



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116762012 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 15

(21) 申请号 202280012016.7

(22) 申请日 2022.01.25

(30) 优先权数据

63/143,255 2021.01.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.07.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/013770 2022.01.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/164830 EN 2022.08.04

(71) 申请人 欧陆迪斯卡沃爱克斯公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 K·C·卡特塞内尔森

D·K·特雷伯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 涂滔

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

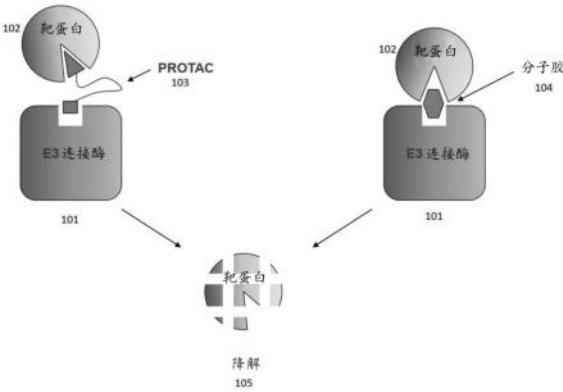
权利要求书3页 说明书12页 附图2页

(54) 发明名称

分子胶筛选测定及其实施方法

(57) 摘要

本公开提供了化合物筛选方法,包括筛选结合感兴趣的靶蛋白和先前未知的另一种配体蛋白以形成复合物的测试化合物,包括(i)在存在和不存在测试化合物的情况下,将固定化配体蛋白与包含核酸标签的感兴趣的靶蛋白一起孵育,其中感兴趣的蛋白和核酸标签彼此不同;(ii)去除未结合的感兴趣的靶蛋白;(iii)检测固定化配体蛋白、测试化合物和感兴趣的靶蛋白之间的复合物的存在或不存在,其中与不存在测试化合物的情况相比,存在测试化合物的情况下与固定化配体蛋白结合的感兴趣的靶蛋白的量增加表明测试化合物结合并使得固定化配体蛋白和感兴趣的靶蛋白之间能够形成蛋白-蛋白复合物。



1. 筛选测试化合物的方法, 所述方法包括:

(i) 在存在和不存在测试化合物的情况下, 将固定化配体蛋白与包含标签的感兴趣的靶蛋白一起孵育;

(ii) 去除任何未结合的感兴趣的靶蛋白; 和

(iii) 检测所述固定化配体蛋白、测试化合物和所述感兴趣的靶蛋白之间的复合物的存在或不存在,

其中与不存在所述测试化合物的情况相比, 存在所述测试化合物的情况下结合至所述固定化配体蛋白的感兴趣的靶蛋白的量的增加, 表明所述测试化合物结合并使得所述固定化配体蛋白和所述感兴趣的靶蛋白之间能够形成蛋白-蛋白复合物。

2. 权利要求1的方法, 其中先前未知所述感兴趣的靶蛋白和配体蛋白是结合伴侣。

3. 权利要求1的方法, 其中所述标签是核酸标签。

4. 权利要求3的方法, 其中所述核酸标签是DNA序列标签。

5. 权利要求1的方法, 其中所述配体蛋白是连接酶。

6. 权利要求5的方法, 其中所述连接酶蛋白是E3泛素连接酶。

7. 权利要求1的方法, 其中所述感兴趣的蛋白和所述标签不相同。

8. 权利要求1的方法, 其中所述测试化合物是分子胶化合物降解剂。

9. 权利要求8的方法, 其中所述分子胶化合物降解剂在感兴趣的靶蛋白和配体蛋白之间形成复合物。

10. 权利要求8的方法, 其中所述分子胶化合物降解剂标记所述感兴趣的靶蛋白用于降解。

11. 权利要求1的方法, 其中所述配体蛋白固定在固相支持珠上。

12. 权利要求1的方法, 其中所述感兴趣的靶蛋白在哺乳动物细胞中单独过表达并同时暴露于所述测试化合物和所述固定化配体蛋白两者。

13. 权利要求1的方法, 其中所述感兴趣的靶蛋白单独展示在噬菌体外壳上并同时暴露于所述测试化合物和所述固定化配体蛋白两者。

14. 权利要求1的方法, 其中所述方法鉴定先前未知的用于感兴趣的蛋白的分子胶化合物降解剂。

15. 权利要求1的方法, 其中所述蛋白-蛋白复合物被靶向用于降解。

16. 权利要求1的方法, 其中所述蛋白-蛋白复合物通过定量PCR检测。

17. 权利要求1的方法, 其中所述测试化合物是小分子。

18. 权利要求1的方法, 其中所述测试化合物是蛋白。

19. 筛选结合感兴趣的靶蛋白和配体蛋白的测试化合物的方法, 其中先前未知所述感兴趣的靶蛋白结合所述配体蛋白, 所述方法包括,

(i) 在存在和不存在测试化合物的情况下, 将固定化配体蛋白与包含可检测标签的感兴趣的靶蛋白一起孵育, 其中所述感兴趣的蛋白和所述可检测标签彼此不同;

(ii) 去除任何未结合的感兴趣的靶蛋白; 和

(iii) 检测所述固定化蛋白、测试化合物和所述感兴趣的靶蛋白之间的复合物的存在或不存在, 其中与不存在所述测试化合物的情况相比, 存在测试化合物的情况下与所述固定化蛋白结合的感兴趣的靶蛋白的量增加, 表明所述测试化合物使得所述固定化蛋白和所

述感兴趣的靶蛋白之间能够形成蛋白-蛋白复合物。

20. 权利要求19的方法,其中所述可检测标签是核酸标签。

21. 权利要求19的方法,其中所述核酸标签是DNA序列标签。

22. 权利要求19的方法,其中所述配体蛋白是连接酶。

23. 权利要求22的方法,其中所述连接酶是E3泛素连接酶。

24. 权利要求19的方法,其中所述测试化合物是分子胶化合物降解剂。

25. 权利要求19的方法,其中所述方法筛选否则未知的用于感兴趣的蛋白的分子胶化合物降解剂。

26. 权利要求19的方法,其中所述配体蛋白固定在固相支持珠上。

27. 权利要求19的方法,其中所述感兴趣的靶蛋白在哺乳动物细胞中单独过表达并同时暴露于所述测试化合物和所述固定化配体蛋白两者。

28. 权利要求19的方法,其中所述感兴趣的靶蛋白单独展示在噬菌体外壳上并同时暴露于所述测试化合物和所述固定化配体蛋白两者。

29. 权利要求19的方法,其中所述感兴趣的靶蛋白用核酸序列标记。

30. 权利要求19的方法,其中所述蛋白-蛋白复合物被靶向用于降解。

31. 权利要求19的方法,其中所述蛋白-蛋白复合物形成通过定量PCR检测。

32. 权利要求19的方法,其中所述测试化合物是小分子。

33. 权利要求19的方法,其中所述测试化合物是蛋白。

34. 将测试化合物鉴定为分子胶的方法,其中所述测试化合物稳定两种通常不相互作用的蛋白之间的相互作用,所述方法包括以下步骤:

(a) 使包含融合蛋白的细胞或细胞裂解物与测试化合物接触,其中所述融合蛋白包含感兴趣的靶蛋白和核酸寡聚物标签;

(b) 在存在固定化配体蛋白的情况下将所述融合蛋白与所述测试化合物一起孵育,其中所述配体蛋白固定在固相支持体上;

(c) 去除任何未结合的融合蛋白;和

(d) 通过检测与融合蛋白结合的所述核酸寡聚物标签来检测与所述固定化配体蛋白结合的所述融合蛋白的量;

其中相对于在不存在所述测试化合物的情况下检测到的融合蛋白的量,在存在所述测试化合物的情况下检测到的步骤(d)的融合蛋白的量的增加或减少表明所述测试化合物促进所述感兴趣的靶蛋白和所述配体蛋白之间的相互作用。

35. 权利要求34的方法,其中相对于在不存在所述测试化合物的情况下检测到的融合蛋白的量,在存在所述测试化合物的情况下检测到的步骤(d)的融合蛋白的量的增加表明所述测试化合物促进蛋白-蛋白相互作用。

36. 权利要求34的方法,其中相对于在不存在所述测试化合物的情况下检测到的融合蛋白的量,在存在所述测试化合物的情况下检测到的步骤(d)的与所述配体蛋白结合的融合蛋白的量的减少表明所述测试化合物不促进蛋白-蛋白相互作用。

37. 权利要求34的方法,其中所述配体蛋白是连接酶。

38. 权利要求37的方法,其中所述连接酶是E3泛素连接酶。

39. 权利要求34的方法,其中所述感兴趣的靶蛋白在哺乳动物细胞中单独过表达并同

时暴露于所述测试化合物和所述固定化配体蛋白两者。

40. 权利要求34的方法,其中所述感兴趣的靶蛋白单独展示在噬菌体外壳上并同时暴露于所述测试化合物和所述固定化配体蛋白两者。

41. 权利要求34的方法,其中所述蛋白配体固定在固相支持珠上。

42. 权利要求34的方法,其中所述核酸寡聚物是DNA序列。

43. 权利要求34的方法,其中所述测试化合物是小分子。

44. 权利要求34的方法,其中所述测试化合物是蛋白。

45. 试剂盒,其包含:

包含融合蛋白的细胞,其中所述融合蛋白包含感兴趣的靶蛋白和可检测标签;

固定在固相支持体上与靶蛋白形成复合物的配体蛋白,所述靶蛋白与所述测试化合物形成复合物;和

通过评估测试化合物的结合特性来将测试化合物筛选为分子胶化合物的说明书。

46. 权利要求45的试剂盒,其进一步包含编码所述包含感兴趣的靶蛋白的融合蛋白的表达载体。

47. 权利要求45的试剂盒,其中先前未知所述感兴趣的靶蛋白和配体蛋白结合。

48. 权利要求45的试剂盒,其中所述可检测标签是核酸标签。

49. 权利要求45的试剂盒,其中所述配体蛋白是连接酶。

50. 权利要求45的试剂盒,其中所述配体蛋白固定在固相支持珠上。

51. 权利要求45的试剂盒,其中通过定量PCR检测复合物形成。

52. 权利要求45的试剂盒,其中所述测试化合物是小分子。

53. 权利要求45的试剂盒,其中所述测试化合物是蛋白。

分子胶筛选测定及其实施方法

[0001] 优先权声明和相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年1月29日提交的美国临时申请号63/143,255和2022年1月25日提交的美国申请号17/584,315的权益和优先权,其公开内容通过引用整体(包括其中引用的所有参考文献和附录)并入本文用于所有目的。

发明领域

[0003] 本文提供的主题涉及筛选具有形成蛋白-蛋白复合物的性质的化合物。更具体地,本文提供的主题涉及筛选测定法,以鉴定能够形成蛋白-蛋白复合物的化合物,该蛋白-蛋白复合物在一些情况下可以被靶向降解。

背景技术

[0004] 蛋白降解是体内的自然过程,其中蛋白一旦用泛素(如E3泛素连接酶)标记就会经由细胞降解机制(如蛋白酶体)被输送进行降解。蛋白降解过程有助于从细胞系统中去除不需要的蛋白(由于生物学原因),并将这些蛋白输送到蛋白酶体(也称为细胞的垃圾压实机)。

[0005] 靶向蛋白降解(TPD)使用小分子通过将E3泛素连接酶募集到感兴趣的蛋白(例如在患病状态下鉴定的蛋白)以诱导其泛素依赖性降解来劫持细胞降解机制。TPD在药物开发中很受关注,因为它可以解决先前认为无法用药物治疗的靶标(人类蛋白组的80%),这些靶标无法用传统的小分子抑制剂抑制,如支架蛋白和转录因子。自第一个降解分子问世以来已有20年了。

[0006] 然而,降解剂的发现和优化仍然是一个缓慢的经验过程。为了定量监测E3连接酶、待标记降解的靶蛋白和降解剂分子之间的蛋白-蛋白复合物形成,已经开发了若干测定形式。然而,所有可用的测定都有一定的局限性。例如,一些测定需要带有人工荧光标签的重组蛋白来生成信号并且需要高蛋白浓度,这不能反映细胞中真实的内源蛋白水平或不能测量真实的热力学结合亲和力。此外,许多测定不是高通量的。

[0007] 具体专利

[0008] 本受让人拥有的题为“Uncoupling of DNA insert propagation and expression of protein for phage display”的美国专利号7,897,381提供了包含修饰的T7噬菌体基因组的载体。

[0009] 本受让人拥有的题为“Uncoupling of DNA insert propagation and expression of protein for phage display”的美国专利号7,112,435提供了包含修饰的T7噬菌体基因组的表达系统。

[0010] 本受让人拥有的题为“Uncoupling of DNA insert propagation and expression of Protein for phage display”的美国专利号7,833,741提供了包含修饰的T7噬菌体基因组的异源多肽的制备。

[0011] 发明概述

[0012] 以下是本发明的概述以提供对本发明的一些方面的基本理解。该概述并非旨在识别本发明的关键/决定性要素或描绘本发明的范围。其唯一目的是以简化形式呈现本发明的一些概念,作为稍后呈现的更详细描述的前序。

[0013] 在各种实施方案中,本文提供了筛选结合感兴趣的靶蛋白和另一种配体蛋白的测试化合物的方法,该方法包括,(i)在存在和不存在测试化合物的情况下,将固定化的配体蛋白与包含核酸标签或可检测标签的感兴趣的靶蛋白一起孵育,其中感兴趣的蛋白和核酸标签不同,(ii)去除任何未结合的感兴趣的蛋白,并且(iii)检测固定化配体蛋白、测试化合物和感兴趣的靶蛋白之间复合物的存在或不存在,其中与不存在测试化合物的情况下相比,存在测试化合物的情况下与固定化配体蛋白结合的感兴趣的靶蛋白的量的增加表明测试化合物结合并促进固定化配体蛋白和感兴趣的靶蛋白之间的蛋白-蛋白复合物形成。在各种其他实施方案中,感兴趣的靶蛋白不直接结合固定化配体蛋白,而是与测试化合物形成蛋白-蛋白复合物,并且测试化合物结合固定化配体蛋白。

[0014] 在许多实施方案中,本文提供了筛选结合感兴趣的靶蛋白和配体蛋白的测试化合物的方法,其中先前未知感兴趣的靶蛋白结合配体蛋白,该方法包括,(i)在存在和不存在测试化合物的情况下,将固定化蛋白与包含可检测标签的感兴趣的靶蛋白一起孵育,其中感兴趣的蛋白和可检测标签彼此不同,(ii)去除任何未结合的感兴趣的蛋白和(iii)检测固定化蛋白、测试化合物和感兴趣的靶蛋白之间的复合物形成的存在或不存在,其中与不存在测试化合物的情况相比,存在测试化合物的情况下与固定化蛋白结合的感兴趣的靶蛋白的量增加,表明测试化合物促进固定化蛋白和感兴趣的靶蛋白之间的蛋白-蛋白复合物形成。

[0015] 在各种实施方案中,本文提供了将测试化合物鉴定为分子胶的方法,其中测试化合物稳定通常不相互作用的两种蛋白之间的相互作用,或者稳定先前未知形成复合物的两种蛋白之间的相互作用,所述方法包括以下步骤:(a)使包含融合蛋白的细胞或细胞裂解物与测试化合物接触,其中所述融合蛋白包含感兴趣的靶蛋白和核酸寡聚物标签;(b)在存在固定化配体蛋白的情况下将融合蛋白与测试化合物一起孵育,其中所述配体蛋白固定在固相支持体上;(c)去除任何未结合的融合蛋白;和(d)通过检测与融合蛋白结合的核酸寡聚物标签来检测与固定化配体蛋白结合的融合蛋白的量;其中相对于不存在所述测试化合物的情况下检测到的融合蛋白的量,存在所述测试化合物的情况下检测到的步骤(d)的融合蛋白的量的增加或减少表明测试化合物调节通常不相互作用的两种蛋白之间的相互作用。

[0016] 在各种实施方案中,相对于不存在所述测试化合物的情况下检测到的融合蛋白的量,存在所述测试化合物的情况下检测到的步骤(d)的融合蛋白的量的增加表明测试化合物促进蛋白-蛋白相互作用和复合物形成。在各种其他实施方案中,相对于不存在所述测试化合物的情况下检测到的融合蛋白的量,存在所述测试化合物的情况下检测到的步骤(d)的与配体蛋白结合的融合蛋白的量的减少表明测试化合物不促进蛋白-蛋白相互作用。

[0017] 在许多实施方案中,固定化蛋白可以是配体蛋白,如连接酶。在许多其他实施方案中,固定化配体蛋白可以是E3泛素连接酶。

[0018] 在各种实施方案中,测试化合物可以是分子胶化合物降解剂。在各种其他实施方案中,测试化合物是蛋白水解靶向嵌合体化合物降解剂。

[0019] 在许多实施方案中,感兴趣的靶蛋白在哺乳动物细胞中单独过表达并暴露于测试

化合物和固定化配体蛋白两者。感兴趣的靶蛋白单独展示在噬菌体外壳上并暴露于测试化合物和固定化配体蛋白两者。

[0020] 在各种实施方案中,本文提供了将测试化合物鉴定为分子胶的方法,其中分子胶使得先前未知结合的感兴趣的靶蛋白和配体蛋白之间能够形成蛋白-蛋白复合物,该方法包括(i)在存在和不存在测试化合物的情况下,将与核酸序列或核酸标签融合的感兴趣的靶蛋白与固定化蛋白配体一起孵育,(ii)去除任何未结合的靶蛋白,和(iii)通过定量聚合酶链式反应(PCR)或qPCR检测或定量感兴趣的靶蛋白与固定化配体蛋白的结合,其中与不存在测试化合物的情况相比,存在测试化合物的情况下与固定化配体蛋白结合的感兴趣的靶蛋白的量的增加表明,所述测试化合物使得感兴趣的靶蛋白和配体蛋白之间能够形成蛋白-蛋白复合物。在许多实施方案中,感兴趣的靶蛋白不直接与固定化配体蛋白结合,而是与测试化合物形成蛋白-蛋白复合物,并且测试化合物与固定化配体蛋白结合。

[0021] 在各种实施方案中,本文提供了将测试化合物鉴定为分子胶化合物降解剂的方法,其中分子胶化合物降解剂促进先前未知结合的感兴趣的靶蛋白与连接酶之间的蛋白-蛋白复合物,该方法包括(i)在存在和不存在测试化合物的情况下将与核酸寡聚物融合的感兴趣的靶蛋白与固定化连接酶一起孵育,(ii)去除任何未结合的感兴趣的靶蛋白,和(iii)通过定量聚合酶链式反应(PCR)或qPCR检测或定量感兴趣的靶蛋白与固定化连接酶的结合,其中与不存在测试化合物的情况相比,存在测试化合物的情况下结合至固定化连接酶的感兴趣的靶蛋白的量增加表明所述测试化合物使得感兴趣的靶蛋白和连接酶之间能够形成蛋白-蛋白复合物并诱导连接酶依赖性降解。在许多实施方案中,感兴趣的靶蛋白不直接结合固定化连接酶,而是与测试化合物形成蛋白-蛋白复合物,并且测试化合物结合固定化连接酶。

[0022] 在各种实施方案中,可检测标签可以是核酸寡聚物,其中寡聚物与可检测蛋白结合,并且寡聚物可以是放射性标记的、荧光标记的或生物素化的。在一些实施方案中,本文提供的方法包括qPCR扩增与感兴趣的靶蛋白结合的核酸寡聚物。

[0023] 在许多实施方案中,在筛选测定中采用感兴趣的靶蛋白上的核酸标签来从化合物文库中鉴定作为潜在的分子胶的测试化合物,其中测试化合物促进固定化配体蛋白和感兴趣的靶蛋白之间的蛋白-蛋白复合物形成。因此,所公开的方法可用于经由高通量测定来筛选化合物或候选化合物,其中可针对固定化配体蛋白和感兴趣的靶蛋白筛选大的化合物文库,并筛选使得先前未知结合的固定化配体蛋白和感兴趣的靶蛋白之间能够形成蛋白-蛋白复合物的化合物。

[0024] 在许多实施方案中,固定化配体蛋白可以是连接酶,如E3连接酶。E3连接酶或E3泛素连接酶标记靶蛋白或感兴趣的蛋白以进行降解。所公开的筛选测定法鉴定可用作分子胶化合物降解剂,并且使得E3连接酶或E3泛素连接酶与感兴趣的靶蛋白之间能够形成蛋白-蛋白复合物的测试化合物,所述感兴趣的靶蛋白将由E3连接酶泛素化并输送用于降解。

[0025] 在一些实施方案中,本发明公开了筛选测试化合物对蛋白-蛋白复合物的结合亲和力的方法。该方法包括将测试化合物与一种或多种感兴趣的蛋白和配体蛋白一起孵育,其中配体蛋白固定在固体表面上,并评估固定化配体蛋白、感兴趣的蛋白和测试化合物之间的结合特性。

[0026] 在某些实施方案中,本公开提供针对多种感兴趣的蛋白筛选化合物文库的方法。

通过该方法,筛选测定有助于用测试化合物筛选一组感兴趣的蛋白,其中一旦测试化合物在感兴趣的蛋白和固定化配体蛋白之间形成蛋白-蛋白复合物,可以进一步单独评估感兴趣的蛋白和测试化合物。

[0027] 在许多实施方案中,感兴趣的靶蛋白在哺乳动物细胞中单独过表达或单独展示在噬菌体外壳上并暴露于测试化合物和固定化配体蛋白两者。

[0028] 在本文提供的方法的各种实施方案中,固定化配体蛋白固定在固相支持体上。在各种其他实施方案中,配体蛋白固定多孔板上,或者固定化配体蛋白附着至固相支持珠。固定化配体蛋白可以任选地用标签标记,例如但不限于DNA标签、荧光标签或光谱标签。

[0029] 该测定可用于鉴定先前未知的感兴趣的蛋白的分子胶化合物降解剂。然后,感兴趣的蛋白可以选择性地被蛋白酶体靶向降解。因此,筛选测定有助于鉴定能够靶向感兴趣的疾病蛋白进行降解的候选药物。

[0030] 在进一步的实施方案中,选择的E3连接酶固定在固相支持珠上,其中选择的E3连接酶将在其N端带有Avi标签的情况下克隆,随后纯化并用脱硫生物素标记,然后将标记的连接酶固定在磁性链霉亲和素珠上。

[0031] 在许多实施方案中,配体如蛋白固定在固相支持珠上,其中蛋白将在其N端带有Avi标签的情况下克隆,随后纯化并用脱硫生物素标记,并将标记的蛋白固定在磁性链霉亲和素珠上。

[0032] 在许多其他实施方案中,感兴趣的靶蛋白用DNA序列标记,其中靶蛋白在哺乳动物或T7噬菌体gateway载体(如NFkB Gateway载体)内克隆并使用T7噬菌体展示在哺乳动物细胞中表达。

[0033] 在许多实施方案中,感兴趣的靶蛋白用DNA序列标记以形成融合靶蛋白,其中融合靶蛋白在哺乳动物细胞中表达或在T7噬菌体展示系统内表达。

[0034] 在许多实施方案中,本公开涉及分子胶筛选方法,该方法包括将选择的配体蛋白固定在固相支持珠上,将核酸标签标记至感兴趣的靶蛋白以形成融合蛋白,在存在和不存在测试化合物的情况下将融合靶蛋白与固定化配体蛋白一起孵育,洗涤未结合的融合蛋白和测试化合物,并在存在或不存在测试化合物的情况下通过超灵敏qPCR读数检测DNA标签,以测量固相支持珠上配体蛋白捕获的靶蛋白的量。在许多实施方案中,超灵敏qPCR读数为融合蛋白上的DNA标签。

[0035] 在进一步的实施方案中,所公开的测定可以筛选化合物作为蛋白水解靶向嵌合体的化合物和分子胶化合物两者的特性。

[0036] 本发明还提供了定量固定化配体蛋白如E3连接酶和测试分子之间的相互作用的方法。还包括使用本文描述的技术评估测试分子的药物开发的商业方法。其他方面包括测试分子、药物配制剂以及治疗和/或预防用途。

[0037] 还提供了用于进行本文描述的测定的试剂盒。试剂盒通常包含固定化配体蛋白和融合蛋白以及用于进行本文所述方法的说明书,所述融合蛋白包含感兴趣的靶蛋白和可检测标签。

[0038] 参考以下附图和描述,本测定和方法的这些和其他特征、方面和优点将变得更好理解。本概述是对概念的介绍。通过以下参考附图对优选实施方案的详细描述,本发明的附加方面和优点将显而易见。

附图说明

[0039] 附图(其中在各个单独的视图中,相似的附图标记指代相同或功能相似的元素)与以下详细描述一起并入说明书中并形成说明书的一部分,并且用于说明包括所要求保护的公开内容的概念的进一步实施方案,并解释这些实施方案的各种优点。

[0040] 本文公开的方法和系统已在适当的情况下由附图中的常规符号表示,仅示出了与理解本公开的实施方案相关的那些具体细节,以免用对于受益于本文描述的本领域普通技术人员来说显而易见的细节来模糊本公开。

[0041] 图1示出了蛋白水解靶向嵌合技术与所公开的分子胶测定之间的比较。

[0042] 图2示出了所公开的筛选测定原理。

[0043] 发明详述

[0044] 虽然目前公开的测定和方法可以采用许多不同形式的实施方案,但是在附图中示出了并且在本文中详细描述若干具体实施方案,应当理解,本公开应被视为当前公开的测定和方法的原理的例证,并且不旨在将本公开的测定和方法限制于所示的实施方案。

[0045] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0046] “分子胶”是指稳定两个通常不相互作用的蛋白之间的相互作用的小分子或小化合物或分子。

[0047] “化合物”或“测试化合物”或“测试分子”是指一种或多种化学实体,例如但不限于蛋白、有机或无机化学分子、合成核酸、天然核酸、合成多肽、天然多肽、肽片段、多种蛋白、碳水化合物或作为天然产物的或合成制备的其他化合物、药物和候选药物。非限制性实例包括聚酮化合物、类固醇、美国药典(U.S. Pharmacopoeia)中存在的化合物以及组合化学合成的产物。候选药物包括功能未知但与具有一种或多种已知功能的已知化合物具有结构相似性的分子。本文使用的术语“化合物”或“测试化合物”还包括实验小分子、FDA批准的小分子治疗剂、为抗体导向疗法开发的抗体和其他治疗剂。

[0048] 如本文所用,术语“靶蛋白”是指可以被靶向降解的任何感兴趣的蛋白。在一些实施方案中,靶蛋白参与细胞过程并具有酶活性或催化活性。

[0049] 众所周知,蛋白水解靶向嵌合体(如**PROTAC[®]**),也称为蛋白降解剂,是由两个配体结构域(如结合感兴趣的蛋白的结构域和结合E3泛素连接酶的结构域)组成的小分子,其中两个配体结构域经由接头连接,形成能够使E3连接酶和感兴趣的蛋白非常接近的小分子,从而能够标记感兴趣的蛋白以进行降解,并通过细胞蛋白酶体降解系统将其去除。然而,由于**PROTAC[®]**分子的大小、接头不必要的灵活性以及**PROTAC[®]**无法降解某些感兴趣的蛋白,该方法存在一定的缺陷和挑战。

[0050] 所公开的测定和方法通过提供筛选测定如分子胶筛选测定来克服挑战,其中筛选测试化合物以充当感兴趣的蛋白和E3连接酶之间的胶或分子胶。此外,此类分子胶筛选测定可用于使用相同原理筛选蛋白水解靶向嵌合体分子。

[0051] 所公开的测定可以筛选针对蛋白水解靶向嵌合体和分子胶化合物的化合物。在许多实施方案中,使用包含天然化合物或非合成化合物的化合物文库,测定可以帮助筛选分子胶化合物,而使用合成化合物文库将帮助潜在地筛选蛋白水解靶向嵌合体分子。

[0052] 如图1所示,目前可用的技术使用**PROTAC**[®] (103)作为具有两个配体结合位点的分子,其中**PROTAC**[®] (103)一端结合靶蛋白 (102),另一端结合E3连接酶 (101)。E3连接酶 (101)靶向感兴趣的蛋白 (102)进行降解 (105),将蛋白输送至蛋白酶体。然而,该技术存在各种缺点。**PROTAC**[®]分子相对较大的尺寸会严重影响其结合特性。此外,由于感兴趣的蛋白和E3连接酶之间缺乏复合物形成,该技术无法结合所有蛋白,而且即使是小分子**PROTAC**[®]的化学合成也非常困难。

[0053] 所公开的筛选测定有助于筛选化合物,该化合物可以充当靶蛋白和E3连接酶蛋白之间的分子胶或蛋白水解靶向嵌合体,使得E3连接酶可以标记感兴趣的靶蛋白以进行蛋白降解。靶蛋白可能被降解,也可能不被降解;然而,测试化合物可用于在感兴趣的蛋白和所选蛋白配体(如E3连接酶)之间形成复合物,以帮助标记感兴趣的蛋白以进行降解。

[0054] 如图1进一步所示,分子胶 (104)化合物可以充当结合剂,在靶蛋白 (102)和E3连接酶 (101)之间形成复合物。E3连接酶 (101)和靶蛋白形成复合物,其中靶蛋白和E3连接酶均结合至测试化合物或分子胶 (104)。E3连接酶与感兴趣的靶蛋白的结合标记了要降解的蛋白 (105),从而输送要降解的蛋白。

[0055] 在所公开的测定和方法的许多优点中,接头的不存在和充当分子胶的小尺寸化合物为TPD中的降解剂提供了更好的治疗靶标。

[0056] 分子胶通过改变靶分子的表面,在分子水平上将结构结合在一起,使其能够附着到另一种蛋白上。因此,本公开提供了用于针对作为分子胶的功能筛选测试化合物并促进先前未知彼此结合的两种蛋白之间的蛋白-蛋白复合物形成的测定。

[0057] 融合蛋白可以包含感兴趣的蛋白和核酸标签,如DNA标签或核酸寡聚物。在一些实施方案中,本文提供的方法包括qPCR扩增与感兴趣的蛋白结合的核酸寡聚物。在一些实施方案中,核酸寡聚物是放射性标记的、荧光标记的或生物素化的。

[0058] 在许多实施方案中,在筛选测定中采用核酸标签以从大量能够在固定化配体蛋白和感兴趣的靶蛋白之间形成复合物的测试化合物中进行鉴定。因此,所公开的方法可用于经由高通量测定来筛选候选化合物,其中可针对感兴趣的蛋白和选择的固定化配体蛋白来筛选大的化合物文库。

[0059] 图2显示了所公开的筛选测定的原理,其中E3连接酶固定在珠表面 (202) 如磁性链霉亲和素珠表面上 (步骤1、201),并且靶蛋白用DNA序列 (203) 标记以用于经由qPCR或其他此类技术对其进行定量。将固定化E3连接酶和DNA标记的靶蛋白进一步与测试化合物一起孵育,其中如果测试化合物与固定化E3连接酶和靶蛋白结合形成复合物 (步骤2、204),使得测试化合物作为感兴趣的靶标和固定化E3连接酶之间的分子胶,则会生成较高的信号 (步骤3、206)。此外,如果测试化合物没有在靶蛋白和固定化E3连接酶 (205) 之间引发或形成复合物,则在qPCR阶段将检测到较低的信号,表明测试化合物没有充当靶蛋白与所选的固定化E3连接酶 (205) 之间的分子胶。E3连接酶不限于能够结合作为分子胶的测试化合物的特定结构域。

[0060] DNA序列标签将使用可定量PCR或qPCR进行定量,并且超灵敏读数将显示在屏幕 (206) 上。

[0061] 可以使用多种载体来实施本文公开的方法。此类载体包括但不限于衍生自细菌质

粒、噬菌体、酵母附加体、酵母染色体元件、哺乳动物病毒、哺乳动物染色体的载体,以及衍生自其组合的载体,如衍生自质粒和噬菌体遗传元件的载体,如粘粒和噬菌粒。一般而言,可以使用适合于在细胞中维持、增殖或表达多核苷酸的任何载体。能够自我繁殖和蛋白展示的噬菌体载体的实例包括例如Novagen的10-3T7和1-1T7株。

[0062] 用于核酸增殖或转移的合适载体(包括基于噬菌体的载体)的选择是本领域众所周知的。载体构建、将载体引入宿主以及在宿主中增殖或表达的必要技术对于本领域技术人员来说是常规的。

[0063] 作为衍生自噬菌体基因组的载体的替代物,以非限制性实例的方式提供了也可商购的以下载体。用于细菌的载体pQE70、pQE60和pQE-9,可从Qiagen获得;Phagescript载体、Bluescript载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A,可从Stratagene获得;和ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5,可从Pharmacia获得。列出这些载体仅是为了说明本领域技术人员可获得的用于根据本发明使用的许多可商购的且众所周知的载体。应当理解,适合于例如在宿主中引入、维持、扩增和/或表达本发明的多核苷酸或多肽的任何其他质粒或载体可以用于本发明的这个方面。

[0064] 在公开的筛选测定中,所选的伴侣靶蛋白用DNA序列标记,其中靶蛋白在哺乳动物或T7噬菌体gateway载体(如NFkB Gateway载体)内克隆并在哺乳动物细胞中表达或使用T7噬菌体展示。

[0065] 多种不同的噬菌体衍生的构建体可用于实施所公开的方法。在所公开方法的优选实施方案中,构建体是噬菌体基因组,其已被修饰为能够条件性表达异源多肽作为与感兴趣的蛋白的融合蛋白,如本文所讨论的。修饰的噬菌体基因组优选保留其中发现的调节和编码序列。用于实施本发明的优选噬菌体基因组是裂解噬菌体的基因组,不限于T7、T4、T3和 λ 噬菌体以及丝状噬菌体。

[0066] 在其他实施方案中,表达包含感兴趣的靶蛋白与核酸寡聚体的融合蛋白的能力部分地通过使用受调节的启动子或另一个调节区(例如诱导型启动子,使得在不存在诱导的情况下,由它们控制的表达量低或检测不到)来调节。诱导型启动子的非限制性实例包括lac启动子、lac UV5启动子、阿拉伯糖启动子和tet启动子。

[0067] “修饰的T7噬菌体基因组”是指T7基因组,其相对于野生型基因组(GenBank登录号:V01146.1)的核苷酸序列包含改变或缺失。修饰的T7噬菌体基因组包含编码一个或多个或全部T7非必需基因的核苷酸序列的完全或部分缺失。完全或部分缺失优选导致给定基因失活。非必需基因是可以从噬菌体基因组中完全或部分缺失而不影响其活力的基因。非必需基因是那些对T7噬菌体生命周期不必需的基因。

[0068] 如所公开的方法中进一步提供的,配体蛋白优选固定在固相支持体上。配体蛋白在固相支持体上的固定可以通过本领域众所周知的将分子共价或非共价偶联至固相支持体的多种手段或标准手段。非限制性实例包括使用接头分子、交联剂如戊二醛以及生物素/抗生物素蛋白相互作用。后者的实例是使用与分子共价偶联的生物素和与固相支持体结合的抗生物素蛋白。固相支持体本身可以采取任何方便的形式,通常是培养皿或板或瓶、多孔培养皿或板的孔、珠、含有固定有分子的颗粒的柱、或含有固定化分子的平面表面。固相支持体的其他非限制性实例包括琼脂糖、聚苯乙烯或其他聚乙烯基化合物、以及磁珠。

[0069] 如所公开的方法中所提供的,生物素-链霉亲和素相互作用用于将配体蛋白固定

在磁珠上。配体蛋白与生物素共价连接(直接或经由接头),生物素与链霉亲和素包被的磁珠结合。与多肽组或家族的成员和测试分子接触后,分离珠并洗脱配体蛋白。可以使用多种洗脱条件。非限制性实例包括用缺乏生物素的配体蛋白的可溶形式进行洗脱;用去污剂溶液洗脱,如含有SDS的去污剂溶液,其使多肽变性以破坏与配体蛋白的结合;并用含有蛋白酶的溶液洗脱以将配体蛋白从噬菌体上切割下来。第一个洗脱示例优选基于与测试分子和感兴趣的蛋白的结合来洗脱结合的配体蛋白。在本发明的替代实施方案中,使用链霉亲和素的其他形式,例如对生物素具有较低亲和力的单体抗生物素蛋白,使得可以使用游离生物素的洗脱。洗脱的蛋白可以通过任何适当的方式进行定量,包括但不限于标准噬菌体滴定方法,如噬斑形成测定或通过定量PCR(qPCR)。

[0070] 虽然上述讨论详述了特别温和的洗脱条件,其在一些条件下可能是有利的,但这不是本发明的必要特征。配体蛋白与固相支持体的共价键合也是实用的,并且洗脱可以通过适合该系统的方法来影响。

[0071] 该方法的方面包括使用包含修饰的T7噬菌体基因组的载体,其在2011年3月1日发布的上述参考美国专利号7,897,381中详细描述,其方法部分通过引用具体并入,如同其全部内容在本文中阐述。

[0072] 该方法的方面包括使用包含修饰的T7噬菌体基因组的表达系统,其在2006年9月26日发布的上述参考美国专利号7,112,435中详细描述,其方法部分通过引用具体并入,如同其全部内容在本文中阐述。

[0073] 该方法的方面包括使用包含修饰的T7噬菌体基因组的异源多肽的制备,其在2006年9月26日发布的上述参考美国专利号7,833,741中详细描述,其方法部分通过引用具体并入,如同其全部内容在本文中阐述。

[0074] 本文描述的任何方法可以以单重或多重形式运行。在一个示例性多重形式中,筛选测试化合物并同时测试其针对来自一组此类蛋白的多种感兴趣的蛋白的结合特性。当同时或顺序测定多种蛋白时,可以使用感兴趣的蛋白特有的核酸寡聚物或检测标签来区分每种感兴趣的蛋白的活性。

[0075] 在许多实施方案中,所公开的筛选测定提供了蛋白-蛋白复合物形成测定,其中两种蛋白在存在分子胶化合物的情况下形成复合物。此外,该测定可以帮助鉴定感兴趣的蛋白的伴侣蛋白。筛选测定还有助于形成蛋白-蛋白复合物,其中蛋白与E3连接酶形成复合物,因此连接酶可以标记感兴趣的蛋白以进行降解,尽管蛋白可能会或可能不会被降解。

[0076] 配体蛋白可以共价偶联到固相支持体珠上,或者可以通过允许释放含有结合的感兴趣的靶蛋白和配体蛋白的整个复合物的系统非共价结合。

[0077] 如本文所提供的,感兴趣的靶蛋白可以是激酶、转移酶、氧化还原酶、水解酶、连接酶、异构酶或裂合酶的底物。此外,感兴趣的靶蛋白可以是多肽或蛋白。感兴趣的靶蛋白可以通过切割、添加或去除官能团或通过进行异构化来修饰。在某些实施方案中,感兴趣的靶蛋白可以是具有转移酶活性的转移酶的底物,如酰基转移酶、糖基转移酶、酰胺基转移酶或巯基转移酶。另外,感兴趣的靶蛋白可以是G偶联蛋白受体、离子通道蛋白、核受体蛋白、转录因子、激酶、细胞因子、生长因子、激素、酶、激酶、蛋白激酶底物、脂质激酶底物、酪氨酸激酶底物、受体、丝氨酸/苏氨酸激酶底物、人非受体酪氨酸激酶底物、人受体酪氨酸激酶底物、抗体或小链可变片段(scFv)、水解酶、肽酶、蛋白酶或磷酸酶或通过自磷酸化修饰的酶

或激酶的底物。

[0078] 在某些实施方案中,将编码感兴趣的靶蛋白的核酸克隆到质粒表达载体中并瞬时转染到细胞系中,导致感兴趣的靶蛋白的瞬时表达。在某些实施方案中,将编码感兴趣的靶蛋白的核酸克隆到质粒表达载体中并稳定转染到细胞系中,导致感兴趣的靶蛋白的稳定表达。在某些实施方案中,将编码感兴趣的靶蛋白的核酸克隆到组成型质粒表达载体中并转染到细胞系中,导致感兴趣的靶蛋白的组成型表达。在具体实施方案中,组成型表达在CMV启动子的控制下。在某些实施方案中,将编码感兴趣的靶蛋白的核酸克隆到诱导型质粒表达载体中并转染到细胞系中,导致感兴趣的靶蛋白的诱导型表达。在具体实施方案中,诱导型表达在含有操纵子位点的CMV启动子的控制下。在更具体的实施方案中,操纵子位点是四环素操纵子2位点。在另一个实施方案中,诱导型质粒表达载体是四环素调节的表达载体。

[0079] 用于构建表达载体和在包含表达载体的细胞中表达基因的技术是本领域众所周知的。参见例如,Sambrook et al.,2001,Molecular Cloning—A Laboratory Manual,3rd edition,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.,以及Ausubel et al.,eds.,Current Edition,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and Wiley Interscience,NY。

[0080] 如所公开的方法中进一步提供的,核酸标签的核酸序列包含连接至可被DNA结合蛋白(例如NFκB、cro阻遏物、GAL4、GCN4、LexA、Opaque-2和TGA1a)特异性识别的靶DNA序列的扩增子并且能够结合或以其他方式连接至具有DNA结合组分的感兴趣的蛋白。然后可以使用例如定量PCR(qPCR)来检测和/或定量核酸标签,或者可以对核酸标签进行PCR扩增并通过质谱法进行检测。

[0081] 在一些实施方案中,在PCR扩增步骤期间采用第二报告子功能。在一个具体的实施方案中,在PCR扩增步骤期间,核酸标签经历引物延伸步骤,此时第二报告子功能如荧光标签附着至核酸标签。

[0082] 核酸标签可以通过qPCR检测和/或定量。qPCR检测核酸标签具有不仅是一种可靠的定量检测方法,而且是一种高灵敏度、高选择性的检测方法的优点。由于qPCR检测方法的高度灵敏性,该方法能够检测极少量的靶蛋白,并减少对稀有且昂贵的测定组分(例如重组蛋白)的需求。由于qPCR检测方法的高度特异性,qPCR还能够检测复杂异质混合物中的特定DNA序列,并且无需通常对蛋白样品进行的任何类型的纯化步骤,以改善或增强蛋白检测。

[0083] 可扩增序列以序列特异性方式与PCR引物杂交或能够杂交。在某些实施方案中,核酸标签包含多个扩增子,例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个扩增子。在一些实施方案中,多个扩增子是单个扩增子的串联重复。在某些实施方案中,扩增子可通过定量PCR扩增,这允许对由此类核酸寡聚物标记的蛋白进行定量。在具体的扩增方法中,PCR序列的扩增包括将含有PCR扩增模板的核酸、PCR引物和qPCR探针在标准PCR反应混合物(一般为终浓度为10mM Tris-HCl(在25°C pH 8.3)、1-4mM MgCl₂、0.1-1mM dNTP)中组合,并且首先在热启动条件下处理样品(例如,加热至95°C持续5分钟)以最小化非特异性退火或错误引发,随后是变性步骤(例如,95°C,45秒),随后是退火步骤(55°C,1分钟),并且随后是延伸步骤(72°C,1分钟),通过最多达四十轮的变性、退火和延伸的连续步骤,完成qPCR信号的放大。

[0084] 在一个实施方案中,核酸标签的长度介于约50个和约100个之间、约50个和约200

个之间、约50个和约300个之间、约50个和约400个之间、约50个和约500个之间、约100个和约200个之间、约100个和约300个之间、约100个和约400个之间、约100个和约500个之间、约200个和约300个之间、约200个和约400个之间、约200个和约500个之间、约300个和约400个之间、约300个和约500个之间、或约400个和约500个之间核苷酸的长度。

[0085] 核酸标签的报告子功能还可以来自核酸标签的放射性标记、荧光标记或生物素化。核酸标签可以是单链或双链DNA、单链或双链RNA、DNA-RNA杂合体、RNA-RNA杂合体、或其天然或合成衍生物、类似物和片段。在一些实施方案中,核酸标签是DNA,并且报告子功能标记可以引入到DNA中,例如,通过任何标准酶促反应如切口平移,或通过用³²P、¹²⁵I或生物素标记的脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)进行末端标记,或该标记可以作为嵌入剂引入。有许多可商购的荧光或发光基团可用于标记核酸标签。可用于标记核酸标签的荧光标记的一些实例是荧光素、罗丹明和香豆素及其商用衍生物,如Texas Red®和Alexa Fluor®。发光基团的实例是镧系元素络合物和发光纳米粒子。在一个实施方案中,核酸标签最初不具有报告子功能,但在核酸检测步骤之前添加报告子功能。

[0086] 所公开的测定可以在细胞中进行,所述细胞可以是任何细胞类型和来源的原代细胞、次级细胞或永生化细胞。在一些实施方案中,细胞源自哺乳动物,包括人类。在一些实施方案中,细胞具有不同的细胞类型。在其他实施方案中,细胞来自基本上同质的细胞群。本发明的方法允许分析包含在例如42孔、96孔、384孔或1536孔测定板中的大量细胞样品。

[0087] 本文提供的方法可以使用可以在标准组织培养塑料器皿中生长的任何细胞类型来进行。此类细胞类型包括衍生自任何公认来源(例如哺乳动物、植物、细菌、病毒或真菌)的所有正常细胞和转化细胞。在特定实施方案中,细胞是哺乳动物(人或动物,如啮齿动物或猿)来源的。在一些实施方案中,细胞是人类来源的。在一些实施方案中,细胞是啮齿动物来源的。在一些实施方案中,细胞是鼠科动物来源的。在一些实施方案中,哺乳动物细胞可以具有任何器官或组织来源(例如,脑、肝、肺、心脏、肾、皮肤、肌肉、骨、骨髓或血液)并且具有任何细胞类型。适用于本文提供的方法的细胞类型包括但不限于成纤维细胞、基底细胞、上皮细胞、内皮细胞、血小板、淋巴细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、网织红细胞、粒细胞、单核细胞、肥大细胞、神经细胞、成神经细胞、巨细胞、树突细胞、巨噬细胞、胚叶细胞、内皮细胞、肿瘤细胞、间质细胞、库普弗细胞、朗格汉斯细胞、衬细胞、组织细胞如肌肉细胞和脂肪细胞、去核细胞等。

[0088] 在本文所述方法的一些实施方案中,可以对细胞进行基因工程改造以表达包含感兴趣的靶蛋白和核酸寡聚物或核酸标签的融合蛋白。表达载体可以通过本领域技术人员已知的任何方法无限制地引入宿主细胞中用于表达。此类方法包括但不限于例如细胞从溶液中直接摄取分子;或通过使用例如脂质体或免疫脂质体的脂转染促进摄取;粒子介导的转染;参见例如,美国专利号5,272,065;Goeddel et al.,eds,1990,Methods in Enzymology,vol.185,Academic Press,Inc.,CA;Krieger,1990,Gene Transfer and Expression—A Laboratory Manual,Stockton Press,NY;Sambrook et al.,1989,Molecular Cloning—A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,NY;以及 Ausubel et al.,eds.,Current Edition,Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience,NY。用于表达载体的有用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型

MMTV启动子、SV40启动子、MRP pol III启动子、组成型MPSV启动子、RSV启动子、四环素诱导型CMV启动子(如人立即早期CMV启动子)和组成型CMV启动子。表达载体应含有与待表达融合蛋白的细胞相容的表达和复制信号。可用于表达本文所述的感兴趣的靶蛋白或融合蛋白的表达载体包括病毒载体如逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒、质粒载体、粘粒等。

[0089] 本领域技术人员已知可用于表达重组多肽的任何哺乳动物细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、A375细胞、HEK293或LnCap细胞,可用于表达包含感兴趣的靶蛋白和检测标签如核酸标签的融合蛋白。当靶蛋白在适当的宿主细胞中表达时,它可以表现出天然蛋白中存在的翻译后修饰,因此预计具有天然蛋白的结构和功能。

[0090] 在另一方面,本发明提供针对一种或多种多肽筛选化合物文库的方法。通常,用感兴趣的多肽测试测试分子组,并且一旦鉴定到感兴趣的结合相互作用,就可以进一步单独评估测试分子。

[0091] 在本发明的另一个方面,筛选化合物文库与单个多肽或多肽组的结合特性。可以一次测试多种化合物。通常,如果测试多种化合物,在发生阳性相互作用后,将单独评估这些化合物的结合特性。

[0092] 本文还提供了用于筛选作为分子胶的候选分子或测试化合物的试剂盒,其中测试化合物使得先前未知彼此结合的感兴趣的靶蛋白和配体蛋白之间能够形成蛋白-蛋白复合物。此类试剂盒可以包含用融合蛋白转染的细胞系,所述融合蛋白包含感兴趣的靶蛋白和在细胞测定中充当可检测底物的可检测标签。此类试剂盒还可以包含与靶蛋白形成复合物的配体蛋白,所述靶蛋白与测试化合物形成复合物。将配体蛋白固定在固相支持体或容器上,如多孔板中的孔。在一些实施方案中,试剂盒进一步包含可检测的核酸标签;以及能够被核酸标签“标记”的靶蛋白。当核酸标签可通过qPCR检测时,试剂盒可以另外包括能够识别核酸标签中的PCR起始序列的PCR引物。此类试剂盒可用于实施鉴定能够在否则未知彼此结合的两种蛋白之间形成蛋白-蛋白复合物的测试化合物的方法,如上所述。

[0093] 与使用小分子药物靶向感兴趣的疾病蛋白相比,所公开的测定和方法进一步提供了优点。分子胶有许多优点,其中之一是可以靶向或结合不可用药的靶标、转录因子、翻译因子、支架蛋白、酶蛋白和非酶蛋白。分子胶化合物可以结合靶蛋白和E3连接酶的非功能结构域,而不仅仅是结合活性位点。所公开的测定还提供了开发具有组织选择性和亚化学计量效力的分子胶降解剂药物的能力,否则使用小分子抑制剂药物很难实现这一点。

[0094] 在说明书中,出于解释而非限制的目的,阐述了具体细节,如特定实施方案、系统、方法等,以便提供对本技术的透彻理解。然而,对于本领域技术人员来说显而易见的是,本技术可以在脱离这些具体细节的其他实施方案中实践。

[0095] 本说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利申请被具体且单独地指示通过引用并入一样。尽管为了清楚理解的目的已经通过说明和示例的方式对前述发明进行了一些详细的描述,但是根据本发明的教导,对于本领域普通技术人员来说,在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下,可以进行某些改变和修改是显而易见的。

[0096] 尽管出于说明性目的在上文描述了该方法的具体实施方案和实例,但是如相关领域的技术人员将认识到的,在该系统的范围内各种等效修改是可能的。例如,虽然过程或步骤以给定顺序呈现,但是替代实施方案可以进行具有不同顺序的步骤的程序,并且一些过

程或步骤可以被删除、移动、添加、细分、组合和/或修改以提供替代或亚组合。这些过程或步骤中的每一个都可以以多种不同的方式来实现。此外,虽然过程或步骤有时显示为串行进行,但是这些过程或步骤可以替代地并行进行或者可以在不同时间进行。

[0097] 虽然上文已经描述了各种实施方案,但是应当理解,它们仅作为示例而非限制的方式呈现。这些描述并不旨在将本技术的范围限制于本文所阐述的特定形式。相反,本描述旨在覆盖如本领域普通技术人员所理解的可包括在本技术的精神和范围内的此类替代、修改和等同物。因此,优选实施方案的广度和范围不应受到任何上述示例性实施方案的限制。

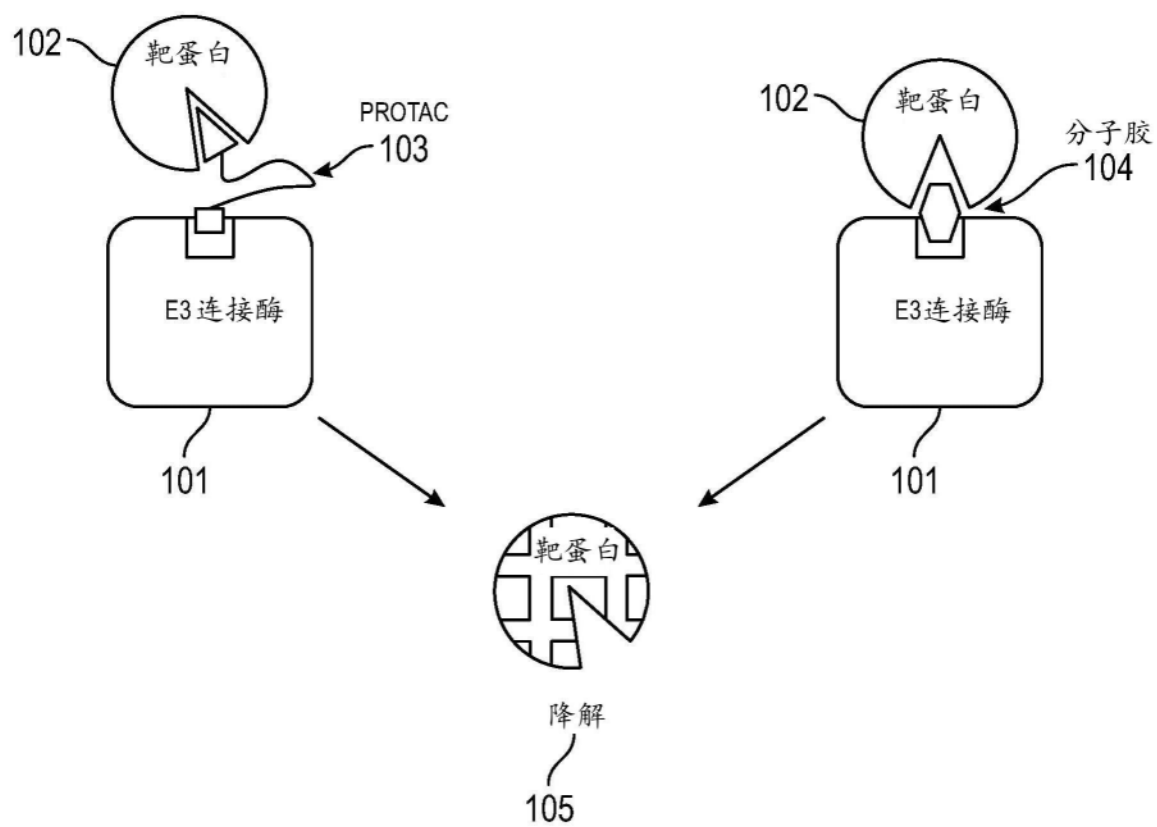


图1

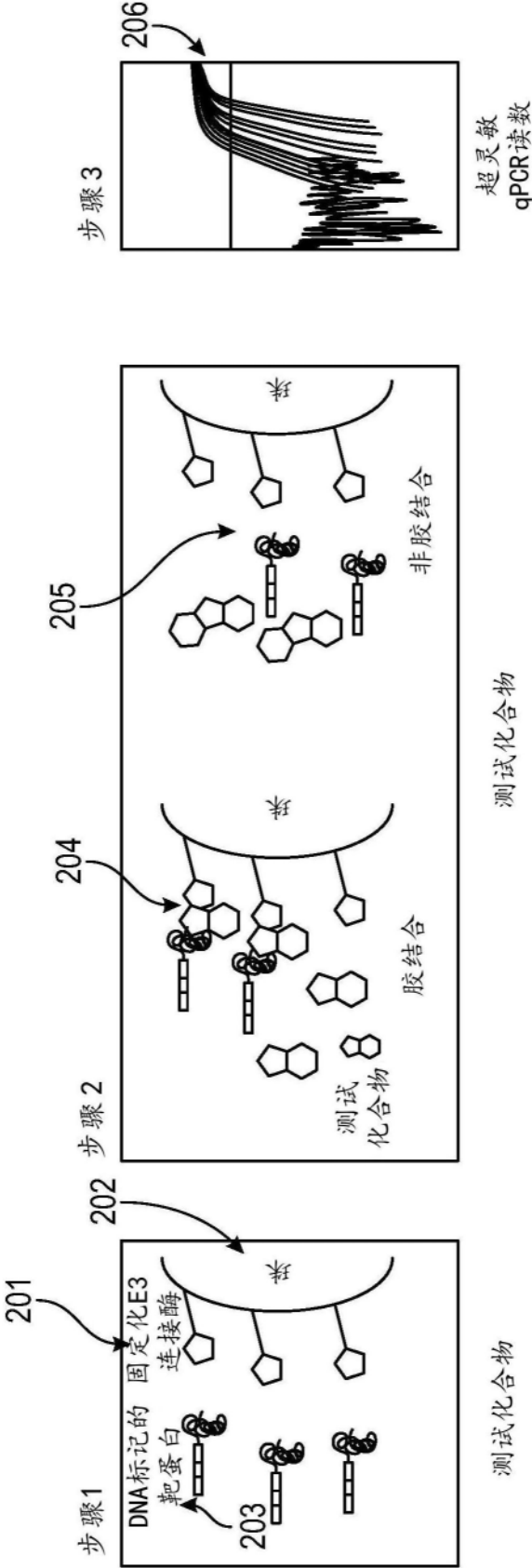


图2