



(21) 申请号 201280025677.X

(22) 申请日 2012.04.18

(30) 优先权数据

1106548.9 2011.04.18 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.11.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2012/050853 2012.04.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/143714 EN 2012.10.26

(73) 专利权人 生物目标共享利益集团

地址 瑞典索尔纳

(72) 发明人 帕尔·诺德隆德

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 谢顺星 张晶

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

(56) 对比文件

W0 9742500 A1, 1997.11.13,

W0 0146693 A2, 2001.06.28,

Rosemarie K. C. Knaust, PÄl

r Nordlund. Screening for soluble expression of recombinant proteins in a 96-well format.. 《Analytical Biochemistry》. 2001, 第 297 卷

Morgane J. J. Moreau 等. Quantitative determination of protein stability and ligand binding using a green fluorescent protein reporter system.. 《Molecular Biosystems》. 2010, 第 6 卷

Morgane J. J. Moreau 等. Quantitative determination of protein stability and ligand binding using a green fluorescent protein reporter system.. 《Molecular Biosystems》. 2010, 第 6 卷

Masoud Vedadi 等. Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination.. 《Proc Natl Acad Sci USA》. 2006, 第 103 卷 (第 43 期),

Kendall D. Powell 等. A general mass spectrometry-based assay for the

(续)

审查员 毕秀华

权利要求书2页 说明书22页 附图6页

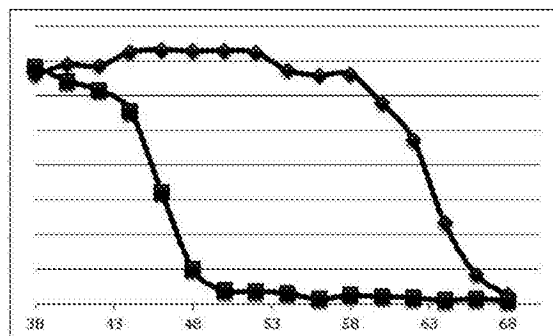
(54) 发明名称

使用热转移试验测定配体与靶蛋白结合的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种确定未纯化样品是否含有结合目的配体的靶蛋白的方法,其包括步骤:a)将所述未纯化样品暴露于能够引起或增强未结合的靶蛋白沉淀至高于能够引起或增强结合所述配体的靶蛋白的沉淀的程度的温度;b)处理步骤a)的产物,以分离可溶性蛋白和不溶性蛋白;和c)分析步骤b)的可溶性蛋白级分和不溶性蛋白级分两者之一或两者是否存在靶蛋白,其中不是基于与其融合的标记物、肽、多肽或蛋白的酶活性来检测所述靶蛋白。特别是,本发明可以用于确定药物

是否能够结合源自患者的样品中的蛋白靶,以确定某一药物是否可以用于该患者的治疗。另外,本发明还涉及用于本发明方法中的仪器以及包含抗体和/或非蛋白融合标记物的试剂盒在本发明方法中的用途。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

quantitation of protein-ligand binding interactions in solution.. 《J Am Chem Soc》.2002, 第 124 卷

Ulrika B.Ericsson 等.Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies.. 《Analytical Biochemistry》.2006, 第 357 卷

Michael W.Pantoliano 等.High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery.. 《Journal of Biomolecular Screening》.2001, 第 6 卷

Guillermo A.Senisterra 等.Application of high-throughput isothermal denaturation

to assess protein stability and screen for ligands.. 《J Biomol Screen》.2008, 第 13 卷

Lori Giver 等.Directed evolution of a thermostable esterase.. 《Proc Natl Acad Sci USA》.1998, 第 95 卷

Dennis E.Epps 等.The ligand affinity of proteins measured by isothermal denaturation kinetics.. 《Analytical Biochemistry》.2001, 第 292 卷

Thomas J Magliery 等.Protein stability by number:high-throughput and statistical approaches to one of protein science"s most difficult problems.. 《Current Opinion in Chemical Biology》.2011, 第 15 卷

1. 一种确定未纯化样品是否含有结合目的配体的靶蛋白的方法,其包括以下步骤:
 - a) 将所述未纯化样品暴露于能够引起或增强未结合的靶蛋白沉淀至高于能够引起或增强结合所述配体的所述靶蛋白沉淀的程度的温度,其中所述未纯化样品中的靶蛋白包含于细胞内或细胞上;
 - b) 使所述样品经历能使细胞裂解的条件;
 - c) 分离步骤 b) 的产物中的可溶性蛋白和不溶性蛋白;以及
 - d) 分析步骤 c) 的可溶性蛋白级分和不溶性蛋白级分者之一或两者是否存在所述靶蛋白,其中通过结合检测部分的亲和性或通过质谱来检测所述靶蛋白。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中根据步骤 c),分析所述可溶性级分。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述配体是蛋白、DNA 或 RNA 分子、细胞代谢物、药物、天然产生的结合伴侣或激素。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述温度等于或高于所述靶蛋白的初始熔化温度。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述温度高于 40℃。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其中将所述未纯化样品暴露于一系列不同的温度,包括等于或高于所述靶蛋白的初始熔化温度的温度。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其中使用抗体来鉴定靶蛋白。
8. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述分离步骤 c) 是离心、过滤或亲和性分离步骤。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其中在所述分析步骤 d) 之前,来自过滤步骤滤液中的靶蛋白捕获在固体支持体上。
10. 如权利要求 1 所述的方法,其中为了确定所述样品中是否存在所述目的配体,将靶蛋白添加到所述样品中。
11. 如权利要求 1 所述的方法,其中为了确定所述样品中是否存在所述靶蛋白,将目的配体添加到所述样品中。
12. 一种用于鉴定能够结合靶蛋白的配体的方法,其包括步骤:
 - a) 将包含所述靶蛋白和测试分子的未纯化样品暴露于一系列不同的温度,包括等于或高于所述靶蛋白的初始熔化温度的温度,其中所述未纯化样品中的靶蛋白包含于细胞内或细胞上;
 - b) 使所述样品经历能使细胞裂解的条件;
 - c) 分离步骤 b) 的产物中的可溶性蛋白和不溶性蛋白;以及
 - d) 分析步骤 c) 的可溶性蛋白级分和不溶性蛋白级分两者之一或两者是否存在所述靶蛋白,其中通过结合检测部分的亲和性或通过质谱来检测所述靶蛋白。
13. 如权利要求 12 所述的方法,其中在对照反应中使未添加测试分子的包含所述靶蛋白的未纯化样品也经受权利要求 12 所述的方法。
14. 一种确定未纯化样品是否含有结合目的配体的靶蛋白的方法,其中所述配体不是融合蛋白,所述方法包括以下步骤:
 - a) 将所述未纯化样品暴露于能够引起或增强结合所述配体的所述靶蛋白沉淀至高于能够引起或增强未结合的靶蛋白沉淀的程度的温度,其中所述未纯化样品中的靶蛋白包含于细胞内或细胞上;
 - b) 使所述样品经历能使细胞裂解的条件;

c) 分离步骤 b) 的产物中的可溶性蛋白和不溶性蛋白 ;以及

d) 分析步骤 c) 的可溶性蛋白级分和不溶性蛋白级分两者之一或两者是否存在所述靶蛋白,其中通过结合检测部分的亲和性或通过质谱来检测所述靶蛋白。

15. 如权利要求 1 所述的方法,其中使用抗体来鉴定所述靶蛋白,并且其中步骤 c) 是离心、过滤或亲和性分离步骤。

16. 如权利要求 1、12 或 14 中任一项所述的方法,其中不是基于与其融合的标记物、肽、多肽或蛋白的酶活性来检测所述靶蛋白。

17. 如权利要求 1、12 或 14 所述的方法,其中所述未纯化样品是细胞集落、细胞的液体培养物或患者或动物样品。

18. 如权利要求 1、12 或 14 所述的方法,其中所述未纯化样品是从人类患者或动物患者或疾病模型直接获得的。

19. 如权利要求 18 所述的方法,其中所述样品是组织样品、血液、血清、血浆或淋巴。

20. 如权利要求 1、12 或 14 所述的方法,其中所述未纯化样品是细胞集落,分离步骤 c) 是过滤,且其中将所述细胞集落在过滤器上升起,并且在所述过滤器上直接对所述集落进行裂解。

使用热转移试验测定配体与靶蛋白结合的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及研究蛋白配体结合相互作用的方法,特别是通过使用热转移(thermal shift)分析来进行。

[0002] 更特别是,本发明涉及用于测定配体与未纯化靶蛋白结合的方法,包括加热未纯化靶蛋白和配体以及分析产物以检测可溶性靶蛋白的步骤。在某些实施方案中,本发明的方法在热处理后使用分离步骤来分离可溶性蛋白和不溶性蛋白,以估算可溶性靶蛋白的含量,并且因此估算热稳定的配体结合靶蛋白。本发明还涉及用于所述方法中的仪器,其包括加热装置、用于分离可溶性蛋白和不溶性蛋白的装置和分析可溶性蛋白和不溶性蛋白是否存在靶蛋白的装置。还描述了包含抗体或非蛋白融合标记物的试剂盒在本发明方法中的用途。

背景技术

[0003] 配体与蛋白结合的检测在生物学和医学的许多不同领域中是重要的。特别是,在化合物研发成药物的过程中,知道化合物是否与药物靶相互作用是重要的。因此靶蛋白-配体相互作用的监控可以用于从大的化学物质文库对相互作用配体进行初始筛选,以及用于将初始配体优化成候选药物的过程中。此外,了解药物与其他蛋白的相互作用(所谓的“脱靶(off-target)相互作用”)是重要的,其中这样的相互作用可能导致治疗副作用。

[0004] 在其他医学应用中,确定特定的药物是否能够结合患者或动物模型(用于疾病)中的靶蛋白是重要的。对于有效的药物,需要在胃/肠道中吸收(或如果注射,应当进入血液)并且转运至身体的正确位置。如果药物没有定向于胞外蛋白或受体,药物还需要转运至细胞中,以便使其接近靶蛋白。在所有这些转运过程中,药物需要稳定并且避免从肾脏分泌出来和分解,例如,在肝脏中分解或被细胞代谢酶降解。药物还需要幸免于细胞抗药性过程,如被 P450 酶降解或通过多种药物流出通道转移。最后,药物需要能够结合药物靶蛋白。在癌症治疗和感染治疗中的抗药性有时候是由于靶蛋白上的药物结合位点区域中的微小突变引起的。然而,在从药物到靶标的路径中,药物将遇到身体的许多不同环境,并且可能潜在地与沿该路径的许多不同蛋白相互作用。

[0005] 在药物到达靶蛋白上的结合位点之前,药物路径的高度复杂性可能是目前基于临床诊断、表达分析和测序的预测方法在预测治疗效率中只具有有限成功的一个原因。用于测定药物是否已经到达其靶标的潜在方式,是直接测定身体的靶细胞中的药物-靶蛋白相互作用。尽管这不会测定药物靶标下游的事件,但将整合如上所述的药物到靶标的所有步骤。因此这样的测定可以包括治疗效率的许多关键步骤并且可能是许多药物效率的有价值的预测,并且因此作为临床诊断工具。因此,期望能够检测出未纯化样品(例如,来自患者的那些)中的配体-蛋白相互作用,来研究药物相互作用和效率。

[0006] 在本领域中已经研发了热转移试验,其可以测定其中蛋白是纯化形式的蛋白-配体结合。这些试验是基于两个原理来研发的,即纯化蛋白在特定的温度下将熔化并解折叠,以及配体与蛋白的结合将使得蛋白热稳定。一旦结合配体,纯化蛋白将显示出热稳定性增

加,并且因此,一旦结合配体,蛋白将在比单独的纯化蛋白更高的温度下熔化,基于此,可以检测配体与蛋白的结合。Vedadi 等(Vedadi et al PNAS, 103(43), 15835-15840, 2006)评价了鉴定促进蛋白稳定性、结晶和结构测定的配体的化学筛选方法。在这些方法中,在对小分子文库筛选后,评价重组纯化蛋白的热稳定性。使用荧光测定法(其中使用荧光探针)或静态光散射来测定蛋白热稳定性的增加,并且由此测定配体结合。然而,如上所述,这种方法使用了在特定的温度下熔化的纯化蛋白(如通过使用未连接蛋白的参照样品测定的),允许测定熔化温度下稳定性的增加。

[0007] Moreau 等(Moreau et al Mol.BioSyst., 6, 1285-1292, 2010)最近使用 GFP 作为报告系统来测定靶蛋白和其配体相关稳定作用的稳定性,其中将 GFP 与靶蛋白融合。然而,这种方法是不理想的。首先,该方法需要融合蛋白的构建和表达,并且因此不能用于天然细胞和组织中,而只能用于转化的细胞中。此外,该方法只可以用于检测配体与稳定性低于 GFP 的蛋白的结合。最后,添加剂或盐的使用影响了 GFP 的稳定性,并且因此每个实验必须使用对照 GFP。

[0008] 因此,现有技术中所述的热转移试验只与纯化蛋白结合使用,或在一种情况中(Moreau et al, 上文),结合与另一种纯化后的蛋白混合的纯化蛋白,其中蛋白融合 GFP。与此相反,本发明发明人已经研发了一种试验,其可以用于测定配体与未纯化蛋白的结合,其中不是基于与其融合的任何标记物或肽、多肽或蛋白的酶活性来检测未纯化蛋白。因此,本发明发明人已经揭示了,例如,在细胞、细胞裂解产物或其他含有许多不同生物分子的复合液体中,未纯化蛋白以与纯化蛋白相似的方式依特征温度解折叠和沉淀是可能的。这种发现是出乎意料的,因为细胞中存在的条件和未纯化样品中存在的条件与纯化样品中的条件是完全不同的。因此,在未纯化样品中或细胞中,预期几个不同的过程可能影响蛋白的稳定性,这几个不同的过程将平行作用,如不同蛋白的拥挤效应(protein crowding effects)或部分解折叠蛋白的不同蛋白伴侣(chaperon)或膜相互作用。本发明发明人利用以上讨论的这种发现来研发热转移试验,其可以基于未纯化蛋白在特征性温度下熔化的能力检测未纯化样品中配体与蛋白的结合。该方法是通用的,并且可以用于大部分靶蛋白和配体组合,与现有技术的方法不同。该试验研究了未纯化形式的靶蛋白在特定温度下的热稳定性,其中热稳定性增加表示配体结合。因此,将具有添加的配体的未纯化靶蛋白的热稳定性与不具有配体的未纯化靶蛋白的热稳定性相比较。与不具有配体的未纯化靶蛋白相比,具有配体的未纯化靶蛋白的任何特稳定性增加表示配体结合了未纯化靶蛋白。具体而言,通过检测热处理后靶蛋白是否是可溶的来确定热稳定性的任何增加。因此,本发明的试验使用分离可溶性蛋白和不溶性蛋白的简单步骤来鉴定任何可溶的靶蛋白。如以上所讨论的,这样的可溶性蛋白与施加于样品的温度下的热稳定性相关,并且因此与具有结合的配体有关。因此区分可溶性蛋白和不溶性蛋白的分离步骤使得本发明的试验可以用于检测任何靶蛋白,并且因此提供了一种通用方法。

发明内容

[0009] 因此,在一个方面中,本发明提供了用于鉴定能够与靶蛋白结合的配体的方法,其中所述靶蛋白是未纯化的,该方法包括以下步骤:

[0010] (a) 将含有所述未纯化靶蛋白和测试分子的样品暴露于能够引起或增强所述靶蛋

白沉淀的温度；

[0011] (b) 处理步骤(a) 的产物以分离可溶性蛋白和不溶性蛋白, 以及

[0012] (c) 分析步骤(b) 的可溶性蛋白是否存在靶蛋白, 其中不是基于与其融合的标记物、肽、多肽或蛋白的酶活性来检测所述靶蛋白。

[0013] 因此, 如以上所讨论的, 本发明的方法涉及检测未纯化样品中配体与靶蛋白的结合, 其中令人惊讶的是, 这样的样品中的靶蛋白能够依特征温度 (characteristic temperature) 熔化或解折叠。当靶蛋白结合配体时, 靶蛋白的热稳定性通常提高, 并且因此结合配体时, 靶蛋白可以在比不存在配体时更高的温度下熔化。因此将通常熔化 / 解折叠未结合的靶蛋白的温度施加于样品, 可以导致未结合的靶蛋白解折叠, 且结合配体的靶蛋白保持更大程度的折叠。因此, 检测出较高水平的折叠靶蛋白表示配体结合。折叠的靶蛋白通常是可溶性的, 而解折叠的蛋白通常是不溶性的。因此, 蛋白的可溶性与其热稳定性相关。因此, 使用靶蛋白通常开始沉淀并且变得不溶的温度热处理后, 检测出较高水平的可溶性靶蛋白表示存在热稳定增加的折叠的靶蛋白同, 并且因此表示配体结合。

[0014] 本发明涉及不纯样品的分析。这允许该技术用于“生物传感器”类型的方法中。可以通过将靶蛋白加入样品中(纯化蛋白样品中或未纯化样品中(例如, 细胞裂解产物)) 来分析含有目的配体的未纯化的样品, 特别是临床或环境样品。这样的方法可以定量血清样品中药物或其他分析物的存在, 即使靶蛋白最初不存在于血清中。可以将含有靶蛋白的细胞裂解产物, 例如来自药物的靶细胞, 加入临床样品中。

[0015] 因此, 本发明提供了更通用的确定未纯化样品是否含有结合目的配体的靶蛋白的方法, 其包括步骤:

[0016] (a) 将所述未纯化样品暴露于能够引起或增强未结合的靶蛋白沉淀至高于能够引起或增强结合所述配体的靶蛋白的沉淀的程度的温度;

[0017] (b) 处理步骤 a) 的产物以分离可溶性蛋白和不溶性蛋白; 以及

[0018] (c) 分析步骤 b) 的可溶性蛋白级分和不溶性蛋白级分之一或或者是否存在靶蛋白, 其中不是基于与其融合的标记物、肽、多肽或蛋白的酶活性来检测所述靶蛋白。

[0019] 本领域技术人员熟知纯化蛋白的热转移分析以及由此产生的熔点曲线。可以取熔点曲线的中点作为蛋白的熔点, 并且该温度在配体结合时可以改变。应当认识到, 根据由配体结合引起的转移的性质, 在某些温度下, 存在一定的结合蛋白和未结合蛋白都熔化(沉淀) 的情形, 但未结合蛋白产生更高程度的沉淀。转移可见并且沉淀蛋白的含量不同时的温度是可鉴别的温度, 并且该范围内的温度可以用作根据以上步骤(a) 的单个可鉴别温度。当未结合和结合的靶蛋白的 m. p. 已知时, 这种情况更是如此, 并且将该方法作为用于检测样品中靶蛋白和 / 或配体存在的试验来进行。因此, 可以将配体加入样品中, 以证实靶蛋白的存在。

[0020] 本发明的方法是用于测定未纯化样品中配体-靶蛋白结合的通用方法。除非文中另有清楚说明, 否则本文的“未纯化蛋白”加以必要的修正为“未纯化样品”。该方法相比现有技术方法具有许多优势。首先, 其不需要为了研究配体结合而纯化蛋白。此外, 该方法不需要靶蛋白的重组表达或含有融合报告蛋白的蛋白产生(如, Moreau et al, 上文)。其进一步允许使用热转移结合试验研究细胞培养物、动物或患者样品中的配体结合, 这在之前是不可能的。如以上讨论的, 这对于分析特定的药物是否可以有效地用于治疗特定患者的疾

病或帮助确定药物的最佳剂量是重要的。例如,这对于其中常常产生抗药性的癌症和传染病的治疗具有重要的结果。在能够检测用药物没有有效治疗的患者的情况中,允许推荐其他疗法,或调整药物剂量。

[0021] 此外,本发明方法的检测步骤不需要使用昂贵的设备或机械;实际上,可以使用过滤器实现分离步骤,并且例如可以使用抗体检测靶蛋白。该方法可以用于任何蛋白来检测配体的结合;对于该方法中检测的每个蛋白,不需要设计特定的探针等。因此,本发明的方法代表一种测定未纯化样品中蛋白-配体结合的有效的、可靠的方式。另外,如下文所进一步讨论的,该方法易于多路复用,并且用来筛选用于相互作用的配体或蛋白文库。

[0022] 如本文中所述的术语“靶蛋白”,指的是在本发明方法中评价配体结合的蛋白。因此靶蛋白可以是样品中存在的任何蛋白。靶蛋白可以是例如在细胞或细胞裂解产物或动物或患者样品中天然存在的,或可以是重组表达的,例如,可以从转化至细胞中的质粒表达。如上所述,靶蛋白最初可以不存在于样品中,而是可以将其加入样品中,来研究起始样品中配体的存在。因此,根据本发明,“样品”是在步骤(a)中处理的测试样品,并且这可以不同于起始样品,例如临床样品。同样,可以将配体加入起始样品中。加入已知含量的靶蛋白或配体有助于获得定量数据。

[0023] 靶蛋白可以是野生型形式的,即,按照其通常在自然界存在的样子,或可以包含一个或多个突变。因此,编码蛋白的基因/cDNA/编码区可以突变,以产生该蛋白的突变体,例如具有不同的结合配体的能力的突变体。如下文进一步讨论的,可以在表达系统中产生这些突变体,其中可以使用本发明的方法选择突变体,例如,配体结合增加的突变体。

[0024] 通常,靶蛋白将具有天然或类天然(native-like)的结构,并且是可溶性的。天然或类天然蛋白以可溶形式表达和/或正确折叠。类天然膜蛋白不必游离于溶液存在,其可以存在于细胞膜或膜囊中,而不是存在于包含体中。因此,类天然蛋白通常不是不溶性的,其存在于包含体中且聚集或错误折叠。

[0025] 靶蛋白在动物群内可以以各种变体的形式存在。这些变体可以存在于健康动物群内,或蛋白中的变异可以导致群内的疾病或抗药性。本发明的方法提供了在许多不同靶蛋白变体中筛选配体的方法。这样的信息对研发特异性地结合某些蛋白变体的配体或基于天然表达的蛋白变体来确定哪种治疗形式最适于患者是有用的。因此,可以使用两种或多种靶蛋白来重复该方法,那些靶蛋白是同一蛋白的变体。

[0026] 可以根据具有天然或类天然结构来限定“可溶性蛋白”。此外,可溶性蛋白可以描述为样品离心(如果所述蛋白在细胞内,则伴随有现有技术的裂解步骤)后保留在上清液中的蛋白。离心通常在 100g 至 20000g 之间进行。离心的持续时间可以为 1 分钟(通常至少 10 分钟)至至少 1 小时,其中随着离心力增大,所需的持续时间通常减少。特别是,用于在所得到的上清液中只提供可溶性蛋白的合适条件包括在 3000g 下 30 分钟,或 20000g 下 15 分钟。

[0027] 术语“未纯化靶蛋白”指不是分离形式的靶蛋白,或可选地,与其他化合物(例如,蛋白)一起存在时观察到的靶蛋白。在加入测试分子(潜在的配体)之前或在测试分子不存在的情况下,本发明的方法中使用的未纯化靶蛋白是未纯化形式的。因此,未纯化靶蛋白与测试分子(潜在的配体)以外的化合物一起存在,对测试分子进行检测,以确定是否是靶蛋白的配体。因此未纯化靶蛋白包括包含在细胞内或上的靶蛋白、细胞裂解产物和直接

从患者(人类患者或动物患者或疾病模型,例如,狗、猫、猴子、兔子、小鼠、大鼠等)获得的样品,如组织样品、血液、血清、血浆、淋巴等。未纯化靶蛋白包括包含在一个或多个细胞集落内的靶蛋白,其中将细胞集落定义为细胞的限制组,通常源自生长于固体或半固体培养基(即,添加有 0.1% 或更多琼脂的培养基)上的单个细胞或小的细胞簇。未纯化靶蛋白也可以包含在细胞的液体培养物中。细胞的液体培养物可以包含全部源自单个细胞的细胞,即,液体培养物内的细胞是无性系,或液体培养物可以包含不同细胞的悬浮液。集落或液体培养物中的细胞可以是原核细胞,即,细菌或真核细胞,例如酵母、单细胞真核生物,如利什曼原虫(*Leishmania*),昆虫细胞或哺乳动物细胞或细胞系。液体培养物中的细胞或作为集落生长的细胞可以形成为大肠杆菌(*E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、乳酸链球菌(*Streptococcus lactis*)、青色链球菌(*Streptococcus lividens*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)。以上所有都是包含靶蛋白的样品的实例。

[0028] 如上所述,本发明的关键是发现当经历热转移分析时“脏”样品可以产生可靠的信息。因此(a)的样品是未纯化的,但是可能将纯化的靶蛋白加入脏起始样品中的环境。样品是未纯化的,并且含有诸如其他蛋白、细胞碎片、核酸等的成分,如本文中“未纯化靶蛋白”部分中所述。

[0029] 通常,未纯化靶蛋白没有经历导致靶蛋白纯化的纯化处理。这样的纯化处理可以包括几个步骤,并且因此本发明中所用的未纯化靶蛋白没有经历所有这样的必需步骤来产生纯化蛋白。例如,在蛋白存在于组织中的情况中,可以使用提取、沉淀和分离(例如,通过离心或层析)的步骤来纯化蛋白。本发明的未纯化靶蛋白将不经历所有这样的步骤,并且因此将不分离纯化的靶蛋白。未纯化靶蛋白已经接受一个或多个步骤,例如,纯化过程的提取步骤,只要没有完成纯化过程并且没有分离纯化蛋白,就是可能的。因此未纯化靶蛋白通常与其他化合物或蛋白一起存在,并且因此靶蛋白不以分离的形式存在。

[0030] 如本文中所用的术语“测试分子”指的是任何分子或化合物,其在本发明的方法中被测试以确定其是否是靶蛋白的配体。换句话说,测试分子是靶蛋白的潜在配体。因此,测试分子或配体可以是蛋白、多肽、肽、RNA 或 DNA 分子。在具体的实施方案中,分子/配体可以是药物或药品、例如血清中的细胞代谢物或激素。测试分子或配体可以是天然产生的或可以是使用已经描述的或以下进一步讨论的任一种方法合成或重组产生的。

[0031] 所用的测试分子可能结合或不结合靶蛋白;在一个方面中,本发明的方法确定或评价具体的分子或化合物是否能够结合靶蛋白,即测试分子或化合物是否是配体。因此,本发明可以用于筛选小分子文库中能够结合靶蛋白的分子。一些测试的分子可能不结合靶蛋白,而另一些可能结合靶蛋白。另外,本发明的方法可以用于鉴定已知结合靶蛋白的小分子的变体,其可以以较高的亲和性(或可选地,以较低的亲和性)结合靶蛋白,其中常常在热稳定程度中反映出这种情况。因此,测试分子可以是突变的配体或已知(或未知)的靶蛋白结合伴侣。通过使用本文中所述的任一种突变方法来实现这样的突变分子的产生。

[0032] 因此,在一个方面中,本发明提供了一种用于鉴定能够结合靶蛋白的配体的方法,其包括步骤:

[0033] (a) 将含有所述靶蛋白和测试分子的未纯化样品暴露于一系列不同的温度,包括

等于或高于所述靶蛋白的初始熔化温度的温度；

[0034] (b) 处理步骤 (a) 的产物，以分离可溶性蛋白和不溶性蛋白；以及

[0035] (c) 分析步骤 (b) 的可溶性蛋白级分和不溶性蛋白级分两者之一或两者是否存在靶蛋白，其中不是基于与其融合的标记物、肽、多肽或蛋白的酶活性来检测所述靶蛋白。

[0036] 本文中所用的术语“配体”指的是能够结合靶蛋白的测试分子，或更概括地，指的是能够结合靶蛋白的化合物。靶蛋白可以具有与其结合的辅因子或生理基质 (physiological substrate)，但本发明的方法研究与未结合配体的靶蛋白 (未结合的靶蛋白) 相比，结合目的配体的靶蛋白的熔点。目的配体可以在蛋白上的别处结合或可以例如与生理配体竞争结合。目的配体可以是药物或药物候选物或天然产生的结合伴侣、生理基质等。因此，配体可以结合靶蛋白以形成较大的复合物。配体可以以任何亲和性即以高或低的亲和性结合靶蛋白。通常，以高亲和性结合靶蛋白的配体与以较低亲和性结合靶蛋白的配体相比，可以产生热稳定更好的靶蛋白。通常，能够结合靶蛋白的配体可以导致靶蛋白的热稳定至少 0.25℃ 或 0.5℃，并且优选至少 1℃、1.5℃ 或 2℃。

[0037] 因此，当已知测试分子结合靶蛋白 (并且因此是靶蛋白的配体) 时，本发明的方法可以用于评价配体与靶蛋白的结合，例如，用以测定相互作用的强度。在这个方面，本发明提供了一种用于评价配体与靶蛋白结合的方法，其中所述靶蛋白是未纯化的，所述方法包括步骤：a) 将含有所述靶蛋白和所述配体的样品暴露于能够引起或增强所述靶蛋白沉淀的温度；b) 处理步骤 a) 的产物，以分离可溶性蛋白和不溶性蛋白；以及 c) 分析步骤 b) 的可溶性蛋白是否存在靶蛋白，其中不是基于与其融合的标记物、肽、多肽或蛋白的酶活性来检测所述靶蛋白。

[0038] 为了评价或测定配体与未纯化靶蛋白的结合或为了鉴定用于未纯化靶蛋白的配体，通常将测试分子或配体加入样品中。然而，可能测试分子或配体已经存在于含有未纯化靶蛋白的样品中例如，它们是天然产生的。因此，本发明还提供了一种用于鉴定能够结合靶蛋白的配体的方法，其中所述靶蛋白是未纯化的，所述方法包括步骤：

[0039] (ai) 将测试分子加入所述未纯化的靶蛋白中；

[0040] (a) 将步骤 (ai) 的产物暴露于能够引起或增强所述靶蛋白沉淀的温度；

[0041] (b) 处理步骤 (a) 的产物，以分离可溶性蛋白和不溶性蛋白；以及

[0042] (c) 分析步骤 (b) 的可溶性蛋白是否存在靶蛋白，其中所述靶蛋白的存在表示所述分子结合了所述靶蛋白且是能够结合所述靶蛋白的配体，并且其中不是基于与其融合的标记物、肽、多肽或蛋白的酶活性来检测所述靶蛋白。

[0043] 通常，在测试分子 (潜在配体) 存在于胞外例如存在于溶液中时，将其简单地加入未纯化的靶蛋白中，例如，在靶蛋白也是在溶液中的情况下，将测试分子与未纯化的靶蛋白混合在一起，或例如，在靶蛋白存在于收集细胞的等份试样中的情况下，将测试分子滴在靶蛋白上。可选地，可以从编码测试分子的载体重组表达测试分子 (潜在配体)。因此添加测试分子的步骤涉及用编码测试分子的载体转化或转染细胞样品，和 / 或一旦进行了转化或转染，则诱导来自载体的测试分子在细胞样品中表达。添加测试分子的步骤还包括诱导由在细胞样品中天然存在的基因编码的测试分子表达。

[0044] 此外，在靶蛋白存在于细胞内的情况下，该方法需要将胞外测试分子或配体转运至细胞中，以接触靶蛋白。然而，对于结合细胞表面上的靶蛋白的测试分子或配体而言，不

需要将其转运至细胞中。可选地或另外地,当靶蛋白存在于细胞中(或细胞表面上)时,可以在加入测试分子或配体之前、同时或之后,进行细胞裂解步骤。这样的裂解步骤允许靶蛋白和测试分子或配体之间接触,和 / 或之后测试分子或配体和靶蛋白之间的任何结合的评价。因此,通常在本发明方法的分离步骤之前进行任何需要的裂解步骤。显而易见的是,只需要对其中靶蛋白包含在细胞内的样品进行裂解步骤。这种裂解步骤可以是热依赖性的,即裂解只在特定的温度下发生,例如在热循环结束时。

[0045] 根据在任何裂解步骤之前或之后细胞是否经受热处理,本发明的裂解步骤将具有不同的要求。对于在热处理之前经受裂解的细胞,优选地裂解步骤是非变性的,允许靶蛋白保持天然即正确折叠的或类天然构象。在本文中将这称为天然裂解(native lysis)。其可以通过化学方式或另外使用本领域公知的试剂如脲、含有缓冲剂或去污剂的溶菌酶(lysozyme),来进行。裂解的程度必须足以使细胞的蛋白自由穿过细胞。通常,处理膜结合蛋白时,在去污剂或双亲分子例如聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)或十二烷基麦芽糖苷的存在下进行裂解,以将蛋白从膜中释放出来。可选地,可以通过将细胞或集落冻融来进行裂解步骤。更优选地,使用天然裂解缓冲液和冻融细胞来进行裂解。优选地,裂解缓冲液含有例如 50–750 $\mu\text{g/ml}$ 、更优选 100–200 $\mu\text{g/ml}$ 的溶菌酶。可以发现天然裂解缓冲液中存在的 DNA 酶(DNAse)优选为 250–750mg/ml。天然裂解缓冲液可以含有,例如 20mM Tris, pH8, 100mM NaCl, 溶菌酶(200 $\mu\text{g/ml}$)和 DNA 酶 I (750 $\mu\text{g/ml}$)。对于已知的插入细胞膜中的靶蛋白,若已知去污剂溶解天然形式的膜插入蛋白,将常规浓度的去污剂添加到裂解缓冲液中,如 1% 十二烷基- β -麦芽糖苷。通常,将细胞暴露于裂解缓冲液 15–60 分钟,优选大约 30 分钟。优选重复进行冻融步骤,即进行两轮或多轮冻融,优选 3 轮或更多轮冻融。在一个优选的实施方案中,通过使用裂解缓冲液在室温下孵育 30 分钟和三个 $\times 10$ 分钟冻融实现裂解。

[0046] 通常,在裂解步骤过程中样品(例如,细胞集落或细胞培养物)内裂解的细胞的百分比是 5–100%。因此,当进行裂解步骤时,不必要对样品内的所有细胞进行裂解。为了释放足够的靶蛋白来接触配体和 / 或经受分离步骤,只需要裂解小的百分比细胞。

[0047] 如以上简短讨论的,测试分子或配体已经存在于包含靶蛋白的样品中是可能的。在这种情况下,可以研究与结合靶蛋白的天然配体,例如通过用缓冲剂稀释样品并且检测配体释放时靶蛋白的热稳定性的任何负转移。

[0048] 本发明的方法需要将未纯化的样品暴露于“能够引起或增强靶蛋白沉淀的温度”。这指的是在测试分子(潜在配体)不存在的情况下,能够引起或增强靶蛋白沉淀的温度。同样,将未纯化的样品暴露于“能够引起或增强未结合的靶蛋白沉淀至高于能够引起或增强结合配体的靶蛋白沉淀的程度的温度”。“未结合”指的是未结合目的配体时的靶蛋白,即在目的配体不存在的情况下的靶蛋白。

[0049] 因此,如之前讨论的,本发明发明人已经发现,不管未纯化样品内,特别是细胞内发现的情况如何变化,未纯化形式的蛋白通常以与纯化蛋白相似的方式以具体的温度(即具有截然不同的熔化温度)而沉淀。因此,蛋白可以在小的温度范围内沉淀。有时候,一些蛋白在一定温度范围内的加热过程中可能经历几次状态的转变,这表明样品中存在几种形式的蛋白(例如,不同的剪接形式(spliced forms)、磷酸化形式或结合其他蛋白)。在这种情况下,测试分子 / 配体并不结合所有转变态的所有形式的蛋白是可能的。因此,测试分子

或配体可以只结合一种或多种转变态的蛋白。因此,有可能测试分子 / 配体只能够热稳定化某些转变态或形式的蛋白并且只可以看到这些转变态的热稳定性转移。

[0050] 如果靶蛋白在小的温度范围内沉淀,初始熔化温度是该范围中的第一个温度,而最终熔化温度是该范围中的最后一个温度。因此,初始熔化温度是最低温度,靶蛋白在该温度下开始沉淀,例如至少 5% 的靶蛋白沉淀,而最终熔化温度是没有检测到可溶性靶蛋白的第一个温度,例如少于 5% 的靶蛋白是可溶形式的。通常,至少 95% 的靶蛋白熔化并沉淀。

[0051] 因此,当靶蛋白在一个温度范围内沉淀时,靶蛋白可以在特定的温度下开始沉淀或解折叠,在该温度,存在的可溶性靶蛋白的量将开始降低,而存在的不溶性靶蛋白的量将增加(因为热稳定性与可溶性相关)。因此,一些可溶性蛋白在初始熔化温度下仍然可检测到,直至施加略高的温度,在该温度点,很少或没有可溶性蛋白可检测到。

[0052] 因此蛋白的最终熔化温度是特定的温度,在该温度下,存在可检测到的可溶性蛋白明显降低,通常至少 95% 的蛋白是不溶性的。对于具有多次转变的不确定的蛋白,这些转变中的每一次可以导致较少量的蛋白变成不溶性的,但这仍然是明显的,足以被测定(例如,在每一次转变,至少 10% 的蛋白变成可溶性的)。在蛋白在小的温度范围内沉淀的情况中,其中可溶性蛋白的百分比降低,直至没有可溶性蛋白可以检测到,并且因此蛋白完全解折叠或沉淀,因此可以测定初始熔化温度和最终熔化温度。因此,在这样的温度范围的初始熔化温度即最低温度,在该温度下靶蛋白开始熔化或沉淀,至少 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 或 95% 的靶蛋白可以熔化或沉淀。换句话说,在这样的温度范围的初始熔化温度下,检测到的可溶性靶蛋白的量降低至少 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 或 95%。此外,存在的不溶性靶蛋白的量增加至少 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 或 95%。

[0053] 靶蛋白在一个特定的温度下解折叠和沉淀也是可能的。在这种情况下,优选至少 95% 的靶蛋白在特定温度下是不溶形式的,并且因此蛋白在小的温度范围内不会沉淀。因此这样的蛋白的初始熔化温度接近最终熔化温度。

[0054] 本发明中可以使用的温度可以是从小于靶蛋白开始解折叠的初始熔化温度开始的任何温度。等于或高于初始熔化温度的任何温度能够引起或增强靶蛋白的沉淀。因此,由于配体结合而具有较高热稳定性的靶蛋白在该温度下通常将不会解折叠或沉淀,与已经完全解折叠或开始解折叠的单独的靶蛋白相比,将检测到较高含量的可溶性蛋白。因此该温度是可区分的,引起或增强未结合的靶蛋白沉淀的程度高于引起或增强结合目的配体的靶蛋白沉淀的程度。

[0055] 与测试分子不存在时的存在可溶性靶蛋白的含量相比,当测试分子存在时在特定温度下检测到可溶性靶蛋白的量增加,这表示该分子是靶蛋白的配体,并且测试分子结合靶蛋白。如果本发明中使用的温度是初始熔化温度或初始熔化温度和最终熔化温度之间的温度(即,不是导致至少 95% 靶蛋白不溶的温度(最终熔化温度或高于其的温度)),则需要对不存在配体的靶蛋白进行对照反应,以便比较两种情况中检测的可溶性蛋白的含量,以检测含有配体的样品,其中与单独的靶蛋白相比存在增加含量的可溶性靶蛋白。这通常通过测定类似于未纯化样品中的蛋白的溶解曲线来进行。然而,如果本发明使用了在该温度下没有检测到或检测到非常少的可溶性靶蛋白(即,不含配体的靶蛋白)的温度,例如最终熔化温度,不需要对每次测定使用比较或对照。在这种情况下,该方法中可溶性蛋白的任何检

测表示热稳定的存在并且因此表示配体结合靶蛋白。这样的温度通常将等于或高于最终熔化温度。

[0056] 另外,本发明中可以选择温度,来筛选只以高亲和性结合靶蛋白的配体。因此,通常检测到可溶性蛋白和因此热稳定的配体结合靶蛋白的温度越高,配体结合靶蛋白的亲和性可能越高。因此,如果只需要检测高亲和性相互作用,则可以选择高于最终熔化温度的温度,例如高于最终熔化温度 3、4、5、6、7、8、9、10℃或更多℃。因此,优选地,选择的温度高于温度范围的最终熔化温度。可选地,如果需要鉴定结合靶蛋白的所有分子/配体,可以使用较低的温度,例如等于范围的初始熔化温度的温度。换句话说,筛选高亲和性相互作用时,步骤(a)的可区别温度将是引起或增强未结合的靶蛋白沉淀至程度比引起或增强配体结合的靶蛋白沉淀高得多的温度,例如至少高 30%,优选至少高 50%,更优选高至少 60、70 或 80%。

[0057] 可以通过在一系列的不同配体浓度或靶蛋白浓度下进行上述方法步骤来测定配体与靶蛋白的结合亲和性。在这样的方法中,步骤(a)中处理的样品将含有添加至其的已知量的靶蛋白或配体。可以绘制出剂量-反应曲线,并且因此确定配体的结合常数(即,一半靶蛋白结合配体时的配体或靶蛋白的浓度)。与源自纯样品的信息相比,在临床的不纯样品中获得的这样的结合信息将提供生理条件下配体与靶蛋白特征性结合的更准确的解释。通过研究身体不同器官中明显的结合常数,这样的信息对设定用于患者的给药方案或发现用于药物的治疗窗口具有有用的应用。因此,本发明的某些方面还包括进一步的步骤:

[0058] d)使用一个或多个(例如,2 个或多个,优选 3 个或 4 个或多个)不同浓度的配体或靶蛋白重复步骤 a) 至 c)。

[0059] 可以使用将样品加热至特定温度的任何热源来进行加热步骤。因此,在未纯化靶蛋白和测试分子(潜在配体)是液体形式的情况中,优选可以在 PCR 仪中进行加热步骤。然而,也可以使用培养箱、水浴等。若靶蛋白位于细胞集落中,优选使用培养箱来进行加热步骤。

[0060] 本发明还包括将一系列的温度施加于靶蛋白和测试分子,并且在每个温度下孵育后处理和分析靶蛋白,以产生每个靶蛋白和测试分子组合的沉淀曲线。因此,可以在任何温度范围下孵育靶蛋白和配体,只要使用能够引起或增强靶蛋白沉淀(即,不含结合的配体)的温度即可。因此,优选地,所用的温度范围包括在初始熔化温度下或在高于初始熔化温度下孵育。通过在整个温度范围下孵育未纯化靶蛋白和测试分子,测定结合配体时靶蛋白沉淀的温度是可能的。此外,如果不含配体的非纯化样品的对照经受相同温度的孵育,不使用靶蛋白熔化温度的现有技术知识鉴定结合蛋白样品的配体是可能的。优选地,可以在未纯化样品和测试分子/配体加热的同时对对照进行任何这样的加热。当研究超过一个配体时,通过使用沉淀曲线,确定对热稳定性具有最大影响的配体也是可能的。

[0061] 通常,若所用的温度与另一个温度相差约 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10℃,可以使用温度范围来产生沉淀曲线。因此,可以在 27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72 和 75℃中多个温度中的任一个温度下孵育靶蛋白和测试分子,只要这些温度之一等于或高于靶蛋白的初始熔化温度。若在温度范围内加热靶蛋白和测试分子,可以在 PCR 仪中进行,其中可以设定初始温度,然后在特定的时间量(例如,1、2、3、4 或 5 分钟)后增加所需的量。如之前讨论的,可以在每个温度下加热后,取出小的等份试样或量的样品(例如,1 或 2 μ l),以分析靶蛋白的可溶性。若未纯化靶蛋白存在于一个或多个细胞集落中,可以在每

次孵育后挑出一部分集落,例如,通过在集落顶部放置滤纸。

[0062] 为了实施本发明的方法,需要测定不含测试分子/配体的目的靶蛋白的熔化温度,从而可以检测在测试分子/配体存在情况下的任何热转移。因此,可以在进行本发明的方法之前测定靶蛋白的熔化温度,或在使用本发明方法的同时进行对照反应,其中将一系列的温度施加于对照以及靶蛋白和分子,例如如以上讨论的那样,以产生沉淀曲线。纯化样品中的许多靶蛋白的 T_m (50% 蛋白沉淀的温度)也是本领域已知的,尽管未纯化靶蛋白的 T_m 略有不同,但这些常常可以用作未纯化蛋白的熔化温度的指导。

[0063] 因此,“能够引起或增强靶蛋白沉淀的温度”指的是如上讨论的温度或温度范围,在该温度下,与较低温度下的靶蛋白相比,存在沉淀的增加,或换句话说,靶蛋白的解折叠或熔化。与通常发现患者体内的靶蛋白的温度(例如 37°C)相比,该温度通常是增加的温度。因此,所用的温度通常高于 37°C ,优选高于 40°C ,例如,高于 50°C 。

[0064] 因此,本发明中所用的温度优选引起靶蛋白沉淀增加至少 5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90 或 95%。蛋白沉淀的增加通常导致产生不溶性蛋白,并且因此换句话说,本发明中所用的温度可以引起存在的不溶性蛋白的含量增加,例如增加至少 5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90 或 95%。在本发明中,可以通过测定存在的可溶性靶蛋白的含量的降低或减少来测定沉淀的任何增强,例如减少至少 5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90 或 95%。例如,可以使用斑点-印迹(dot-blot)或 ELISA- 实验来测定这种降低,其中例如使用荧光标记的抗体的荧光信号的整合来定量结合抗体的量。

[0065] 本发明的方法还需要使用分离步骤(b)来分离可溶性蛋白和不溶性蛋白。分离步骤可以涉及能够分离可溶性蛋白和不溶性蛋白的任何分离方法。例如,如上所述,可以使用离心步骤,或在优选的实施方案中,可以使用过滤步骤。因此,过滤器可以用于分离可溶性蛋白和不溶性蛋白,其中可溶性蛋白将通过过滤器。标准滤膜可以用于过滤加热的样品,其中过滤器的孔径通常为 $0.015\text{ }\mu\text{m}$ 至 $12\text{ }\mu\text{m}$,优选 $0.35\text{ }\mu\text{m}$ 至 $1.2\text{ }\mu\text{m}$,更优选 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 至 $0.8\text{ }\mu\text{m}$ 。优选地,过滤器的孔径小于 $4.0\text{ }\mu\text{m}$,通常小于 $2.0\text{ }\mu\text{m}$,更优选低于 $1.0\text{ }\mu\text{m}$ 。在细胞(如细菌,例如大肠杆菌)中产生或表达靶蛋白时,最佳的孔径可以是 $0.1\text{--}1.5\text{ }\mu\text{m}$ 。如果靶蛋白来自真核细胞或样品,优选的孔径可以较大。应认识到,过滤器是作为具有特定的孔径制造和销售的,但制造方法可能偶尔会导致少数较小或较大的孔;因此所列举的大小指的是的直径,并且是给定过滤器的最常用的孔径大小。尽管参考了一系列可能的孔径,但任何单个过滤器的孔径将是一个指定的孔径,例如 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 。合适的过滤器是 Super 和 GH polypro(来自 Pall) 以及 Nucleopore(来自 Whatman)。

[0066] 应当认识到,来自真核生物和原核生物样品以及来自不同细胞类型的靶蛋白可能需要使用不同孔径的过滤器。选择的合适过滤器在本领域技术人员的能力范围之内。例如,可以通过使用一组用于所需细胞类型或样品的测试蛋白并使用不同孔径的过滤器研究其行为,来选择合适的孔径。

[0067] 如之前讨论的,如果靶蛋白存在于细胞内,在分离步骤之前可以进行细胞裂解步骤。当样品是细胞样品并且将靶蛋白添加到其中以测试配体存在时,也需要细胞裂解。对细胞集落进行本发明方法时,可以在那些集落上直接进行裂解,即,不需要挑选集落并将其在液体培养中生长(尽管这可以进行)。在这种情况下,优选分离步骤是过滤的一种。此外,如果对细胞集落上进行该方法,优选,将滤纸覆盖在集落上,以从半固体生长培养基或固体

生长培养基上引起集落。可选地,可以将过滤器置于生长培养基上,并且将细胞直接接种于过滤器上,然后可以简单地抬起在上面已经带有集落的过滤器。优选地,可以在裂解步骤之前,进行这种方式的集落的抬起。如上所示,可以对过滤器上的集落直接进行裂解。具有粘附的集落的过滤器可以用裂解缓冲液处理,或将其覆盖在用裂解缓冲液处理的其他膜 / 过滤器上。

[0068] 也可以对细胞的液体培养物进行过滤,例如,生长在多孔板(例如 96 孔板)中的液体培养物。

[0069] 在进行任何需要的裂解步骤后,进行过滤。然而,应当认识到,当考虑整个集落时,过滤和裂解可以同时进行,这是由于一些细胞在其他细胞之前经历裂解,因此可以在其他裂解之前或与其同时进行过滤。

[0070] 优选地,如果分离步骤是过滤,则通过过滤器的蛋白保持在固体支持体例如捕获膜上,以允许筛选 / 检测靶蛋白,然后允许鉴定含有结合配体的靶蛋白的样品。这样的捕获膜通常包含硝化纤维。然而,应当认识到,这是该方法中分离可溶性蛋白和不溶性蛋白的第一个过滤器。在优选的实施方案中,可以简单地允许蛋白通过过滤器,可能地作为毛细管作用的结果。在另一个实施方案中,对滤纸垂直地施加力,其中这样的力可以包括施加压力或真空。

[0071] 捕获膜可以从个体样品中固定可溶性蛋白,并且以这种方式,可以将这种方法多元化。因此,可以将靶蛋白在捕获膜上的位置与携带初始细胞集落的过滤器(如果该方法在细胞集落上进行)或样品斑点相比较。因此,根据过滤印迹,可以追溯和鉴定包含靶蛋白和结合配体的初始样品。为了帮助鉴定包含结合配体的靶蛋白的集落的方法,可以使用正对照。这些在最终集落过滤斑点上可以清楚地看到,并且能够使膜 / 印迹与初始集落正确定向。因此,在进行任何过滤步骤后,固体支持体如捕获膜允许迅速鉴定具有结合配体的靶蛋白的样品。

[0072] 在另一个实施方案中,可以将带有热处理样品的过滤器按样品朝下放置,然后将(硝化纤维)捕获膜放在过滤器上,将几层滤纸(和纸巾)放置在这上面。然后将力施加于该“三明治”的上面,并且理想地转移倒在底部周围的缓冲剂,以促进蛋白过滤并将蛋白转移至捕获膜上。

[0073] 在另一个实施方案中,将过滤器按样品朝上放置在捕获膜上,然后施加真空,以“拖动”蛋白通过滤纸并到捕获膜上。

[0074] 替代过滤和离心,可以进行可溶性蛋白的亲性和捕获。识别蛋白折叠结构的许多抗体和亲性和试剂将以高于未折叠和沉淀蛋白非常多的亲性和结合可溶性蛋白。此外,当较小标记物(如,结合金属钷合物的聚-组氨酸标记物)在沉淀蛋白中不太容易接近时,这些标记物的识别常常与可溶性相关。抗体、金属钷合物和其他亲性和试剂可以与磁珠或柱树脂相连,所述磁珠或柱树脂与热处理过的未纯化样品混合。当混合物对亲性和试剂不具有高亲性和时,可以在随后的步骤中,将这种混合物放入合适的阀中并且洗涤,以除去不溶性蛋白。随后可以使用例如 Bradford 技术、凝胶电泳、Elisa 或表面等离子体共振检测,来测定结合亲性和试剂的蛋白的量。

[0075] 根据本发明的方法,可以分析不溶性级分和可溶性级分两者之一或两者是否存在靶蛋白。在分析之前,优选将不溶性级分溶解,例如按照实施例 3 中所述的,在应用分离凝胶之前,将沉淀的蛋白溶解于加样缓冲液中。优选地,本发明的方法包括步骤(c):分析可

溶性蛋白是否存在靶蛋白。因此,优选分析分离步骤后获得的可溶性蛋白是否存在靶蛋白。因此,如果进行了离心分离步骤,可以分析上清液是否存在靶蛋白,并且在进行了过滤分离步骤的情况下,分析通过过滤器的蛋白(即,滤液)是否存在靶蛋白在。

[0076] 可以通过各种不同的方法来检测靶蛋白。因此,可以使用本领域公知的各种标记物来检测靶蛋白,标记物例如,组氨酸标记物、VS 标记物、T7 标记物、FLAG 标记物或提供特异性抗体的任何短蛋白序列、硫氧还蛋白和麦芽糖结合蛋白。标记物的长度优选为 1-100 个氨基酸,优选 1-70、2-50、1-30 或 1-20 个氨基酸。更优选地,标记物的长度可以是 3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸。然而,不是基于与靶蛋白融合的标记物、肽、多肽或蛋白的任何酶活性来检测靶蛋白。因此,例如,如果酶活性导致可检测信号产生,使用与靶蛋白融合的任何这样的标记物或蛋白表现的酶活性没有检测到靶蛋白。例如,具有酶活性的融合标记物,如绿色荧光蛋白、辣根过氧化物酶、荧光素酶和谷胱甘肽-S-转移酶,没有用于本发明中来检测靶蛋白。因此,尽管将任何标记物/蛋白与靶蛋白融合是可能的,但使用任何这样的标记物或蛋白具有的酶活性没有检测到靶蛋白。因此,在 GFP 标记物的情况中,通过酶反应产生了绿色荧光,并且对于使用这样的反应来检测靶蛋白,因此在本发明中被明确排除。因此,排除了通过从 GFP 标记物产生的荧光检测靶蛋白,因为这样的荧光是标记物具有的酶活性的结果。此外,在优选的实施方案中,本发明的靶蛋白没有与具有酶活性的报告蛋白融合。在特别优选的实施方案中,靶蛋白没有与 GFP 融合。因此,换句话说,优选地与靶蛋白融合的任何标记物是非蛋白标记物。

[0077] 对于待与靶蛋白融合的标记物,通常将其与靶蛋白转录和翻译成单个分子。因此,结合靶蛋白且可以用 HRP 等标记的抗体并不被认为与靶蛋白融合。在这样的情况中,可以使用 HRP 标记物来检测靶蛋白,因为这不是具有靶蛋白的融合分子的一部分。

[0078] 因此,可以通过将这类蛋白作为融合蛋白表达,将标记物与靶蛋白连接。因此,优选短的标记物以允许靶蛋白维持类天然构像。此外,尽管也可以使用 N-端 His 标记物,但优选 C-端标记物。应当认识到,只可以使用包括使用与靶蛋白融合的标记物的检测步骤,其中靶蛋白源自重组表达系统。因此,当靶蛋白例如获自患者时,通常不使用这种检测方法。

[0079] 可以进一步通过充当酶反应方法中的底物的融合标记物来检测靶蛋白,在这点上,His 标记物特别合适。例如,INDIA His Probe-HRP (Pierre, Rockford IL, USA) 可以用于检测,在所述检测中,靶蛋白是聚-组氨酸标记的或是富含组氨酸的,并且通过结合 His 标记物的辣根过氧化物酶的镍激活衍生物来检测靶蛋白。还可以基于它们自身的酶活性来检测靶蛋白。

[0080] 可选地,检测可以基于靶蛋白和检测部分之间的或与靶蛋白融合的标记物和检测部分之间的亲和性结合,所述检测部分例如为抗体、抗体片段或亲和体(非基于 Ab 的蛋白结合伴侣)。优选地,可以使用针对标记物或直接针对靶蛋白(自身表达或作为融合体表达)的单克隆抗体或多克隆抗体来检测靶蛋白。针对靶蛋白的抗体通常用于检测来自患者样品的靶蛋白。这样的方法允许快速且可靠地分析多种靶蛋白,包括其自身不具有催化活性的靶蛋白。还可以使用半定量质谱(MS)来检测靶蛋白。在使用轨道仪器(orbitrap instrument)的傅立叶变换离子回旋共振实验中,通常在来自裂解产物的样品中可以同时检测 1000-2000 个蛋白。在优选的实施方案中,细胞的温度扫描、之后的溶解、过滤以及最

后一个步骤中使用质谱检测所有剩余的可溶性蛋白,在扫描的每个温度下,允许平行测定许多蛋白的沉淀曲线。全局蛋白质组溶解曲线也可以用于检测药物的所谓脱靶效应,即监测细胞中的哪些蛋白质与药物结合。当探究用于药物的药物靶或药物靶未知的药物候选物时,也可以使用这种全局蛋白质组溶解曲线分析。例如,针对细胞的化合物文库筛选可以鉴定在这些细胞中产生优选表型的化合物,表明化合物影响细胞中的作用过程,化合物可以用作某些疾病的药物靶。然而,鉴定药物候选物与细胞中的哪一种或那些蛋白相互作用通常是非常困难的。对于可以以足够水平用 MS 检测的蛋白,用于热转移变化的全局蛋白质组溶解曲线分析允许进行这种鉴定。

[0081] 可以在重组表达系统中研究与靶蛋白结合的分子 / 配体。因此,可以将靶蛋白的基因 / cDNA / 编码区转化或转染至载体 / 构建体的表达系统中,所述载体 / 构建体如质粒、病毒载体、粘粒和 YACS。这样的载体可以含有调控序列和本领域公知的其他元件。例如,可以将基因 / cDNA / 编码区置于载体中启动子的控制下。所用的启动子通常能够在特定宿主内表达靶蛋白。在具体的实施方案中,所用的启动子是诱导型的,即可以控制靶蛋白的表达。这样的诱导型启动子 / 系统包括 lac,其中通过添加 IPTG 和 tet 开 / 关来控制表达的诱导,其中通过四环素和本领域已知的其他物质的存在 / 缺乏来控制表达的诱导。

[0082] 如之前所述的,本发明的方法可以用于筛选小分子文库中将结合靶蛋白的那些小分子。在优选的实施方案中,使用多孔板来进行这种筛选,其中将文库的每种化合物添加至细胞或细胞裂解产物的等份试样中。可选地,可以筛选突变靶蛋白的文库,以确定显示出特定配体的结合改变的突变靶蛋白。例如,可以鉴定出比野生型靶蛋白具有与配体更近或更紧的联系的突变靶蛋白。如果正评价突变靶蛋白,希望测定不含配体的蛋白的稳定性,以确定稳定作用是否是由于配体相互作用引起的或是由于突变体自身更稳定引起的,即突变对突变体蛋白具有稳定作用。如果配体是另一种蛋白,稳定性测定可以替代地在这种未突变蛋白上进行,其中可以选择稳定未突变蛋白的突变蛋白变体。例如,这将可以用于使结合蛋白(即配体)成熟,所述结合蛋白例如抗体、FAB- 片段、单链抗体或亲和体,其中将随机突变添加至结合蛋白,通过测定未突变蛋白提高的稳定作用,来检测具有明显提高的结合的变体。用这样的方法,可以从较低亲和性结合体(binder)中选择出较高亲和性结合体。当结合蛋白可以用作靶向例如特异性受体或细胞因子的蛋白药物时,该方法可以用于提高这些结合体对蛋白药物的药物靶的亲和性。

[0083] 许多不同的诱变方法是本领域已知的,其可以用于形成靶蛋白的变体或靶蛋白变体的文库。可能的步骤包括截短序列、使用外切核酸酶、使用例如易错 PCR 引入随机位点突变、引入随机盒式诱变或定点诱变。对于截短,去除的核苷酸的数量可以小于 2000,优选小于 1000,更优选小于 800。引入用于诱变的随机盒优选使用含有少于 100 个核苷酸的盒。

[0084] 可以对编码靶蛋白的几个核酸序列的拷贝进行诱变,使得可以筛选一组不同的突变序列,因此提高了鉴定具有所需配体结合特性的靶蛋白的概率。在其中根据现有技术知识不知道哪个具体突变可以产生例如更紧密结合配体的变体(即,对配体具有更高的亲和性)的情况下,尤其优选使用随机诱变。

[0085] 可以形成蛋白文库,其中编码区已经随机诱变并且其中已经通过除去碱基(erase-a-base)或随机启动反应产生了不同长度的构建体。

[0086] 因此,本发明的方法可以用于检测对配体具有改变的并且优选具有提高的或较高

的亲性和结合的靶蛋白变体。另外,本发明的方法可以用于确定细胞培养物或患者样品中的靶蛋白是否将与特定的测试分子(例如,药物)相互作用。因此,该方法的优选用途是,确定药物研发循环过程中细胞培养物中的药物-蛋白相互作用,以证实药物在该细胞类型中结合靶蛋白。同样,该方法可以用于监控药物与不期望的蛋白的结合,所谓的脱靶结合。该方法的另一种优选用途是确定患者样品(例如,组织、血液、淋巴等)中的药物-蛋白相互作用,以提供特定的药物治疗对该患者是否有效的指示。如果待检测组织样品,那么本发明的方法还可以包括从组织提取靶蛋白的步骤。另外地或可选地,可以使用裂解步骤。合适的裂解条件如上所述。

[0087] 一旦使用本发明的方法检测到未纯化样品中靶蛋白和配体相互作用,则希望鉴定靶蛋白的序列或结构,特别是如果已经研究了靶蛋白变体。可选地,如上所讨论的,所获得的结果可以用于确定药物治疗在患者中是否可能有效,并且因此调整提供给患者的治疗。

[0088] 如例如实施例 4,5,6 和 7 中所示,高亲和性药物与确定的药物靶的结合通常导致靶蛋白的稳定化,其如通过熔化温度正向转移至更高温度所支持的。然而,还存在配体结合靶蛋白时,引起熔化温度向较低温度的负向转移,即,去稳定化。例如,对于与靶蛋白形成共价-型键(包括一些金属)的配体,可以看到负向转移。认为在一些情况中,共价键的结合能量以及通过形成这种键产生的能量上不利的键可以促进蛋白去稳定化。例如,Ericsson 等(Ericsson et al Anal Biochem 357 (2006) pp289-298)揭示,含有重金属离子的化合物,如氯化镧六水合物,能够使多种细菌蛋白在结合时去稳定。

[0089] 因此,在另一方面中,本发明提供了确定未纯化样品是否含有结合目的配体的靶蛋白的方法,其中所述配体不是融合蛋白,该方法包括以下步骤:

[0090] a) 将所述未纯化样品暴露于能够引起或增强结合所述配体的靶蛋白的沉淀至高于能够引起或增强未结合的靶蛋白沉淀程度的温度;

[0091] b) 处理步骤 a) 的产物以分离可溶性蛋白和不溶性蛋白;以及

[0092] c) 分析步骤 b) 的可溶性蛋白级分和不溶性蛋白级分两者之一或两者是否存在靶蛋白,其中不是基于与其融合的标记物、肽、多肽或蛋白的酶活性来检测所述靶蛋白。

[0093] 本发明的又一个方面提供了确定未纯化蛋白是否含有结合目的配体的靶蛋白的方法,该方法包括以下步骤:

[0094] a) 将所述未纯化样品暴露于能够引起或增强结合所述配体的靶蛋白的沉淀至高于能够引起或增强未结合的靶蛋白沉淀的程度的温度;

[0095] b) 处理步骤 a) 的产物以分离可溶性蛋白和不溶性蛋白;以及

[0096] c) 分析步骤 b) 的可溶性蛋白级分是否存在靶蛋白,其中不是基于与其融合的标记物、肽、多肽或蛋白的酶活性来检测所述靶蛋白。

[0097] 在以上方面中,将未纯化样品暴露于能够引起或增强结合配体的靶蛋白的沉淀,是由于结合去稳定的配体的靶蛋白与未结合的靶蛋白相比,将在较低温度下沉淀。因此,在步骤 a) 中所述的可区别温度下,预期将发现不溶性蛋白级分中的结合蛋白越多,可溶性蛋白级分中的未结合蛋白越多。

[0098] 对通过配体结合引起的稳定作用所列出的本发明的方法和优选实施方案的各个特征的讨论加以必要的修正,同样适用于其中配体结合引起去稳定的本发明的这些方面。

[0099] 在一些情况中,细胞裂解产物中可能存在生理基质或辅因子,如 ATP 或 NADP,甚至

在将配体加入样品之前,这些物质就结合靶蛋白。与细胞裂解产物中不存在生理配体时的情况相比,将目的配体加入这样的裂解产物中时,熔解曲线朝向较高温度的转移通常较小。在极端的情况中,非常低的亲和性的配体(通常产生小的正向热转移)如早期药物前导候选物,在非常高的浓度下可以胜过较强的生理配体(通常产生大的正向热转移)如 NADP。在这样的情况中,当明显的转移是蛋白的两种配体结合形式的转移之间的差异时,生理配体的替代可能会导致负向转移,即朝向较低熔化温度的转移。在这样的情况下,由于随着靶蛋白的熔化温度的降低可以检测到这种负向转移,因此在此应用与引起去稳定的配体相关的本发明的各个方面。

[0100] 本发明还包括用于本发明方法中的仪器,其中所述仪器包括加热装置、用于分离可溶性蛋白和不溶性蛋白的装置以及用于分析蛋白中靶蛋白存在的装置,例如用于分析合适的蛋白。

[0101] 换句话说,包括了适用于实施本发明方法的仪器,其包括加热装置、用于分离可溶性蛋白和不溶性蛋白的装置以及用于分析蛋白(例如,可溶性蛋白)中靶蛋白存在的装置。

[0102] 此外,本发明涉及一种仪器在本发明方法中的用途,所述仪器包括加热装置、用于分离可溶性蛋白和不溶性蛋白的装置以及用于分析蛋白(例如,可溶性蛋白)中靶蛋白存在的装置。

[0103] 排列该仪器,使得样品首先接触加热装置,然后分离装置,最后是分析装置。

[0104] 如本文中所用的术语“加热装置”指的是能够将样品加热至特定温度的任何热源。因此,加热装置可以由热板组成或包括热板,其可以被设定以将样品加热至特定的温度,例如可以使用 PCR 仪器以这种方式加热样品。此外,加热装置可以包括培养箱或水浴。

[0105] 术语“用于分离可溶性蛋白和不溶性蛋白的装置”指的是能够分离可溶性蛋白和不溶性蛋白的任何已知装置。因此,该装置可以包括滤纸,其中可溶性蛋白将通过滤纸。可选地,该装置可以包括能够将离心力施加于加热样品上的装置,例如离心机。此外,该装置可以包括能够亲和性捕获可溶性蛋白的装置。这样的装置可以包括抗体或其他亲和性试剂,其能够识别可溶性蛋白的折叠结构。抗体、金属螯合物或其他亲和性试剂可以连接至磁珠或柱树脂。可以通过洗涤除去不溶性蛋白。

[0106] 如本文中所用的术语“用于分析蛋白(例如,可溶性蛋白)中靶蛋白存在的装置”指的是能够检测靶蛋白的任何装置。因此,这可以指的是质谱仪,但更优选可以指例如检测用结合靶蛋白的 HRP 或荧光分子标记的抗体所需要的装置(即,硝化纤维素膜或荧光计)。此外,用于分析蛋白中靶蛋白存在的装置可以包括用于结合靶蛋白的亲和性柱。用于分析蛋白中靶蛋白存在的装置可以进一步包括检测靶蛋白需要的任一种试剂,或可选地,这些可以分开提供。

[0107] 最后,本发明包括包含抗体和 / 或非蛋白标记物的试剂盒在本发明方法中的用途。

附图说明

[0108] 将在以下非限制性实例中进一步描述本发明,其中:

[0109] 图1显示了在暴露于一系列不同温度后,对在大肠杆菌样品中表达的三种不同蛋白中可溶性蛋白存在的评估。已知的纯化蛋白的熔化温度显示于图的右侧。

[0110] 图2显示了添加配体渥曼青霉素和 3-[4-(4-吗啉基)噻吩并[3,2-d]嘧啶-2-基]-苯酚(化合物 15e)(+)后,评估可溶性 PIK3C3-蛋白的存在。还显示了不含添加的配体的参照样品(-)。可以在含有配体的样品中看到热转移。含配体的蛋白的泳道比不含配体的蛋白的热稳定更高。

[0111] 图3显示了依赖激酶-2(CDK-2)(a)和蛋白激酶 C(PKC)(b)的靶细胞周期蛋白的蛋白质印迹膜。黑色条带表示直至特定温度都检测到可溶性蛋白的存在,并且随着温度提高变得越来越淡,直至最后消失(从左至右)。将来自最高温度的含有沉淀蛋白的球状物溶解于加样缓冲液中,并且加样于凝胶的最后一条泳道,以显示出该级分中靶蛋白的存在。

[0112] 图4显示了暴露于一系列不同温度后,哺乳动物细胞提取物中存在的可溶性胸苷酸合酶(TS)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、CDK-2或PKC蛋白的水平。X轴表示暴露的温度(°C),而Y轴表示蛋白质印迹(Western blots)的积分强度。

[0113] 图5显示了添加抑制剂氨甲喋呤后来自可溶性 DHFR 蛋白的人细胞提取物的热熔解曲线(◆)。还显示了不含抑制剂的参照样品(■)。X轴表示暴露的温度(°C),而Y轴表示蛋白质印迹的积分强度。

[0114] 图6显示了添加抑制剂雷替曲塞(raltitrexed)后来自可溶性 TS 蛋白的人细胞提取物的热熔解曲线(+)。还显示了不含抑制剂的参照样品(-)。X轴表示暴露的温度(°C),而Y轴表示蛋白质印迹的积分强度。

[0115] 图7显示了添加来自牛肝提取物(a)或来自人细胞提取物(b)的配体 TNP-470 后可溶性甲硫氨酸-氨基肽酶-2的热熔解曲线(×)。还显示了不含配体的参照样品(○)。X轴表示暴露的温度(°C),而Y轴表示蛋白质印迹的积分强度。

[0116] 图8显示了牛肝提取物用 TNP-470 处理的剂量反应曲线。X轴表示添加的 TNP-470 的浓度,而Y轴表示蛋白质印迹的积分强度。

[0117] 图9显示了通过用含有靶蛋白的细胞裂解产物强化(spiking)形成的 TNP-470 的剂量反应曲线。X轴表示添加的 TNP-470 的浓度,而Y轴表示蛋白质印迹的积分强度。

[0118] 图10显示了添加配体 SB590885 后可溶性 V600E 变体 B-raf 蛋白(◆)或野生型 B-raf 蛋白(▲)的热熔解曲线。还显示不含配体的参照样品,用于 V600E 变体 B-raf 蛋白(■)和野生型 B-raf 蛋白(×)。X轴表示暴露的温度(°C),而Y轴表示蛋白质印迹的积分强度。

具体实施方式

[0119] 实施例 1- 四种测试蛋白熔化温度的测定

[0120] 为了测定细胞中每种蛋白的熔化温度,使用了具有 N-端 His-标记物的表达载体中的三种人可溶性蛋白表达构建体。这通过将含蛋白细胞暴露于一组渐增的温度,并且在每个温度步骤后,将细胞点在浸没在裂解缓冲剂中的“裂解/过滤三明治”上来完成。通过使用这种裂解/过滤步骤,可以在捕获硝化纤维素膜上检测到呈暗色斑点的可溶性蛋白(直至蛋白的特定熔化温度),而沉淀的蛋白(即,高于其特定的熔化温度)不能通过滤膜,并且因此未检测到。

[0121] 材料和方法

[0122] 在 96-孔深孔板(Porvair Plc., UK)中,通过用来自甘油储液的冷冻大肠杆菌接

种 1ml 含有 50 μ g/ml 卡那霉素(Sigma-Aldrich Co., USA) 和 35 μ g/ml 氯霉素(Duchefa Biochemie, 荷兰) 的 Luria-Bertani 肉汤(LB) (Formedium Ltd., UK), 来开始过量表达三种目的蛋白的大肠杆菌细胞的液体培养。将培养物在 700rpm 和 +37 $^{\circ}$ C 下在振荡板上孵育过夜。第二天, 将 100 μ l 的每种过夜培养物转移至含有 900 μ l LB、50 μ g/ml 卡那霉素和 35 μ g/ml 氯霉素的新 96-孔深孔板的相应孔中。将培养物在 700rpm 和 +37 $^{\circ}$ C 下在振荡板上孵育。1.5 小时后, 将温度降至 +18 $^{\circ}$ C (30min), 并且通过加入 100mM IPTG (Anatrace/Affymetrix Co., USA) 来诱导蛋白表达。将细胞在 700rpm 和 +18 $^{\circ}$ C 下在振荡板上生长过夜。第二天通过在 1500g 下离心 2min(分钟) 使细胞成沉淀物, 并且通过吸取, 从每个孔中取出 900 μ l 上清液, 并丢弃。将细胞沉淀物重悬浮于剩余的 100 μ l 培养基中(即, 浓缩 10 倍)。将细胞悬浮液转移至 8-管 PCR 条带(Applied Biosystems, UK) 上, 并且置于热循环仪中。使用以下的温度设置: 具有 3 $^{\circ}$ C 增量的 +27 $^{\circ}$ C 至 +75 $^{\circ}$ C, 并且在每个步骤保持 3min。在每个温度保持 3min 后, 暂停热循环仪, 并且将 2 μ l 的每种细胞悬浮液快速地点在由 0.45 μ m 孔径的 Durapore 滤膜(Millipore Inc., USA) (上层)、Protran BA45 硝化纤维素膜(Schleicher & Schuell, 德国) (中层) 和 3MM Whatman 纸(VWR Int'l Ltd., UK) 组成的“裂解/过滤三明治”上。将“裂解/过滤三明治”浸没在天然裂解缓冲液(20mM Tris-HCl pH8.0, 100mM NaCl, 10mg/ml Lysozyme(Sigma-Aldrich Co., USA), 25U/ μ l Benzonase 核酸酶(Novagen, 丹麦) 和完全无 EDTA 蛋白酶抑制剂片(Roche, 瑞士)) 中。将细胞点在“裂解/过滤三明治”上后, 在每个温度步骤重复上述过程。点完最后一个细胞等份试样点后, 将“裂解/过滤三明治”在室温下孵育 15min, 使得细胞完全裂解, 并且液体细胞材料通过滤膜转移。此后将“裂解/过滤三明治”在 -80 $^{\circ}$ C 下冷冻 10min, 然后在 +37 $^{\circ}$ C 解冻 10min。将该冷冻/解冻过程重复 3 次。在含 1%BSA (VWR Int'l Ltd., UK) 的 TBST 缓冲液(20mM Tris-HCl pH 7.5, 500mM NaCl, 0.05%Tween-20) 中阻塞硝化纤维素膜 1 小时。然后使用一定的搅拌(台式振荡器), 将印迹在 TBST 中洗涤 3 次, 持续 10min。用 TBST 中 1:5000 稀释的 IDNIA HisProbe-HRP (Thermo Scientific, USA) 培养膜 1 小时。然后将印迹在 TBST 中洗涤 3 次, 持续 10min。使用持久性化学发光底物(SuperSignal West Dura(Pierce) Extended Duration Substrate(Thermo Scientific, USA)), 对印迹上的每个斑点中的靶蛋白表达水平进行化学发光检测。使用 CCD 相机(BioRad Laboratories, Inc., USA) 检测和记录化学发光。

[0123] 结果

[0124] 检测到指示存在可溶性蛋白的暗色斑点, 直至特定的温度; 在较高温度下, 它们变得越来越淡并且最终消失(图 1)。与之前三种 IMAC-纯化蛋白的熔化温度的数据(右图)比较, 显示出两组结果之间良好的关联性。由于蛋白在细胞和纯化缓冲剂中具有不同的溶剂环境, 因此并不期望熔点是精确的。该实验表明这些蛋白在细胞环境中具有截然不同的熔点, 并且通过监控蛋白的沉淀可以容易地检测这些熔点。

[0125] 实施例 2- 结合配体后熔化温度提高的检测

[0126] 用具有 N-端 His-标记物的表达载体中的人可溶性 PIK3C3 蛋白的表达构建体研究添加并结合两种 PIK3C3 特异性抑制剂(渥曼青霉素和化合物 15e) 中的任一种后 PIK3C3 构建体熔化温度可能的提高。用或不用两种抑制剂中的一种处理后, 将表达 PIK3C3 构建体的细胞暴露于一组递增的温度, 并且在每个温度步骤后, 将表达蛋白的细胞点在浸没于裂

解缓冲液中的“裂解 / 过滤三明治”上。通过在“裂解 / 过滤三明治”上使用这种裂解 / 过滤步骤,可以在捕获硝化纤维素膜上检测到呈暗色斑点的可溶性蛋白(直至构建体的特定熔化温度),而沉淀蛋白(即,高于其特定熔化温度)并不能通过滤膜,因此不能被检测到。将用化合物 15e 或渥曼青霉素处理的构建体的熔化温度与未处理样品的那些相比较。

[0127] 材料和方法

[0128] 在 96-孔深孔板(Porvair Plc., UK)中,通过用来自甘油储液的冷冻大肠杆菌接种 1ml 含有 50 μ g/ml 卡那霉素(Sigma-Aldrich Co., USA)和 35 μ g/ml 氯霉素(Duchefa Biochemie, 荷兰)的 Luria-Bertani 肉汤(LB) (Formedium Ltd., UK),来开始过量表达 PIK3C3 构建体的大肠杆菌细胞的液体培养。将培养物在 700rpm 和 +37°C 下在振荡板上孵育过夜。第二天,将 100 μ l 的每种过夜培养物转移至含有 900 μ l LB、50 μ g/ml 卡那霉素和 35 μ g/ml 氯霉素的新 96-孔深孔板的相应孔中。将培养物在 700rpm 和 +37°C 下在振荡板上孵育。1.5 小时后,将温度降至 +18°C (30min),并且通过加入 100mM IPTG (Anatrace/Affymetrix Co., USA)来诱导蛋白表达。将细胞在 700rpm 和 +18°C 下在振荡板上生长过夜。第二天通过在 1500g 下离心 2min 使细胞成沉淀物,并且通过吸取,从每个孔中取出 900 μ l 上清液并丢弃。将细胞沉淀物重悬浮于剩余的 100 μ l 培养基中(即,浓缩 10 倍)。对于每个实验,加入溶解于 DMSO (Sigma-Aldrich Co., USA)中的 1mM PIK3C3 抑制剂化合物 15e (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)或 500 μ M 渥曼青霉素(Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)或等体积(各自为 1 μ l 和 0.5 μ l)的纯 DMSO,并且将样品在室温下温和搅拌 30min。将细胞悬浮液转移至 8-管 PCR 条带(Applied Biosystems, UK)上,并且置于热循环仪中。使用以下的温度设置:具有 3°C 增量的 +27°C → +75°C,并且在每个步骤保持 3min。在每个温度保持 3min 后,暂停热循环仪,并且将 2 μ l 的每种细胞悬浮液快速地点在由 0.45 μ m 孔径的 Durapore 滤膜(Millipore Inc., USA)(上层)、Protran BA45 硝化纤维素膜(Schleicher & Schuell, 德国)(中层)和 3MM Whatman 纸(VWR Int'l Ltd., UK)组成的“裂解 / 过滤三明治”上。将“裂解 / 过滤三明治”浸没在天然裂解缓冲液(20mM Tris-HCl pH8.0, 100mM NaCl, 10mg/ml Lysozyme (Sigma-Aldrich Co., USA), 25U/ μ l Benzonase 核酸酶(Novagen, 丹麦)和完全无 EDTA 蛋白酶抑制剂片(Roche, 瑞士))中。将细胞点在“裂解 / 过滤三明治”上后,在每个温度步骤重复上述过程。点完最后一个细胞等份试样点后,将“裂解 / 过滤三明治”在室温下孵育 15min,使得细胞完全裂解,并且液体细胞材料通过滤膜转移。此后将“裂解 / 过滤三明治”在 -80°C 下冷冻 10min,然后在 +37°C 解冻 10min。将该冷冻 / 解冻过程重复 3 次。在含 1%BSA (VWR Int'l Ltd., UK)的 TBST 缓冲液(20mM Tris-HCl pH7.5, 500mM NaCl, 0.05%Tween-20)中阻塞硝化纤维素膜 1 小时。然后使用一定的搅拌(台式振荡器),将印迹在 TBST 中洗涤 3 次,持续 10min。用 TBST 中 1:5000 稀释的 IDNIA HisProbe-HRP (Thermo Scientific, USA)培养膜 1 小时。然后将印迹在 TBST 中洗涤 3 次,持续 10min。使用持久性化学发光底物(SuperSignal West Dura(Pierce)Extended Duration Substrate(Thermo Scientific, USA)),对印迹上的每个斑点中的靶蛋白表达水平进行化学发光检测。使用 CCD 相机(BioRad Laboratories, Inc., USA)检测和记录化学发光。

[0129] 结果

[0130] 检测到指示存在可溶性蛋白的暗色斑点,直至超过不再看见暗色斑点的特定温度

(图 2)。加入化合物 15e 导致熔化温度从大约 +55℃ 提高至 +58℃, 而加入渥曼青霉素导致熔化温度在大约 +55℃ 至 +65℃ 之间提高。与之前添加和未添加化合物 15e 或渥曼青霉素的 IMAC- 纯化的 PIK3C3 构建体的熔化温度的数据比较, 显示出两组结果之间良好的关联性。该实验表明, 在加入和结合两种 PIK3C3 抑制剂渥曼青霉素和化合物 15e 中的任一种后, 检测细胞环境中 PIK3C3 构建体熔化温度的提高是可能的。

[0131] 实施例 3- 哺乳动物细胞系统中四种测试蛋白的熔化温度的测定

[0132] 为了测定四种蛋白的熔化温度, 从孵育的哺乳动物细胞制得裂解产物, 并且将其暴露于一组递增的温度。在温度步骤后, 除去沉淀的蛋白, 只留下待检测的可溶性蛋白(即, 直至蛋白的特异性熔化温度)。

[0133] 材料和方法

[0134] 从孵育的人腺癌细胞(A549)制备裂解产物。在冰上在低渗缓冲液中并且用均质破坏细胞。将悬浮液冻融多次, 并且在完全裂解后通过离心使所有不溶性聚集物和细胞碎片成沉淀物。将含有视觉上澄清的细胞质蛋白级分的上清液等分至 8- 条带 PCR 管中, 并且经受一组递增的温度。加热三分钟后, 将样品冷却并且通过离心使沉淀的蛋白形成粒状沉淀。将含有可溶性蛋白的上清液加样于分离凝胶上。此外, 将来自最高温度的含有沉淀蛋白的粒状沉淀溶解于加样缓冲液中, 并且加样于凝胶的最后泳道, 以显示该级分中这种蛋白的存在。将凝胶点在蛋白质印迹硝化纤维素膜上。将膜洗涤, 并且用阻断剂阻断, 用对抗二氢叶酸还原酶(DHFR)、胸苷酸合成酶(TS)、依赖细胞周期素激酶-2(CDK-2)和蛋白激酶 C(PKC)的一抗探测。结合二抗, 并且通过化学发光检测到来自结合的二抗的信号, 并且用 CCD 相机记录。测定强度并且绘制曲线。

[0135] 结果

[0136] 检测到指示存在可溶性蛋白的暗色条带, 直至特定的温度; 在较高温度下, 它们变得越来越淡并且最终消失(图 3)。该实验表明这些蛋白在细胞环境中具有截然不同的熔化温度和表现, 并且通过监控蛋白的沉淀可以容易地检测出这些熔点(图 4)。

[0137] 实施例 4- 结合哺乳动物细胞中的配体后熔化温度的提高的检测

[0138] 为了研究加入和结合抑制剂后可能的熔化温度的提高或降低, 在孵育的哺乳动物细胞中研究了蛋白二氢叶酸还原酶(DHFR)和胸苷酸合酶(TS)。

[0139] 用两种抑制剂雷替曲塞或氨甲喋呤之一处理来自培养的腺癌细胞的裂解产物, 其中对 DHFR 分析了氨甲喋呤可能的稳定或去稳定作用, 对 TS 分析了雷替曲塞。用或不用抑制剂处理后, 使样品经受加热步骤, 接着除去沉淀的蛋白。将处理过的样品的熔化温度与未处理样品的那些相比较。

[0140] 材料和方法

[0141] 从培养的人腺癌细胞(A549)制备裂解产物。在冰上在低渗缓冲液中并且用均质破坏细胞。将悬浮液冻融多次, 并且在完全裂解后通过离心使所有不溶性聚集物和细胞碎片形成粒状沉淀。将含有视觉上澄清的细胞质蛋白级分的上清液分成四等份, 两份补充其对应的配体, 其中一份作为相应的阴性对照。添加的配体的浓度为所述的对于药物 / 靶相互作用的 IC₅₀ 值的 10 倍。将每种配体溶解于 DMSO 中, 且将终浓度设为 1%。

[0142] 孵育后, 将每个等份分入 8- 管 PCR 条带中, 并且对于 DHFR, 经受从 +36℃ 至 60℃ 的一系列温度范围, 对于 TS, 经受从 +51℃ 至 +69℃ 的一系列温度范围(由实施例 3 的熔解曲

线来指导)。加热三分钟后,通过离心使沉淀的蛋白形成粒状沉淀。将所得到的上清液加样于分离凝胶上,并且将其转移至蛋白质印迹硝化纤维素膜上。将膜阻断后,用一抗和二抗检测。通过化学发光检测来自结合的二抗的信号,并用 CCD 相机记录。将强度绘制曲线,以观察配体处理后熔化温度的变化。

[0143] 结果

[0144] 添加氨甲喋呤或雷替曲塞导致熔化温度提高(图 5 和 6)。该实验表明,添加和结合各自的抑制剂氨甲喋呤和雷替曲塞后,检测细胞环境中的 DHFR 或 TS 的熔化温度的提高是可能的。

[0145] 实施例 5- 在不同的细胞系统和生物体中研究的细胞热转移,以确定结合配体时熔化温度的变化

[0146] 为了研究配体结合在不同系统中的作用,测定将配体 TNP-470 (一种抗血管生成剂)加入蛋白蛋氨酸-氨基肽酶-2 时可能的稳定或去稳定作用。对来自两个不同系统的细胞进行研究:a) 用 TNP-470 孵育的完整的牛肝活组织切片和 b) 用 TNP-470 孵育的人培养细胞。将所有样品与没有暴露于 TNP-470 的参照样品进行比较。用或不用抑制剂处理后,制备样品并且使其经受一系列的递增温度。通过离心使沉淀的蛋白级分形成粒状沉淀,并通过蛋白质印迹在凝胶上分析每个温度步骤的上清液。将用 TNP-470 处理的蛋白的熔化温度与未处理样品的熔化温度进行比较。

[0147] 材料和方法

[0148] 通过在冰上在低渗缓冲液中并用均质破坏,制备了培养的人细胞(K562)和牛肝样品的裂解产物。将上清液冻融多次,并且完全裂解后,通过离心使所有不溶性聚集物和细胞碎片形成粒状沉淀。将每种细胞类型的裂解产物分成两等份,其中一份补充 TNP-470 (溶解于纯的 DMSO 中),而另一份补充等体积的纯 DMSO。在室温孵育后,将样品在 8-管 PCR 条带中分成 50 微升的级分,并且随后置于 Verti 热循环仪中。

[0149] 接着,将 +56℃ 至 +88℃ 之间的一系列温度施加于不同的样品,使用 2 或 4℃ 增量,并且在每个步骤保持 3 分钟。加热后,将样品冷却,并且通过离心使沉淀蛋白形成粒状沉淀。取出 20 微升的每种上清液,补充凝胶加样缓冲液并过加热完全变性。将样品加样于分离凝胶上,充分跑胶时间后,将其点在硝化纤维素膜上。将膜洗涤,并且用阻断剂阻断,用一抗和二抗检测。通过化学发光检测来自结合的二抗的信号,并用 CCD 相机记录。将强度绘制曲线,以观察配体处理后熔化温度的变化。

[0150] 结果

[0151] 蛋白质印迹膜上的深色条带表明,上清液中仍然存在可溶性蛋白。检测可溶性蛋白,直至超过其它不再可见的特定温度。添加 TNP-470 导致人细胞裂解产物的熔化温度从 62℃ 变化为 80℃ (变化 18℃),而导致牛肝裂解产物从 66℃ 变化为 80℃ (变化 14℃) (图 7)。

[0152] 实施例 6- 来自热稳定的浓度依赖性的剂量反应曲线

[0153] 为了构建剂量-反应曲线来估算表观结合常数,将牛肝裂解产物接受一系列稀释的配体 TNP-470,其特异性地靶向蛋氨酸氨基肽酶-2。在该实施例之前,已经获得了对应于处理和未处理样品的曲线(参见实施例 5),其中已经将剂量设定在饱和水平。然后可以使用熔化温度的差异来确定处理过的样品仍然存在而未处理过的样品将沉淀的温度。对于这个

实施例,将温度设定为+76℃。将稀释系列构建为一系列的 10- 倍稀释。所产生的曲线表示结合裂解产物中的靶蛋白需要的配体浓度。

[0154] 材料和方法

[0155] 从牛肝样品制得裂解产物。在冰上在低渗缓冲液中并且用均质破坏细胞。将上清液冻融多次,并且完全裂解后通过离心使所有不溶性聚集物和细胞碎片形成粒状沉淀。将含有视觉上澄清的细胞质蛋白级分的上清液等分至 8- 条带 PCR 管中,其中每个管含有递增量的配体 TNP-470,使得配体的浓度为 1 皮摩尔至 100 纳摩尔,并且 DMSO 的浓度为最终体积的 1%。孵育样品,并且随后加热至 76℃,持续 3 分钟。热处理后,将样品冷却,并且通过离心使沉淀的级分形成粒状沉淀。取出 20 微升的每种上清液,并且补充凝胶加样缓冲液,并且通过加热完全变性。将样品加样于分离凝胶上,充分跑胶时间后,将其点在硝化纤维素膜上。将膜洗涤,并且用阻断剂阻断,用一抗和二抗检测。通过化学发光检测来自结合的二抗的信号,并用 CCD 相机记录。测定强度并且绘制曲线。

[0156] 结果

[0157] 蛋白质印迹膜上的深色条带表示上清液中存在蛋白。如果不存在蛋白或存在非常少的蛋白,将看不到信号或只看到非常低的信号。随着配体浓度的增加,稳定的蛋白的量也增加。这作为蛋白质印迹膜上逐渐增强的深色条带的信号而观察到。将积分强度绘制曲线会得到剂量 - 反应曲线(图 8),这使得明确显著的浓度成为可能,其中样品中一半的蛋白已经被结合的配体结合(即,稳定)。通过研究身体不同器官中的表观结合常数,这对于为患者设定给药方案或发现药物的治疗窗口具有有益应用。

[0158] 实施例 7- 生物传感器应用 - 测定复合流体中配体的存在

[0159] 即使在缺乏靶蛋白的复合测试样品中,可以指示存在同源配体结合蛋白(例如,药物靶)的配体(例如,药物)的存在。这通过将含有蛋白的等份样品(例如,靶细胞的裂解产物或纯化蛋白)添加到生物流体测试样品中来实现。与实施例 6 一致,也可以使用含有目的配体的稀释系列生物流体(例如,血浆或血清)来构建剂量反应曲线。将由此形成的曲线与通过强化产生的剂量 - 反应曲线拟合,以获得生物流体中配体的估算浓度。

[0160] 材料和方法

[0161] 从孵育的人腺癌细胞(A549)制备裂解产物。在冰上在低渗缓冲液中并且用均质破坏细胞。将悬浮液冻融多次,并且在完全液解后通过离心使所有不溶性聚集物和细胞碎片形成粒状沉淀。将含有视觉上澄清的细胞质蛋白级分的上清液等分至 8- 条带 PCR 管中,其中每个管含有溶解于热处理过的 A549 裂解产物中的递增含量的配体 TNP-470 (在 76℃ 下热处理沉淀了所有靶蛋白(蛋氨酸氨基肽酶 -2) 并且确保没有配体被消耗))。与实施例 6 中一样,浓度范围为 1 皮摩尔至 100 纳摩尔有效浓度。

[0162] 将样品孵育,然后加热至 76℃,持续 3 分钟。热处理后,将样品冷却,并且通过离心使沉淀的级分形成粒状沉淀。取出 20 微升的每种上清液,并且补充凝胶加样缓冲液,并且通过加热完全变性。将样品加样于分离凝胶上,充分跑胶时间后,将其点在硝化纤维素膜上。将膜洗涤,并用阻断剂阻断,用一抗和二抗检测。通过化学发光检测来自结合的二抗的信号,并用 CCD 相机记录。测定强度并且绘制曲线。

[0163] 结果

[0164] 生成热处理过的裂解产物,以模拟靶蛋白不足的生物流体。用配体强化热处理过

的裂解产物将其连续稀释,随后产生了反应曲线(图 9),将其与体外产生的剂量反应曲线比较并与该曲线拟合,以获得样品中存在的配体的估算数目。

[0165] 实施例 8- 靶向特异性蛋白变体的配体

[0166] 在人群内,蛋白作为不同的变体存在,通常具有少量的氨基酸取代。在一些情况中,这些取代引发了疾病,例如癌症。蛋白 B-raf 涉及多个途径,在所述途径中,调控或功能的扰乱可能引起这样的疾病。对于导致致癌蛋白的 B-raf,已经描述了许多不同的氨基酸取代。氨基酸取代还可以使得蛋白不太能够结合药物,这是癌症治疗过程中引起晚期抗药性 (behind resistance) 的一个强有力的因素。

[0167] 已知配体 SB590885 结合 B-raf 的 V600E 变体,其难以用索拉非尼 (Sorafenib) 这样的药物来治疗。在该实施例中,我们证明,取代的蛋白和野生型蛋白存在稳定性差异,并且配体的结合不同程度地影响蛋白变体。

[0168] 材料和方法

[0169] 从孵育的人 A375 细胞制得裂解产物,所述细胞在含有其野生型的 B-raf 和 K562 中具有 V600E 取代。在冰上在低渗缓冲液中并用均质破坏细胞。将悬浮液冻融多次,并且在完全裂解后通过离心使所有不溶性聚集物和细胞碎片形成粒状沉淀。将含有视觉上澄清的细胞质蛋白级分的上清液各自等分至两个试管中,其中每个试管含有溶解于 DMSO 中的配体 SB590885 或用于对照的纯 DMSO。将样品孵育,并且随后以 50 微升的级分等分至 8- 管 PCR 条带中。将 +44℃ 至 +62℃ 范围内的一系列温度施加于不同的样品,使用 2℃ 增量,并且在每个温度保持 3 分钟。加热后,将样品冷却,并且通过离心使沉淀的蛋白形成粒状沉淀。取出 20 微升的每种上清液,并且补充凝胶加样缓冲液,并且通过加热完全变性。将样品加样于分离凝胶上,充分跑胶时间后,将其点在硝化纤维素膜上。将膜洗涤,并且用阻断剂阻断,用一抗和二抗检测。通过化学发光检测来自结合的二抗的信号,并用 CCD 相机记录。将强度标准化并且绘制成曲线,以观察配体处理后熔化温度的变化(图 10)。

[0170] 结果

[0171] 图 10 中的熔解曲线表明,如果不存在稳定配体,取代的 V600E B-raf 不如野生型稳定。在处理时,稳定了 V600E 取代的 B-raf,熔化温度提高大约 6℃,而野生型蛋白一旦稳定,只显示出熔化温度提高 3℃。稳定后,V600E B-raf 和野生型 B-raf 都显示出 55℃ 的熔化温度。

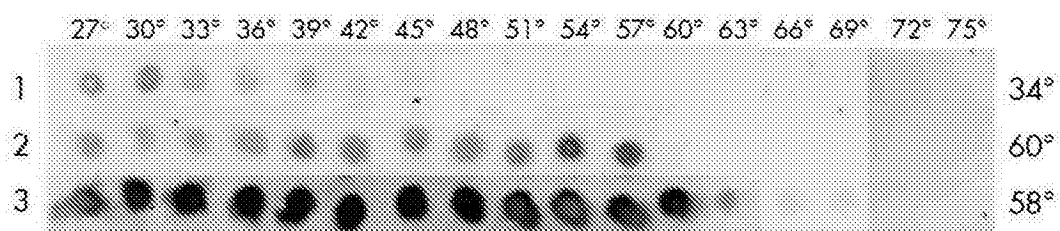


图 1

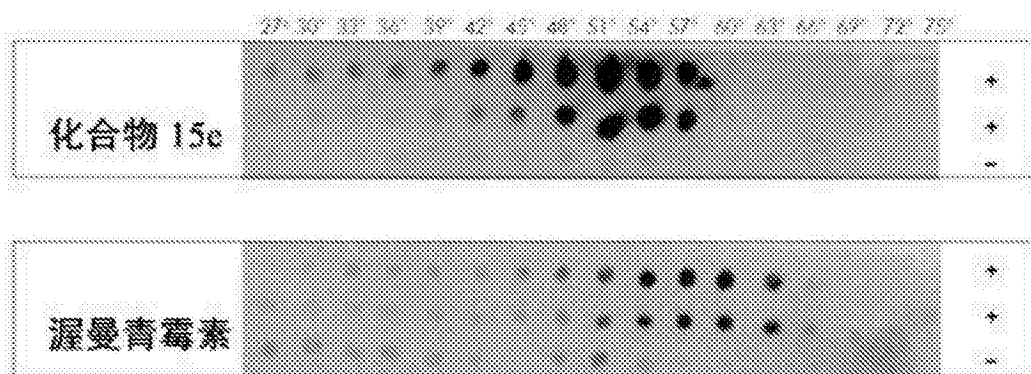


图 2

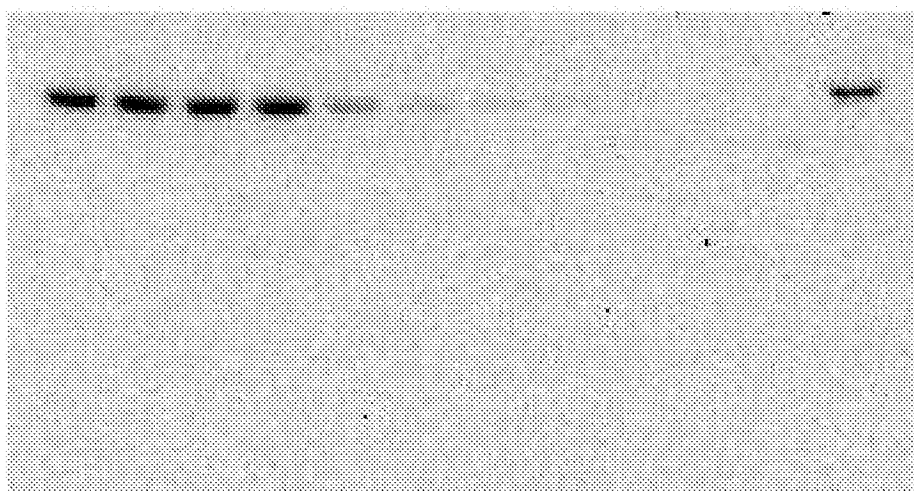


图 3a



图 3b

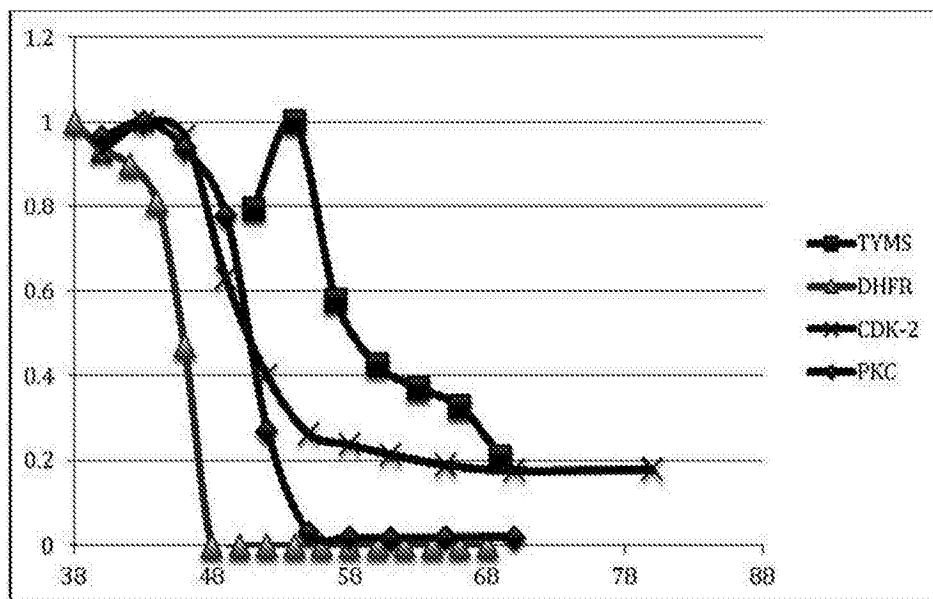


图 4

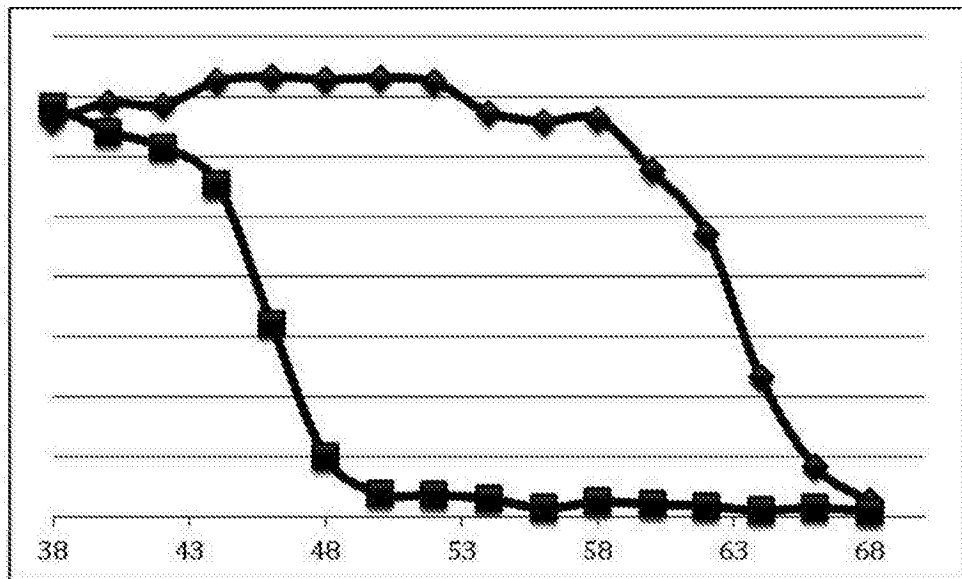


图 5

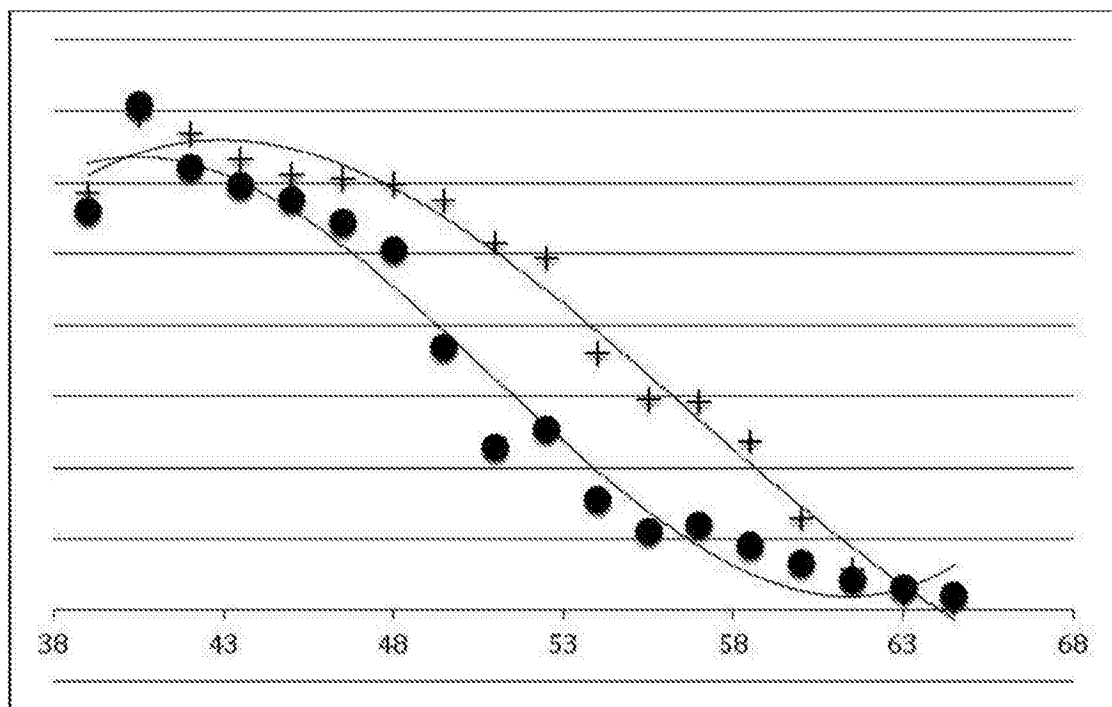


图 6

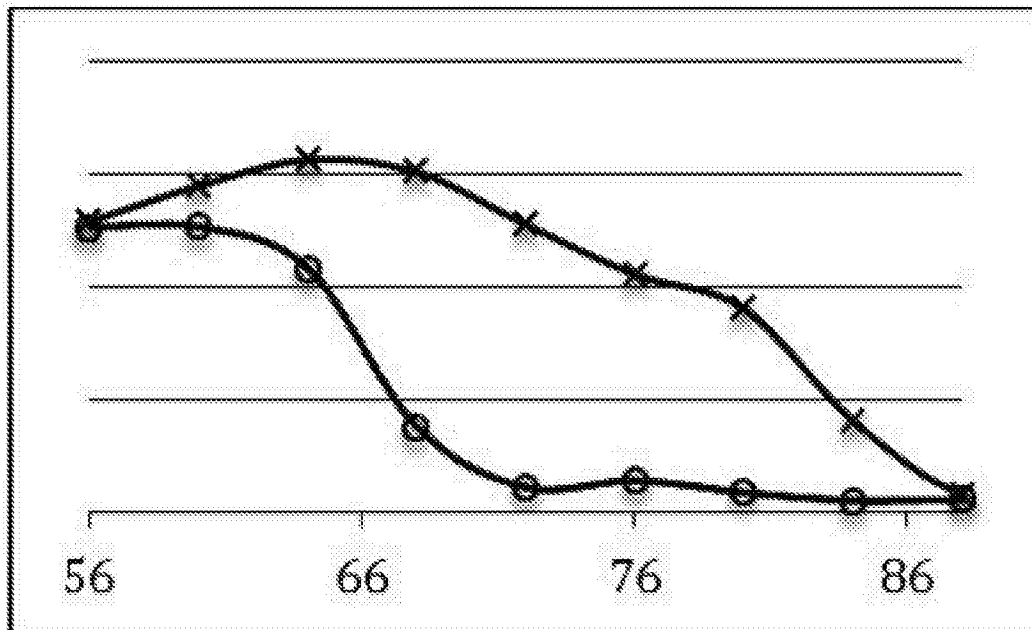


图 7a

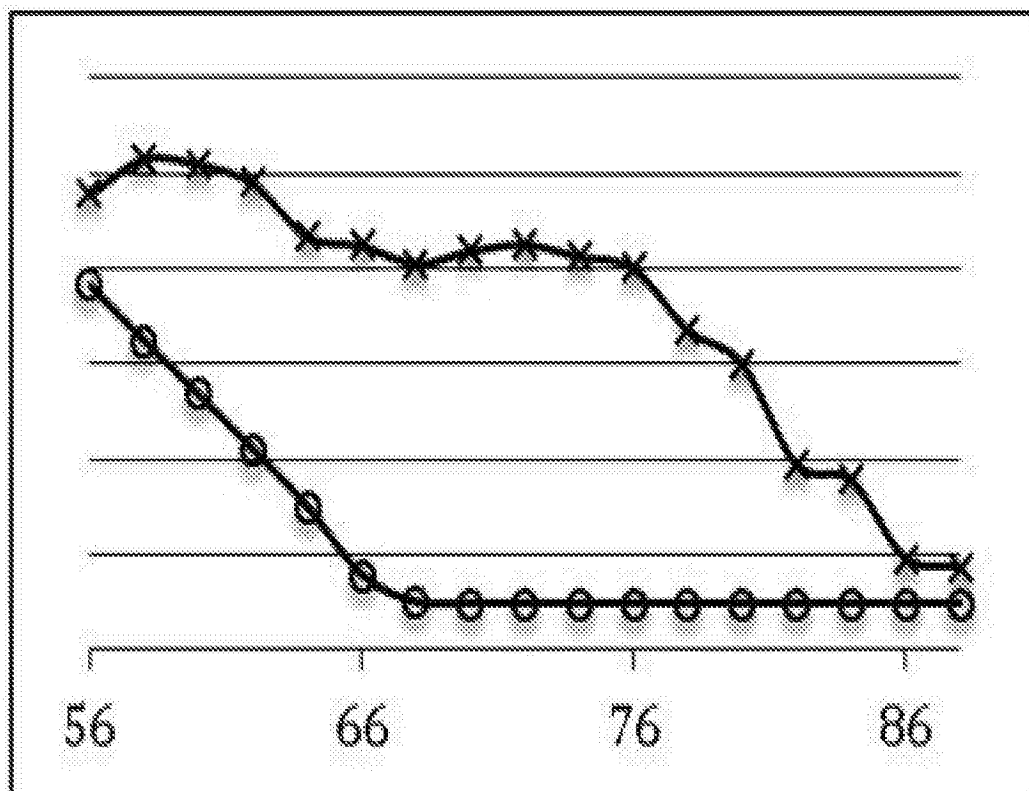


图 7b

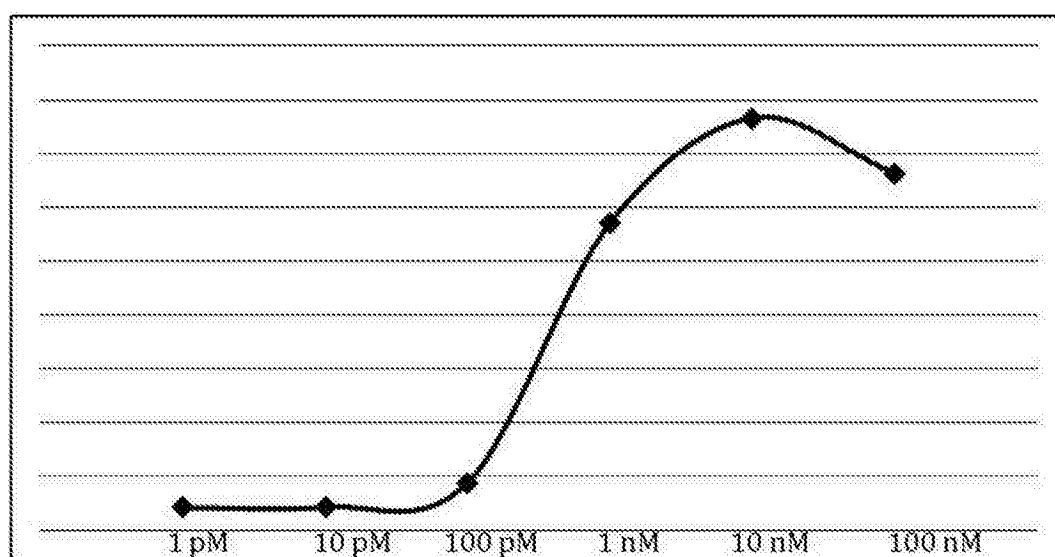


图 8

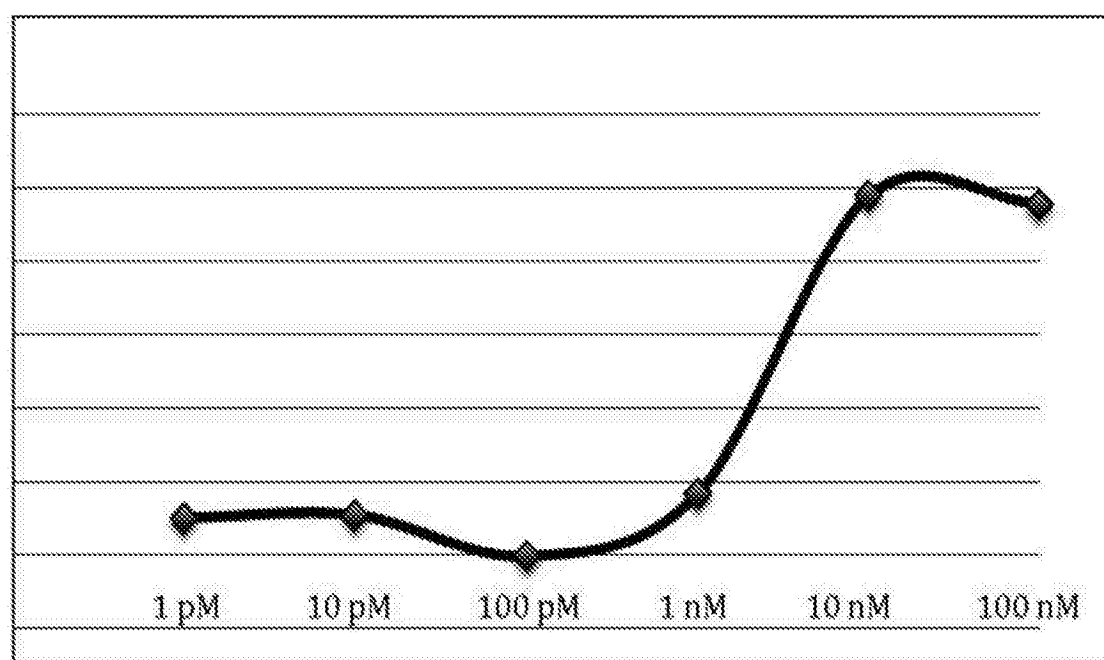


图 9

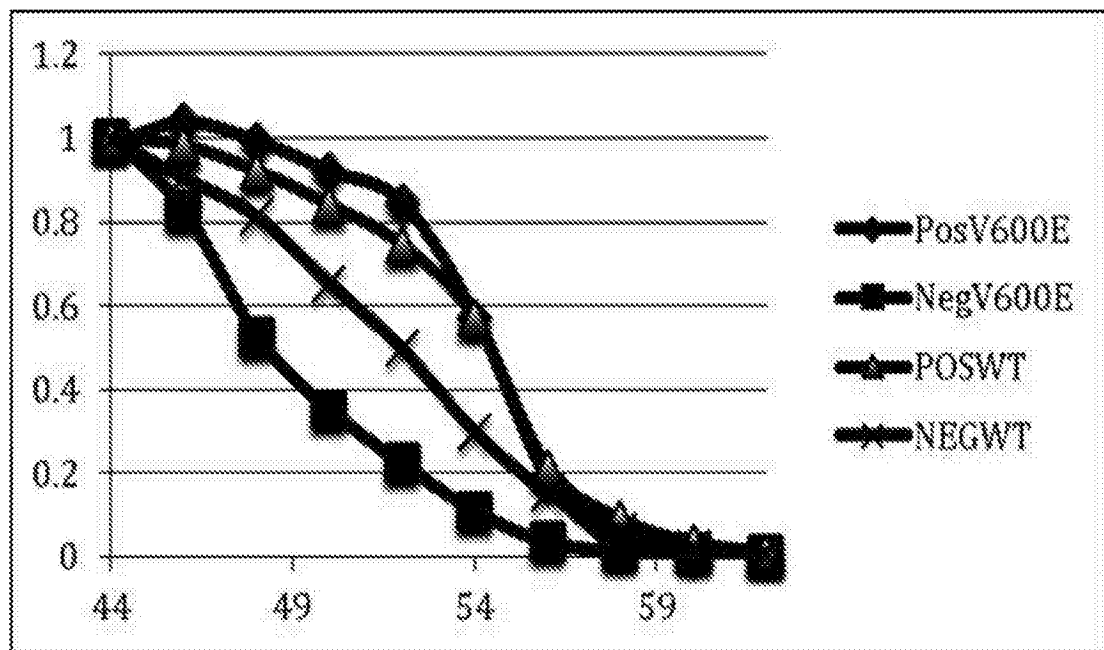


图 10