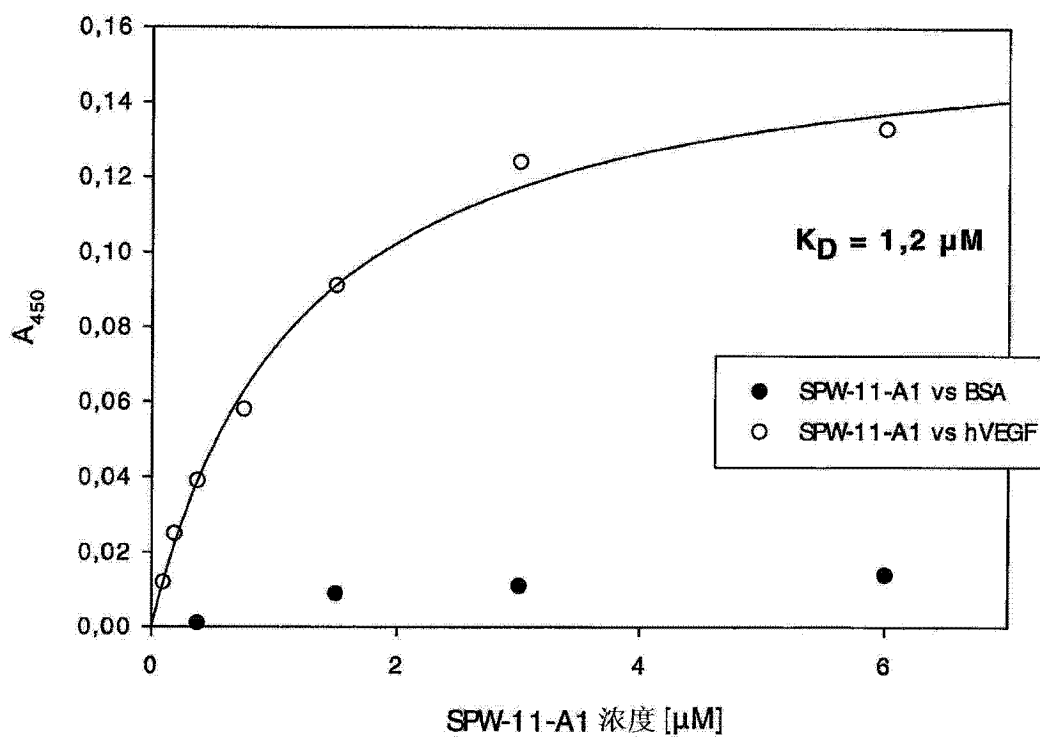


图 6

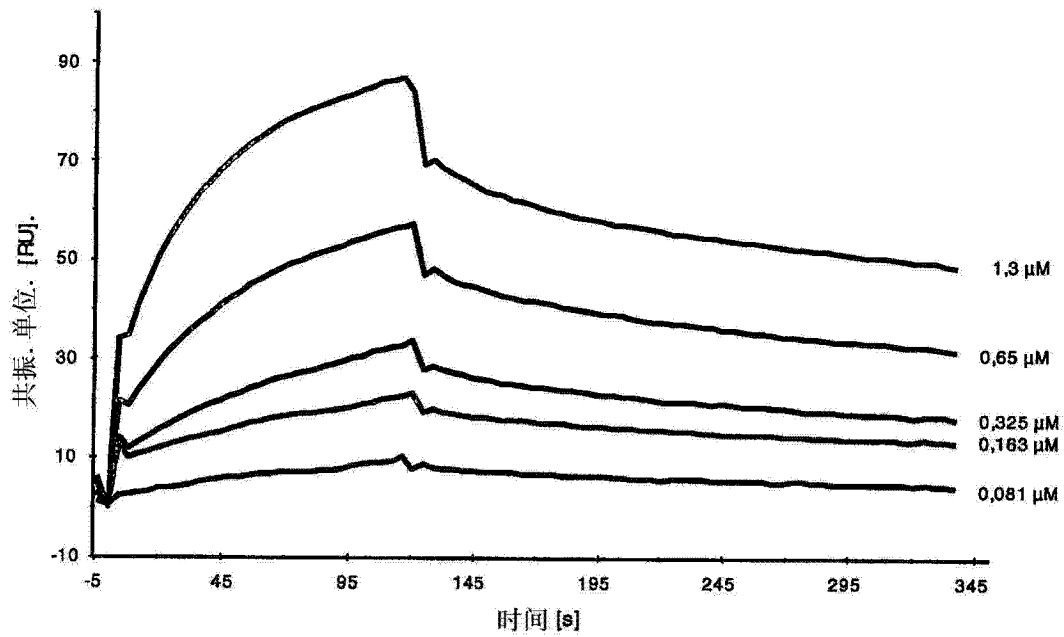


图 7

SPU-3-H13-0与氢化可的松、睾酮、雌二醇和BSA(载体蛋白)
的结合——用Ni-NTA/POD检测

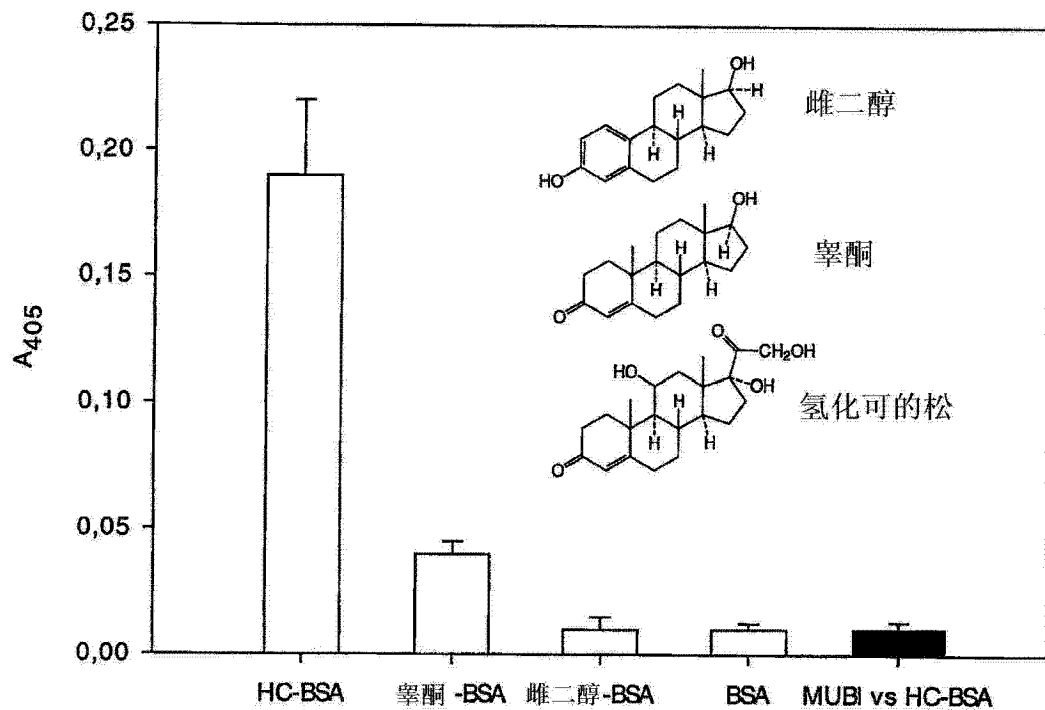


图 8

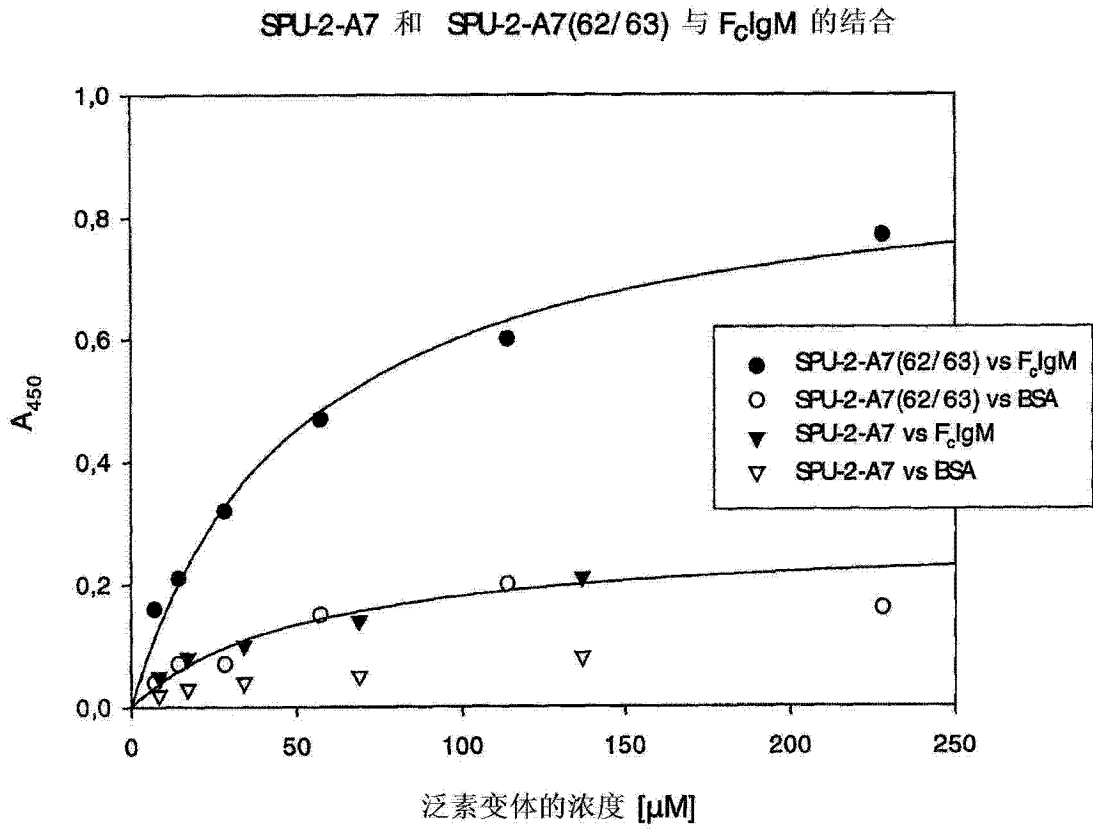


图 9

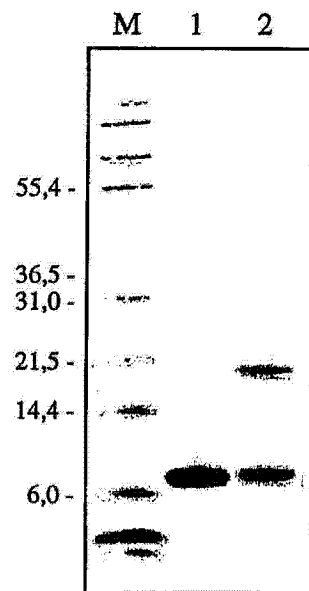


图 10

本发明涉及修饰的“泛素样蛋白”超家族的蛋白质、具有泛素样折叠的蛋白质及其片段或融合蛋白。作为所述修饰的结果，所述蛋白质对预定的结合伴侣具有之前并不存在的结合亲和力。本发明也涉及生产和使用所述蛋白质的方法。

选择	位置:	位置:	位置:	位置:	位置:	位置:	位置:	位置:	位置:
	2:	4:	6:	62:	63:	64:	65:	66:	
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	R ₂ IgM	Ser	Leu	Pro	Pro	Pro	Gly	Arg	Asn
SPU-3-H13	HC	Gly	Gly	Lys	Phe	Phe	Val	Thr	Asn
SPU-15-G7	TNFR	Tyr	Cys	Asn	Asn	Leu	Ser	Trp	Gln
SPU-15-E1	TNFR	Gln	Ala	Ile	Met	Phe	Gln	Thr	Ser
*SPU:									