



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101965408 B

(45) 授权公告日 2013.08.28

(21) 申请号 200980107743.6

(22) 申请日 2009.02.03

(30) 优先权数据

08002053.0 2008.02.04 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.09.03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/000692 2009.02.03

(87) PCT申请的公布数据

W02009/098021 EN 2009.08.13

(73) 专利权人 塞尔卓姆有限责任公司

地址 德国海德堡

(72) 发明人 A·坎斯菲尔德 G·博加米尼摩尔

G·纽鲍尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 李波 万雪松

(51) Int. Cl.

C12Q 1/48 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2006051270 A1, 2006.05.18, 说明书.

WO 9510628 A2, 1995.04.20, 说明书.

Walker Edward H., et al.. structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. 《molecular cell》.2000, 第6卷(第4期), 第909-919页.

审查员 邢振兰

权利要求书3页 说明书34页 附图23页

(54) 发明名称

针对多重靶的PI3K相互作用分子的选择性概况分析

(57) 摘要

本发明涉及其中通过使包含PI3K的蛋白质制剂与苯基噻唑配体1温育来鉴定PI3K相互作用化合物的方法。

1. 用于鉴定 PI 3K 相互作用化合物的方法,其包括步骤
  - a) 提供包含 PI 3K 的蛋白质制剂,
  - b) 在允许 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺-PI3K 复合物形成的条件下,使所述蛋白质制剂与固定在固体支持物上的 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺接触,
  - c) 使所述 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺-PI3K 复合物与给定化合物温育,
  - d) 测定所述化合物是否能够使 PI 3K 与所述经固定的 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺分离,和
  - e) 测定所述化合物是否还能够使 ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 与所述经固定的 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺分离。
2. 权利要求 1 的方法,其中步骤 d) 包括检测经分离的 PI3K 或测定经分离的 PI3K 的量,和 / 或步骤 e) 包括检测经分离的 ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 或测定经分离的 ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 的量。
3. 权利要求 2 的方法,其中通过质谱法或免疫检测方法检测经分离的 PI3K、ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR,或测定经分离的 PI3K、ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 的量。
4. 权利要求 3 的方法,其中检测经分离的 PI3K、ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR,或测定经分离的 PI3K、ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 的量是用针对 PI3K、ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 的抗体。
5. 用于鉴定 PI3K 相互作用化合物的方法,其包括步骤
  - a) 提供包含 PI3K 的蛋白质制剂,
  - b) 在允许 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺-PI3K 复合物形成的条件下,使所述蛋白质制剂与固定在固体支持物上的 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺接触,
  - c) 检测在步骤 b) 中形成的所述 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺-PI 3K 复合物,和
  - d) 检测在步骤 b) 中是否也已形成 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺与 ATM、ATR、DNAPK 和或 mTOR 之间的复合物,其中在步骤 c) 中所述检测通过测定 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺-PI 3K 复合物的量来进行,和 / 或其中在步骤 d) 中测定

3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺与 ATM、ATR、DNAPK 和或 mTOR 之间的复合物的量。

6. 权利要求 4 或 5 中任一项的方法,其中步骤 a) 至 c) 用几种蛋白质制剂执行,以便测试不同化合物。

7. 用于鉴定 PI3K 相互作用化合物的方法,其包括步骤:

a) 提供包含 PI 3K 的蛋白质制剂的 2 个等分试样,

b) 在允许 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺-PI3K 复合物形成的条件下,使一个等分试样与固定在固体支持物上的所述 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺接触,

c) 在允许 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺-PI3K 复合物形成的条件下,使另一个等分试样与固定在固体支持物上的所述 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺以及给定化合物接触,

d) 测定在步骤 b) 和 c) 中形成的所述 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺-PI3K 复合物的量,和

e) 测定在步骤 b) 和 c) 中是否也已形成 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺与 ATM、ATR、DNAPK 和或 mTOR 之间的复合物,

其中和未与所述化合物温育的等分试样相比较,在与所述化合物温育的等分试样中形成减少量的所述 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺-PI3K 复合物指示 PI 3K 是所述化合物的靶。

8. 用于鉴定 PI3K 相互作用化合物的方法,其包括步骤:

a) 提供各自包括包含 PI3K 的至少一个细胞的 2 个等分试样,

b) 使一个等分试样与给定化合物温育,

c) 收获每个等分试样的细胞,

d) 使所述细胞裂解,以便获得蛋白质制剂,

e) 在允许 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺-PI3K 复合物形成的条件下,使所述蛋白质制剂与固定在固体支持物上的所述 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺接触,和

f) 测定在步骤 e) 中每个等分试样中形成的所述 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙

酰胺-PI3K 复合物的量,和

g) 测定在步骤 e) 中是否也已形成 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-丙酰胺与 ATM、ATR、DNAPK 和或 mTOR 之间的复合物,

其中和未与所述化合物温育的等分试样相比较,在与所述化合物温育的等分试样中形成减少量的所述 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-丙酰胺-PI3K 复合物指示 PI3K 是所述化合物的靶。

9. 权利要求 5 的方法,其中通过使 PI 3K 与所述经固定的 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-丙酰胺分离和随后检测经分离的 PI3K 或随后测定经分离的 PI 3K 的量,测定所述 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-丙酰胺-PI3K 复合物的量。

10. 权利要求 5 的方法,其中通过使所述蛋白质与所述经固定的 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-丙酰胺分离和随后检测经分离的 ATM、ATR、DNAPK 和或 mTOR 或随后测定经分离的 ATM、ATR、DNAPK 和或 mTOR 的量,执行是否也已形成 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-丙酰胺与 ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 之间的复合物的所述测定。

11. 权利要求 9 或 10 中任一项的方法,其中通过质谱法或免疫检测方法检测所述蛋白质,或测定所述蛋白质的量。

12. 权利要求 11 的方法,其中检测所述蛋白质,或测定所述蛋白质的量用针对所述蛋白质的抗体。

13. 权利要求 1 的方法,其作为中等或高通量筛选执行。

14. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物选自合成化合物或有机合成药物,和天然小分子化合物。

15. 权利要求 1 的方法,其中所述 PI3K 相互作用化合物是 PI3K 抑制剂。

16. 权利要求 1 的方法,其中所述固体支持物选自琼脂糖、琼脂糖珠、乳胶、纤维素和铁磁性或亚铁磁性颗粒。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述琼脂糖珠是 NHS 活化的琼脂糖。

18. 权利要求 1 的方法,其中所述 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-丙酰胺与所述固体支持物共价偶联。

19. 权利要求 1 的方法,其中所述 PI3K 是 PI3K  $\gamma$  和 / 或 PI3K  $\delta$ 。

20. 权利要求 1 的方法,其中所述蛋白质制剂的提供包括收获包含 PI3K 的至少一个细胞且使所述细胞裂解的步骤。

21. 权利要求 1 的方法,其中所述 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-丙酰胺-PI3K 复合物形成的步骤在基本生理条件下执行。

## 针对多重靶的 PI3K 相互作用分子的选择性概况分析

[0001] 本发明涉及使用苯基噻唑配体 1 作为关于 PI3K 的配体,用于鉴定且表征 PI3K 相互作用分子和用于纯化 PI3K 的方法。此外,本发明涉及例如用于治疗癌症、代谢疾病或自身免疫 / 炎性病症的,包括所述相互作用分子的药物组合物。

[0002] 激酶催化蛋白质、脂质、糖、核苷和其他细胞代谢产物的磷酸化,并且在真核细胞生理学的所有方面起关键作用。特别地,蛋白质激酶和脂质激酶参与信号事件,所述信号事件响应细胞外介质或刺激例如生长因子、细胞因子或趋化因子控制细胞的活化、生长、分化和存活。一般而言,蛋白质激酶分成 2 组,优先磷酸化酪氨酸残基的那些和优先磷酸化丝氨酸和 / 或苏氨酸残基的那些。

[0003] 不适当地高蛋白质激酶活性涉及许多疾病,包括癌症、代谢疾病和自身免疫 / 炎性病症。这可以通过由于酶的突变、超表达或不适当活化的控制机制失败直接或间接引起。在所有这些情况下,激酶的选择性抑制预期具有有利效应。

[0004] 已成为药物开发的近期焦点的一组脂质激酶是磷酸肌醇 3- 激酶 (PI3K) 家族。PI3K 家族成员是脂质激酶,其催化  $\gamma$ - 磷酸从 ATP 到磷脂酰肌醇及其衍生物 ( 统称为磷酸肌醇 ) 的 3' 羟基的转移。迄今为止已从哺乳动物细胞中分离出 PI3K 家族的 8 个成员 ( 同种型 ), 并且根据其一级结构和底物特异性分成 3 个类别 ( 类别 IA :PI3K  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\delta$  ;类别 IB :PI3K  $\gamma$  ;类别 II :PI3KC2  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  ;类别 III :Vps34 酵母同系物 (Fruman 等人,1998. Phosphoinositide kinases. Annual Review Biochemistry 67,481-507 ;Cantley, L. C., 2002, Science 296,1655-1657) 。

[0005] 已知哺乳动物细胞表达 PI3K IA 类的催化亚单位的 3 个同种型 (p110  $\alpha$ 、p110  $\beta$  和 p110  $\delta$ , 同义词 “PI3K  $\delta$  ”)。类别 IB 仅包含一个成员 ( 催化亚单位 ), 其已命名为 p110  $\gamma$  或 PI3K  $\gamma$ 。除了其脂质激酶活性外, PI3K  $\gamma$  还显示丝氨酸 / 苏氨酸蛋白质激酶活性,如由自磷酸化证实的。

[0006] 其中编码 PI3K  $\gamma$  或  $\delta$  的基因被缺失的经遗传处理的小鼠的研究给出关于这些激酶的生理学功能及其作为药物靶的潜在效用的重要信息。缺乏 PI3K  $\gamma$  或  $\delta$  的小鼠是存活的并且显示特征性表型,暗示几种潜在的治疗适应症。PI3K  $\gamma$  看起来是先天性免疫系统的主要介质。例如,PI3K  $\gamma$  缺陷巨噬细胞和嗜中性粒细胞显示浸润发炎腹膜的能力受损。肥大细胞代表在 PI3K  $\gamma$  缺陷小鼠中受累的另一细胞类型。缺乏 PI3K  $\delta$  的小鼠的表型的特征在于淋巴细胞功能的损害,并且指向适应性免疫应答控制中的主导因素 (Wetzker 和 Rommel, Current Pharmaceutical Design, 2004, 10, 1915-1922) 。

[0007] 与广泛表达的 PI3K  $\alpha$  和  $\beta$  同种型形成对比,造血特异性同种型 PI3K  $\gamma$  和  $\delta$  暗示重要的治疗适应症。2 种同种型表现为用于治疗由过度活跃的吞噬细胞、肥大细胞、B 和 T 淋巴细胞介导的自身免疫 / 炎性疾病 ( 例如类风湿性关节炎、哮喘或过敏反应 ) 的理想靶。为了避免不希望有的副作用,需要高度同种型选择性的抑制剂 (Ohashi 和 Woodgett 2005, Nature Medicine 11,924-925) 。

[0008] 磷脂酰肌醇激酶相关激酶 (PIKK) 家族成员是涉及细胞周期进展、DNA 重组和 DNA 损伤检测的高分子量激酶。在具有毛细血管扩张性共济失调症的患者细胞中缺陷且涉及

细胞对损伤 DNA 的检测和应答的人 ATM 基因是这个家族的成员。另一个是 mTOR (同义词 FRAP), 其涉及雷帕霉素敏感途径, 导致 G1 细胞周期进展 (Shilo, 2003. Nature Reviews Cancer 3, 155-168)。

[0009] 关于鉴定和表征 PI3K 抑制剂的一个先决条件是合适测定法的提供, 优选生理学形式的蛋白质靶。在本领域中, 已提出几种策略以解决这个问题。

[0010] 常规地, PI3K 脂质激酶家族活性可以使用经纯化的酶或重组酶在具有磷脂 (原文为 phopholipid, 疑为 phospholipid) 囊泡的基于溶液的测定法中进行测量。通过添加酸化的有机溶剂和通过萃取或薄层色谱法分析的后续相分离来终止反应 (Carpenter 等人, 1990, J. Biol. Chem. 265, 19704-19711)。

[0011] 本领域描述的另一测定法基于从放射性标记的 ATP 到固定在平板上的磷脂酰肌醇的磷酸盐转移。这种测定法类型也使用重组 PI3K  $\gamma$  酶, 但可以以高通量方式执行 (Fuchikami 等人, 2002, J. Biomol. Screening 7, 441-450)。

[0012] 另外一种生物化学筛选测定法基于使用荧光团标记的磷酸肌醇的竞争荧光偏振 (FP) 形式 (Drees 等人, 2003, Comb. Chem. High Throughput Screening 6, 321-330)。

[0013] 最后, 报告了基于荧光显微镜成像和自动化图像分析的基于细胞的 Akt-EGFP 再分布测定法。为此, 用人胰岛素受体和 Akt1-增强绿色荧光蛋白 (EGFP) 融合构建体稳定转染中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。在用胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 刺激后, PI3K 被激活, 并且 Akt1-EGFP 蛋白质被招募至细胞膜。用 PI3K 同种型选择性抑制剂验证再分布测定法显示, PI3K  $\alpha$  是在 IGF-1 刺激后在 CHO 宿主细胞中激活的主要同种型 (Wolff 等人, Comb. Chem. High Throughput Screen. 9, 339-350)。

[0014] 尽管不是所有情况下用于鉴定选择性激酶抑制剂需要的另一个先决条件是允许测定这些分子的靶选择性的方法。例如, 可以预期提供与特定药物靶结合且抑制其但不与紧密相关的靶相互作用的分子, 所述紧密相关靶的抑制可以导致副作用。常规地, 个别酶测定法的大实验对象组用于评估化合物对于激酶的抑制效应 (Knight 等人, 2004. Bioorganic and Medicinal Chemistry 12, 4749-4759; Knight 等人, 2006, Cell 125, 733-747)。最近, 在噬菌体上展示的激酶或激酶结构域已用于评估给定化合物与大激酶组相互作用的能力 (Karaman 等人, 2008. Nature Biotechnology 26, 127-132)。此外, 已描述了允许激酶抑制剂针对蛋白质组的概况分析的化学蛋白质组学方法 (W02006/134056; Bantscheff 等人, 2007. Nature Biotechnology 25, 1035-1044; Patricelly 等人, 2007. Biochemistry 46, 350-358; Gharbi 等人, 2007. Biochem. J. 404, 15-21; W02008/015013)。

[0015] 由上文看来, 需要提供用于鉴定且选择性概况分析 PI3K 相互作用化合物的有效方法以及用于纯化 PI3K 的方法。

[0016] 为了顺应这个需要, 本发明在第一个方面提供了用于鉴定 PI3K 相互作用化合物的方法, 其包括步骤

[0017] a) 提供包含 PI3K 的蛋白质制剂,

[0018] b) 在允许苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物形成的条件下, 使蛋白质制剂与固定在固体支持物上的苯基噻唑配体 1 接触,

[0019] c) 使苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物与给定化合物温育,

[0020] d) 测定化合物是否能够使 PI3K 与经固定的苯基噻唑配体 1 分离, 和

[0021] e) 测定化合物是否还能够使 ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 与经固定的苯基噻唑配体 1 分离。

[0022] 在第二个方面,本发明涉及用于鉴定 PI3K 相互作用化合物的方法,其包括步骤

[0023] a) 提供包含 PI3K 的蛋白质制剂,

[0024] b) 在允许苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物形成的条件下,使蛋白质制剂与固定在固体支持物上的苯基噻唑配体 1 接触,

[0025] c) 检测在步骤 b) 中形成的苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物,和

[0026] d) 检测在步骤 b) 中是否也已形成苯基噻唑配体 1 与 ATM、ATR、DNAPK 和或 mTOR 之间的复合物。

[0027] 在第三个方面,本发明提供了用于鉴定 PI3K 相互作用化合物的方法,其包括步骤:

[0028] a) 提供包含 PI3K 的蛋白质制剂的 2 个等分试样,

[0029] b) 在允许苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物形成的条件下,使一个等分试样与固定在固体支持物上的苯基噻唑配体 1 接触,

[0030] c) 在允许苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物形成的条件下,使另一个等分试样与固定在固体支持物上的苯基噻唑配体 1 和给定化合物接触,

[0031] d) 测定在步骤 b) 和 c) 中形成的苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物的量,和

[0032] e) 测定在步骤 b) 和 c) 中是否也已形成苯基噻唑配体 1 与 ATM、ATR、DNAPK 和或 mTOR 之间的复合物。

[0033] 在第四个方面,本发明涉及用于鉴定 PI3K 相互作用化合物的方法,其包括步骤:

[0034] a) 提供各自包括包含 PI3K 的至少一个细胞的 2 个等分试样,

[0035] b) 使一个等分试样与给定化合物温育,

[0036] c) 收获每个等分试样的细胞,

[0037] d) 使细胞裂解,以便获得蛋白质制剂,

[0038] e) 在允许苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物形成的条件下,使蛋白质制剂与固定在固体支持物上的苯基噻唑配体 1 接触,和

[0039] f) 测定在步骤 e) 中每个等分试样中形成的苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物的量,和

[0040] g) 测定在步骤 e) 中是否也已形成苯基噻唑配体 1 与 ATM、ATR、DNAPK 和或 mTOR 之间的复合物。

[0041] 在本发明的背景中,已令人惊讶地发现苯基噻唑配体 1 是 PI3K 配体和 PIKK 家族其他成员(即 ATM、ATR、DNAPK 和 mTOR(FRAP))的配体。这使得苯基噻唑配体 1 在筛选测定法中的使用成为可能,例如在竞争筛选测定法中以及在用于纯化 PI3K 的方法中。

[0042] 苯基噻唑配体 1 的结构在图 1 中给出。这种化合物是取代的噻唑(3-(2-(2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-丙酰胺),根据图 1,其在液体溶液中具有盐酸盐作为阴离子。然而,在本发明的背景中还设想了进一步的抗衡离子。苯基噻唑配体 1 可以经由伯氨基与合适的固体支持物材料共价偶联,并且用于分离结合蛋白质。苯基噻唑配体 1 的合成在实施例 1 中描述。根据本发明,表达“苯基噻唑配体 1”还包括这样的化合物,其包含等同核心但具有另一个接头,优选与并非环状结构的部分的氮偶联,用于与固体支持物连接。

一般地,接头具有 8、9 或 10 个原子的主链。接头可以包含羧基、羟基或氨基活性基团。

[0043] 因此,在一个优选实施方案中,表达“苯基噻唑配体 1”还包括这样的化合物,其具有相同的 N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-丙酰胺核心但包括在 N-原子处的另一个接头,例如 C1-C8 烷基羰基或 C1-C8 烷基氨基羰基,其中任何一个任选由下述取代:卤素、羟基、氨基、C1-C8-烷基氨基、C1-C8-烷氧羰基、任选由羟基取代的 C1-C8-烷氧基、或任选由羟基或卤素取代的 C1-C8-烷基。此外,这个表达还包括如上所述的化合物,其具有另一个卤素例如溴代替 4-氯残基,或在苯环上例如由卤素进一步取代。此外,代替甲磺酰基,还可能存在任选由卤素取代的另一个基团如羟基、羧基或 C1-C8 烷基。

[0044] 在一个特别优选的实施方案中,归入表达“苯基噻唑配体 1”的化合物选自 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-丙酰胺盐酸盐、3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-丙酰胺、和具有相同的 N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-丙酰胺核心的化合物,所述化合物仅在 N-原子处由 C1-C8 烷基羰基或 C1-C8 烷基氨基羰基进一步取代,其中任何一个任选由下述取代:卤素、羟基、氨基、C1-C8-烷基氨基、C1-C8-烷氧羰基、任选由羟基取代的 C1-C8-烷氧基、或任选由羟基或卤素取代的 C1-C8-烷基。

[0045] 根据本发明,“PI3K”包括 PI3K 家族的所有成员,包括类别 IA(例如 PI3K  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\delta$ )、类别 IB(例如 PI3K  $\gamma$ )、类别 II(例如 PI3K $\gamma$ 2  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ ) 和类别 III(例如 Vps34 酵母同系物)。

[0046] 人 PI3K  $\gamma$ (类别 IB 迄今为止唯一已知的成员)的序列在图 4 中给出。

[0047] PI3K  $\delta$ (类别 IA 的成员)的序列在图 5 中给出。

[0048] 根据本发明,表达“PI3K”指这个家族的人和其他蛋白质。该表达特别包括其功能活性衍生物、或其功能活性片段、或其同系物、或由在低严格条件下与编码所述蛋白质的核酸杂交的核酸编码的变体。优选地,这些低严格条件包括在包含 35% 甲酰胺、5X SSC、50mM Tris-HCl(pH 7.5)、5mM EDTA、0.02% PVP、0.02% BSA、100ug/ml 变性鲑精 DNA 和 10% (wt/vol) 硫酸葡聚糖的缓冲液中于 40°C 杂交 18-20 小时,在由 2X SSC、25mM Tris-HCl(pH 7.4)、5mM EDTA 和 0.1% SDS 组成的缓冲液中于 55°C 洗涤 1-5 小时,并且在由 2X SSC、25mM Tris-HCl(pH 7.4) 5mM EDTA 和 0.1% SDS 组成的缓冲液中于 60°C 洗涤 1.5 小时。

[0049] 根据本发明,“ATM”意指毛细血管扩张性共济失调症突变蛋白质。ATM 蛋白质是蛋白质的磷脂酰肌醇-3 激酶家族的成员,其通过使涉及 DNA 修复和 / 或细胞周期控制的关键底物磷酸化而响应 DNA 损伤 (Shilo, 2003. Nature Reviews Cancer 3, 155-168)。

[0050] 根据本发明,“ATR”意指毛细血管扩张性共济失调症和 RAD3 相关蛋白质(同义词 FRAP 相关蛋白质 1、FRP1)。

[0051] 根据本发明,“DNAPK”意指 DNA 依赖性蛋白质激酶。PRKDC 基因编码核 DNA 依赖性丝氨酸 / 苏氨酸蛋白质激酶 (DNA-PK) 的催化亚单位。第二个组分是自身免疫抗原 Ku (152690),其由在染色体 22q 上的 G22P1 基因编码。单独地, DNA-PK 的催化亚单位是无活性的,并且依赖于 G22P1 组分,以将其导向 DNA 且触发其激酶活性;PRKDC 必须与 DNA 结合以表达其催性质。

[0052] 根据本发明,“mTOR”意指雷帕霉素的哺乳动物靶 (mTOR, 也称为 FRAP 或 RAFT1)

(Tsang 等人, 2007, *Drug Discovery Today* 12, 112-124)。mTOR 蛋白质是 289kDA 的大激酶, 其出现在迄今为止测序的所有真核生物中。羧基末端“磷脂酰肌醇 3- 激酶 (PI3K) 相关激酶” (PIKK) 结构域的序列在物种之间是高度保守的, 并且显示丝氨酸和苏氨酸激酶活性但无可检测的脂质激酶活性。

[0053] 根据本发明, 表达“ATM”、“ATR”、“DNAPK”或“mTOR”涉及这个家族的人和其他蛋白质 (Shilo, 2003. *Nature Reviews Cancer* 3, 155-168)。该表达特别包括其功能活性衍生物、或其功能活性片段、或其同系物、或由在低严格条件下与编码所述蛋白质的核酸杂交的核酸编码的变体。优选地, 这些低严格条件包括在包含 35% 甲酰胺、5X SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、5mM EDTA、0.02% PVP、0.02% BSA、100ug/ml 变性鲑精 DNA 和 10% (wt/vol) 硫酸葡聚糖的缓冲液中于 40°C 杂交 18-20 小时, 在由 2X SSC、25mM Tris-HCl (pH 7.4)、5mM EDTA 和 0.1% SDS 组成的缓冲液中于 55°C 洗涤 1-5 小时, 并且在由 2X SSC、25mM Tris-HCl (pH 7.4) 5mM EDTA 和 0.1% SDS 组成的缓冲液中于 60°C 洗涤 1.5 小时。

[0054] 苯基噻唑配体 1 是关于 PI3K 的所有同种型的配体 (参见上文)。然而, 本发明自始至终, 优选 PI3K 是 PI3K  $\gamma$  或 PI3K  $\delta$ , 特别是其人同种型。

[0055] 在本发明的某些方面, 首先提供了包含 PI3K 的蛋白质制剂。本发明的方法可以用任何蛋白质制剂作为原材料执行, 只要 PI3K 溶解于制剂中。例子包括几种蛋白质的液体混合物、细胞裂解物、包含在原始细胞或几种细胞裂解物的组合中存在的并非所有蛋白质的部分细胞裂解物, 特别是在其中并非每一种目的靶蛋白质都存在于每一种细胞裂解物中的情况下。术语“蛋白质制剂”还包括溶解的纯化蛋白质。

[0056] PI3K 蛋白质种类在目的蛋白质制剂中的存在可以在用抗体探测的蛋白质印迹上进行检测, 所述抗体特异性针对 PI3K。在 PI3K 是特异性同种型 (例如 PI3K  $\gamma$  和 / 或 PI3K  $\delta$ ) 的情况下, 所述同种型的存在可以通过同种型特异性抗体进行测定。此类抗体是本领域已知的 (Sasaki 等人, 2000, *Nature* 406, 897-902; Deora 等人, 1998, *J. Biol. Chem.* 273, 29923-29928)。备选地, 还可以使用质谱法 (MS) (参见下文)。

[0057] ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 蛋白质在目的蛋白质制剂中的存在可以在用抗体探测的蛋白质印迹上进行检测, 所述抗体对于所述蛋白质特异。

[0058] 通过首先分离细胞的细胞器 (例如核、线粒体、核糖体、高尔基体等), 并且随后制备衍生自这些细胞器的蛋白质制剂, 可以获得细胞裂解物或部分细胞裂解物。用于分离细胞的细胞器的方法是本领域已知的 (第 4.2 章 Purification of Organelles from Mammalian Cells in “Current Protocols in Protein Science”, 编辑: John. E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, ISBN: 0-471-14098-8)。

[0059] 此外, 通过细胞提取物的分馏, 从而富集特定类型的蛋白质例如细胞质或膜蛋白质, 可以制备蛋白质制剂 (第 4.3 章 Subcellular Fractionation of Tissue Culture Cells in “Current Protocols in Protein Science”, 编辑: John. E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, ISBN: 0-471-14098-8)。

[0060] 此外, 可以使用来自体液的蛋白质制剂 (例如血液、脑脊髓液、腹膜液和尿)。

[0061] 例如, 可以使用衍生自模型生物体例如线虫 (*C. elegans*) 的限定发育期或成体期的整个胚胎裂解物。此外, 整个器官例如从小鼠中解剖的心脏可以是蛋白质制剂的来源。这

些器官也可以在体外进行灌注,以便获得蛋白质制剂。

[0062] 此外,蛋白质制剂可以是包含已重组产生的PI3K的制剂。用于在原核和真核细胞中产生重组蛋白质的方法是广泛建立的(第5章 Production of Recombinant Proteins in "Current Protocols in Protein Science",编辑:John. E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, 1995, ISBN: 0-471-14098-8)。

[0063] 在本发明的方法的一个优选实施方案中,蛋白质制剂的提供包括收获包含PI3K的至少一个细胞且使细胞裂解的步骤。

[0064] 用于这个用途的合适细胞是表达PI3K家族成员的那些细胞或组织。PI3K家族的成员在大多数细胞和组织中表达。PI3K  $\gamma$  在造血系统的细胞(例如粒细胞、巨噬细胞、肥大细胞和血小板)中优先表达,而且在心肌细胞、血管平滑肌和血管上皮细胞中表达。PI3K  $\delta$  在淋巴细胞、粒细胞和肥大细胞中以显著表达进行遍在表达。

[0065] 因此,在一个优选实施方案中,从外周血中分离的细胞代表合适的生物材料。用于分离和培养得自外周血的人淋巴细胞和淋巴细胞亚群(PBLs)的操作是广泛已知的(W. E. Biddison, 第2.2章 "Preparation and culture of human lymphocytes" in Current Protocols in Cell Biology, 1998, John Wiley & Sons, Inc.)。例如,密度梯度离心是用于使淋巴细胞与其他血细胞群体(例如红细胞和粒细胞)分离的方法。人淋巴细胞亚群可以经其特异性细胞表面受体进行分离,所述细胞表面受体可以由单克隆抗体识别。物理分离方法涉及这些抗体试剂与磁珠的偶联,所述磁珠允许富集由这些抗体结合的细胞(阳性选择)。通过加入针对T细胞受体或共受体例如CD-3的抗体以起始T细胞受体信号和PI3K的后续磷酸化,可以进一步培养且刺激经分离的淋巴细胞(Houtman等人, 2005, The Journal of Immunology 175(4), 2449-2458)。

[0066] 作为原代人细胞的备选物,可以使用经培养的细胞系(例如MOLT-4细胞或大鼠嗜碱细胞性白血病(RBL-2H3)细胞)。通过经由多价抗原交联关于IgE的高亲和力受体(Fc  $\epsilon$  RI)以诱导PI3K的激活,可以刺激RBL-2H3(Kato等人, 2006, J. Immunol. 177(1): 147-154)。

[0067] 在一个优选实施方案中,细胞是细胞培养系统的部分,并且用于从细胞培养系统中收获细胞的方法是本领域已知的(同上的文献)。

[0068] 细胞的选择将主要依赖于PI3K的表达,因为必须确保蛋白质主要存在于选择的细胞中。为了测定给定细胞是否是用于本发明的方法的合适起始系统,方法如蛋白质印迹、基于PCR的核酸检测方法、RNA印迹和DNA微阵列方法("DNA芯片)可能是合适的,以便测定目的给定蛋白质是否存在于细胞中。

[0069] 细胞的选择还可以受研究目的影响。如果需要分析关于给定药物的体内功效,那么可以选择其中发生所需疗效的细胞或组织(例如粒细胞或肥大细胞)。相比之下,为了阐明介导不希望有的副作用的蛋白质靶,可以分析其中观察到副作用的细胞或组织(例如心肌细胞、血管平滑肌或上皮细胞)。

[0070] 此外,在本发明内设想包含PI3K的细胞可以例如通过活组织检查得自生物体。相对应方法是本领域已知的。例如,活组织检查是用于获得少量组织的诊断操作,其随后可以用显微镜或用生物化学方法进行检查。活组织检查对于诊断、分类和分级疾病是重要的,对于评估和监控药物治疗也是重要的。

[0071] 在本发明内包括的是,通过至少一个细胞的收获,同时执行裂解。然而,同样优选首先收获细胞并且随后分开裂解。

[0072] 用于细胞裂解的方法是本领域已知的(Karwa 和 Mitra:Sample preparation for the extraction, isolation, and purification of Nuclei Acids; “Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry”中的第 8 章, Wiley 2003, 编辑: Somenath Mitra, 出版 ISBN: 0471328456; 在线 ISBN: 0471457817)。通过匀浆器(例如, 波特 (Potter) 匀浆器)、超声粉碎机、酶促裂解、去污剂(例如 NP-40、Triton X-100、CHAPS、SDS)、渗透休克、反复冻融或这些方法的组合,可以达到不同细胞类型和组织的裂解。

[0073] 根据本发明的方法,在允许苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物形成的条件下,使包含 PI3K 的蛋白质制剂与固定在固体支持物上的苯基噻唑配体 1 接触。

[0074] 在本发明中,术语“苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物”指示其中苯基噻唑配体 1 例如通过共价或最优选地通过非共价结合与 PI3K 相互作用的复合物。相同定义还应用于苯基噻唑配体 1 与 ATM、ATR、DNAPK 或 mTOR 之间的复合物。

[0075] 技术人员应了解可以应用何种条件,以便使得苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物的形成成为可能。

[0076] 在本发明的背景中,术语“在允许复合物形成的条件下”包括在其下此类形成优选此类结合是可能的所有条件。这包括具有在固定相上的固体支持物且将裂解物倾倒在之上的可能性。在另一个优选实施方案中,还包括固体支持物是颗粒形式且与细胞裂解物相混合。

[0077] 在非共价结合的背景中,苯基噻唑配体 1 和 PI3K 之间的结合例如经由盐桥、氢键、疏水性相互作用或其组合。

[0078] 在一个优选实施方案中,苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物形成的步骤在基本生理条件下执行。蛋白质在细胞内的物理状况在 Petty, 1998 (Howard R. Petty, 第 1 章, Unit 1.5 in: Juan S. Bonifacino, Mary Dasso, Joe B. Harford, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Kenneth M. Yamada (编辑) Current Protocols in Cell Biology Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Inc. 保留所有权利。DOI: 10.1002/0471143030.cb0101s00 在线公布日期: 2001 年 5 月印刷出版日期: 1998 年 10 月) 中描述。

[0079] 在基本生理条件下的接触具有下述优点: 配体、细胞制剂(即待表征的激酶)和任选地化合物之间的相互作用尽可能多地反映自然条件。“基本生理条件”尤其是存在于原始、未加工的样品材料中的那些条件。它们包括生理学蛋白质浓度、pH、盐浓度、缓冲容量和所涉及蛋白质的翻译后修饰。术语“基本生理条件”不需要与样品由其衍生的原始活生物体中的那些等同的条件,而是基本上细胞样的条件或接近于细胞条件的条件。当然,本领域技术人员应认识到,由于将最终导致较少细胞样条件的实验设置可能出现特定限制。例如,当从活生物体中获得且加工样品时,最终必需的细胞壁或细胞膜断裂可能要求与生物体中发现的生理条件不等同的条件。用于实践本发明的方法的生理条件的合适变异对于本领域技术人员是显而易见的,并且由如本文所使用的术语“基本生理条件”包括。总之,应当理解术语“基本生理条件”指接近于如例如在天然细胞中发现的生理条件的条件,但不一定要求这些条件是等同的。

[0080] 例如,“基本生理条件”可以包括 50-200mM NaCl 或 KCl、pH 6.5-8.5、20-37°C 和

0.001-10mM 二价阳离子（例如  $Mg^{++}$ 、 $Ca^{++}$ ）；更优选约 150m NaCl 或 KCl、pH7.2 至 7.6、5mM 二价阳离子，并且通常包括 0.01-1.0% 非特异性蛋白质（例如 BSA）。通常可以存在非离子型去污剂（Tween、NP-40、Triton-X100），通常以约 0.001 至 2%、一般 0.05-0.2%（体积 / 体积）。关于一般指导，可以应用下述缓冲水性条件：10-250mM NaCl、5-50mM Tris HCl、pH5-8，伴随一种或多种二价阳离子和 / 或金属螯合剂和 / 或非离子型去污剂的任选添加。

[0081] 优选地，“基本生理条件”意指 6.5 至 7.5、优选 7.0 至 7.5 的 pH，和 / 或 10 至 50mM、优选 25 至 50mM 的缓冲浓度，和 / 或 120 至 170mM、优选 150mM 的单价盐（例如 Na 或 K）浓度。二价盐（例如 Mg 或 Ca）可以进一步以 1 至 5mM、优选 1 至 2mM 的浓度存在，其中更优选地缓冲剂选自 Tris-HCl 或 HEPES。

[0082] 在本发明的背景中，苯基噻唑配体 1 固定在固体支持物上。本发明自始至终，术语“固体支持物”指能够在其表面上固定小分子配体的每一种不溶解的支持物。

[0083] 根据一个进一步优选的实施方案，固体支持物选自琼脂糖、经修饰的琼脂糖、琼脂糖珠（例如 NHS 活化的琼脂糖）、乳胶、纤维素和铁磁性或亚铁磁性颗粒。

[0084] 苯基噻唑配体 1 可以与固体支持物共价或非共价偶联。非共价结合包括经由与链霉亲和素基质结合的生物素亲和配体的结合。

[0085] 优选地，苯基噻唑配体 1 与固体支持物共价偶联。

[0086] 在偶联前，基质可以包含活性基团例如 NHS、碳化二亚胺等，以使得与苯基噻唑配体 1 的偶联反应成为可能。苯基噻唑配体 1 可以通过直接偶联（例如使用官能团例如氨基、巯基、羧基、羟基、醛和酮基团）和通过间接偶联（例如经由生物素、与苯基噻唑配体 1 共价附着的生物素和生物素与链霉亲和素（其与固体支持物直接结合）的非共价结合）与固体支持物偶联。

[0087] 与固体支持物材料的连接可以涉及可切割和不可切割接头。切割可以通过酶促切割或用合适的化学方法处理来达到。

[0088] 用于使苯基噻唑配体 1 与固体支持物材料结合的优选结合界面是具有 C- 原子主链的接头。一般地接头具有 8、9 或 10 个原子的主链。接头可以包含羧基或氨基活性基团。

[0089] 技术人员应当理解在本发明的方法的个别步骤之间，洗涤步骤可能是必需的。此类洗涤是本领域技术人员知识的一部分。洗涤作用于从固体支持物中去除细胞裂解物的非结合组分。非特异性（例如简单离子）结合相互作用可以通过加入低水平的去污剂或通过适度调整至洗涤缓冲液中的盐浓度降到最低。

[0090] 根据本发明的鉴定方法，读出系统是 PI3K 的检测或测定（本发明的第一个方面）、苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物的检测（本发明的第二个方面）、或苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物的量的测定（本发明的第二个、第三个和第四个方面）。

[0091] 本发明自始至终，用于测定或检测 PI3K、检测苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物、或测定苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物的量的相同读出系统可以用于检测 ATM、ATR、DNAPK 或 mTOR，或检测或测定苯基噻唑配体 1 与所述蛋白质之间的复合物的量。这暗示在其中使用对于 PI3K 特异的试剂（例如抗体）的情况下，必须使用对于 ATM、ATR、DNAPK 或 mTOR 特异的抗体代替。因此，下文给出的实施方案和说明也应用于检测 ATM、ATR、DNAPK 或 mTOR，或检测复合物，或测定苯基噻唑配体 1 与所述蛋白质之间的复合物的量。

[0092] 在根据本发明的第一个方面的方法中，经分离的 PI3K 的检测或测定优选指示化

合物能够使 PI3K 与经固定的苯基噻唑配体 1 分离的事实。这种能力指示分别的化合物与 PI3K 相互作用, 优选结合至 PI3K, 这指示其治疗潜力。

[0093] 在根据本发明的第二个方面的方法的一个实施方案中, 检测出在本发明的方法过程中形成的苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物。此类复合物形成的事实优选指示化合物不完全抑制复合物的形成。另一方面, 如果未形成复合物, 那么推测化合物是与 PI3K 的强相互作用物, 这指示其治疗潜力。

[0094] 根据本发明的第二个、第三个和第四个方面的方法, 测定在方法的过程中形成的苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物的量。一般而言, 在分别化合物的存在下形成越少的复合物, 分别化合物与 PI3K 的相互作用越强, 这指示其治疗潜力。

[0095] 根据本发明的第二个方面苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物的检测可以通过使用针对 PI3K 的经标记的抗体和合适的读出系统来进行。

[0096] 根据本发明的第二个方面的一个优选实施方案, 苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物通过测定其量进行检测。

[0097] 在本发明的第二个、第三个和第四个方面的过程中, 优选 PI3K 与经固定的苯基噻唑配体 1 分离, 以便测定苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物的量。

[0098] 根据本发明, 分离意味着破坏苯基噻唑配体 1 与 PI3K 之间的相互作用的每一个动作。在一个优选实施方案中, 这包括从经固定的苯基噻唑配体 1 中洗脱 PI3K。

[0099] 洗脱可以通过如下文详细描述的使用非特异性试剂来达到 (离子强度、pH 值、去污剂)。此外, 可以测试目的化合物是否可以从苯基噻唑配体 1 中特异性洗脱 PI3K。此类 PI3K 相互作用化合物在下述部分中进一步描述。

[0100] 用于破坏相互作用的此类非特异性方法原则上是本领域已知的, 并且依赖于配体酶相互作用的性质。原则上, 离子强度的改变、pH 值、温度或与去污剂温育是使靶酶与经固定的配体解离的合适方法。洗脱缓冲液的应用可以通过极端 pH 值 (高或低 pH; 例如通过使用 0.1M 柠檬酸盐, pH2-3 降低 pH), 改变离子强度 (例如使用 NaI、KI、MgCl<sub>2</sub> 或 KCl 的高盐浓度), 破坏疏水性相互作用的极性还原剂 (例如二噻烷或乙二醇), 或变性剂 (离液盐或去污剂例如十二烷基硫酸钠, SDS; Review: Subramanian A., 2002, Immunoaffinity chromatography) 来解离结合配偶体。

[0101] 在某些情况下, 固体支持物已优选与所释放的材料分离。关于这点的个别方法依赖于固体支持物的性质, 并且是本领域已知的。如果固体材料包含在柱内, 那么所释放的材料可以作为柱流出物 (flowthrough) 进行收集。在支持物材料与裂解物组分相混合的情况下 (所谓的批操作), 另外的分离步骤例如温和离心可能是必需的, 并且所释放的材料作为上清液进行收集。备选地, 磁珠可以用作固体支持物, 从而使得珠可以通过使用磁性装置从样品中消除。

[0102] 在根据本发明的第一个方面的方法的步骤 d) 中, 测定 PI3K 是否已与经固定的苯基噻唑配体 1 分离。这可以包括 PI3K 的检测或 PI3K 量的测定。

[0103] 因此, 至少在本发明的所有鉴定方法的优选实施方案中, 使用用于检测经分离的 PI3K 或用于测定其量的方法。此类方法是本领域已知的, 并且包括物理化学方法例如蛋白质测序 (例如 Edmann 降解)、通过质谱法的分析或采用针对 PI3K 的抗体的免疫检测方法。

[0104] 本发明自始至终, 如果使用抗体以便检测 PI3K 或以便测定其量 (例如经由

ELISA),那么技术人员应当理解,如果待检测 PI3K 的特定同种型,或待测定 PI3K 的特定同种型的量,那么可以使用同种型特异性抗体。如上所述,此类抗体是本领域已知的。此外,技术人员知道用于产生抗体的方法。

[0105] 优选地,检测 PI3K、ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR,或通过质谱法或免疫检测方法测定所述蛋白质的量。在下文中,这将通过提及 PI3K 更详细地说明,但下文描述的实施方案和说明也应用于 ATM、ATR、DNAPK 或 mTOR。

[0106] 用质谱分析(质谱法)鉴定蛋白质是本领域已知的(Shevchenko 等人,1996, *Analytical Chemistry* 68:850-858;Mann 等人,2001, *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry, Annual Review of Biochemistry* 70,437-473),并且在实施例部分进一步举例说明。

[0107] 优选地,质谱分析以定量方式执行,例如通过使用 iTRAQ 技术(关于相对和绝对定量的等压标记物)或 cICAT(可切割的同位素编码的亲亲和标记物)(Wu 等人,2006. *J. Proteome Res.* 5,651-658)。

[0108] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,通过鉴定 PI3K 的蛋白分型(proteotypic)肽来执行通过质谱法(MS)的表征。想法是 PI3K 用蛋白酶进行消化,并且所得到的肽通过 MS 进行测定。因此,关于来自相同来源蛋白质的肽的肽频率相差很大程度,“一般”促成这种蛋白质鉴定的最通常观察到的肽被称为“蛋白分型肽”。因此,如本文所使用的,蛋白分型肽是独特地鉴定特定蛋白质或蛋白质同种型的在实验上可良好观察的肽。

[0109] 根据一个优选实施方案,通过使在实践本发明的方法的过程中获得的蛋白分型肽与已知蛋白分型肽相比较来执行表征。因为当使用通过蛋白酶消化制备的片段用于鉴定 MS 中的蛋白质时,通常对于给定酶观察到相同蛋白分型肽,所以可以使对于给定样品获得的蛋白分型肽与对于给定酶类别的酶已知的蛋白分型肽相比较,并且从而鉴定样品中存在的酶。

[0110] 作为质谱分析的备选方法,可以检测经洗脱的 PI3K(包括共洗脱的结合配偶体或支架蛋白质),或通过使用针对 PI3K 的特异性抗体(或针对 PI3K 的同种型,参见上文)可以测定其量。

[0111] 此外,在另一个优选实施方案中,一旦共洗脱的结合配偶体的特性已通过质谱分析进行确认,每个结合配偶体就可以用针对这种蛋白质的特异性抗体进行检测。

[0112] 合适的基于抗体的测定法包括但不限于蛋白质印迹、ELISA 测定法、夹心 ELISA 测定法和抗体阵列或其组合。此类测定法的建立是本领域已知的(*Short Protocols in Molecular Biology*. 第 4 版中的第 11 章, *Immunology*, 第 11-1 至 11-30 页,由 F. M. Ausubel 等人编辑, Wiley, New York, 1999)。

[0113] 这些测定法不仅可以以检测且定量目的 PI3K 相互作用蛋白质的方法进行配置(例如,PI3K 复合物的催化或调节亚单位),还可以分析翻译后修饰模式例如磷酸化或遍在蛋白修饰。

[0114] 此外,本发明的鉴定方法涉及化合物的使用,所述化合物就其成为 PI3K 相互作用化合物的能力进行测试。

[0115] 原则上,根据本发明,此类化合物可以是能够与 PI3K 相互作用的每一种分子,例如通过抑制其与苯基噻唑配体 1 的结合。优选地,化合物对 PI3K 具有作用,例如刺激或抑

制作用。

[0116] 优选地,所述化合物选自合成或天然存在的化学化合物或有机合成药物,更优选小分子、有机药物或天然小分子化合物。优选地,所述化合物从包含此类化合物的文库开始进行鉴定。随后,在本发明的过程中,筛选此类文库。

[0117] 此类小分子优选不是蛋白质或核酸。优选地,小分子显示出小于1000Da、更优选小于750Da、最优选小于500Da的分子量。

[0118] 根据本发明的“文库”涉及以分类方式提供的(众多)不同化学实体的(主要是大的)集合,所述分类方式使得不同个别实体的快速功能分析(筛选)成为可能,并且同时提供形成文库的个别实体的快速鉴定。例子是在表面上的管或孔或斑点的集合,其包含可以以高通量形式与一种或多种限定的潜在相互作用配偶体一起加入反应内的化学化合物。在鉴定2种配偶体的所需“正”相互作用后,由于文库构建,可以容易地鉴定分别化合物。合成和天然来源的文库可以进行购买或通过技术人员进行设计。

[0119] 文库构建的例子在例如 Breinbauer R, Manger M, Scheck M, Waldmann H. Natural product guided compound library development. *Curr Med Chem.* 2002 Dec ;9(23) : 2129-45 中提供,其中描述了用于设计组合文库的生物学验证初始点的自然产物,因为它们具有经证明的生物学关联性记录。根据关于由结构生物学和生物信息学获得的蛋白质的结构域体系结构,可以解释自然产物在药物化学和化学生物学中的专门作用。为了实现在结构域家族内个别结合袋的特定需求,可能必须通过化学变异最佳化自然产物结构。固相化学被说成变成用于这个最佳化过程的有效工具,并且这个领域中的近期进展在这个综述文章中突出显示。其他相关参考文献包括 Edwards PJ, Morrell AI. Solid-phase compound library synthesis in drug design and development. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2002 Jul ;5(4) :594-605. ; Merlot C, Domine D, Church DJ. Fragment analysis in small molecule discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2002 May ;5(3) :391-9. Review ; Goodnow RA Jr. Current practices in generation of small molecule new leads. *J Cell Biochem Suppl.* 2001 ;Suppl 37 :13-21 ;这描述了在许多药物公司中的目前药物开发过程需要大的和增长中的高品质先导物(lead)结构集合用于在高通量筛选测定法中使用。具有多样结构和“药物样”性质的小分子的集合在过去已通过几种方法获得:通过先前内部先导物最佳化努力的档案,通过从化合物卖主购买,和通过在公司合并后的分开集合的联合。尽管高通量/组合化学被描述为新先导物产生的过程中的主要组分,但用于文库成员的合成和后续设计的文库设计的选择已进化为激发和重要的新水平。针对多重生物学靶筛选多重小分子化合物文库设计的潜在利益提供了开发新先导物结构的重要机会。

[0120] 在本发明的第二个和第三个方面的一个优选实施方案,包含PI3K的蛋白质制剂首先与化合物温育,并且随后与经固定的苯基噻唑配体1温育。然而,化合物和经固定的苯基噻唑配体1(共温育)与包含PI3K的蛋白质制剂的同时温育同样是优选的(竞争结合测定法)。

[0121] 在与化合物的温育首先的情况下,在4°C至37°C、更优选4°C至25°C、最优选4°C下,PI3K优选首先与化合物温育10至60分钟、更优选30至45分钟。优选地化合物以1 μM至1mM、优选地10至100 μM的浓度使用。第二个步骤,与经固定的配体接触,优选在4°C下

执行 10 至 60 分钟。

[0122] 在同时温育的情况下,在 4°C 至 37°C、更优选 4°C 至 25°C、最优选 4°C 下,PI3K 优选与化合物和苯基噻唑配体 1 一起同时温育 30 至 120 分钟、更优选 60 至 120 分钟。优选地,化合物以 1  $\mu$ M 至 1mM、优选地 10 至 100  $\mu$ M 的浓度使用。

[0123] 此外,本发明的第二个方面的步骤 a) 至 c) 可以用几种蛋白质制剂执行,以便测试不同化合物。这个实施方案在中等或高通量筛选中特别有利(参见下文)。

[0124] 在根据第三个或第四个方面的本发明的方法的一个优选实施方案中,使步骤 c) 中形成的苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物的量与步骤 b) 中形成的量相比较。

[0125] 在根据第三个或第四个方面的本发明的方法的一个优选实施方案中,与步骤 b) 中相比较,在步骤 c) 中形成减少量的苯基噻唑配体 1-PI3K 复合物指示 PI3K 是化合物的靶。这起因于下述事实:在本发明的这种方法的步骤 c) 中,化合物与配体竞争结合 PI3K。如果在与化合物温育的等分试样中存在较少的 PI3K,那么这优选意味着化合物已与抑制剂竞争与酶相互作用,并且因此是蛋白质的直接靶,并且反之亦然。

[0126] 优选地,本发明的鉴定方法作为中等或高通量筛选执行。

[0127] 根据本发明鉴定的相互作用化合物可以通过测定它对 PI3K 例如对其激酶活性是否具有作用进行进一步表征(Carpenter 等人,1990, J. Biol. Chem. 265,19704-19711)。此类测定法是本领域已知的,也以允许中等至高通量筛选的形式(Fuchikami 等人,2002, J. Biomol. Screening 7,441-450)。

[0128] 此外,根据本发明鉴定的相互作用化合物可以通过测定它对 ATM、ATR、DNAPK 或 mTOR 例如对其激酶活性是否具有作用进行进一步表征(Knight 等人,2004. Bioorganic and Medicinal Chemistry 12,4749-4759;Knight 等人,2006, Cell 125,733-747)。

[0129] 简言之,PI3K 脂质激酶活性可以使用利用磷脂囊泡的基于溶液的测定法进行测量。通过添加酸化的有机溶剂和通过萃取或薄层色谱法分析的后续相分离来终止反应(Carpenter 等人,1990, J. Biol. Chem. 265,19704-19711)。

[0130] 备选地,可以使用荧光偏振测定法形式。简言之,使 PI3K 与合适的磷酸肌醇底物温育。在反应完成后,使反应产物与特定的磷酸肌醇检测蛋白质和荧光磷酸肌醇探针相混合。随着与磷酸肌醇检测蛋白质结合的探针由反应产物替换,偏振(mP)值减少。荧光探针的偏振程度与 PI3K 反应的产物量成反比(Drees 等人,2003, Comb. Chem. High Throughput Screening 6,321-330)。

[0131] 对于 PI3K 蛋白质激酶活性的测定,可以使用具有合适的肽底物的荧光偏振测定法。简言之,荧光素标记的肽底物可以与 PI3K(例如 PI3K  $\delta$ )、ATP 和抗磷酸丝氨酸抗体温育。随着反应进展,磷酸化的肽与抗磷酸丝氨酸抗体结合,导致偏振信号的增加。抑制激酶的化合物导致低偏振信号。

[0132] 根据本发明鉴定的化合物可以进一步进行最佳化(先导物最佳化)。由于在这些先导物产生文库中编码的结构-活性关系(SAR)信息,通常加速此类化合物的这种后续最佳化。由于高通量化学(HTC)方法用于后续合成的容易适用性,通常促进先导物最佳化。

[0133] 此类文库和先导物最佳化的一个例子是对于 PI3K  $\gamma$  的描述(Pomel 等人,2006, J. Med. Chem. 49,3857-3871)。

[0134] 本发明的方法包括这样的方法步骤:其中测定化合物是否还能够使 ATM、ATR、

DNAPK 和 / 或 mTOR 与经固定的苯基噻唑配体 1 分离 ( 本发明的第一个方面 ), 或是否也已形成苯基噻唑配体 1 与 ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 之间的复合物。如上所述, 这些步骤可以基本上如上文对于 PI3K 所述来执行, 其中需要时, 使用试剂例如对于给定激酶特异的抗体。

[0135] 在这些方法步骤后的原理是可以测定经鉴定的 PI3K 相互作用化合物的特异性。在本发明的背景中, 优选鉴定对于 PI3K 特异的 PI3K 相互作用化合物, 即其与 ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 在较少程度上结合, 或更加优选, 不与这些蛋白质中的一种或全部结合。

[0136] 本发明进一步涉及用于制备药物组合物的方法, 其包括步骤

[0137] a) 如上所述鉴定 PI3K 相互作用化合物, 和

[0138] b) 将相互作用化合物配制成药物组合物。

[0139] 因此, 本发明提供了用于制备药物组合物的方法, 其可以以有效量施用于受试者。在一个优选方面, 治疗剂是基本上纯化的。待治疗的受试者优选是动物, 包括但不限于动物例如牛、猪、马、鸡、猫、犬等, 并且优选是哺乳动物, 并且最优选人。在一个特别实施方案中, 非人哺乳动物是受试者。

[0140] 根据本发明鉴定的化合物用于预防或治疗其中 PI3K 起作用的疾病, 例如癌症 ( 例如乳腺癌、结肠癌或卵巢癌 )、代谢病症 ( 例如糖尿病或肥胖 ) 或自身免疫 / 炎性病症 ( 例如类风湿性关节炎、牛皮癣、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、哮喘或过敏反应 )。

[0141] 因此, 本发明还涉及通过本发明的方法鉴定的化合物在制备用于治疗上述疾病中的一种或多种的药物中的用途。此外, 本发明涉及包括所述化合物的药物组合物。

[0142] 一般而言, 本发明的药物组合物包括治疗有效量的治疗剂和药学上可接受的载体。在一个特别实施方案中, 术语“药学上可接受的”意指由联邦管理机构或州政府批准或在美国药典或其他一般公认的药典中列出用于在动物且更特别地在人中使用。术语“载体”指治疗剂与之一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。此类药学载体可以是无菌液体, 例如水和油, 包括石油、动物、蔬菜或合成起源的那些, 包括但不限于花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当药物组合物经口施用, 水是优选载体。当药物组合物静脉内施用, 盐水和含水右旋糖是优选载体。盐水溶液和含水右旋糖和甘油溶液优选用于可注射溶液的液体载体。合适的药学赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。需要时, 组合物还可以包含微量湿润剂或乳化剂、或 pH 缓冲剂。这些组合物可以采取溶液、悬浮液、乳状液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、持续释放制剂等的形式。组合物可以用常规粘合剂和载体例如甘油三酯配制为栓剂。经口制剂可以包括标准载体例如药学级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适药学载体的例子由 E. W. Martin 在“Remington's Pharmaceutical Sciences”中描述。此类组合物将包含治疗有效量的优选以纯化形式的治疗剂, 连同合适量的载体, 以便提供用于适当施用于患者的形式。制剂应适合施用方式。

[0143] 在一个优选实施方案中, 依照常规操作, 组合物配制为适合于静脉内施用于人类的药物组合物。一般地, 用于静脉内施用的组合物是在无菌等渗水缓冲液中的溶液。需要时, 组合物还可以包括增溶剂和局部麻醉剂例如利多卡因, 以减轻注射部位处的疼痛。一般地, 成分分开供应或以单位剂型混合在一起, 例如, 作为在指示活性剂的量的密封容器例如

安瓿或囊（原文为 sachette, 疑为 sachet）中的干燥冻干粉末或无水浓缩物。当组合物待通过输注施用，它可以用包含无菌药理学级别的水或盐水的输液瓶调配。当组合物通过注射施用，可以提供注射用无菌水或盐水的安瓿，从而使得成分可以在施用前进行混合。

[0144] 本发明的治疗剂可以配制为中性或盐形式。药学上可接受的盐包括由游离羧基形成的那些，例如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些，由游离胺基形成的那些，例如衍生自异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些，以及衍生自氢氧化钠、钾、铵、钙和铁等的那些。

[0145] 在治疗特定病症或病状中有效的本发明的治疗剂的量将依赖于病症或病状的性质，并且可以通过标准临床技术进行测定。此外，可以任选采用体外测定法，以帮助鉴定最佳剂量范围。在制剂中待采用的精确剂量还将依赖于施用途径、和疾病或病症的严重程度，并且应根据从业者的判断和每个患者的情况来决定。然而，用于静脉内施用的合适剂量范围一般是约 20-500 微克活性化合物 / 千克体重。用于鼻内施用的合适剂量范围一般是约 0.01pg/kg 体重至 1mg/kg 体重。有效剂量可以从衍生自体外或动物模型测试系统的剂量应答曲线进行推断。一般而言，栓剂可以包含 0.5 重量% 至 10 重量% 的活性成分；经口制剂优选包含 10% 至 95% 的活性成分。

[0146] 各种递送系统是已知的，并且可以用于施用本发明的治疗剂，例如在脂质体、微粒和微胶囊中封装；能够表达治疗剂的重组细胞的使用，受体介导的内吞作用的使用（例如 Wu 和 Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262 :4429-4432）；治疗核酸作为逆转录病毒或其他载体的部分的构建等。引入的方法包括但不限于真皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜上和经口途径。化合物可以通过任何方便的途径进行施用，例如通过输注、通过弹丸注射、通过经过上皮或皮肤粘膜衬里（例如、口腔、直肠和肠粘膜等）吸收，并且可以连同其他生物学活性剂一起施用。施用可以是全身或局部的。此外，可能希望通过任何合适的途径包括心室内和鞘内注射，将本发明的药物组合物引入中枢神经系统内；通过例如与贮器（例如 Ommaya 贮器）附着的心室内导管可以促进心室内注射。还可以采用肺施用，例如通过使用吸入器或喷雾器，和用雾化试剂配制。

[0147] 在一个特别实施方案中，可能希望将本发明的药物组合物局部施用于需要治疗的区域。这可以例如通过但不限于在手术过程中的局部输注、局部应用例如在手术后与创伤辅料结合、通过注射、借助于导管、借助于栓剂、或借助于埋植剂，所述埋植剂是多孔、非多孔或凝胶状材料，包括膜例如 sialastic 膜或纤维。在一个实施方案中，施用可以是通过在恶性肿瘤或赘生或赘生前组织的部位（或先前部位）处的直接注射。

[0148] 在另一个实施方案中，治疗剂可以在囊泡特别是脂质体中进行递送（Langer, 1990, Science 249 :1527-1533）。

[0149] 在另外一个实施方案中，治疗剂可以经由控制释放系统进行递送。在一个实施方案中，可以使用泵（Langer, 同上）。在另外一个实施方案中，控制释放系统可以放置在治疗靶即脑的附近，从而仅需要全身剂量的一部分。

[0150] 在本发明的背景中，已发现苯基噻唑配体 1 是关于 ATM、ATR、DNAPK 和 mTOR 的配体。因此，本发明还涉及用于鉴定与 ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 相互作用的化合物的方法。这些方法如上文在 PI3K 相互作用化合物鉴定的背景中所述来执行。此外，在本发明内设想用于鉴定 ATM、ATR、DNAPK 或 mTOR 相互作用化合物的这些方法可以包含或不包含下述

步骤:测定给定化合物是否还能够与如本发明中限定的其他 PIKK 激酶相互作用。

[0151] 本发明进一步涉及用于纯化 ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 的方法,其包括步骤

[0152] a) 提供包含所述蛋白质中的一种或多种的蛋白质制剂,

[0153] b) 在允许苯基噻唑配体 1-蛋白质复合物形成的条件下,使蛋白质制剂与固定在固体支持物上的苯基噻唑配体 1 接触,和

[0154] c) 使蛋白质与经固定的苯基噻唑配体 1 分离。

[0155] 如上所述,已令人惊讶地发现苯基噻唑配体 1 是识别这些蛋白质的配体。这使得用于这些蛋白质的有效纯化方法成为可能。

[0156] 如上文对于本发明的鉴定方法限定的实施方案也应用于本发明的纯化方法。

[0157] 优选地,所述纯化如上所述使用同种型特异性抗体来执行。

[0158] 在一个优选实施方案中,本发明的纯化方法在步骤 c) 后进一步包括鉴定能够与 ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 结合的蛋白质。当在基本生理条件下执行复合物的形成时,这是特别有利的,因为随后有可能保存酶的自然条件,所述自然条件包括结合配偶体的存在、酶亚单位或翻译后修饰,这随后可以借助于质谱法 (MS) 进行鉴定。

[0159] 因此,在一个优选实施方案中,本发明的纯化方法在步骤 c) 后进一步包括测定给定蛋白质是否例如通过遍在蛋白修饰进行进一步翻译后修饰。

[0160] 本发明进一步涉及苯基噻唑配体 1 用于鉴定 ATM、ATR、DNAPK 和 / 或 mTOR 相互作用化合物和用于纯化 PI3K 的用途。如上限定的实施方案也应用于本发明的用途。

[0161] 在本发明的一个优选实施方案,不仅苯基噻唑配体 1,而且另外一种配体可以用于鉴定相互作用化合物,即如图 16 中所示的苯替吗啉-色原 (phenylmorpholin-chromen) 配体 (8-(4-氨基甲基-苯基)-2-吗啉-4-基-色原 (chromen)-4-酮) 或其衍生物,例如这样的化合物,其包含等同核心但具有另一个接头,优选与并非环状结构的部分的氮偶联,用于与固体支持物连接。因此,在本发明的这些实施方案中,固定 2 种配体。在这个背景中,在使用珠的情况下,包括固定在相同珠上的 2 种配体,或一种配体固定在一珠上,并且另一种配体固定在另一珠上。在这个背景中,一般地接头具有 8、9 或 10 个原子的主链。接头可以包含羧基、羟基或氨基活性基团。

[0162] 本发明通过下述附图和实施例进行进一步举例说明,所述附图和实施例不视为关于由本申请的权利要求赋予的保护范围的限制。

[0163] 附图简述

[0164] 图 1:苯基噻唑配体 1 的合成和结构。

[0165] 苯基噻唑配体 1 如实施例 1 中所述进行合成。

[0166] 图 2:用经固定的苯基噻唑配体 1 的药物牵出 (pulldown) 实验和 PI3K 蛋白质的蛋白质印迹检测。

[0167] 作为生物材料,使用由 MOLT-4 细胞制备的细胞裂解物。药物牵出实验如实施例 2 中所述进行,使用包含 50mg 蛋白质的裂解物样品。经捕获的蛋白质用包含 DMSO 的缓冲液 (泳道 1)、100  $\mu$  M 游离苯基噻唑配体 1 或 SDS 样品缓冲液 (泳道 3) 进行洗脱。经洗脱的样品在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行分离,并且转移至膜。印迹首先与针对 PI3K  $\gamma$  (图 2A) 和 PI3K  $\delta$  (图 2B) 的特异性抗体温育。由用于检测的荧光染料标记的第二检测抗体与 Odyssey 红外成像系统一起使用。

- [0168] 泳道 1 :DMSO 洗脱对照 ;泳道 2 :用 100  $\mu$  M 游离苯基噻唑配体 1 洗脱 ;
- [0169] 泳道 3 :SDS 洗脱。
- [0170] 图 3 :用于蛋白质的质谱分析的用经固定的苯基噻唑配体 1 的药物牵出实验。
- [0171] 显示了在用考马斯亮蓝染色后的蛋白质凝胶。所指示的凝胶区域作为凝胶切片切掉,并且对蛋白质实施通过质谱法的分析。
- [0172] 药物牵出实验如实施例 2 中所述进行,使用包含 50mg 蛋白质的 MOLT-4 细胞裂解物样品。用 SDS 样品缓冲液洗脱与经固定的苯基噻唑配体 1 结合的蛋白质,并且通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分离。
- [0173] 图 4 :PI3K  $\gamma$  鉴定的肽。
- [0174] 通过人 PI3K  $\delta$  序列的质谱分析鉴定的肽以粗体且加下划线显示。
- [0175] 图 5 :PI3K  $\delta$  鉴定的肽。
- [0176] 通过人 PI3K  $\gamma$  序列的质谱分析鉴定的肽以粗体且加下划线显示。
- [0177] 图 6 :用于鉴定 PI3K  $\gamma$  相互作用化合物的洗脱测定法。
- [0178] 实验如实施例 3 中所述进行。PI3K  $\gamma$  蛋白质通过经固定的苯基噻唑配体 1 从 MOLT-4 细胞裂解物中捕获,并且如所示的通过化合物洗脱。将洗脱物转移至硝酸纤维素膜,并且用 Odyssey 红外成像系统检测 PI3K  $\gamma$ 。第一抗体:抗 PI3K  $\gamma$  (Jena Bioscience ABD-026S ;小鼠抗体)。第二抗体:抗小鼠 IRDye800 (Rockland,610-732-124)。显示了累积强度 (累积 kilopixel/mm<sup>2</sup>)。
- [0179] 用于洗脱的化合物 :
- [0180] 化合物 1 (LY294002) ;IC<sub>50</sub> > 100  $\mu$  M ;化合物 2 (AS-605240) :IC<sub>50</sub> = 26nM ;化合物 3 (AS-604850) ;IC<sub>50</sub> = 1.7  $\mu$  M,
- [0181] 图 7 :用于鉴定 PI3K  $\gamma$  相互作用化合物的竞争结合测定法。
- [0182] 实验如实施例 4 中所述进行。将以所示浓度的测试化合物和亲和基质加入 MOLT-4 细胞裂解物中,并且通过在亲和基质上经固定的苯基噻唑配体 1 捕获不与测试化合物相互作用的 PI3K  $\gamma$  蛋白质。使亲和基质与裂解物分离,并且用 SDS 样品缓冲液洗脱结合的蛋白质,并且将洗脱物转移至硝酸纤维素膜。用 Odyssey 红外成像系统测定 PI3K  $\gamma$  的量。
- [0183] 7A :用抗体探测的斑点印迹,和用 Odyssey 红外成像系统检测的信号。第一抗体:抗 PI3K  $\gamma$  (Jena Bioscience ABD-026S ;小鼠抗体)。第二抗体:抗小鼠 IRDye800 (Rockland,610-732-124)。
- [0184] 7B :竞争结合曲线。针对化合物浓度标绘相对 Odyssey 单位 (累积强度 ;累积 kilopixel/mm<sup>2</sup>),并且计算一半最大结合竞争 (IC) 值。化合物 1 (LY294002) :IC<sub>50</sub> > 30  $\mu$  M ;化合物 2 (AS-605240) :IC<sub>50</sub> = 4.6  $\mu$  M ;化合物 3 (AS-604850) :IC<sub>50</sub> = 176nM。
- [0185] 图 8 :通过将化合物加入细胞裂解物中 (裂解物测定法) 或通过使化合物与活的 RAW264.7 细胞温育 (细胞测定法) 的化合物概况分析。
- [0186] 实验如实施例 5 中所述进行。化合物以 10  $\mu$  M 的浓度在 2 种测定法中使用,并且 PI3K  $\delta$  的量用 Odyssey 红外成像系统进行定量。
- [0187] 图 9 :使用质谱法定量的 PI3K 抑制剂的选择性概况分析。
- [0188] 实验在如实施例 6 中所述作为在 Ramos 细胞裂解物中的 Kinobeads 竞争结合测定法执行。基于定量质谱法,显示了关于个别靶的 IC<sub>50</sub> 值 ( $\mu$  M) 的概况分析。

[0189] A :化合物 CZC00015097

[0190] B :化合物 CZC00018052

[0191] C :化合物 CZC00019091

[0192] 图 10 :化合物 CZC18052 的剂量应答曲线。

[0193] 化合物用激酶的多路免疫检测在竞争结合测定法中进行测试,如实施例 7 中所述。在单个测定法中,测量了化合物对于 PI3K  $\alpha$ 、PI3K  $\beta$ 、PI3K  $\gamma$ 、PI3K  $\delta$  和 DNAPK 的结合亲和力。简言之,使 Molt-4 和 Jurkat 细胞裂解物的 1 : 1 混合物与亲和基质(具有经固定的苯基噻唑配体 1 的珠和具有苯替吗啉-色原配体的珠 1 : 1 混合物)和化合物 CZC18052 温育。洗涤珠,并且洗脱结合的激酶。将洗脱物的等分试样点在 5 个不同的硝酸纤维素膜上,其各自与分别的靶抗体温育且随后与荧光第二抗体温育。使用红外扫描仪定量荧光信号。化合物显示对于下述激酶范围的有效结合:

[0194] PI3K  $\alpha$  ( $IC_{50} = 0.027 \mu M$ )、PI3K  $\beta$  ( $IC_{50} = 0.034 \mu M$ )、PI3K  $\gamma$  ( $IC_{50} = 0.43 \mu M$ )、PI3K  $\delta$  ( $IC_{50} = 0.14 \mu M$ ) 和 DNAPK ( $IC_{50} = 0.038 \mu M$ )。

[0195] 图 11 :关于化合物 CZC19950 的剂量应答曲线。

[0196] 实验如实施例 7 中所述进行。化合物显示与下述激酶的结合:PI3K  $\alpha$  ( $IC_{50} > 7 \mu M$ )、PI3K  $\beta$  ( $IC_{50} = 1.7 \mu M$ )、PI3K  $\gamma$  ( $IC_{50} = 0.17 \mu M$ )、PI3K  $\delta$  ( $IC_{50} > 3 \mu M$ ) 和 DNAPK ( $IC_{50} > 6 \mu M$ )。化合物 CZC19950 显示仅与 PI3K  $\gamma$  的有效结合 ( $IC_{50} = 0.17 \mu M$ )。

[0197] 图 12 :用于蛋白质的质谱分析的用经固定的苯基噻唑配体 1 的药物牵出实验。

[0198] 显示了在用考马斯亮蓝染色后的蛋白质凝胶。所指示的凝胶区域作为凝胶切片切掉,并且对蛋白质实施通过质谱法的分析。药物牵出实验如实施例 2 中所述进行,使用包含 50mg 蛋白质的 Jurkat 和 Ramos 细胞裂解物样品的 1 : 1 混合物。用 SDS 样品缓冲液洗脱与经固定的苯基噻唑配体 1 结合的蛋白质,并且通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分离。在这个实验中鉴定了下述蛋白质:DNA-PK、ATM 和 mTOR。

[0199] 图 13 :在用经固定的苯基噻唑配体 1 的药物牵出后,通过 DNA-PK 的质谱法鉴定的肽。经鉴定的肽是加下划线的。

[0200] 图 14 :在用经固定的苯基噻唑配体 1 的药物牵出后,通过 ATM 的质谱法鉴定的肽。

[0201] 图 15 :在用经固定的苯基噻唑配体 1 的药物牵出后,通过 mTOR 的质谱法鉴定的肽。

[0202] 图 16 :苯替吗啉-色原配体 (8-(4-氨基甲基-苯基)-2-吗啉-4-基-色原-4-酮) 的合成和结构。配体如实施例 8 中所述进行合成。显示了配体的结构 [G]。

[0203] 图 17 :用于蛋白质的质谱分析的用经固定的苯替吗啉-色原配体的药物牵出实验。

[0204] 显示了在用考马斯亮蓝染色后的蛋白质凝胶。所指示的凝胶区域作为凝胶切片切掉,并且对蛋白质实施通过质谱法的分析。药物牵出实验如实施例 2 中所述进行,使用包含 50mg 蛋白质的 HeLa 和 K-562 细胞裂解物样品的 1 : 1 混合物。用 SDS 样品缓冲液洗脱与苯替吗啉-色原配体结合的蛋白质,并且通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分离。

[0205] 图 18 :在用经固定的苯替吗啉-色原配体从 HeLa-K562 裂解物混合物中的药物牵出后,通过人 ATR 的质谱法鉴定的肽。

[0206] 图 19 :在用经固定的苯替吗啉 - 色原配体从 HeLa-K562 裂解物混合物中的药物牵出后,通过人 ATM 的质谱法鉴定的肽。

[0207] 图 20 :在用经固定的苯替吗啉 - 色原配体从 HeLa-K562 裂解物混合物中的药物牵出后,通过人 mTOR 的质谱法鉴定的肽。

[0208] 实施例 1 :亲和基质的制备

[0209] 这个实施例举例说明了用于从细胞裂解物亲和捕获 PI3K 激酶的亲和基质的制备。捕获配体使用氨基官能团共价通过共价连接固定在固体支持物上。这种亲和基质在实施例 2、实施例 3 和实施例 4 中使用。

[0210] 苯基噻唑配体 1(3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺盐酸盐)的合成

[0211] 步骤 1-3 :根据 WO 2003/072557 中描述的操作制备 1-溴-1-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-丙-2-酮

[0212] 步骤 4 :5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基胺

[0213] 使 1-溴-1-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-丙-2-酮 (480mg 1.5mmol) 和硫脲 (114mg 1.5mmol) 在乙醇 (12ml) 中相组合,并且加热至 70℃ 2 小时。允许反应混合物冷却至室温,并且通过过滤收集固体产物,并且在真空下干燥,以得到作为灰白色固体的 5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基胺 (375mg)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.4(br s, 2H), 8.0(d, 1H), 7.9(d, 1H), 7.8(dd, 1H), 3.4(s, 3H), 2.3(s, 3H)。

[0214] 步骤 5 : (2-{2-[2-(2-{2[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基氨基甲酰]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙基)-氨基甲酸叔丁酯

[0215] 使 3-(2-{2-[2-(2-叔丁氧基羰基氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-丙酸 (690mg 1.9mmol)、EDAC(403mg 2.1mmol)、HOBt(284mg 2.1mmol)、NMM(420uL 3.8mmol) 和 5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基胺 (520mg 1.7mmol) 在二甲基甲酰胺 (16ml) 中相组合,并且在室温下搅拌过夜。在减压下去除溶剂,并且使残基溶解于二氯甲烷 (150ml) 中,用 1M HCl 水溶液 (50ml) 和饱和含水碳酸氢钠 (50ml) 洗涤,干燥 (硫酸镁),过滤并且蒸发。通过使用 50g IST 硅快速药筒用 0-2% 甲醇 / 二氯甲烷洗脱的快速色谱法纯化残渣,以得到作为油的 (2-{2-[2-(2-{2[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基氨基甲酰]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙基)-氨基甲酸叔丁酯 (存在 1.1g 残留溶剂)<sup>1</sup>H NMR(400MHz CDCl<sub>3</sub>) 10.3(br s, 1H), 8.2(s, 1H), 7.6(m, 2H), 7.2(br s, 1H), 3.9(t, 2H) 3.8-3.5(br m, 14H), 3.3(br m, 5H), 2.8(t, 2H), 2.4(s, 3H), 1.4(s, 9H)。

[0216] 步骤 6 :3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺盐酸盐

[0217] 使 (2-{2-[2-(2-{2[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2-基氨基甲酰]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙基)-氨基甲酸叔丁酯 (1.0g 1.5mmol) 溶解于二氯甲烷 (10ml) 中,并且用 HCl(4ml 在二噁烷中的 4M 溶液) 处理。使反应在室温下搅拌 3 小时。使溶剂蒸发,并且使残渣在真空下干燥,以得到作为黄色粘稠油的 3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-N-[5-(4-氯-3-甲磺酰基-苯基)-4-甲基-噻唑-2基]-丙酰胺盐酸盐 (存在 830mg 残留溶剂)<sup>1</sup>H NMR(400MHz

CDC13) 8.4 (br s, 3H), 8.2 (s, 1H), 7.7 (br d, 1H), 7.6 (br d, 1H) 3.9 (br m, 4H), 3.8-3.6 (br m, 12H), 3.3 (s, 3H), 3.3 (br m, 2H), 3.1 (br m, 2H), 2.6 (s, 3H)。NMR 谱在 Bruker dpx400 上获得。

[0218] 表 1: 使用的缩写

[0219]

br	宽
CDC13	氘代氯仿
d	双重峰
dd	双重峰的双重峰
DMSO	二甲基亚砷
EDAC	1-乙基-3-(3'-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺
g	克
HCl	盐酸
HOBt	N-羟基苯并三唑
m	多重峰
mg	毫克
ml	毫升
mmol	毫摩尔
M	摩尔
MHz	兆赫
NMM	N-甲基吗啉
NMR	核磁共振
q	四重峰
s	单重峰
t	三重峰

[0220] 苯基噻唑配体 1 固定在珠（亲和基质）上

[0221] NHS活化的Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, 17-0906-01) 用无水

DMSO(二甲基亚砜, Fluka, 41648, H<sub>2</sub>O ≤ 0.005%) 进行平衡。将 1ml 沉降珠置于 15ml Falcon 管中, 加入化合物母液(通常为在 DMF 或 DMSO 中 100mM)(终浓度 0.2-2 μmol/ml 珠)以及 15 μl 三乙胺(Sigma, T-0886, 99% 纯)。珠在室温下在黑暗中在立式(end-over-end)振荡器(Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.)上温育 16-20 小时。通过 HPLC 测定偶联效率。通过在室温下在立式振荡器上与氨基乙醇温育过夜来封闭非反应的 NHS 基团。珠用 10ml DMSO 进行洗涤, 并且在异丙醇中贮藏于 -20°C 下。这些珠在实施例 2、3 和 4 中用作亲和基质。如上所述通过与氨基乙醇温育封闭 NHS 基团而产生对照珠(未固定配体)。

[0222] 实施例 2: 使用经固定的苯基噻唑配体 1 的 PI3K 的药物牵出这个实施例证实了经固定的苯基噻唑配体 1 用于从人 T 细胞系(MOLT-4 细胞; ATCC 编号 CRL-1582)的细胞裂解物中鉴定 PI3K 蛋白质的用途。为此, 使 MOLT-4 细胞的裂解物与实施例 1 中描述的亲和基质接触。通过蛋白质印迹和质谱(MS)分析鉴定与苯基噻唑配体 1 结合的蛋白质。

[0223] 对于蛋白质印迹分析, 结合的蛋白质从亲和基质中进行洗脱, 并且随后通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。用特异性抗体检测 PI3K γ 和 PI3K δ(图 2)。蛋白质印迹分析的结果显示经固定的苯基噻唑配体 1 从细胞裂解物中捕获(牵出)PI3K γ 和 PI3K δ。

[0224] 对于通过质谱分析的蛋白质鉴定, 将由亲和基质捕获的蛋白质进行洗脱, 并且随后通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离(图 3)。切掉合适的染色条带, 并且实施用胰蛋白酶的凝胶内蛋白水解消化, 并且通过 LC-MS/MS 质谱法进行分析。

[0225] PI3K 家族成员的鉴定在表 3 中得到证明。PI3K γ 的肽序列覆盖显示于图 4 中, 并且对于 PI3K δ 显示于图 5 中。

### [0226] 1. 细胞培养

[0227] MOLT-4 细胞(ATCC 编号 1582)在 1 升旋转瓶(Integra Biosciences, #182101)中在补充有 10% 胎牛血清(Invitrogen)的 RPMI 1640 培养基(Invitrogen, #21875-034)中以 0.15x10<sup>6</sup> 至 1.2x10<sup>6</sup> 细胞/ml 的密度悬浮生长。细胞通过离心进行收获, 用 1xPBS 缓冲液(Invitrogen, #14190-094)洗涤 1 次, 并且使细胞团块在液氮中冷冻, 并且随后贮藏于 -80°C。

### [0228] 2. 细胞裂解物的制备

[0229] 使 MOLT-4 细胞在 Potter S 匀浆器中在裂解缓冲液中进行匀浆化处理: 50mM Tris-HCl, 0.8% NP40, 5% 甘油, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM NaF, 1mM 正钒酸钠, 1mM DTT, pH 7.5。加入一片完整的无 EDTA 片(蛋白酶抑制剂混合物(cocktail), Roche Diagnostics, 1873 580)/25ml 缓冲液。材料使用机械化的 POTTER S dounced 10 次, 转移至 50ml falcon 管, 在冰上温育 30 分钟, 并且在 20,000g 下于 4°C 旋转 10 分钟(在 Sorvall SLA600 中 10,000rpm, 预冷却)。将上清液转移至超速离心机(UZ)聚碳酸酯管(Beckmann, 355654), 并且在 100,000g 下于 4°C 旋转 1 小时(在 Ti50.2 中 33,500rpm, 预冷却)。将上清液转移至新鲜的 50ml falcon 管, 通过 Bradford 测定法(BioRad)测定蛋白质浓度, 并且制备包含 50mg 蛋白质/等分试样的样品。样品立即用于实验或在液氮中冷冻且冷冻贮藏于 -80°C。

### [0230] 3. 化合物牵出实验

[0231] 具有经固定的化合物的 Sepharose 珠 (100  $\mu$  l 珠 / 牵出实验) 在裂解缓冲液中平衡, 并且与包含 50mg 蛋白质的细胞裂解物样品一起在立式振荡器 (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.) 上于 4°C 温育 2 小时。收集珠, 转移至 Mobicol- 柱 (MoBiTech 10055), 并且用包含 0.5% NP40 去污剂的 10ml 裂解缓冲液洗涤, 随后用具有 0.25% 去污剂的 5ml 裂解缓冲液洗涤。为了洗脱结合的蛋白质, 加入 60  $\mu$  l 2xSDS 样品缓冲液, 使柱在 50°C 下加热 30 分钟, 并且通过离心将洗脱物转移至微量离心管。随后通过 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质。

#### [0232] 4. 通过蛋白质印迹分析的蛋白质检测

[0233] 根据标准操作执行蛋白质印迹, 并且通过使用特异性抗 PI3K 抗体 (第一抗体)、荧光标记的第二抗体和来自 LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA) 的 Odyssey 红外成像系统检测且定量 PI3K 蛋白质, 并根据由制造商提供的说明书 (Schutz-Geschwendener 等人, 2004. Quantitative, two-color Western blot detection with infrared fluorescence. 2004 年 5 月由 LI-COR Biosciences 公开, www.licor.com)。

[0234] 小鼠抗 PI3K  $\gamma$  抗体 (Jena Bioscience, 目录号 ABD-026S) 以 1 : 200 的稀释度使用, 并且与印迹一起于 4°C 温育过夜。抗小鼠 IRDye™800 第二抗体 (Rockland, 目录号 610-732-124) 以 1 : 15000 的稀释度使用。兔抗 PI3K  $\delta$  抗体 (Santa Cruz, 目录号 sc-7176) 1 : 600 稀释, 并且于 4°C 温育过夜。作为第二检测抗体, 抗兔 IRDye™ 800 抗体 1 : 20000 稀释 (LICOR, 目录号 926-32211)。

#### [0235] 5. 通过质谱法的蛋白质鉴定

##### [0236] 5.1 在质谱分析前的蛋白质消化

[0237] 基本上根据由 Shevchenko 等人, 1996, Anal. Chem. 68 :850-858 描述的操作, 使凝胶分离的蛋白质在凝胶中还原, 烷基化且消化。简言之, 使用干净的解剖刀从凝胶中切下凝胶分离的蛋白质, 使用 10mM DTT 进行还原 (在 5mM 碳酸氢铵中, 54°C, 45 分钟), 并且随后用 55mM 碘乙酰胺 (在 5mM 碳酸氢铵中) 在室温下在黑暗中进行烷基化 (30 分钟)。还原且烷基化的蛋白质在凝胶中用猪胰蛋白酶 (Promega) 以在 5mM 碳酸氢铵中 12.5ng/ $\mu$  l 的蛋白酶浓度进行消化。允许消化在 37°C 下进行 4 小时, 并且随后使用 5  $\mu$  l 5% 甲酸终止反应。

##### [0238] 5.2 在通过质谱法分析前的样品制备

[0239] 凝胶塞用 20  $\mu$  l 1% TFA 萃取 2 次, 并且与酸化的消化上清液合并。使样品在真空离心机中干燥, 并且重悬浮于 10  $\mu$  l 0.1% 甲酸中。

##### [0240] 5.3. 质谱法数据采集

[0241] 将肽样品注入纳米 LC 系统 (CapLC, Waters 或 Ultimate, Dionex) 内, 所述纳米 LC 系统与四级 TOF (QTOF2, QTOF Ultima, QTOF Micro, Micromass) 或离子陷阱 (LCQ Deca XP) 质谱仪直接偶联。肽在 LC 系统上进行分离, 使用水和有机溶剂的梯度 (参见下文)。溶剂 A 是在 0.5% 甲酸中的 5% 乙腈, 并且溶剂 B 是在 0.5% 甲酸中的 70% 乙腈。

[0242] 表 2 : 从 LC 系统中洗脱的肽在质谱仪内进行部分测序。

[0243]

时间 (分钟)	溶剂 A%	溶剂 B%

<u>0</u>	<u>95</u>	<u>5</u>
<u>5.33</u>	<u>92</u>	<u>8</u>
<u>35</u>	<u>50</u>	<u>50</u>
<u>36</u>	<u>20</u>	<u>80</u>
<u>40</u>	<u>20</u>	<u>80</u>
<u>41</u>	<u>95</u>	<u>5</u>
<u>50</u>	<u>95</u>	<u>5</u>

[0244] 5.4. 蛋白质鉴定

[0245] 在 LC-MS/MS 实验中产生的肽质量和断裂数据用于查询在 NCBI (关于 NCBI nr、dbEST 以及人和小鼠基因组) 和 European Bioinformatics Institute (EBI, 关于人、小鼠、黑腹果蝇 (*D. melanogaster*) 和线虫蛋白质组数据库) 维持且定期更新的 fasta 格式化的蛋白质和核苷酸序列数据库。使用软件工具 Mascot (Matrix Science; Perkins 等人, 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567), 通过使所测量的肽质量和断裂数据与从数据库中的实体计算的相同数据相关联来鉴定蛋白质。搜索标准依赖于何种质谱仪用于分析而改变。

[0246] 表 3: 通过质谱法鉴定的 PI3K 蛋白质 (MOLT-4 细胞; 实验 P15234B; MS 样品指从聚丙烯酰胺凝胶中切掉的凝胶切片 (图 3))。

[0247]

MS 样品	蛋白质登记号 (IPI)	蛋白质名称	经鉴定的肽的数目
4	IPI00070943.3	PIK4CA; 磷脂酰肌醇 4-激酶, 催化, $\alpha$ 多肽	62
5	IPI00024006.1	PIK3R4; 磷酸肌醇-3-激酶, 调节亚单位 4, p150	11
6	IPI00292690.1	PIK3CG; 磷酸肌醇-3-激酶, 催化, $\gamma$ 多肽	39
6	IPI00298410.2	PIK3CD; 磷酸肌醇-3-激酶, 催化, $\delta$ 多肽	26
7	IPI00298410.2	PIK3CD; 磷酸肌醇-3-激酶, 催化, $\delta$ 多肽	12
8	IPI00002591.3	PIK4CB; 磷脂酰肌醇 4-激酶, 催化, $\beta$ 多肽	15
9	IPI00021448.1	PIK3R1; 磷酸肌醇-3-激酶, 调节亚单位 1 (p85 $\alpha$ )	27
9	IPI00011736.3	PIK3R2; 磷酸肌醇-3-激酶, 调节亚单位 2 (p85 $\beta$ )	8
14	IPI00333040.3	PIK3R1; 磷酸肌醇-3-激酶, 调节亚单位 1 (p85 $\alpha$ )	7

[0248] 实施例 3:用于鉴定 PI3K  $\gamma$  相互作用化合物的洗脱测定法

[0249] 如实施例 1 中所述完成苯基噻唑配体 1 亲和基质的制备。为了在 96 孔平板中最大限度地筛选 80 种化合物,如下所述执行洗脱实验。

[0250] 洗脱测定法

[0251] 亲和基质 (1200  $\mu$ l 珠) 用 30ml 1x DP 缓冲液洗涤 2x。在每个洗涤步骤后,通过在 Heraeus 离心机中在 1200rpm 下于 4°C 离心 2 分钟收集珠。弃去上清液。最后,使珠在 15ml 结合缓冲液 (1x DP 缓冲液 /0.4% NP40) 中平衡。在这个温育时间后,收获珠,并且在 50ml falcon 管中与 MOLT-4 细胞裂解物相混合 (以 5mg/ml 的蛋白质浓度),其中总量为 75mg 蛋白质。裂解物的制备如实施例 2 中所述完成。使珠和裂解物在 4°C 下温育 2 小时。在与裂解物温育后,珠如所述的通过离心进行收集,并且转移至 2ml 柱 (MoBiTec, #S10129),并且用 10ml 1x DP 缓冲液 /0.4% NP40 和 5ml 1x DP 缓冲液 /0.2% NP40 洗涤。一旦洗涤缓冲液已运行完全通过柱后,计算柱中留下的珠的体积 (约 1000  $\mu$ l)。使珠重悬浮于 4 倍过量的 1x DP 缓冲液 /0.2% NP40 (4ml) 中,以产生 20% 浆。对于化合物洗脱测试,将 50  $\mu$ l 这种悬浮液加入 96 孔平板 (Millipore MultiScreenHTS, MSBVN1210, 具有盖和 1.2 $\mu$ m 亲水的低蛋白质结合 Durapore 膜) 的每个孔中。为了去除残留缓冲液,使 96 孔平板与 Assemble 过滤器和收集平板装配,并且使这种夹层装配在离心机中在 800rpm 下旋转 10 秒。随后将补充有测试化合物的 40  $\mu$ l 洗脱缓冲液 (1x DP 缓冲液 /0.2% NP40) 加入珠中。从在 DMSO 中的 40

倍浓缩母液开始通过使其在稀释缓冲液中稀释来制备测试化合物。使平板装配上收集平板上,固定在Eppendorf温箱上,并且于4°C在650rpm振荡下温育30分钟。为了收获洗脱物,使装配在96孔收集平板上的96孔过滤平板在800rpm下在台式离心机中于4°C(Heraeus)离心1分钟。通过使用斑点印迹操作,就PI3K $\gamma$ 和PI3K $\delta$ 的存在检查洗脱物。

[0252] 经洗脱的PI3K $\gamma$ 的检测

[0253] 通过斑点印迹操作,使用针对PI3K $\gamma$ 的抗体(Jena Bioscience, #ABD-026S)、荧光标记的第二抗小鼠IRDye™ 800(Rockland, #610-732-124)和来自LI-COR Biosciences(Lincoln, Nebraska, USA)的Odyssey红外成像系统检测且定量经洗脱的PI3K $\gamma$ 蛋白质,且根据由制造商提供的说明书(Schutz-Geschwendener等人,2004. Quantitative, two-color Western blot detection with infrared fluorescence. 2004年5月由LI-COR Biosciences公开, www.licor.com)。

[0254] 硝酸纤维素膜用20%乙醇处理,并且随后用1x PBS缓冲液洗涤。使洗脱物(如上所述)与12 $\mu$ l 4x SDS上样缓冲液(200mM Tris-HCl pH6.8, 8% SDS、40%甘油、0.04%溴酚蓝)相组合,并且用斑点印迹装置(BioRad, #170-6545)应用于硝酸纤维素膜。

[0255] 对于PI3K $\gamma$ 的检测,膜首先通过与Odyssey封闭缓冲液温育1小时进行封闭。经封闭的膜与第一抗体(来自Jena Bioscience的小鼠抗PI3K $\gamma$ , ABD-026S)于4°C温育16小时,所述第一抗体在补充有0.2% Tween 20的Odyssey封闭缓冲液中1:100稀释。在膜用包含0.1% Tween 20的1x PBS缓冲液洗涤4次共5分钟后,使膜与检测抗体(来自Rockland的抗小鼠IRDye™ 800, 610-732-124)温育40分钟,所述检测抗体在补充有0.2% Tween 20的Odyssey封闭缓冲液中1:10000稀释。然后,膜用1x PBS缓冲液/0.1% Tween 20洗涤4次共5分钟,并且用1x PBS缓冲液洗涤1次共5分钟。然后膜用Odyssey阅读器进行扫描,并且分析数据。

[0256] 表4:5x-DP缓冲液的制备

[0257]

物质:	母液	在1x裂解缓冲液中的终浓度	对于11.5x裂解缓冲液加入
Tris/HCl pH 7.5	1 M	50 mM	250 ml
甘油	87 %	5 %	288 ml
MgCl <sub>2</sub>	1 M	1.5 mM	7.5 ml
NaCl	5 M	150 mM	150 ml
Na <sub>2</sub> VO <sub>4</sub>	100 mM	1 mM	50 ml

[0258] 使5x-DP缓冲液经过0.22 $\mu$ m过滤器过滤,并且以40ml等分试样贮藏于-80°C。这些溶液得自下述供应商:1.0M Tris/HCl pH 7.5(Sigma, T-2663)、87%甘油(Merck, 目录号04091.2500);1.0M MgCl<sub>2</sub>(Sigma, M-1028);5.0M NaCl(Sigma, S-5150)。

[0259] 用于洗脱的测试化合物

[0260] 在如下所述稀释后,下文列出的测试化合物用于洗脱实验。一般地,所有化合物都在100% DMSO(Fluka, 目录号41647)中以100mM或50mM的浓度溶解。化合物贮藏于-20°C下。测试化合物用于洗脱实验的稀释:通过用100% DMSO 1:1稀释100mM原液制备50mM

原液。对于洗脱实验,用洗脱缓冲液(1x DP 缓冲液 /0.2% NP40)进一步稀释化合物。

[0261] 用于洗脱的化合物:

[0262] 化合物 1:PI3K 抑制剂 LY294002(Tocris 1130 ;Vlahos 等人,1994, J. Biol. Chem. 269,5241-5248)。

[0263] 化合物 2:PI3K  $\gamma$  抑制剂 (Calbiochem 528106 ;AS-605240 ;Camps 等人,2005, Nature Medicine 11,936-943)。

[0264] 化合物 3:PI3K  $\gamma$  抑制剂 II(Calbiochem 528108 ;AS-604850 ;Camps 等人,2005, Nature Medicine 11,936-943)。

[0265] 实施例 4:用于鉴定 PI3K  $\gamma$  相互作用化合物的竞争结合测定法

[0266] 这个实施例证实了其中测试化合物直接加入细胞裂解物内的竞争结合测定法。将测试化合物(以各种浓度)和具有苯基噻唑配体 1 的亲基质加入裂解物等分试样中,并且允许与裂解物样品中包含的蛋白质结合。在温育时间后,使具有经捕获的蛋白质的珠与裂解物分离。随后洗脱结合的蛋白质,并且在斑点印迹操作中使用特异性抗体和 Odyssey 红外检测系统检测且定量 PI3K  $\gamma$  的存在(图 7A)。产生关于 3 种化合物的剂量应答曲线(图 7B)。

[0267] 亲和基质的洗涤

[0268] 如实施例 1 中所述的亲和基质(1.1ml 干体积)用 15ml 包含 0.4% NP40 的 1x DP 缓冲液洗涤 2 次,并且重悬浮于 5.5ml 包含 0.4% NP40 的 1x DP 缓冲液中(20%珠浆)。

[0269] 测试化合物的制备

[0270] 在 DMSO 中制备相应于与最终所需测试浓度相比较浓度高 100 倍的测试化合物的母液(例如,对于 4  $\mu$  M 的最终测试浓度制备 4mM 母液)。这种稀释方案导致 1%的最终 DMSO 浓度。对于对照实验(无测试化合物),使用包含 1% DMSO 的缓冲液,从而使得所有测试样品都包含 1% DMSO。

[0271] 化合物 1:PI3K 抑制剂 LY294002(Tocris 1130 ;Vlahos 等人,1994, J. Biol. Chem. 269,5241-5248)。

[0272] 化合物 3:PI3K  $\gamma$  抑制剂 II(Calbiochem 528108 ;AS-604850 ;Camps 等人,2005, Nature Medicine 11,936-943)。

[0273] 化合物 4(CZC00015387)。

[0274] 细胞裂解物的稀释

[0275] 细胞裂解物如实施例 2 中所述进行制备。对于一般实验,使包含 50mg 蛋白质的 1 个裂解物等分试样在 37°C 水浴中解冻,并且随后维持在 4°C 下。向裂解物中加入 1 体积的 1xDP 缓冲液,从而使得达到 0.4%的最终 NP40 浓度。随后,加入 50 倍浓缩的蛋白酶抑制剂溶液的 1/50 最终体积(1 片蛋白酶抑制剂溶解于 0.5ml 包含 0.4% NP40 的 1x DP 缓冲液中;来自 Roche Diagnostics 的无 EDTA 蛋白酶抑制剂混合物片,目录号 41647)。通过加入包含 0.4% NP40 的 1x DP 缓冲液进一步稀释裂解物,从而使得达到 5mg/ml 的最终蛋白质浓度。

[0276] 裂解物与测试化合物和亲和基质温育

[0277] 将 100  $\mu$  l 体积的稀释裂解物分配到 96 孔过滤平板的每个孔内。随后加入在 DMSO 中稀释的 1.5  $\mu$  l 测试化合物。对于对照反应,使用 1.5  $\mu$  l 不含测试化合物的 DMSO。随后加

入 50  $\mu$ l 亲和基质 (20%浆)/孔。使平板于 4°C 在振荡器上 (在 Thermomixer, Eppendorf 上 750rpm) 温育 2 小时。

[0278] 使用多头抽真空装置 (Millipore, MAVM 096 0R) 洗涤平板。每个孔用 400  $\mu$ l 包含 0.4% NP-40 的 1x DP 缓冲液洗涤 4 次, 并且用 400  $\mu$ l 包含 0.2% NP-40 的 1x DP 缓冲液洗涤 2 次。

[0279] 对于洗脱, 将过滤平板置于收集平板上, 并且将 40  $\mu$ l 具有 DTT (50mM 终浓度) 的 2x 样品缓冲液 (100mM TrisHCl, pH6.8; 4% SDS; 20% 甘油; 0.02% 溴酚蓝) 加入每个孔中。使平板在室温下在振荡器上 (在 Thermomixer, Eppendorf 上 750rpm) 温育 30 分钟。随后, 使平板在 1100rpm 下离心 2 分钟 (Heraeus 离心机), 并且将洗脱物收集到收集平板的孔内。

[0280] 经洗脱的 PI3K  $\gamma$  的检测和定量

[0281] 通过斑点印迹操作, 使用针对 PI3K  $\gamma$  的第一抗体 (来自 Jena Bioscience 的抗 PI3K  $\gamma$ , ABD-026S) 和荧光标记的第二抗体 (抗小鼠 IRDye<sup>TM</sup> 800, 来自 Rockland, 610-732-124) 检测且定量洗脱物中的 PI3K  $\gamma$  蛋白质。根据由制造商提供的说明书 (Schutz-Geschwendener 等人, 2004. Quantitative, two-color Western blot detection with infrared fluorescence. 2004 年 5 月由 LI-COR Biosciences 公开, www.licor.com), 操作来自 LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA) 的 Odyssey 红外成像系统。

[0282] 根据供应商的说明书 (Bio-Dot 微量过滤装置, BioRad 170-65) 使用斑点印迹装置。硝酸纤维素膜 (BioTrace NT Nitrocellulose, PALLBTNT30R) 用 20% 乙醇处理, 并且随后用 PBS 缓冲液洗涤。应用 30  $\mu$ l 洗脱样品/斑点, 并且在应用真空泵前静置 30 分钟。

[0283] 对于 PI3K  $\gamma$  的检测, 膜首先通过与 Odyssey 封闭缓冲液 (LICOR, 927-40000) 在室温下温育 1 小时进行封闭。经封闭的膜随后与第一抗体 (来自 Jena Bioscience 的小鼠抗 PI3K  $\gamma$ , ABD-026S) 于 4°C 温育 16 小时, 所述第一抗体在含有 0.2% Tween 20 的 Odyssey 封闭缓冲液中稀释。在膜用包含 0.1% Tween 20 的 PBS 缓冲液洗涤 4 次共 5 分钟后, 使膜与检测抗体 (来自 Rockland 的抗小鼠 IRDye<sup>TM</sup>800, 610-732-124) 温育 40 分钟, 所述检测抗体在包含 0.2% Tween 20 的 Odyssey 封闭缓冲液中稀释。然后, 膜用 1x PBS 缓冲液/0.1% Tween 20 洗涤 4 次, 每次 5 分钟, 并且用 1x PBS 缓冲液洗涤 1 次共 5 分钟。使膜维持在 PBS 缓冲液中于 4°C 下, 并且随后用 Odyssey 装置进行扫描, 并且根据制造商的说明书记录且分析信号。

[0284] 实施例 5: PI3K  $\delta$  相互作用化合物通过将化合物加入细胞裂解物或活细胞中的化合物概况分析

[0285] 这个实施例证实了其中测试化合物直接加入细胞裂解物内或与活细胞 (RAW264.7 巨噬细胞) 温育的结合测定法。

[0286] 对于细胞裂解物竞争结合测定法, 将化合物加入裂解物样品中, 并且允许与裂解物样品中包含的蛋白质结合。随后, 加入包含经固定的苯基噻唑配体的亲和基质, 以便捕获未与测试化合物结合的蛋白质。在温育时间后, 通过离心使具有经捕获的蛋白质的珠与裂解物分离。随后洗脱珠结合的蛋白质, 并且使用特异性抗体和 Odyssey 红外检测系统检测且定量 PI3K  $\delta$  蛋白质的存在。

[0287] 对于细胞概况分析实验, 使活 RAW264.7 巨噬细胞的等分试样首先与化合物一起

在细胞培养基中温育 30 分钟。在这个温育时间过程中,化合物可以进入细胞并且与细胞内的蛋白质靶结合。随后收获细胞,制备细胞裂解物,并且加入亲和基质,以便捕获未与测试化合物结合的蛋白质。在细胞裂解物与亲和基质温育 90 分钟后,通过离心使具有经捕获的蛋白质的珠与裂解物分离。随后洗脱结合的蛋白质,并且使用特异性抗体和 Odyssey 红外检测系统检测且定量 PI3K  $\delta$  的存在。

[0288] 对于可渗透细胞的参考化合物 PI-103,2 种方法都得到相似结果(图 8)。2 种其他化合物(化合物 5 和 6)在裂解物测定法中与 PI3K  $\delta$  相互作用,但在细胞测定法中不显著。关于这种差异的可能原因是后面 2 种化合物不足以渗透细胞。

#### [0289] 细胞培养

[0290] RAW264.7 巨噬细胞(美国典型培养物中心, Rockville, MD)在达尔贝科改良的伊格尔培养基(DMEM, 4mM L-谷氨酰胺、4.5g/L 葡萄糖; Gibco #41965)中于 37°C 在加湿大气中在 5% CO<sub>2</sub> 的存在下进行培养,所述 DMEM 补充有 10% 热灭活的胎牛血清(Gibco #10270)和 1.5g/L 碳酸氢钠(Gibco #25080, 7.5% 溶液)。通过使用细胞刮棒从培养皿中刮取在 DMEM 培养基中的细胞,并且使它们在新培养基中重新铺平板,使巨噬细胞进行传代培养。在达到传代数 3 后, RAW264.7 巨噬细胞用于实验。细胞用磷酸盐缓冲盐水(D-PBS, Gibco #14040)洗涤 1 次,从培养皿中在 DMEM 培养基中取出,并且在 1,000rpm 下在室温下离心 3 次。使细胞团块重悬浮于 DMEM 培养基中,并且测定细胞数目。将  $25 \times 10^6$  细胞铺平板到 1 个 10cm 培养皿上,并且在新鲜 DMEM 培养基中温育 48 小时,直至它们达到约 90% 汇合。

#### [0291] A) 活细胞中的化合物概况分析

#### [0292] 用测试化合物处理细胞

[0293] 巨噬细胞用 D-PBS 缓冲液进行洗涤,并且加入新鲜 DMEM 培养基。细胞用包含 0.2% DMSO 的 DMEM 培养基(媒介物对照)或具有 10  $\mu$  M PI-103(Calbiochem, 目录号 528100; Knight 等人, 2006, Cell 125, 733-747)、10  $\mu$  M 化合物 5 或 10  $\mu$  M 化合物 6 的 DMEM 培养基处理经过 30 分钟的时间段。测试化合物在 DMSO 中制备为 20mM 母液,并且进一步稀释以达到在细胞培养基中 10  $\mu$  M 化合物和 0.2% DMSO 的终浓度。

#### [0294] 细胞裂解物的制备

[0295] 去除培养基,细胞用 D-PBS 缓冲液洗涤 1 次,并且加入 4ml 冰冷的 D-PBS 缓冲液。通过轻轻刮取细胞并且将其重悬浮于 D-PBS 缓冲液中,取出巨噬细胞。将细胞悬浮液转移到 15ml Falcon 管内,并且维持在冰上。使巨噬细胞悬浮液在 1500rpm 4°C 下在 Heraeus Multifuge 中离心 3 分钟。去除上清液,并且用冷 D-PBS 缓冲液洗涤细胞团块。在另外的离心步骤后,使细胞团块在液氮中速冻。使细胞在冰上解冻,并且通过加入 120  $\mu$  l 1x 裂解缓冲液(1x DP 缓冲液、0.8% NP40)进行裂解。将裂解物转移到 1.5ml Eppendorf 管内,并且在 4°C 下旋转温育 30 分钟,并且随后在 13,200rpm 下于 4°C 离心 10 分钟。将上清液转移到超速离心管内,并且在 TLA-120.2 转子中在 53,000rpm(100,000xg)下于 4°C 离心 1 小时。经澄清的上清液的等分试样用于执行 Bradford 测定法(Biorad Protein Assay 染料浓缩物,目录号 500-0006)的蛋白质定量。其余样品在液氮中速冻,并且贮藏于 -80°C 下,直至在结合测定法中使用。

#### [0296] 细胞裂解物的稀释

[0297] 细胞裂解物如下所述由 RAW264.7 巨噬细胞进行制备。使 1 个裂解物等分试样在

37°C 水浴中解冻, 并且随后维持在 4°C 下。向裂解物中加入 1 体积的包含蛋白酶抑制剂的 1xDP 缓冲液 (1 片蛋白酶抑制剂溶解于 25ml 1x DP 缓冲液或 25ml 包含 0.8% NP40 的 1x DP 缓冲液中; 来自 Roche Diagnostics 的无 EDTA 蛋白酶抑制剂混合物片, 目录号 41647), 从而使得达到 0.8% 的最终 NP40 浓度。通过加入包含 0.8% NP40 和蛋白酶抑制剂的 1x DP 缓冲液进一步稀释裂解物, 从而使得达到 10mg/ml 的最终蛋白质浓度。

#### [0298] 亲和基质的洗涤

[0299] 如实施例 1 中所述的亲和基质 (0.25ml 干珠体积) 用 10ml 包含 0.2% NP40 的 1x DP 缓冲液洗涤 2 次, 并且最终重悬浮于 5.0ml 包含 0.2% NP40 的 1x DP 缓冲液中 (5% 珠浆)。

#### [0300] 细胞裂解物与亲和基质温育

[0301] 将 50  $\mu$ l 体积的稀释裂解物 (10mg/ml 蛋白质) 分配到 96 孔过滤平板的每个孔内。随后加入 100  $\mu$ l 亲和基质 (5% 浆) / 孔。使平板于 4°C 在振荡器上 (在 Thermomixer, Eppendorf 上 750rpm) 温育 2 小时。使用多头抽真空装置 (Millipore, MAVM 096 0R) 洗涤平板。每个孔用 220  $\mu$ l 包含 0.4% NP-40 的 1x DP 缓冲液洗涤 2 次。对于蛋白质的洗脱, 将过滤平板置于收集平板上, 并且将 20  $\mu$ l 具有 DTT (50mM 终浓度) 的 2x 样品缓冲液 (100mM TrisHCl, pH7.4; 4% SDS; 20% 甘油; 0.0002% 溴酚蓝) 加入每个孔中。使平板在室温下在振荡器上 (在 Thermomixer, Eppendorf 上 750rpm) 温育 30 分钟。随后使平板在 1100rpm 下离心 4 次 (Heraeus 离心机), 并且将洗脱物收集到收集平板的孔中。

#### [0302] PI3K $\delta$ 的检测和定量

[0303] 通过将等分试样点在硝酸纤维素膜上并且用针对 PI3K  $\delta$  的第一抗体和荧光标记的第二抗体检测, 检测且定量洗脱物中的 PI3K  $\delta$  蛋白质。硝酸纤维素膜 (BioTrace NT Nitrocellulose, PALL BTNT30R) 用 20% 乙醇进行预处理, 并且随后用 PBS 缓冲液进行洗涤。

[0304] 对于 PI3K  $\delta$  的检测, 膜首先通过与 Odyssey 封闭缓冲液 (LICOR, 927-40000) 在室温下温育 1 小时进行封闭。经封闭的膜随后与第一抗体 (抗 PI3K  $\delta$ , 来自 Santa Cruz 的兔多克隆抗体, 目录号 sc-7176) 于 4°C 温育 16 小时, 所述第一抗体在包含 0.2% Tween 20 的 Odyssey 封闭缓冲液中 1 : 800 稀释。在膜用包含 0.1% Tween 20 的 PBS 缓冲液洗涤 4 次共 7 分钟后, 使膜与检测抗体 (来自 LICOR 的山羊抗兔 IRDye™800CW, 目录号 926-32211) 温育 60 分钟, 所述检测抗体在包含 0.2% Tween 20 和 0.02% SDS 的 Odyssey 封闭缓冲液中 1 : 2500 稀释。然后, 膜用 1x PBS 缓冲液 / 0.1% Tween 20 洗涤 4 次 5 分钟, 并且用 1x PBS 缓冲液洗涤 1 次共 5 分钟。使膜维持在 PBS 缓冲液中于 4°C 下, 并且随后用 Odyssey 装置进行扫描, 并且根据制造商的说明书记录且分析信号。根据由制造商提供的说明书 (Schutz-Geschwendener 等人, 2004. Quantitative, two-color Western blot detection with infrared fluorescence. 2004 年 5 月由 LI-COR Biosciences 公开, www.licor.com), 操作来自 LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA) 的 Odyssey 红外成像系统。

#### [0305] B) 在细胞裂解物中的化合物概况分析

#### [0306] 细胞裂解物的制备

[0307] 去除培养基, 细胞用 D-PBS 缓冲液洗涤 1 次, 并且加入 4ml 冰冷的 D-PBS 缓冲液。通过轻轻刮取细胞并且将其重悬浮于 D-PBS 缓冲液中, 取出巨噬细胞。将细胞悬浮液转移

到 15ml Falcon 管内,并且维持在冰上。使巨噬细胞悬浮液在 1500rpm 4℃下在 Heraeus Multifuge 中离心 3 分钟。去除上清液,并且用冷 D-PBS 缓冲液洗涤细胞团块。在另外的离心步骤后,使细胞团块在液氮中速冻。使细胞在冰上解冻,并且通过加入 120  $\mu$ l 1x 裂解缓冲液 (1x DP 缓冲液、0.8% NP40) 进行裂解。将裂解物转移到 1.5ml Eppendorf 管内,并且在 4℃下旋转温育 30 分钟,并且随后在 13,200rpm 下于 4℃离心 10 分钟。将上清液转移到超速离心管内,并且在 TLA-120.2 转子中在 53,000rpm (100,000xg) 下于 4℃离心 1 小时。经澄清的上清液的等分试样用于执行 Bradford 测定法 (Biorad Protein Assay 染料浓缩物,目录号 500-0006) 的蛋白质定量。其余样品在液氮中速冻,并且贮藏于 -80℃下,直至在结合测定法中使用。

#### [0308] 细胞裂解物的稀释

[0309] 细胞裂解物如下所述由 RAW264.7 巨噬细胞进行制备。使 1 个裂解物等分试样在 37℃水浴中解冻,并且随后维持在 4℃下。向裂解物中加入 1 体积的包含蛋白酶抑制剂的 1xDP 缓冲液 (1 片蛋白酶抑制剂溶解于 25ml 1x DP 缓冲液或 25ml 包含 0.8% NP40 的 1x DP 缓冲液中;来自 Roche Diagnostics 的无 EDTA 蛋白酶抑制剂混合物片,目录号 41647),从而使得达到 0.8%的最终 NP40 浓度。通过加入包含 0.8% NP40 和蛋白酶抑制剂的 1x DP 缓冲液进一步稀释裂解物,从而使得达到 10mg/ml 的最终蛋白质浓度。

#### [0310] 亲和基质的洗涤

[0311] 如实施例 1 中所述的亲和基质 (0.25ml 干珠体积) 用 10ml 包含 0.2% NP40 的 1x DP 缓冲液洗涤 2 次,并且最终重悬浮于 5.0ml 包含 0.2% NP40 的 1x DP 缓冲液中 (5% 珠浆)。

#### [0312] 测试化合物的制备

[0313] 对于裂解物竞争实验,在 DMSO 中制备相应于与测定法中的终浓度相比较浓度高 50 倍的测试化合物的母液 (例如,对于 10  $\mu$ M 的最终测试浓度制备 500  $\mu$ M 母液)。这种稀释方案导致测定法中 2%的最终 DMSO 浓度。对于对照实验 (无测试化合物),使用包含 2% DMSO 的缓冲液,从而使得所有测试样品都包含 2% DMSO。

#### [0314] 细胞裂解物与测试化合物和亲和基质温育

[0315] 将 50  $\mu$ l 体积的稀释裂解物 (10mg/ml 蛋白质) 分配到 96 孔过滤平板的每个孔内。随后加入在 DMSO 中稀释的 3.0  $\mu$ l 测试化合物。对于对照反应,使用 3.0  $\mu$ l 不含测试化合物的 DMSO。随后加入 100  $\mu$ l 亲和基质 (5%浆)/孔。使平板于 4℃在振荡器上 (在 Thermomixer, Eppendorf 上 750rpm) 温育 2 小时。使用多头抽真空装置 (Millipore, MAVM 096 0R) 洗涤平板。每个孔用 220  $\mu$ l 包含 0.4% NP-40 的 1x DP 缓冲液洗涤 2 次。对于蛋白质的洗脱,将过滤平板置于收集平板上,并且将 20  $\mu$ l 具有 DTT (50mM 终浓度) 的 2x 样品缓冲液 (100mM TrisHCl, pH7.4 ;4% SDS ;20%甘油 ;0.0002%溴酚蓝) 加入每个孔中。使平板在室温下在振荡器上 (在 Thermomixer, Eppendorf 上 750rpm) 温育 30 分钟。随后,使平板在 1100rpm 下离心 4 分钟 (Heraeus 离心机),并且将洗脱物收集到收集平板的孔内。PI3K  $\delta$  的检测和定量如上所述执行。

#### [0316] 实施例 6 :PI3K 相互作用化合物使用定量质谱法的选择性概况分析

[0317] 这个实施例证实了其中测试化合物直接加入细胞裂解物内的竞争结合测定法。将测试化合物 (以各种浓度) 和亲和基质 (珠与经固定的苯基噻唑配体 1 和珠与经固定的苯

替吗啉-色原配体的 1 : 1 混合物) 加入裂解物等分试样中, 并且允许与裂解物样品中包含的蛋白质结合。在温育时间后, 使具有经捕获的蛋白质的珠与裂解物分离。随后洗脱结合的蛋白质, 并且使用基于 ITRAQ 方法的定量质谱法测量激酶的存在。测定关于 3 种化合物与几种激酶相互作用的  $IC_{50}$  值 (图 9)。

#### [0318] 亲和基质的洗涤

[0319] 亲和基质 (珠与经固定的苯基噻唑配体 1 和珠与经固定的苯替吗啉-色原配体的 1 : 1 混合物) 用 15ml 包含 0.4% NP40 的 1x DP 缓冲液洗涤 2 次, 并且重悬浮于 5.5ml 包含 0.4% NP40 的 1x DP 缓冲液中 (20% 珠浆)。

#### [0320] 测试化合物的制备

[0321] 在 DMSO 中制备相应于与最终所需测试浓度相比较浓度高 100 倍的测试化合物的母液 (例如, 对于  $4 \mu M$  的最终测试浓度制备 4mM 母液)。这种稀释方案导致 1% 的最终 DMSO 浓度。对于对照实验 (无测试化合物), 使用包含 1% DMSO 的缓冲液, 从而使得所有测试样品都包含 1% DMSO。

[0322] 化合物 CZC00018052 : 双重 PI3K/mTOR 激酶抑制剂 PI-103 (Calbiochem 目录号 528100 ; Knight 等人, 2006, Cell 125, 733-747)。

[0323] 化合物 CZC00015097 : PI3K  $\gamma$  抑制剂 I (Calbiochem 528106 ; AS-605240 ; Camps 等人, 2005, Nature Medicine 11, 936-943)。

#### [0324] 细胞裂解物的稀释

[0325] 细胞裂解物如实施例 2 中所述由 Ramos 细胞 (ATCC 编号 CRL-1596) 进行制备。对于一般实验, 使包含 50mg 蛋白质的 1 个裂解物等分试样在  $37^{\circ}C$  水浴中解冻, 并且随后维持在  $4^{\circ}C$  下。向裂解物中加入 1 体积的 1xDP 缓冲液, 从而使得达到 0.4% 的最终 NP40 浓度。随后, 加入 50 倍浓缩的蛋白酶抑制剂溶液的 1/50 最终体积 (1 片蛋白酶抑制剂溶解于 0.5ml 包含 0.4% NP40 的 1x DP 缓冲液中 ; 来自 Roche Diagnostics 的无 EDTA 蛋白酶抑制剂混合物片, 目录号 41647)。通过加入包含 0.4% NP40 的 1x DP 缓冲液进一步稀释裂解物, 从而使得达到 5mg/ml 的最终蛋白质浓度。

#### [0326] 裂解物与测试化合物和亲和基质温育

[0327] 将  $100 \mu l$  体积的稀释裂解物分配到 96 孔过滤平板的每个孔内。随后加入在 DMSO 中稀释的  $1.5 \mu l$  测试化合物。对于对照反应, 使用  $1.5 \mu l$  不含测试化合物的 DMSO。随后加入  $50 \mu l$  亲和基质 (20% 浆) / 孔。使平板于  $4^{\circ}C$  在振荡器上 (在 Thermomixer, Eppendorf 上 750rpm) 温育 2 小时。

[0328] 使用多头抽真空装置 (Millipore, MAVM 096 0R) 洗涤平板。每个孔用  $400 \mu l$  包含 0.4% NP-40 的 1x DP 缓冲液洗涤 4 次, 并且用  $400 \mu l$  包含 0.2% NP-40 的 1x DP 缓冲液洗涤 2 次。

[0329] 对于洗脱, 将过滤平板置于收集平板上, 并且将  $40 \mu l$  具有 DTT (50mM 终浓度) 的 2x 样品缓冲液 (100mM TrisHCl, pH6.8 ; 4% SDS ; 20% 甘油 ; 0.02% 溴酚蓝) 加入每个孔中。使平板在室温下在振荡器上 (在 Thermomixer, Eppendorf 上 750rpm) 温育 30 分钟。随后, 使平板在 1100rpm 下离心 2 分钟 (Heraeus 离心机), 并且将洗脱物收集到收集平板的孔内。

#### [0330] 通过质谱法检测和定量激酶

[0331] 如实施例 2 中所述通过质谱法检测洗脱物中的激酶,并且如先前所述执行使用 ITRAQ 方法的定量分析 (WO 2006/134056 ;Bantscheff 等人,2007. Nature Biotechnology 25,1035-1044),并且计算关于个体化合物和激酶的相互作用的  $IC_{50}$  值 (图 9)。

[0332] 实施例 7 :PI3K 相互作用化合物使用多路免疫检测的选择性概况分析

[0333] 这个实施例证实了其中测试化合物直接加入细胞裂解物内的竞争结合测定法。将测试化合物 (以各种浓度) 和亲和基质 (珠与经固定的苯基噻唑配体 1 和珠与经固定的苯替吗啉 - 色原配体的 1 : 1 混合物) 加入裂解物等分试样中,并且允许与裂解物样品中包含的蛋白质结合。在温育时间后,使具有经捕获的蛋白质的珠与裂解物分离。随后洗脱结合的蛋白质,并且使用多路免疫检测形式检测且定量激酶的存在。产生关于个体激酶的剂量应答曲线,并且计算  $IC_{50}$  值 (图 10 和 11)。

[0334] 亲和基质的洗涤

[0335] 亲和基质 (珠与经固定的苯基噻唑配体 1 和珠与经固定的苯替吗啉 - 色原配体的 1 : 1 混合物) 用 15ml 包含 0.4% NP40 的 1x DP 缓冲液洗涤 2 次,并且重悬浮于 5.5ml 包含 0.4% NP40 的 1x DP 缓冲液中 (20% 珠浆)。

[0336] 测试化合物的制备

[0337] 在 DMSO 中制备相应于与最终所需测试浓度相比较浓度高 100 倍的测试化合物的母液 (例如,对于  $4 \mu M$  的最终测试浓度制备 4mM 母液)。这种稀释方案导致 1% 的最终 DMSO 浓度。对于对照实验 (无测试化合物),使用包含 1% DMSO 的缓冲液,从而使得所有测试样品都包含 1% DMSO。化合物 CZC00018052 : 双重 PI3K/mTOR 激酶抑制剂 PI-103 (Calbiochem 目录号 528100 ;Knight 等人,2006, Cell 125,733-747)。

[0338] 细胞裂解物的稀释

[0339] 细胞裂解物如实施例 2 中所述进行制备。对于这个实验,使用包含 Jurkat (ATCC 目录号 TIB-152 Jurkat, cloe E6-1) 和 Molt-4 (ATCC 目录号 CRL-1582) 细胞裂解物样品的 1 : 1 混合物。对于一般实验,使包含 50mg 蛋白质的 1 个裂解物等分试样在  $37^{\circ}C$  水浴中解冻,并且随后维持在  $4^{\circ}C$  下。向裂解物中加入 1 体积的 1xDP 缓冲液,从而使得达到 0.4% 的最终 NP40 浓度。随后,加入 50 倍浓缩的蛋白酶抑制剂溶液的 1/50 最终体积 (1 片蛋白酶抑制剂溶解于 0.5ml 包含 0.4% NP40 的 1x DP 缓冲液中 ;来自 Roche Diagnostics 的无 EDTA 蛋白酶抑制剂混合物片,目录号 41647)。通过加入包含 0.4% NP40 的 1x DP 缓冲液进一步稀释裂解物,从而使得达到 5mg/ml 的最终蛋白质浓度。

[0340] 裂解物与测试化合物和亲和基质温育

[0341] 向 96 孔过滤平板 (Multiscreen Solvinert Filter Plate, Millipore MSRL N04 10) 中加入 :100  $\mu l$  亲和基质 (珠) / 孔、3  $\mu l$  化合物溶液和 50  $\mu l$  细胞裂解物。使平板密封且在冷室中在 Thermoxer 上伴随振荡 (750rpm) 温育 2 小时。然后,平板用 220  $\mu l$  洗涤缓冲液洗涤 2 次。珠随后用 20  $\mu l$  样品缓冲液进行洗脱。洗脱物在  $-80^{\circ}C$  下速冻并且贮藏于  $-20^{\circ}C$  下。

[0342] 经洗脱的激酶的检测和定量

[0343] 通过在硝酸纤维素膜上的点样操作,使用针对目的激酶的第一抗体和荧光标记的第二抗体 (来自 Rockland 的抗小鼠或抗兔 IRDye™ 抗体),检测且定量洗脱物中的激酶。根据由制造商提供的说明书 (Schutz-Geschwendener 等人,2004. Quantitative,

two-color Western blot detection with infrared fluorescence. 2004年5月由LI-COR Biosciences 公开, www.licor.com), 操作来自 LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA) 的 Odyssey 红外成像系统。

[0344] 在洗脱物点样后, 硝酸纤维素膜 (BioTrace NT, Millipore #66485) 首先通过与 Odyssey 封闭缓冲液 (LICOR, 927-40000) 在室温下温育 1 小时进行封闭。经封闭的膜随后与第一抗体于 25°C 温育 16 小时, 所述第一抗体在包含 0.2% Tween 20 的 Odyssey 封闭缓冲液中稀释。然后, 膜用包含 0.1% Tween 20 的 PBS 缓冲液洗涤 4 次共 7 分钟。随后使膜与检测抗体 (来自 Rockland 的 IRDye™ 标记的抗体) 在室温下温育 60 分钟, 所述检测抗体在包含 0.2% Tween 20 和 0.02% SDS 的 Odyssey 封闭缓冲液中稀释。然后, 膜用 1x PBS 缓冲液 / 0.1% Tween 20 洗涤 4 次, 7 分钟, 并用 1x PBS 缓冲液洗涤一次, 5 分钟。使膜维持在 PBS 缓冲液中于 4°C 下, 并且随后用 Odyssey 装置进行扫描。根据制造商的说明书记录且分析荧光信号。

[0345] 抗体的来源:

[0346] 抗 PI3K  $\gamma$  小鼠 (Jena Bioscience ABD-026); 抗 PI3K  $\delta$  (Santa Cruz #sc-7176); 抗 PI3K  $\alpha$  (Cell signaling #4255); 抗 DNAPK (Calbiochem #NA57); Licor IRDye 800 小鼠 (926-32210); Licor IRDye 680 兔 (926-32221); Licor IRDye 800 兔 (926-32211); Licor IRDye 680 小鼠 (926-32220)。

[0347] 实施例 8: 具有苯替吗啉-色原配体的亲和基质的制备

[0348] 这个实施例描述了苯替吗啉-色原配体 (8-(4-氨基甲基-苯基)-2-吗啉-4-基-色原-4-酮) 的合成 (图 16)。这种捕获配体通过共价连接使用氨基官能团固定在固体支持物上, 并且用于从细胞裂解物中捕获蛋白质 (参见例如图 17)。

[0349] 8-(4-氨基甲基-苯基)-2-吗啉-4-基-色原-4-酮的合成

[0350] 步骤 1

[0351] 使 2,3-二羟基-苯甲酸 [A] (25g, 0.16mol) (Sigma-Aldrich, 目录号 126209) 在具有浓缩硫酸 (1ml) 的甲醇 (125ml) 中搅拌, 并且使反应加热至轻柔回流过夜。随后使其浓缩, 并且残基在乙酸乙酯和饱和含水碳酸氢钠之间分开。有机层用进一步饱和的含水碳酸氢钠洗涤, 用硫酸镁干燥, 过滤且浓缩以提供 2,3-二羟基-苯甲酸甲酯 [B]。得率 15.2g, 57%。

[0352] HPLC (方法 B): (M-H<sup>+</sup>) 167; RT = 2.3 分钟。<sup>1</sup>H NMR: (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.92 (s, 1H); 7.39 (dd, 1H); 7.13 (dd, 1H); 6.82 (dt, 1H); 5.70 (s, 1H); 3.98 (s, 3H)。

[0353] 步骤 2

[0354] 使 2,3-二羟基-苯甲酸甲酯 [B] (15. g, 89mmol) 溶解于具有吡啶 (3.6ml, 44.6mmol, 0.5 当量) 和 DMAP (272mg, 2.2mmol, 0.025 当量) 的二氯甲烷 (100ml) 中, 并且使反应在冰/水浴中冷却。加入三氟甲磺酸酐 (16.2ml, 98.2mmol, 1.1 当量), 并且允许反应加温至室温并且搅拌过夜。用二氯甲烷稀释反应混合物, 用 1M 盐酸 (150ml) 洗涤, 用硫酸钠干燥, 过滤且蒸发。产物由乙酸乙酯重结晶, 以提供 2-羟基-3-三氟甲磺酰氧-苯甲酸甲酯 [C]。得率收获 1,6.5g, 24%。进一步的重结晶提供第二个收获, 6.8g, 26%。

[0355] <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  11.11 (s, 1H); 7.80 (dd, 1H); 7.36 (dd, 1H); 6.86 (t, 1H); 3.93 (s, 3H)。

**[0356] 步骤 3**

**[0357]** 使在氮下在 30ml 干四氢呋喃中的 N-乙酰吗啉 (1.72g, 13.3mmol, 2 当量) 溶液在丙酮/干冰浴 (-78°C) 中冷却, 并且用 LDA (10ml, 在 THF 中的 2M 溶液, 3 当量) 处理。使反应混合物搅拌 60 分钟, 随后加入 2-羟基-3-三氟甲磺酰氧-苯甲酸甲酯 [C] (2g, 6.6mmol, 1 当量作为在 10ml 干 THF 中的溶液)。允许反应混合物从 -78°C 加温至室温并且搅拌过夜。反应用水 (4ml) 随后为 2M 盐酸 (40ml) 稀释, 随后用二氯甲烷萃取 3 次。使萃取物合并, 用卤水洗涤, 用硫酸镁干燥, 过滤且蒸发。粗产物通过快速色谱法使用乙酸乙酯洗脱进行纯化, 以提供三氟甲磺酸 2-羟基-3-(3-吗啉-4-基-3-氧-丙酰)-苯酯 [D]。得率 1.06g, 40%

**[0358]**  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.96 (dd, 1H); 7.49 (dd, 1H); 7.00 (t, 1H); 4.14 (s, 2H); 3.65-3.73 (m, 6H), 3.56 (t, 2H)。

**[0359] 步骤 4**

**[0360]** 在二氯甲烷 (30ml) 中的三氟甲磺酸 2-羟基-3-(3-吗啉-4-基-3-氧-丙酰)-苯酯 [D] (1.06g, 2.7mmol) 用三氟甲磺酸酐处理, 并且在室温下搅拌过夜。随后使反应混合物浓缩, 重新溶解于甲醇中并且搅拌另外 2 小时。溶液用水稀释且碱化至 pH8。它随后用二氯甲烷萃取 3 次, 使萃取物合并, 用卤水洗涤, 用硫酸镁干燥且蒸发, 以得到作为褐色油的粗产物。用醚研磨得到三氟甲磺酸 2-吗啉-4-基-4-氧-4H-色原-8-基酯 [E] 的褐色固体。得率 210mg, 20%。

**[0361]** HPLC (方法 B): RT = 2.8 分钟。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.16 (dd, 1H); 7.49 (dd, 1H); 7.40 (t, 1H); 5.62 (s, 1H); 3.85 (dd, 4H), 3.60 (dd, 4H)。

**[0362] 步骤 5**

**[0363]** 使三氟甲磺酸 2-吗啉-4-基-4-氧-4H-色原-8-基酯 [E] (380mg, 1.0mmol)、4-(N-Boc-氨基甲基)苯硼酸 (280mg, 1.1mmol, 1.1 当量)、碳酸钾 (275mg, 2.0mmol, 2 当量) 和四三苯基磷钨 (0) (60mg, 0.05mmol, 0.05 当量) 在二噁烷 (4ml) 中搅拌, 并且加热至 80°C 4 小时。随后使冷却反应物过滤, 并且使滤液在真空中浓缩。残渣通过快速色谱法使用在二氯甲烷中的 0-3% 甲醇洗脱进行纯化, 以提供 [4-(2-吗啉-4-基-4-氧-4H-色原-8-基)-苯甲基]-氨基甲酸叔丁酯 [F]。得率 238mg, 54%。

**[0364]** HPLC (方法 A): ( $\text{MH}^+$ ) 437, ( $\text{MNa}^+$ ) 459; RT 3.0 分钟。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.17 (dd, 1H); 7.55 (dd, 1H); 7.49 (d, 2H); 7.37-7.42 (m, 3H); 5.51 (s, 1H), 5.00 (brs, 1H), 4.39 (d, 2H); 3.74 (dd, 4H); 3.35 (dd, 4H); 1.48 (s, 9H)。

**[0365] 步骤 6**

**[0366]** 使在二氯甲烷 (5ml) 中的 [4-(2-吗啉-4-基-4-氧-4H-色原-8-基)-苯甲基]-氨基甲酸叔丁酯 [F] (230mg, 0.53mmol) 用在二噁烷 (2ml) 中的 4M 氯化氢处理。使反应在室温下搅拌 3 小时, 在这个时间期间形成沉淀物。溶剂在真空中去除, 并且残渣用醚研磨。所得到的固体通过过滤收集并且干燥, 以得到 8-(4-氨基甲基-苯基)-2-吗啉-4-基-色原-4-酮 [G]。得率 189mg, 定量。

**[0367]** HPLC (方法 18): ( $\text{MH}^+$ ) 337, ( $\text{MNa}^+$ ) 359; RT 1.32 分钟 (宽)。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  8.54 (br s, 2H); 7.99 (dd, 1H); 7.68-7.73 (m, 3H); 7.62 (d, 2H); 7.51 (t, 1H); 5.79 (s, 1H); 4.09 (q, 2H); 3.68 (t, 4H); 3.41 (t, 4H)

[0368] 表 5 :缩写

[0369]

DCM	二氯甲烷
DMAP	4-(二甲基氨基)吡啶
LDA	二异丙胺锂
MeOH	甲醇
THF	四氢呋喃

[0370] NMR 谱在 Bruker dpx400 上获得。LCMS 在 Agilent 1100 上使用 ZORBAX® SB-C18, 4.6x75mm, 3.5 微米柱执行。柱流动为 1ml/分钟, 并且所使用的溶剂是水和乙腈 (0.1% 甲酸), 注入体积为 10ul。波长为 254 和 210nm。方法在下文描述述。

[0371] 表 6 :分析方法

[0372]

方法	Easy Access 方法名称	ChemStation 方法名称	流速	溶剂	运行时间
A	Short 柱 ANL Positive Medium	SANL-PGM.M	1ml/分钟	0-1.5 分钟 30-95 % MeCN 1.5-4.5 分钟 95 % MeCN	5 分钟
B	Short 柱 ANL Negative Medium	SANL-NGM.M	1ml/分钟	0-1.5 分钟 30-95 % MeCN 1.5-4.5 分钟 95 % MeCN	5 分钟

[0373] 苯替吗啉 - 色原配体固定在珠 (亲和基质) 上

[0374] NHS 活化的 Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, 17-0906-01) 用无水 DMSO (二甲基亚砜, Fluka, 41648, H<sub>2</sub>O ≤ 0.005%) 进行平衡。将 1ml 沉降珠置于 15ml Falcon 管中, 加入化合物母液 (通常为在 DMF 或 DMSO 中 100mM) (终浓度 0.2-2 μmol/ml 珠) 以及 15 μl 三乙胺 (Sigma, T-0886, 99% 纯)。珠在室温下在黑暗中进行立式振荡器 (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.) 上温育 16-20 小时。通过 HPLC 测定偶联效率。通过在室温下在立式振荡器上与氨基乙醇温育过夜来封闭非反应的 NHS 基团。珠用 10ml DMSO 进行洗涤, 并且在异丙醇中贮藏于 -20°C 下。这些珠在实施例 2、3 和 4 中用作亲和基质。如上所述通过与氨基乙醇温育封闭 NHS 基团而产生对照珠 (未固定配体)。

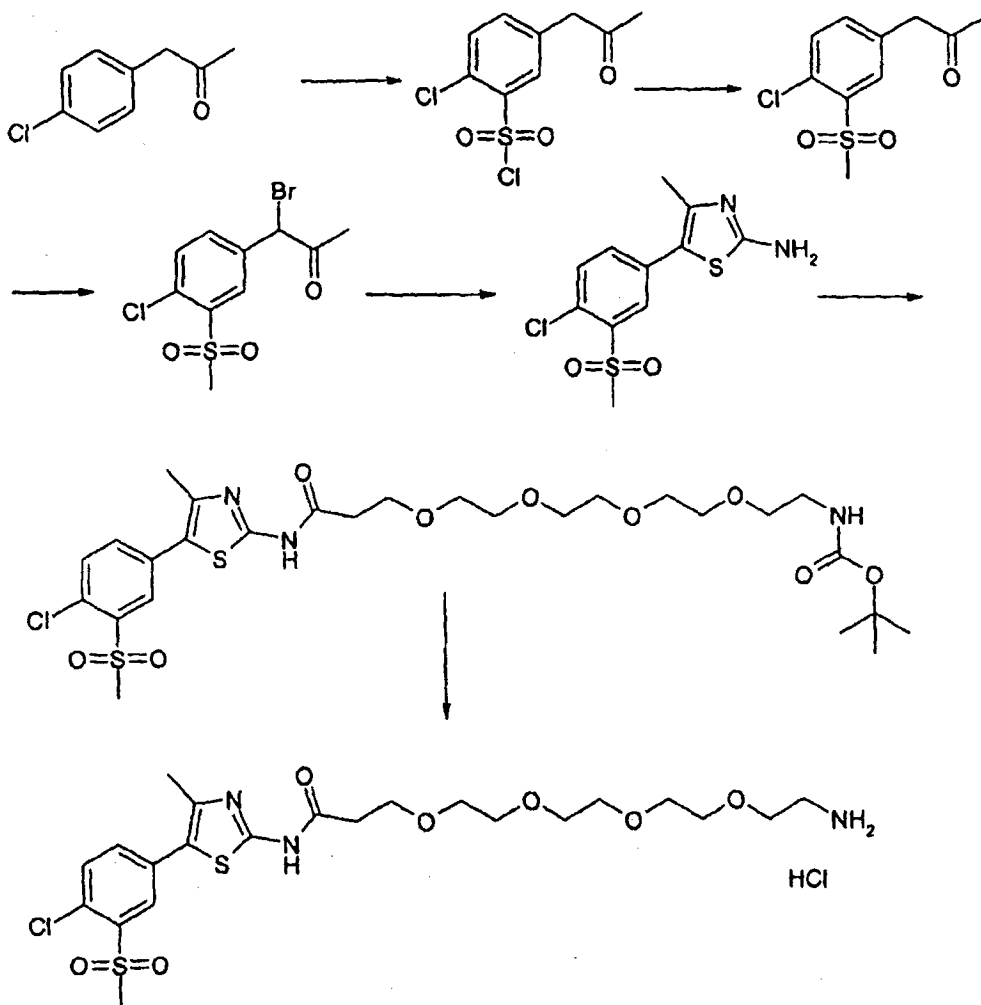


图 1

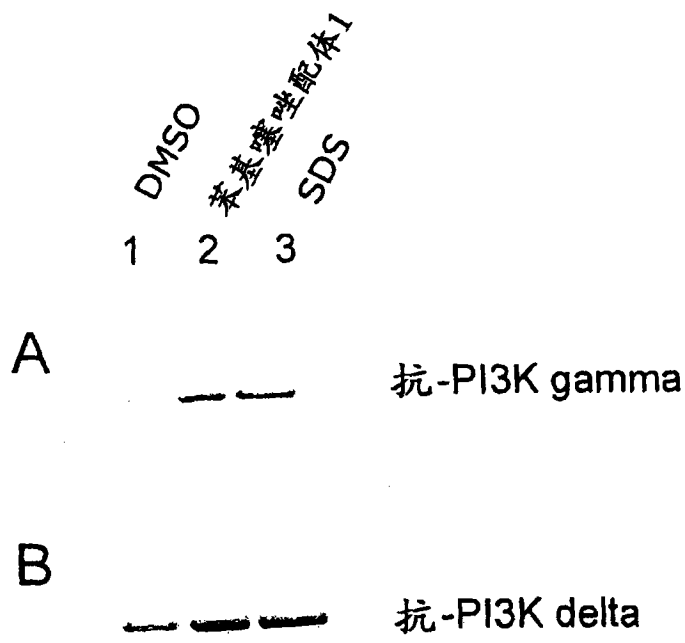


图 2

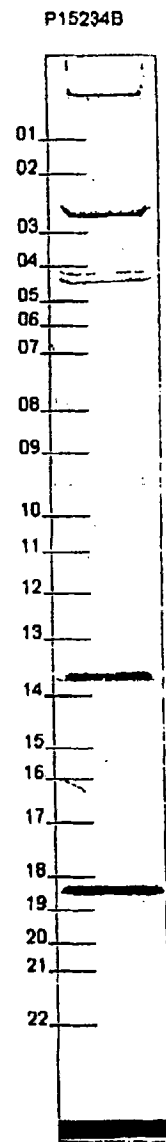


图 3

1    MELENYKQPV VLREDNCRRR RRMKPRSAAA SLSSMELIPI EFVLPTSQRK  
 51    CKSPETALLH VAGHGNVEQM KAQVWLRAL TSVAADFYHR LGP HHFLLLY  
 101   QKKGQWYEIY DKYQVVQTL CLRYWKATHR SPGQIHLVQR HPPSEESQAF  
 151   QRQLTALIGY DVTDVSNVHD DELEFTRRGL VTPRMAEVAS RDPKLYAMHP  
 201   WVTSKPLPEY LWKKIANNCI FIVIHRSTTS QTIKVSPDDT PGAILQSF  
 251   KMAKKKSLMD IPESQSEODF VLRVCGRDEY LVGETPIKNF QWVRHCLKNG  
 301   EEIHVVLDTP PDPALDEVK EEWPLVDDCT GVTGYHEQLT IHGKDHEVSF  
 351   TVSLWDCDRK FRVKIRGIDI PVLPRNTDLT VFVEANIQHG QQVLCQRRTS  
 401   PKPFTEEV LW NVWLEFSIKI KDLPKGALLN LQIYCGKAPA LSSKASAESP  
 451   SSESKGKVQL LYYVNL LID HRFLRRGEY VLHMWQISGK GEDQGSFNAD  
 501   KLTSATNPDK ENSMSISILL DNYCHPIALP KHQPTDPEG DRVRAEMPNO  
 551   LRKQLEAIIA TDPLNPLTAE DKELLWHFRY ESLKHPKAYP KLFSSVKWGO  
 601   QEIVAKTYQL LARREVWDQS ALDVGLTMQL LDCNFSDENV RAIAVQKLES  
 651   LEDDDLVHYL LQLVQAVKFE PYHDSALARF LLKRGLRNKR IGHFLFWFLR  
 701   SEIAQSRHYQ QRFAVILEAY LRGCGTAMLH DFTQQVQVIE MLQKVTLDIK  
 751   SLSAEKYDVS SQVISQLKQK LENLONSQLP ESFRVPYDPG LKAGALAI EK  
 801   CKVMASKKKP LWLEFKCADP TALSNETIGI IFKHGDDLRO DMLILQILRI  
 851   MESIWETESL DLCLLPYGCI STGDKIGMIE IVKDATTIAK IQOSTVGN TG  
 901   AFKDEVLNHW LKEKSPTTEK FQAAVERFVY SCAGYCVATF VLGIGDRHND  
 951   NIMITETGNL FHIDFGHILG NYKSFLGINK ERVPFVLTPD FLFVMGTSGK  
 1001 KTSPHFQKFO DICVKAYLAL RHHTNLLIIL FSMMLMTGMP QLTSKEDI EY  
 1051 IRDALTVGKN EEDAKKYFLD QIEVCRDKGW TVQFNWFLHL VLGIKQGEKH  
 1101 SA

图 4

1 MPPGVDCPME FWTKEENQSV VVDFLLPTGV YLNFPVSRNA NLSTIKQLLW  
 51 HRAQYEPLFH MLSGPEAYVF TCINQTAEQQ ELEDEQRRLC DVQPFLPVLR  
 101 LVAREGDRVK KLINSQISLL IGKGLHEFDS LCDPEVNDFR AKMCQFCEEA  
 151 AARRQQLGWE AWLQYSFPLQ LEPSAQTWGP GTLRLPNRAL LVNVKFEGSE  
 201 ESFTFQVSTK DVPLALMACA LRKKATVFRQ PLVEQPEDYT LOVNGRHEYL  
 251 YGSYPLCQFQ YICSCLSHGL TPHLTMVHSS SILAMRDEQS NPAPQVQKPR  
 301 AKPPPIPAKK PSSVSLWSLE QPFRIELIQG SKVNADERMK LVVQAGLFHG  
 351 NEMLCKTVSS SEVSVCSEPV WKQRLEFDIN ICDLPRMARL CFALYAVIEK  
 401 AKKARSTKKK SKKADCPIAW ANMLLFDYKD QLKTGERCLY MWPSVPDEKG  
 451 ELLNPTGTVR SNPNTDSAAA LLICLPEVAP HPVYYPALEK ILELGRHSEC  
 501 VHVTEEEQLQ LREILERRGS GELYEHEKDL VWKLRHEVQE HFPEALARLL  
 551 LVTKWNKHED VAQMLYLLCS WPPELVLSAL ELLDFSFPDC HVGSFAIKSL  
 601 RKLTDDELFO YLLQLVQVLK YESYLDCELT KFLLDRALAN RKIGHFLFWH  
 651 LRSEMHVPSV ALRFGILILEA YCRGRTHHMK VLMKQGEALS KLKALNDFVK  
 701 LSSQKTPKPQ TKELMHLCMR QEAYLEALSH LQSPLDPSTL LAEVCVEQCT  
 751 FMDSKMKPLW IMYSNEEAGS GGSVGIIFKN GDDLRODMLT LQMIQLMDVL  
 801 WKQEGDLDRM TPYGCLPTGD RTGLIEVVLR SDTIANIQLN KSNMAATAAF  
 851 NKDALLNWLK SKNPGEALDR AIEEFTLSCA GYCVATYVLG IGDRHSDNIM  
 901 IRESGQLFHI DFGHFLGNFK TKFGINRERV PFILTYDFVH VIQOGKTNNS  
 951 EKFERFRGYC ERAYTILRRH GLLFLHLFAL MRAAGLPELS CSKDIQYLKD  
 1001 SLALGKTEEE ALKHFRVKFN EALRESWKTK VNWLAHNVSK DNRQ

图 5

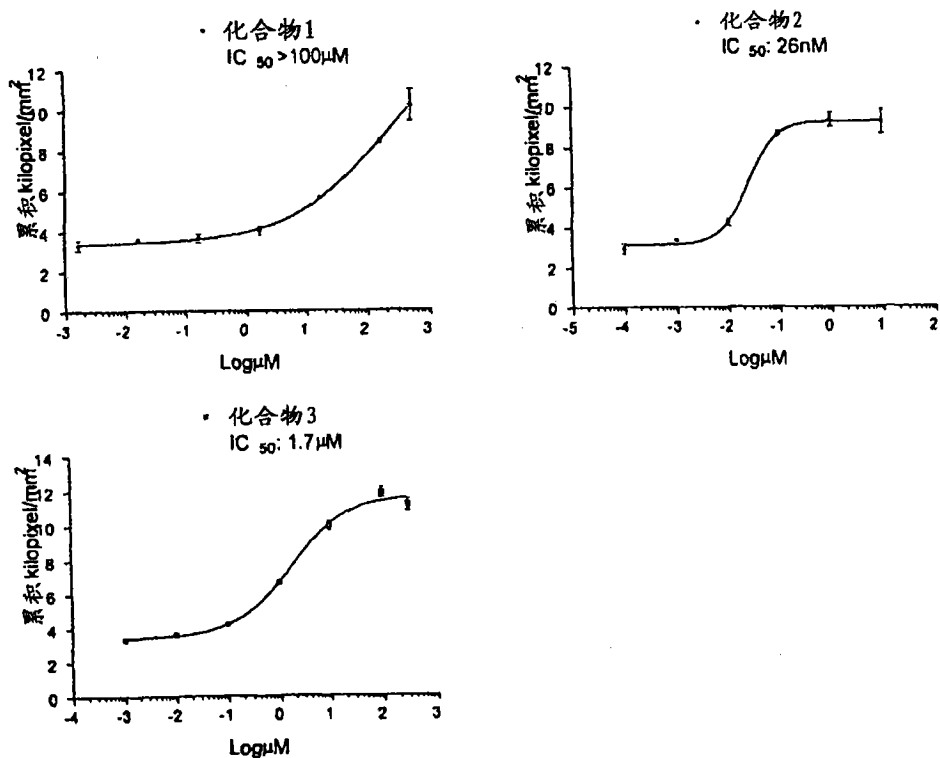


图 6

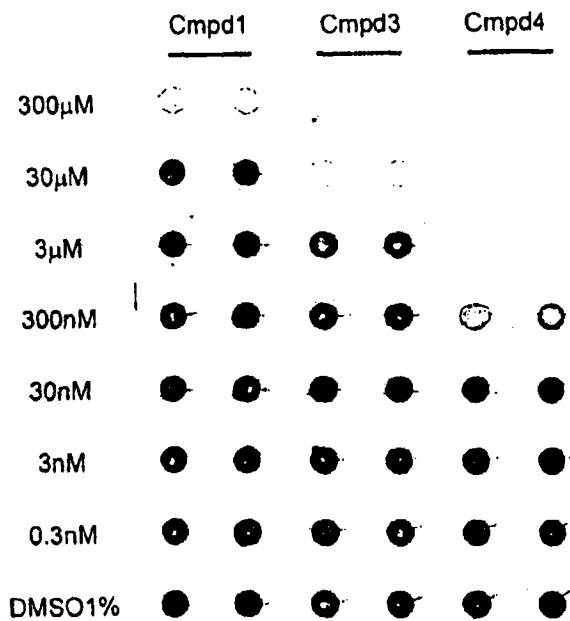


图 7A

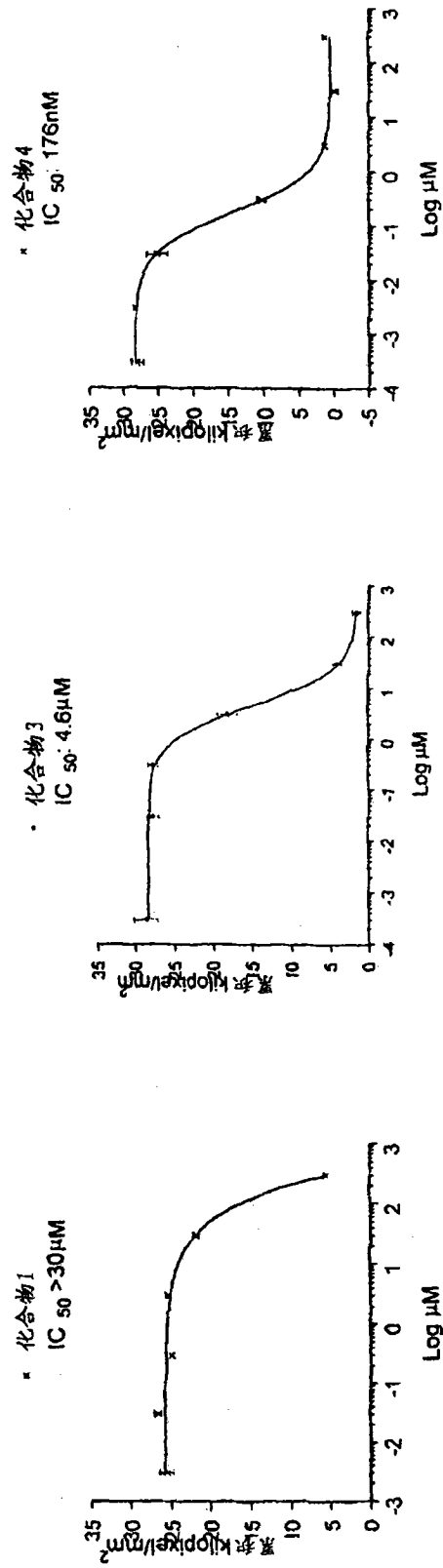


图 7B

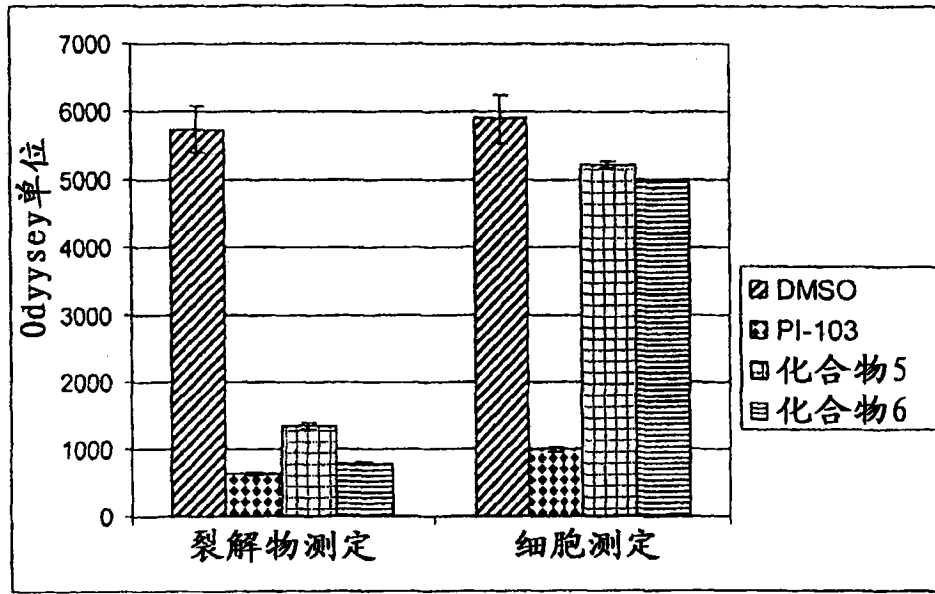


图 8

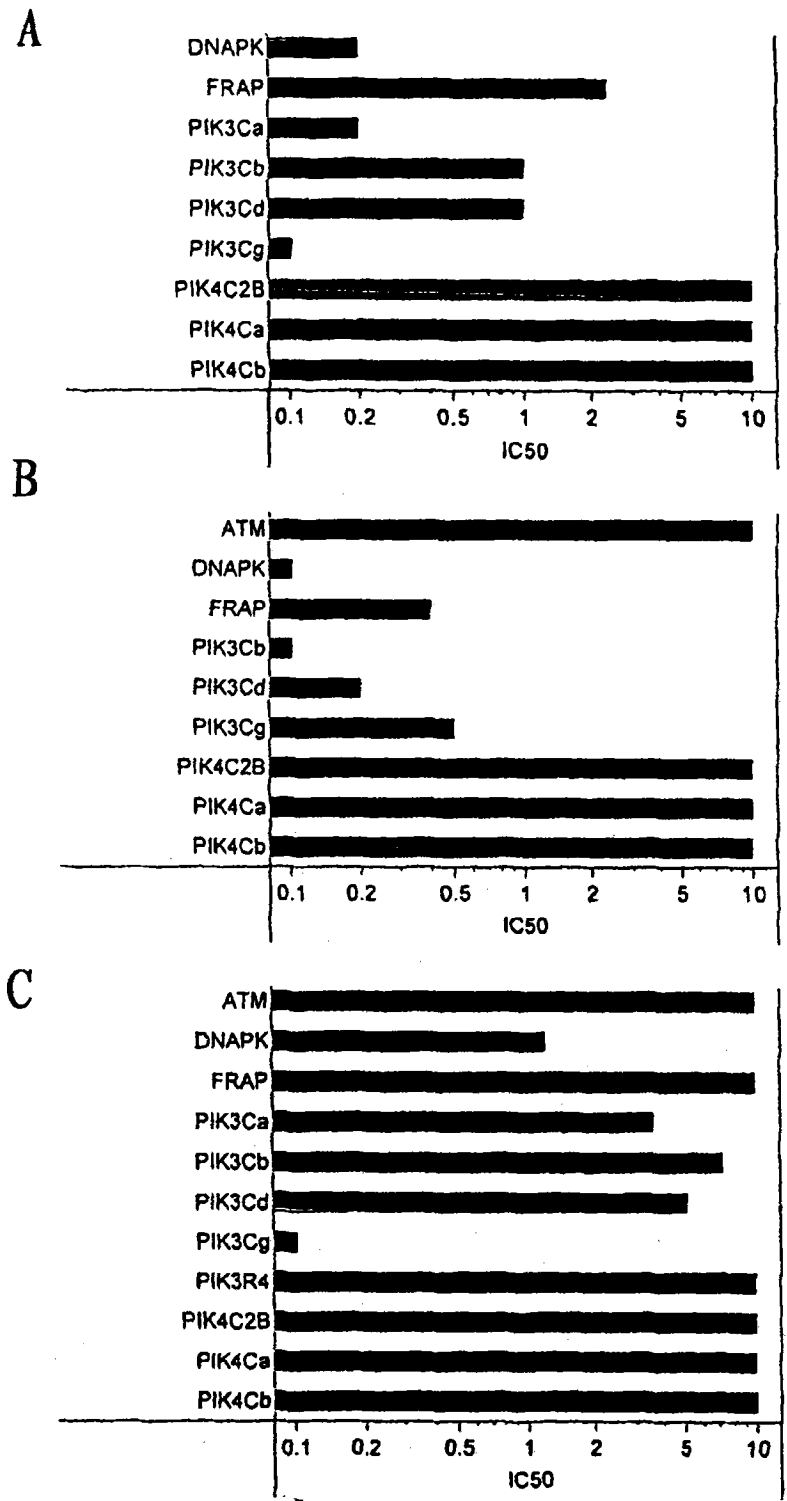


图 9

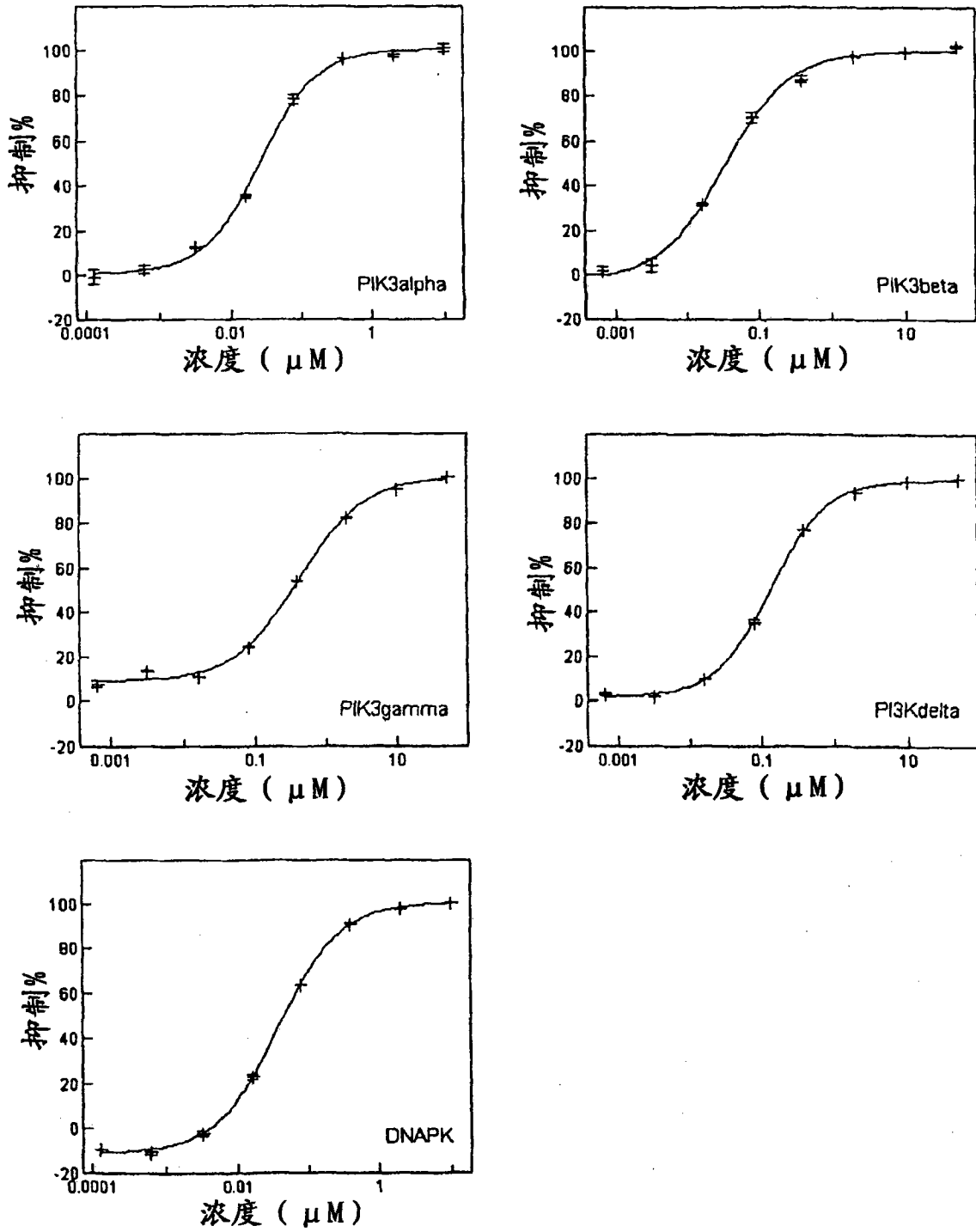


图 10

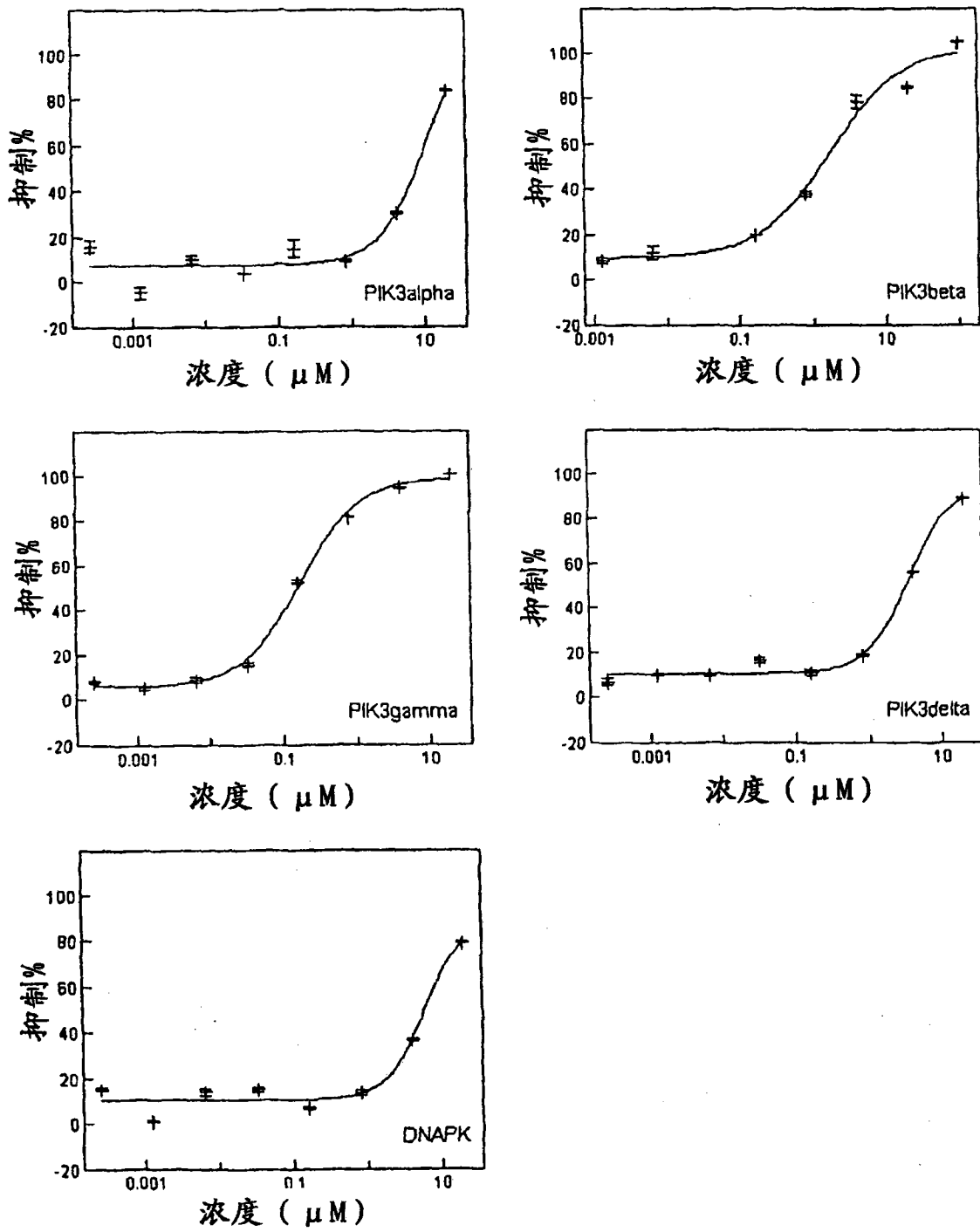


图 11

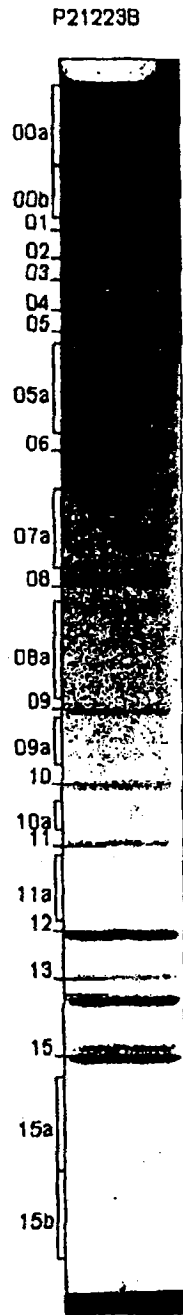


图 12

1 MAGSGAGVRC SLLRLOETLS AADRCGAALA GHQLIRGLGQ ECVLSSSPAV  
 51 LALQTSLVFS RDFGLLVFVR KSLNSIEFRE CREEILKFLC IFLEKMGQKI  
 101 APYSVEIKNT CTSVYTKDRA AKCKIPALDL LIKLLQTFRS SRLMDEFKIG  
 151 ELFSKFYQEL ALKKKIPDTV LEKVYELLGL LGEVHPSEMI NNAENLFRFRA  
 201 LGELKTQMTS AVREPKLPVL AGCLKGLSSL LCNFTKSMEE DPQTSREIFN  
 251 FVLKAIRPQI DLKRYAVPSA GLRRLFALHAS QFSTCLLDNY VSLFEVLLKW  
 301 CAHTNVELKK AALSALESFL KQVSNMVAKN AEMHKNKLOY FMEQFYGIIR  
 351 NVDSNNKELS IAIRGYGLFA GPCKVINAKD VDFMYVELIQ RCKQMFLTQT  
 401 DTGDDRQVQM PSFLQSVASV LLYLDTVPEV YTPVLEHLVV MQIDSFPOYS  
 451 PKMQLVCCRA IVKVFLALAA KGPVLRNCIS TVVHQGLIRI CSKPVVLPKG  
 501 PESESEDHRA SGEVRTGKWK VPTYKDYVDL FRHLLSSDOM MDSILADEAF  
 551 FSVNSSSESL NHLLYDEFVK SVLKIVEKLD LTLEIQTVGE QENGDEAPGV  
 601 WMIPTSDPAA NLHPAKPKDF SAFINLVEFC REILPEKQAE FFEPWVYSFS  
 651 YELILQSTRL PLISGFYKLL SITVRNAKKI KYFEGVSPKS LKHSPEDPEK  
 701 YSCFALFVKF GKEVAVKMKQ YKDELLASCL TFLLSLPHNI IELDVRAYVP  
 751 ALQMAFKLGL SYTPLAEVGL NALEEWISIYI DRHVMQPYK DILPCLDGYL  
 801 KTSALSDETK NNWEVSALS AAQKGFNKVV LKHLKKTQNL SSNEAISLEE  
 851 IRIRVQMLG SLGGQINKNL LTVTSSDEMM KSYVAWDREK RLSFAVPFRE  
 901 MKPVI FLDFV LPRVTEALAT ASDRQTKVAA CELLHSMVMF MLGKATQMP  
 951 GGQGAPPMYQ LYKRTFPVLL RLACDQVT RQLYEPLVMQ LIHWFTNNKK  
 1001 FESQDTVALL EAILDGI VDP VDSTLRDFCG RCIREFLKWS IKQITPOQOE  
 1051 KSPVNTKSLF KRLYSLALHP NAFKRLGASL AFNNIYREFR EEESLVEQFV  
 1101 FEALVIYMES LALAHADEKS LGTIQCCDA IDHLCRI IEK KHVSLNKAKK  
 1151 RRLPRGFPPS ASLCLLDLVK WLLAHCGRPQ TECRHKSIEL FYKFVPLLP  
 1201 NRSPNLWLKD VLKEEGVSFL INTFEGGGCG QPSGILAQPT LLYLRGPFSL  
 1251 QATLCWLDLL LAALECYNTF IGERTVGALQ VLGTEAQSSL LKAVAFFLES  
 1301 IAMHDI IAAE KCFGTGAAGN RTSPQEGERY NYSKCTVVVR IMEFTTLLN  
 1351 TSPEGWLLK KDLNTHLMR VLVQTLCEPA SIGFNIGDVQ VMAHLPDVCV  
 1401 NLMKALKMSP YKDILETHLR EKITAQSIEE LCAVNLYGPD AQVDRSRLAA  
 1451 VVSACKQLHR AGLLHNILPS QSTD LHHSVG TELLSLVYKG IAPGDEROCL  
 1501 PSLDLCKQL ASGLELFA FGGLCERLVS LLLNPAVLST ASLGSSQGSV  
 1551 IHFSHG EYFY SLFSETINTE LLKNLDLAVL ELMQSSVDNT KMVSAVLNGM  
 1601 LDQSFREERAN QKHQGLKLAT TILQHWKCD SWWAKDSPLE TKMAVLALLA  
 1651 KILQIDSSVS FNTSHGSFPE VFTTYISLLA DTKLDLHLKG QAVTLLPFFT  
 1701 SLTGGSL EEL RRVLEQLIVA HFFMQSREFP PGTFRFNYYV DCMKKFLDAL  
 1751 ELSQSPMLLE LMTEVLCREQ QHVMEELFQS SFRRIARRGS CVTQVGLLES  
 1801 VYEMFRKDDP RLSFTRQSFV DRSLLTLLWH CSLDALREFF STIVVDAIDV  
 1851 LKSFRFKLNE STFDTQITK MGYKILDVM YSRLPKDDVH AKESKINQVF  
 1901 HGSCITEGNE LTKTLIKLCY DAFTENMAGE NQLLERRRRLY HCAAYNCAIS  
 1951 VICCVFNEK FYQGFLFSEK PEKNLLIFEN LIDLKRRYNF PVEVEVPMER  
 2001 KKKYIEIRKE AREAANGDSD GPSYMSLSY LADSTLSEEM SQFDFSTGVQ  
 2051 SYSYSSQDPR PATGRFRRRE QRDPVHDDV LELEMDELNR HECMAPLTAL  
 2101 VKHMHRSLGP POGEEDSVPR DLPSWMKFLH GKLGNPVPL NIRLFLAKLV

图 13

2151 INTEEVFRPY AKHWLSPLLO LAASENNGGE GIHYMVVEIV ATILSWTGLA  
 2201 TPTGVPKDEV LANRLNFLM KHVFPKRAV FRHNLEIikt LVECWKDCLS  
 2251 IPYRLIFEKF SGKDPNSKDN SVGIQLLGIV MANDLPPYDP QCGIQSSEYF  
 2301 QALVNNMSFV RYKEVYAAAA EVLGLILRYV MERKNILEES LCELVAKQLK  
 2351 QHQNTMEDKF IVCLNKVTKS FPPLADRFMN AVFFLLPKFH GVLKTLCLEV  
 2401 VLCRVEGMTE LYFQLKSKDF VQVMRHRDDE RQKVCLDIY KMMPKLPVE  
 2451 LRELLNPVVE FVSHPSTTCR EQMYNLMWI HDNYRDPSE TDNDSQEIFK  
 2501 LAKDVLIOGL IDENPGLQLI IRNFWSHETR LPSNTLDRLL ALNSLYSPKI  
 2551 EVHFLSLATN FLEMTSMSP DYPNPMFEHP LSECEFOEYT IDSDFRFRST  
 2601 VLTPMFVETQ ASOQTLQTRT QEGSLARWP VAGQIRATQO QHDFTLTQTA  
 2651 DGRSSFDWLT GSSTDPLVDH TSPSSDSSLF AHKRSERLQR APLKSVGPDF  
 2701 GKKRLGLPGD EVDNKVKGAA GRTDLLRLRR RFMRDQEKLS LMYARKGVAE  
 2751 QKREKEIKSE LKMKQDAQVV LYRSYRHGDL PDIQIKHSSL ITPLQAVAQR  
 2801 DPIIAKQLFS SLFSGILKEM DKFKTLSEKN NITQKLLQDF NRFLNNTTFSF  
 2851 FPPFVSCIQD ISCQHAALLS LDPAAVSAGC LASLOQPVGI RLLEEALLRL  
 2901 LPAELPAKRV RGKARLPPDV LRWVELAKLY RSIGEYDVL R GIFTSEIGTK  
 2951 QITQSALLAE ARSDYSEAAK QYDEALNKQD WVDGEPTEAE KDFWELASLD  
 3001 CYNHLAEWKS LEYCSTASID SENPPDLNKI WSEPFYQETY LPYMIRSKLK  
 3051 LLLOGEADQS LLTFIDKAMH GELOKAIHEL HYSQELSLLY LLQDDVDRAK  
 3101 YYIQNGIQSF MQNYSSIDVL LHQSRLTKLQ SVQALTEIQE FISFISKQGN  
 3151 LSSQVPLKRL LNTWTNRYPD AKMDPMNIWD DIITNRCFFL SKIEEKLTP  
 3201 PEDNSMNVQ DGDPDRMEV QEQEEDISSL IRSCKFSMKM KMIDSARKON  
 3251 NPSLAMKLLK ELHKESKTRD DWLVSWVQSY CRLSHCRSRS QGCSEQVLTV  
 3301 LKTVSLLDEN NVSSYLSKNI LAFRDQNIL GTTYRIANA LSSEPACLAE  
 3351 IEEDKARRIL ELSGSSSEDS EKVIAGLYQR AFQHLSEAVQ AAEAEAQPPS  
 3401 WSCGPAAGVI DAYMTLADFC DQQLRKEEN ASVIDSAELO AYPALVVEKM  
 3451 LKALKLNSNE ARLKFPRLQ I IERYPEETL SLMTKEISSV PCWQFISWIS  
 3501 HMVALLDKDQ AVAVQHSVEE ITDNYPQAI V YPFIISSESY SFKDTSTGHK  
 3551 NKEFVARIKS KLDQGGVIQD FINALDQLSN PELLFKDWSN DVRAELAKTP  
 3601 VNKKNIEKMY ERMYAALGDP KAPGLGAFRR KFIQTFGKEF DKHFGKGGSK  
 3651 LLRMKLSDFN DITNMLLLKM NKDSKPPGNL KECSPWMSDF KVEFLRNELE  
 3701 IPGQYDGRGK PLPEYHVRIA GFDERVTVMA SLRRPKRII RGHDEREHPF  
 3751 LVKGGEDLRQ DQRVEQLFQV MNGILAQDSA CSQRALQLRT YSVVPMTSRL  
 3801 GLIEWLENTV TLKDLLLNTM SQEEKAA YLS DPRAPPCEYK DWLTKMSGKH  
 3851 DVGAYMLMYK GANRTETVTS FRKRESKVPA DLLKRAFVRM STSPFAFLAL  
 3901 RSHFASSHAL ICISHWILGI GDRHLNFMV AMETGGVIGI DFGHAFGSAT  
 3951 QFLPVPELMP FRLTROFINL MLPKGTGLM YSIMVHALRA FRSDPGLLTN  
 4001 TMDVVFKEPS FDWKNFEQKM LKKGGSWIOE INVAEKNWYP RQKICYAKRK  
 4051 LAGANPAVIT CDELLLGHEK APAFRDYVAV ARGSKDHNIR AQEPESGLSE  
 4101 ETQVKCLMDQ ATDPNILGRT WEGWEPWM

图 13- 续

1 MSLVLNLLI CCRQLEHDRA TERKKEVEKF KRLIRDPEI KHLDRHSDSK  
 51 QGKYLNDVAV FRFLQKYIQK ETECLRIAKP NVSASTQASR QKKMQEISSL  
 101 VKYFIKCANR RAPRLKCQEL LNYYIMDTVKD SSNGAIYGAD CSNILLKDIL  
 151 SVRKYWCEIS QQWLELFSV YFRLYLKPSQ DVHRVLVARI IHAVTKGCCS  
 201 QTDGLNSKFL DFFSKAIQCA ROEKSSSGLN HILAALTIFL KTAVNFRIR  
 251 VCELGDEILP TLLYIWTQHR LNDSLKEVII ELFQLQIYIH HPGKAKTQEK  
 301 GAYESTKWRS ILYNLYDLLV NEISHIGSRG KYSSGFRNIA VKENLIELMA  
 351 DICHQVFNED TRSLEISQSY TTTORESSDY SVPCKRKKIE LGWEVIKDHL  
 401 QKSONDFDLV PWLQIATQLI SKYPASLPNC ELSPLLMILS QLLPQQRHGE  
 451 RTPYVLRCLT EVALCQDKRS NLESSQKSDL LKLWNKIWCI TFRGISSEOI  
 501 QAENFGLLGA IIQGSLEVD REFWKLFRTGS ACRPSCPAVC CLTLALTTSI  
 551 VPGAUKMGIE QNMCEVNRSF SLKESIMKWL LFYQLEGDLE NSTEVPPILH  
 601 SNFPHLVLEK ILVSLTMKNC KAAMNFPQSV PECEHHQKDK EELSFSEVEE  
 651 LFLQTTFDKM DFLTIVRECG IEKHQSSIGF SVHQNLKESL DRCLLGLSEQ  
 701 LLNNYSSEIT NSETLVRCRS LLVGVLCYC YMGVIAEEEA YKSELFQKAN  
 751 SLMQCAGESI TLFKNKTNEE FRIGSLRNM QLCTRCLSNC TKKSPNKIAS  
 801 GFFLRLLTSK LMNDIADICK SLASFIKKPF DRGEVESMED DTNGNLMEVE  
 851 DQSSMNLFND YPDSSVSDAN EPGESQSTIG AINPLAEEYL SKQDLLFLDM  
 901 LKFLCLCVTT AQTNTVSFRA ADIRKLLML IDSSTLEPTK SLHLHMYLML  
 951 LKELPGEEYP LPMEDVLELL KPLSNVCSLY RRDQDVCKTI LNHVLHVVKN  
 1001 LGQSNMDSN TRDAQQFLT VIGAFWHLTK ERKYIFSVM ALVNCLKTL  
 1051 EADPYKWA LNVMGKDFPV NEVFTQFLAD NHHQVRMLAA ESINRLFQDT  
 1101 KGDSSRLKA LPLKLQQTAF ENAYLKAQEG MREMSHAEN PETLDEIYNR  
 1151 KSVLLTLIAV VLSCSPICEK QALFALCKSV KENGLPHLV KKVLEKVSET  
 1201 FGYYRLEDFM ASHLDYLVLE WLNLDQTEYN LSSFPFILLN YTNIEDFYRS  
 1251 CYKVLPHLV IRSHFDEVKS IANQIQEDWK SLLTDCFPKI LVNILPYFAY  
 1301 EGTRDSGMAQ QRETATKVYD MLKSENLLGK QIDHLFISNL PEIVVELLMT  
 1351 LHEPANSSAS QSTDLCDFSG DLDPAPNPPH FPSHVIKATF AYISNCHKTK  
 1401 LKSILEILSK SPDSYQKILL AICEQAAETN NVYKXHRILK IYHLFVSLLL  
 1451 KDIKSLGGA WAFVLRDVIY TLIHYINQRP SCIMDVSLRS FSLCCDLLSQ  
 1501 VCQTAVTYCK DALENHLHVI VGTLIPLVYE QVEVQKQVLD LLKYLVIDNK  
 1551 DNENLYITIK LLDPPFDHVV FKDLRITQOK IKYSRGPFSL LEEINHFLSV  
 1601 SVYDALPLTR LEGLKDLRRQ LELHKDQMDV IMRASQDNPO DGIMVKLVN  
 1651 LLQLSKMAIN HTGEKEVLEA VGSCLGVEGP IDFSTIAIQH SKDASYTKAL  
 1701 KLFEDKELQW TFIMLTYLNN TLVEDCVKVR SAAVTCLKNI LATKTGHSFW  
 1751 EIYKMTDPM LAYLQPFRTS RKKFLEVPRF DKENPFEGLD DINLWIPLSE  
 1801 NHDIWIKTLT CAFLDSGGTK CEILQLLKPM CEVKTDFCQT VLPYLHIDIL  
 1851 LQDTNESWRN LLSTHVQGGF TSCLRHSQTS SRSTTPANLD SESEHFRCC  
 1901 LDKKSQRTML AVVDYMRQK RPSSGTIFND AFWLDLNYLE VAKVAQSCAA  
 1951 HFTALLYAEI YADKKSMDQ EKRSLAFEEG SQSTTISSLS EKSKEETGIS  
 2001 LQDLLLEIYR SIGEPDSLYG CGGGKMLQPI TRLRTEHEA MWGKALVTYD  
 2051 LETAIPSSTR QAGIIQALQN LGLCHILSVY LKGLDYENKD WCPELEELHY

图 14

2101 QAAWRNMQWD HCTSVSKEVE GTSYHESLYN ALQSLRDREF STFYESLKYA  
 2151 RVKEVEEMCK RSLESVYSLY PTLSRLQAIG ELESIGELFS RSVTHRQLSE  
 2201 VYIKWQKHSQ LLKDSDFSFO EPIMALRTVI LEILMEKEMD NSQRECIKDI  
 2251 LTKHLVELSI LARTFKNTQL PERAIFQIKQ YNSVSCGVSE WQLEEAQVFW  
 2301 AKKEQSLALS ILKQMIKKLD ASCAANNPSL KLTYTECLRV CGNWLAECL  
 2351 ENPAVIMQTY LEKAVEVAGN YDGESSDEL NGKMKAFSL ARFSDTQYQR  
 2401 IENYMKSSSEF ENKQALLKRA KEEVGLLREH KIQTNRYTVK VQRELELDEL  
 2451 ALRALKEDRK RFLCKAVENY INCLLSGEEH DMWVFRCLSL WLENSGVSEV  
 2501 NGMMKRDGMK IPTYKFLPLM YQLAARMGTK MMGGLGFHEV LNNLISRISM  
 2551 DHPHHTLFII LALANANRDE FLTKPEVARR SRITKNVPKQ SSQLEDRTE  
 2601 AANRIICTIR SRRPQMVRVS EALCDAYIIL ANLDATQWKT QRKGINIPAD  
 2651 QPITKLNLE DVVVPTMEIK VDHTGEYGNL VTIQSFKAEF RLAGGVNLPK  
 2701 IIDCVGSDGK ERRQLVKGRD DLRQDAVMQ VFQMCNTLLQ RNTETKRKRL  
 2751 TICTYKVVPL SQRSGVLEWC TGTVPIGEFL VNNEDGAHKR YRPNDFSAFQ  
 2801 CQKMMMEVQK KSFEEKYEVF MDVCQNFQPV FRYFCMEKFL DPAIWFEKRL  
 2851 AYTRSVATSS IVGYILGLGD RHVQNILINE QSAELVHIDL GVAFEQ GKIL  
 2901 PTPETVPFRL TRDIVDGMGI TGVEGVFRRC CEKTMEVMRN SQETLLTIVE  
 2951 VLLYDPLFDW TMNPLKALYL QORPEDETEL HPTLNADDQE CKRNLSDIDQ  
 3001 SFNKVAERVL MRLQEKLGKV EEGTVLSVGG QVNLLIQQAI DPKNLSRLFP  
 3051 GWKAWV

图 14- 续

1 MLGTGPAAAAT TAATTSSNV VLOQFASGLK SRNEETRAKA AKELQHYVTM  
 51 ELREMSQEES TRFYDQLNHH IFELVSSSDA NERKGGILAI ASLIGVEGGN  
 101 ATRIGRFANY LRNLLPSNDP VVMEMASKAI GRLAMAGDTF TAEYVEFEVK  
 151 RALEWLGADR NEGRRHAAVL VLRELAISVP TFFFQQVQPF FDNIFVAVWD  
 201 PKQAIREGAV AALRACLILT TQREPKEQK PQWYRHTFEE AEKGFDETLA  
 251 KEKGMNRDDR IHGALLILNE LVRISSMEGE RLREEMEEIT QQQLVHDKYC  
 301 KDLMGFGTKP RHITPFTSFQ AVQPQOSNAL VGLLGYSSHQ GLMGFGTSPS  
 351 PAKSTLVESR CCRDLMEEFK DQVCQWVLKC RNSKNSLIQM TILNLLPRLA  
 401 AFRPSAFTDT QYLQDTMNHV LSCVKKEKER TAAFQALGLL SVAVRSEFKV  
 451 YLPRVLDIIR AALPPKDFAH KRQKAMQVDA TVFTCISMLA RAMGPGIQOD  
 501 IKELLEPMLA VGLSPALTAV LYDLSRQIPQ LKKDIQDGLL KMLSLVLMHK  
 551 PLRHPGMPKG LAHQLASPGL TTLPEASDVG SITLALRTLK SFEFEGHSLT  
 601 QFVRHCADHF LNSEHKEIRM EAARTCSRLT TPSIHLISGH AHVVSQTAVQ  
 651 VVADVLSKLL VVGITDPPD IRYCVLASLD ERFDAHLAQA ENLQALFVAL  
 701 NDQVFEIREL AICTVGRSS MNPAFVMPFL RKMLIQILTE LEHSGIGRIK  
 751 EQSARMLGHL VSNAPRLIRP YMEPILKALI LKLDPPDPD NPGVINNVLA  
 801 TIGELAQVSG LEMRKWDEL FIIIMDMLQD SSLLAKRQVA LWTLGQLVAS  
 851 TGYVVEPYRK YPTLLEVLN FLKTEQNQGT RREAIRVLGL LGALDPYKHK  
 901 VNIGMIDQSR DASAVLSSES KSSQDSSDYS TSEMLVNMGN LPLDEFYPAV  
 951 SMVALMRIFR DQSLSHHTM VVQAITFIFK SLGLKCVQFL POVMPTFLNV  
 1001 IRVCDGAIRE FLFQQLGMLV SFVKSHIRPY MDEIVTLMRE FWVMNTSIQS  
 1051 TIILLIEQIV VALGGEFKLY LPQLIPHMLR VFMHDNSPGR IVSIKLLAAI  
 1101 QLFGANLDDY LHLLLPPIVK LFDAPEAPLP SRKAALETVD RLTESLDFTD  
 1151 YASRIIHPIV RTLDQSPELR STAMDTLSSL VFQLGKKYQI FIPMVNKVLV  
 1201 RHRINHORYD VLICRIVKGY TLADEEEDPL IYQHRMLRSG QGDALASGPV  
 1251 ETGPMKKLHV STINLQKAWG AARRVSKDDW LEWLRRLSLE LLKDS SSPSL  
 1301 RSCWALAQAY NPMARDLFNA AFVSCWSELN EDQQDELIRS IELALTSODI  
 1351 AEVTQTLNL AEFMEHSDKG PLPLRDDNGI VLLGERAAKC RAYAKALHYK  
 1401 ELEFQKGPTP AILESLSIN NKLOQPEAAA GVLEYAMKHF GELEIQATWY  
 1451 EKLHEWEDAL VAYDKKMDTN KDDPELMLGR MRCLEALGEW GOLHQCCCK  
 1501 WTLVNDETQA KMARMAAAA WGLQWDSME EYTCMIPRDT HDGAFYRAVL  
 1551 ALHQDLFSLA QQCIDKARDL LDAELTAMAG ESYSRAYGAM VSCHMLSELE  
 1601 EVIQYKLVPE RREIIRQIWW ERLQGCQRIV EDWQKILMVR SLVVSPHEDM  
 1651 RTWLKYASLC GKSGRLALAH KTLVLLLGVD PSRQLDHPLP TVHPQVYAY  
 1701 MKNMWKSARK IDAFQHMQHF VQTMQQAQAH AIATEDQQHK QELHKLMARC  
 1751 FLKLGEWQLN LOGINESTIP KVLQYSAAT EHDRSWYKAW HAWAVMNFEA  
 1801 VLHYKHQQA RDEKKLRHA SGANITNATT AATTAATATT TASTECSNSE  
 1851 SEAESTENSP TPSPLQKKVT EDLSKTLMLY TVPAVQGFRR SISLSRGNL  
 1901 QDTRLRVTLW FDYGHWPDVN EALVEGVKAI QIDTWLQVIP QLIARIDTPR  
 1951 PLVGRLIHQL LTDIGRYHPQ ALIYPLTVAS KSTTTARHNA ANKILKNMCE  
 2001 HSNTLVQQAM MVSEELIRVA ILWHEMWHEG LEEASRLYFG ERNVKGMFEV  
 2051 LEPLHAMMER GPOTLKETF NQAYGRDLME AQEWCRKYMK SGNVKDLTQA

图 15

2101 WDLYYHVFRR ISKQLPOLTS LELQYVSPKL LMCRDLELAV PGTYDPNQPI  
 2151 IRIQSIAPSL QVITSKQRPR KLTLMGSNHG EFVFLKKGHE DLRQDERVMQ  
 2201 LFGLVNTLLA NDPTSLRKNL SIQRYAVIPL STNSGLIGWV PHCDTLHALI  
 2251 RDYREKKKIL LNIHRIMLR MAPDYDHLTL MQKVEVFEHA VNNTAGDDLA  
 2301 KLLWLKSPSS EVWFDRRTNY TRSLAVMSMV GYILGLGDRH PSNLMLDRLS  
 2351 GKILHIDFGD CFEVAMTREK FPEKIPFRLT RMLTNAMEVT GLDGNRYITC  
 2401 HTVMEVLRH KDSVMAVLEA FVYDPLLNR LMDTNTKGNK RSRTRTDSYS  
 2451 AGQSVEILDG VELGEPAAKK TGTTVPESIH SFIGDGLVKP EALNKKAIQI  
 2501 INRVRDKLTG RDFSHDDTLD VPTQVELLIK QATSHENLCQ CYIGWCPFW

图 15-续

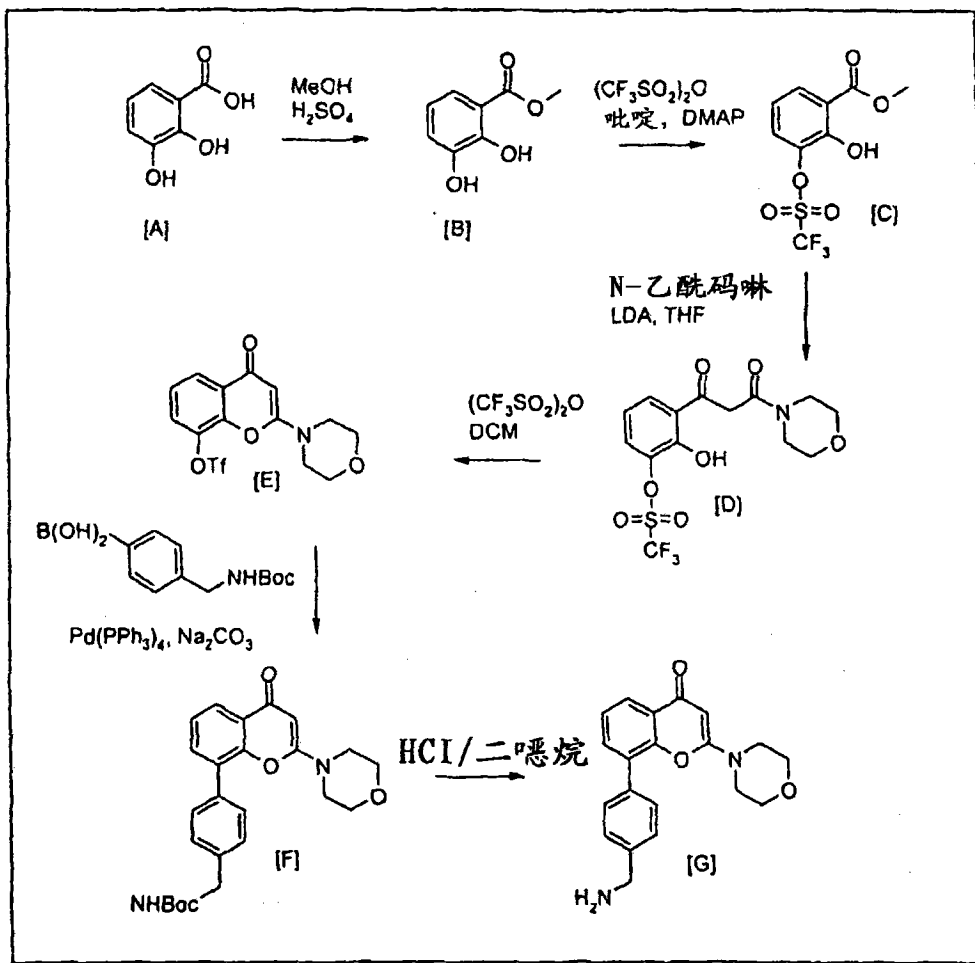


图 16

P21252B

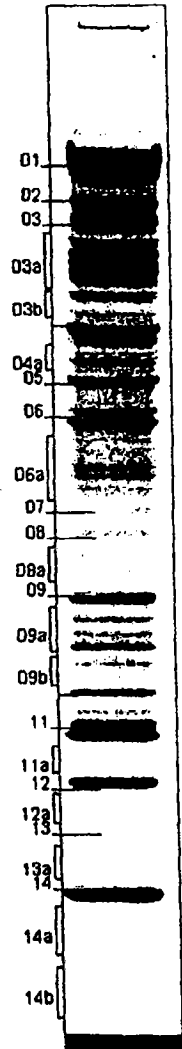


图 17

1 MGEHGLELAS MIPALRELGS ATPEEYNTVV QKPRQILCQF IDRILTDVNV  
 51 VAVELVKKTD SQPTSVMLLD FIOHIMKSSP LMFVNVSGSH EAKGSCIEFS  
 101 NWIITRLLRI AATPSCHLLH KKICEVICSL LFLFKSKSPA IFGVLTKELL  
 151 QLFEDLVYLH RRNVMGHAVE WPVVMRFLS QLDEHMGYLQ SAPLQLMSMQ  
 201 NLEFIEVTLL MVLTRIIAIV FFRRQELLLW QIGCVLLEYG SPKIKSLAIS  
 251 FLTELFQJGG LPAQPASTFF SSFLELLKHL VEMDTDQLKL YEEPLSKLIK  
 301 TLFPPFEAEAY RNIEPVYLM LLEKLCVMFE DGVLMLRKSD LLKAALCHLL  
 351 QYFLKFVPAG YESALQVRKV YVRNICKALL DVLGIEVDAE YLLGPLYAAL  
 401 KMESMEIEE IQCOTOENL SSNSDGISPK RRRSSSLNPN SKRAPQTEE  
 451 IKHVDMNQKS ILWSALKQKA ESLQISLEYS GLKNPVIEML EGIAVVLQLT  
 501 ALCTVHCSHQ NMNCRTEFKDC QHKSKKKPSV VITWMSLDFY TKVLKSCRSL  
 551 LESVQKLDLE ATIDKVVKIY DALIYMQVNS SFEDHILEDL CGMLSLPWIY  
 601 SHSDDGCLKL TTFAANLLTL SCRISDSYSP QAQSRCVFLF TLFPRRIFLE  
 651 WRTAVYNWAL QSSHEVIRAS CVSGFFILLQ QONSCNRVPK ILIDKVKDDS  
 701 DIVKKEFASI LGQLVCTLHG MFYLTSLSLTF PFSEHGHVDL FCRNLKATSO  
 751 HECSSSQLKA SVCKPFLFLL KKKIPSPVKL AFIDNLHHLK KHLDFREDET  
 801 DVKAVLGTLL NLMEDPKDV RVAFSGNIKH ILESLSDEG FIKELFVLRM  
 851 KEAYTHAQIS RNNELKDTLI LTTGDIGRAA KGDLVPFALL HLLHCLLSKS  
 901 ASVSGAAYTE IRALVAAKSV KLQSFSSQYK KPICQFLVES LHSSQMTALP  
 951 NTPCQNADVR KQDVAHQREM ALNTLSEIAN VFDFPDLNRF LTRTLQVLLP  
 1001 DLAAKASPAA SALIRTLGKQ LNVNRREILI NNFKYIFSHL VCSCSKDELE  
 1051 RALHYLKNET EIELGSLLRQ DFQGLHNELL LRIGEHYQQV FNGLSILASF  
 1101 ASSDDPYQGP RDIISPELMA DYLOPKLLGI LAFFNMQLLS SSVGIEDKMK  
 1151 ALNSLMSLMK LMGPKHVSSV RVKMMTTLRT GLRFKDDFPE LCCRAWDCFV  
 1201 RCLDHACLGS LLSHVIVALL PLIHQPKEA AAFHYLIIE NRDAVQDFLH  
 1251 EIYFLPDHPE LKKIKAVLQE YRKETSESTD LQTTLQLSMK AIQHENVQVR  
 1301 IHALTSLKET LYKNQEKLIK YATDSETVEP IISQLVTVLL KGCQDANSQA  
 1351 RLLCGECLGE LGAIDPGRLD FSTTETQGKD FTFVTGVEDS SFAYGLLMEL  
 1401 TRAYLAYADN SRAQDSAAYA IQELLSIYDC REMETNGPGH QLWRRFPEHV  
 1451 REILEPHLNT RYKSSQKSTD WSGVKKPIYL SKLGSNFAEW SASWAGYLIT  
 1501 KVRHDLASKI FTCCSIMMKH DFKVTIYLLP HILVYVLLGC NQEDQQEVYA  
 1551 EIMAVLKHDD QHTINTQDIA SDLCQLSTQT VFSMLDHLTQ WARHKFQALK  
 1601 AEKCPHSHSN RNKVDMSVST VDYEDYQSVT RFLDLIPQDT LAVASFRSKA  
 1651 YTRAVMHFES FITEKKQNIQ EHLGFLQKLY AAMHEPDGVA GVS AIRKAEP  
 1701 SLKEQILEHE SLGLLRDATA CYDRAIQLEP DQI IHYHGVV KSMLGLGQLS  
 1751 TVITQVNGVH ANRSEWDEL NTYRVEAAWK LSQWDLVENY LAADGKSTTW  
 1801 SVRLGQLLS AKKRDIATFY DSLKLVRAEQ IVPLSAASFE RGSYQRGYEV  
 1851 IVRLHMLCEL EHSIKPLFQH SPGDSSQEDS LNWARLEMT QNSYRAKEPI  
 1901 LALRRALLSL NKRPDYNEMV GECWLQSARV ARKAGHHQTA YNALLNAGES  
 1951 RLAELYVERA KWLWSKGDVH QALIVLQKGV ELCFPENETP PEGKNMLIHG  
 2001 RAMLLVGRFM EETANFESNA IMKKYKDVTA CLPEWEDGHF YLAKYYDKLM

图 18

2051 PMVTDNKMEK QGDLIRYIVL HFGRSLQYGN QFIYQSMPRM LTLWLDYGTK  
2101 AYEWKAGRS DRVQMRNDLG KINKVITEHT NYLAPYQFLT AFSQLISRIC  
2151 HSHDEVFVVL MEIIAKVFLA YPQAMWMMT AVSKSSYPMR VNRCKEILNK  
2201 AIHMKSLEK FVGDATRLTD KLELCNKPV DGSSSTLSMS THFKMLKCLV  
2251 EEATFSEILI PLQSVMIPTL PSILGTHANH ASHEPFPQHW AYIAGFDDMV  
2301 EILASLQKPK KISLKGSDGK FYIMMCKPKD DLRKDCRLME FNSLINKCLR  
2351 KDAESRRREL HIRTYAVIPL NDECGIIEWV NNTAGLRPIL TKLYKEKGVY  
2401 MTGKELRQCM LPKSAALSEK LKVFREFLLP RHPPIFHEWF LRTFPDPTSW  
2451 YSSRSAYCRS TAVMSMVGVI LGLGDRHGEN ILFDSLGTGEC VHVDFNCLFN  
2501 KGETFEVPEI VPFRLTHNMV NGMGPMGTEG LFRRACEVTM RLMRDQREPL  
2551 MSVLKTFLLD PLVEWSKPVK GHSKAPLNET GEVVNEKAKT HVL DIEORLQ  
2601 GVIKTRNRVT GLPLSIEGHV HYLIQEATDE NLLCQMYLGW TPYM

图 18- 续

1 MSLVLNLLI CCRQLEHDRA TERKKEVEKF KRLIRDPETI KHLDRHSDSK  
 51 QGKYLWDAV FRFLQKYIQK ETECLRIAKP NVSASTQASR QKKMQEISSL  
 101 VKYFIKCANR RAPRLKCQEL LNYIMDTVKD SSNGAIYGAD CSNILLKDIL  
 151 SVRKYWCEIS QQOWLELFSV YFRLYLKPSQ DVHRVLVARI IHAVTKGCCS  
 201 QTDGLNSKFL DFFSKAIQCA RQEKSSSGLN HILAALTI FL KTLAVNFRIR  
 251 VCELGDEILP TLLYIWTQHR LNDLSKEVII ELFQLQIYIH HPGKAKTQEK  
 301 GAYESTKWRS ILYNLYDLLV NEISHIGSRG KYSSGFRNIA VKENLIELMA  
 351 DICHQVFNE D TRSLEISQSY TTTQRESSDY SVPCKRKKIE LGWEVIKDHL  
 401 QKSQNDFDLV PWLQIATQLI SKYPASLPNC ELSPLLMILS QLLPQQRHGE  
 451 RTPYVLRCLT EVALCQDKRS NLESSQKSDL LKLWNKIWCI TFRGISSEQI  
 501 QAENFGLLGA IIQGSLEVE D REFVKLFTGS ACRPSCPVC CLTLALTTSI  
 551 VPGA VKMGIE QNMCEVNRSF SLKESIMKWL LFYQLEGDLE NSTEVPPILH  
 601 SNFPHLVLEK ILVSLTMKNC KAAMNFFQSV PECEHHQKDK EELSFSEVEE  
 651 LFLQTTFDKM DFLTIVRECG IEKHQSSIGF SVHQNLKESL DRCLLGLSEQ  
 701 LLNYSSEIT NSETLVRCR LLLVGLGCYC YMGVIAEEEA YKSELFQKAN  
 751 SLMQCAGESI TLFKNKTNEE FRIGSLRNM QLCRCLSNC TKKSPNKIAS  
 801 GFFLRLLTSK LMNDIADICK SLASFIKPF DRGEVESMED DTNGNLMEVE  
 851 DQSSMNFND YPDSSVDAN EPGESQSTIG AINPLAE EYL SKQDLLFLDM  
 901 LKFLCLCVTT AQTNTVSFRA ADIRKLLML IDSSTLEPTK SLHLHMYLML  
 951 LKELPGEEYP LPMEDVLELL KPLSNVCSLY RRDQDVCKTI LNHVLHVVKN  
 1001 LGQSNMDS EN TRDAQGFLT VIGAFWHLTK ERKYIFSVRM ALVNCLKTLL  
 1051 EADPYSKWAI LNVMGKDFPV NEVFTQFLAD NHHQVRMLAA ESINRLFQDT  
 1101 KGDSSRLKA LPLKLOQTAF ENAYLKAQEG MREMSHAEN PETLDEIYNR  
 1151 KSVLLTLIAV VLSCSPICEK QALFALCKSV KENGLEPHLV KKVLEKVSET  
 1201 FGYRLED FM ASHLDYLVLE WLNLDQTEYN LSSFPFILLN YTNIEDFYRS  
 1251 CYKVLIPHLV IRSHFDEVKS IANQIQEDWK SLLTDCFPKI LVNILPYFAY  
 1301 EGTRDSGMAQ QRETATKVYD MLKSENLLGK QIDHLFISNL PEIVVELLMT  
 1351 LHEPANSSAS QSTDLCDFSG DLDPAPNPPH FPSHVIKATF AYISNCHKTK  
 1401 LKSILEILSK SPDSYQKILL AICEQAAETN Nvykkhrilk IYHLFVSLLL  
 1451 KDIKSGLGA WAFVLRDVIY TLIHYINQRP SCIMDVSLRS FSLCCDLLSQ  
 1501 VCQTA VTYCK DALENHLHVI VGTLIPLVYE QVEVQKQVLD LLKYLVIDNK  
 1551 DNENLYITIK LLDPPFDHV Fkdlritqok IKYSRGPFSL LEEINHFLSV  
 1601 SVYDALPLTR LEGLKDLRRQ LELHKDQV D IMRASQDNPO DGIMVKLVVN  
 1651 LLQLSKMAIN HTGEKEVLEA VGSCLG E VGP IDfstiaiqh SKDASYTKAL  
 1701 KLFEDKELQW TFIMLTYLNN TLVEDCVKVR SAAVTCLKNI LATKTGHSFW  
 1751 EIYKMTTDP M LAYLQPFRTS RKKFLEVPRF DKENPFEGLD DINLWIPLSE  
 1801 NHDIWIKTLT CAFLD SGGTK CEILQLLKPM CEVKTDFCQT VLPYLIHDIL  
 1851 LQDTNESWRN LLSTHVQGF TSCLRHSFSQT SRSTTPANLD SESEHFFRCC  
 1901 LDKKSQRTML AVVDYMR RQK RPSSGTIFND AFWLDLNYLE VAKVAQSCAA  
 1951 HFTALLYAEI YADKKSMD DQ EKRS LAFEEG SQSTTISSLS EKSKEETGIS  
 2001 LQDLLLEIYR SIGEPDSLYG CGGKMLQPI TRLR TYEHEA MWGKALV TYD

图 19

```

2051 LETAI PSSTR QAGIIQALQN LGLCHILSVY LKGLDYENKD WCPELEELHY
2101 QAAWRNMQWD HCTSVSKEVE GTSYHESLYN ALQSLRDREF STFYESLKYA
2151 RVKEVEEMCK RSLESVYSLY PTL SRLQAIG ELESIGELFS RSVTHRQLSE
2201 VYIKWQKHSQ LLKDSDFSQ EPIMALRTVI LEILMEKEMD NSQRECIKDI
2251 LTKHLVELSI LARTFKNTQL PERAIFQIQ YNSVSCGVSE WQLEEAQVFW
2301 AKKEQSLALS ILKQMIKKLD ASCAANNPSL KLTYTECLRV CGNWLAE TCL
2351 ENPAVIMQTY LEKAVEVAGN YDGESSDEL R NGKMKAFSL ARFSDTQYQR
2401 IENYMK SSEF ENKQALLKRA KEEVGLLREH KIQTNR YTVK VQRELELDEL
2451 ALRALKEDRK RFLCKAVENY INCLLSGEEH DMWVFR L CSL WLENSGVSEV
2501 NGMMKR DGMK IPTYKFLPLM YQLAARMG TK MMGGLGFHEV LNNLISRISM
2551 DHPHHTLFII LALANANRDE FLTKPEVARR SRITKNV PKQ SSQLED RTE
2601 AANRIICTIR SRRPQM VRSV EALCDAYIIL ANLDATQWKT QRKGINIPAD
2651 QPITKLK NLE DVVVPTMEIK VDHTGEYGNL VTIQSFKA EF RLAGGVNLPK
2701 IIDCVGSDGK ERRQLVKGRD DLRQDAVMQQ VFQMCNTLLQ RNTETRKRKL
2751 TICTYKVVEL SQRSGVLEWC TGTVP IGEFL VNNEDGAHKR YRPND FSAFQ
2801 CQKMMEVQK KSFE EKYEVF MDVCQNFQPV FRYFCMEKFL DPAIWFEKRL
2851 AYTRSVATSS IVGYILGLGD RHVQNILINE QSAELVHIDL GVAFEQKIL
2901 PTPETVPFRL TRDIVDGMGI TGVEGVFRRC CEKTMEVMRN SQETLLTIVE
2951 VLLYDPLFDW TMNPLKALYL QORPEDETEL HPTLNADDQE CKRNLS DIDQ
3001 SFDKVAERVL MRLQEK LKGV EEGTVLSVGG QVNLLIQQAI DPKNLSRLFP
3051 GWKAWV

```

图 19- 续

1 MLGTGPAAT TAATTSSNVS VLQOFASGLK SRNEETRAKA AKELQHYVTM  
 51 ELREMSQEES TRFYDQLNHH IFELVSSDA NERKGGILAI ASLIGVEGGN  
 101 ATRIGRFANY LRNLLPSNDP VVMEMASKAI GRLAMAGDTF TAEYVEFEVK  
 151 RALEWLGADR NEGRRHAAVL VLRELAISVP TFFFQOVQPF FDNIFVAVWD  
 201 PKQAIREGAV AALRACLILT TQREPKEMQK PQWYRHTFEE AEKGFDETLA  
 251 KEKGMNRDDR IHGALLILNE LVRISSEMEGE RLREEMEEIT QOQLVHDKYC  
 301 KDLMGFGTKP RHITPFTSFQ AVQPQSNAL VGLLYSSHQ GLMGFGTSPS  
 351 PAKSTLVESR CCRDLMEEFK DOVCQWVLKC RNSKNSLIQM TILNLLPRLA  
 401 AFRPSAFTDT QYLQDTMNHV LSCVKKEKER TAAFQALGLL SVAVRSEFKV  
 451 YLPRVLDIIR AALPPKDFAH KROKAMQVDA TVFTCISMLA RAMGPGIQOD  
 501 IKELLEPMLA VGLSPALTAV LYDLSRQIPQ LKKDIQDGLL KMLSLVLMHK  
 551 PLRHPGMPKG LAHQLASPLG TTLPEASDVG SITLALRTL SFEFEGHSLT  
 601 QFVRHCADHF LNSEHKEIRM EAARTCSRLL TPSIHLISGH AHVVSQTAVQ  
 651 VVADVLSKLL VVGITDPDPD IRYCVLASLD ERFDAHLAQA ENLQALFVAL  
 701 NDQVFEIREL AICTVGRLLS MNPAFVMPFL RKMLIQILTE LEHSGIGRIK  
 751 EQSARMLGHL VSNAPRLIRP YMEPILKALI LKCLKDPDPD NPGVINNVLA  
 801 TIGELAQVSG LEMRKWDEL FIIIMDMLQD SSLLAKROVA LWTLGQLVAS  
 851 TGYVVEPYRK YPTLLEVLN FLKTEQNQGT RREAIRVLGL LGALDPYKHK  
 901 VNIGMIDQSR DASAVLSSES KSSQDSSDYS TSEMLVNMGN LPLDEFYPVAV  
 951 SMVALMRIFR DQSLSHHHTM VVQAITFIK SLGLKCVQFL PQVMPFTLNV  
 1001 IRVCDGAIRE FLFQQLGMLV SFVKSHIRPY MDEIVTLMRE FWMNTSIQS  
 1051 TIILLIEQIV VALGGEFKLY LPQLIPHMLR VFMHDNSPGR IVSIKLLAAI  
 1101 QLFGANLDDY LHLLLPIVK LFDAPEAPLP SRKAALETVD RLTESLDFTD  
 1151 YASRIHPIV RTLDQSPELR STAMDTLSSL VFQGGKYYQI FIPMVNKVLV  
 1201 RHRINHORYD VLICRIVKGY TLADEEEDPL IYQHRMLRSQ QGDALASGPV  
 1251 ETGPMKKLHV STINLQKATA WGAARRVSKD DWLEWLRRLS LELLKSSSP  
 1301 SLRSCWALAQ AYNPMARDLF NAAFVSCWSE LNEDQQDELI RSIELALTSQ  
 1351 DIAEVTQTLL NLAEFMEHSD KGPLPLRDDN GIVLLGERAA KCRAYAKALH  
 1401 YKELEFQKGP TPAILESLIS INNKLQOPEA AAGVLEYAMK HFGELEIQAT  
 1451 WYEKLHEWED ALVAYDKMD TNKDDPELML GRMRCLEALG EWGQLHQOCC  
 1501 EKWTLVNDDET QAKMARMAAA AAWGLGOWDS MEEYTCMI PR DTHDGAFYRA  
 1551 VLALHQDLFS LAQQCIDKAR DLLDAELTAM AGESYSRAYG AMVSMCHLSE  
 1601 LEEVIQYKLV PERREIRQI WWRLOGCQR IVEDWQKILM VRSLVVPHE  
 1651 DMRTWLKYAS LCGKSGRLAL AHKTLLVLLG VDPSRQLDHP LPTVHPQVTY  
 1701 AYMKNMWKSA RKIDAFQHM HFVQTMQQA QHAIATEDQQ HKQELHKLMA  
 1751 RCFLKLGWQ LNLOGINEST IPKVLQYISA ATEHDRSWYK AWHAWVMNF  
 1801 EAVLHYKHQN QARDEKKLR HASGANITNA TTAATTAATA TTTASTEGRN  
 1851 SESEAEESTEN SPTSPLOKK VTEDLSKTL MYTVPVQGF FRSISLSRGN  
 1901 NLQDTLRVLT LWFDYGHWP VNEALVEGVK AIQIDTWLQV IPQLIARIDT  
 1951 PRPLVGRLIH QLLTDIGRYH PQALIYPLTV ASKSTTTARH NAANKILKNM  
 2001 CEHSNTLVQQ AMMVSEELIR VAILWHEMWH EGLEEASRLY FGERNVKGMF

图 20

2051 EVLEPLHAMM ERGPQTLKET SFNQAYGRDL MEAQEWCRKY MKSGNVKDLT  
2101 QAWDLYYHVF RRISKQLPQL TSLELQYVSP KLLMCRDLEL AVPGTYDPNQ  
2151 PIIRIQSIAP SLQVITSKQR PRKLTLMGSN GHEFVFLKKG HEDLRQDERV  
2201 MQLFGLVNTL LANDPTSLRK NLSIQRYAVI PLSTNSGLIG WVPHCDTLHA  
2251 LIRDYREKKK ILLNIEHRIM LRMAPDYDHL TLMQKVEVFE HAVNNTAGDD  
2301 LAKLLWLKSP SSEVWFDRRT NYTRSLAVMS MVGYILGLGD RHPSNLMLDR  
2351 LSGKILHIDF GDCFVAMTR EKFPEKIPFR LTRMLTNAME VTGLDGNRYI  
2401 TCHTVMEVLR EHKDSVMAVL EAFVYDPLL WRLMDTNTKG NKRSRTRTDS  
2451 YSAGQSVEIL DGVELGEPAH KKTGTTVPES IHSFIGDGLV KPEALNKKAI  
2501 QIINRVRDKL TGRDFSHDDT LDVPTQVELL IKQATSHENL CQCYIGWCPF  
2551 W

图 20- 续