



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113683660 B

(45) 授权公告日 2023.09.01

(21) 申请号 202111074407.5

C07D 495/04 (2006.01)

(22) 申请日 2021.09.14

C07D 209/14 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C07D 209/04 (2006.01)

申请公布号 CN 113683660 A

C09K 11/06 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

(43) 申请公布日 2021.11.23

A61K 38/07 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(73) 专利权人 北京大学深圳研究生院

地址 518055 广东省深圳市南山区西丽大

学城北校区E301

专利权人 深圳湾实验室坪山生物医药研发
转化中心

(56) 对比文件

CN 112047996 A, 2020.12.08

CN 113683659 A, 2021.11.23

CN 114133425 A, 2022.03.04

CN 114057827 A, 2022.02.18

CN 115073365 A, 2022.09.20

CN 113912532 A, 2022.01.11

Zhangfeng Hou, et al. A sulfonium
triggered thiol-yne reaction for Cysteine
modification. 《The Journal of Organic
Chemistry》. 2020, 第85卷(第3期),

(72) 发明人 李子刚 尹丰 赵融通

(74) 专利代理机构 上海政济知识产权代理事务
所(普通合伙) 31479

专利代理师 肇甲武

审查员 王也

(51) Int. Cl.

C07K 1/26 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

C07K 1/10 (2006.01)

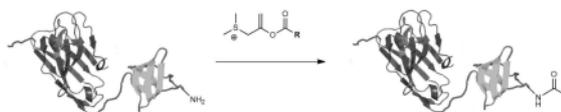
权利要求书2页 说明书10页 附图11页

(54) 发明名称

一种蛋白质赖氨酸位点的修饰方法及其应
用

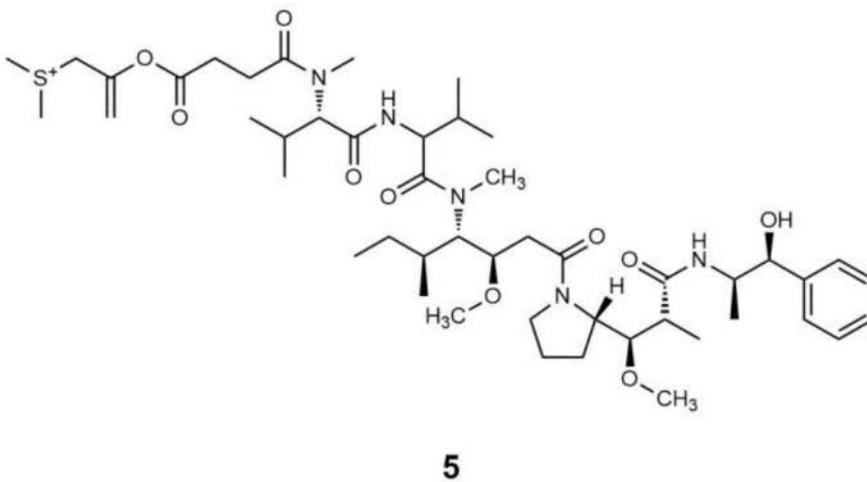
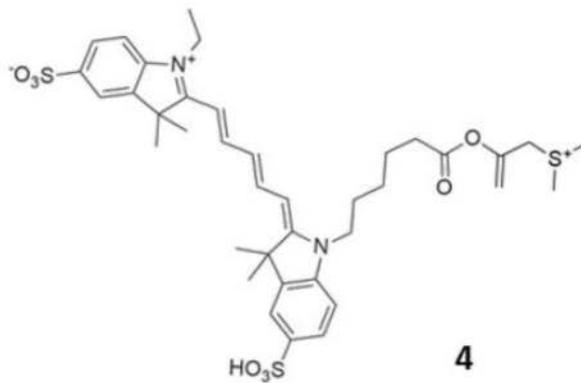
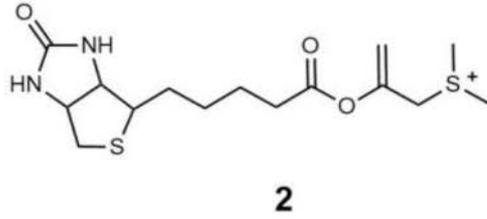
(57) 摘要

本发明提供了一种蛋白质赖氨酸位点的修
饰方法,步骤如下:蛋白和探针于PBS中混匀,于
37℃水浴中反应后,加入适量的聚丙烯酰胺凝胶
电泳上样缓冲液混匀,沸水加热10分钟,进行分
离,通过考马斯亮蓝染色进行染色鉴定,通过免
疫印迹实验检测对应蛋白的含量,用以鉴定蛋白
质的生物素等特定修饰;探针为具有铈盐活性酯
结构的探针。本发明拓展了对铈盐的蛋白质修饰
方法,实现了对于蛋白质赖氨酸位点的偶联修
饰。本发明还开发了一种新型抗体偶联药物,针
对目标蛋白赖氨酸进行修饰,实现了利用新型铈
盐链接结构的抗体偶联药物的构建。



1. 一种蛋白质赖氨酸位点的修饰方法,其特征在于步骤如下:蛋白和探针于PBS中混匀,于37°C水浴中反应后,加入聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液混匀,沸水加热8-10分钟后进行分离;

其中,探针为铈盐活性酯探针2、铈盐活性酯荧光探针4或铈盐活性酯探针5中的一种,结构式分别如下:



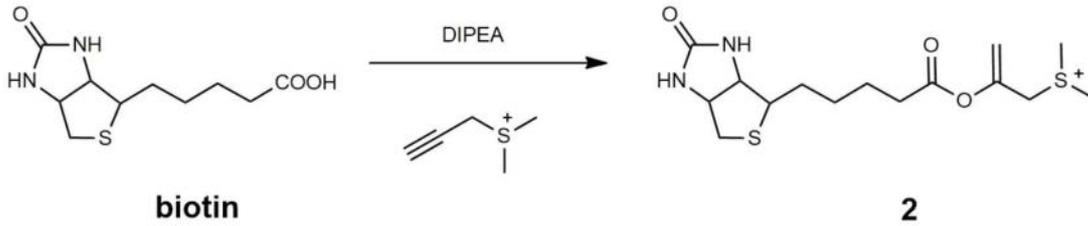
其中,当探针为铈盐活性酯探针5时,探针与蛋白的摩尔比为1:10,pH为7.4,在37°C下反应12小时,反应后通过分子筛在快速蛋白质液相色谱上纯化。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,分离后通过考马斯亮蓝染色进行染色鉴定。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,分离后通过免疫印迹实验检测对应蛋白的含量。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述铈盐活性酯探针2的制备方法为:将生

物素溶解在甲醇中,加入摩尔比1:2的二甲基(丙-2-炔-1-基)铊盐和N,N-二甲基甲酰胺,在37°C下反应6小时,减压浓缩,通过HPLC纯化和分离,反应式如下:



5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述铊盐活性酯荧光探针4的制备方法为:将荧光染料磺基青色素5溶解在甲醇中,加入摩尔比1:2的二甲基(丙-2-炔-1-基)铊盐和N,N-二甲基甲酰胺,在37°C下反应6小时,减压浓缩,通过HPLC纯化和分离。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,铊盐活性酯探针5的制备步骤如下:选择细胞毒性药物一甲基澳瑞他汀E作为细胞毒药,将一甲基澳瑞他汀E的非活性末端进行修饰,形成末端羧基的结构,与二甲基的炔丙基硫盐反应,HPLC分离纯化后得到铊盐活性酯探针5。

一种蛋白质赖氨酸位点的修饰方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种蛋白质特定位点的修饰方法及其用途,属于化学生物学与生物技术领域,尤其涉及利用炔丙基铈盐修饰蛋白质赖氨酸位点的方法及其应用。

背景技术

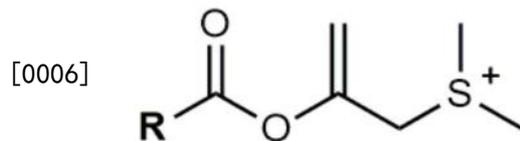
[0002] 在过去的二十年中,科学家们已经开发了许多化学修饰靶蛋白的策略,包括位点选择性和化学选择性方法。无论是在体外还是在细胞中,由于蛋白质与细胞环境的复杂性,蛋白质修饰仍然存在选择性差、反应条件相对苛刻、反应速度慢、反应活性与选择性两难等问题。实现位点选择性的一种方法是利用生物正交反应对整合了非天然氨基酸的蛋白质进行标记,以及对整合特定多肽序列的蛋白进行空间识别,实现位点选择性的另一种方法是配体诱导的蛋白质偶联。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种蛋白质赖氨酸位点的修饰方法。

[0004] 本发明提供了一种蛋白质赖氨酸位点的修饰方法,步骤如下:蛋白和探针于PBS中混匀,于37℃水浴中反应后,加入聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液混匀,加热8-10分钟,进行SDS-PAGE凝胶分离,通过考马斯亮蓝染色可以进行染色鉴定,通过免疫印迹实验可以检测对应蛋白的含量,用以鉴定蛋白质的生物素等特定修饰;

[0005] 其中,探针为铈盐活性酯探针,结构式如下:

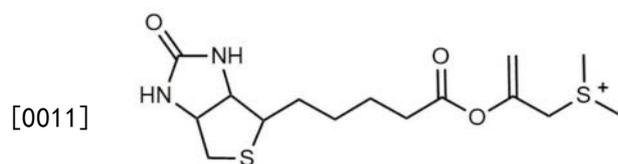


[0007] 其中,R为生物素基团、荧光基团或生物功能基团。

[0008] 本发明中,分离后通过考马斯亮蓝染色进行染色鉴定。

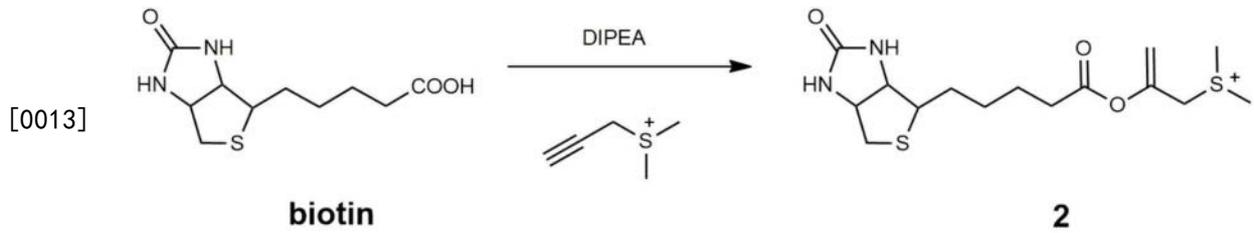
[0009] 本发明中,分离后通过免疫印迹实验检测对应蛋白的含量。

[0010] 本发明中,探针为铈盐活性酯探针2,结构式如下:

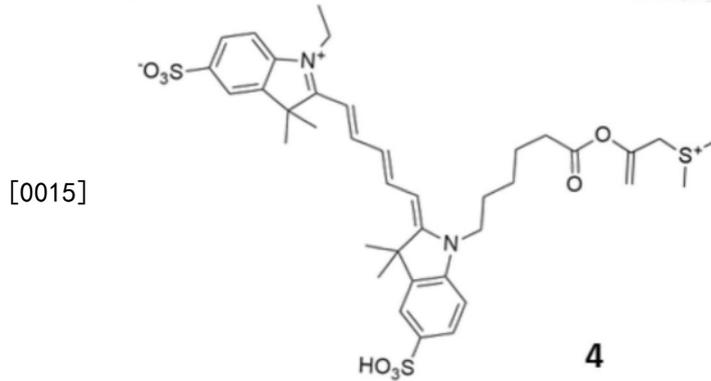


2

[0012] 本发明中,铈盐活性酯探针2的制备方法为:将生物素溶解在甲醇中,加入摩尔比1:2的二甲基(丙-2-炔-1-基)铈盐和N,N-二甲基甲酰胺,在37℃下反应6小时,减压浓缩,通过HPLC纯化和分离,反应式如下:



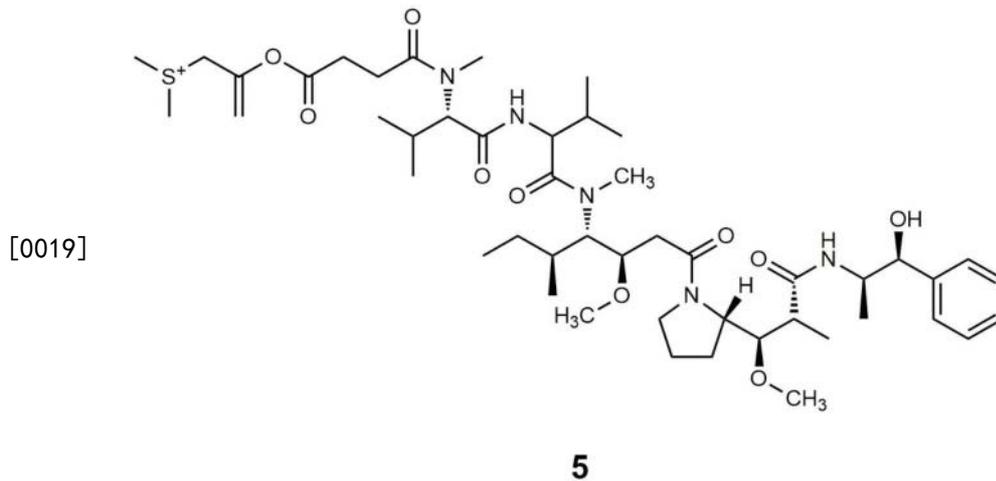
[0014] 本发明中,探针还可以为铈盐活性酯荧光探针4,结构式如下:



[0016] 本发明中,铈盐活性酯荧光探针4的制备方法为:将磺基靛色素5(Cy5)溶解在甲醇中,加入二甲基(丙-2-炔-1-基)铈盐和N,N-二甲基甲酰胺,在37°C下反应6小时,减压浓缩,通过HPLC纯化和分离。

[0017] 本发明还提出具有铈盐活性酯结构的探针在制备抗体偶联药物中的应用:探针与蛋白以摩尔比1:10,pH为7.4,在37°C下反应12小时,反应后通过分子筛在快速蛋白质液相色谱(FPLC)上纯化,

[0018] 其中,探针为铈盐活性酯探针5,结构如下:



[0020] 本发明中,铈盐活性酯探针5的制备步骤如下:选择细胞毒性药物一甲基澳瑞他汀E(MMAE)作为细胞毒药,将一甲基澳瑞他汀E的非活性末端进行修饰,形成末端羧基的结构,与二甲基的炔丙基硫盐反应,HPLC分离纯化后得到铈盐活性酯探针5。

[0021] 本发明通过合成一系列相关铈盐的类似物,进行了铈盐探针的筛选,并对基于Lys修饰的新型铈盐探针与经典的ADC构建策略中的马来酰亚胺链接器进行了详细的比较。通过ESI-MS检测,确认了对于抗体蛋白的修饰情况,并估算了ADC的药物抗体比(DAR)值。通过ESI-MS/MS检测,确认了铈盐策略的蛋白质修饰的位点。通过设计带有荧光结构的铈盐活性

酯探针,实现了细胞成像的功能。最后,选取一甲基澳瑞他汀E(MMAE)作为细胞毒药,设计了针对Lys修饰的ADC,并通过CD38抗原高表达的细胞系验证了ADC的毒性效果。

[0022] 发明的有益效果:

[0023] 本发明开发了围绕铈盐中心的新型偶联反应,可以实现对于目标蛋白上Lys的共价偶联,而且摆脱了配体导向与邻近反应的模式。这种方式具有位点特异性,对于蛋白只发生独立的Lys位点的修饰,而不发生在易修饰的Cys位点。基于新的铈盐修饰策略,本发明还开发了一种新型ADC,针对目标蛋白Lys进行修饰,实现了利用新型铈盐链接结构的ADC构建。

[0024] 本发明拓展了对铈盐的蛋白质修饰方法,实现了对于蛋白质不同位点的偶联修饰。基于这些铈盐策略,设计并筛选了蛋白质Lys的修饰方法。ESI-MS、ESI-MS/MS的检测验证了铈盐修饰的数目,确定了修饰的具体位点。通过铈盐荧光探针的设计,实现了利于抗体偶联荧光分子对于抗原的免疫荧光定位。最后,通过铈盐策略将MMAE偶联到抗体蛋白上,得到了ADC的药物。

[0025] 本发明的基于蛋白修饰的铈盐活性酯策略开发的ADC构建方法,与经典的通过马来酰亚胺等策略实现的ADC构造,有以下显著的差异。(1)经典的ADC采用马来酰亚胺与蛋白质Lys氨基残基的反应实现与抗体蛋白的偶联,然后通过点击反应添加细胞毒性药物。而本发明基于铈盐蛋白修饰策略设计的ADC,可以通过一步的蛋白-探针反应,完成抗体蛋白与药物的偶联。在简化化学步骤的同时,由于铈盐结构在化学上可以实现简易而丰富的调整,使得反应的灵活性也大大提高。(2)经典的ADC构造方法采用迅速而高效的蛋白质修饰反应,而本发明基于铈盐的反应特性,给出了一种更温和,更具容忍性的修饰策略。通过对于反应条件的调控,可以有效控制反应的效率,进而控制ADC的载药量等相关参数。经典的ADC有着0-8的DAR范围,其中高DAR或低DAR的异质ADC会与抗原结合,通过竞争减弱ADC的效果。本研究中开发的ADC带有更均匀DAR,为新一代ADC的发展提供了思考。

附图说明

[0026] 图1是实施例1中目标蛋白Ab1(Nb1053-Ab1^{N31C})的结构示意图。

[0027] 图2是实施例1中铈盐活性酯探针与Ab1蛋白的修饰反应示意图。

[0028] 图3是实施例1中探针的蛋白质印迹实验和考马斯亮蓝染色实验结果图。

[0029] 图4是实施例1中阳性对照探针1和铈盐活性酯探针2与蛋白进行修饰反应的时间梯度的蛋白质印迹实验和考马斯亮蓝染色实验结果图。

[0030] 图5是实施例1中阳性对照探针1和铈盐活性酯探针2与蛋白进行修饰反应的当量实验的蛋白质印迹实验和考马斯亮蓝染色实验结果图。

[0031] 图6是实施例1中阳性对照探针1和铈盐活性酯探针2与蛋白进行修饰反应的不同pH条件的蛋白质印迹实验和考马斯亮蓝染色实验结果图。

[0032] 图7是实施例1中铈盐活性酯探针2与不同蛋白之间的修饰反应对照的蛋白质印迹实验和考马斯亮蓝染色实验结果图。

[0033] 图8是实施例2中铈盐活性酯荧光探针4与蛋白进行修饰反应的时间梯度的荧光染色(FL)实验和考马斯亮蓝染色实验结果图。

[0034] 图9是实施例2中铈盐活性酯荧光探针4与蛋白进行修饰反应的当量实验的FL实验

和考马斯亮蓝染色实验结果图。

[0035] 图10是实施例2中铈盐活性酯荧光探针4与不同蛋白之间的修饰反应的FL实验和考马斯亮蓝染色实验结果图。

[0036] 图11是实施例2中用于Lys修饰的探针2、4与Ab1蛋白在Lys修饰试剂NSH预处理条件下的修饰反应的蛋白质印迹实验、FL实验和考马斯亮蓝染色实验结果图。

[0037] 图12是实施例2中Ab1经铈盐活性酯探针2修饰后剩余Cys含量的DNTB检测结果图。

[0038] 图13是实施例3中探针1、2与Ab1偶联后的修饰数及DAR值。

[0039] 图14是实施例3中蛋白Ab1的ESI-MS图谱

[0040] 图15是实施例3中阳性对照探针1偶联后的Ab1的ESI-MS图谱。

[0041] 图16是实施例3中铈盐活性酯探针2偶联后的Ab1的ESI-MS图谱。

[0042] 图17是实施例3中两种探针1、2与Ab1偶联后的ESI-MS/MS搜库数据。

[0043] 图18是实施例3中两种探针1、2与Ab1偶联后的修饰位点整理。

[0044] 图19是实施例4中LP-1/KO-21细胞的Ab1(4)细胞膜成像实验,比例尺均为10 μ m,其中,(1)为LP-1不加药对照Ctrl,(2)为LP-1直接加入小分子铈盐4的对照Ctrl-Cy5,(3)为LP-1 500nM的Ab1(4)成像,(4)为LP-1 50nM的Ab1(4)成像,(5)为LP-1(RA)500nM的Ab1(4)成像,(6)为LP-1(RA)50nM的Ab1(4)成像,(7)为KO-21 500nM的Ab1(4)成像,(8)为KO-21(RA)500nM的Ab1(4)成像。

[0045] 图20是实施例5中ADC药物Ab1(5)在LP-1/KO-21/HKT293细胞的毒理性结果。

具体实施方式

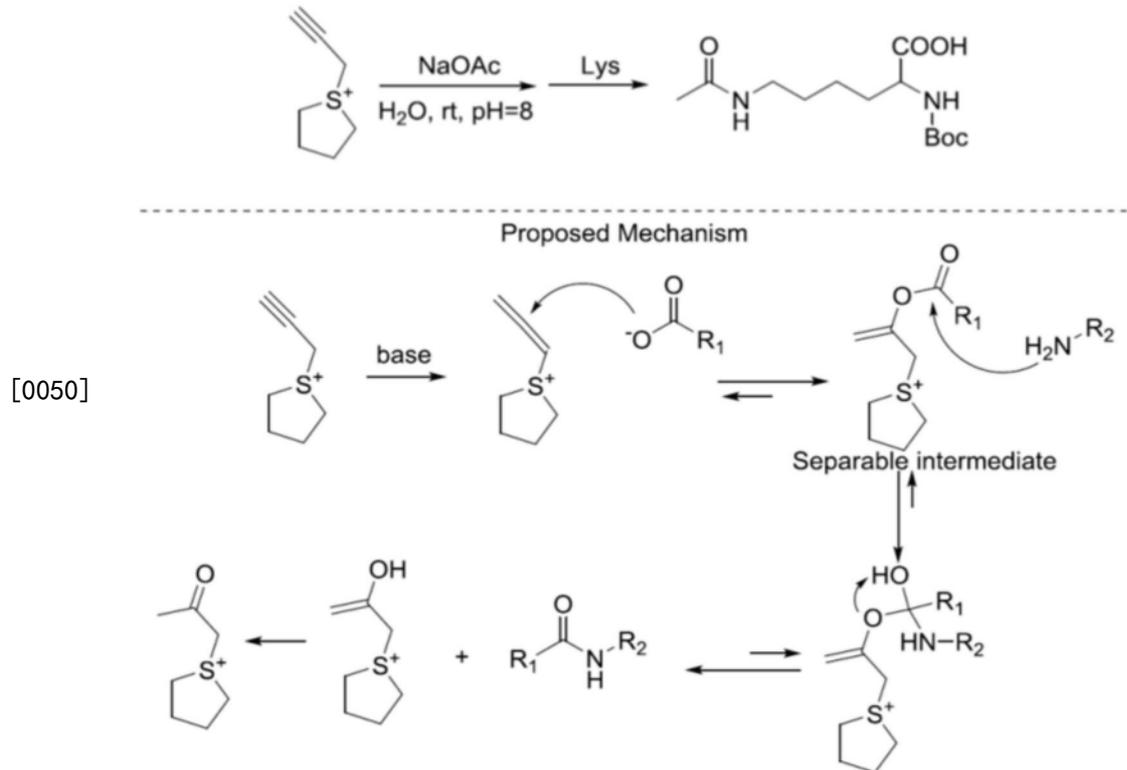
[0046] 下面结合附图对本发明的技术方案做进一步说明。

[0047] 实施例1:基于Lys修饰的铈盐活性酯探针的制备

[0048] 为了探究铈盐探针对于蛋白的修饰,以及后续ADC的开发,首先选择了靶向CD38的纳米抗体蛋白Nanobody 1053(Nb1053)(Li,T.;Qi,S.;Unger,M.;Hou,Y.N.;Deng,Q.W.;Liu,J.;Lam,C.M.C.;Wang,X.W.;Xin,D.;Zhang,P.;Koch-Nolte,F.;Hao,Q.;Zhang,H.;Lee,H.C.;Zhao,Y.J.,Immuno-targeting the multifunctional CD38 using nanobody.Sci.Rep.2016,6,27055.)作为目标蛋白,并通过基因克隆在蛋白C端连缀了Ab1^{N31C}(Pisabarro,M.T.;Serrano,L.;Wilmanns,M.,Crystal structure of the abl-SH3domain complexed with a designed highaffinity peptide ligand:implications for SH3-ligand interactions.J.Mol.Biol.1998,281,513-521.)结构域。在通常的抗体中,抗体蛋白均存在折叠程度较高,暴露在外的可供修饰的氨基酸残基位点较少的缺陷。作为已经被报导的通过配体导向策略实现修饰的蛋白质模板,Ab1^{N31C}结构域有着空间位置合适的氨基酸残基,同时也在Nb1053结构的基础上增加了50%的Lys残基(Nb1053含有6个Lys,而Ab1^{N31C}结构域引入了额外3个Lys),极大地扩充了目标蛋白Lys修饰的可能范围。1053Nb-Ab1^{N31C}(Ab1)的结构如图1。

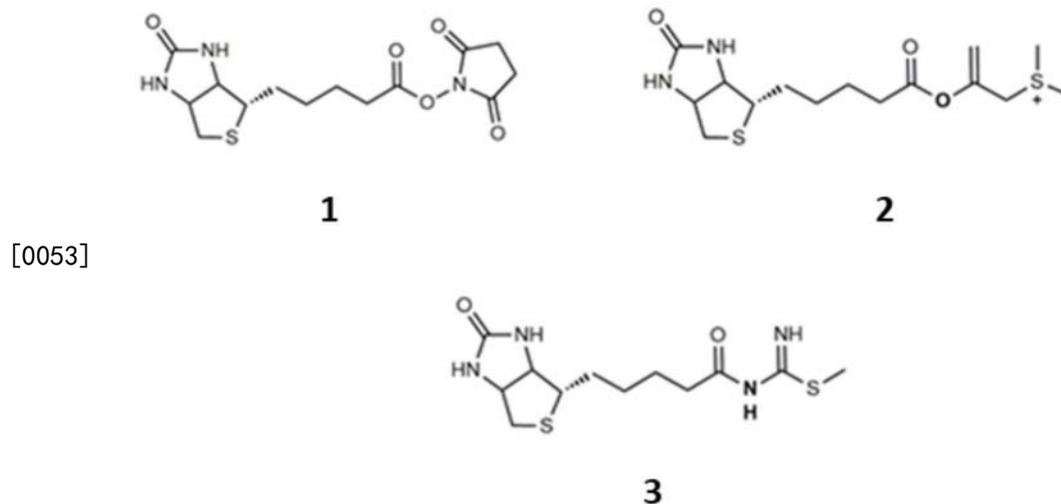
[0049] 在蛋白质中,除Cys以外,赖氨酸的氨基残基由于较高的丰度、丰富的位置分布,成为了蛋白质选择修饰研究的另一个理想靶点,也是ADC药物的常用位点。炔丙基铈盐是一种可用的蛋白质Cys的共价修饰策略。除了和Cys反应外,炔丙基铈盐也可以与氨基在烧瓶中反应,但与蛋白质上氨基残基的反应效率并不理想,这可能是由于蛋白质复杂的化学环境

导致的。为了提高炔丙基铈盐与氨基反应的效率问题,对于这一反应的优化进行了一系列化学尝试。结合铈盐的特性,利用炔丙基铈盐与酸反应形成的中间产物,可以实现与氨基的简单、高效的反应。实验表明,这一反应只能与Lys的氨基反应,无法与Cys的巯基或Ser的羟基反应。反应机理如下,其中, R_1 、 R_2 代表一般的有机物结构。



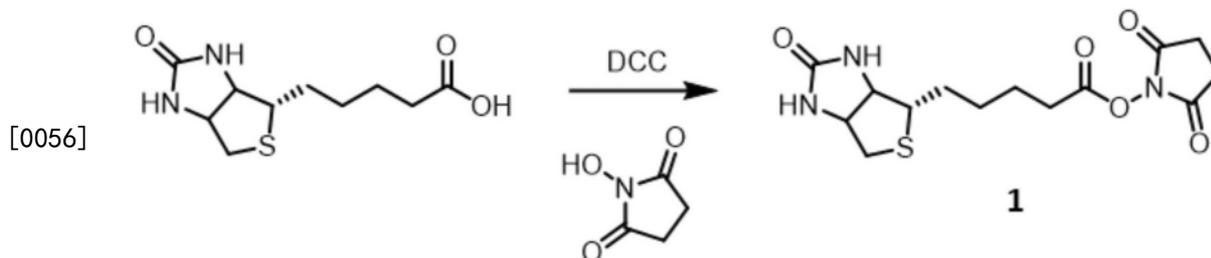
[0051] 通过炔丙基铈盐和酸的反应,分离这一反应的中间产物,可以得到用于蛋白质Lys修饰的铈盐活性酯探针。铈盐活性酯结构可以用于蛋白质Lys位点的共价修饰。图2为铈盐活性酯探针对于蛋白质Lys修饰的示意图。

[0052] 在以Lys为修饰目标的常见修饰策略中,使用Lys修饰中最常使用的琥珀酰亚胺活性酯1作为阳性对照探针。除了以生物素物为基础的铈盐活性酯探针2之外,还设计了其类似物,带有胍基结构的铈盐结构中间体3。几种基于Lys修饰的探针结构如下。

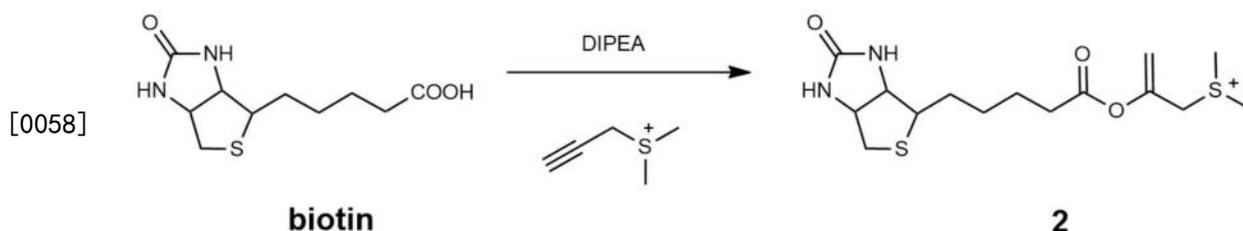


[0054] 1、铈盐探针的制备。

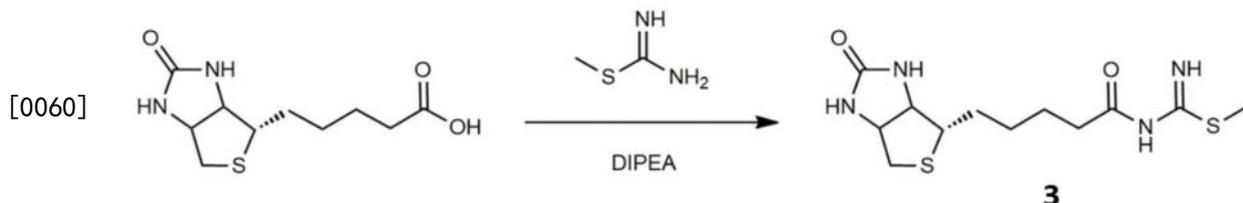
[0055] 阳性对照探针1通过文献报道的方法合成,反应式如下。(Sandfort, F.; Knecht, T.; Pinkert, T.; Daniliuc, C.G.; Glorius, F., Site-Selective Thiolation of (Multi) halogenated Heteroarenes. J. Am. Chem. Soc. 2020, 142, 6913-6919.)



[0057] 铕盐活性酯探针2的合成。将生物素溶解在甲醇中,并加入二甲基(丙-2-炔-1-基)铕盐(5equiv.)和DIPEA(10equiv.)。混合物在37℃下反应6小时。减压浓缩,得到原油产品。通过HPLC进行目标产物的纯化和分离。通过MS鉴定产物,并通过冻干收集为白色粉末。反应式如下。用同样的方法可以合成后续的荧光探针。



[0059] 铕盐探针3可通过生物素与S-甲基异硫脲的酰胺缩合反应合成。合成反应式如下。



[0061] 2、不同探针的筛选如图3(蛋白质/探针5/50μM, pH 7.4, 37℃, 4h)。蛋白质印迹实验(WB)结果可知,除对照探针1外,铕盐活性酯探针2也能实现Ab1蛋白的修饰,而带有胍基结构铕盐探针3在实验条件下无法实现对于蛋白的修饰。在此次实验条件下, Lys为修饰位点的铕盐探针组中,阳性对照1展现了最强的修饰能力。

[0062] 探针与蛋白反应的详细条件如下:取5μM的蛋白,分别加入探针或对照药物(50μM),于PBS中仔细混匀,于37℃水浴中反应。反应结束后,加入适量的SDS-PAGE上样缓冲液(loading buffer)混匀,沸水加热10分钟,进行SDS-PAGE凝胶分离。通过考马斯亮蓝染色实验(CBB)可以进行染色鉴定,通过免疫印迹实验可以检测对应蛋白的含量,用以鉴定蛋白质的生物素等特定修饰。

[0063] 3、为了更充分地描述铕盐活性酯探针2对于蛋白Lys的修饰情况,将其与阳性对照探针1进行了一系列反应条件下的对比,包括反应时间,当量,以及pH条件等。

[0064] 如图4(蛋白质/铕盐5/50μM, pH 7.4, 37℃), WB显示,在Lys修饰时,1具有更快的反应速率,在30min已经可以观测到足够的反应,而2几乎在4h左右才开始显著反应。但是,当反应充分进行到8-12h时,2基本可以达到接近1的反应程度。这一结果说明,2虽然与蛋白反应大速度相对更缓和一些,但在充分的反应时间后,实现的最终修饰效果基本与1接近或持

平。

[0065] 如图5(蛋白质5 μ M, pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C, 12h), 以12h为反应时间, 研究阳性对照1与铕盐活性酯探针2的加药当量对与蛋白Lys修饰的影响, WB结果可以发现, 阳性对照1可以在较低的当量下, 呈现出更高的修饰效率, 但当加药当量达到10equiv.时, 铕盐活性酯探针2的蛋白反应效率已经同对照1接近。这一结果再次说明, 对于阳性对照, 铕盐活性酯探针2对于蛋白的Lys修饰更为温和, 需要更长的反应时间以及更多的加药当量, 才能实现阳性对照1的修饰水平。

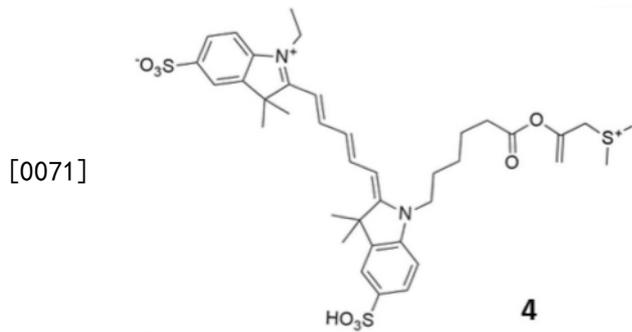
[0066] 在对铕盐与氨基反应的化学性质研究中, 实验发现, 一定的碱性有助于反应的进行。由此, 实验配置了不同pH的PBS溶液, 以研究阳性对照1与铕盐活性酯探针2在不同pH条件下与蛋白Lys反应的情况。如图6(蛋白质/铕盐5/50 μ M, 37 $^{\circ}$ C, 12h), WB结果显示, 在中性及弱碱性(pH 8-9)的条件下, 铕盐探针2的Lys修饰水平接近于同等条件下的阳性对照1。但是到了更高的碱性环境中(pH 10-11), 铕盐探针2对于蛋白Lys的修饰水平得以保持, 而阳性对照1因为偏离了反应的最适条件, 对蛋白Lys的修饰效率有明显降低, 已经弱于这一条件下铕盐探针2的修饰水平。更高的碱性条件(pH 12), 蛋白已经变性(CBB结果), 无法验证两种策略的修饰情况了。

[0067] 通过以上实验, 可以得出这样的结论: 对于蛋白质的Lys修饰方法, 对比常用的阳性对照探针1, 铕盐活性酯探针2是一种反应更为温和, pH适应宽度更宽的方法。温和的反应特性, 使得通过反应条件的控制来调控蛋白质Lys的修饰水平变得更为容易。经典的基于琥珀酰亚胺结构开发的ADC有着很宽的DAR范围(0-8), 常常会面临DAR异质化的问题。而本发明可以通过反应条件的设置, 控制反应的效率, 缩小ADC的DAR范围, 给DAR异质化的问题提供了一种解决的方向。

[0068] 4、与蛋白质Cys修饰不同, 蛋白质Lys修饰在不同的蛋白中更易被检测, 因为大部分蛋白中都含有丰富的Lys残基。为研究新开发的铕盐活性酯探针对于Lys修饰的蛋白选择情况, 用铕盐活性酯探针2与Ab1, Nb1053, 以及对照蛋白PDZ进行比较。WB结果如图7(蛋白质/铕盐5/50 μ M, pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C, 12h)。WB结果也证明了铕盐活性酯探针2与两种蛋白Ab1、PDZ均可以检测到明显的修饰结果。其中, 铕盐活性酯探针2对Ab1的修饰结果均明显强于对Nb1053的修饰结果, 这可能是因为比起Nb1053(19kD), Ab1(25kD)有更大的分子量, 有着更广泛、更丰富、也更易于修饰的Lys位点分布。

[0069] 实施例2: 基于Lys修饰的铕盐活性酯荧光探针的制备

[0070] 以Cy5作为荧光基团, 开发了基于Lys修饰的铕盐活性酯荧光探针4, 制备步骤如下: 结构如下。荧光探针4的制备与铕盐探针2的制备方案一致, 将荧光染料Cy5溶解在甲醇中, 并加入二甲基(丙-2-炔-1-基)铕盐(5equiv.)和DIPEA(10equiv.)。混合物在37 $^{\circ}$ C下反应6小时。减压浓缩, 得到原油产品。通过HPLC进行目标产物的纯化和分离。通过MS鉴定产物, 并通过冻干收集, 产物为蓝色粉末。



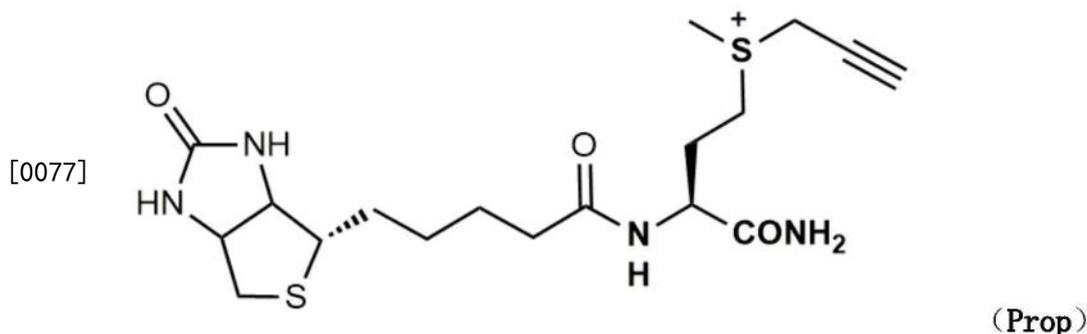
[0072] 1、在图8(蛋白质/铕盐5/50 μ M, pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C)、图9(蛋白质5 μ M, pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C, 12h)中,同样监测了不同时间(0、0.5、1、4、8、12小时)、不同当量条件下(0、0.5、

[0073] 1、2.5、5、10equiv.), 铕盐活性酯荧光探针4与Ab1蛋白的反应情况。实验结果证明,铕盐活性酯荧光探针4也能够顺利实现与蛋白的Lys的偶联。

[0074] 2、同样,使用铕盐活性酯荧光探针4,监测其与不同蛋白的反应情况。选用的蛋白包括目标蛋白Ab1,修饰Ab1^{N31C}结构域之前的纳米抗体蛋白Nb1053,带有游离Cys的其他蛋白PDZ, BFL1, mgrA, 以及一种常用于Lys氨基修饰的蛋白MDM4。如图10(蛋白质/铕盐5/50 μ M, pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C, 12h), 荧光结果显示,除了Ab1(25kD)和PDZ(12kD)蛋白以外,其余各种蛋白上可以检测到强弱不一的Cy5荧光信号, Nb1053(19kD)也有较弱的信号相应。这一实验验证了铕盐结构对于蛋白质Lys的无差别修饰。

[0075] 3、为验证铕盐探针的修饰位点为Lys,进行竞争实验。蛋白Ab1在Lys修饰试剂N-羧基琥珀酰亚胺活性酯(NHS Ester)预处理(500 μ M, 1h)的条件下,检测用于Lys修饰的铕盐活性酯探针2、4与蛋白Ab1的反应情况。如图11(蛋白质/铕盐5/50 μ M, pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C, 12h)。WB及FL结果显示,在Lys位点被竞争后,铕盐活性酯探针2、4对于目标蛋白的修饰有明显削弱,进一步验证了铕盐活性酯探针以Lys作为主要修饰位点。

[0076] 4、为验证活性酯探针对于Lys修饰的位点特异性,需验证铕盐活性酯探针2不与蛋白质的Cys位点发生反应。通过5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)检测修饰前后体系中Cys的相对含量,采用用炔丙基铕盐作为Cys修饰的阳性探针,其结构如下。DTNB可以检测蛋白质中游离的巯基,从而确定蛋白体系中Cys的相对含量。



[0078] 实验结果如图12,在Cys修饰的阳性探针Prop修饰后,蛋白中的游离巯基相对含量降低约60%。而在铕盐活性酯探针2修饰后,蛋白中巯基相对含量与修饰前基本持平,证明了铕盐活性酯探针2作为Lys修饰探针,并不会修饰到蛋白质的Cys上。

[0079] 实施例3:铕盐活性酯探针修饰数目及位点探究。

[0080] 1、为检测一系列铕盐探针与蛋白质共价偶联之后,结合到蛋白上探针的平均数

目,收集了不同探针与Ab1偶联后的蛋白质ESI-MS图谱数据。通过阳性对照探针1和铈盐活性酯探针2两种探针与Ab1偶联后的ESI-MS图谱,可以按照各个探针不同修饰数n的相对含量,来估算每种修饰的修饰药物数量与蛋白数量的比值,及DAR值,结果如图13。

[0081] 图14-16分别代表蛋白Ab1、阳性对照探针1偶联后的Ab1、铈盐活性酯探针2偶联后的Ab1的对应图谱。探针与蛋白的偶联反应条件均为:蛋白质/铈盐5/50 μ M,pH 7.4,37 $^{\circ}$ C,12h。可以看出:阳性对照探针1的修饰数n=0/1/2;铈盐活性酯探针2修饰数n=0/1/2/3。

[0082] 由计算结果可知,在给出的反应条件下,铈盐活性酯探针2能达到1左右的DAR值,而阳性对照探针1的DAR值只有0.8左右。这再一次证明了铈盐活性酯探针对于蛋白质修饰的有效性。

[0083] 2、为判定铈盐探针与蛋白质共价偶联之后,在Ab1上发生偶联的具体位点,收集了不同探针与Ab1偶联后的蛋白质ESI-MS/MS数据。图17分别展示了阳性对照探针1、铈盐活性酯探针2与Ab1蛋白发生偶联反应后,产物蛋白MS/MS数据的搜库结果。对应修饰方式在蛋白质序列上方进行了标记,其中O代表Met的氧化,C代表Cys的氨基甲酰甲基化修饰(固定修饰),B代表Lys的Biotin修饰(1、2)。探针与蛋白发生偶联条件均为:蛋白质/铈盐5/50 μ M,pH 7.4,37 $^{\circ}$ C,12h。

[0084] 将各蛋白的修饰情况进行整理,可以得到如图18的修饰位点示意图。其中,圆圈代表在该氨基酸残基处发生了修饰。分析可知,在Lys(K)的修饰中,蛋白序列中含有9个Lys,阳性对照探针1只检测到了其中3个Lys的修饰。相对的,铈盐活性酯探针2可以检测到8个位置的铈盐修饰,基本覆盖了整条蛋白序列,其中3个靠近C端的Lys是由Ab1^{N31C}结构域引入的。

[0085] 在上一实验中,估算了两种修饰的DAR值,铈盐活性酯探针2有着比阳性对照探针1更高的DAR值(约为1.5倍)。这些研究都加深了对于新型铈盐探针2修饰性质的理解。

[0086] 铈盐活性酯探针2比起阳性对照探针1有着更宽的蛋白位点修饰范围,以及更高的DAR值,但对于蛋白修饰的速率弱于阳性对照探针1,整体的修饰效率也需要足够的反应时间与当量,才能与阳性对照探针1接近。这些差异正是由于铈盐活性酯探针2拥有更温和的反应性质决定的,由此铈盐活性酯探针2才由充分的时间与蛋白更广泛位点的Lys残基接触并发生反应。而反应速率更快的阳性对照探针1可能更倾向于迅速定位蛋白上位点合适、反应活性更高的Lys残基,但在达到一定程度的修饰后,反而不利于与其他更多位点的Lys发生偶联。

[0087] 通过蛋白质的ESI-MS/MS分析,发现在阳性对照探针1和铈盐活性酯探针2的修饰中,除Lys外,Biotin也能修饰到一部分的Thr、Tyr、Ser上。特别的,Biotin无法修饰在Cys上。这些结果验证了铈盐活性酯探针2的修饰位点,同时证明了铈盐活性酯探针不会修饰在蛋白质更活泼的Cys残基上,有效说明了探针的位点特异性。

[0088] 实施例4:细胞膜成像实验。

[0089] CD38作为跨膜蛋白,在LP-1细胞的膜表面高度表达。用视磺酸(Retinoic acid, RA)处理细胞,可以增加CD38的表达水平。利用本发明的铈盐活性酯荧光探针4,通过共价偶联将Ab1荧光化,然后利用Ab1与CD38的抗原-抗体识别,在LP-1细胞系表面进行细胞膜成像。用KO-21细胞(敲除掉CD38基因的LP-1细胞系)作为对照细胞系。

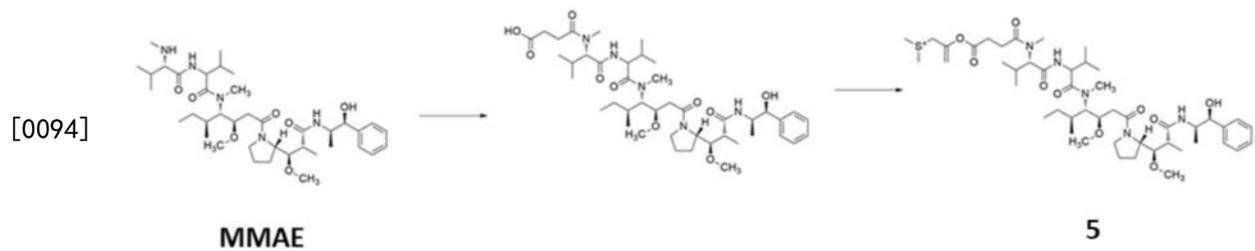
[0090] 首先,用铈盐活性酯荧光探针4处理Ab1抗体蛋白,反应12h后超滤去除多余的硫

盐。得到修饰后的抗体Ab1 (4), 用500nM/50nM抗体进行细胞染色, 染色时间为1h。LP-1细胞、LP-1细胞用RA处理 (10nM, 3days)、K0-21细胞分别进行荧光染色后, 用激光共聚焦成像 (confocal) 拍摄。

[0091] 铈盐活性酯荧光探针4修饰Ab1蛋白后, 对于细胞成像的结果如图19。Confocal结果可知, 只有LP-1 (RA) 细胞在与50nM/500nM的Ab1 (4) 成像中, 均可以拍摄到呈圆圈的细胞膜图像, 而在LP-1与500nM的Ab1 (4) 成像中, 也可以观测到较弱的细胞图像。这一结果验证了铈盐活性酯荧光探针4对于目标蛋白的修饰能力。

[0092] 实施例5: 利用铈盐活性酯探针修饰赖氨酸的方法开发ADC。

[0093] 1、依照本研究开发选出的蛋白质的铈盐修饰策略, 基于CD38的抗体Ab1, 设计ADC的结构。选择细胞毒性药物MMAE作为细胞毒药。首先, 将MMAE的非活性末端进行修饰, 形成末端羧基的结构。羧基末端则与二甲基的炔丙基铈盐反应, 得到带有活性酯的铈盐药物偶联结构5。铈盐的结构与设计如下。



[0095] 通过HPLC分离纯化两种铈盐后, 与Ab1蛋白进行偶联反应, 偶联条件为: 蛋白质/铈盐5/50 μ M, pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C, 12h。偶联后得到的蛋白Ab1 (5) 通过分子筛在FPLC上纯化。

[0096] 2、对于新设计的ADC药物Ab1 (5), 通过细胞毒性实验检测其对LP-1、K0-21以及正常细胞HKT293中的毒性。ADC的加药时间为48h, 通过cck-8试剂检测细胞的存活状况, 每个浓度设置4个平行组, 重复3次实验。实验结果如图20。分析结果可知, 在LP-1细胞中, ADC药物均在0.5-1nM之间使得细胞的生存情况发生了急剧变化。而这一变化在K0-21细胞则需要药物浓度增加1-2个数量级, 达到10-100nM。在正常细胞HEK293中, 类似的给药浓度下则ADC不具有毒性。

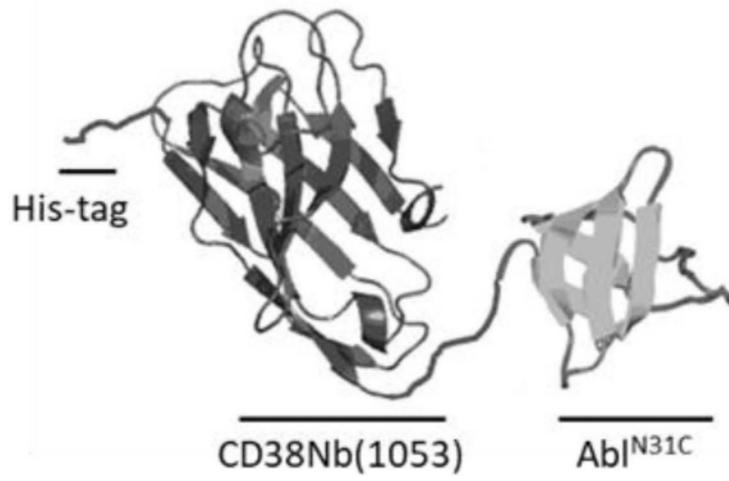


图1

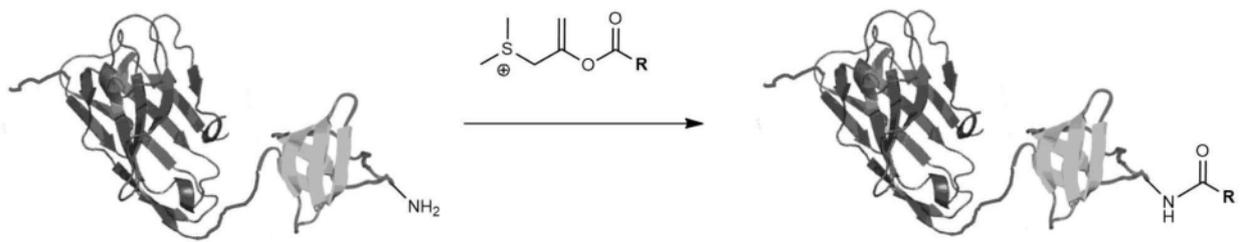


图2

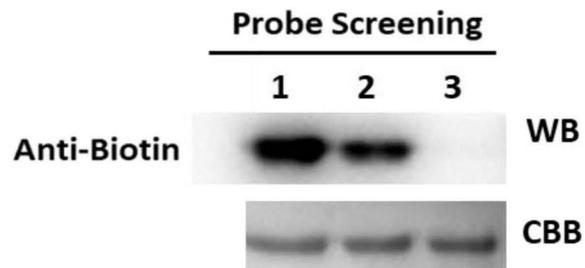


图3

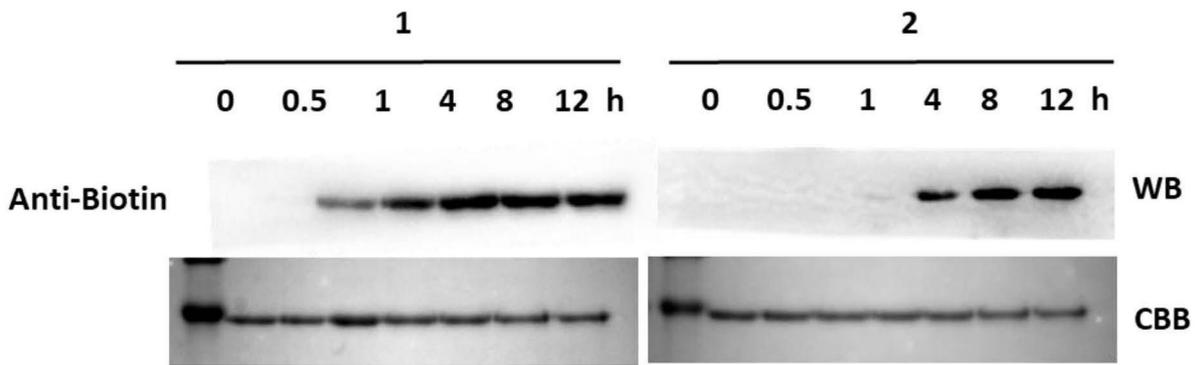


图4

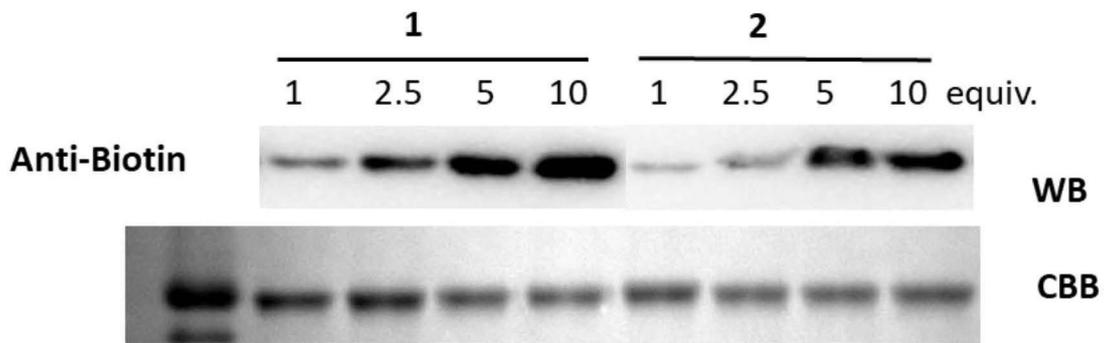


图5

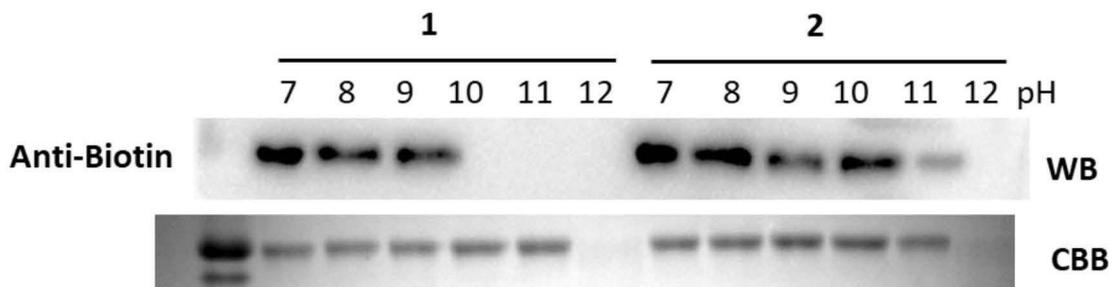


图6

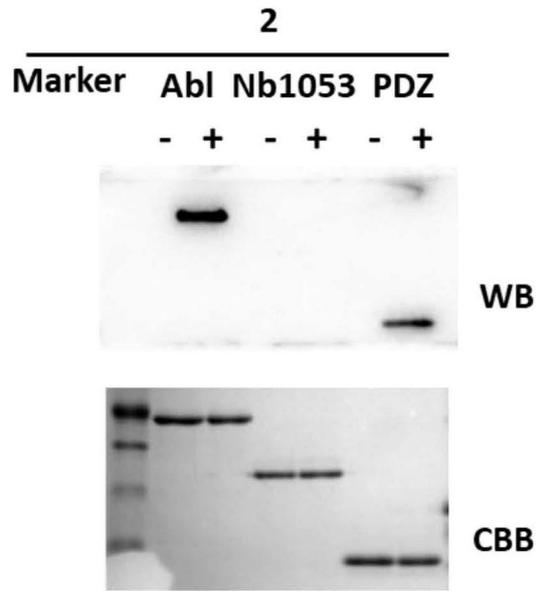


图7

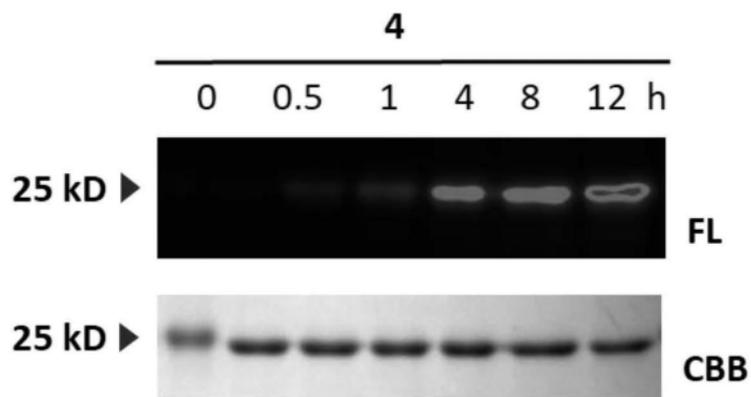


图8

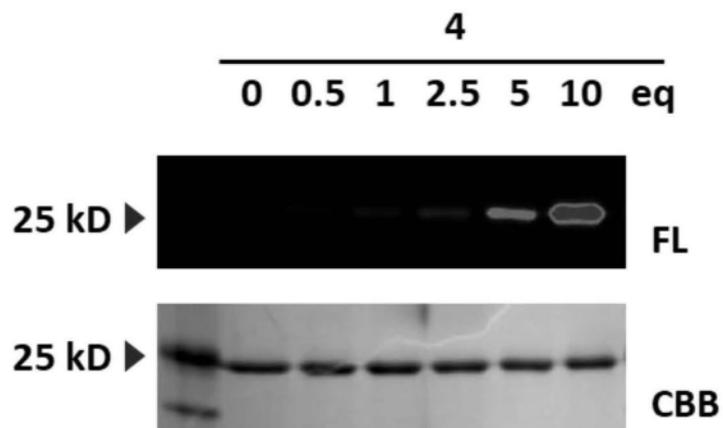


图9

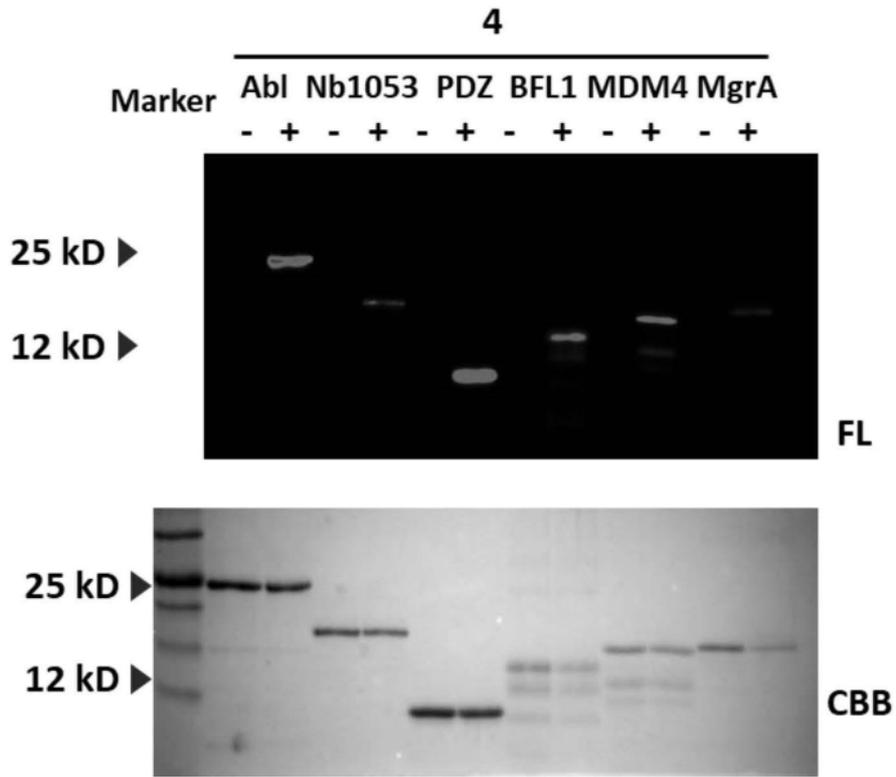


图10

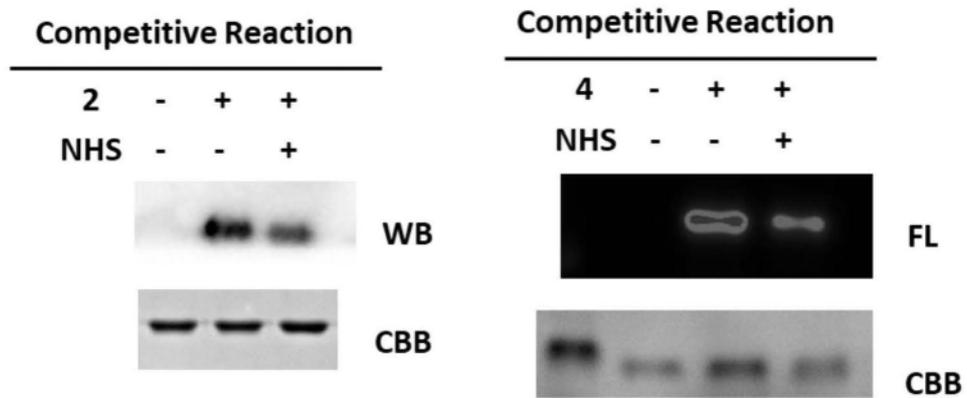


图11

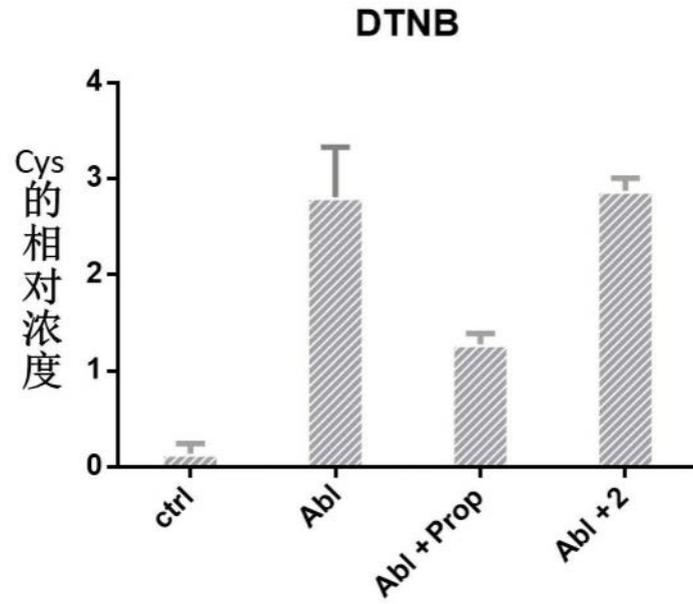


图12

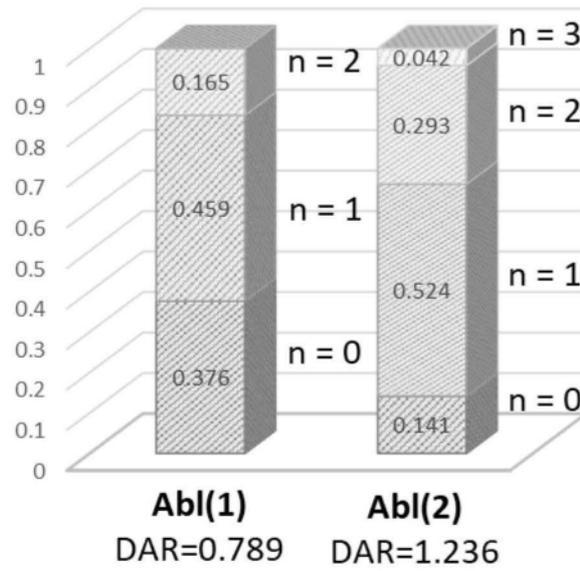


图13

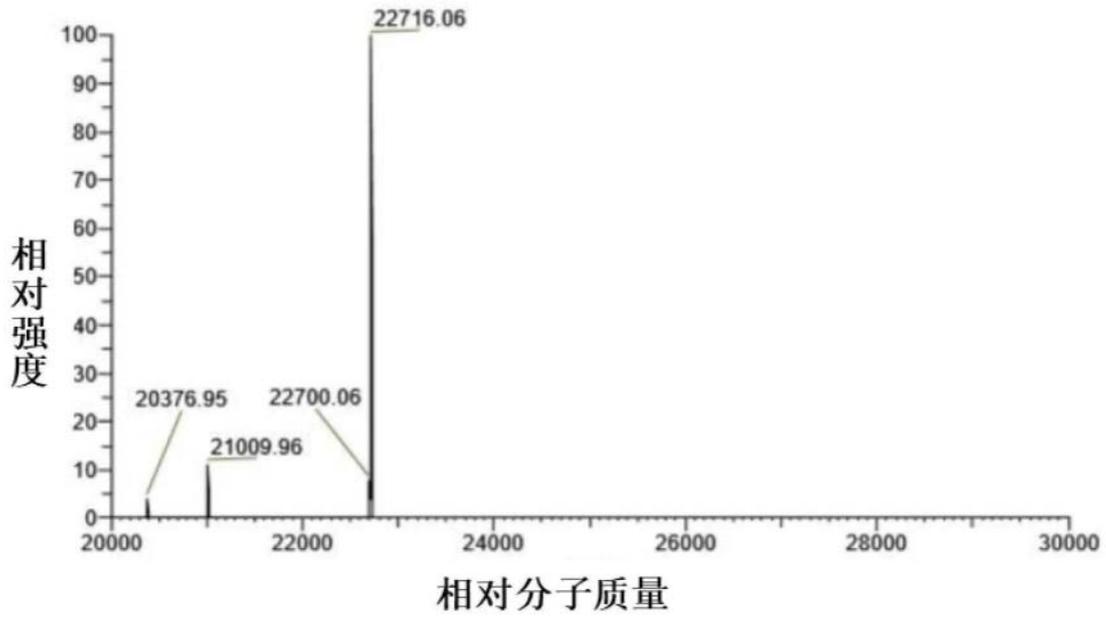


图14

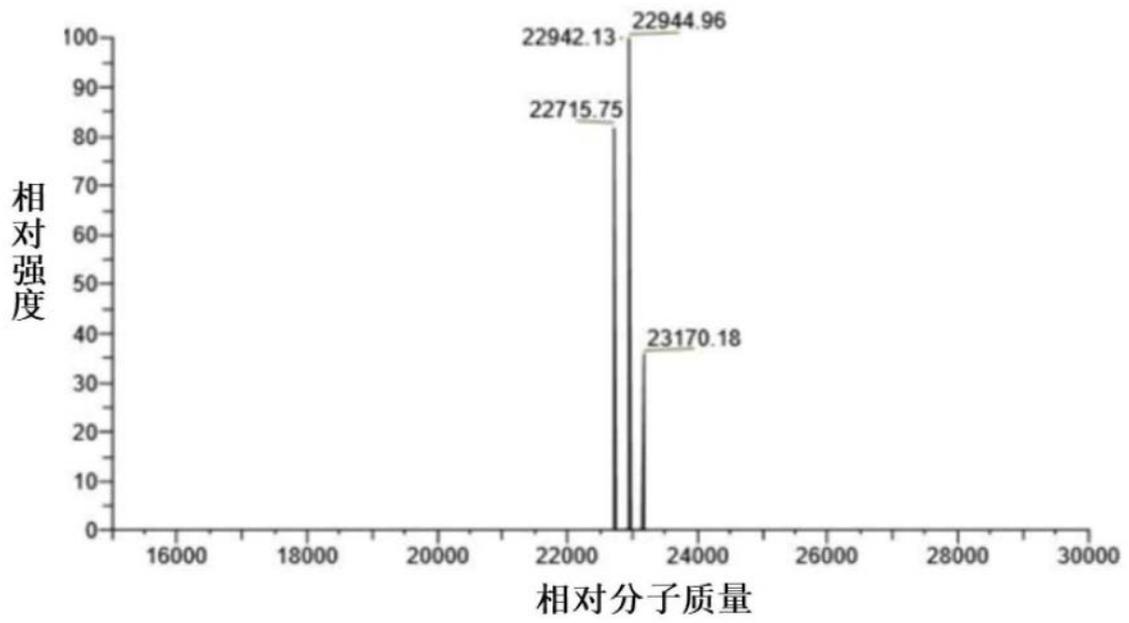


图15

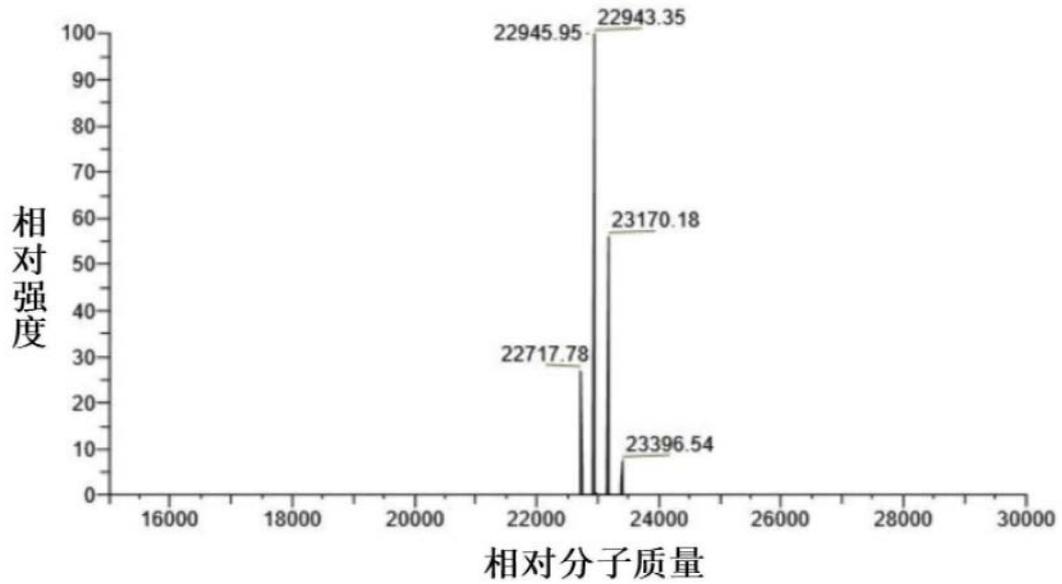


图16

Abl (1)

	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91		
1	HHHHHDVQL	QESGGGLVQA	C	CGSLRLSCTG	O	SGRTFRNYPM	AMFRQAPGKE	REFVAGITWV	GASTLYADFA	KGRFTISRDN	AKNTVYLQNN	SLKPEDTAVY
101	C	SCAAGRGIVA	GRIPAEYADW	B	QOQTQVTSS	EPKTPKQPPA	MNLFVALYDF	VASGDNTLSI	TKCEKLRVLG	YCHNGEWCEA	QTKNGQQWVP	SNYITPVNS

Abl (2)

	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91				
1	HHHHHDVQL	QESGGGLVQA	C	CGSLRLSCTG	B	SGRTFRNYPM	AMFRQAPGKE	REFVAGITWV	GASTLYADFA	KGRFTISRDN	AKNTVYLQNN	SLKPEDTAVY		
101	C	SCAAGRGIVA	GRIPAEYADW	B	B	O	QOQTQVTSS	EPKTPKQPPA	MNLFVALYDF	VASGDNTLSI	TKCEKLRVLG	YCHNGEWCEA	QTKNGQQWVP	SNYITPVNS

图17

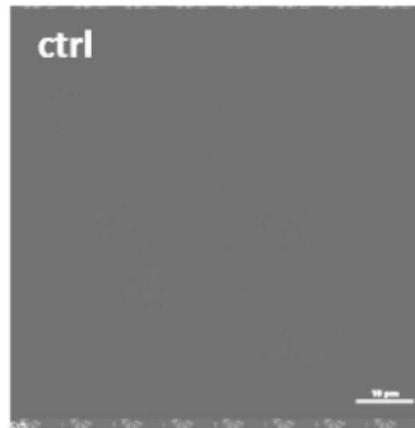
Abl (1)

HHHHHHDVQL	QESGGGLVQA	GGSLRLSCTG	SGRTFRNYPM
AWFRQAPGKE	REFVAGITWV	GASTLYADFA	KGRFTISRDN
A ^K NTVYLQMN	SL ^K PEDTAVY	SCAAGRGIVA	GRIPAEYADW
GQGTQVTVSS	EP ^K TPKPQA	MNLFVALYDF	VASGDNTLSI
TKGEKLRVLG	YCHNGEWCEA	QTKNGQGWP	SNYITPVNS

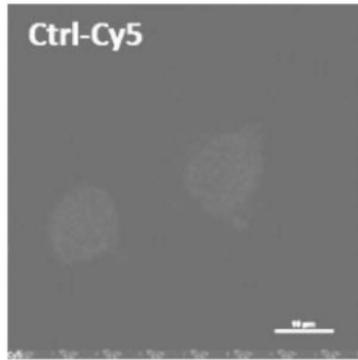
Abl (2)

HHHHHHDVQL	QESGGGLVQA	GGSLRLSCTG	SGRTFRNYPM
AWFRQAPGKE	REFVAGITWV	GASTLYADFA	^K GRFTISRDN
A ^K NTVYLQMN	SL ^K PEDTAVY	SCAAGRGIVA	GRIPAEYADW
GQGTQVTVSS	EP ^K TP ^K PQA	MNLFVALYDF	VASGDNTLSI
T ^K GE ^K LRVLG	YCHNGEWCEA	QT ^K NGQGWP	SNYITPVNS

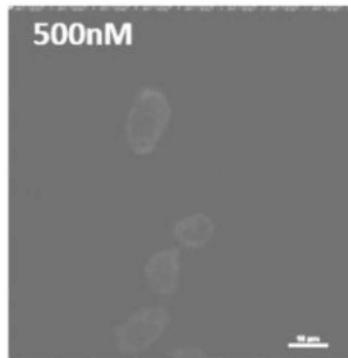
图18



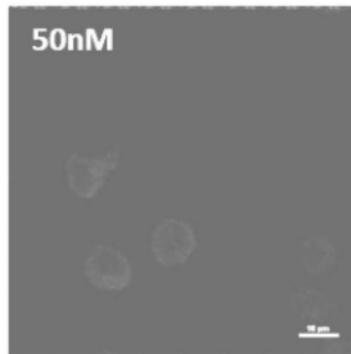
(1)



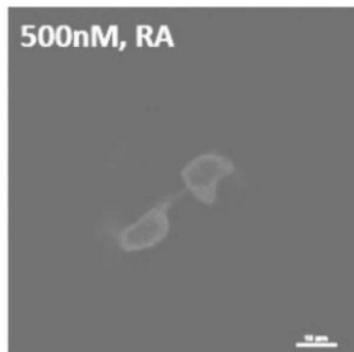
(2)



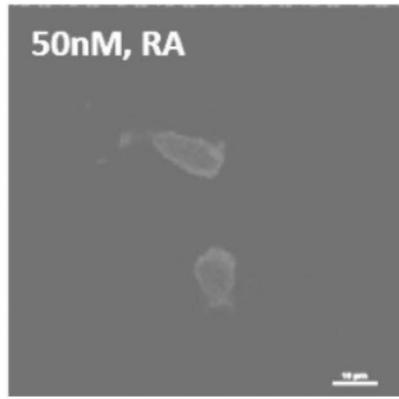
(3)



(4)



(5)



(6)



(7)



(8)

图19

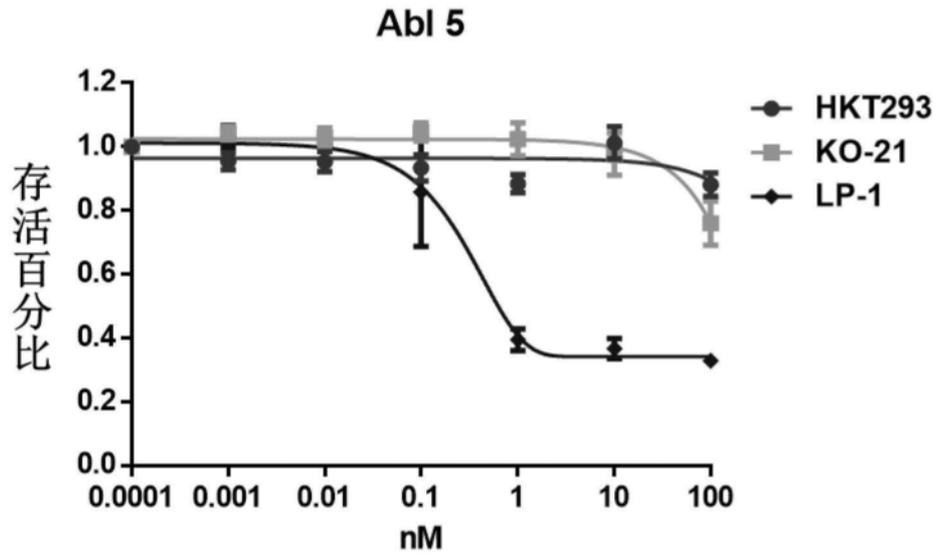


图20