

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

C12Q 1/48 (2006.01)
C07K 14/72 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

专利号 ZL 200480006018.7

[45] 授权公告日 2007 年 10 月 31 日

[11] 授权公告号 CN 100345978C

[22] 申请日 2004.3.4

[21] 申请号 200480006018.7

[30] 优先权

[32] 2003. 3. 7 [33] EP [31] 03005186.6

[86] 国际申请 PCT/EP2004/002185 2004. 3. 4

[87] 国际公布 WO2004/079326 英 2004. 9. 16

[85] 进入国家阶段日期 2005. 9. 5

[73] 专利权人 国家肿瘤治疗研究中心

地址 意大利米兰

[72] 发明人 L·A·平纳 A·多内拉-德亚纳

O·马林 L·莫洛格尼

R·古恩比

C·甘巴科尔蒂帕瑟里尼

L·斯卡波扎

[56] 参考文献

US5770421A 1998. 6. 23

US6001621A 1999. 12. 14

Kinase receptor activation (KIRA): A rapid and accurate alternative to end - point bioassays. SADICK M D ET AL, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 1999 NETHERLANDS, Vol. 19 No. 6 1999

审查员 孙俊荣

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

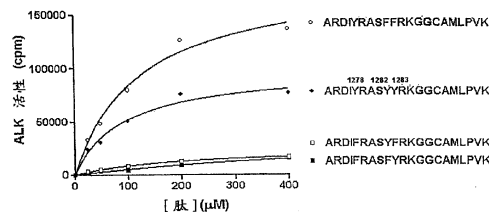
权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 6 页

[54] 发明名称

间变性淋巴瘤激酶测定法、试剂和它们的组合物

[57] 摘要

公开了用于检测 ALK 酪氨酸激酶活性并且用于鉴定调节 ALK 活性的化合物的方法、肽底物、试剂和它们的组合物。



1. 检测间变性淋巴瘤激酶(ALK)的酪氨酸激酶活性的方法, 其包含以下步骤:

i) 将 ALK 蛋白质或其功能衍生物与选自 SEQ ID NO. 1 或者 2 的肽底物在适于肽磷酸化的条件下孵育;

ii) 检测磷酸化的肽。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其中肽具有 SEQ ID NO. 1 的序列。

3. 根据权利要求 1 的方法, 其中使用纯化的 ALK 蛋白质或者含有 ALK 的制品。

4. 根据权利要求 3 的方法, 其中所述制品是细胞裂解液。

5. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述功能衍生物含有跨越 ALK 序列 1116-1392 残基的完整 ALK 催化结构域。

6. 根据权利要求 5 的方法, 其中所述功能衍生物是从残基 Leu¹⁰⁷³ 到 Ala¹⁴⁵⁹ 的 ALK 蛋白质片段。

7. 根据权利要求 6 的方法, 其包含步骤:

a) 将 SEQ ID NO. 1 或者 2 的肽附着于固相;

b) 将固相与所述 ALK 片段在适宜酪氨酸磷酸化的条件下孵育;

c) 洗涤固相;

d) 将固相与作为初级抗体的抗磷酸化酪氨酸抗体在适宜抗原-抗体结合的条件下孵育;

e) 洗涤固相;

f) 将固相与能够识别初级抗体的作为次级抗体的酶缀合抗体在适于初级抗体与次级抗体结合的条件下孵育, 以致形成三元免疫复合物;

g) 洗涤固相;

h) 测定免疫复合物的酶活性, 其中测定的活性与酪氨酸磷酸化的数量成比例。

8. 根据权利要求 7 的方法, 其中与抗体缀合的酶是辣根过氧化物酶。

9. 根据权利要求 7 的方法, 其中酶活性是通过比色反应检测的。

10. 权利要求 1-9 任一项所述的方法在用于鉴定调节 ALK 酪氨酸激酶活性的化合物中的用途。

11. 根据权利要求 10 的用途, 其包含步骤:

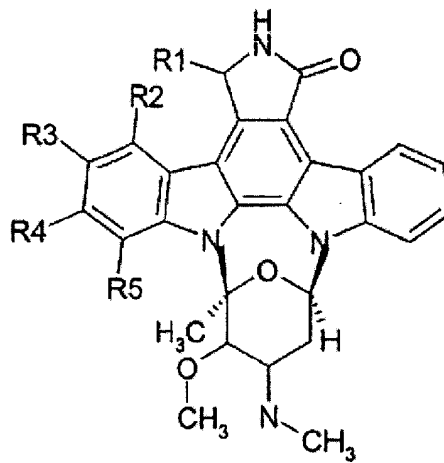
i) 在存在候选化合物(a)时, 将 ALK 蛋白质或其功能衍生物与选自 SEQ ID NO. 1 或者 2 的肽在适于肽磷酸化的条件下孵育;

ii) 检测因此而形成的磷酸化的肽。

12. 根据权利要求 10 或 11 的用途, 其中进一步包括将候选化合物的 ALK 调节活性与同候选化合物相同的条件下进行测定的参考化合物的 ALK 调节活性进行比较。

13. 根据权利要求 12 的用途, 其中参考化合物是星形孢菌素。

14. 根据权利要求 12 的用途, 其中参考化合物是具有通式 (I) 的星形孢菌素衍生物:



其中 R1 和 R2 相互独立地选自卤素、苯基或者 C1-C3 烷基; R3 为羟基; R4 为羟基或者羟甲基; R5 为 C1-C3 烷基或者苯甲基。

15. 根据权利要求 14 的星形孢菌素衍生物, 其中 R1 和/或 R2 为氯。

16. 根据权利要求 14 的星形孢菌素衍生物, 其中 R1 和/或 R2 为被一个或多个卤素取代的 C1-C3 烷基。

17. 根据权利要求 15 的星形孢菌素衍生物, 其中 R5 为被卤素取代的 C1-C3 烷基。

18. 选自 SEQ ID NO. 1 或 2 的用作 ALK 底物的肽。

-
19. 根据权利要求 18 的肽，它是 SEQ ID NO. 1。
 20. 根据权利要求 18 或者 19 的肽用于测定 ALK 酪氨酸激酶活性的用途。
 21. 用于权利要求 1-9 任一项方法和权利要求 10-14 任一项用途的试剂盒，其中含有 SEQ ID NO.1 或者 2 的肽和抗磷酸化酪氨酸的抗体。
 22. 根据权利要求 21 的试剂盒，其还含有选自比色反应试剂、缓冲液、稀释剂、去污剂、稳定剂、根据权利要求 14 的星形孢菌素或其衍生物的额外组分。

间变性淋巴瘤激酶测定法、试剂和它们的组合物

本发明提供了测定间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase) (ALK) 的激酶活性的测定法。更具体地, 本发明针对用于检测 ALK 酪氨酸磷酸化活性的方法、试剂和组合物。该测定法对于体外筛选和鉴定潜在的 ALK 抑制剂特别有用。

发明背景

间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 是一种受体酪氨酸激酶, 被认为在神经系统的发育和功能方面起着重要的作用。ALK 通常表达于中枢神经系统, 而在新生儿期有较弱的表达。然而由于染色体易位, 在一些癌症中 ALK 也可以以致癌性融合蛋白的形式异常表达或激活。在所有的非何杰金 (Hodgkin) 淋巴瘤中, 大约 5-10% 是由于 ALK 融合蛋白引起的。ALK 阳性的淋巴瘤的年发病率在全世界为大约 100 000, 在欧盟 (EU) 国家每年的新发病例为 2000-3000。因为 ALK 在致癌性中起着根本的作用并且正常的表达基本上局限在中枢神经系统, 它成为用于治疗介入的极好的候选。因此, 特异的 ALK 抑制剂会有有效的治疗 ALK 阳性淋巴瘤, 且几乎不带有临床副作用。对于鉴定潜在的 ALK 抑制剂, 极其需要研发出直接评估化合物对酶活性抑制效果的适宜测定法。

发明内容

根据发明, 提供了对 ALK 特异的并且用于筛选调节 ALK 活性的化合物的体外激酶测定法。本测定法基于使用容易被 ALK 磷酸化的肽底物和随后的对所得到的磷酸化产物的检测。在本发明的一个优选实施方案中, 测定法是 ELISA, 其中通过免疫化学反应检测磷酸化产物。

为了产生选择性的 ALK 底物, 合成并测试了再现 ALK 激活环 (氨基

酸 1274-1294: ALK_HUMAN, Q9UM73, swiss-PROT) 的序列的肽。肽 ARDIYRASFFRKGGCAML PVK (SEQ ID NO. 1) 和 ARDIYRASYYRKGGCAML PVK (SEQ ID NO. 2) 作为 ALK 底物特别有效, 表现出高于多聚 Glu/Tyr 的磷酸化程度, 多聚 Glu/Tyr 是一种随机多聚物, 已知它对于多数酪氨酸激酶是优良的底物。因此本发明的第一个目标是具有选自 SEQ ID NO. 1 和 SEQ ID NO. 2 的氨基酸序列的肽。

本发明还有的目标是检测 ALK 酪氨酸激酶活性的方法, 其大致包括步骤:

i) 将 ALK 蛋白质或其功能衍生物与选自 SEQ ID NO. 1 及 2 的肽在适于肽磷酸化的条件下孵育;

ii) 检测所形成的磷酸化的肽。

如此处所使用“ALK 功能衍生物”指 ALK 蛋白质的任何修饰形式, 例如其保持着未修饰 ALK 的催化活性的截短或缀合的形式或其片段。功能衍生物应优选含有跨越 ALK 序列(Q9UM73)中 1116-1392 残基的 ALK 完整的催化结构域。优选使用从残基 Leu¹⁰⁷³ 延伸到 Ala¹⁴⁵⁹ 的 ALK 蛋白质的部分。当通过重组基因技术使用基于杆状病毒的表达系统产生时, ALK 片段表现出正确的折叠(通过圆二色性谱证实)和有效的催化活性。

此外, 可以使用含有 ALK 组成性活性形式的制品代替纯化的蛋白质或其功能性衍生物。此种制品优选地是细胞裂解液, 通过用不同的化合物处理表达 ALK 的细胞进而评估细胞裂解液中 ALK 激酶的活性, 细胞裂解液可用于 a) 评估表达 ALK 或者 ALK 融合蛋白的全细胞中的 ALK 活性和 b) 评估潜在抑制剂对细胞内 ALK 的效果。

为了检测步骤 ii) 中的磷酸化的肽, 步骤 i) 中的磷酸化反应可以在放射性试剂(例如 $[\gamma^{32}\text{P}] \text{ATP}$ 或者 $[\gamma^{33}\text{P}] \text{ATP}$) 存在的情况下进行, 从而形成了通过放射分析技术容易检测的放射性产物。另外, 可以实施免疫反应, 该反应包括形成磷酸化肽和抗磷酸化酪氨酸抗体之间的免疫复合物。该抗磷酸化酪氨酸的抗体可以是放射性标记的或者与诸如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶或者葡萄糖氧化酶之类的报告酶缀合, 因此能够通过

测定特异的放射性或者酶活性直接检测抗体并由此检测磷酸化肽。还可另选的是，通过识别抗磷酸化酪氨酸抗体并且带有放射性标记或者报告酶的次级抗体，或者通过识别生物素标记的抗磷酸化酪氨酸抗体的链霉亲和素缀合酶，间接检测抗磷酸化酪氨酸的抗体。

在本发明一个优选的实施方案中，提供了检测 ALK 酪氨酸激酶活性的方法，其包含步骤：

- a) 使 SEQ ID NO. 1 或者 2 中的肽附着于固相上；
- b) 将固相和从 Leu¹⁰⁷³ 至 Ala¹⁴⁵⁹ 的 ALK 片段在适宜酪氨酸磷酸化的条件下孵育；
- c) 洗涤固相；
- d) 将固相和抗磷酸化酪氨酸的抗体（初级抗体）在适宜抗原-抗体结合的条件下孵育；
- e) 洗涤固相；
- f) 将固相与能够识别抗磷酸化酪氨酸初级抗体的酶缀合抗体（次级抗体）在适于初级抗体与次级抗体结合的条件下孵育，以致形成三元免疫复合物；
- g) 洗涤固相；
- h) 测定免疫复合物的酶活性，其中测定的活性与酪氨酸磷酸化的数量成比例。

该测定法是完全基于 ELISA 的激酶测定法，它利用了酶-抗体缀合物。缀合的酶裂解底物以产生有色反应产物，该产物可通过测定有色溶液的吸光来进行分光光度法检测，其与磷酸化酪氨酸的数量成比例。

根据本发明，能够使用的固相或支持物包括塑料材料（反应板、孔、瓶）、聚苯乙烯、橡胶和磁珠、胶体金属颗粒、玻璃和/或硅表面等。

基于 ELISA 的 ALK 测定法优选用于筛选能够调节 ALK 酪氨酸磷酸化活性的化合物，特别是用于筛选 ALK 抑制剂。

因此本发明的一个优选实施方案涉及用于鉴定能够调节 ALK 酪氨酸激酶活性的化合物的方法，其中在存在候选化合物或者已知刺激或者抑制

ALK 酪氨酸激酶活性的化合物(对照)的条件下进行上述的 ALK 测定法。具体而言,用于鉴定能够调节 ALK 酪氨酸激酶活性的化合物的方法包含步骤

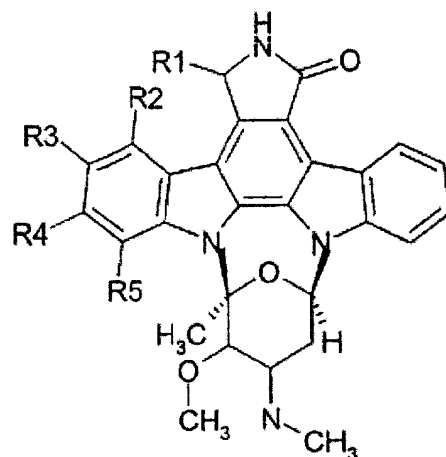
i)将 ALK 蛋白质或者它们的功能衍生物与选自 SEQ ID NO. 1 或者 2, (优选 SEQ ID NO. 1)、的肽在候选化合物存在并在适于肽磷酸化的条件下孵育;

ii)定量所形成的磷酸化的肽。

抑制 ALK 活性的化合物选作潜在的治疗剂,用于治疗 ALK 相关肿瘤,例如间变性大细胞淋巴瘤和非何杰金淋巴瘤。可比较候选化合物和同候选化合物相同的条件下进行测定的参考化合物(对照)的 ALK 调节活性。

当筛选其它化合物的 ALK 抑制活性时,证明在 0.2-0.3 μM 浓度下是有效的 ALK 抑制剂的星形孢菌素 (Meggio F.等, *Eur. J. Biochem.* (1995) 234,317- 322), 可用作阳性对照。

分子建模研究就改进星形孢菌素对 ALK 蛋白质的亲和性和特异性所需的取代模式提供了重要的指示。最有效的结构表示为下面的通式 (I):



其中 R1 和 R2 相互独立地选择于卤素(优选为氯)、苯基或者 C1-C3 烷基(任选被一个或多个卤素取代); R3 为羟基; R4 为羟基或者羟甲基; R5 为 C1-C3 烷基(任选地卤代)或者苯甲基。

式(I)中的化合物能够拮抗 ATP 与致癌融合蛋白的 ALK 酪氨酸激酶结构域的结合, 致癌融合蛋白例如有 NPM-ALK、ATIC-ALK、CTLC-ALK、TFG-ALK 或者其它个别的与原肌球蛋白融合蛋白。因此,

它们可以用于制备治疗 ALK 相关肿瘤（特别是间变性大细胞淋巴瘤和非何杰金淋巴瘤）的药物。

如此处所公开的，在本发明的另一实施方案中，化合物 (I) 用于筛选 ALK 抑制剂的 ALK 测定法中。使用本发明的 ALK 测定法还可以进行高通量筛选。

根据另一方面，本发明涉及用于进行上述 ALK 测定的试剂盒。试剂盒由预定比例的试剂组合包装而成。通常，试剂盒含有 SEQ ID NO. 1 或 2 的肽（任选固定于固相），抗磷酸化酪氨酸的抗体和用酶或者放射性标记的抗体（如果需要的话）。此外，试剂盒可以含有用于显色或放射性反应的试剂、缓冲液、诸如星形孢菌素或其衍生物之类的对照、稀释剂、去污剂、稳定剂和任何对于建立和开展测定法有用的其它组分。为了最优化测定的灵敏度，可以改变各种试剂的相对量。具体而言，可以以固体或者液体制品提供试剂，例如溶液、悬浮液、分散液、干粉、冻干制品。试剂盒组分以单个或分开的容器提供。试剂盒还可以包含开展测定的说明书。

附图说明

图 1: 带有 His 标签的重组 ALK 的纯化和活性

A) 10% SDS-PAGE 凝胶的银染色显示标准(M)、欲上样到 HiTrap 柱的已透析并合并的 DEAE 柱级分（上样）、HiTrap 柱级分（数字表示级分编号）。B) 纯化的 ALK 的放射性自磷酸化分析。泳道 1: ^{32}P 标记的 rALK 的放射自显影。泳道 2: 与泳道 1 同一样品的银染色。

图 2: ALK 激酶对肽的动力学

图 3: 使用基于 ELISA 的激酶测定法检测 rALK 活性

A) 肽 SEQ ID NO. 2 被纯化的 rALK 的磷酸化。在含有或不含有 0.5 μg 纯化 rALK，含有或不含有 15 μg SEQ ID NO. 2 肽，30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟的条件下进行 ELISA 激酶反应。图显示 450 nm 的吸光度。B) ALK 肽底物磷酸化的动力学。使用 206 μM 肽 SEQ ID NO. 2 或者 42 μM 肽 SEQ ID NO. 1 与 0.1 μg 纯化 rALK 进行 ELISA 激酶反应。在 0、0.5、2、5、10

和 15 分钟后加入 EDTA 终止反应。

图 4: 肽底物浓度对磷酸化水平的影响

在 0.2 μg 纯化 rALK 和 0-105 μM 肽 SEQ ID NO. 1 (A) 或者 0-315 μM 肽 SEQ ID NO. 2 (B) 存在的条件下进行 ELISA 测定, 反应在 30 $^{\circ}\text{C}$ 持续 15 分钟。

图 5: rALK 浓度对底物磷酸化的影响

使用 206 μM 肽 SEQ ID NO. 2 或者 42 μM 肽 SEQ ID NO. 1 和 0-225 ng 范围内的 rALK 进行 ELISA 测定, 反应在 30 $^{\circ}\text{C}$ 持续 15 分钟。

图 6: 星形孢菌素对 rALK 活性的抑制

在 0-5 μM 星形孢菌素或者相等体积的溶剂 (DMSO) 存在的条件下, 使用 42 μM 肽 SEQ ID NO. 1、20 ng rALK, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 分钟进行 ELISA 测定。图示按未处理对照标准化的 A450。

实验结果

肽的合成

使用 Applied Biosystems Model 431A 合成仪, 通过利用 9-芴甲氧羰基 (Fmoc) 化学的自动固相合成, 在 4-羟甲基-共聚苯乙烯 (copolystyrene)-1% 二乙烯基苯树脂 (0.95 mmol/g, 0.05 mmol) 上合成肽。

Fmoc 氨基酸 (0.5 mmol) 被 2-(1H-苯并三唑-1-yl)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸 (HBTU) (1 当量) 和 1-羟基苯并三唑 (HOBt) (1 当量) 在 DIPEA (2 当量) 存在的条件下激活。

在含有 5 ml 三氟乙酸、0.375 克苯酚、0.125 μl 1,2-二巯基乙烷、0.250 μl 苯甲硫醚和 0.25 μl 水的混合物中裂解和脱保护肽酰树脂 (100 mg), 反应进行 2 小时。将反应混合物过滤到含有预冷至 0 $^{\circ}\text{C}$ 的乙醚的管中。离心分离沉淀的肽并用新鲜乙醚洗涤。

将粗制的肽 (50-100 mg 于 10 ml 水中) 泵入制备型 RP-柱上 (prepNova-Pak HR C18, 6 μm , 25x10 mm, Waters) 并用 10%-45% 线性梯度的乙腈以 12ml/分钟的流速进行洗脱。

通过在 5 μm , C18 Symmetry 300 柱, 4.6x250 mm (Waters), 使用在 0.1

%三氟乙酸中的线性梯度的乙腈以 1 ml/分钟的流速进行分析型 RP-HPLC, 判定肽的纯度为 >90%。通过使用基质辅助的激光解吸离子化飞行时间 (matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight) 质谱仪 (MALDI-Tof) (Maldi-1; Kratos-Schimidzu, Manchester, UK) 的质谱证实肽的分子量。

重组 ALK 的产生和纯化

将从氨基酸 Leu¹⁰⁷³ 到 Ala¹⁴⁵⁹ 的 ALK 的一部分克隆到杆状病毒转移载体、pBlueBacHis2C (Invitrogen) 中。使用该载体和 MaxBac[®]2.0 杆状病毒表达系统 (Invitrogen), 产生了重组杆状病毒并且在 Sf9 (草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)) 昆虫细胞中表达了重组 ALK (rALK) 蛋白质。该蛋白质具有一个 49 kDa 的理论分子量并且含有融合 6 个组氨酸-标签 (His 标签) 的预测的 ALK (Ile¹¹¹⁶-Val¹³⁹²) 催化结构域。通过对全细胞裂解液进行抗磷酸化酪氨酸的免疫印迹和体外放射性激酶分析证实了带有 His 标签的 rALK 的自磷酸化活性, 该活性是正确折叠的指示。

为了产生用于纯化的蛋白质, 用重组的病毒以 5 的感染复数 (MOI) 感染 Sf9 细胞。将培养物在 27°C 下培养 3 天然后通过 4°C 下 400 g 离心 10 分钟进行收获。将细胞沉淀贮存于 -80°C 备用。为了裂解细胞, 将细胞沉淀重新悬浮于含有 50 mM Tris-HCl pH 8、20 mM NaCl 和蛋白酶抑制剂 (抑胃酶肽、苯甲脒、亮抑酶肽和抑酶肽) 的低渗缓冲液 (缓冲液 A) 中。在冰上孵育 30 分钟后, 将细胞悬浮液在 4°C 下 1500 g 离心 15 分钟并且将上清液用 0.45 μm 的滤器过滤。然后使用 AKTK FPLC 系统 (Amersham-Pharmacia Biotech) 在缓冲液 A 存在的条件下, 以 1.5 ml/分钟的流速将滤液上样到 80ml 阴离子交换 Fast Flow DEAE-sepharose (Sigma) 柱上。用从 20-200mM 的 NaCl 梯度将结合的蛋白质洗脱下来。通过免疫印迹分析级分中是否存在 ALK 蛋白质。合并阳性级分并在 1 升天然结合缓冲液 (20mM 磷酸钠 pH7.8、500mM NaCl 和 PI) 中于 4°C 下透析 3 小时, 每小时换一次缓冲液。然后将透析后的级分上样到 HiTrap[™]镍亲和层析柱 (Amersham-Pharmacia Biotech) 上, 该柱预先用添加 50mM 咪唑和

20mM β -巯基乙醇的天然结合缓冲液平衡。对于柱子使用 0.5-1ml/分钟的流速。当用天然结合缓冲液洗涤柱子后，用 50-200mM 的线性梯度的咪唑将结合蛋白质洗脱下来。然后通过 SDS-PAGE 和银染色分析级分中是否存在 rALK 及其纯度。图 1A 显示的是 rALK 纯化的实例。

最后，将阳性级分用 50mM Tris pH 7.4、100mM NaCl、10%甘油、20mM β -巯基乙醇和蛋白酶抑制剂透析并贮存于-80℃备用。为了证实纯化的 rALK 是有活性的，我们进行了放射性自磷酸化分析。含有 20 μ l rALK 阳性级分、6 μ M 冷的 ATP、1.2mM DTT、10 μ Ci [γ -³²P]ATP、25mM Hepes pH 7.5、10mM MgCl₂ 和 10mM MnCl₂ 的反应混合物在 30℃ 孵育 30 分钟。通过加入 Laemmli 缓冲液并在 95℃ 加热 5 分钟终止反应。样品在 10%SDS-PAGE 凝胶中进行分离并将其转移到 Immobilon™-P 膜上。如图 1B 所示，通过放射自显影显示出放射性标记的蛋白质。

肽磷酸化（放射性分析）

在 30 μ l 含有 50 mM Tris/HCl pH 7.5、5 mM MnCl₂、10 μ M 钒酸钠，30 μ M [γ ³²P] ATP 或者 [γ ³³P] ATP (比活性 1000 cpm/pmol) 和 10 单位 rALK [定义每分钟转移 1 pmol 磷酸至多聚 GluTyr (0.1 mg/ml) 的酶量为 1 个单位] 的介质中磷酸化肽和随机多聚体多聚 Glu/Tyr (1: 4)。在 30℃ 孵育 10 分钟后将 25 μ l 混合物点到 P81 磷酸纤维素纸上以终止反应，其操作如别处所述(1)。通过 GraphPad Prism 软件使用非线性回归将数据直接拟合米曼(Michaelis-Menten)方程来决定动力学常数。

结果

来源于 ALK 参考序列的、含有 Tyr-1278 的肽是 rALK 的优选底物，而含有 Tyr-1282 或者 Tyr-1283 的肽受酶的影响较弱（见图 2）。Tyr-1278 衍生物的磷酸化效率甚至比具有三个 Tyr 残基的肽表现的更高（表 I）。为了证实 Tyr-1278 衍生物是 ALK 催化结构域最佳的肽底物，我们比较了它与多聚 Glu/Tyr (1: 4) 的磷酸化程度，多聚 Glu/Tyr (1: 4) 是一种随机多聚体并且对于大多数酪氨酸激酶而言为非常好的底物。表 II 显示 Tyr-1278 衍生物是一个比多聚 Glu/Tyr 更好的 ALK 底物。

表 I

rALK 对于合成肽的动力学常数

肽	V_{max} (pmol/分钟)	K_m (μ M)	效率 (V_{max}/K_m)
ARDIYRASYRKGCCAMLPVK	99.5	90.5	1.1
ARDIYRASFFRKGGCMLPVK	186.3	109.4	1.7

表 II

模型底物被 ALK 催化结构域磷酸化的速率

多聚(Glu/Tyr)和肽的浓度分别为 0.1 mg/ml 和 400 μ M。酶浓度为 10 单位。报导的数值为 3 次独立实验的平均值。S. E. M.数值始终小于 14%。

底物	磷酸化程度 (pmol/分钟)
多聚(Glu/Tyr)	10.0
ARDIYRASFFRKGGCMLPVK	30.3

基于 ELISA 的体外激酶测定法

用含有以不同浓度存在于 PBS 中的 ALK 肽底物 (SEQ ID NO. 1 或者 SEQ ID NO. 2) 的包被溶液于 37 $^{\circ}$ C 过液孵育 Nunc Immuno 96 孔板 (125 μ l/孔)。然后用 200 μ l 洗涤缓冲液 (PBS-Tween 0.05 %) 进行洗涤并且在 37 $^{\circ}$ C 放置至少 2 小时使其干燥。通过将激酶缓冲液 (25 mM HEPES pH 7.5、5 mM $MnCl_2$ 、5 mM $MgCl_2$)、0.3 mM ATP 和不同浓度的纯化的 rALK 以 100 μ l/孔的总体积在 30 $^{\circ}$ C 下孵育 15 分钟来进行激酶反应。然后将反应混合物去除并用 200 μ l 洗涤缓冲液将孔洗涤 5 次。使用 100 μ l/孔的用 PBS + 4% BSA 进行 1: 500 稀释的鼠单克隆抗磷酸化酪氨酸的抗体 (克隆 4G10 UpstateBiotech Ltd) 来检测磷酸化的肽。当在室温孵育 30 分钟后将抗体去除并且如上所述将孔进行洗涤。每孔加入 100 μ l 用 PBS + 4% BSA 1: 1000 稀释的次级抗体 (抗鼠 IgG, 辣根过氧化物酶耦联的完整抗体, 来源于绵羊, Amersham Pharmacia Biotech), 并且将板在室温下再次孵育 30

分钟，然后如上进行洗涤。将板子用 100 μl /孔的 TMB 底物溶液(Endogen) 进行显色并且通过加入等体积的 0.18 M H_2SO_4 终止反应。最后，使用 Ultrospec[®] 300 分光光度计(Amersham-Pharmacia Biotech)读取 450 或者 490 nm 下的吸光度。

结果

我们已经证明基于 ELISA 的激酶测定法能够用来检测磷酸化的 ALK 肽底物 (SEQ ID NO. 1 和 NO. 2) 并且因此能够检测纯化的 rALK 的活性。在起始的实验中，我们在纯化的 rALK 和底物 SEQ ID NO. 2 都存在或都缺乏的条件下进行测定以便决定是否能观察到 450 nm 吸光度(A450)特异的增加 (图 3A)。在 rALK 和底物都存在时确实观察到 A450 急剧增加。相反，缺乏肽或者 rALK 或者两者时，A450 是低的，表明有低水平的背景吸光度。为了确定底物磷酸化的动力学，我们在各种不同的孵育时间之后测定了 A450 值 (图 3B)。两个肽的反应动力学相似，都在 10 分钟后达到最大的磷酸化。

为了比较在 ELISA 激酶测定中两个肽的效率和确定所使用肽的最佳浓度，我们制作了两个肽的标准曲线。结果表明随着肽底物量的增加 A450 增加了并且因此 rALK 激酶活性增加了。对于肽底物 SEQ ID NO. 2, A450 最大值因而也是磷酸化的最大值出现在大约 200 μM 处，与此相比较对于肽底物 SEQ ID NO. 1 只在 25 μM 时就达到最大值 (图 4A 和 B)。这表明肽底物 SEQ ID NO. 1 是一个更有效的 rALK 底物。

为了观察激酶活性的抑制，有必要使用恰当浓度的酶，即标准曲线的线性范围内的浓度。使用 206 μM SEQ ID NO. 2 或者 42 μM SEQ ID NO. 1 和 0-220 ng 范围内的 rALK 进行 ELISA 反应。对于两个底物的线性范围大约介于 0-15 ng 之间的 rALK，在这之后曲线达到了平台 (图 5)。

使用 42 μM 肽底物 SEQ ID NO. 2 评估了抑制剂星形孢菌素对 rALK 活性的影响。同时进行了含有相应浓度的 DMSO 的溶剂对照实验。星形孢菌素显著抑制 rALK 活性，在 1 μM 时达到了最大抑制，并且估计的 IC_{50} 为 300 nM (图 6)。单独的溶剂 (DMSO) 对 rALK 活性没有显著的影响。

参考文献

- [1] Glass, D.B., Masaracchia, R.A., Feramisco, J.R. 和 Kemp, D.E. (1978) *Anal. Biochem.* 87,566-575.
- [2] Till, J. H. , Ablooglu, A. J. , Frankel, M. , Bishop, S. M. , Kohanski, R. A. 和 Hubbard S. R. (2001) *J. Biol. Chem.* 276,10049-10055.

序列表

<110> 国家肿瘤治疗研究中心

<120> 间变性淋巴瘤激酶测定法、试剂和它们的组合物

<130> 1206EUR

<160> 2

<170> PatentIn 版本 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成肽

<400> 1

Ala Arg Asp Ile Tyr Arg Ala Ser Phe Phe Arg Lys Gly Gly Cys Ala

1

5

10

15

Met Leu Pro Val Lys
20

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 合成肽

<400> 2

Ala Arg Asp Ile Tyr Arg Ala Ser Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Cys Ala
1 5 10 15

Met Leu Pro Val Lys
20

图 1

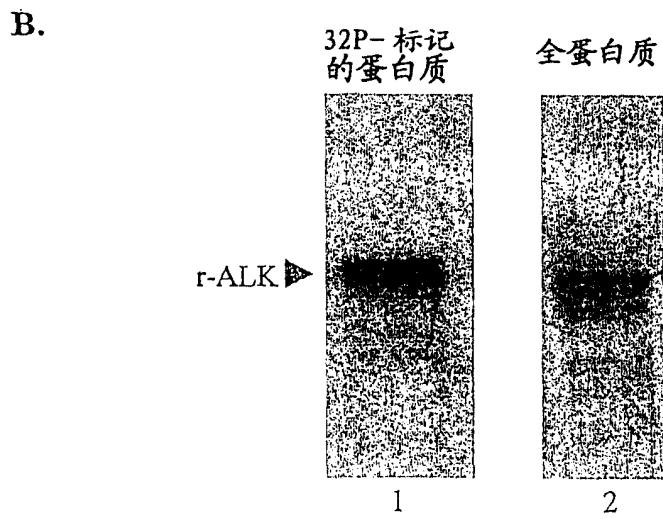
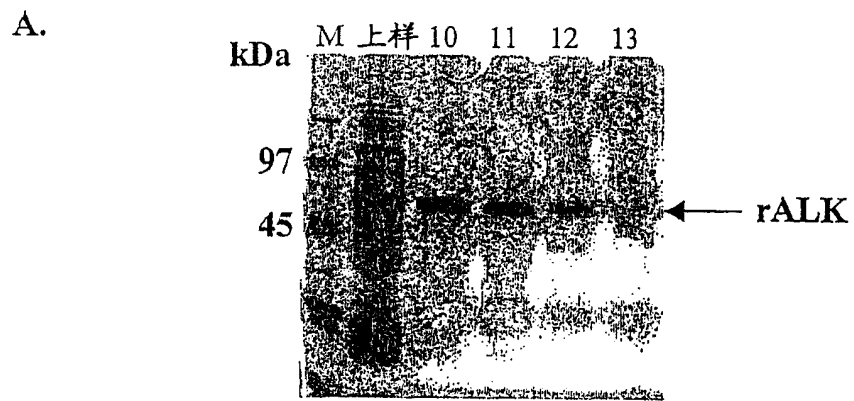


图 2

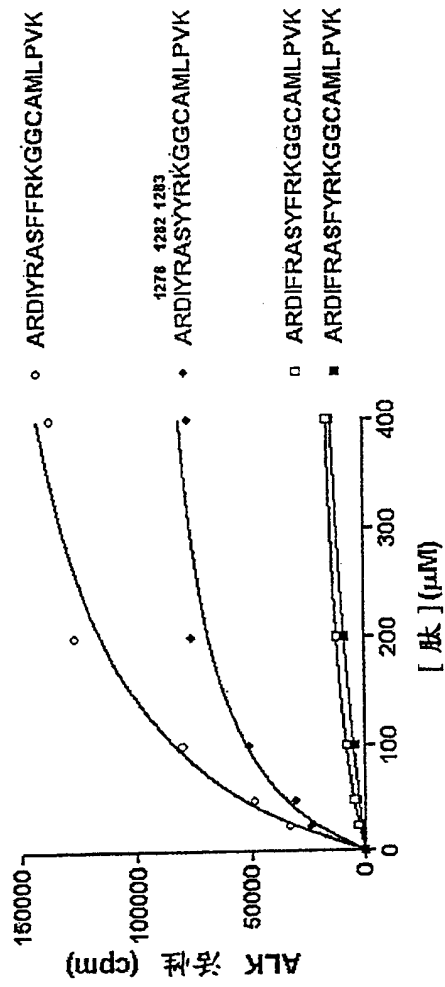


图 3

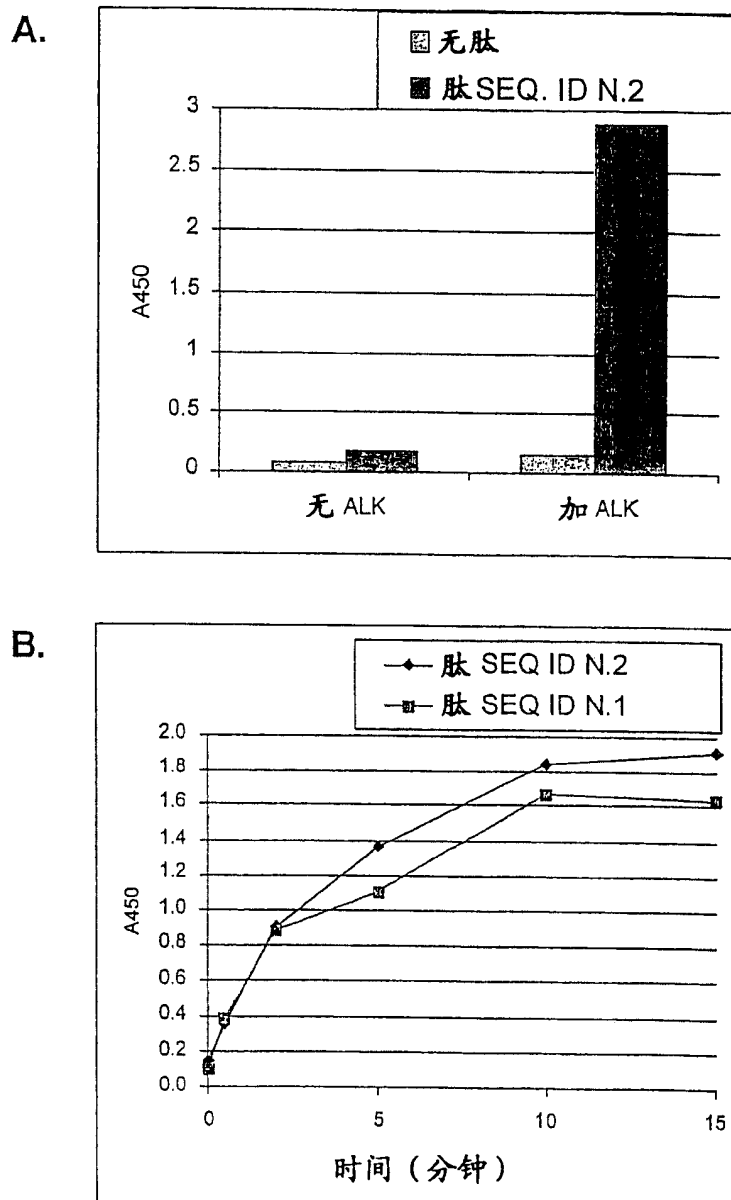


图 4

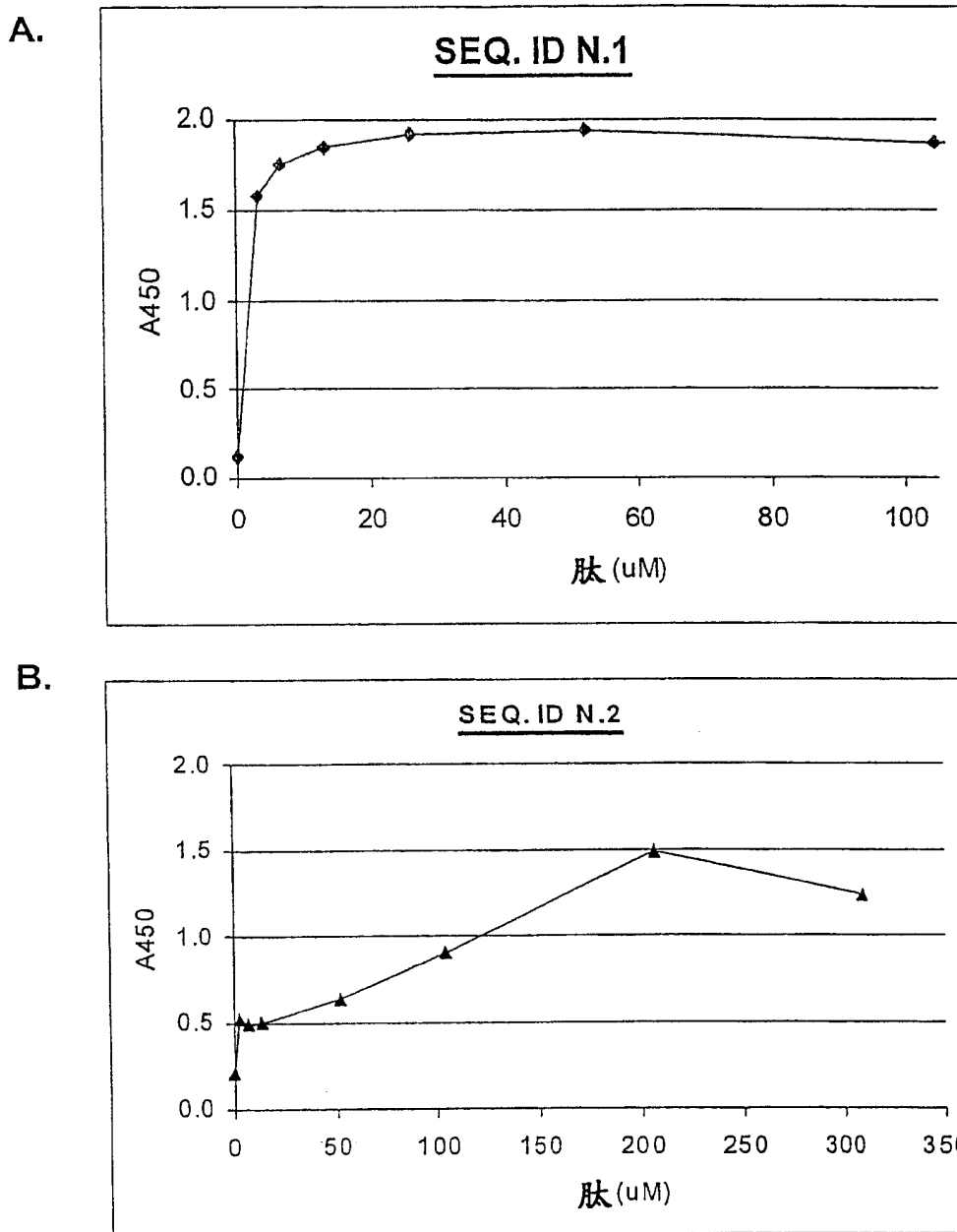


图 5

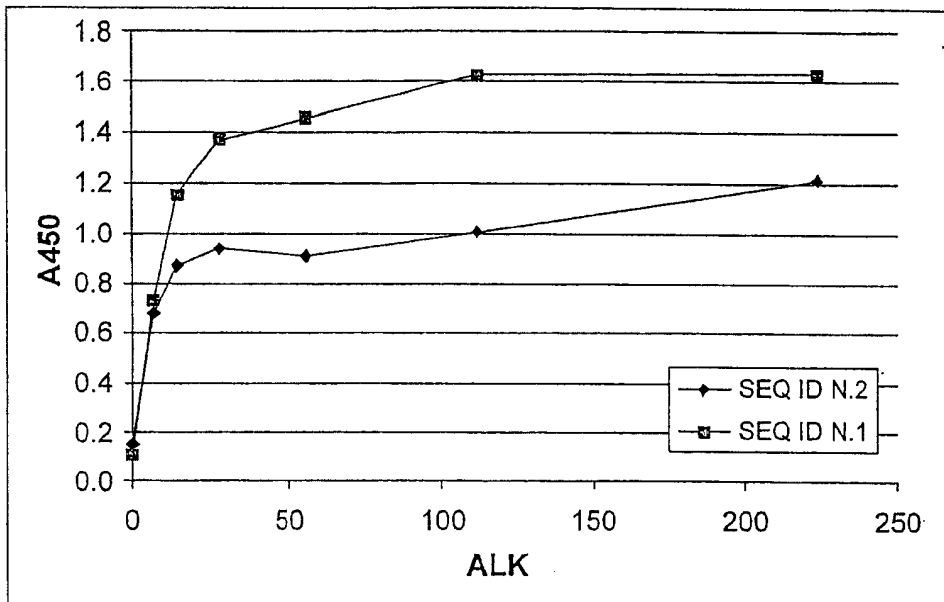


图 6

