



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110658314 A

(43)申请公布日 2020.01.07

(21)申请号 201910967979.2

G01N 30/06(2006.01)

(22)申请日 2019.10.12

(71)申请人 四川大学

地址 610000 四川省成都市一环路南一段
24号

(72)发明人 戴伦治 王秀轩 王新媛

(74)专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务
所(特殊普通合伙) 11463

代理人 覃蛟

(51) Int. Cl.

G01N 33/15(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

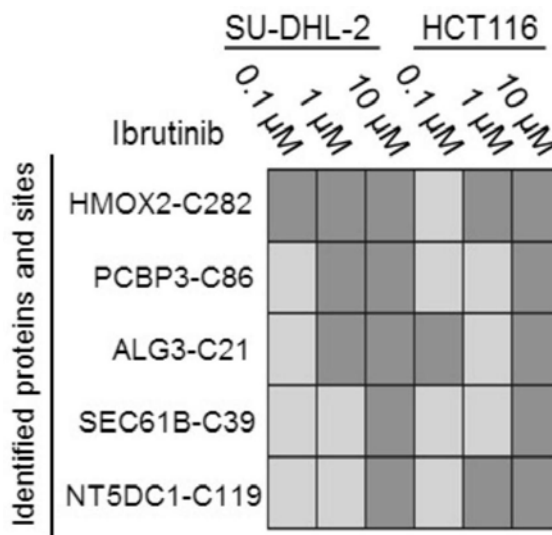
权利要求书3页 说明书10页 附图6页

(54)发明名称

化合物的靶点的鉴定方法、化合物与靶标相互作用的检测方法和化合物药效的评价方法

(57)摘要

本发明公开了化合物的靶点的鉴定方法、化合物与靶标相互作用的检测方法和化合物药效的评价方法,涉及药物靶点鉴定技术领域。具体而言,将经过目标化合物处理后细胞或者动物的蛋白或蛋白酶解产物与捕获剂孵育;所述捕获剂为可特异性识别并结合所述目标化合物和/或含有目标化合物的结合物的抗体。该鉴定方法采用捕获剂特异性地获取或富集蛋白或多肽溶液中的目标化合物和/或含有目标化合物的结合物,通过质谱分析,鉴定捕获剂捕获目标化合物的结合物是否是/或属于靶标蛋白、捕获的靶标蛋白是什么,以及捕获的靶标蛋白的数量和丰度,该鉴定方法无需对目标化合物结构进行修饰,直接有效特异性地富集并鉴定出目标化合物的靶标。



1. 一种化合物的靶点的鉴定方法,其特征在于,其包括:将经过目标化合物处理后的细胞或者动物的蛋白或所述蛋白的酶解产物,与捕获剂孵育;所述捕获剂为可特异性识别并结合所述目标化合物和/或含有目标化合物的结合物的抗体。

2. 根据权利要求1所述的化合物的靶点的鉴定方法,其特征在于,所述抗体包括:单克隆抗体、多克隆抗体和基因工程抗体中的至少一种;

优选地,所述基因工程抗体包括:嵌合抗体、小分子抗体、双特异性抗体、抗体偶联物和抗体融合蛋白。

3. 根据权利要求2所述的化合物的靶点的鉴定方法,其特征在于,所述多克隆抗体的制备包括:将含所述目标化合物结构的抗原免疫宿主动物,从经免疫后的所述宿主动物的血清或腹水中提取分离得到的所述多克隆抗体;

优选地,所述宿主动物包括老鼠、兔子、山羊、猴子和羊驼中的任意一种;

优选地,所述多克隆抗体的制备还包括:将所述血清或腹水进行纯化,以获得所述多克隆抗体;

优选地,纯化方式包括:超速离心法、盐析沉淀法、凝胶层析法、离子交换层析法和亲和层析法中的至少一种,优选为亲和层析法。

4. 根据权利要求3所述的化合物的靶点的鉴定方法,其特征在于,含所述目标化合物结构的抗原为:经多肽或多肽库修饰并和载体蛋白偶联的所述目标化合物;

优选地,所述多肽序列为:目标化合物已知结合位点周围5-20个氨基酸序列;

优选地,所述多肽库序列如式1所示:

式1: E-XXXXXX-C-XXXXXX-CONH₂; 其中, X选自除半胱氨酸和赖氨酸以外的18种天然氨基酸;

优选地,所述载体蛋白选自钥孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白、鸡卵白蛋白中的至少一种。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的化合物的靶点的鉴定方法,其特征在于,所述目标化合物是指具有与氨基酸共价结合特性的化合物;

优选地,所述目标化合物是指具有与所述氨基酸上的连接基团共价结合特性的化合物;

优选地,所述连接基团选自巯基、羟基、氨基和羧基中的至少一种;

优选地,所述氨基酸选自:半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸中的至少一种。

6. 根据权利要求5所述的化合物的靶点的鉴定方法,其特征在于,所述目标化合物包括以下至少一种小分子:

(1) 含有烯丙基类、炔丙基类、氰基类、乙烯砜基类、缩氨基硫脲类、酮类、醌类和/或环氧丙烷类基团的小分子,且能发生以下至少一种反应:与半胱氨酸巯基、丝氨酸侧链羟基、苏氨酸侧链羟基或酪氨酸侧链酚羟基发生加成反应,以及与赖氨酸侧链氨基发生取代反应;

(2) 含有卤代酮、硫氰酸、炔和/或氰基团的小分子,且能与巯基发生取代反应;

(3) 含有巯基的小分子,且能与半胱氨酸形成二硫键;

(4) 含有糖基或苷元的化合物,且能与丝氨酸侧链羟基、苏氨酸侧链羟基或酪氨酸侧链羟基形成糖苷键;

(5) 含有环氧丙烷结构的化合物,且能与半胱氨酸、赖氨酸、天冬氨酸或谷氨酸发生开环加成反应。

7. 根据权利要求4所述的化合物的靶点的鉴定方法,其特征在于,所述目标化合物为依鲁替尼;

优选地,所述捕获剂为特异性识别并结合所述依鲁替尼和/或含有依鲁替尼结构的蛋白和多肽的多克隆抗体;

优选地,所述多肽序列为:E-XXXXXX-C(ibrutinib)-XXXXXX-CONH₂;

优选地,X为除E和C以外的18种天然氨基酸)。

8. 根据权利要求1所述的化合物的靶点的鉴定方法,其特征在于,在孵育后,所述鉴定方法包括对所述捕获剂的捕获物进行检测;

优选地,所述捕获物的检测为采用串联质谱对所述捕获物进行鉴定。

9. 一种化合物与靶标相互作用的检测方法,其特征在于,将经过目标化合物处理后的细胞或者动物的蛋白或所述蛋白的酶解产物,与捕获剂孵育;所述捕获剂为可特异性识别并结合所述目标化合物和/或含有目标化合物的结合物的抗体;

优选地,所述抗体包括:单克隆抗体、多克隆抗体和基因工程抗体中的至少一种;

优选地,所述多克隆抗体的制备包括:将含所述目标化合物结构的抗原免疫宿主动物,从经免疫后的所述宿主动物的血清或腹水中提取分离得到的所述多克隆抗体;

优选地,含所述目标化合物结构的抗原为:经多肽或多肽库修饰并和载体蛋白偶联的所述目标化合物;

优选地,所述多肽序列为:目标化合物已知结合位点周围5-20个氨基酸序列;

优选地,所述多肽库序列如式1所示:

式1:E-XXXXXX-C-XXXXXX-CONH₂;其中,X选自除半胱氨酸和赖氨酸以外的18种天然氨基酸;

优选地,所述目标化合物是指具有与氨基酸共价结合特性的化合物;

优选地,所述目标化合物是指具有与所述氨基酸上的连接基团共价结合特性的化合物;

优选地,所述蛋白的来源选自以下至少一种:动物的组织或体液的蛋白,或其酶解产物;细胞的分泌蛋白或其酶解产物;以及细胞蛋白或其酶解产物;

优选地,在孵育后,所述检测方法包括酶联免疫吸附测定对捕获剂的捕获物进行检测。

10. 一种化合物药效的评价方法,其特征在于,其包括:将经过目标化合物处理后的动物或细胞的蛋白或蛋白的酶解产物溶液与捕获剂孵育,检测捕获剂和目标化合物的结合物的结合效率;

所述捕获剂为可特异性识别并结合所述目标化合物的结合物的抗体;

优选地,所述抗体包括:单克隆抗体、多克隆抗体和基因工程抗体中的至少一种;

优选地,所述多克隆抗体的制备包括:将含所述目标化合物结构的抗原免疫宿主动物,从经免疫后的所述宿主动物的血清或腹水中提取分离得到的所述多克隆抗体;

优选地,含所述目标化合物结构的抗原为:经多肽或多肽库修饰并和载体蛋白偶联的所述目标化合物;

优选地,所述多肽序列为:目标化合物已知结合位点周围5-20个氨基酸序列;

优选地,所述多肽库序列如式1所示:

式1: E-XXXXXX-C-XXXXXX-CONH₂; 其中, X选自除半胱氨酸和赖氨酸以外的18种天然氨基酸;

优选地,所述目标化合物是指具有与氨基酸共价结合特性的化合物;

优选地,所述目标化合物是指具有与所述氨基酸上的连接基团共价结合特性的化合物;

优选地,所述蛋白的来源选自以下至少一种:动物的组织或体液的蛋白,或其酶解产物;细胞的分泌蛋白或其酶解产物;以及细胞蛋白或其酶解产物;

优选地,在孵育后,所述评价方法包括酶联免疫吸附测定对捕获剂的捕获物进行检测;

优选地,通过酶联免疫吸附测定检测捕获剂和目标化合物的结合物的结合效率。

化合物的靶点的鉴定方法、化合物与靶标相互作用的检测方法和化合物药效的评价方法

技术领域

[0001] 本发明涉及药物靶点鉴定技术领域,具体而言,涉及化合物的靶点的鉴定方法、化合物与靶标相互作用的检测方法和化合物药效的评价方法。

背景技术

[0002] 大多数药物通过与器官、组织以及细胞上的靶点作用,影响和改变人体的功能,产生药理效应。由于药物结构类型的千差万别,因而呈现诸多作用靶点。

[0003] 药物的作用靶点不仅为揭示药物的作用提供了重要信息和入门途径,而且对新药的开发研制、建立筛选模型以及发现先导化合物也具有重要的作用。药物的作用靶点一旦被人们认识和掌握,就能获取新药研发的切入点。

[0004] 虽然药物的作用靶点已成为合理药物设计的重要依托,但是人体的构成和功能非常复杂,受到多种因素的调控,存在很多天然屏障和各种平衡,对某一特定功能,在某些情况下,会有同时几种靶点结合发挥作用,还要经历吸收、转动、分布和代谢等药动力学过程。

[0005] 因此,如何鉴定药物的靶点,面临着极大的挑战。

[0006] 鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供化合物的靶点的鉴定方法、化合物与靶标相互作用的检测方法和化合物药效的评价方法。该鉴定方法在对化合物靶点进行鉴定的过程中,不需要对小分子化合物进行修饰,可以真实有效地检测细胞和/或组织中目标化合物的靶点。

[0008] 本发明是这样实现的:

[0009] 第一方面,本发明实施例提供一种化合物的靶点的鉴定方法,其包括:

[0010] 将经过目标化合物处理后的细胞或者动物的蛋白或所述蛋白的酶解产物,与捕获剂孵育;所述捕获剂为可特异性识别并结合所述目标化合物和/或含有目标化合物的结合物的抗体。

[0011] 将蛋白或该蛋白酶解产物的溶液与捕获剂孵育,可特异性地获取或富集蛋白溶液中的目标化合物和/或含有目标化合物的结合物,通过质谱分析,鉴定蛋白溶液中的目标化合物是否具有结合的靶标蛋白以及其结合的靶标数量和类型。该鉴定方法基于抗原抗体的特异性反应,不需要对目标化合物结构进行修饰,能够直接有效地富集并鉴定出目标化合物的靶标。

[0012] 需要说明的是,上述经过目标化合物处理后的蛋白或蛋白酶解溶液是指:将目标化合物处理生物样本,从生物样本中提取得到的蛋白溶液,或经酶解后得到蛋白酶解溶液。此外,生物样本可以是非人动物体,也可以是细胞。如果生物样本是非人动物体,则采用注射或灌胃方式等方式将目标化合物施用于非人动物体,然后从非人动物体的需要鉴定组织(例如肠、胃、肺、心等)或体液(如血液、尿液、精液等)中提取蛋白溶液。如果是细胞,则直接

将目标化合物与细胞共同孵育,从该细胞中提取得到所述蛋白溶液,或经酶解后得到蛋白酶解溶液。上述自经过目标化合物处理后的蛋白溶液可以是指目标化合物直接与蛋白孵育后的蛋白溶液,或经酶解后得到蛋白酶解溶液。

[0013] 在可选的实施方式中,所述抗体包括:单克隆抗体、多克隆抗体和基因工程抗体中的至少一种。

[0014] 优选地,所述基因工程抗体包括:嵌合抗体、小分子抗体、双特异性抗体、抗体偶联物和抗体融合蛋白。

[0015] 在可选的实施方式中,所述多克隆抗体的制备包括:将含所述目标化合物结构的抗原免疫宿主动物,从经免疫后的所述宿主动物的血清或腹水中提取分离得到的所述多克隆抗体。

[0016] 优选地,所述宿主动物包括老鼠、兔子、山羊、猴子和羊驼中的任意一种;

[0017] 优选地,所述多克隆抗体的制备还包括:将所述血清或腹水进行纯化,以获得所述多克隆抗体;

[0018] 优选地,纯化方式包括:超速离心法、盐析沉淀法、凝胶层析法、离子交换层析法和亲和层析法中的至少一种,优选为亲和层析法。

[0019] 在可选的实施方式中,上述含所述目标化合物结构的抗原为:经多肽或多肽库修饰并和载体蛋白偶联的所述目标化合物。

[0020] 优选地,所述多肽序列为:目标化合物已知结合位点周围5-20个氨基酸序列。

[0021] 优选地,所述多肽库序列如式1所示:

[0022] 式1: E-XXXXXX-C-XXXXXX-CONH₂;其中,X选自除半胱氨酸和赖氨酸以外的18种天然氨基酸。

[0023] 优选地,所述载体蛋白选自钥孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白、鸡卵白蛋白中的至少一种。

[0024] 在可选的实施方式中,所述目标化合物是指具有与氨基酸共价结合特性的化合物;

[0025] 优选地,所述目标化合物是指具有与所述氨基酸上的连接基团共价结合特性的化合物;

[0026] 优选地,所述连接基团选自巯基、羟基、氨基和羧基中的至少一种;

[0027] 优选地,所述氨基酸选自:半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸中的至少一种。

[0028] 在可选的实施方式中,所述目标化合物包括以下至少一种小分子:

[0029] (1) 含有烯丙基类、炔丙基类、氰基类、乙烯砜基类、缩氨基硫脲类、酮类、醌类和/或环氧丙烷类基团的小分子,且能发生以下至少一种反应:与半胱氨酸巯基、丝氨酸侧链羟基、苏氨酸侧链羟基或酪氨酸侧链羟基发生加成反应,以及与赖氨酸侧链氨基发生取代反应;

[0030] (2) 含有卤代酮、硫氰酸、炔和/或氰基团的小分子,且能与巯基发生取代反应;

[0031] (3) 含有巯基的小分子,且能与半胱氨酸形成二硫键;

[0032] (4) 含有糖基或苷元的化合物,且能与丝氨酸侧链羟基、苏氨酸侧链羟基或酪氨酸侧链羟基形成糖苷键;

- [0033] (5) 含有环氧丙烷结构的化合物,且能与天冬氨酸或谷氨酸发生开环加成反应。
- [0034] 在可选的实施方式中,所述目标化合物为依鲁替尼;
- [0035] 优选地,所述捕获剂为特异性识别并结合所述依鲁替尼和/或含有依鲁替尼结构的蛋白和多肽的多克隆抗体。
- [0036] 优选地,所述多肽序列为:E-XXXXXX-C(ibrutinib)-XXXXXX-CONH₂(X选自除半胱氨酸和赖氨酸以外的18种天然氨基酸)。
- [0037] 在可选实施方式中,在所述蛋白或者蛋白酶解溶液与捕获剂孵育后,所述鉴定方法包括对所述捕获剂的捕获物进行检测;
- [0038] 优选地,所述捕获物的检测包括:包括蛋白水平的检测或多肽水平的检测;
- [0039] 优选地,所述捕获物的检测为采用串联质谱对所述捕获物进行鉴定。
- [0040] 第二方面,本发明实施例提供一种化合物与靶标相互作用的检测方法,将经过目标化合物处理后的细胞或者动物的蛋白或所述蛋白的酶解产物,与捕获剂孵育;所述捕获剂为可特异性识别并结合所述目标化合物和/或含有目标化合物的结合物的抗体。该检测方法能够在无需修饰化合物结构的情况下,对目标化合物和其特定靶标蛋白之间的作用进行直接有效的鉴定。
- [0041] 优选地,所述抗体包括:单克隆抗体、多克隆抗体和基因工程抗体中的至少一种;
- [0042] 优选地,所述多克隆抗体的制备包括:将含所述目标化合物结构的抗原免疫宿主动物,从经免疫后的所述宿主动物的血清或腹水中提取分离得到的所述多克隆抗体;
- [0043] 优选地,含所述目标化合物结构的抗原为:经多肽或多肽库修饰并和载体蛋白偶联的所述目标化合物;
- [0044] 优选地,所述多肽序列为:目标化合物已知结合位点周围5-20个氨基酸序列。以获得所述多克隆抗体,特异性识别目标化合物对某一特定蛋白修饰位点。
- [0045] 优选地,所述多肽库序列如式1所示:
- [0046] 式1:E-XXXXXX-C-XXXXXX-CONH₂;其中,X选自除半胱氨酸和赖氨酸以外的18种天然氨基酸;
- [0047] 优选地,所述目标化合物是指具有与氨基酸共价结合特性的化合物;
- [0048] 优选地,所述目标化合物是指具有与所述氨基酸上的连接基团共价结合特性的化合物;
- [0049] 优选地,所述蛋白的来源选自以下至少一种:动物的组织或体液的蛋白,或其酶解产物;细胞的分泌蛋白或其酶解产物;以及细胞蛋白或其酶解产物;
- [0050] 优选地,在孵育后,所述检测方法包括酶联免疫吸附测定对捕获剂的捕获物进行检测。
- [0051] 第三方面,本发明实施例提供一种化合物药效的评价方法,其包括:将经过目标化合物处理后的动物或细胞的蛋白或蛋白的酶解产物溶液与捕获剂孵育,检测捕获剂和目标化合物的结合物的结合效率;
- [0052] 所述捕获剂为可特异性识别并结合所述目标化合物的结合物的抗体。
- [0053] 该评价方法能直接确定目标化合物与特定物种中靶标的结合强弱,直观公正地评价化合物的药效,为研究化合物药物的作用机制提供新的方向。
- [0054] 优选地,所述抗体包括:单克隆抗体、多克隆抗体和基因工程抗体中的至少一种。

[0055] 优选地,所述多克隆抗体的制备包括:将含所述目标化合物结构的抗原免疫宿主动物,从经免疫后的所述宿主动物的血清或腹水中提取分离得到的所述多克隆抗体。

[0056] 优选地,含所述目标化合物结构的抗原为:经多肽或多肽库修饰并和载体蛋白偶联的所述目标化合物。

[0057] 优选地,所述多肽序列为:目标化合物已知结合位点周围5-20个氨基酸序列。以获得所述多克隆抗体,特异性识别目标化合物对某一特定蛋白修饰位点。

[0058] 优选地,所述多肽库序列如式1所示:

[0059] 式1: E-XXXXXX-C-XXXXXX-CONH₂;其中,X选自除半胱氨酸和赖氨酸以外的18种天然氨基酸。

[0060] 优选地,所述目标化合物是指具有与氨基酸共价结合特性的化合物。

[0061] 优选地,所述目标化合物是指具有与所述氨基酸上的连接基团共价结合特性的化合物。

[0062] 优选地,所述蛋白的来源选自以下至少一种:动物的组织或体液的蛋白,或其酶解产物;细胞的分泌蛋白或其酶解产物;以及细胞蛋白或其酶解产物。

[0063] 优选地,在孵育后,所述评价方法包括酶联免疫吸附测定对捕获剂的捕获物进行检测。

[0064] 优选地,通过酶联免疫吸附测定检测捕获剂和目标化合物的结合物的结合效率。

[0065] 需要说明的是,本申请提供的检测方法和评价方法中目标化合物、抗体的制备等具体信息和效果均同上述鉴定方法中记载的,在此不再赘述。

[0066] 本发明具有以下有益效果:

[0067] 本发明实施例提供一种化合物的靶点的鉴定方法,将经过目标化合物处理后的细胞或者动物的蛋白或所述蛋白酶解产物与捕获剂孵育;所述捕获剂为可特异性识别并结合所述目标化合物和/或含有目标化合物的结合物的抗体。该鉴定方法采用捕获剂特异性地获取或富集蛋白或蛋白酶解产物溶液中的目标化合物和/或含有目标化合物的结合物,通过质谱分析,鉴定蛋白或蛋白酶解产物溶液中的目标化合物是否具有结合的靶标以及其结合的靶标数量和类型,该鉴定方法无需要对目标化合物结构进行修饰,能直接特异性地富集靶标并鉴定出目标化合物的靶标和/或靶点。

[0068] 此外,本发明实施例还提供了化合物与靶标相互作用的检测方法和化合物药效的评价方法,该检测方法能够有效快速的鉴定化合物与特定靶标之间的相互作用,该评价方法能够直观公正地评价化合物的药效,为研究化合物药物的作用机制提供新的方向。

附图说明

[0069] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

[0070] 图1为试验例1中抗体的结合目标化合物的结合物的特异性评价结果;

[0071] 图2为试验例1中SU-DHL-2细胞中结合蛋白与药物浓度的关系;

[0072] 图3为试验例1中结合蛋白的质谱MS2图谱;

- [0073] 图4为试验例2中HCT116浓度梯度依鲁替尼处理细胞后依鲁替尼结合蛋白Western blot检测结果；
- [0074] 图5为试验例2中依鲁替尼浓度梯度细胞内的免疫荧光检测的结果；
- [0075] 图6为试验例2中不同依鲁替尼浓度处理HCT116细胞的依鲁替尼结合蛋白的质谱检测结果；
- [0076] 图7为试验例2中不同依鲁替尼浓度处理SU-DHL-2和HCT116细胞内的依鲁替尼结合蛋白结果对比；
- [0077] 图8为试验例2中HCT116细胞内的依鲁替尼结合蛋白的蛋白质-蛋白质相互作用的分析结果；
- [0078] 图9为试验例3中依鲁替尼已知靶点蛋白BTK的Western blot检测结果；
- [0079] 图10为试验例4中不同小鼠组织中依鲁替尼结合蛋白；
- [0080] 图11为试验例4中TAP1蛋白中依鲁替尼结合位点的保守性分析；
- [0081] 图12为试验例4中依鲁替尼与DSTN结合的三维结构模拟图；
- [0082] 图13为试验例4中依鲁替尼与周围氨基酸相互作用的三维结构模拟图。

具体实施方式

[0083] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0084] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0085] 实施例1

[0086] 本实施例提供一种化合物的靶点的鉴定方法，其包括以下步骤：

[0087] 1) 抗原的制备：

[0088] 将所述目标化合物与多肽库 (EXXXXXXCXXXXXX-CONH₂) Cys残基偶联，得到目标化合物修饰的多肽库(半抗原)，将目标化合物修饰的多肽库的多肽N端与载体蛋白的赖氨酸偶联得到含所述目标化合物结构的抗原，载体蛋白为BSA或KLH。

[0089] 2) 抗体的制备：

[0090] 将步骤实施例1的步骤1)中制备的抗原免疫兔子，从经免疫后的所述宿主动物的血清或腹水中提取分离、纯化得到的所述多克隆抗体；

[0091] 3) 目标化合物处理细胞(或动物)：

[0092] 将溶解有目标化合物的溶液与细胞混合，然后裂解收集的细胞内的蛋白溶液，测定细胞液中蛋白浓度。

[0093] 4) 检测细胞中目标化合物的结合蛋白(靶标)：

[0094] 纯化上述步骤3)得到的蛋白溶液样品，纯化蛋白溶液样品，进行LC-MS/MS分析。

[0095] 质谱数据进一步利用MaxQuant和Mascot等软件处理分析。

[0096] 实施例2

[0097] 与实施例1大致相同，区别在于，在1)抗原的制备的步骤中：实施例2将目标化合物直接与载体蛋白进行偶联，省略了多肽的修饰步骤。

[0098] 实施例3

[0099] 与实施例1大致相同,区别在于,在1)抗原的制备的步骤中:目标化合物修饰的多肽为目标化合物已知结合位点周围5-20个氨基酸序列,以获得所述多克隆抗体,特异性识别目标化合物对某一特定蛋白修饰位点。

[0100] 试验例1

[0101] 采用实施例1提供的鉴定方法鉴定SU-DHL-2细胞系中依鲁替尼的结合蛋白,具体包括以下步骤。

[0102] 1) 制备抗原(依鲁替尼):

[0103] 合成特异性多肽库(XXXXXXXXXXXXXXXX-CONH₂,X选自除半胱氨酸和赖氨酸以外的18种天然氨基酸),用DMF溶解依鲁替尼,在pH=9的硼酸-硼砂缓冲液中下与特异性多肽库室温反应24h。反应结束后,浓缩除去溶剂,多肽库用PBS复溶,离心除去不溶物,与载体蛋白KLH偶联,超滤,测浓度后,分装保存抗原待用。

[0104] 2) 免疫宿主动物:

[0105] 饲养体重约为1.5kg的雌性新西兰大白兔,皮下注射制备的抗原,首次免疫1mg/只,后续免疫0.5mg/只,共免疫4次后,动脉取血。

[0106] 3) 抗体纯化:

[0107] 将兔子全血4℃静置过夜,4000rpm,4℃离心15min,取上清(血清)。取7mL血清与1×PBS溶液(配方:氯化钠8.0g/L、氯化钾0.2g/L、七水合磷酸氢二钠2.72g/L、磷酸二氢钾0.245g/L)1:1混合,加入Protein A固相化珠子,室温反应2h。用低盐、高盐、PBS交替洗涤,去除杂蛋白。用100mM glycine (PH=2.8)洗脱,得到总IgG,用pH=8.8的1M Tris调节pH到中性,用PBS超滤洗涤,待用。

[0108] 合成化合物Cys-依鲁替尼,将Cys-依鲁替尼与NHS活化珠子反应,制备亲和小柱。将得到的总IgG加入小柱中,过夜孵育。用低盐、高盐、1×PBS交替洗涤,去除杂蛋白。用100mM glycine (PH=2.8)洗脱,得到特异性结合并识别依鲁替尼的抗体,用PBS超滤,加入叠氮钠保存于-20℃冰箱。

[0109] 4) 抗体特异性检测:

[0110] 取4mg BSA,双蒸水溶解后,加入100mM TEAB溶液中溶解,加入TCEP,终浓度为20mM,56℃,还原1h。一分为二,一部分-20℃保存,待用(对照)。一部分加入2mg样品(依鲁替尼),室温反应16h,浓缩除去溶剂。

[0111] 分别采用1×loading缓冲液(配方:10%甘油,2%SDS,1%β-巯基乙醇,5%1M Tris-HCL,PH=6.8)溶解样品,终浓度为0.5mg/mL,采用Western blot(蛋白印迹试验)对抗体(Anti-C-依鲁替尼)进行检测,结果请参照附图1,由附图1可知,制备的抗体能特异性地识别依鲁替尼修饰的牛血清白蛋白,而不是未修饰的牛血清白蛋白。

[0112] 5) 依鲁替尼处理SU-DHL-2细胞系:

[0113] 用DMSO溶解依鲁替尼,配制10mM母液,分别用0nM,0.5nM,0.1μM,1μM和10μM处理SU-DHL-2细胞6h。收取处理后的SU-DHL-2细胞,用1×PBS洗两遍,离心,去上清。

[0114] 在细胞液中加入1mL RIPA裂解液(配方:NP-40 1%、脱氧胆酸钠0.5%、氯化钠150mM、Tris (pH=7.5) 50mM、尼克酰胺25mM、丁酸钠10mM;1×蛋白酶抑制剂(cocktail)、1×磷酸酶抑制剂A液、1×磷酸酶抑制剂B液),冰水中超声裂解,2000g低温离心30min,取上清,

并用Bradford法测量蛋白浓度,用裂解液稀释到蛋白浓度为2mg/mL。

[0115] 6) 检测SU-DHL-2中依鲁替尼的结合蛋白:

[0116] 将每个浓度取1mg蛋白样品,分别加入4倍体积的甲醇,1倍体积氯仿和3倍体积的水,并涡旋离心(10000g,10min)。离心后液体分为三层,依次为水相层,蛋白层,氯仿层。轻轻去除上层甲醇和水混合相,并向6组样品中分别加入4倍体积的甲醇,涡旋离心(20000g,10min),轻轻去除上清,室温挥干蛋白样品。

[0117] 分别用400 μ L 50mM的碳酸氢铵溶解蛋白样品,并分别加入60 μ g胰酶,37 $^{\circ}$ C酶解过夜。

[0118] 分别加入100mM DTT,使终浓度为5mM,56 $^{\circ}$ C还原1h。待样品冷却至室温,向上述样品中分别加入500mM碘乙酰胺溶液(现制现用),使终浓度为15mM,室温避光振摇30min。加入1M cysteine,使终浓度为20mM,室温反应1h。二次酶解,每管补加30 μ g胰酶,37 $^{\circ}$ C酶解4h。95 $^{\circ}$ C煮2min,灭活。将二次酶解后得到的多肽20000g,4 $^{\circ}$ C,离心10min,取上清,加入10 \times PBS,使终浓度为1 \times PBS。4 $^{\circ}$ C,旋转摇床孵育4h。将多肽取出,4 $^{\circ}$ C,20000g,离心10min,取多肽上清。

[0119] 将40 μ L Protein A磁珠,用1ml PBS洗4次之后,加入50 μ L依鲁替尼特异性抗体4 $^{\circ}$ C孵育4h,protein A磁珠与抗体结合。与抗体结合的Protein A磁珠用1ml PBS洗4次,加入多肽上清,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。依次用NETN洗2次、ETN洗1次、水洗1次洗去非特异性结合蛋白。用0.1%TFA洗脱结合蛋白,浓缩干,分别进行Zip-tip C18柱除盐,然后进行LC-MS/MS分析。质谱数据进一步利用MaxQuant和Mascot等软件处理分析。

[0120] 通过数据处理分析,该方法共鉴定出8个结合蛋白,其中,0.1 μ M有1个,1 μ M有3个,10 μ M有8个,结合位点数(靶点)与药物浓度呈正相关,具体结果如附图2所示,质谱检测结果请参照附图3。结果显示,靶标HMOX2、PCBP3和ALG3可以被细胞内相对较低浓度的依鲁替尼结合,表明这些蛋白质可能是SU-DHL-2细胞内较为可靠的依鲁替尼的靶点。

[0121] 试验例2

[0122] 采用实施例1提供的鉴定方法鉴定HCT116中依鲁替尼结合蛋白(靶标),试验例2的鉴定方法大致与试验例1相同,区别在于将SU-DHL-2细胞系替换为HCT116细胞系。

[0123] 在试验例2的步骤4)中,用增加的依鲁替尼浓度(0nM,0.5nM,0.1 μ M,1 μ M和10 μ M)处理的HCT116细胞,然后对细胞的蛋白溶液进行Western blot分析和细胞内的免疫荧光分析,Western blot结果请参照附图4,结果显示免疫信号上调。细胞内的免疫荧光分析的结果请参照附图5,结果表明抗依鲁替尼的抗体具有良好的特异性。

[0124] 在试验例2的步骤6)中,确定了84个依鲁替尼的靶标,请参照附图6。其中,靶标CKAP4在不同浓度的依鲁替尼处理的细胞中均被检测到,表明CKAP4与依鲁替尼之间有较强的相互作用。CKAP4是一种调节dickkopf1(DKK1)信号转导的DKK1受体,在肿瘤细胞增殖中发挥重要作用。

[0125] 结合试验例1,本申请提供的鉴定方法从SU-DHL-2和HCT116细胞系中均发现了靶标:HMOX2、PCBP3、ALG3、SEC61B(转运蛋白)和NT5DC1,请参照附图7。

[0126] 发明人进一步对在HCT116细胞系中鉴定的84种依鲁替尼的结合蛋白进行蛋白质-蛋白质相互作用分析,请参照附图8。通过网站<https://string-db.org>进行分析,依鲁替尼在SU-DHL-2细胞中的靶标为HMOX2、PCBP3、ALG3、和NT5DC1等蛋白质,且与这些靶标相互作

用的其它蛋白很少很少,说明这些靶标在SU-DHL-2中是依鲁替尼的直接靶点。

[0127] 试验例3

[0128] 采用实施例1提供的鉴定方法鉴定HCT116中依鲁替尼结合蛋白(靶标),鉴定方法大致与试验例1相同,区别在于将依鲁替尼处理SU-DHL-2细胞系替换为依鲁替尼处理BTK野生型细胞以及BTK^{C418S}突变细胞。而BTK是依鲁替尼的已知靶点。

[0129] Western blot检测结果请参照附图9,结果显示,抗依鲁替尼抗体只在依鲁替尼处理的BTK野生型细胞中检测到,而在BTK^{C481S}突变细胞中检测不到,该依鲁替尼特异性抗体具有特异性和可靠性,即本申请实施例提供的捕获剂具有准确性。

[0130] 试验例4

[0131] 动物模型中依鲁替尼结合蛋白(靶点)的鉴定。

[0132] 1) 制备抗原(同试验例1);

[0133] 2) 免疫宿主动物(同试验例1);

[0134] 3) 抗体纯化(同试验例1);

[0135] 4) 抗体特异性检测(同试验例1);

[0136] 5) 饲养小鼠:将小鼠分成等数量两组,一组进行依鲁替尼灌胃(60mg/kg),另一组进行等体积的生理盐水灌胃,6h后,然后收集心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、脑、结肠共九个组织,生理盐水洗净血后,液氮速冻,-80℃保存待用;

[0137] 6) 小鼠各组织蛋白提取;

[0138] 每个小鼠的九个组织样品取100mg,加入1mL RIPA裂解液,利用组织匀浆仪破碎组织,超声裂解,高速低温离心,取上清,并用Bradford法测量蛋白浓度,用裂解液稀释到蛋白浓度为2mg/mL。

[0139] 7) 检测各组织中依鲁替尼的靶标(结合蛋白)

[0140] 将每个组织取3mg蛋白样品,分别加入4倍体积的甲醇,1倍体积氯仿和3倍体积的水,并斡旋离心(10000g,10min)。离心后液体分为三层,依次为水相层,蛋白层,氯仿层。轻轻去除上层甲醇和水混合相,并向6组样品中分别加入4倍体积的甲醇,斡旋离心(20000g,10min),轻轻去除上清,室温挥干蛋白样品。

[0141] 分别用400μL 50mM的碳酸氢铵溶解蛋白样品,并分别加入60μg胰酶,37℃酶解过夜。

[0142] 分别加入100mM DTT,使终浓度为5mM,56℃还原1h。待样品冷却至室温,向上述样品中分别加入500mM碘乙酰胺溶液(现制现用),使终浓度为15mM,室温避光振摇30min。加入1M cysteine,使终浓度为20mM,室温反应1h。

[0143] 二次酶解,每管补加30μg胰酶,37℃酶解4h。95℃煮2min,灭活,得到多肽,将多肽20000g,4℃,离心10min,取上清,加入10×PBS,使终浓度为1×PBS。4℃,旋转摇床孵育4h。将多肽取出,4℃,20000g,离心10min,取多肽上清。

[0144] Protein A磁珠和依鲁替尼特异性抗体4℃孵育4h,protein A磁珠与抗体结合,然后加入多肽上清,4℃孵育过夜。依次用NETN、ETN、水洗去非特异性结合蛋白。用0.1%TFA洗脱结合蛋白,浓缩干,分别进行Zip-tip C18柱除盐,进行LC-MS/MS分析。

[0145] 质谱数据进一步利用MaxQuant和Mascot等软件处理分析。

[0146] 通过数据处理分析,该方法在心、肺、肾和脑组织中,未检测到结合蛋白,在胃、小

肠、结肠、肝和脾均检测到结合蛋白,共鉴定出9个结合蛋白,结果如附图10所示。

[0147] 由上述结果可知,在小鼠肺、肾和脑中均未检测到依鲁替尼的结合位点(靶点),在质谱鉴定的所有依鲁替尼的结合蛋白中,人细胞和小鼠模型均发现了靶标Ses61b和destin (DSTN)。DSTN是一种肌动蛋白结合蛋白,DSTN表达缺失是许多癌症的生物标志物,因此推测依鲁替尼在许多器官引起的副作用可能是由于DSTN的抑制作用。

[0148] 对依鲁替尼与靶标相互作用进行检测:

[0149] Destrin的三维结构(PDB ID:1AK7)从RCSB蛋白质数据库(www.rcsb.org)下载。ibrutinib的3D结构由Discovery Studio v3.1软件生成。将这两个结构,按照Glide Covalent Docking协议,在薛定谔套件2018软件中进行共价对接计算。对接结果图像由PyMoL v1.8软件处理(附图12和附图13),三维结构显示依鲁替尼与DSTN的表面结合较好,请参照附图12。根据计算机模拟,请参照附图13,ARG13与依鲁替尼之间可能存在 π -阳离子相互作用,Asp17与依鲁替尼之间可能存在氢键。

[0150] 在胃、小肠、结肠、肝和脾均检测到Tap1,在胃中检测到Ses61b与在SU-DHL-2细胞系中一致,质谱检测结果如附图11所示。

[0151] 抗原肽转运体1(TAP1)是ATP结合盒(ABC)转运体家族的成员。在小鼠大肠、小肠、胃、肝、脾等5个脏器的Cys150上发现了依鲁替尼与TAP1的结合,表明依鲁替尼与TAP1之间存在较强的相互作用。在uniprot中下载TAP1各种属的序列fasta文件,通过MEGA软件进行序列比对分析,发现Cys150不是人和小鼠之间的保守位点。同样没有观察到在人类细胞中没有发现靶标TAP1,这与进化分析结果一致。长期以来,动物模型在阐明药物作用模型方面发挥了重要作用。物种间观察到的靶点分布部分解释了为什么某些候选药物在小鼠中非常有效,但在人类中却不是。

[0152] 依鲁替尼为FDA批准的治疗套细胞淋巴瘤淋巴瘤的靶向药,能够与BTK活性中心的半胱氨酸残基共价结合,从而抑制其活性,抑制恶性B细胞的增殖、生存。

[0153] 在实施例1中,首先选用人B淋巴细胞系,鉴定SU-DHL-2细胞系中依鲁替尼的结合蛋白,该方法共鉴定出8个结合蛋白,其中,0.1白,有1个,1 1有3个,10白有8个,结合位点数(靶点)与药物浓度呈正相关,具体结果如附图2所示,质谱检测结果请参照附图3。

[0154] 结果显示,靶标HMOX2、PCBP3和ALG3可以被细胞内相对较低浓度的依鲁替尼结合,表明这些蛋白质可能是SU-DHL-2细胞内较为可靠的依鲁替尼的靶点。为了进一步确定依鲁替尼的结合蛋白,我们选取了一种与人B淋巴细胞系不相关的细胞系HCT116细胞系,实施例2中,在HCT116细胞系中鉴定的84种依鲁替尼的结合蛋白,从SU-DHL-2和HCT116细胞系中均发现了靶标:HMOX2、PCBP3、ALG3、SEC61B(转运蛋白)和NT5DC1,且相互作用靶标较少,说明这些靶标在SU-DHL-2中是依鲁替尼的直接靶点。

[0155] 实施例3鉴定方法大致与试验例1相同,区别在于将依鲁替尼处理SU-DHL-2细胞系替换为依鲁替尼处理BTK野生型细胞以及BTKC418S突变细胞。而BTK是依鲁替尼的已知靶点。结果显示,抗依鲁替尼抗体只在依鲁替尼处理的BTK野生型细胞中检测到,而在BTK^{C418S}突变细胞中检测不到,该依鲁替尼特异性抗体具有特异性和可靠性,即本申请实施例提供的捕获剂具有准确性。

[0156] 综上,本发明实施例提供一种化合物的靶点的鉴定方法,

[0157] 本发明实施例提供一种化合物的靶点的鉴定方法,将经过目标化合物处理后的细

胞或者动物的蛋白或所述蛋白酶解产物与捕获剂孵育；所述捕获剂为可特异性识别并结合所述目标化合物和/或含有目标化合物的结合物的抗体。该鉴定方法采用捕获剂特异性地获取或富集蛋白或蛋白酶解产物溶液中的目标化合物和/或含有目标化合物的结合物，通过质谱分析，鉴定蛋白或蛋白酶解产物溶液中的目标化合物是否具有结合的靶标以及其结合的靶标数量和类型，该鉴定方法无需要对目标化合物结构进行修饰，能直接特异性地富集靶标并鉴定出目标化合物的靶标和/或靶点。

[0158] 此外，本发明实施例还提供了化合物与靶标相互作用的检测方法和化合物药效的评价方法，该检测方法能够有效快速的鉴定化合物与特定靶标之间的相互作用，该评价方法能够直观公正地评价化合物的药效，为研究化合物药物的作用机制提供新的方向。

[0159] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

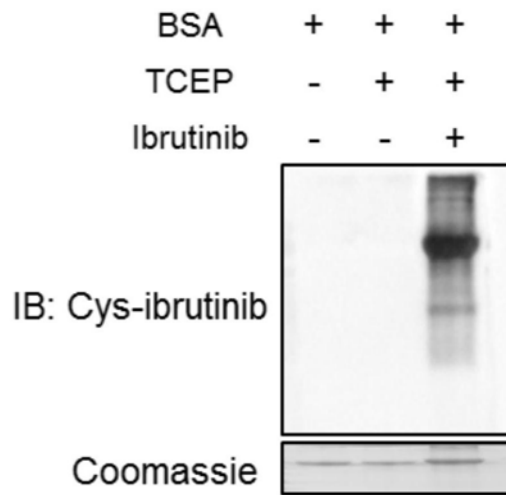


图1

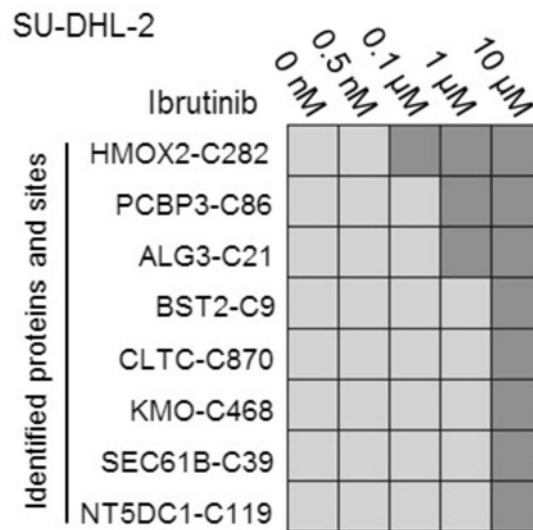


图2

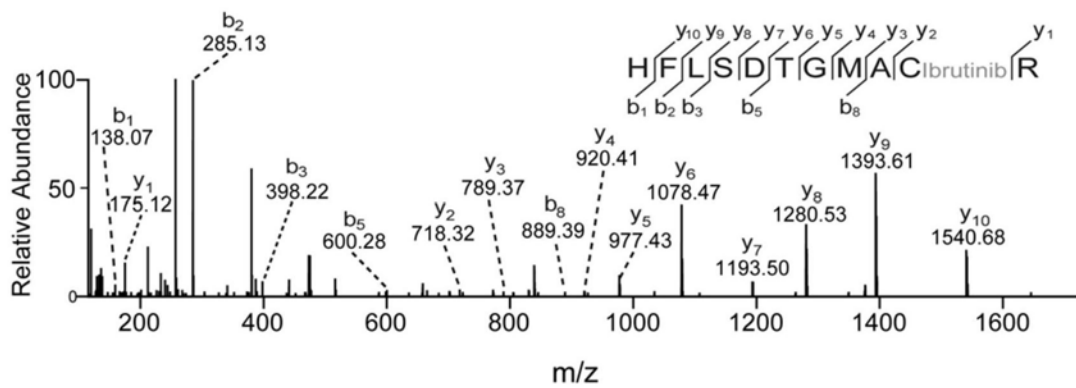


图3

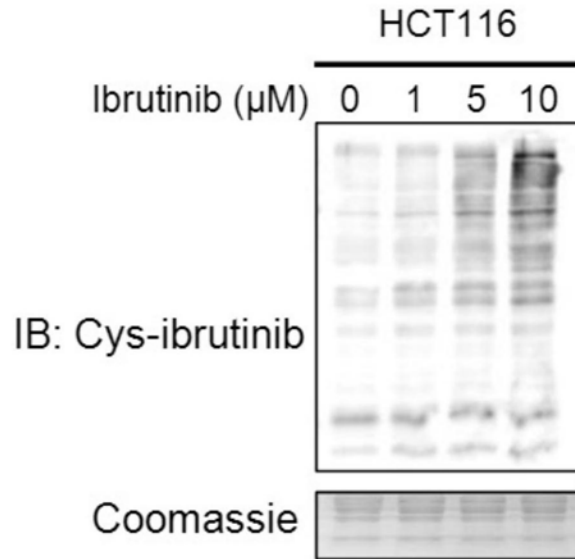


图4

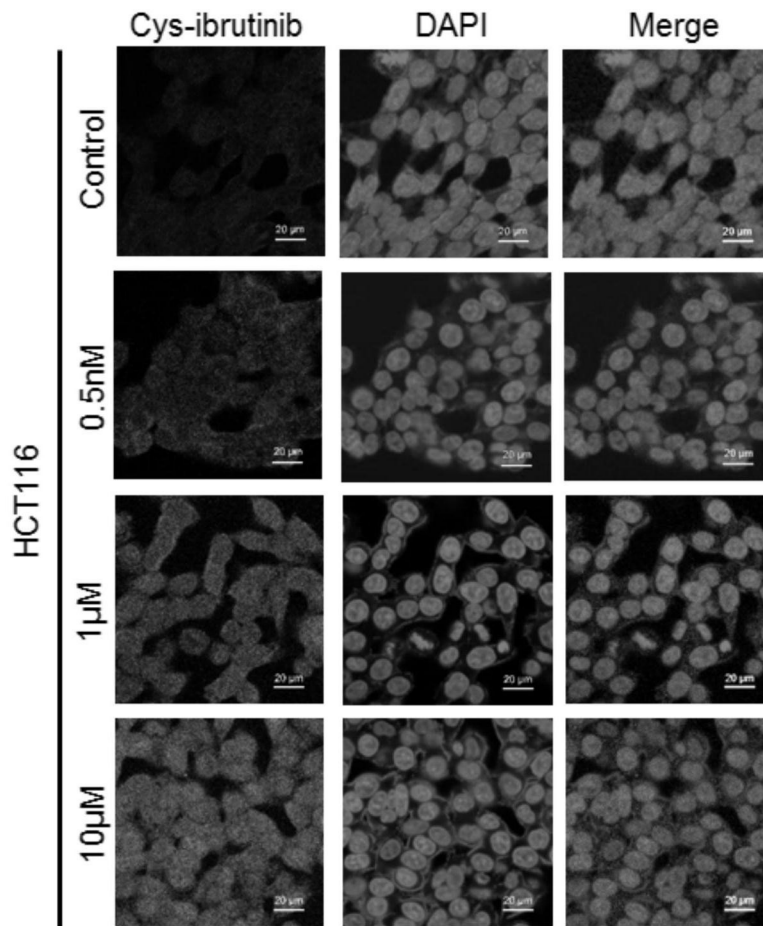


图5

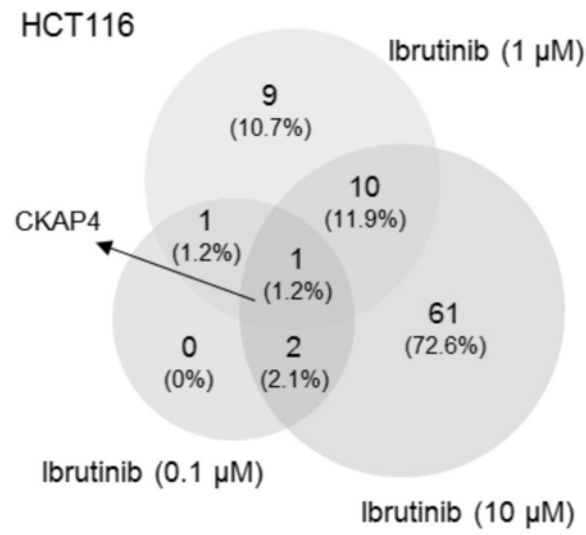


图6

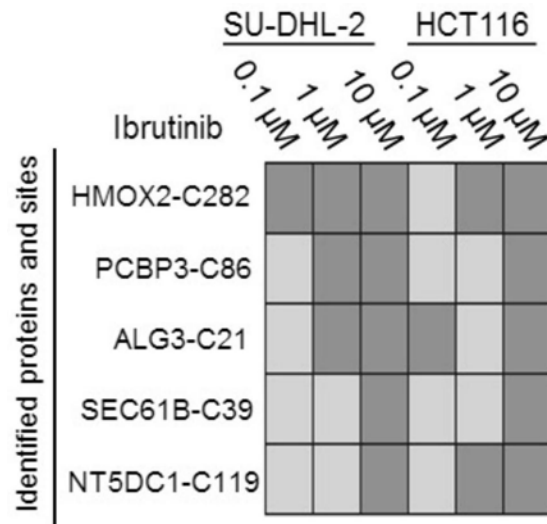


图7

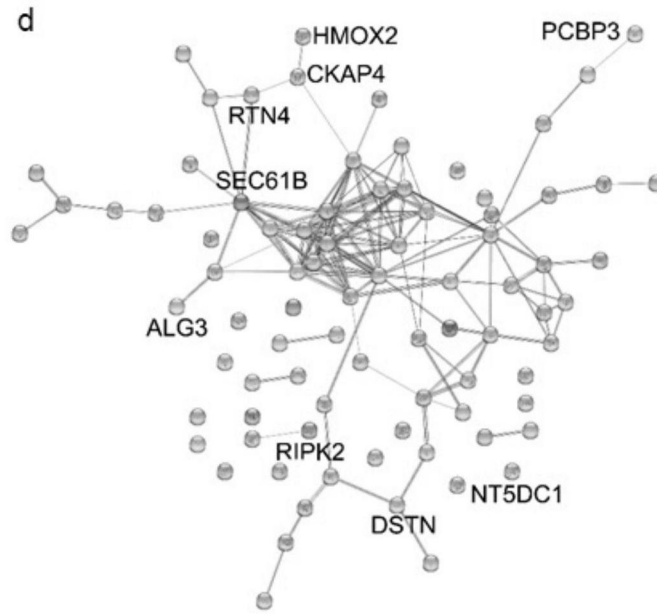


图8

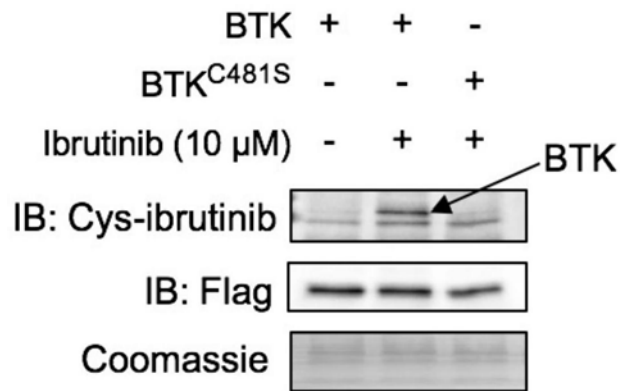


图9

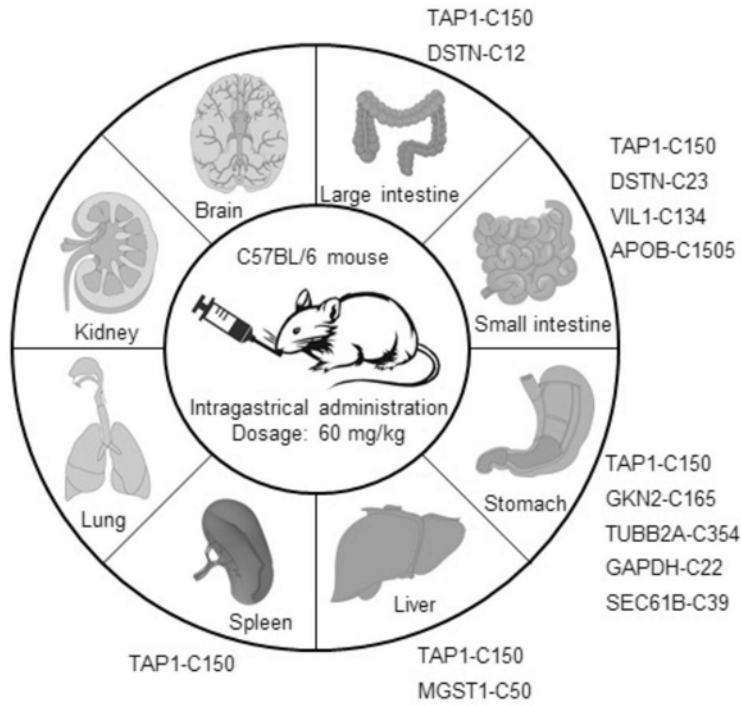


图10

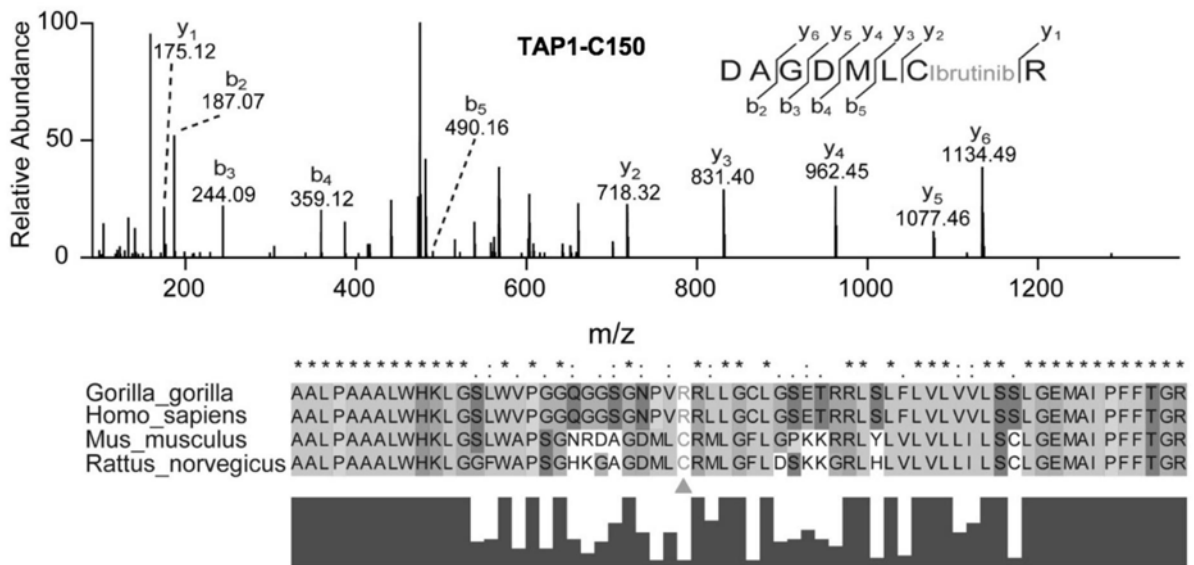


图11

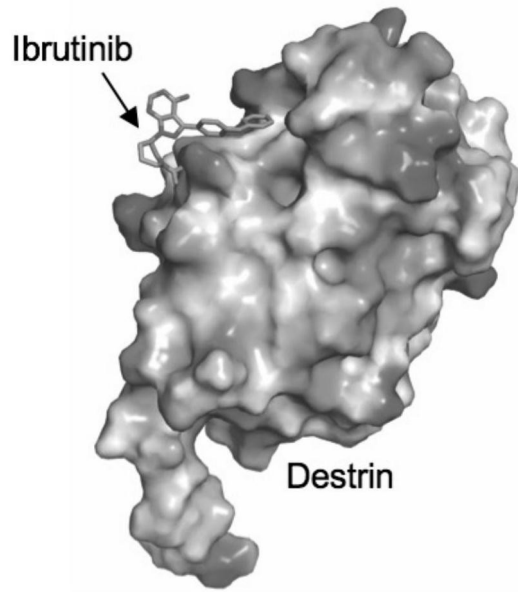


图12

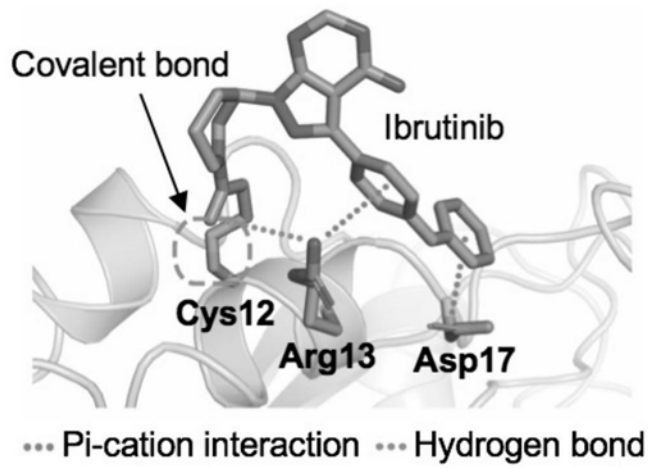


图13

专利名称(译)	化合物的靶点的鉴定方法、化合物与靶标相互作用的检测方法和化合物药效的评价方法		
公开(公告)号	CN110658314A	公开(公告)日	2020-01-07
申请号	CN201910967979.2	申请日	2019-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	四川大学		
申请(专利权)人(译)	四川大学		
当前申请(专利权)人(译)	四川大学		
[标]发明人	戴伦治 王新媛		
发明人	戴伦治 王秀轩 王新媛		
IPC分类号	G01N33/15 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/68 G01N30/02 G01N30/06		
CPC分类号	G01N30/02 G01N30/06 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/6848		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了化合物的靶点的鉴定方法、化合物与靶标相互作用的检测方法和化合物药效的评价方法，涉及药物靶点鉴定技术领域。具体而言，将经过目标化合物处理后细胞或者动物的蛋白或蛋白酶解产物与捕获剂孵育；所述捕获剂为可特异性识别并结合所述目标化合物和/或含有目标化合物的结合物的抗体。该鉴定方法采用捕获剂特异性地获取或富集蛋白或多肽溶液中的目标化合物和/或含有目标化合物的结合物，通过质谱分析，鉴定捕获剂捕获目标化合物的结合物是否是/属于靶标蛋白、捕获的靶标蛋白是什么，以及捕获的靶标蛋白的数量和丰度，该鉴定方法无需对目标化合物结构进行修饰，直接有效特异性地富集并鉴定出目标化合物的靶标。

