

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

A61K 31/00 A61K 33/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94194297. X

[45] 授权公告日 2003 年 12 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1132011C

[22] 申请日 1994. 9. 28 [21] 申请号 94194297. X

[30] 优先权

[32] 1993. 9. 28 [33] US [31] 127922

[32] 1994. 5. 20 [33] US [31] 246441

[86] 国际申请 PCT/US94/11067 1994. 9. 28

[87] 国际公布 WO95/09365 英 1995. 4. 6

[85] 进入国家阶段日期 1996. 5. 27

[71] 专利权人 纽约大学医疗中心

地址 美国纽约州

共同专利权人 苏根公司 杜克大学医疗中心

[72] 发明人 J·施莱辛格 M·L·吉希基

A·M·彭德加斯特 H·阿普

审查员 王 奕

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 吴玉和 姜建成

权利要求书 7 页 说明书 70 页 附图 3 页

[54] 发明名称 鉴定能够调节细胞增殖疾病的待测化合物的方法

[57] 摘要

本发明涉及预防和治疗细胞增殖疾病的组合物和方法, 所述疾病涉及能够与含 SH2 - 和/或 SH3 区的接合蛋白家族成员复合的蛋白酪氨酸激酶或蛋白酪氨酸磷酸酯酶。 本发明部分是基于意外的发现接合蛋白 (GRB - 2) 在体内与细胞内 BCR - ABL 酪氨酸激酶产物结合并且为激活具有致癌潜力的 BCR - ABL 产物所必需。 本发明进一步涉及蛋白酪氨酸激酶/接合蛋白复合物和这些复合物用来鉴别能够减小或抑制这些复合物成员之间相互作用的物质的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种鉴定能调节涉及蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的细胞增殖疾病的待检化合物的方法, 包括:

5 (a) 将至少一种化合物暴露于含蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物功能部分的多肽中保持一段足以使化合物与所述功能部分相结合的时间;

 (b) 除去未结合的化合物; 和

10 (c) 检测与蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物功能部分结合的化合物的存在, 由此鉴定待检化合物能调节涉及蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的细胞增殖疾病。

2. 一种鉴定能调节涉及蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合蛋白复合物的细胞增殖疾病的化合物的方法, 包括将化合物暴露于蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物一段足以使复合物破坏的时间, 并检测蛋白
15 酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的破坏。

3. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的蛋白酪氨酸激酶多肽是跨膜受体蛋白酪氨酸激酶多肽。

4. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的蛋白酪氨酸激酶多肽是细胞内的胞质蛋白酪氨酸激酶多肽。
20

5. 权利要求 4 的方法, 其中细胞内的胞质蛋白酪氨酸激酶多肽是 BCR / ABL 细胞内胞质蛋白酪氨酸激酶多肽。

6. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的蛋白酪氨酸激酶多肽是细胞内核蛋白酪氨酸激酶多肽。

25 7. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的接合多肽为 GRB 多肽。

8. 权利要求 7 的方法, 其中 GRB 多肽为 GRB - 2 多肽。

9. 权利要求 7 的方法, 其中 GRB 多肽是 GRB - 1、GRB - 4、GRB - 7 或 GRB - 10 多肽。

30 10. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的蛋白酪氨酸激酶多肽是 BCR / ABL 细胞内胞质蛋白酪氨酸

酸激酶多肽，并且蛋白酪氨酸激酶多肽/接合多肽复合物的接合多肽是 GRB-2 多肽，这样蛋白酪氨酸激酶多肽/接合多肽复合物为 BCR/ABL 多肽/接合多肽复合物。

11. 权利要求 1 或 2 的方法，其中含有蛋白酪氨酸激酶多肽/接合多肽之功能部分的肽含有至少具有 1 个磷酸化酪氨酸氨基酸残基的肽。

12. 权利要求 1 或 2 的方法，其中含有蛋白酪氨酸激酶多肽/接合多肽复合物之功能部分的肽含有磷酸化区的功能部分

13. 权利要求 1 或 2 的方法，其中含有蛋白酪氨酸激酶多肽/接合多肽复合物之功能部分的肽含有 SH2 区的功能部分。

14. 权利要求 1 或 2 的方法，其中含有蛋白酪氨酸激酶多肽/接合多肽复合物之功能部分的肽含有 SH3 区的功能部分。

15. 权利要求 1 或 2 的方法，其中含有蛋白酪氨酸激酶多肽/接合多肽复合物之功能部分的肽至少含有 4 个连续的 SH2 结合区的氨基酸残基。

16. 权利要求 1 或 2 的方法，其中含有蛋白酪氨酸激酶多肽/接合多肽复合物功能部分的肽含有 SH3 结合区的功能部分。

17. 权利要求 16 的方法，其中 SH3 结合区的功能部分的长度至少为 4 个氨基酸残基。

18. 权利要求 16 的方法，其中 SH3 结合区的功能部分的长度至少为 10 个氨基酸残基。

19. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所鉴定的化合物还能破坏蛋白酪氨酸激酶多肽/接合多肽复合物。

20. 权利要求 1 或 2 的方法，其中能破坏蛋白酪氨酸激酶多肽/接合多肽复合物的化合物还能调节涉及蛋白酪氨酸激酶多肽/接合多肽复合物的细胞增殖疾病。

21. 权利要求 20 的方法，其中所鉴定的化合物还能破坏 BCR/ABL 多肽/GRB-2 多肽复合物。

22. 权利要求 21 的方法，其中能破坏 BCR/ABL/GRB-2 多肽/GRB-2 多肽复合物的化合物还能调节涉及 BCR/ABL 多肽/GRB-2 多肽复合物的细胞增殖疾病。

23. 权利要求 22 的方法，其中细胞增殖疾病是慢性髓细胞性

白血病。

24. 权利要求 22 的方法，其中细胞增殖疾病是急性淋巴细胞性白血病。

25. 权利要求 22 的方法，其中细胞增殖疾病是急性髓细胞性白血病。

26. 一种鉴定能调节涉及蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物的细胞增殖疾病的待检化合物的方法，包括：

(a) 将至少一种化合物暴露于含蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物功能部分的肽中保持一段足以使化合物与所述功能部分结合的时间；

(b) 除去未结合的化合物；和

(c) 检测与蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物功能部分结合的化合物的存在，由此鉴定待检化合物能调节涉及蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物的细胞增殖疾病。

27. 一种鉴定能调节涉及蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物的细胞增殖疾病的化合物的方法，包括将化合物暴露于蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物一段足以使复合物破坏的时间，并检测蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物的破坏。

28. 权利要求 26 或 27 的方法，其中蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物的蛋白酪氨酸磷酸酶多肽是跨膜的受体蛋白酪氨酸磷酸酶多肽。

29. 权利要求 26 或 27 的方法，其中蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物的蛋白酪氨酸磷酸酶多肽是细胞内胞质蛋白酪氨酸磷酸酶多肽。

30. 权利要求 26 或 27 的方法，其中蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物的接合多肽是 GRB 多肽。

31. 权利要求 30 的方法，其中 GRB 多肽是 GRB-2 多肽。

32. 权利要求 30 的方法，其中 GRB 多肽是 GRB-1、GRB-4、GRB-7、或 GRB-10 多肽。

33. 权利要求 26 或 27 的方法，其中含有蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物之功能部分的肽含有至少具有一个磷酸化氨基酸残基的肽。

34. 权利要求 26 或 27 的方法, 其中含有蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物之功能部分的肽含有 SH2 区的功能部分。

35. 权利要求 26 或 27 的方法, 其中含有蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物之功能部分的肽含有 SH3 区的功能部分。

5 36. 权利要求 26 或 27 的方法, 其中含有蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物之功能部分的肽至少含有 4 个连续的 SH2 - 结合区的氨基酸残基。

37. 权利要求 26 或 27 的方法, 其中含有蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物之功能部分的肽含有 SH3 - 结合区的功能部分。

10 38. 权利要求 37 的方法, 其中 SH3 - 结合区的功能部分的长度至少为 4 个氨基酸残基。

39. 权利要求 37 的方法, 其中 SH3 - 结合区的功能部分的长度至少为 10 个氨基酸残基。

15 40. 一种鉴定能调节涉及跨膜受体蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的细胞增殖疾病的待检化合物的方法, 它包括:

(a) 将化合物与能够形成受体酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的细胞接触一段时间, 使得足以使化合物结合到受体蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的受体蛋白酪氨酸激酶多肽上;

20 (b) 检测步骤 (a) 的细胞中存在的受体蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的水平;

(c) 检测步骤 (a) 中未与化合物接触的细胞类型中存在的受体蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的水平; 和

25 (d) 比较步骤 (b) 和步骤 (c) 中所检测到的受体蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的水平, 如果步骤 (c) 检测到的水平高于步骤 (b) 检测到的水平, 那么可鉴定待检化合物能调节涉及受体蛋白酪氨酸激酶多肽 / 接合多肽复合物的细胞增殖疾病。

41. 一种鉴定能调节涉及跨膜受体蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物的细胞增殖疾病的待检化合物的方法, 它包括:

30 (a) 将化合物与能够形成受体酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物的细胞接触一段时间, 使得足以使化合物结合到受体蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物的受体蛋白酪氨酸磷酸酶多肽上;

(b) 检测步骤 (a) 的细胞中存在的受体蛋白酪氨酸磷酸酶多

肽 / 接合多肽复合物的水平;

(c) 检测步骤 (a) 中未与化合物接触的细胞类型中存在的受体蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物的水平; 和

(d) 比较步骤 (b) 和步骤 (c) 中所检测到的受体蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物的水平, 如果步骤 (c) 检测到的水平高于步骤 (b) 检测到的水平, 那么可鉴定待检化合物能调节涉及受体蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / 接合多肽复合物的细胞增殖疾病。

42. 权利要求 40 或 41 的方法, 其中接合多肽是 GRB 多肽。

43. 权利要求 42 的方法, 其中 GRB 多肽是 GRB-2 多肽。

44. 权利要求 42 的方法, 其中 GRB 多肽是 GRB-1、GRB-4、GRB-7, 或 GRB-10 多肽。

45. 鉴定破坏蛋白酪氨酸磷酸酶多肽或蛋白酪氨酸激酶多肽 / GRB-2 接合多肽复合物的化合物的方法, 其包括:

(a) 将形成所述复合物的细胞与一种胞内作用的化合物在足以破坏蛋白酪氨酸磷酸酶多肽或蛋白酪氨酸激酶多肽 / GRB-2 接合多肽复合物的浓度下接触;

(b) 检测步骤 (a) 细胞中复合物的水平; 和

(c) 比较步骤 (b) 中检测到的复合物水平与步骤 (a) 中未接触所述化合物的细胞中的复合物的水平, 如果步骤 (b) 检测到的水平低于所述细胞中的水平, 那么可鉴定此化合物破坏蛋白酪氨酸磷酸酶多肽或蛋白酪氨酸激酶多肽 / GRB-2 接合多肽复合物。

46. 根据权利要求 45 的方法, 其中 GRB-2 接合多肽包括 F-L-I-R-E-S (SEQ ID NO: 4) 或 F-L-V-R-E-S (SEQ ID NO: 5) 的氨基酸序列。

47. 根据权利要求 45 的方法, 其中蛋白酪氨酸磷酸酶多肽或蛋白酪氨酸激酶多肽包括 X-P-X-Y-V/I-N-V/I (SEQ ID NO: 6) 的氨基酸序列。

48. 根据权利要求 45 的方法, 其中所述蛋白酪氨酸磷酸酶多肽或蛋白酪氨酸激酶多肽选自 CD45、LAR、RPTP α 、RPTP β 、RPTP χ 、RPTP κ 。

49. 鉴定能破坏蛋白酪氨酸磷酸酶多肽或蛋白酪氨酸激酶多肽 / GRB-2 接合多肽复合物的待检化合物的方法, 其包括: 将蛋白酪氨酸

酸磷酸酶多肽、蛋白酪氨酸激酶多肽或 GRB-2 接合多肽与待检测化合物接触一段时间，使得待检测化合物足以与蛋白酪氨酸磷酸酶多肽、蛋白酪氨酸激酶多肽或 GRB-2 接合多肽结合；如果待检测化合物结合所述蛋白酪氨酸磷酸酶多肽，蛋白酪氨酸激酶多肽或 GRB-2 接合多肽，那么可鉴定待检化合物能破坏蛋白酪氨酸磷酸酶多肽或蛋白酪氨酸激酶多肽 / GRB-2 接合多肽复合物。

50. 根据权利要求 49 的方法，其中 GRB-2 接合多肽包括 F-L-I-R-E-S (SEQ ID NO: 4) 或 F-L-V-R-E-S (SEQ ID NO: 5) 的氨基酸序列。

51. 根据权利要求 49 的方法，其中蛋白酪氨酸磷酸酶多肽或蛋白酪氨酸激酶多肽包括 X-P-X-Y-V/I-N-V/I (SEQ ID NO: 6) 的氨基酸序列。

52. 根据权利要求 49 的方法，其中蛋白酪氨酸激酶多肽或蛋白酪氨酸激酶多肽选自 CD45、LAR、RPTP α 、RPTP β 、RPTP κ 、RPTP κ 。

53. 根据权利要求 45 的方法，其中蛋白酪氨酸磷酸酶多肽或蛋白酪氨酸激酶多肽的 GRB 接合多肽 SH2- 或 SH3 结合部分包括磷酸化功能区。

54. 根据权利要求 45 的方法，其中蛋白酪氨酸激酶多肽或蛋白酪氨酸激酶多肽的 GRB 接合多肽 SH2- 或 SH3 结合部分包括 SH2- 结合区的至少 4 个连续的氨基酸残基。

55. 根据权利要求 45 的方法，其中蛋白酪氨酸激酶多肽或蛋白酪氨酸磷酸酶多肽的 GRB 接合多肽 SH2- 或 SH3 结合部分包括 SH3- 结合功能区。

56. 根据权利要求 55 的方法，其中 SH3- 结合功能区的长度为至少 4 个氨基酸残基。

57. 根据权利要求 55 的方法，其中 SH3- 结合功能区的长度为至少 10 个氨基酸残基。

58. 根据权利要求 45 的方法，其中鉴定的化合物破坏蛋白酪氨酸激酶多肽或蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / GRB-2 接合多肽复合物。

59. 根据权利要求 45 的方法，其中鉴定的化合物调节涉及蛋白酪氨酸激酶多肽或蛋白酪氨酸磷酸酶多肽 / GRB-2 接合多肽复合物的

细胞增殖性疾病。

60. 根据权利要求 59 的方法，其中鉴定的化合物破坏 BCR/ABL 多肽/GRB-2 接合多肽复合物。

61. 根据权利要求 60 的方法，其中鉴定的化合物调节涉及
5 BCR/ABL 多肽/GRB-2 接合多肽复合物的细胞增殖性疾病。

62. 根据权利要求 61 的方法，其中细胞增殖性疾病为慢性髓细胞性白血病。

63. 根据权利要求 61 的方法，其中细胞增殖性疾病为急性淋巴细胞性白血病。

10 64. 根据权利要求 61 的方法，其中细胞增殖性疾病为急性髓细胞性白血病。

鉴定能够调节细胞增殖疾病的待测化合物的方法

本申请是美国申请号08/246,441,申请日1994年5月20日的部分连续申请,该申请的全部内容均引入本文供参考。美国申请号08/246,441是美国申请号08/127,922,申请日1993年9月28日的部分连续申请。

1. 引言

本发明涉及预防和治疗细胞增殖疾病的组合物和方法,所述疾病涉及一种能与一族含SH2-和/或SH3区的接合蛋白复合的蛋白酪氨酸激酶或蛋白酪氨酸磷酸酯酶(phosphatase)。本发明部分是基于惊奇地发现接合蛋白(GRB-2)在体内与细胞内的BCR-ABL酪氨酸激酶产物结合且为激活致癌潜力的BCR-ABL产物所需,因此破坏GRB-2的发信号能力,可反转细胞的转化表现型并减缓动物的肿瘤生长。本发明还涉及蛋白酪氨酸激酶/接合蛋白复合物和这些复合物用来识别能破坏这些复合物之间相互作用的物质的用途。

2. 背景技术

2.1. 蛋白质的磷酸化和信号转导

细胞很大程度上通过接受其直接的环境的刺激物而依赖于细胞外分子。这些细胞外信号对正确调节多种多样的细胞过程是必要的,如,分化、收缩性、分泌、细胞分裂、接触抑制及代谢。细胞外分子(如包括激素、生长因子、淋巴细胞活素或神经递质)起与特异的细胞表

面受体结合的配体的作用。这些配体与其受体结合触发级联反应，引起原刺激物的扩增和上述各个细胞过程的协同调节。除了正常的细胞过程之外，受体及其细胞外配体可包含在不正常的或可能有害的过程中如病毒-受体的相互作用、炎症和细胞转化为癌状态。

该过程的主要特征，所称的信号转导（最近的综述，参见Posada等，1992，Mol. Biol. Cell 3 : 583 - 592; Hardie, D. G., 1990, Symp. Soc. Exp. Biol. 44 : 241 - 255）是某些蛋白质的可逆性磷酸化。

氨基酸残基的磷酸化或脱磷酸化触发调节蛋白质的构型变化而改变了其生物学特性。蛋白质通过蛋白激酶而磷酸化并通过蛋白磷酸酯酶而脱磷酸化。按照他们所作用的氨基酸残基，将蛋白激酶和磷酸酯酶分类；一类是丝氨酸-苏氨酸激酶和磷酸酯酶（Scott等人综述，1992，2 : 289 - 295），他们作用于丝氨酸和苏氨酸残基，另一类是酪氨酸激酶和磷酸酯酶（Fischer等人综述，1991，Science 253 : 401 - 406; Schlessinger等，1992，Neuron 9 : 383 - 391; Ullrich等人，1990，Cell 61 : 203 - 212），他们作用于酪氨酸残基。磷酸化是一种包括竞争磷酸化和脱磷酸化反应的动态过程，并且在任何给定的时刻，磷酸化的水平都反映了在该时刻蛋白激酶和磷酸酯酶催化这些反应的相对活性。

虽然蛋白磷酸化大多数发生在丝氨酸和苏氨酸的氨基酸残基上，但在酪氨酸残基上也发生磷酸化，并且已开始引起人们极大的兴趣，因为发现许多致癌物和生长因子受体都具有内在的蛋白酪氨酸激酶活性。现在充分地确定了蛋白酪氨酸磷酸化在生长因子信号转导。细胞循环进展和肿瘤转化中的重要性（Cantley等，1991，Cell 64 : 281 - 302; Hunter T., 1991，Cell 64 : 249 - 270; Nurse,

1990, Nature 344 : 503 - 508; Schlessinger等, 1992, Neuron 9 : 383 - 391; Ullrich等, 1990, Cell 61 : 203 - 212) 据显示, 破坏正常生长控制途径而产生癌基因是由组成大量显性癌基因蛋白质的蛋白酪氨酸激酶的激活或过表达引起的 (Hunter, T. 的综述, 1991, Cell 64 : 249 - 270)。

2. 2. 蛋白酪氨酸激酶

蛋白酪氨酸激酶包含一大族蛋白, 包括许多生长因子受体和潜在的癌基因, 它虽与丝氨酸/苏氨酸特异蛋白激酶起源相同但有所不同 (Hanks等, 1988, Science 241 : 42 - 52)。蛋白激酶还可被定义为受体或非受体。

对受体型蛋白酪氨酸激酶 (具有跨膜拓扑学) 已进行了广泛的研究。认为特异性配体与细胞外的受体蛋白酪氨酸激酶的区域结合诱导受体二聚作用并且其本身的酪氨酸残基磷酸化。胞质受体的区域的各个磷酸酪氨酸残基可作为与宿主胞质信号分子相互作用的特异性结合位点, 由此激活各种信号转导途径 (Ullrich等, 1990, Cell 61 : 203 - 212)。

细胞内胞质非受体蛋白酪氨酸激酶可广义地定义为不含疏水性跨膜区的那些蛋白酪氨酸激酶。在这种广义的分类中, 可将已知的胞质蛋白酪氨酸激酶分成四种不同的形态类型: SRC族 (Martinez等, 1987, Science 237 : 411 - 414; Sukegawa等, 1987, Mol. Cell. Biol. 7 : 41 - 47; Yamanishi等, 1987, 7 : 237 - 243; Marth等, 1985, Cell 43 : 393 - 404; Dymecki等, 1990, Science 247 : 332 - 336), FES族 (Ruebroek等, 1985, EMBO J. 4 : 2897 - 2903; Hao等, 1989, Mol. Cell. Biol. 9 : 1587 - 1593), ABL族 (Shtivelman等, 1986, Cell 47 : 277 - 284; Kruh等, 1986, Science 234 :

1545 - 1548), 和JAK族。尽管在其总的分子结构上有区别, 但这些形态类型的胞质蛋白酪氨酸激酶的各个成员除共同具有其催化激酶区外, 还都具有非催化区。此非催化区为SH2 (SRC同源区 2; Sadowski等, Mol. Cell. Biol. 6 : 4396 - 4408; Koch等, 1991, Science 252 : 668 - 674) 区和SH3区 (Mayer等, 1988, Nature 332 : 269 - 272)。据认为非催化区在信号转导期间调节蛋白质-蛋白质相互作用中是重要的 (Pawson等, 1992, Cell 71 : 359 - 362)。

尽管对胞质蛋白酪氨酸激酶的代谢作用的了解不如对受体型蛋白酪氨酸激酶的代谢作用了解的清楚, 但在解释某些涉及这类分子的过程已取得显著进展。例如, lck和fyn (SRC族成员) 已表明与CD4/CD8和T细胞受体复合物相互作用, 并因此参与T细胞的激活 (Veillette等, 1992, TIG 8 : 61 - 66)。已将某些胞质蛋白酪氨酸激酶连接在细胞环的某些相上 (Morgan等, 1989, Cell 57 : 775 - 786; Kipreos等, 1990, Science 248 : 217 - 220; Weaver等, 1991, Mol. Cell. Biol. 11 : 4415 - 4422)。胞质蛋白酪氨酸激酶参与了神经元的产生 (Maness, P., 1992, Dev. Neurosci. 14 : 257 - 270)。已确立因突变或过表达而使激酶活性失调是潜在的细胞转化的机制 (Hunter等1985, 同上; Ullrich等, 同上)。

2. 3. G-蛋白和信号转导

鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 (G-蛋白; Simon等, 1991, Science 252 : 802 - 808; Kaziro等, 1991, Ann. Rev. Biochem. 60 : 349 - 400) 如Ras (参见Lowy等, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62 : 851 - 891) 在由受体酪氨酸激酶传递细胞分裂信号中起必不可少的作用。以Ras为例, 配体结合使受体酪氨酸激酶激活而导致活性GTP结合形式的Ras分子积累 (Gibbs等, 1990, J. Biol. Chem. 265 : 20437 -

2044; Satoh等, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 5993 - 5997; Li等, 1992, Science 256 : 1456 - 1459; Buday等, 1993, Mol. Cell. Biol. 13 : 1903 - 1910; Medema等, 1993, Mol. Cell. Biol. 13 : 155 - 162)。病毒癌基因酪氨酸激酶的转化也需要Ras激活(Smith等, 1986, Nature 320 : 540 - 43)。

通过GTP酶激活蛋白(GAPs)和鸟嘌呤核苷酸交换因子的相对作用, 用GAPs刺激Ras上的缓慢的固有速度的GTP水解并用交换因子刺激Ras上的基本速度的GDP与GTP的交换来调节Ras的活性。因此, GAPs作为Ras功能的负调节剂, 而交换因子作为Ras激活剂。

近来, 发现哺乳动物GRB-2蛋白直接偶合受体酪氨酸激酶到哺乳动物的Ras交换因子Sos和Drosophila, 在此基础上确立了激活的受体酪氨酸激酶和Ras之间的直接连接(Buday等, 1993, Cell 73 : 611 - 620; Egan等, 1993, Nature 363 : 45 - 51; Li等, 1993, Nature 363 : 85 - 87; Gale等, 1993, Nature 363 : 88 - 92; Rozakis - Adcock等, 1993, Nature 363 : 83 - 85; Chardin等, 1993, Science 260 : 1338 - 1343; Oliver等, Cell 73 : 179 - 191; Simon等, 1993, Cell 73 : 169 - 177), 这里所述的哺乳动物GRB-2蛋白质是26千道尔顿蛋白, 它含有一个SH2和两个SH3区(Lowenstein等, 1992, Cell 70 : 431 - 442)。GRB-2 SH3区结合到存在于Sos交换因子的富含脯氨酸序列上的同时, GRB-2 SH2区结合到受体酪氨酸激酶中的特异性酪氨酸磷酸化序列上。所以, GRB-2与受体激酶的结合允许Sos补充到质膜上, Ras被定位于该膜上(Schlessinger, J., 1993, TIBS 18 : 273 - 275)。

2. 4. 白血病形成中的BCR-ABL

通过改变蛋白质相应的酶活性, 它们与其它细胞组分不适宜的结

合（如上述2.3.节或两节中都提到的）可激活正常细胞如蛋白酪氨酸激酶的致癌潜力。

例如，通过酶活性变化和/或改变非共价的蛋白质-蛋白质相互作用，BCR-ABL蛋白酪氨酸激酶致癌蛋白可转化细胞。编码BCR-ABL致癌蛋白的基因是由在染色体9上的cABL蛋白酪氨酸激酶序列易位到染色体22上的BCR序列产生的嵌合致癌基因（Kurczok等人综述，1988，N. Engl. J. Med. 319：990 - 998 和Rosenberg等人，1988，Adv. in Virus Res. 35：39 - 81中的评述）。BCR-ABL致癌基因参与Philadelphia染色体（Ph¹）阳性的人类白血病发病机理（Pathogenesis）。也就是说，至少在90 - 95%的慢性粒性白血病（CML）病例中发现了Ph¹染色体，它是一种由造血干细胞的癌转化产生的克隆癌（Fialkow等人，1977，Am. J. Med. 63：125 - 130），并且在大约20%患急性淋巴细胞性白血病（ALL）的成人，5%患ALL的儿童和2%患急性骨髓性白血病（AML）的成人中也观察到了Ph¹染色体（Whang - Peng等人，1970，Blood 36：448 - 457；Look, A. T., 1985，Semin. Oncol. 12：92 - 104）。BCR-ABL基因产生两种交替嵌合的蛋白，P210 BCR-ABL和P185 BCR-ABL，它们分别是CML和ALL的特征。进一步，最近已直接证明BCR-ABL基因的产物是CML的诱导剂（Skorski等人，1993，J. Clin Invest. 92：194 - 202；Snyder等人，1993，Blood 82：600 - 605）。

在临床上，通过两个阶段过程来表示CML的特征。该病开始时是以未定型骨髓母细胞库的快速增殖为标志的慢性期。因为保持晚期分化，引起循环的成熟粒性白细胞库的快速增殖，几周至很多年后，产生加速骨髓增殖的状态，其中，骨髓细胞逐渐丧失其晚期分化的能力。

这时，常常出现血小板增多，嗜碱细胞增多和克隆细胞遗传异常。这些异常是晚期胚细胞危险阶段的信号，在此期间，未成熟的胚细胞迅速增殖并且病人不可避免地死亡。

前面已表明，与正常的 c - ABL蛋白相比BCR - ABL蛋白中酪氨酸激酶增多并且具有转化的能力 (Konopka等人, 1984, Cell 37 : 1035 - 1042)。BCR最初的编码顺序特异性地激活酪氨酸激酶并且改变BCR - ABL的潜力 (Muller等人, 1991, Mol. Cell. Biol. 11 : 1785 - 1792; McWhirter等人, 1991, Mol. Cell. Biol. 11 : 1553 - 1565)。BCR最初的编码顺序能够以依赖磷酸酪氨酸的方式与ABL SH2区结合 (Pendergast等人, 1991, Cell 66 : 161 - 171)，与ABL SH2结合必需的BCR序列缺失使得不能转化成BCR - ABL (Pendergast等人, 1991, Cell 66 : 161 - 171)。另外，已证明，在体外，BCR可以与由其它蛋白编码的某些其它SH2区结合 (Muller等人, 1992, Mol. Cell. Biol. 12 : 5087 - 5093)。同时从这些结果可以推断，在BCR - ABL致癌蛋白的致癌性中涉及SH2区与BCR结合的某个方面，BCR - ABL引起癌形成的机理仍然不清楚。例如大量已知的含已知存在蛋白质的SH2区，BCR - ABL效应器的鉴定都有必要进一步研究。

3. 本发明概要

本发明涉及预防和治疗细胞增殖疾病的组合物和方法，所述疾病涉及一种能与一族含SH2-和/或SH3区的接合蛋白复合的蛋白酪氨酸激酶或蛋白酪氨酸磷酸酯酶。本发明进一步涉及蛋白酪氨酸激酶/接合蛋白复合物，蛋白酪氨酸磷酸酯酶/接合蛋白复合物，和这些复合物用来鉴定能破坏这些复合物组分之间相互作用的物质的应用。

本文将“蛋白酪氨酸激酶”缩写为“PTK”，并且将“蛋白酪氨

酸磷酸酯酶”缩写为“PTP”。除另外说明外，“PTK”可以指跨膜，受体类型的蛋白酪氨酸激酶或胞质型蛋白酪氨酸激酶，并且类似地，除另外说明外，“PTP”可以指跨膜受体型蛋白酪氨酸磷酸酯酶或胞质蛋白酪氨酸磷酸酯酶。

本发明部分基于意外的发现接合蛋白即GRB-2在体内与细胞内的BCR-ABL PTK产物的结合，并且GRB-2为激活BCR-ABL产物致癌潜力所必需。部分地通过揭示破坏信号转导可引起转化表现型细胞的逆转和抑制动物肿瘤的生长，本发明人首先证明了信号转导途径成员之间相互作用的生理关系。下文6-14节研究实施例中描述了该发现相应的数据。因此，本发明代表第一例，由此揭示，含有SH2-和/或SH3区的接合族蛋白，尤其是GRB亚族蛋白中的GRB-2成员参与细胞增殖/激活的形式和保持，并证明了在癌形成，转化过程和人类癌形成中所包含的不正常细胞增殖。更进一步，就BCR-ABL而言，本发明揭示了BCR-ABL产物的第一个效应物（即GRB-2）。

3.1. 缩写

下表列出了在蛋白质化学中通常使用的和在本文中所使用的氨基酸单字母或三个字母的缩写。

氨基酸	一个字母的代码	三个字母的代码
丙氨酸	A	Ala
精氨酸	R	Arg
天冬酰胺	N	Asn
天冬氨酸	D	Asp
半胱氨酸	C	Cys
谷氨酸	E	Glu
谷氨酰胺	Q	Gln
甘氨酸	G	Gly
组氨酸	H	His
异亮氨酸	I	Ile
亮氨酸	L	Leu
赖氨酸	K	Lys
甲硫氨酸	M	Met
苯丙氨酸	F	Phe
脯氨酸	P	Pro
丝氨酸	S	Ser
苏氨酸	T	Thr
色氨酸	W	Trp
酪氨酸	Y	Tyr
缬氨酸	V	Val
非特定的	X	

4. 附图的说明

图1. 由BCR-ABL通过Ras刺激转录的活化要求在BCR第一外显子中存在酪氨酸177。用0.5 μ g指示BCR-ABL cDNA+/- 5 μ g H-Ras (17N) cDNA和1 μ g pB4X-CAT报道质粒一起转染NIH 3T3细胞。如下文9.1.1.节中概括的, 在转染后48小时采集细胞并测定其CAT活性。用任意单位来记录数据; 基础信号归应于该报道质粒的活性。

图2. 由BCR-ABL通过Ras刺激转录的活化要求GRB2 SH3区的存在。用任一GRB2缺失的突变体, 和1 μ g pB4X-CAT报道质粒一起来转染表达p210 BCR/ABL细胞的Rat 1细胞。如下文9.1.1.节中概括的那样, 转染后48小时, 采集细胞并且测定其CAT活性。LANE 1: RAT 1; LANE 2: RAT 1/p210/pCEN Vector; LANE 3: RAT 1/p210/pCEN GRB2 Δ N'; LANE 4: RAT 1/p210/pCEN GRB2 Δ C'。用将RAT 1规定为1的任意单位来记录数据。基础信号应归于该报道质粒的活性。数值为重复+/-变化的均值。

图3. 血红蛋白在表达野生型和变异型GRB2蛋白的K562细胞中的含量。如Feinstein等人(1992, Oncogene 7: 1853 - 1857)所述用联苯胺着色剂来制备细胞溶菌产物并且测定血红蛋白的含量。用三份样品来分析每种细胞的数量。数据代表每1 mg用指示结构转染的总细胞蛋白质中血红蛋白的量。

5. 本发明详细说明

下文描述的是预防和治疗细胞增殖性疾病的组合物和方法, 所述疾病涉及一种能够与一族含SH2-和/或SH3区接合蛋白复合的蛋白酪氨酸激酶或蛋白酪氨酸磷酸酯酶。本文还描述了蛋白酪氨酸激酶/接合蛋白复合物, 蛋白酪氨酸磷酸酯酶/接合蛋白复合物, 生产这些复

合物的方法，和这些复合物的应用。这些应用可包括，但不限于对能破坏这些复合物之间相互作用的物质的鉴定。

本发明部分基于意外的发现，即在体内接合蛋白（adaptor protein）（GRB-2）与细胞内的BCR-ABL产物的结合为激活BCR-ABL产物致癌潜力所需，并且破坏GRB-2信号转导可逆转转化表现型细胞和减慢动物的肿瘤生长。在下文6-14节的研究实施例中描述了代表该发现的数据。

5.1. 蛋白酪氨酸激酶/接合蛋白复合物

如下所述本发明PTK/接合蛋白复合物至少包含PTK族蛋白中的一员和至少包含接合蛋白族中的一员。在标准生理状态下，这种复合物的组分能够与一种或多种其它PTK/接合蛋白复合物组分形成稳定的，非共价的连接物。

本发明PTK/接合蛋白复合物的PTK组分是细胞内胞质非受体型PTKs，细胞内核非受体型PTKs，或跨膜受体型PTKs，其中每一种都包含一种或多种特征肽区。该区可包括一种或多种催化区，所述催化区可包括，但不限于酪氨酸激酶区。对应于约30 kDa的分子量，酪氨酸激酶催化区通常在约250-300个氨基酸的长度内变化。酪氨酸激酶催化区的位置（但不固定）通常接近蛋白的羧基端。在酪氨酸激酶区内可见经过简短保护的氨基酸残基的延长，这在具有氨基酸残基长度可变性延长的序列中交替进行，其中所述序列未经过高度保护。相应于极高度保护的酪氨酸激酶催化区氨基酸残基，已编译出交感序列并且是本领域普通技术人员公知的。例如见Hanks等人（Hanks等人，1991, Science 241 : 42 - 52）和Wilks（Wilks, A. F., 1990, Prog. Growth Factor Res. 2 : 97 - 111）的报道，二者全部引入本文以供参考。此类交感序列是PTK特有的序列D-L-R-A-

A - N 或 D - L - A - A - R - N, 和 P - I / V - K / R - W - T / M - A - P - E。该序列肽链片断 (motifs) 的其它实例见 Wilks, A. F., 1990, *Progress in Growth Factor Res.* 2 : 97 - 111。

本发明 PTK/接合蛋白复合物中 PTK 组分还可包括一种或多种非催化区, 所述非催化区可包括但不限于一种或多种 SH2 和 / 或一种或多种 SH3 区, 一种或多种 SH2 结合和 / 或一种或多种 SH3 结合的肽区, 和 / 或 (在受体 PTKs 情况下) 疏水跨膜区。SH2 (即, Src 同源区 2) 非催化区通常大约为 100 个氨基酸残基长。在数个, 优选 5 个充分保护的氨基酸序列肽链片断内, 此类 SH2 区可含有许多高度保护的或不变的氨基酸残基, 这是本领域普通技术人员公知的。例如见 Koch 等人 (Koch 等人, 1991, *Science* 252 : 668 - 674), 该文全面引入本文以供参考。例如, 氨基酸交感序列可以包括, 但不限制于 F - L - I - R - E - S 和 F - L - V - R - E - S。这些交感序列的 R 残基在 SH2 区中是不变的。多个可变的氨基酸序列片断的延长 (当变化时, 通常含一个或多个 G 或 P 残基) 将充分保护的氨基酸序列肽链片断分离。

SH3 (即, Src 同源区 3) 非催化区大约为 50 个氨基酸长。但在 SH3 区内的氨基酸序列是可变的, 该区的三维、三级结构是充分保护的。SH3 区的三级结构是本领域普通技术人员公知的。例如见 Koyama 等人 (Koyama 等人, 1993, *Cell* 72 : 945 - 952), 该文全面引入本文以供参考。

SH2-结合肽区是本领域公知的。例如见 Songyang 等人 (Songyang 等人, 1993, *Cell* 72 : 767 - 778), Rotin 等人 (Rotin 等人, *EMBO J.* 11 : 559 - 567), 和 Skolnick 等人 (Skolnick 等人, 1993, *EMBO J.* 12 : 1929 - 1936), 它们全面引入本文以供参考。SH2 区

可表现某种SH2结合区的特异性。例如，SH2-结合肽区可包括，但不限制于磷酸酪氨酸-亲水的-亲水的-异亮氨酸/脯氨酸氨基酸序列肽链片断（例如，通常该序列肽链片断是src, fyn, lck, fgr, abl, crk和nck蛋白中发现的SH2区优选的），和磷酸酪氨酸-疏水的- $\times$ -疏水的，和/或磷酸酪氨酸-蛋氨酸- $\times$ -蛋氨酸（例如，通常，该序列肽链片断是P 85，磷酸酶C- γ 和SHPTP2蛋白中发现的SH2区优选的）。并且，已测定出由结合GRB-2蛋白的SH2区的几种蛋白质的分析区产生的交感序列是X-P-X-Y-V/I-N-V/I。另外，SH2-结合肽区可包括富含部分或全部磷酸化的丝氨酸和苏氨酸残基的区段（Pendergast等人，1991，Cell 66：161-171）。

SH3结合肽区也是本领域普通技术人员公知的。例如见Ren等人（Ren等人，1993，Science 259：1157-1161）和Cicchetti等人（Cicchetti等人，1992，Science 257：803-806），该文全面引入本文以供参考。该SH3-结合肽区通常富含脯氨酸残基，尽管除了单一的脯氨酸外氨基酸残基对SH3结合也是重要的。SH3结合区可能的交感序列为X-P-X-X-P-P-P疏水基-X-P。进一步，已测定GRB-2的SH3区为P-P-P-V-P-P-R-R，它是在SOS蛋白中发现的一种氨基酸序列肽链片断（Li等人，1993，Nature 363：8588；Schlessinger，1993，TIBS, 18：273-275）。

例如，本发明PTK/接合蛋白复合物中细胞内胞质PTK组分可包括Src族成员，这类分子如src, yes, fgr, fyn, lyn, hck, lck和blk；Fes族成员如fes和fer；Abl族成员如abl和arg；和Jak族成员如jak1和jak2。在本发明优选方案中，PTK/接合蛋白复合物中PTK组分是BCR-ABL基因的细胞内PTK产物。例如，本发明PTK/接合蛋白复合物中跨膜受体PTK组分可包括分子如FGF受体，Sevenless/ROS，胰岛素

受体, PDGF受体, EGF受体族的生长因子受体或任何其它与接合蛋白相关的分子(例如见Lowensteir等人, 1992, Cell 70 : 431 - 442)。

本发明PTK/接合蛋白复合物中接合蛋白组分包含一种或多种SH2和/或一种或多种SH3非催化区。可以为接合蛋白的一部分的SH2和SH3区如上在关于PTK组分中描述。例如, 可以为本发明PTK/接合蛋白复合物组分的接合蛋白可包括p85, c-Crk, SHC, Nck, ISGF3 α , 鸟嘌呤三磷酸酶激活剂蛋白(GAP), 和GRB亚族蛋白如GRB1, GRB-2, GRB-3, GRB-4, GRB-7和GRB-10。在优选实施方案中, 本发明PTK/接合蛋白复合物包含BCR-ABL基因的PTK产物和GRB-2蛋白。

利用下文5.3.1节中所述的方法可以基本上纯化本发明复合物, 和/或本发明复合物中的各个组分。并且, 通过使用各种方法可以生产本发明复合物中PTK和/或接合蛋白组分, 其中所述方法包括, 但不限制于下文5.3.2节中所述的化学合成或重组DNA技术。

5.2. 蛋白酪氨酸磷酸酯酶/接合蛋白复合物

本发明PTP/接合蛋白复合物至少包含PTP族蛋白中的一员和至少包含接合蛋白族中的一员。在标准生理状态下, 该复合物组分能够与一种或多种其它PTP/接合蛋白复合物组分形成稳定的, 非共价连接物。

本发明PTP/接合蛋白复合物中的PTP组分是胞质, 细胞内, 非受体PTPs或跨膜, 受体型PTPs, 其中每一种都包含一个或多个特征肽区。该区可包括一个或多个催化区, 它可包括, 但不限制于酪氨酸磷酸酯酶区。通常, 酪氨酸磷酸酯酶区大约为230个氨基酸长。该催化磷酸酯酶区中大约40个氨基酸残基受到高度保护, 并且其中通常含有更高度保护的具有I/V-H-C-X-A-G-X-X-R-S/T-G交感序列的11个氨基酸残基片断。非受体PTPs通常含有一个这

样的催化区，同时跨膜受体PTPs通常含有两个这样由大约58个氨基酸残基长的肽片断分开的催化区。

本发明PTP/接合蛋白复合物中的PTP组分还可包括一个或多个非催化区，它们可包括，但不限制于一个或多个SH2区，一个或多个SH3区，一个或多个SH2-结合区，和/或一个或多个SH3-结合区。上述5.2节描述了这些非催化区中的每一个。

本发明PTP/接合蛋白复合物中的跨膜，受体PTP组分可包括，例如CD45、LAR、RPTP α 、RPTP β 、RPTP χ 和RPTPk。本发明PTP/接合蛋白复合物的细胞内，胞质PTP组分可包括，例如PTP1C，PTP1D和corkScrew。

5.3. PTK/接合蛋白和PTP/接合蛋白复合物的提纯和生产

5.3.1. 提纯方法

可将本发明PTK/接合蛋白和PTP/接合蛋白复合物提纯，即至少可除掉90%（以重量计）的其它蛋白，糖蛋白和其它相关的大分子，如果需要，至少可除掉99%。利用本领域技术人员公知的各种方法可以实现该提纯，所述方法如联合使用标准方法来处理含有PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白的细胞，组织或液体，所述标准方法例如硫酸铝沉淀法，分子筛色谱法，和/或离子交换色谱法。可选择性地（或另外）通过免疫亲和色谱法，使用将抗体固定在上面的免疫吸附柱可以提纯PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物，其中所述免疫吸附柱能够结合PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物中的一种或多种组分。该抗体可以是起源单克隆或多克隆的。其它对于PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物有用的亲和提纯类型可利用例如与催化区（即PTK的激酶区或PTP的磷酸酯酶区）或PTK，PTP，和/或复合物中接合蛋白组分的非催化区的固定的结合位点结合的固相底物，以这种

方式结合时不破坏复合物。

通过生物化学方法，本发明PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白可除去各种细胞或组织来源物。例如，就纯化天然存在的PTK/接合蛋白复合物而言细胞来源物可包括杆状病毒感染的SF9细胞，A-431，CHO和/或3T3细胞。在本发明的优选实施方案中，PTK/接合蛋白复合物包含BCR-ABL和GRB2蛋白。提纯该PTK/GRB-2复合物的来源可包括，但不限制于K562，NMJ-01，和ALL-1细胞系。

5.3.2. 合成方法

合成能够作为本发明PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物组分的多肽或其片断的方法是本领域普通技术人员公知的。例如见Creighton 1983, *Proteins: Structure and Molecular Principles*, W. H. Freeman and Co., NY, 该文全面引入本文以供参考。使用本领域技术人员公知的标准生化技术可以使分别合成或重组产生的PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的组分重新构形成复合物。例如，可以在室温下将含有PTK/接合蛋白复合物组分的样品混合在用约大于150mM的NaCl缓冲的，生理pH在7左右的溶液中。例如，可使用含20mM Tris-HCl, pH7.4, 137mM NaCl, 10%甘油, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5%脱氧胆酸盐和20mM EDTA的缓冲剂。该方法也可以用于PTP/接合蛋白组合物的重新构成。

本文描述了通过表达编码PTK, PTP和/或接合蛋白的核酸来制备本发明PTK/接合蛋白复合物的组分的方法。可使用本领域技术人员公知的方法来构成含PTK, PTP, 和/或接合蛋白的编码序列和相应的转录/翻译控制信号的表达媒介。例如，这些方法包括体外重组DNA技术，合成技术和体内重组/基因重组。另外，可以使用自动合成仪来进行DNA和RNA的合成。例如，见Maniatis等人在1989, *Molecular*

Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. 和 Ausubel 等人在 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. 中所述的技术。

可利用各种宿主-表达媒介系统来表达本发明 PTK/接合蛋白, PTP/接合蛋白复合物组分的编码序列。这些包括但不限于微生物如由含有 PTK, PTP 或接合蛋白编码序列的重组噬菌体 DNA, 质粒 DNA 或装配型质粒 DNA 表达媒介转化的细菌(例如 E.coli, B. Subtilis); 由含有 PTK, PTP, 和/或接合蛋白编码序列的重组酵母表达媒介转化的酵母(例如, Pichia 酵母); 由含有 PTK, PTP, 和/或接合蛋白编码序列的重组病毒表达媒介(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统; 由含有 PTK, PTP, 和/或接合蛋白编码序列的重组病毒表达媒介(例如, 花椰菜花叶病毒, CaMV; 烟草花叶病毒, TMV)感染的, 或由含有 PTK, PTP, 和/或接合蛋白编码序列的重组质粒表达媒介(例如, Ti 质粒)转化的植物细胞系统; 或隐匿含有由哺乳动物细胞基因组衍生的启动子(例如, 金属硫基组氨酸三甲基内盐启动子)或由哺乳动物病毒衍生的启动子(例如, 腺病毒后期启动子; 痘苗病毒 7.5k 启动子)的重组表达结构的哺乳动物细胞系统。

在细菌系统中, 依赖于表达 PTK/接合蛋白或 PTP/接合蛋白复合物的应用, 可有益地选择许多表达媒介。例如, 当要生产大量 PTK/接合蛋白或 PTP/接合蛋白复合物来产生抗体或筛选肽系时, 可直接表达易于提纯的高度融合蛋白产物的媒介是合乎需要的。这些媒介包括但不限于 E.coli; 表达媒介 pUR278 (Ruther 等人, 1993, EMBO J. 2 : 1791), 其中 PTK, PTP, 和/或接合蛋白编码序列可以与 lac Z 编码区以形成框架的方式——连接到媒介中, 产生融合蛋白;

pIN媒介 (Inouye等人, 1985, Nucleic Acids Res. 13 : 3101 - 3109; Van Heeke等人, 1989, J. Biol. Chem. 264 : 5503 - 5509) 等。也可以用pGEX媒介用谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 将外源性多肽表达为融合蛋白。通常, 该融合蛋白是可溶的并且通过吸附到谷胱甘肽-琼脂糖珠上后在游离谷胱甘肽存在下洗脱可以很容易地从溶解的细胞中提纯。所设计的pGEX媒介包含凝血酶或因子 Xa 蛋白酶裂解部位使得克隆PTK和/或接合蛋白可以从GST部分中释放出来。

在昆虫系统中, 用Autographa Californica核性多汗症病毒 (AcNPV) 作为媒介来表达外源性基因, 该病毒在Spodoptera frugiperda细胞中生长。可将PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物组分的编码序列——克隆到病毒的非必需区 (例如Polyhedrin基因) 并在AcNPV启动子 (例如Polyhedrin启动子) 控制下插入。成功地插入编码序列将灭活Polyhedrin基因并且产生未咬合的重组病毒 (即缺少由Polyhedrin基因编码的蛋白质包膜的病毒)。然后用这些重组病毒来感染用于其中表达插入基因的Spodoptera frugiperda细胞。(例如, 见Smith等人, 1983, J. Virol., 46 : 584; Smith, 美国专利4, 215, 051)。

在哺乳动物宿主细胞中, 可以利用许多以病毒为基础的表达系统。在以腺病毒作为表达媒介时, 可以将PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物组分的编码序列连接到腺病毒转录/翻译控制复合物, 例如后期启动子和三部分组成的先导序列上。然后, 通过体外或体内重组, 可以将嵌合基因插到腺病毒基因组中。插到病毒基因组的非必需区 (例如E₁或E₃区) 将产生活的并且能在感染宿主体内表达PTK, PTP, 和/或接合蛋白的重组病毒 (例如见Logan等人, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 3655 - 3659)。有效地翻译插入的

PTK, PTP, 和/或接合蛋白编码序列也要求特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。在将全部PTK, PTP或接合蛋白基因, 包括其特定起始密码子和相邻序列插入适宜的表达媒介中时, 不需要另外的翻译控制信号。然而, 当只将PTK, PTP或接合蛋白编码序列中的部分插入时, 必须提供外源性翻译控制信号, 包括ATG起始密码子。更进一步, 起始密码子必须具有所需要编码序列的阅读密码以确保翻译全部插入序列。这些外源性翻译控制信号和起始密码子可以是各种来源的, 即可以是天然的, 又可以是合成的。通过包含适宜的转录增强因子元素, 翻译终止符可促进表达的有效性(见Bittner等人, 1987, Methods in Enzymol. 153 : 516 - 544)。

另外, 可以选择用来调节插入序列的表达, 或以需要的特定方式修饰和加工基因产物的宿主细胞系。对于蛋白质的功能而言, 这种修饰(例如糖基化)和加工(例如裂解)可能是重要的。就翻译后蛋白质的加工和修饰而言不同的宿主细胞具有其特性和特异性机制。为了确保正确修饰和加工所表达的外源性蛋白质, 可以选择适宜的细胞系或宿主系统。最后, 可以使用拥有适于基因产物初次转录, 糖基化和磷酸化加工的细胞结构的真核宿主细胞。这种哺乳动物的宿主细胞包括但不限于CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3 WI38等。长期以来, 高产率生产重组蛋白, 稳定的表达是优选的。例如, 可以将能够稳定地共同表达PTK和接合蛋白或PTP和接合蛋白的细胞系工程化。不用含复制的病毒来源表达媒介, 可以用通过适宜的控制因素(例如, 启动子, 强化因子, 序列, 转录, 终止符, 聚腺苷酰化位点等)和可选择的标记单独或协同控制的PTK和接合蛋白DNA或PTP和接合蛋白DNA来转化宿主细胞。引入外源性DNA后, 让工程化的细胞在充分的培养基中生长1 - 2天, 然后转移到选择性培养基中。在重组

质粒中可选择标记的标记抵抗选择并且使得细胞稳定地将质粒整合到其染色体中且生长形成可依次被克隆并且扩展到细胞系中的繁殖源。该方法可有力地用于同时表达PTK和接合蛋白或PTP和接合蛋白的工程细胞系。这类工程化细胞系尤其适用于筛选和评估影响由复合物调节影响信号的化合物。

可以使用许多选择系统，包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶（Wigler等人，1977，Cell 11 : 223），次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核苷转移酶（Szybalska等人，1962，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 : 2026）和腺嘌呤磷酸核苷转移酶（Lowy等人，1980，Cell 22 : 817）基因可分别用于 tk⁻，hgp⁻或ap⁻细胞中。也可以使用抗代谢物的抗性作为选择基础，所选择的细胞中，dhfr抵抗氨基嘌呤（Wigler等人，1980，Natl. Acad. Sci. USA 77 : 3567；O'Hare等人，1981，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 1527）；gpt抵抗霉酚酸（Mulligan等人，1981，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 2072）；neo抵抗氨基糖苷 G-418（Colberre - Garapin等人，1981，J. Mol. Biol. 150 : 1）；和hygro抵抗潮霉素（Santerre等人，1984，Gene 30 : 147）基因。

通过本领域公知的分子生物学技术可以识别和分离能够形成本发明复合物的PTK，PTP和/或接合蛋白族的新成员。例如，通过使用两种简并低聚核苷酸引物库（其设计基于在与PTK，PTP，或接合蛋白族成员共有区内高度保护的序列）进行聚合酶链反应（PCR），可分离从前未知的PTK，PTP，或接合蛋白基因。反应模板为cDNA，它是通过mRNA的逆转录得到的，其中mRNA是由已知表达PTK/接合蛋白和/或PTP/接合蛋白复合物的细胞系或组织制备的。将PCR产物亚克隆并且按顺序排列以确保扩增的序列代表PTK，PTP或接合蛋白亚族成员的序

列。然后，通过放射性标记扩增的片断和筛选噬菌体cDNA库，可使用PCR片断来分离完整长度的PTK，PTP或接合蛋白的cDNA克隆。或者，可使用标记的片断来筛选基因组库。从克隆的策略考虑可以使用该方法，例如见Maniatis, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Press, N. Y., 和Ausubel等人, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y.)。

Skolnick (Skolnick, E. Y., 1991, *Cell* 65 : 75) 和 Skolnick等人 (美国专利申请序号07/643, 237) 已描述了克隆从前未知的接合蛋白的通用方法，它们全面引入本文以供参考。简要地说，通过接合蛋白族新成员与至少部分含接合蛋白结合区的酪氨酸磷酸化肽的特异性结合能力可识别接合蛋白族新成员。所述接合蛋白的结合区包括但不限于SH2-结合区。

5. 4. PTK/接合蛋白和PTP/接合蛋白复合物的衍生物

本文也提供PTK/接合蛋白和PTP接合蛋白复合物的功能性衍生物。“功能性衍生物”是指PTK/接合蛋白和PTP/接合蛋白复合物的化学衍生物，“片断”，“变异体”，“嵌合体”或“杂种”，这些术语定义如下。功能性衍生物至少保留PTK，PTP或接合蛋白的部分功能，例如与PTK/接合蛋白或PTP接合蛋白复合物特异性抗体的反应性，PTK或PTP酶活性或通过非催化区调节的结合活性，这些使得它们的应用符合本发明。

PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的“化学衍生物”含有在正常情况下非蛋白质部分的其它化学组分。蛋白质复合物或肽的共价修饰包括在本发明范围内。如下所述，通过使肽的靶向氨基酸残基与能够与所选择的侧链或末端残基反应的有机衍生试剂反应将该修饰引

入分子中。

通常，半胱氨酰基与 α -卤代乙酸酯（和相应的酰胺）如氯乙酸或氯乙酰胺反应得到羧甲基或羧氨基甲基衍生物。也可以通过与溴代三氟丙酮， α -溴- β （5-咪唑基）丙酸，氯乙酰磷酸酯，N-烷基马来酰亚胺，3-硝基-2-吡啶基二硫化物，甲基-2-吡啶基二硫化物，对-氯高汞苯甲酸，2-氯高汞-4-硝基苯酚，或氯-7-硝基苯并-2-噁-1,3-二唑反应来衍生半胱氨酰基。

可以通过在 pH 5.5-7.0 下与原碳酸二乙酯反应来衍化组氨酰基，因为该试剂对组氨酰侧链是相对特异性的。也可以使用对溴苯甲酰甲基溴；优选反应在 pH 6.0 下在 0.1M 二甲基胍酸钠中进行。

将赖氨酰基和氨基端残基与琥珀酐或其它羧酸酐反应。用这些试剂衍生可以改变或逆转赖氨酰基的电荷。其它适用于衍生含 α -氨基残基的试剂包括亚氨酸酯如吡啶甲亚氨酸（picolinimide）甲酯；磷酸吡哆醛；吡哆醛；氯硼氢化物；三硝基苯磺酸；邻甲基异脲；2,4-戊二酮；和转氨酶催化的与乙醛酸（盐）的反应。

通过与一种或几种常规试剂如苯甲酰甲醛，2,3-丁二酮，1,2-环己烷二酮和茚三酮反应来修饰精氨酰基。精氨酸残基的衍生要求反应在碱性条件下进行，因为鸟嘌呤功能基的 PKa 较高。再者，这些试剂可以与赖氨酸与精氨酸 ϵ -氨基反应。

酪氨酰基是通过与芳香族重氮化合物或四硝基甲烷反应引入光谱标记的公知的修饰靶。最通常是分别使用 N-乙酰基咪唑和四硝基甲烷来形成邻乙酰基酪氨酰物种和 3-硝基衍生物。

通过与碳化二亚胺（ $\text{R}'-\text{N}-\text{C}-\text{N}-\text{R}'$ ）如 1-环己基-3-（2-咪唑基（4-乙基）碳化二亚胺或 1-乙基-3-（4-氮鎓-4,4-二甲基戊基）碳化二亚胺反应选择性修饰羧基端基团

(天冬氨酰基或谷氨酰基)。而且,通过与铵离子反应,可以将天冬氨酰基和谷氨酰基转化为天冬酰胺酰基和谷氨酰胺酰基。

谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基常常脱酰胺成为相应的谷氨酰基和天冬酰基。或者,这些基团在弱酸条件下脱酰胺。这些基团的任一形式都属于本发明范围内。

例如,与双官能试剂的衍生适用于PTK/接合蛋白或PTP接合蛋白复合物的组成肽彼此之间的交联或PTK/接合蛋白受体复合物与水不溶性载体基质或与其它大分子载体之间的交联。例如,通常使用的交联试剂包括1,1-双(重氮乙酰基)-2-苯乙烷,戊二醛,N-羟基琥珀酰亚胺酯,如与4-叠氮水杨酸形成的酯,相同的双官能亚氨酸酯,包括二琥珀酰亚胺酸酯如3,3'-二硫代双(琥珀酰亚胺丙酸酯),和双官能马来酰亚胺如双-N-马来酰亚氨基-1,8-辛烷。在光存在下衍生剂如3-(对-叠氮苯基)二硫代丙酰亚胺酸甲酯产生能形成交联的,可光敏化的中间体。或者,在蛋白质固定中使用反应性的水不溶性基质如溴化氰激活的碳水化合物和反应性底物,见美国专利3,969,287;3,691,016;4,195,128;4,247,642;4,229,537;和4,330,440。

其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酸和苏氨酸上羟基的磷酸化,赖氨酸,精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(Creighton, T. E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp, 79 - 86 (1983)), N-端胺的乙酰化,和,在某些实例中, C-端羧基的酰胺化。

这些衍生的结构部分可以改善稳定性,溶解性,吸附性,生物半衰期等等。该结构部分可以选择性地消除或减小蛋白复合物等的任何

不需要的副作用。例如在Remington's Pharmaceutical Science, 1990, 18th ed., Mack Publishing Co. Easton, PA中公开了能够介导该作用的结构部分。

术语“片断”用来表示由PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的PTK, PTP或接合蛋白的氨基酸序列衍生的多肽, 其长度小于衍生它的多肽的全长。例如, 可通过蛋白水解裂解全长蛋白质来制备该片断。优选用重组的方法, 通过适当地修饰编码PTK, PTP或接合蛋白的DNA序列, 在C-端, N-端, 和/或天然序列内的一个或多个位点删除一个或多个氨基酸得到片断。如下所述, 当PTK, PTP, 或接合蛋白以类似于天然存在的PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的复合物形式存在时, 可用于筛选发挥调节信号转导作用的化合物。已知, 当这些片断以复合物的形式存在时, 可以保留天然PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的一个或多个特征部分。这种所保留的特性的实例包括: 催化活性; 底物专一性; 在完整的细胞内与其它分子相互作用; 调节功能; 或与天然PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物特异性抗体或其抗体结合。

本发明范围内的其它官能衍生物为至少含有一个“变异体”多肽(例如PTK, PTP或接合蛋白)的PTK/接合蛋白或PTP接合蛋白复合物, 与天然多肽相比, 它或者缺少一个或多个氨基酸, 或者包含另外的或取代的氨基酸。通过适当地修饰PTK, PTP和/或接合蛋白DNA编码序列, 在C-端, N-端, 和/或天然序列内的一个或多个部位增加, 删除, 和/或修饰一个或多个氨基酸的密码子, 可以从天然存在的PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物衍生出变异体。如上所述, 已知增加了取代的和/或附加的氨基酸的这种变异体保留天然PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的一个或多个特性部分。

用本领域普遍技术人员公知的标准技术，可以制备含有删除，插入和/或取代氨基酸残基的PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的官能衍生物。例如，用定位诱变技术可以制备官能衍生物被修饰组分（如Adelman等人，1983，DNA 2：183的举例说明），其中，应用上述技术，修饰编码序列的DNA中的核苷酸，使得所修饰的编码序列被修饰，此后在原核和真核宿主细胞中表达该重组DNA。或者，可以用本领域公知的方法，通过直接化学合成法方便地制备含删除，插入和/或取代氨基酸的PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的官能衍生物的组分。典型地，PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的官能衍生物与天然复合物的生物活性相同。

5.5. PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物抗体

本发明进一步涉及抗体它能够特异性地识别PTK/接合蛋白复合物或PTP/接合蛋白复合物或其抗原决定基，或特异性地识别在复合物的PTK，PTP或接合蛋白组分上的抗原决定基，当PTK，PTP和/或结合蛋白组分单独存在和从PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物上离去时，该抗原决定基不能被抗体识别。这种抗体可包括但不限于多克隆抗体，单克隆抗体（mAbs）经处理类似于人的抗体或嵌合抗体，单链抗体，Fab片断，F(ab')₂片断，由FAb表达库产生的片断，抗个体基因型（anti-Id）抗体和以上任何抗体的抗原决定基结合片断。例如，这种抗体可用于检测生物样品中的PTK/接合蛋白复合物，或者，作为抑制PTK/接合蛋白复合物形成的方法，因此抑制细胞增殖性疾病的发展。

多克隆抗体是从用抗原如PTK/接合蛋白复合物，或其抗原的功能性衍生物免疫的动物的血清衍生的异种抗体分子。就多克隆抗体的生产而言，可通过注射PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物将各种

宿主动物免疫化，所述动物包括但不限于兔子、小鼠、大鼠等，依赖于宿主的种类，可以使用各种佐剂来增加免疫应答，所述佐剂包括但不限于弗氏佐剂（完全和不完全的）矿物凝胶如溶血卵磷脂，Pluronic多元醇，聚阴离子，肽，油状乳剂，钥孔（keyhole）藤血兰素，二硝基苯酚，和可能有用的人类佐剂如BCG（卡介苗）和 *Corynebacterium Parvum*。

通过用于在培养基中以连续细胞系生产抗体分子的任何技术，可以获得单克隆抗体，它是基本上同种的特定抗原抗体。这些技术包括但不限于Kohler等人的杂交(hybridoma)技术(Kohler等人, Nature 256 : 495 - 497 (1975)和美国专利4, 376, 110)，人类B细胞杂交技术(Kohler等人, 1983, Immunology Today 4 : 72; Cole等人, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 2026 - 2030)，和EBV-杂交技术(Cole等人, 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96)这种抗体可以是包括IgG, IgM, IgE, IgA, IgD的任何免疫球蛋白类及其任何亚类。可以在体外或体内培养生产本发明的mAb的杂种(hybridoma)。在体内生产中，生产高效价的mAbs 使其成为目前优选的生产方法。

另外，可使用通过剪接小鼠适宜的抗原特异性抗体分子基因和适宜生物活性的人抗体分子基因制备“嵌合抗体”的技术。嵌合抗体是由不同种动物衍生不同部分的分子，如具有由鼠的mAb衍生的可变区和人免疫球蛋白不变区的分子。

或者，可采用生产单链抗体的技术(美国专利4, 946, 778; Bird, 1988, *Science* 242 : 423 - 426; Huston等人, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 5879 - 5883; 和Ward等人, 1989, Nature 334 : 544 - 546)来生产PTK/接合蛋白复合物特异性或PTP/接合

蛋白复合物特异性单链抗体。通过经过氨基酸桥连接F_v区的重链和轻链片断，得到单链多肽从而形成单链抗体。

可用已知技术生产含有PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物特异性结合位点的抗体片断。例如，该片断包括但不限于：可通过胃蛋白酶消化抗体分子生产的F(ab')₂片断和可通过还原F(ab')₂片断的二硫桥生产的Fab片断。或者，可以建立Fab表达库（Huse等人，1989，Science 246：1275 - 1281）来迅速和容易地识别具有所需的PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物特异性的单克隆Fab片断。

5.6. 与PTK/接合蛋白和PTP/接合蛋白相关的细胞增殖病的治疗

本发明首次证明，含有SH2-和/或SH3区的接合蛋白族成员的结合可代表肿瘤形成和转化过程的必需步骤。更具体地说，在下文6-12节研究实例中列出的数据详细叙述了接合蛋白GRB亚族的GRB2与人类BCR-ABL基因的细胞内PTK产物的结合。

本节所描述的是某些用途，其中可利用PTKs和接合蛋白和/或PTPs和接合蛋白的结合来治疗与这些复合物相关的细胞增殖病。本文所描述的用途集中于但不限制于识别能够破坏这些复合物的试剂（即降低或抑制复合物的组分PTK或PTP和接合蛋白之间的相互作用），和利用这些化合物来治疗与PTK和PTP有关的细胞增殖性疾病，PTK或PTP能够与含SH2-和/或SH3的结合蛋白族成员复合。本文所用的“破坏”不仅指蛋白质复合物组分的物理分离，而且指对复合物活性的干扰，而不管该复合物是否能够通过物理方法再形成。在此所用的“活性”是指蛋白复合物在其形成的细胞的信号转导级联中的功能，即指复合物影响或抑制细胞外信号向细胞内转导的功能。细胞增殖病的实例包括，但不限制于肿瘤形成性疾病如慢性骨髓性和急性淋巴细胞性白血病及牛皮癣和动脉粥样硬化。本发明复合物也可以涉及这些细胞过程如激

活、分化和生存。

依赖于各自的PTK/接合蛋白复合物或PTP/接合蛋白复合物，破坏此复合物成分之间的相互作用可对所涉及的信号转导产生不同的调节作用，即复合物破坏作用可激活、减小或阻断正常信号转导到细胞内。同样地，依赖于所涉及的细胞增殖病，或者激活，减小或者阻断正常信号转导到细胞中对治疗疾病来说是需要的。例如，BCR-ABL PTK与GRB-2接合蛋白的复合的一种效果是激活Ras信号发射途径（参见下文8节中的研究实施例）。因此，破坏BCR-ABL PTK/GRB-2接合蛋白质复合物会抑制异常信号的转导并防止Ras途径的激活。另外，例如PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的存在对正常信号转导产生异常抑制，因此可形成涉及此复合物的细胞增殖疾病。在这种情况下，破坏复合物会恢复有用的信号转导。而且，异常的复合物可使被改变的亚细胞接合蛋白定位，当它为接合蛋白GRB亚族的GRB-2时，例如可导致因细胞骨架重组的功能障碍细胞。这时，抑制PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物会使正常细胞结构恢复或维持。再进一步，引起PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物破坏的试剂可引起此复合物（可包括但不限于SOS蛋白）的其它潜在组分之间相互作用的破坏。

当考虑其中复合物的PTK或PTP成分为跨膜的受体型PTK或PTP分子的PTK/接合蛋白和PTP/接合蛋白复合物时，该受体或其配体可直接用来调节信号转导，该信号转导可导致细胞增殖疾病的形成。例如，使用PTKs的情况下，可采用本领域技术人员公知的技术，施用已知与配体结合的可溶性PTKs，代表细胞外PTK区的肽或代表部分细胞外PTK区的肽当它们暴露于相关的PTK表达细胞时，能起到与内源性跨膜PTK受体分子竞争的有益配体的作用，这样减小或抑制配体与内源性PTKs

的结合。此过程的作用可减小或抑制PTK和接合蛋白之间的相互作用，这可能是通过阻断继而能减小接合蛋白对PTK分子的亲合力的PTK自身磷酸化来产生的。类似的情况在PTPs中也会发生。

另外，当又考虑受体型PTKs时，采用本领域公知技术施用结合此PTKs的细胞外分子，结合的同时不激活该分子。该类型的细胞外分子例如可由相关的修饰形式的PTK天然配体组成，这样可产生受体结合，但不激活激酶。具有此结构的分子可按与给予可溶性PTK类似的方式起作用，在两个过程中，最终都减小或抑制PTK/接合蛋白复合物的形成。再一次，PTPs也会产生类似的过程。

更进一步，可采用本领域技术人员公知的技术，施用能与本发明PTK/接合蛋白复合物受体PTKs或PTP/接合蛋白复合物受体PTPs的天然配体相结合的分子。这类分子会起抑制配体与其各自受体结合力的作用，并因此会最终减小或抑制PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的形成。

依赖于被治疗的具体疾病，可将该试剂配制并按系统或局部给药。可在“Remington's Pharmaceutical Sciences”，1990，第18版，Mack Publishing Co., Easton, PA中找到配制和给药的技术。合适的途径可包括口腔、直肠、粘膜或肠给药；非肠道释放，包括肌肉内、皮下、髓内注射，以及鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻腔内或眼内注射，这仅仅是给出的一些名称。为了注射，本发明的试剂可被配成水性溶液，优选溶在生理相容的缓冲液中如Hanks's溶液，Ringer's溶液，或生理盐水缓冲液。为了粘膜给药，在制剂中使用适于透过屏障的渗透剂。此渗透剂通常在本技术领域是已知的。

可施用在细胞内直接干扰本发明PTK/接合蛋白和/或PTP/接合蛋白复合物形成的试剂来治疗细胞增殖疾病。此试剂包括但不限于

含SH2和/或SH3区，或SH2和/或SH3结合区的肽和/或磷酸肽，会与结合复合物成分竞争、因此减小或抑制复合物形成、继而会减慢或抑制细胞增殖病发展的小的有机分子或天然产物提取物。上文5.1节中描述了SH2和SH3肽区，和SH2结合和SH3结合肽区。此试剂除了破坏复合物形成之外，也可通过干扰下游发信号容量来破坏复合物。

采用本领域普通技术人员公知的技术，可施用旨在细胞内使用的试剂。例如，可将此试剂包在脂质体中，然后按上文所述方法给药。脂质体是具有水内部的球状脂质双层体。脂质体形成时，水溶液中存在的所有分子都被混合在水内部。脂质体中的内容物受到外部微环境的保护并因脂质体与细胞膜融合而将脂质体中的成分有效地释放到细胞胞质中。另外，由于其疏水性，小的有机分子可细胞内直接给药。

采用本领域普通技术人员公知的技术，可将编码细胞内使用的肽剂的核苷酸序列可在相关的细胞内表达。例如，可使用由病毒（如逆转录病毒，痘苗病毒，腺相关的病毒，疱疹病毒或牛乳头状瘤病毒）衍生的表达载体来将此核苷酸序列释放和表达在靶细胞群中。构建此载体的方法是公知的。例如参见在Maniatis等，1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. 和Ausubel等，1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y中描述的技术。

另外，可施用能干扰PTK/接合蛋白和/或PTP/接合蛋白复合物形成的抗体来治疗涉及能与接合蛋白质形成复合物的PTK或PTP的细胞增殖病。例如，采用上文所描述的技术，可施用能干扰配体与受体型PTKs或PTPs结合的中和抗体。此给药的作用将会类似于上文所述的施用可溶性PTKs或PTPs的作用。另外，也可施用与细胞内抗原决定位点

结合来影响PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物形成的破坏的中和抗体。例如此类抗体可通过使用上文所述施用旨在细胞内起作用的试剂的技术来施用。另外，例如使用marasco等描述的技术可在靶细胞群内表达编码单链抗体的核苷酸序列（Marasco等，1993，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90：7889 - 7893）。

本发明的PTK/接合蛋白复合物和/或PTP/接合蛋白复合物可用于筛选另外的分子，该分子可起破坏此复合物成分活性的作用并因此而能够调节此复合作用的信号转导。此化合物可包括但不限于由D-和/或L构型氨基酸组成的肽（例如，随机肽库形式；参见Lam等，1991，Nature 354：82 - 84），磷酸肽（例如，随机或部分简并的定向的磷酸肽库形式，参见Songyang等，1993，Cell，767 - 778），抗体和小的有机分子。

例如，可以鉴定与PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物各成分或各成分功能部分结合的化合物（并另外能破坏复合物的形成）。这里复合物各成分的功能部分可定义为仍能与另一复合物成员形成稳定复合物的复合物各成分的肽部分。例如PTK SH2结合区的肽部分，仍能稳定结合接合蛋白质SH2区并因此还能与接合蛋白质形成复合物。而且，在本发明各个PTK或PTP成分的催化区，催化区的功能部分可指仍能稳定结合底物分子的肽。

利用可在分离此类PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物成分结合的分子中进行的手段的一种方法包括将成分分子或其功能部分吸附地固体材料上，如琼脂糖或塑料珠，微滴定孔，培养皿，或由如尼龙或硝基纤维素组成的膜，并随后在潜在成分结合的化合物存在下培养吸附的成分分子。培养后，洗去未结合的化合物，回收结合成分的化合物。使用该方法，可同时筛选许多类具有PTK/接合蛋白或PTP/接

合蛋白复合物结合成分的活性的分子。

可用在上述筛选方法中的PTK/接合蛋白复合物成分可包括但不限于局限于PTK分子或其功能部分，如PTK催化区、磷酸化区、SH2区、SH3区、SH2-结合区，或SH3结合区，和接合蛋白或其功能部分，如SH2区和SH3区。使用的肽可被磷酸化，如可至少含有一个磷酸化氨基酸残基，优选磷酸化酪氨酸残基，或可未被磷酸化。可将磷酸化区定义为某些氨基酸残基被特异磷酸化的肽区。此磷酸化区的功能性部分可被定义为某些氨基酸上可被特定的PTK特异磷酸化的肽。SH2区的功能部分可被定义为至少含有一部分能与SH2结合区特异结合的SH2区的肽。类似地，SH3区的功能部分可被定义为至少含有一部分能与SH3结合区特异结合的SH3区的肽，SH2结合区的功能部分可被定义为能与SH2结合的肽，且其长度可至少约为4个氨基酸残基。SH3结合区的功能部分可被定义为能与SH3区结合的肽，且其长度至少约为4个氨基酸残基，优选其长度约为10个氨基酸残基。

可在上文筛选方法中使用的PTP/接合蛋白复合物成分可包括但不限于局限于PTP分子或其功能部分，如PTP催化区，磷酸化区，SH2区，SH3区，SH2-结合区，或SH3-结合区，和接合蛋白或其功能部分，如SH2区和SH3区。使用的肽可被磷酸化，如可至少含有一个磷酸化的氨基酸残基，优选磷酸化酪氨酸氨基酸残基，或未被磷酸化。磷酸化区可被定义为在某些氨基酸残基被特异磷酸化的肽区。此磷酸化区的功能部分可被定义为能在某些氨基酸上被特定的PTK特异磷酸化的肽。SH2、SH3、SH2结合和SH3结合区的功能部分可如上所述。

可进一步筛选具有破坏PTK/接合蛋白或PTK/接合复合物的能力的显示结合活性的分子。另外，可直接筛选具有破坏PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的能力的分子。例如，可通过首先将相关复

合物的一种成分或其功能部分固定到固体载体上，其次将固定的复合物成分暴露于化合物（如上述鉴定的）和相关复合物的第二种成分或其功能部分，第三可确定在化合物存在下，第二种成分是否还能与固定的成分形成复合物，这样来测定体外复合物的形成。

另外，可采用本领域技术人员公知的共免疫沉淀技术来测定体外复合物的形成。简而言之，可将能形成相关PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的细胞系暴露于如上鉴定的化合物中，并由该暴露的细胞系制备细胞溶解物。可将对抗相关复合物成分之一的抗体加到细胞溶解物中，并施行标准的免疫沉淀技术。在复合物仍形成的情况下，免疫沉淀会沉淀该复合物，而在复合物已被破坏的情况下，仅会沉淀抗体所对抗的复合物成分。

可直接测定试剂对相关PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的转化容量的影响。此试剂可以（但不是要求）包括采用上文筛选技术鉴定的那些试剂。例如，可将试剂施予能形成PTK/接合蛋白复合物的细胞如成纤维细胞或造血细胞，在不存在任何抑制剂的情况下，复合物会导致细胞转化（Muller等，1991，Mol. Cell. Biol. 11 : 1785 - 1792；Mclaughlin等，1987，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 6558 - 6562）。然后可通过监测例如其在软琼脂中形成集落的能力来测量细胞在体外的转化状态（Lugo等，1989，Mol. Cell. Biol. 9 : 1263 - 1270；Gishizky等，1992，Science 256 : 836 - 839）。另外，可通过测定在重度联合免疫缺乏（SCID）小鼠的免疫缺乏裸鼠中形成肿瘤的能力来监测细胞的转化状态（Sawyers等，1992，Blood 79 : 2089 - 2098）。而且，在BCR-ABL的情况下，也可将试剂施予本领域普通技术人员公知的ALL和/或CML动物模型（Gishizky等，1993，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 3755 - 3759）和/或逆

转致癌疾病的进展。

在治疗显示细胞增殖病或处于细胞增殖病危险状态的患者中，可使用能破坏PTK/接合蛋白和/或PTP/接合蛋白复合物形成并能减少或抑制由此复合物形成而引起的细胞增殖病的试剂。可施予病人足够浓度的试剂（如上文所述的）以便减小或消除含PTK/接合蛋白和/或PTP/接合蛋白复合物（没有此类试剂时）细胞的细胞增殖容量。

另外，在造血细胞增殖病（如白血病）中，不是将试剂直接施予病人，而是可以与本领域普通技术人员公知的自身骨髓移植和化学放射治疗技术一起使用试剂。简而言之，从患者体内取出等分量的骨髓细胞（通常取自骨盆）。然后在能有效破坏PTK/接合蛋白或PTP/接合蛋白复合物的浓度的试剂存在下培养细胞。通过阻断能形成此复合物的那些骨髓细胞的信号转导途径，选择对抗这些细胞的克隆下降，因此有效地净化了与被治疗造血细胞增殖病有关的那些细胞的培养。在培养骨髓细胞并净化具有高致癌容量细胞的同时，使用适于该疾病的本领域技术人员公知的化学放射治疗法来对病人进行治疗。完成此化学放射治疗后，病人接受培养骨髓细胞的自体输注，该细胞已被除去了致癌细胞。

在本发明优选的实施例中，破坏或防止PTK/接合蛋白复合物并且该复合物的PTK成分是人BCR-ABL基因的细胞内PTK产物，并且接合蛋白成分是接合蛋白GRB亚族的GRB-2成员。而且，在这个优选的实施例中，使用此试剂治疗的细胞增殖病包括但不限于慢性骨髓性白血病和急性淋巴细胞白血病。

5.7. 能破坏结合之间相互作用的化合物的鉴定

可使用任何种类的测定系统来测试化合物干扰（即破坏或抑制）激活的酪氨酸激酶分子和接合蛋白分子之间相互作用的能力，本文将

酪氨酸激酶分子和接合蛋白质分子称为“结合对”。除激活的酪氨酸激酶分子外，可以理解，其它与接合蛋白结合并形成复合物的分子也被包括在该定义的结合对范围之内。所以，另外的结合对例如可包括SHC，已显示结合GRB-2接合蛋白的含SH2区的蛋白质（Tauchi, T.等，1994, J. Exp. Med. 179 : 167 - 175; Rozakis - Adcock, M.等，1992, Nature 360 : 689 - 692; Pelicci, G.等，1992, Cell 70 : 93 - 104）。然而，优选快速高效筛选大量化合物（包括但不限于配体（天然的或合成的），肽或小的有机分子）的测定方法。可按本文所述方法进一步评价鉴定为干扰结合对相互作用化合物的抑制活性。

用于鉴定干扰结合对之间相互作用的化合物测定系统的基本原则包括在一定条件下制备含有结合对的反应混合物并放置一段时间足以允许两种蛋白质相互作用并结合，因此形成复合物。为了试验化合物的抑制活性，在试验化合物存在和不存在的条件下进行该反应，即可将试验化合物一开始就包括在反应混合物中，或结合对加入后再加入；对照在不含试验化合物下或用安慰剂来培养。然后检测结合对蛋白质之间形成的任何复合物。在对照反应中形成复合物，但在含试验化合物的反应混合物中不形成复合物，或者相对于对照反应来说反应混合物中所形成复合物的量减小，这表明化合物干扰结合对之间的相互作用。下文描述了可以使用的测定成分和各种规格形式。

在测定中用作成分的结合对可由天然来源得到，如采用本领域公知的蛋白质分离技术从细胞中纯化；采用本领域已知的技术，通过重组DNA技术生产（如参见，Sambrook等，1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories Press, Cold Spring Harbor, N. Y.）；和/或采用本领域已知

的技术进行完全或部分化学合成；例如通过固相技术合成肽，从树脂中分出，并通过制备性高效液相色谱法纯化（如参见，Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman & Co., N. Y., pp. 50 - 60）。可通过氨基酸分析或测序来确定合成肽的组成；如使用Edman降解法（如参见，Creighton, 1983, 同上）。

可生产对应于各蛋白质结合区的肽片断。例如，该片断可包括但不限于SH2区，SH3区，SH2结合区和/或SH3结合区的肽片断。可使用本领域日常操作的任何方法来鉴定和分离蛋白质结合位点。这些方法包括但不限于使编码蛋白质和在共免疫沉淀鉴定中筛选破坏结合的基因诱变。对编码各蛋白质基因的序列分析会揭示对应于涉及相互作用结合的蛋白区的突变。

另外，可将一种蛋白质固定到固体表面并允许它与其标记的结合对相互作用并且结合，该结合对已用蛋白酶，如胰蛋白酶处理过。洗涤后，含有结合区的短的标记肽可保持在固体材料上，该肽可被分离并通过氨基酸测序来鉴定。而且，一旦获得该蛋白基因，可将短的基因区段工程化以表达蛋白质肽片段，然后测试其结合活性并纯化或合成。

不管是通过分子克隆法产生的还是通过化学合成法产生的，在本发明测定中可使用的结合对氨基酸顺序不需要与编码它们的基因的报道序列相同。结合对可含有改变的顺序，其中氨基酸残基被消除，加成或取代而得到功能相当的产物。

例如，功能相当的氨基酸残基可取代为导致改变顺序的序列内的残基。此取代物可选自属于氨基酸的其它成员；如，非极性（疏水的）氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、

色氨酸和蛋氨酸；极性天然氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺；正电荷（碱性）氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸；负电荷（酸性）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。

该测定系统中使用的结合对之一应是被标记的（直接或间接的）以便于检测结合对之间形成的复合物。可使用任何种类的合适的标记系统，包括但不局限于放射性同位素如 ^{125}I ；酶标记系统，即当暴露于底物时，产生可检测的比色信号或光；和荧光标记。

用重组DNA技术生产测定的结合对时，可便于标记、固定和/或检测的工程融合蛋白质是有利的。例如，可将酪氨酸激酶或接合蛋白的编码序列融合成具有酶活性或起酶底物作用的异种蛋白的编码序列以便于标记和检测。应设计融合构成物使融合产物的异种成分不干扰结合对的结合。

间接标记包括使用第三种蛋白，如一种标记的抗体，它可特异地与结合对之一结合。此抗体包括但不是限于多克隆、单克隆、嵌合体、单链、Fab片段和由Fab表达库产生的片段。

可在异相或均相形式中进行测定。异相测定包括将结合对之一锚定在固相上并在反应结束时检测固定在固体相上的复合物。在均相测定中，整个反应都在液相中进行。在任一方法中，加入反应物的顺序可以不同以获得有关被试验化合物的不同信息。例如，可通过在试验化合物存在下进行反应来鉴定如通过竞争来干扰结合对之间相互作用的试验化合物，即在结合对之前或同时将试验化合物加入到反应混合物中。另一方面，可通过在复合物形成之后，将试验化合物加到反应混合物中来试验破坏形成复合物的试验化合物，如，具较高结合常数化合物代替了复合物中的结合对之一。

在异相测定系统中，将一个结合对固定在固体表面，并将未固定的结合对直接或间接标记。在操作中，常规使用微滴定板。通过非共价的或共价吸附，可将固定物固定。通过用蛋白溶液涂布固体表面并干燥来简单地完成非共价吸附。另外，可使用特异于蛋白质的固定抗体将蛋白质固定到固体表面。可预先制备该表面并贮存。

为了进行测定，将固定的结合对加到用或未用试验化合物包裹的表面上。反应完成之后，除去未反应的成分（如，通过洗涤），形成的任何复合物都会保持固定在固体表面。可以各种方法完成对固定在固体表面的复合物的检测。预先标记结合对时，检测固定在表面的标记物表明复合物形成。在结合对未被预先标记时，可使用间接的标记物来检测固定在表面的复合物；如，使用特异于结合对的标记抗体（随后可将抗体直接标记或用抗Ig抗体间接标记）。根据加入反应成分的顺序，可检测抑制复合物形成或破坏形成的复合物的试验化合物。

另外，在试验化合物存在或不存在下，在液相中进行反应，从未反应的成分中分离反应产物并检测复合物；如使用特异于一个结合对的固定抗体来固定溶液中形成的任何复合物并使用特异于另一结合对的标记抗体来检测固定的复合物。再者，依据将反应物加到液相中的顺序，可鉴定抑制复合物或破坏形成的复合物的试验化合物。

在本发明的替换实施例中，可使用均相测定。在该方法中，制备由结合对形成的复合物，其中结合对中的一个被标记，但由于形成复合物而抑制由标记物产生的信号（如参见Rubenstein的美国专利4109496，其中使用该方法进行免疫测定）。加入与复合物的一个结合对竞争并取代了它的试验物会在上面的背景下产生信号。在该方法中，可鉴定破坏病毒蛋白宿主细胞蛋白相互作用的试验物。

6. 实施例：BCR-ABL与GRB-2的在体外和体内的结合

在本节的研究实施例中，证明了GRB亚族接合蛋白的GRB-2成员在体外和体内都与BCR-ABL细胞外PTK结合。

6.1. 材料和方法

6.1.1. 细胞和病毒

在完全的Grace介质中繁殖草地贪夜蛾昆虫细胞 (Smith, G. E., 1983, Mol. Cell. Biol. 3 : 2156 - 2165)。由慢性骨髓性白血病患者得到 P h⁺ - 阳性白血病细胞系K562和NMG-01并表达P210 BCR-ABL。由急性淋巴细胞白血病患者得到 P H⁺ - 阳性细胞系，ALL-1并表达P185 BCR-ABL。在RPMI 1640介质中用胎牛血清培养 P H⁺ - 阳性细胞系。使COS非洲绿猴细胞和Rat1成纤维细胞生长于含5%胎牛血清的DMEM介质中。

如Pendergast等所述，在野生型杆状病毒DNA存在下，通过共同转染克隆在pAcCI2杆状病毒载体中的相应的cDNAs来制备表达cBCR、cABL和BCR-ABL的重组杆状病毒 (Pendergast等, 1991, Cell 66 : 161 - 171; Pendergast等, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 5927 - 5931)。

按先前所述方法，在COS细胞中进行瞬时过度表达(hyperexpress)来制备无辅助逆转录病毒种子 (Muller等, 1991, Mol. Cell. Biol. 11 : 1785 - 1792)。采用免疫组织化学法，按其转移野生型和突变型BCR-ABL基因产物到Rat1成纤维细胞中的能力来确定逆转录病毒种子的特征 (Muller等, 1991, Mol. Cell. Biol. 11 : 1785 - 1792)。在这些着色方法中，不检测鼠c-abl蛋白的内源水平。通过测量BCR-ABL蛋白质的表达水平 (蛋白质印迹技术) 来进一步评价基因转移水平。在这些研究中，仅使用显示明显基因转移水平的逆转录病毒种

子。滴定度在每毫升105感染颗粒的范围之内，这是通过暴露于极限稀释的病毒种子之后的G418抵抗Rat1克隆的频率确定。

6. 1. 2. 抗体

以前描述了直接对抗cBCR的氨基端和cABL的氨基和羧基端序列的多克隆兔抗体 (Pendergast等, 1991, Cell 66 : 161 - 171; Konopka等, 1984, Cell 37 : 1035 - 1042)。采用小鼠单克隆抗-ABL (21 - 63) 抗体进行免疫印迹 (Pendergast等, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 5927 - 5931)。在免疫沉淀和免疫印迹中分别使用GRB-2的C末端SH3区的多克隆兔抗体 (Ab50) 和GRB-2 N-末端SH3区衍生的合成肽的多克隆兔抗体 (Ab86) (Lowenstein等, 1992, Cell 70 : 431 - 442)。

6. 1. 3. 质粒结构

通过如 (5') SH3-SH2和 (3') SH3片段的多聚酶链反应 (PCR), 由人胎盘cDNA库来克隆650-碱基对的人GRB-2 cDNA (Lowenstein等, 1992, Cell 70 : 431 - 442; Matuoka等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 9015 - 9019)。用GRB-2的密码子154处的单一KpnI位点来产生全长GRB-2 cDNA。将GRB2的完整编码序列和GRB-2的 (3') SH3区以骨架方式 (in-frame) 亚克隆到pGEX-2T 载体的BamHI位点 (Pharmacia)。按所述方法制备分离的GRB-2 (5') SH3和SH2区 (Skolnik等, 1993, EMBO J. 12 : 1929 - 1936)。

按先前所述方法制备野生型P185 BCR-ABL的cDNAs (McLaughlin等, 1989, Mol. Cell. Biol. 9 : 1866 - 1874) 和P185 (Δ 176-426) 的cDNAs (Muller等, 1991, Mol. Cell. Biol. 11 : 1785 - 1792) 并将相应的cDNAs克隆到pSR α (Pendergast等, 1991, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 88 : 5927 - 5931)。和pSR α MSVtkneo (Muller等, 1991, Mol. Cell. Biol. 11 : 1785 - 1792)载体中。使用Muta - Gene Phagemid体外诱变系统(Bio Rad), 通过直接诱变的低聚核苷酸位点来生产P185 BCR-ABL(Y177F)突变体。将来自pGEM4/cBCR的cBCR的1.6kb EcoRI - SacI片段亚克隆入pBlueScript SK+载体(Stratagene)的EcoRI和SacI位点并通过用辅助噬菌体R408(Stratagene)共染XL-1 Blue细菌来营救单链DNA, 产生模板。通过将核苷酸530由A变为T, 采用致突变低聚核苷酸(5' - AAG CCC TTC TTC GTT AAC GTC GAG - 3')在酪氨酸位置产生苯丙氨酸密码子。另外, 引导核苷酸534的沉默碱基改变来产生单一HpaI位点。选择存在有单一HpaI位点的诱变质粒。通过两个方向上的二脱氧链末端序列的分析来证实突变。将突变的BCR序列引入野生型P185 BCR-ABL cDNA。将P185 BCR-ABL(Y177F)亚克隆到pSR α 和pSR α MSVtkNeo哺乳动物表达载体和用于杆状病毒表达的AcC12载体中。以前已描述了将野生型cABL的cDNA克隆到pSR α 载体中(Pendergast等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 5927 - 5931)。也可按所述方法将BCR(Δ 872-1271)克隆到pSR α 中(Pendergast等, 1991, Cell 66 : 161 - 171)。

6. 1. 4. GST融合蛋白的表达和纯化

按以前描述的方法, 使用谷胱甘肽-琼脂糖凝胶4B珠(pharmacia)来表达和纯化GST-融合蛋白(Pendergast等, 1991, Cell 66 : 161 - 171)。将融合蛋白质放置在树脂上并在4℃下贮存。

6. 1. 5. 代谢标记和免疫沉淀

用指明的重组杆状病毒感染Sf9细胞。用0.1mCi/ml [35 S]蛋氨酸(ICN)的游离蛋氨酸介质中培养感染3天后的细胞, 在27℃

培养4到6小时。用KLB (10mM磷酸钠pH7.0, 150mM NaCl, 1%去利通 X-100) 或PCLB (50mM HEPES, pH7.0, 150mM NaCl, 1mM $MgCl_2$, 1%去利通 X-100, 10%甘油) 溶解标记的细胞, KLB和PCLB补加有5mM EDTA, 1mM PMSF, 50 $\mu g/ml$ 亮胺素, 25 $\mu g/ml$ 抑肽酶, 25mM NaF, 1mM Na_3VO_4 和0.1mM Na_2MoO_4 。在100,000xg 转速下离心1小时来使溶解物澄清。按标示直接或将培养缓冲液 (20mM HEPES, pH7.0, 150mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 10%甘油, 0.5mM Na_3VO_4 , 0.1mM Na_2MoO_4 , 25mM NaF, 1mM PMSF, 25 $\mu g/ml$ 亮抑蛋白酶肽) 稀释3倍后用标明的抗体培养溶解物。用蛋白质A-琼脂糖凝胶珠 (pharmacia) 在4℃下培养120分钟来收集免疫复合物。用培养缓冲液彻底洗涤该珠以除去未结合的原料。用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳来分析结合的蛋白质并通过荧光自显影术来显色。不管什么时候使用未标记的溶解物, 都用标明的抗体通过免疫印迹技术来检测蛋白质。

6.1.6. 结合分析

用孵育缓冲液将蛋白溶解物稀释3倍并用结合于谷胱甘肽-琼脂糖凝胶珠的GST或GST融合蛋白培养。在4℃温度下培养90分钟后。按指示用培养缓冲液或用RIPA缓冲液 (20mM Tris-HCl, pH7.4, 137mM NaCl, 10%甘油, 1%去利通 X-100, 0.1%SDS, 0.5%脱氧胆酸盐和2mM EDTA) 彻底洗涤该珠。通过SDS-聚丙烯酰胺然后再对放射标记蛋白质进行荧光X线照相术来分析结合的蛋白质。

6.1.7. 免疫印迹, 体外自身磷酸化和脱磷酸化反应

基本上按以前描述的方法来进行免疫印迹和用 [γ ^{32}P] ATP进行体外标记 (Pendergast等, 1991, Cell 66 : 161 - 171; Pendergast等, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 5927 -

5931)。按描述方法用马铃薯酸磷酸酯酶进行脱磷酸化(Pendergast等, 1991, Cell 66 : 161 - 171; Pendergast等, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 5927 - 5931)。

6. 2. 结果

6. 2. 1. BCR-ABL与GRB-2在体内联合

为了确定BCR-ABL酪氨酸激酶是否与完整细胞中的GRB-2接合蛋白形成物理复合物, 检测了两种蛋白质是否共免疫沉淀。由P h¹-阳性白血病细胞系K562, MEG-01, 和ALL-1 P h¹造血细胞及Rat1成纤维细胞制备细胞溶解物并用抗ABL pEX4、抗GRB-2或对照抗体来进行免疫沉淀。彻底洗涤后, 在蛋白质A-琼脂糖凝胶珠上收集免疫沉淀物并在[γ ³²P] ATP和MnCl₂存在下进行体外脱磷酸化。该条件促进BCR-ABL激酶的自身磷酸化。在30℃温度下30分钟后停止反应, 洗涤并通过SDS / 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。用放射X线照相术检测³²P标记的蛋白。使用抗GRB-2或抗ABL抗体沉淀显著量的BCR-ABL蛋白。而且, 两种形式的BCR-ABL(P210和P185)都与表达相应BCR-ABL蛋白的Rat1成纤维细胞中的GRB-2有关。

相类似地, 可通过表达BCR-ABL的细胞系中的抗ABL抗体使用GRB-2蛋白质进行免疫沉淀。具体来说, 由MEG-01细胞制备细胞溶解物并用对照(免疫前血清)、抗ABL pEX4和抗GRB-2抗体进行免疫沉淀。通过SDS / 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离免疫沉淀的蛋白质, 将其转移到硝基纤维素中并用抗GRB-2抗体进行免疫印迹。用[¹²⁵I]蛋白A使结合的抗体显色并在含抗GRB-2和抗ABL免疫沉淀原料的泳道中都可进行检测。

用³⁵S-蛋氨酸代谢标记BCR-ABL表达细胞再用抗ABL或抗GRB-2抗体免疫沉淀证明与上文所述结果一致, 细胞中可有50%到90%

的BCR-ABL激酶与GRB-2复合。有趣的是,观察到GRB-2与致癌v-abl激酶之间没有关系。这些实验证明GRB-2接合蛋白与两种形式的BCR-ABL酪氨酸激酶都形成稳定的复合物但不与v-abl激酶形成复合物,并且BCR-ABL/GRB-2复合物在体外BCR-ABL脱磷酸化之后仍保持完整。

6.2.2. BCR-ABL与GRB-2在体外结合

为了检查BCR-ABL与GRB-2的分子基础,将全长GRB-2 cDNA序列克隆到pGEX-2T中,在细菌中表达为谷胱甘肽S-转移酶(GST)融合蛋白。纯化GST-GRB-2蛋白并测试其体外与BCR-ABL结合的能力。具体来说,由用P185 BCR-ABL重组杆状病毒感染的Sf9昆虫细胞的溶解物制备³⁵S-蛋氨酸标记的蛋白,将该蛋白质用结合于蛋白A-琼脂糖凝胶珠的等量的单一固定化GST,全长GST-GRB-2, GST-氨基端, GRB-2 SH3区, GST-GRB-2 SH2区GST-羧基端, GRB-2 SH3区和抗ABL抗体培养。在4℃下培养90分钟后,将该珠用培养缓冲液洗涤四次并用RIPA缓冲液洗涤两次以除去非结合的原料。用SDS/7%聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结合的蛋白质并用荧光显影术来检测。发现在杆状病毒感染的昆虫细胞中表达的P185 BCR-ABL结合到全长的固定在谷胱甘肽-琼脂糖凝胶珠的GRB-2上。单独使用GST,未检测到有结合。用含有SDS和脱氧胆酸盐洗涤剂的缓冲液洗涤后,BCR-ABL和GST-GRB-2复合物仍保持完整。

为了确定与BCR-ABL结合的GRB-2区,制备含有分离的GRB-2 SH3和SH2区的GST融合蛋白。BCR-ABL结合于GST-GRB-2 SH2融合蛋白。含有GRB-2氨基和羧基端的SH3区的GST融合蛋白也在体外结合到杆状病毒产生的BCR-ABL蛋白上。BCR-ABL与GRB-2的SH2和SH3区的相互作用有抵抗用含SDS和脱氧胆酸盐缓冲液洗涤的能力。用马

铃薯酸磷酸酯酶处理BCR-ABL完全消除了其与GRB-2 SH2区结合的能力，但不影响其与GRB-2 SH3区的结合。

7. 实施例，对SH2介导的GRB-2与BCR-ABL结合所必需的BCR-ABL序列

在本节的研究实施例中，观察BCR-ABL/GRB-2通过GRB-2 SH2区结合所需的氨基酸序列。具体来说，是证明结合需要酪氨酸-磷酸化的氨基酸残基的存在，而且也表明BCR第一外显子突变能消除SH2介导的BCR/GRB-2结合。

7.1. 材料和方法

在本节研究实施例的实验中，采用与上文6.1节相同的材料和技术。

7.2. 结果

7.2.1. SH2介导的GRB-2与BCR-ABL的结合需要酪氨酸磷酸化的BCR序列

为了确定参与GRB-2结合的BCR-ABL的区域，将BCR和ABL序列分别表达在杆状病毒感染的昆虫细胞中并测试其结合全长GRB-2以及分离的GRB-2 SH2和SH3区的能力。杆状病毒产生的cABL在体外与全长GRB-2结合但不与单独的GRB-2 SH2区结合。具体来讲，Sf9昆虫细胞单独用cABL重组的杆状病毒感染。感染后三天，用³⁵S-蛋氨酸标记该细胞。将标记的细胞溶化并在蛋白质A-琼脂糖凝胶珠存在下用单独GST，GST-GRB-2全长，GST-GRB-2氨基SH2，GST-GRB-2 SH2，GST-GRB-2羧基SH3和相应的抗-ABL抗体培养溶化的蛋白。在4℃下培养90分钟后，将该珠用培养缓冲液洗涤4次并用RIPA缓冲液洗涤2次。用SDS/10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结合的蛋白质并用荧光显影术检测。在酪氨酸残基上磷酸化在昆虫细胞

中过度表达的cABL (Pendergast等, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 5927 - 5931)。因此, GRB-2 SH2区没有能力与杆状病毒产生的cABL蛋白质结合并不是由于缺乏酪氨酸磷酸化。

cABL与GRB-2的体外结合似乎只能通过GRB-2的氨基和羧基端SH3区来介导。SH3区结合于特异的富含脯氨酸的基元 (Cicchetti等, 1992, Science 257 : 803 - 806; Ren等, 1993, Science 259 : 1157 - 1161)。近来, 已经显示, 通过GRB-2 SH3区与富含脯氨酸的基元序列直接相互作用, GRB-2与SOS1鸟嘌呤核苷酸交换剂结合, 富含脯氨酸的序列PPPVPFR存在于SOS1的羧基端区 (Li等, 1993 Nature 363 : 85 - 87; Rozakis - Adcock等, 1993, Nature 363 : 83 - 85)。cABL的羧基末端含有一些富含脯氨酸的扩展段。然而, 在cABL蛋白中未发现PPPVPFR序列。在缺乏大量cABL羧基端区域的cABL缺失突变的蛋白中, GRB-2 SH3区与cABL的体外结合显著减小但不完全消除。这些数据以及如下文所述的在细胞溶化物免疫沉淀之后正常cABL与GRB-2之间缺乏可检测得到的结合暗示体外观察到的cABL / GRB-2的相互作用不是特异性的并在体内可不发生。然而, cABL富含脯氨酸的区域有可能起其它SH3区结合位点的作用。

cBCR与GRB-2全长或分离的区域在体外结合的类似分析揭示仅全长GRB-2和扩展较少的GRB-2 N-端SH3区在体外与cBCR结合。特别是, 用cBCR重组的杆状病毒单一感染Sf9昆虫细胞, 并按上文所述方法处理cABL重组的杆状病毒。有趣的是, 未检测到cBCR与GRB-2的SH2区结合。

GRB-2 SH2区与cABL和cBCR体外完全不结合与该区和嵌合的BCR-ABL酪氨酸激酶的强力结合形成对照。磷酸化状态的cBCR序列的全长cBCR蛋白与BCR-ABL嵌合体是不同的。在检测的全部细胞类型中,

cBCR仅在丝氨酸/苏氨酸残基上磷酸化，甚至在昆虫细胞内过度表达之后也是如此（Timmons等，1989，*Oncogene* 4 : 559 - 567；Pendergast等，1991，*Cell* 66 : 161 - 171）。相反地，在BCR-ABL嵌合体中，激活的ABL激酶磷酸化酪氨酸上的BCR第一外显子序列（Liu等，1993，*Oncogene* 8 : 101 - 109）。为了评价BCR序列酪氨酸磷酸化是否可与分离的GRB-2 SH2区的结合，用编码有全长cBCR和cABL蛋白的杆状病毒共同感染昆虫细胞。具体地说，用cABL和cBCR重组的杆状病毒共同感染Sf9昆虫细胞，并按上文所述方法，处理cABL重组杆状病毒。用cABL酪氨酸激酶使cBCR反磷酸化，导致GRB-2 SH2区与cBCR结合。用抗磷酸酪氨酸抗体进行的蛋白印迹证明在用cABL和cBCR杆状病毒共同感染的Sf9细胞中cBCR是酪氨酸磷酸化的。也检测了cBCR与分离的GRB-2氨基和羧基端SH3区体外的低水平结合。这些结果证明GRB-2 SH2区与BCR序列的结合需要酪氨酸磷酸化。

7. 2. 2. 在体外，GRB-2与BCR-ABL相互作用但不与cABL和cBCR序列相互作用

为了检测GRB-2与cABL和cBCR的体外结合是否也在体内发生，用表达构成物的相应cDNAs转染COS细胞。这些cDNAs的转染导致在相应的内源性蛋白质水平上cABL和cBCR的表达增加约50到200倍（Pendergast等，1991，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 5927 - 5931）。在这些条件下，cABL与GRB-2没有明显的共免疫沉淀。类似地，在BCR序列过度表达之后未检测到GRB-2与BCR序列的相互作用，所述BCR序列保留在COS细胞的P210 BCR-ABL嵌合体中。相反地，在相同实验中，抗GRB-2抗体沉淀了显著量的P185 BCR-ABL。

具体来说，用克隆在pSR α 载体中的P185野生型和cABL cDNAs转染COS细胞。转染后3天，将细胞溶解并在4℃下，用正常兔血清，

抗ABL 2 / 3 抗体和抗GRB- 2 抗体培养溶解物 2 小时。将免疫沉淀物收集在蛋白质-A-琼脂糖凝胶珠上并用培养缓冲液洗涤 6 次。用 SDS / 8 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结合的蛋白质, 将其转移到硝基纤维素滤膜上并用抗ABL小鼠单克隆抗体培养滤膜。用增强化学发光 (ECL) 检测系统 (Amersham) 使免疫反应带显色。另外, 用克隆在 pSR α 载体中的BCR (Δ 872-1271) cDNA转染COS细胞。感染 3 天后, 将细胞溶解并在 4 °C 下用对照血清, 抗BCR抗体或抗GRB- 2 抗体培养溶解物 2 小时。用蛋白质-A-琼脂糖凝胶珠收集免疫沉淀物, 用培养缓冲液洗涤 4 次并用 50mM Tris - HCl (pH7.0) 洗涤 2 次, 然后在 γ - 32 P - ATP和MnCl₂ 存在下进行体外磷酸化。用SDS / 8 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影术分析蛋白质。

这些数据, 以及在由正常细胞的抗GRB- 2 免疫沉淀中缺乏可检测到的内源性cABL和cBCR蛋白支持体内未发现cABL / GRB- 2 和cBCR / GRB- 2 复合物的论点。这些发现证明BCR-ABL嵌合体显示新的蛋白质结合特性, 该特性区别于BCR和ABL蛋白序列成分所显示的特征。

7. 2. 3. BCR第一外显子中的点突变消除了GRB- 2 SH2区与BCR的结合

SH2区与特异的酪氨酸-磷酸化蛋白的结合取决于一级序列的磷酸化酪氨酸的C末端 (Fanti等, 1992, Cell, 69 : 413 - 423; Kashishian等, 1992, EMBO J. 11 : 1373 - 1382; Sonyang等, 1993, Cell 72 : 767 - 778)。对BCR第一外显子内围绕十一个潜在的酪氨酸磷酸化位点的序列的检测揭示在序列YVNV中发现酪氨酸 177, 它对应于GRB- 2 SH2区的最适宜的结合位点 (Sonyang等, 1993, Cell 72 : 767 - 778; Skolnik等, 1993, EMBO J. 12 : 1929 - 1936)。在BCR第一外显子中围绕其它 10 个酪氨酸的序列不

适合于GRB-2 SH2区或所检测的其它SH2区的最适宜结合位点

(Sonyang等, 1993, *Cell* 72 : 767 - 778)。为了确定BCR-ABL与GRB-2 SH2区的结合是不是需要酪氨酸177, 可通过位点直接诱变, 用苯丙氨酸代替BCR-ABL中的酪氨酸177, 将突变的蛋白质表达在昆虫细胞中并试验其与GRB-2的结合情况。体外自身磷酸化后P185 (Y177F)突变的和P185野生型蛋白质的磷酸肽图型的比较揭示在P185 (Y177F)中至少缺少一个主要的磷酸肽。具体来讲, 用克隆在pSR α MSVtKneo载体中的P185野生型和P185 (Y177F)转染COS细胞。转染3天后, 将细胞溶解并用抗ABL抗体培养溶解物。在 γ - ^{32}P ATP和 MnCl_2 存在下体外自身磷酸化后进行免疫沉淀。用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析蛋白质, 将其转移到硝基纤维素上, 并制出磷酸肽图。

结合研究表明, 与野生型P185 BCR-ABL相反, P185 BCR-ABL (Y177F)突变蛋白(其中BCR第一外显子中的酪氨酸177被苯丙氨酸取代)在体外不与GRB-2 SH2区相互作用。具体来说, 使用由pAcC12载体克隆的野生型杆状病毒DNA和野生型P185 BCR-ABL cDNAs或克隆在pAcC12载体中的野生型杆状病毒DNA和P185 BCR-ABL (Y177F) cDNAs共同转染Sf9昆虫细胞。转染6天后, 用 ^{35}S -蛋氨酸代谢标记该细胞。将细胞溶解并用GST-GRB-2 SH2或用结合在蛋白质A-琼脂糖凝胶珠上的抗ABL pEX4抗体培养溶解物。用SDS/7%聚丙烯酰胺凝胶电泳和荧光自显影术来分析结合的蛋白质。

其次, 评价了P185 BCR-ABL (Y177F)突变体与GRB-2体内相互作用的能力。当在稳定表达突变蛋白质的COS细胞或Rat1成纤维细胞中过度表达时, P185 (Y177F)不与内源性的GRB-2相互作用。类似地, 缺少酪氨酸177的BCR-ABL缺失突变体不与GRB-2结合。具体来讲, 用克隆在pSR α MSVtKneo载体中的P185野生型和P185 (Y177F)

cDNAs转染COS细胞。转染3天后，将细胞溶解并用正常兔血清(NRS)，抗ABL 2 / 3 抗体或抗GRB-2 抗体在4℃下将溶解物培养2小时。用蛋白质-A-琼脂糖凝胶珠收集免疫沉淀物并在[γ 32 P] ATP和MnCl₂ 存在下在体外进行磷酸化。用SDS 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影术分析蛋白质。另外，在4℃下，用抗GRB-2 抗体，抗ABL 2 / 3 抗体，或正常兔血清，将表达P185野生型和P185(Y177F)的G418选择性Rat1细胞的溶解物培养2小时。将免疫沉淀物收集在蛋白质-A-琼脂糖凝胶珠上。用SDS 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳再用抗ABL小鼠单克隆抗体免疫印迹来分析结合的蛋白质。用ECL检测系统(Amersham)将免疫反应带显色。

这些数据表明：BCR-ABL和GRB-2 之间的体内相互作用是由GRB-2 SH2区与BCR-ABL中的磷酸化酪氨酸177的结合来介导的。GRB-2 SH3区在全长GRB-2 和BCR-ABL之间的体内结合中显然不起作用。

8. 实施例：GRB-2 结合中缺失的BCR-ABL蛋白显示转化容量降低

在研究实施例的数据证明：BCR-ABL细胞内PTK的转化能力依赖于该PTK与接合蛋白族GRB亚族的GRB-2 的结合。该结果代表基本情况，即接合蛋白与此PTK的结合是参与转化/致癌过程的一个步骤。

8.1 材料和方法

8.1.1. 转化测定

按以前所述感染Rat1成纤维细胞(Lugo等, 1989, Mol. Cell. Biol. 9 : 1263 - 1270)。按基因转移到成纤维细胞上的频率确定滴定度在每毫升 $> 10^5$ 感染颗粒的范围之内。通过在补加有15%胎牛血清和0.4% Noble琼脂的5 ml Iscores中每6 - cm² 平皿平铺 5×10^4 个细胞来测量半固体介质中Rat1集落形成(Lugo等, 1989,

Mol. Cell. Biol. 9 : 1263 - 1270)。通过在G518 (0.5mg/ml) 中培养感染细胞 12 - 15 天来建立G418耐受群。选择后, 将来自G418耐受培养物的细胞以每毫升 10^4 个细胞的密度平铺在琼脂中。平铺细胞两周后记录琼脂中形成集落的数目。

按以前所述感染并建立由新分离的鼠骨髓得到的造血细胞培养物 (McLaughlin等, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 6558.-6562), 简而言之, 将来自 4 - 6 周龄雌性BALB/C小鼠的骨髓元素以 2×10^6 个细胞/ml的浓度再悬浮在补加有每毫升 4 μ g的 Polybrene的适宜的逆转录病毒种子中。在 37 °C 温度下, 将细胞培养 4 小时。感染后, 将细胞洗涤并再悬浮在补加有 5 % 胎牛血清和 50 μ M β -巯基乙醇的RPMI 1640介质中, 以每 5 ml细胞混悬液有 10^6 个细胞的密度平铺于 6 cm² 平皿中。保持培养 8 周且每周加一次新鲜培养基。当非粘着性造血细胞的细胞密度超过每毫升 10^6 个细胞时, 考虑转化培养物。

8.1.2. 混杂方法

除按 8.1.1 节描述的方法进行转化测定外使用上文 6.1 节描述的技术。

8.2. 结果

为了确定GRB-2 结合BCR-ABL诱导致癌的生物学关系, 检测突变的酪氨酸177对BCR-ABL转化成纤维细胞和造血细胞能力的影响 (需要与GRB-2 结合)。使用野生型和突变BCR-ABL形式的无辅助逆转录病毒种子来感染Rat1成纤维细胞和新鲜分离的鼠骨髓细胞。在这些细胞类型中都显示表达了GRB-2 和hSOS-1 (Lowenstein等, 1992, Cell 70 : 431 - 442; Bowtell等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 6511 - 6515; Chardin等, 1993, Science

260 : 1338 - 1343)。通过在软琼脂中形成集落来测定Rat1成纤维细胞的转化 (Lugo等, 1989, Mol. Cell. Biol. 9 : 1263 - 1270)。在有助于前B淋巴细胞生长的条件下, 通过培养感染的小鼠骨髓细胞来测定造血细胞的转化 (McLaughlin等, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 6558 - 6562)。与野生型BCR-ABL相反, P185 (Y177F) 蛋白不转化造血细胞并显示转化Rat1细胞的能力降低 (参见下表1)。这些结果与以前所观察到的缺失Y177的P185 (Δ 176-426) 突变体显示在Rat1成纤维细胞和造血细胞中转化活性降低相一致 (Muller等, 1991, Mol. Cell. Biol. 11 : 1785 - 1792; 表1)。在Rat1成纤维细胞转化中, P185 (Δ 176-426) 显示比P185 (Y177F) 更显著的缺失, 尤其是在G418选择之后 (表1)。BCR第一外显子序列下游的Y177已经显示以磷酸丝氨酸/磷酸苏氨酸依赖性方式与SH2区结合 (Pendergast等, 1991, Cell 66 : 161 - 171; Muller等, 1991, Mol. Cell. Biol. 11 : 1785 - 1792)。在这个区内已确定两个SH2-结合位点 (指定为A和B) 而且除去这些位点可消除对由BCR-ABL-介导的成纤维细胞转化重要的特异蛋白质的相互作用。在造血细胞中P185 (Y177F) 和P185 (Δ 176-426) 都没有显示转化活性。BCR-ABL蛋白质转化活性的不同并不是由于蛋白质表达水平的不同。

表 1

逆转录病毒 ^a 的构成	Rat1 ^b #菌落/10 ⁵ 个细胞		转化的骨髓 ^c /总量
	急性感染 ^c	G418选择 ^d	
P185野生型	37	690	11/12
P185(Y177F)	0	40	0/14
P185(Δ 176-426)	0	10	0/9
载体	0	0	0/7

角注说明：

- a 不同P185 BCR-ABL形式的名称，圆括号中为突变或缺失的氨基酸。
- b 由每次测定使用两个板且每种构成独立测定4到5次得到的琼脂中集落形成的平均频率。
- c 用无辅助的逆转录病毒种子感染3天后，将细胞平铺于琼脂中。
- d 用无辅助逆转录病毒种子感染3天后，开始用G418(0.5mg/ml)选择细胞12到15天。
- e 显示转化淋巴样生长的高密度骨髓培养物的数与平铺的培养物总量。数据代表三次分别的实验。在每次实验中，用各自的逆转录病毒感染后产生细胞培养物。

对来自表达各种BCR-ABL形式细胞溶解物的Western印迹分析揭示用相应的逆转录病毒感染Rat1成纤维细胞后,蛋白质可达到类似的稳态水平。为进行Western印迹分析,用编码野生型和突变(Y177F)型的P185 BCR-ABL逆转录病毒或载体对照感染RAT1细胞。感染3天后,将细胞溶解并用抗ABL鼠单克隆抗体进行Western印迹。用ECL测定系统(Amersham)使免疫反应带显色。

9. 实施例:由Ras-反应性元素启动子以Ras-依赖性方式转录BCR-ABL活性

在本节的研究实施例中,证明了BCR-ABL细胞内PTK/GRB-2结合激活Ras发信号途径。

9.1. 材料和方法

9.1.1. 转录激活测定

基本上按以前描述的方法转录激活Ras-反应性元素(ets/AP-1)启动子的表达(Clark等,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4887 - 4891; Hauser等,1993, Methods in Enzymology, 正在印刷)。简而言之,在有或没有5 μ g pZIP H-Ras(17N)的存在下,用1 μ g pB4X-CAT氯霉素乙酰转移酶报道质粒(Wasylyk等,1989, Mol. Cell. Biol. 9: 2247 - 2250),与0.5 μ g含所示BCR-ABL突变体的pSR α MSVTkneo(Feig等,1988, Mol. Cell. Biol. 8: 3235 - 3243)一起转染NIH 3T3细胞。在60mm的平皿中进行双重转染并在48小时后收获细胞。在100 μ l 250mM Tris-HCl(pH 7.8)中冷冻解冻后,经离心取出细胞碎片并将上清液加热到62℃来使内源性乙酰转移酶变性。再一次离心后,用最终反应体积为140 μ l的0.1 μ Ci 14 C氯霉素(NEN)和0.34mM乙酰辅酶A i 250mM Tris-HCl培养45分钟来测定每份50 μ l各上清液的CAT活性。用500 μ l

乙酸乙酯提取来终止反应，真空蒸发，并将所得片状物再重新溶解，然后在硅胶板上，用5%甲醇/95%氯仿(v/v)作溶剂进行薄层色谱层析。用AMBIS β 扫描仪进行定量测定。

9.1.2. 混杂技术

除了按8.1.1节所述方法进行转化测定外，使用上6.1节所描述的技术。

9.2. 结果

GRB-2与BCR-ABL结合的机制可更有力地说明致癌转化通过SOS-1鸟嘌呤核苷酸交换因子经受Ras直接刺激。为了检测BCR-ABL与GRB-2的相互作用是不是直接进入Ras途径，使用转录激活测定法。致癌Ras增加由Ras反应性元素的转录速率(如，ets-1和AP-1 DNA基元序列，Hauser等，1993，Methods in Enzymology，正在印刷)。另外，具有广泛功能的癌基因(包括蛋白酪氨酸激酶和丝氨酸/苏氨酸激酶)可激活含Ras-反应性元素(如ets/AP-1基元)的启动子的转录(Schweighoffer等，1992，Science 256: 825-827)。各种癌基因激活含ets/AP-1的启动子的转录及其转化细胞的容量之间存在相关性(Wasylyk等，1988，EMBO J. 7: 2475-2483)。因此，反向激活测定可补充用细胞生长和致癌性研究来分析癌基因的功能。

比较野生型和突变型BCR-ABL激活ets/AP-1转录的能力。在含4个串联Ras-反应性元素的 β -珠蛋白启动子的控制下报道CAT(pB4X-CAT)。已经显示致癌Ras增加该元素转录的速率高达15倍(Schweighoffer，Science 256: 825-827)。如图1所示，通过Ras(17N)共转染消除野生型BCR-ABL诱导的激活，该Ras(17N)为一种显示中和Ras功能的主要抑制性突变体(Feig等，1988，Mol,

Cell. Biol 8 : 3235 - 3243; Thomas等, 1992, Cell 68 : 1031 - 1040; Wood等, 1992, Cell 68 : 1041 - 1050), 这表明BCR-ABL诱导的转录激活是通过Ras介导的。重要的是, 缺乏GRB-2结合的BCR-ABL突变体, P185(Y177F)和P185(Δ 176-426)对该启动子的转录反式激活产生很小的(如果有的话)影响。与野生型P185 BCR-ABL相比, 用BCR-ABL突变体获得的低水平的反式激活与它们降低的转化活性相关联(上表1)。

而且, 用野生型含BCR-ABL的逆转录病毒感染的Rat1成纤维细胞在Ras-GTP部分产生增加。具体来讲, 用无辅助逆转录病毒种子P185 BCR-ABL野生型或载体对照感染Rat1细胞。感染两天后, 用含 ^{32}P -正磷酸盐(0.5mCi/ml)的游离磷酸盐的介质中将该细胞标记16小时。将细胞溶解并用抗Ras单克隆抗体进行Ras-免疫沉淀。分离与Ras结合的鸟嘌呤核苷酸并随后在PEI-纤维板上用0.75M KH_2PO_4 (pH 3.5)通过薄层色谱层析来进行分离。用AMBIS β 扫描仪定量测定的与Ras结合的GDP和GTP的量表明有限度但能再现的增加。

10. 实施例: 发射非感受态(incompetent)的GRB2信号逆转转化细胞的表型

下列实施例表明破坏涉及BCR/ABL和GRB-2的信号转导途径的可逆转转化细胞的表型。提高发射非感受态GRB2突变体信号的表达逆转Rat1细胞中BCR/ABL诱导的转化生长。发射信号途径的破坏也抑制表达BCR/ABL的从慢性骨髓性白血病患者中分离的细胞(k562细胞)以及依赖于PDGF受体的转化细胞的生长。

10.1. 材料和方法

构成氨基(N')或羧基(C')末端缺失SH3区的突变的GRB2基因。按Pendergast等在Cell 75 : 175 - 185, 1993中描述的方法,

将全长的和截短的GRB2插入修饰pCGN质粒载体的Bam HI位点 (Tanaka 等, Cell 60 : 375 - 386, 1990)。该载体具有插入复制的SV₄₀起点上游的潮霉素耐受基因。为了促进辨别来源于转染构成物的内源性GRB2蛋白在突变蛋白骨架N端融合编码流感病毒血凝素抗原决定基序列 (Pati, U. K. Gene 114 : 285 - 288, 1992)。将相同的抗原标记物融合到野生型GRB2基因中。

按上实施例 8. 1. 1 的方法制备转化Rat1成纤维细胞的BCR/ABL。采用标准的磷酸钙转染方案 (Molecular Cloning Techniques, Laboratory Manual, 第二版, Ed Sambrook等, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989和Muller), 将GRB2构成物转染到Rat1-BCR/ABL细胞系和大鼠神经胶质瘤细胞系C6 (ATCC CCL 107) 中。转染后, 将Rat1细胞培养 24 小时, 然后暴露于药物G418 + 潮霉素 (Sigma) 中 7 - 9 天。将选择细胞集群的两个药物接种到软琼脂中, 并使用Western印迹术确定内源性BCR/ABL、GRB2和转染的GRB2水平。也建立了表达不同转染GRB2构成物的各种克隆细胞系。在转染C6 细胞的情况下, 按在Muller (同上) 中所描述的方法, 将细胞在含潮霉素的介质中选择 10 天。药物选择后, 将细胞接种在含 0.5% FCS和PDGF (1 ng/ml) 的软琼脂介质中。记录 10 天时大于 0.4mm的集落。

按Pendergast等在Cell 75 : 175 - 185, 1993中描述的方法, 通过免疫沉淀来评价GRB2构成物的表达。简而言之, 将表达BCR/ABL-GRB2的Rat1细胞溶解并用抗ABL pEX4抗体进行免疫沉淀, 在体外, 对免疫沉淀物进行自身激酶测定 (Pendergast等, Supra)。通过SDS-PAGE凝胶分析样品并用放射自显影术来显色。在第二个实验中, 将细胞溶在10mM Tris-HCl, pH7.4, 1% SDS, 1mM PMSF中, 用SDS

- PAGE (15%) 从每个样品中分出 15 μ g 的蛋白质。将该蛋白质电泳转移到硝基纤维素滤膜上并用抗 GRB2 小鼠单克隆抗体 (Transduction Laboratories) 进行免疫印迹, 然后用与马-萝卜过氧化酶 (BioRad) 结合的山羊抗小鼠 Mab 培养。用增强化学发光检测系统 (Amersham) 使蛋白质显色。

按以前所述方法进行软琼脂测定 (Lugo 等, *Mol. Cell. Bio* 9: 1263 - 1270, 1989)。按各细胞型的克隆效率, 以 $10^3 - 5 \times 10^4$ 个细胞 / 6 cm^2 平皿的密度范围, 接种药物选择细胞的集群。将样品按双份放在含 20% 胎牛血清的介质中。14 天后记录肉眼可见的集落 ($>0.4 \text{ mm}$)。该数据表示在用转染和药物选择的细胞的集群进行的 3 到 5 次独立实验中观察到的集落的平均数。使用三种由适宜构成物转染的独立 Rat1-BCR/ABL 克隆细胞系并对每个细胞系重复 2 到 3 个分割的实验, 得到 Rat1-BCR/ABL 生长的数据。因此, 该数据表示在 7 个独立实验中观察到的集落平均数。

采用标准的电泳法 (electroporation), 用 GRB2 构成物转染 K562 (ATCC CRL 243) 细胞。转染后, 将细胞培养 18 到 24 小时, 然后暴露于潮霉素 ($500 \mu\text{g}/\text{ml}$) 2 天。药物选择后, 通过记录排斥染料台盼蓝的细胞来确定生存细胞的数目。将相同数量的生存细胞接种在软琼脂中。

10.2. 结果

10.2.1. GRB2 在 RAT 1 细胞中的表达

在 Rat1-BCR/ABL 细胞中表达的 N' GRB2 突变蛋白逆转为正常表型。表达 N' GRB2 突变体的细胞集群在液体培养物中以单层生长, 并且当汇合时显示接触性抑制。重要的是, 当与表达空载体的细胞比较时, 表达 N' GRB2 突变体的 Rat1-BCR/ABL 细胞在其软琼脂中形成集

落的能力显示戏剧性地减小（见表2）。表达C' GRB2突变体的细胞在液体培养物中按单层生长，但当汇合时不抑制。表达C' GRB2突变体的Rat1-BCR/ABL成纤维细胞在软琼脂中的生长也被抑制，但比在N' GRB2突变体中观察到的抑制程度要小。因为在表达N' 和C' 的细胞群中都存在相似比例的突变蛋白与野生型GRB2蛋白，所以N' 突变体对BCR/ABL诱导转化的抑制的较大效力可能并不是简单地由于两种突变体量的不同。具体来说，溶解仅表达P210 BCR-ABL或也表达野生型GRB-2或截断的GRB-2的Rat1细胞，并用抗ABL抗体进行免疫沉淀。在体外自身激酶测定免疫沉淀物并通过SDS-PAGE（8%凝胶）来分析样品。在比对照提高GRB-2表达的细胞中未见ABL激酶活性的改变。另外，溶解单独表达P210 BCR-ABL或也表达野生型GRB-2或截断的GRB-2的Rat1细胞并将克隆细胞溶解物的蛋白质电泳转移到硝基纤维素滤膜上，然后用抗GRB-2 MAb进行免疫印迹。所有GRB-2转化体大约表达相同量的GRB-2蛋白质。更确切地说，这些不同可表明两个SH3区结合不同亲和力的SOS或与不同的底物结合。因此，当GRB2 SH3缺失突变蛋白在细胞中以相同摩尔或比内源性野生型GRB2较大量存在时，它作为BCR/ABL诱导转化的区域性负抑制剂而起作用。

与N' 或C' GRB2突变体相反，野生型GRB2在Rat1-BCR/ABL成纤维细胞中表达的提高似乎强调转化的表型。表达转染野生型GRB2组件细胞的药物选择集群在软琼脂集落数量上与用空载体转染的细胞相比，一致显示25-30%的增加（表2）。这些数据揭示在BCR/ABL诱导的Rat1成纤维细胞的转化中，GRB2蛋白可以是一种限制效应子。

表 2

构成物	Rat1	K562	C6
空载体	566	187	520
野生型GRB2	734	209	577
N' 截断的GRB2	14	13	2
C' 截断的GRB2	119	86	3
(# 集落 / 1×10^4 个接种细胞)			

10.2.2. GRB2突变体在K562细胞中的表达

SH3 GRB2突变体也抑制人白血病细胞的生长。将GRB2构成物引入K562细胞,该细胞是一种由胚细胞危象(blast crisis)CML患者得到的表达P210 BCR/ABL的细胞。转染并用药物选择48小时之后,用Western印迹分析测定内源性BCR/ABL、GRB2和转染的GRB2的浓度。同时,将生存的细胞接种在软琼脂中。当与模拟转染对照比较时,接种有表达N' GRB2突变体蛋白K562细胞的培养物显示少10倍的软琼脂集落数目(表2)。与在Rat1-BCR/ABL成纤维细胞中所观察到的情况相类似,C' GRB2突变体也抑制K562集落的形成,但比N' 突变体抑制的程度要小。这些数据表明GRB2介导的信号转导是BCR/ABL诱导的人恶性肿瘤的必要组成部分。

1 0 . 2 . 3 . GRB2在C6神经胶质瘤细胞中的表达

也将GRB2构成物引入鼠C6神经胶质瘤细胞中,它依赖于转化其生长表型的PDGF受体活性(Zhang等, Neurol, Res. 14 (5) : 397 - 401, 1992)。据显示PDGF受体与GRB2相互作用(Lowenstein等, 1992, Cell 70 : 431 - 442)。如表2所示,发射非感受态GRB2突变体信号的表达显著抑制集落的形成。该数据证明抑制GRB2信号转导可用于抑制依赖于受体酪氨酸激酶激活的转化细胞的生长。

1 1 . 实施例:发射非感受态的GRB2信号预防动物模型中肿瘤的生长

该实施例证明在动物中表达发射非感受态GRB2信号的细胞不再能形成肿瘤,揭示了BCR/ABL发信号途径的破坏可用于治疗哺乳动物癌症。

1 1 . 1 . 材料和方法

按上1 0 . 1 节的方法制备表达GRB2(野生型和突变型)和BCR/ABL的Rat1细胞。从左肋给裸鼠(每组四只)皮下注射共同表达P210 BCR/ABL和野生型GRB2, N'截断的GRB2或C'截断的GRB2的Rat1细胞。在每只鼠的右侧后腿皮下注射仅表达P210 BCR/ABL的细胞(2×10^6 个细胞在100 μ l中)作为自身对照。在植入三周后,处死小鼠并测量肿瘤的体积。

1 1 . 2 . 结果

表3所示结果清楚地证明在体内,发射非感受态GRB2蛋白质信号的表达减小肿瘤细胞的生长。

表 3

组别	左	右
野生型GRB2	0.5	0.5
N' 截断的GRB2	0.3	0.7
C' 截断的GRB2	<0.1	0.7
(所示数据为每组的平均肿瘤大小)		

1 2 . 实施例：发射非感受态GRB2信号对Ras激活的影响

该实施例显示本文所述的发射非感受态GRB2分子信号抑制BCR/ABL诱导的ras激活，这与由GRB2和下游发信号成分相互作用来破坏ras激活的转化抑制力相称。

1 2 . 1 . 材料和方法

按上 9 . 1 节所述方法，转录激活Ras-反应性元素(ets/A P - 1)启动子的表达。按上 1 0 . 1 节所述方法进行Rat1细胞转化，软琼脂测定和免疫印迹实验。

1 2 . 2 . 结果

为了确定GRB2的生长抑制作用是不是由于其阻断ras激活的能力，由过度表达野生型或突变型GRB2蛋白的Rat1-BCR/ABL细胞系来制备溶解物，并评价其激活ras的能力。采用ras依赖性转录激活测定，我们观察到来自表达N' GRB2的Rat1-BCR/ABL细胞的溶解物显示比模

拟转染对照低 10 – 15 倍的ras激活活性(图 2)。来自表达C' GRB2细胞系的溶解物也在其ras激活活性上有所减小,但减小的程度比N'突变体减小的程度要小。N'和C'突变体抑制作用的不同与其逆转BCR/ABL转化表型的能力是一致的。

在信号转导途径中,如果阻断GRB2突变蛋白功能的中间步骤先于Ras,然后再用基因转化,不会影响防止ras激活。为了试验该假设,将GRB2构成物转染到用激活形式的raf转化的Rat1细胞中,该raf是一种在相同发信号途径中引起其ras促细胞分裂作用下移的丝氨酸激酶(Kolch等, *Nature* 349 : 426, 1991)。用潮霉素进行药物选择后,将细胞集群接种在琼脂中。在软琼脂中,表达N'或C' GRB2突变体的Rat1/v-raf细胞与模拟转染的对照细胞产生相同数量的集落(表 4)。而且,表达比内源性野生型GRB2蛋白质多出多于 2 倍量的SH3突变体的细胞系在软琼脂中的生长能力不受抑制。这些数据揭示GRB2突变蛋白通过未偶合的信号转导途径上游的raf抑制BCR/ABL促细胞分裂信号。

表 4

组件	Rat1/v-raf
空载体	620
野生型GRB2	665
N' 截断的GRB2	653
C' 截断的GRB2	598
(# 集落 / 1×10^4 个接种细胞)	

1.3. 实施例：GRB2突变体抑制人 P h¹ - 阳性白血病细胞系K562的生长并诱导其分化

在下列实施例中，证明SH3 Grb2突变蛋白质不仅显示出逆转造血细胞BCR/ABL诱导致癌表型的能力，而且此突变体能使K562细胞发生红细胞分化。

1.3.1. 材料和方法

转化测定：按上文8.1.1节中所述方法进行软琼脂测定。依据各细胞型的克隆效率，按 10^3 到 5×10^4 个细胞/ 6 cm^2 平皿的密度范围，将等量的生存细胞接种在软琼脂中。将样品以双份平铺在含20%胎牛血清的介质中。14天后，记录肉眼可见的集落(>0.4mm)。将集落数调整到 10^4 细胞。

转录激活测定：按以前所述方法转录激活Ras-反应的元素(ets/A P-1)启动子的表达(Pendergast等, 1993)。简而言之，用 $1\text{ }\mu\text{g}$ pB4X-CAT报道质粒转染表达GRB2蛋白的正常Rat1细胞和转化的Rat1/BCR-ABL细胞。转染后48小时，收集细胞并按上文9.1.1节中所述方法测定CAT活性。

结合测定，体外自身磷酸化和免疫印迹：基本上按上文6.1.6和6.1.7节所述方法进行体外结合测定。体外用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP标记和免疫印迹过程。

血红蛋白测定：基本上按Feinstein等人描述的方法测定转染K562细胞集群中血红蛋白的量(Feinstein, E. 等, 1992, Oncogene 7: 1853 - 1857)。简而言之，由各细胞群制备溶解物并采用Bradford测定法测定蛋白质总量。对于每个样品来说，将 $20\text{ }\mu\text{g}$ 的总细胞蛋白质与1%联苯胺的90%乙酸溶液和新鲜制备的过氧化氢混合。在室温下培养20分钟后，加入10%乙酸溶液并测定515nm处的光密

度。用人血红蛋白作标准对照。

肿瘤生长测定：基本上按Lugo等人所述的方法评价Rat1/BCR-ABL成纤维细胞的致癌性（Lugo等，1989，Mol. Cell. Biol 9：1263 - 1270）。简而言之，将来自野生型或突变体GRB2构成物转染的Rat1/BCR-ABL成纤维细胞集群的 2×10^5 个细胞接种在裸鼠的左后肋中。作为自身对照，每只小鼠也在右后肋接种空载体转染的Rat1/BCR-ABL细胞。每个Rat1/BCR-ABL细胞群评价四只小鼠。接种三周后，将小鼠处死，按湿重克数比较并记录左和右肋上的肿瘤大小。

1 3 . 2 . 结果

在下文所述的实验中，评价在造血细胞中SH3 GRB2突变蛋白是否能逆转BCR/ABL诱导的致癌表型。将GRB2构成物引入P h⁺ - 阳性K562细胞中。转染并在潮霉素存在下培养48小时后，通过免疫印迹分析测定内源性和转染的GRB2蛋白的浓度。同时，从液体培养物中收集细胞并将等量细胞接种在软琼脂中。在每一实验中，转染的GRB2突变蛋白的至少比内源性GRB2高5倍。当与模拟转染对照相比时，用而后表达 ΔN -GRB2突变蛋白的K562细胞接种的培养物在软琼脂中显示少10倍的集落（见上文表2）。与在Rat1/BCR-ABL成纤维细胞中所观察到的情况相类似， ΔC -GRB2突变体也抑制K562集落的形成，但比 ΔN -GRB2要弱（见上文表2）。这些数据充分揭示GRB2介导的BCR-ABL诱导Ras激活是BCR-ABL诱导的人恶性肿瘤中一个必要组成部分。

虽然在培养物中可以维持稳定表达高水平野生型GRB2蛋白的K562细胞系，但不可能产生表达 ΔN 或 ΔC -GRB2蛋白的克隆细胞系。K562细胞保留其分化和合成血红蛋白的能力（Anderson L. C.等，

1979, Int. J. Cancer 23 : 143 - 147; Rowley, P. T.等, 1981, Exp. Hematol. 9 : 32 - 37; Feinstein, E.等, 1992, Oncogene 7 : 1853 - 1857)。以前的研究已经证明可使用抑制酪氨酸激酶活性的药物来使K562细胞产生红细胞分化(Fukazawa H.等, 1991 Biochem. Pharm, 42 : 1661 - 1671; Anafi, M.等, 1993, Blood 82 : 3524 - 3529)。

为了确定GRB2突变体的表达是不是存在类似的分化过程, 溶解一部分在软琼脂测定中使用的转染K562细胞并确定各转染细胞群的血红蛋白的量。在表达 ΔN 或 ΔC -GRB2突变体的细胞中观察到血红蛋白的浓度有戏剧性增加。相反地, 表达高水平野生型GRB2蛋白质的K562细胞与模拟转染对照相比血红蛋白没有增加。因此, 本文所使用的GRB2突变体不仅能逆转BCR/ABL转化表型, 而且在K562细胞中产生红细胞分化。这些数据揭示BCR-ABL在某种程度上可通过以Ras依赖性方式阻断正常分化而转化造血细胞。

1.4. 实施例: 用筛选测定来鉴定破坏蛋白质/酪氨酸激酶相互作用的化合物

该实施例描述的是一种评价试验化合物抑制结合配对复合物之间相互作用的能力。此结合配对物例如可包括接合蛋白和与此接合蛋白质结合的分子, 如, 激活的酪氨酸激酶和其它蛋白质如SHC蛋白。本文鉴定的化合物能够调控细胞生长并能调节肿瘤发生和细胞增殖疾病。

在本文所述的具体测定中, 在试验物的存在下, 用磷酸化酪氨酸激酶蛋白(它已被固定在固相上)培养能与磷酸化酪氨酸激酶蛋白结合的接合蛋白-GST融合蛋白。与不存在试验化合物时结合于酪氨酸激酶分子的接合蛋白-GST融合蛋白的量相比, 当试验物能抑制接合蛋白-GST融合蛋白和酪氨酸激酶分子之间的相互作用时。它致使与

固定的酪氨酸激酶分子结合的接合蛋白-GST融合蛋白的量减少。

该实施例详细描述GRB-2和EGF-R相互作用的抑制剂的筛选。然而，可将相同的原则用于检测任何酪氨酸激酶蛋白质或酪氨酸磷酸化的酪氨酸激酶底物（如，SHC，磷酸酯酶1D）和与之相互作用的任何接合蛋白之间相互作用的抑制剂。

接合-GST融合蛋白：本文所使用的接合-GST（谷胱甘肽-S-转移酶）融合蛋白是通过在用GRB-2/pGEX构成物转化的大肠杆菌中表达来制备的GRB-2-GST融合蛋白。这些融合蛋白的GRB-2部分仅由GRB-2蛋白的SH2区组成。使转化的细胞在补加有氨苄青霉素的Luria肉汤培养基中生长。在600nm处，光学密度（OD）达到0.3后，用异丙基- β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷（IPTG）将细胞诱导6小时以便表达融合蛋白。

表达6小时后，在4℃下，以10,000xg的转速离心10分钟，使细胞沉淀，成片，洗涤并再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中（PBS）。此后，通过超声处理使细胞溶解（冲击6次，每次5秒钟）。在4℃下以10,000xg转速离心10分钟除去未溶解的材料并将上清液通过谷胱甘肽-琼脂糖凝胶柱。用5mM还原谷胱甘肽洗脱柱中的结合GRB-2-GST融合蛋白，然后用PBS进行渗析。

固定的酪氨酸激酶分子：本文所使用的酪氨酸激酶分子是表皮生长因子受体酪氨酸激酶（EGF-R）。EGF-R是从过度表达EGF-R的细胞（如A431（ATCC CRL 1551）细胞系）中分离的。将该细胞溶在HNTG缓冲液中（20mM Hepes/HCl，pH7.4，150mM NaCl，1.0%去利通X-100，5%甘油，1mM苯甲基磺酰基氟化物（PMSF），1mg/L抑肽酶，1mg/L亮氨酸，10mg/L苯脲）。

按下文所述，通过固定在微滴定板上从细胞溶解物分离EGF-R

蛋白。按下文所述，随后在体外将EGF-R磷酸化。

将EGF-R分子固定在微滴定板上。在4℃温度下，用直接对抗胞外EGFR区（UBI，#05 - 101）的抗EGF-R单克隆抗体以每微滴定孔0.5 μg（在PBS中，每孔最终体积为150 μl）的浓度首先过夜涂铺滴定板的孔来制备微滴定板。

过夜涂铺后，从微滴定孔中除去涂铺溶液，在室温下用封阻缓冲液（5%在PBS中的干乳）置换30分钟，此后，除去封阻缓冲液并用TBST缓冲液（150mM NaCl，50mM Tris-HCl，pH7.2，0.1%去利通X-100）将孔洗涤4次。

将来自表达EGF-R细胞的细胞溶解物（在150 μl PBS中）加到各孔中，在室温下，振摇培养30分钟。用TBST缓冲液将孔洗涤5次除去未结合的EGF-R。每孔大约结合50 - 100 ng的EGF-R蛋白。

使用显示高内源性磷酸酯酶活性的过度表达EGF-R的细胞系（如A431细胞系）是重要的。这是因为在用固定的抗体裂解和培养期间，磷酸酯酶从EGF-R分子上除去磷酸酯基团，因此，阻止了内源性接合蛋白（如GRB蛋白）与EGFR结合（它能潜在性地导致假性结果）。另外，如果所使用的细胞系容易饥饿，那么在裂解前，细胞也会饥饿。

制备自身磷酸化的EGF-R：在体外进行下列激酶反应产生自身磷酸化的EGF-R。通过加入15 μl ATP/Mn²⁺混合物（在50mM MnCl₂中，最终浓度为10 μM ATP，总体积为150 μl）来使激酶反应启动。在室温下将板培养5分钟，振摇，吸出上清液，然后将该板用TBST洗涤5次。

测定过程：在溶于二甲基亚砜（DMSO）的试验化合物存在下，将30 ng GRB-2-GST融合蛋白（即1：1配比的EGF-R：GRB-2蛋白）或5 ng GRB-2-GST融合蛋白（即4：1配比的EGF-R

: GRB-2 蛋白) 加到磷酸化的 EGF-R 涂铺的微滴定孔中, 室温下在培养缓冲液 (0.1M 磷酸钾缓冲液, pH6.5) 中培养 30 分钟。在不存在试验物的条件下, 用 GRB-2-GST 融合蛋白培养对照孔。

培养后, 用 TBST 将孔彻底洗涤。然后优选用对抗融合蛋白的 GST 一部分的纯化兔抗血清 (AMRAD, New Victoria, Australia, Catalog No. 00001605) 确定与固定的 EGF-R 结合的 GRB-2-GST 融合蛋白的量。在室温下培养 30 分钟。培养后, 除去抗体并用 TBST 将孔彻底洗涤。为了显色, 将孔在室温下用 TAGO 山羊抗兔过氧化酶抗体再培养 30 分钟。培养后, 除去抗体, 先用自来水, 再用 TBST 洗涤各孔。将底物溶液, ABTS (2, 2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸))/H₂O₂ (1.2 μl H₂O₂ 加到 10 ml ABTS 中) 加到孔中, 并在室温下培养 20 分钟。加 5 NH₂SO₄ 使反应停止。测定每孔在 410nm 处的 OD。采用该技术, 在背景上检测少达 2 ng GRB-2-GST 是可能的。

另外, 试验物和 GRB-2-GST 融合蛋白在 EGF-R 孔上培养后, 可用生物素酰化的单克隆抗体 (如, EL-6 或 EL-12) 来测定结合的融合蛋白。用抗体识别的抗原决定基对 GRB-2 SH2 区作图谱, 但不干扰 GRB-2 与磷酸化 EGFR 的结合, 然后使用抗生物素蛋白链菌素生物素酰化的辣根过氧化酶反应物测定这些抗体的结合。

此外, 将试验物和 GRB-2-GST 融合蛋白在 EGF-R 孔上培养后, 可通过用 1 mM 1-氯-2,4-二硝基苯 (CDNB) 和 1.54 mg/ml 还原的谷胱甘肽的培养缓冲液培养来测定与固定的 EGFR 结合的融合蛋白。然后测量 340nm 处的 OD。在 OD 1.0 以下, 该反应是线性的, 并可按 Mannervik 和 Danielson 所述方法, 用竞争性 GST 抑制剂停止反应 (Mannervik, B. 和 Danielson, V. H., 1988, CRC Critical

Reviews in Biochemistry 23 : 238)。

在未脱离本发明的主题和范围的情况下，对本文所述的本发明进行各种修饰和改变是显而易见的。上文所述的具体实施方案仅是以实施例的方式给出的并且本发明仅通过所附加权利要求项来限定。

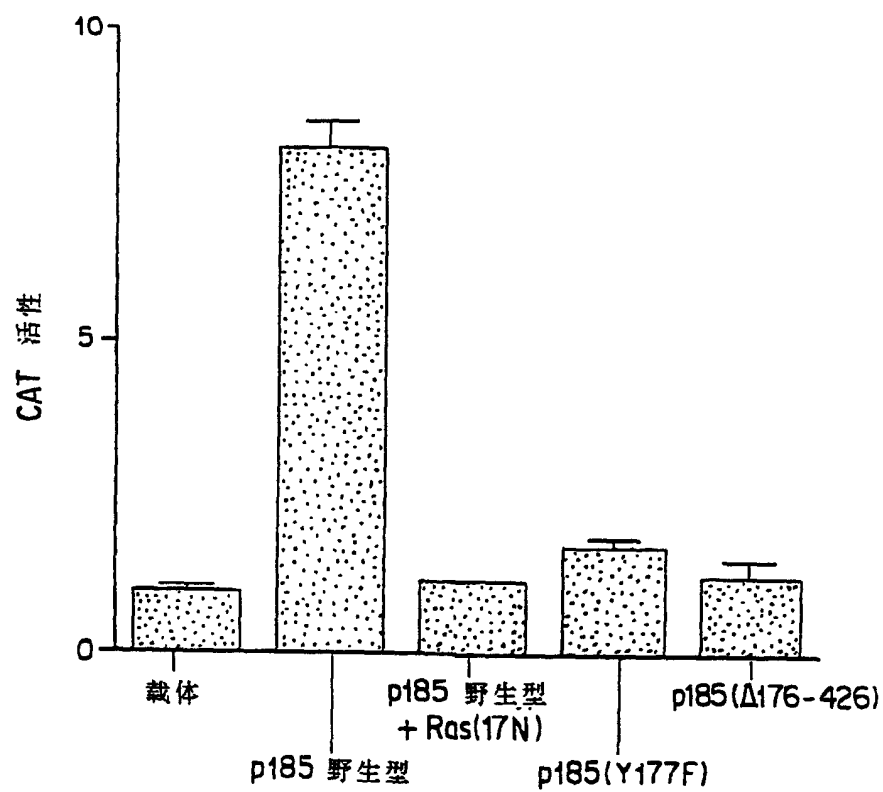


图 1

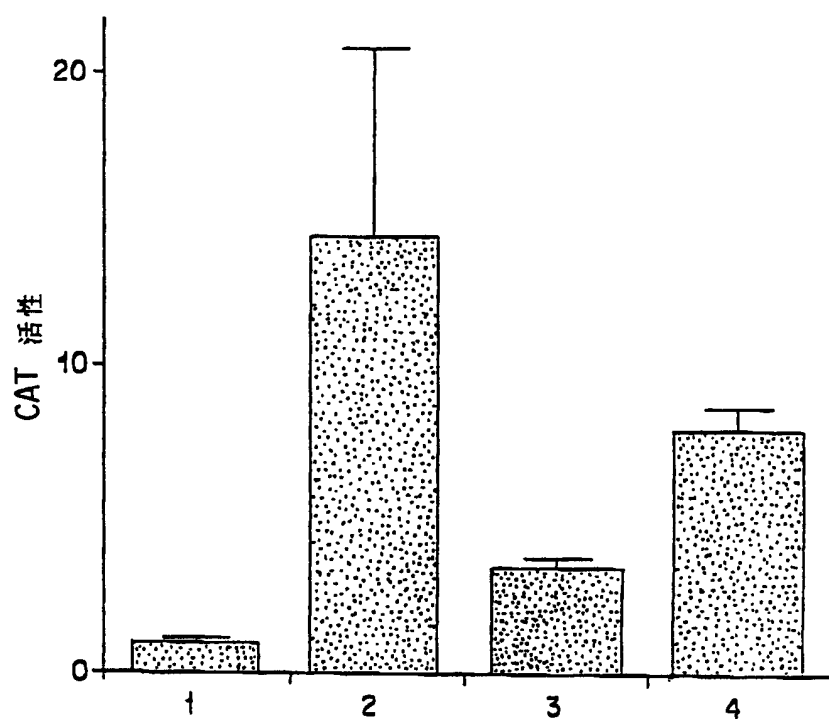


图 2

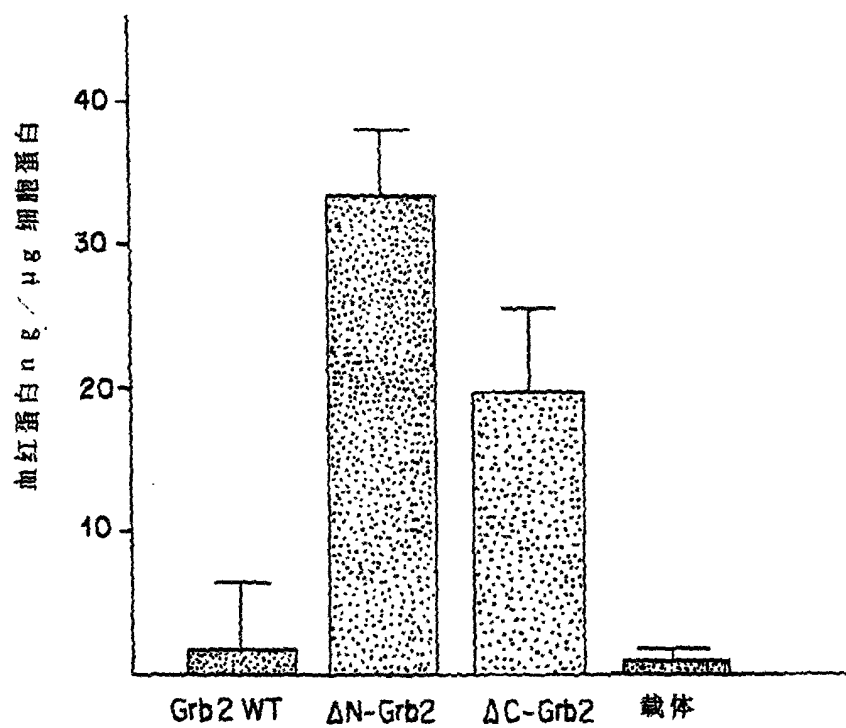


图 3