



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105874078 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(21)申请号 201480072222.2

(22)申请日 2014.11.26

(30)优先权数据

61/909,367 2013.11.26 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.07.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2014/051131 2014.11.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/077884 EN 2015.06.04

(71)申请人 富鲁达加拿大公司

地址 加拿大安大略省

(72)发明人 奥尔加·奥尔纳特斯基

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 王思琪 郑霞

(51)Int.Cl.

G12Q 1/37(2006.01)

G07K 1/13(2006.01)

G40B 70/00(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页

(54)发明名称

使用元素分析的多重酶测定

(57)摘要

本发明总体上涉及用于使用元素分析来检测酶的方法。

1. 一种用于确定生物流体中的蛋白酶活性的方法,所述方法包括
将编码的珠附接至肽底物的第一氨基酸以形成固定化的肽底物,所述肽底物包含所述第一氨基酸和末尾氨基酸并且是用于蛋白酶的底物;
将元素标签附接至所述肽底物的所述末尾氨基酸以形成固定化的带标签的肽底物;
用生物流体孵育所述固定化的带标签的肽底物;
通过元素分析检测所述生物流体中的所述元素标签和所述编码的珠;以及
基于检测所述元素标签,确定所述生物流体内的蛋白酶活性。
2. 如权利要求1所述的方法,其中检测所述元素标签和所述编码的珠包括使用质谱细胞计量术。
3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述肽底物包含两种或更多种肽底物,其中所述两种或更多种肽底物是用于两种或更多种不同的蛋白酶的底物。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中检测所述元素标签和所述编码的珠包括使用质谱细胞计量术定量所述元素标签。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,还包括将所述固定化的肽底物从所述生物流体中分离以形成分析物溶液以及检测所述元素标签。
6. 如权利要求5所述的方法,其中所述元素标签通过质谱细胞计量术来检测。
7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述编码的珠包含用于所述编码的珠的唯一的元素或唯一的元素组合。
8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述肽底物的所述第一氨基酸是C-末端氨基酸。
9. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述肽底物的所述第一氨基酸是N-末端氨基酸。
10. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述肽底物的所述末尾氨基酸是N-末端氨基酸。
11. 如权利要求1至7和权利要求9中任一项所述的方法,其中所述肽底物的所述末尾氨基酸是C-末端氨基酸。
12. 如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述元素标签包括过渡金属元素。
13. 如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述元素标签包含选自以下组成的组的过渡后金属元素:铝、镓、铟、锡、铊、以及铋。
14. 如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述元素标签包含镧系元素。
15. 如权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述元素标签被附接至包含10种至100种过渡金属、过渡后金属、或镧系原子的聚合物。
16. 如权利要求15所述的方法,其中所述元素标签被附接至包含20种至50种过渡金属、过渡后金属、或镧系原子的聚合物。
17. 如权利要求15所述的方法,其中所述元素标签被附接至包含25种至35种过渡金属、过渡后金属、或镧系原子的聚合物。
18. 如权利要求1至17中任一项所述的方法,其中五种或更多种肽底物是用于五种或更多种不同的蛋白酶的底物。
19. 如权利要求1至17中任一项所述的方法,其中十种或更多种肽底物是用于十种或更

多种不同的蛋白酶的底物。

20. 一种用于检测在生物流体中的蛋白酶活性的方法,其中所述方法包括:

将编码的固定化部分附接至至少五种不同的肽底物的第一氨基酸以形成至少五种不同的编码的固定化的肽底物,其中所述至少五种不同的肽底物中的每种是用于不同的蛋白酶的底物;

将不同的元素标签附接至所述至少五种不同的编码的固定化的肽底物中的每种的末尾氨基酸以形成至少五种不同的固定化的带标签的肽底物;

用生物流体孵育所述至少五种不同的固定化的带标签的肽底物;以及

通过质谱细胞计量术检测所述生物流体中的所述元素标签和编码的固定化部分;以及基于检测所述元素标签和所述编码的固定化部分,确定所述生物流体中的所述蛋白酶活性。

21. 如权利要求20所述的方法,还包括将所述固定化的肽底物从所述生物流体中分离以形成分析物溶液以及通过质谱细胞计量术检测所述分析物溶液中的所述不同的元素标签。

22. 如权利要求20或21所述的方法,其中检测所述元素标签和所述编码的固定化部分包括使用质谱细胞计量术。

23. 如权利要求20至22中任一项所述的方法,其中所述编码的固定化部分是编码的珠并且包含唯一的元素或唯一的元素组合。

24. 如权利要求20至23中任一项所述的方法,其中所述肽底物中的每种的所述第一氨基酸是C-末端氨基酸。

25. 如权利要求20至24中任一项所述的方法,其中所述肽底物中的每种的所述第一氨基酸是N-末端氨基酸。

26. 如权利要求20至24中任一项所述的方法,其中所述肽底物中的每种的所述末尾氨基酸是N-末端氨基酸。

27. 如权利要求20至23和权利要求25中任一项所述的方法,其中所述肽底物中的每种的所述末尾氨基酸是C-末端氨基酸。

28. 如权利要求20至27中任一项所述的方法,其中所述元素标签包含过渡金属元素。

29. 如权利要求20至27中任一项所述的方法,其中所述元素标签包含镧系元素。

30. 如权利要求20至27中任一项所述的方法,其中所述元素标签包含选自以下组成的组的过渡后金属元素:铝、镓、铟、锡、铊、铅、以及铋。

31. 如权利要求20至30中任一项所述的方法,其中所述元素标签被附接至包含10种至100种过渡金属、过渡后金属、或镧系原子的聚合物。

32. 如权利要求31所述的方法,其中所述元素标签被附接至包含20种至50种过渡金属、过渡后金属、或镧系原子的聚合物。

33. 如权利要求31所述的方法,其中所述元素标签被附接至包含25种至35种过渡金属、过渡后金属、或镧系原子的聚合物。

34. 如权利要求20至33中任一项所述的方法,其中所述至少五种肽底物包含至少10种肽底物,其中所述至少10种肽底物中的每种是用于不同的蛋白酶的底物。

使用元素分析的多重酶测定

[0001] 领域

[0002] 本发明总体上涉及用于使用元素分析来检测酶的方法。

[0003] 背景

[0004] 由于酶的测定和药理学调节在保持动物内稳态(animal homeostasis)方面的作用,酶的测定和药理学调节已经变成在鉴定可能的治疗剂方面关键的要素。蛋白酶是近来已经被示出在信号通路方面起至关重要作用的蛋白降解酶的子类(subclass),信号通路的调节异常可以导致癌症、心血管病、以及神经系统异常。在约400种已知的人类蛋白酶中,约14%作为可能的药物候选物正在被研究。蛋白酶的小分子抑制剂现在被认为是用于治疗退化性疾病(degenerative disease)、用于治疗癌症以及作为抗菌剂、抗病毒剂和抗真菌剂的有价值的治疗性先导物(therapeutic lead)。

[0005] 对允许同时测量多个酶反应的耐用的、灵敏的、以及定量的酶测定有需求。这样的测定可以允许保存有价值的生物样品和试剂,实现高通量(high-throughput)和减少的测定时间,以及降低酶分析的总成本。

[0006] 概述

[0007] 本发明的一方面是用于检测生物流体中的蛋白酶活性的方法。该方法包括将编码的珠附接至肽底物的第一氨基酸以形成固定化的肽底物,该肽底物包含第一氨基酸和末尾氨基酸(last amino acid)并且是用于蛋白酶的底物;将元素标签附接至肽底物的末尾氨基酸以形成带标签的肽底物;用生物流体孵育固定化的、带标签的肽底物;以及通过元素分析检测生物流体中的元素标签和编码的珠。

[0008] 本发明的另一方面是用于检测生物流体中的蛋白酶活性的方法。该方法包括将编码的固定化部分附接至至少五种不同的肽底物的第一氨基酸以形成至少五种不同的编码的固定化的肽底物,该肽底物是用于不同的蛋白酶的底物;将不同的元素标签附接至至少五种不同的肽底物中的每种末尾氨基酸以形成带标签的肽底物;用生物流体孵育固定化的、带标签的肽底物;以及通过质谱细胞计量术(mass cytometry)检测生物流体中的元素标签和编码的固定化部分。

[0009] 其他目的和特征将在下文中部分地是明显的且部分地被指出。

[0010] 详述

[0011] 据已经发现,元素分析,特别地质谱细胞计量术,可以被用以使能够迅速、定量测量酶反应,包括在单个测定中检测且定量多个酶反应。当以多重模式(multiplexed format)进行该测定时,多种酶的活性可以被确定。多种酶底物可以在允许通过对应的酶将底物加工成产物,使得每种酶产生不同的产物的条件下与全部细胞裂解物组合。每种产物的量被确定并且此量是对应的酶活性的指示。

[0012] 在某些实施方案中,每种不同的酶底物被用不同的可检测的标记物标记以有助于定量相应的产物。虽然任何合适的可检测的标记物都可以被用于此目的,但是带元素标签的底物特别地适于多重反应(multiplex reaction)。

[0013] 混合物可以通过候选效应物(candidate effector)(即,酶活性的抑制剂或激活

剂)来加强。效应物在本文中更详细地被描述。

[0014] 所公开的测定法有若干优点。主要优点包括以下:该测定提供在一个反应中对多种酶的测量;该测定不使用抗体或放射性同位素;该测定对光是不敏感的;在该测定中使用的试剂具有非常长的贮存期(shelf life);该测定不需要纯化步骤;该测定经得起小型化和自动化的检验;以及该测定可以实时地进行用于动力学研究。

[0015] 由于这些和其他优点,该测定实现提供可以被用以开发能够同时地筛选许多抑制剂的酶抑制剂筛选法的定量结果的高通量、多用性、以及灵敏度。

[0016] 本公开内容提供的方法的另一种应用在于产生用于酶活性的高通量筛选的底物悬浮阵列(substrate suspension array)。

[0017] 用于特定的酶的底物可以用元素编码的珠和酶裂解的位点的远端的元素标签来加标签并且与对不同的底物特异性地起作用的酶的混合物接触,并且珠可以以细胞计数的方式(cytometric fashion)(质谱细胞计量术)相继地被询问。例如,测试酶可以裂解底物,使得元素标签被释放到溶液中。应理解,在测试样品中存在的酶将裂解在样品中的带标签的底物的至少一部分。进行酶反应持续较长的时间、调整pH、调整温度、和/或增加酶浓度可以导致带标签的底物的完全的或最优的裂解。元素标签与编码的珠的存在或不存在提供酶裂解底物的测量,颗粒中的元素标签和编码的珠的存在指示底物不被酶裂解并且仅编码的珠的存在指示底物被酶裂解。

[0018] 在某些实施方案中,酶底物可以被附接至金属螯合物或具有金属螯合物的聚合物。合适的金属螯合物的非限制性实例包括二乙烯三胺五乙酸盐(DTPA)配体或1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)配体。更通常地,本领域技术人员可以理解,具有结合金属离子和原子的特定的方式的任何合适的螯合物可以被使用。

[0019] 通常,肽的自动合成可以被本领域普通技术人员常规地进行。例如,酶底物可以在肽合成仪中的固体珠上直接地被合成(一珠一化合物的库合成法(one-bead one-compound library synthesis))。固体珠可以包含TENTAGEL™,TENTAGEL™是包含聚(乙二醇)(PEG)接枝物的二乙烯基苯交联的聚苯乙烯树脂并且被用于固相肽合成(SPPS)。此聚合物家族的其他成员包括ARGOGEL™、NOVAGEL™、以及NOVASYN TG™。用于肽的自动合成的其他合适的材料通常对本领域技术人员是已知的。

[0020] 此方法可以被用于在一个管中实时地灵敏地定量测量多种酶反应以及产生用于酶底物鉴定和优化的底物悬浮阵列库。为了此目的,用不同的元素或多个比率的若干元素编码的珠可以被共价地附接至特定的底物,该特定的底物以一个珠类型代表一种底物这样的方式用在珠中不存在的元素加标签。因为可以被使用的元素和其稳定的同位素的数目大于50并且每种类型的珠可以被唯一的金属组合编码,所以被连接至唯一编码的珠的不同的特定的探针的数目可以是非常大的(超过 10^6 个不同编码的珠是可行的)。

[0021] 通常,本文描述的过程和方法包括至少四个步骤。在一个步骤中,肽底物的第一氨基酸被附接至带元素标签的支持体,从而形成固定化的肽底物。在另一步骤中,元素标签被附接至固定化的肽底物的末尾氨基酸,从而形成带标签的、固定化的肽底物。在另外的步骤中,带标签的、固定化的肽底物用生物介质孵育。并且在另外的步骤中,元素分析被用以检测生物介质中的元素标签和/或带元素标签的支持体的存在。

[0022] 在分析方法的初始步骤中,肽底物的第一氨基酸被附接至带元素标签的支持体,

从而形成固定化的肽底物。

[0023] 通常,使用对本领域技术人员已知的任何合适的附接法,肽底物可以被附接至带元素标签的支持体。

[0024] 典型地,肽底物的第一氨基酸被共价地结合至带元素标签的支持体。例如,带元素标签的支持体的表面可以用反应性化学基团来官能化。反应性化学基团的非限制性实例包括羧酸酯基、氨基、硫醇基、环氧基、醛基、羟基、巯基、以及酰肼基。自由基和/或自由基阳离子可以被用以引发偶合反应。

[0025] 例如,带元素标签的支持体可以具有已经被吡咯-2,5-二酮(马来酰亚氨基)、磺酸阴离子、或对(氯甲基)苯乙烯官能化的表面。

[0026] 肽底物还可以使用非共价偶合法来固定化。例如,肽底物可以被物理地吸附至带元素标签的支持体上。

[0027] 具体地,肽底物可以使用生物素-链霉亲和素复合物被固定在带元素标签的支持体上。例如,生物素可以被连接至肽底物的第一氨基酸并且链霉亲和素可以被连接至带元素标签的支持体,或反之亦然。

[0028] 在分析法的另一步骤中,元素标签被附接至固定化的肽底物的末尾氨基酸,从而形成带标签的、固定化的肽底物。

[0029] 通常,使用对本领域技术人员已知的任何合适的附接法,元素标签可以被附接至固定化的肽底物。

[0030] 例如,元素标签可以被共价地结合至固定化的肽底物的末尾氨基酸。为了有助于共价结合,元素标签可以包含一个或多个反应性化学基团。反应性化学基团的非限制性实例包括羧酸酯基、氨基、硫醇基、环氧基、醛基、羟基、巯基、以及酰肼基。自由基和/或自由基阳离子可以被用以引发偶合反应。

[0031] 可选择地,元素标签可以使用非共价偶合法被附接至固定化的肽底物。例如,元素标签可以使用生物素-链霉亲和素复合物被附接至底物。例如,生物素可以被连接至固定化的肽底物的末尾氨基酸并且链霉亲和素可以被连接至元素标签,或反之亦然。

[0032] 上文描述的加标签和固定化步骤可以以任何顺序被进行,从而形成带标签的、固定化的肽底物。

[0033] 在分析法的另外的步骤中,带标签的、固定化的肽底物用生物介质孵育。

[0034] 如本文所使用,术语“生物介质”宽泛地指的是包含、被认为包含、或可以包含酶、酶激活剂、和/或酶抑制剂的任何材料。例如,生物介质可以包括从动物源、植物源、真菌源、细菌源、或病毒源的组织、流体、以及细胞获得的样品。可以被包括在生物介质中的样品的非限制性实例包括痰、血浆、尿、腹膜液、胸膜液、奶、唾液、滑液、羊水、以及来自血细胞、组织以及细针活检(fine needle biopsy)的提取物。

[0035] 可以被包括在生物介质中的样品的另外的非限制性实例包括均质化的模型病毒(homogenized model virus)和动物细胞、植物细胞、细菌细胞、以及真菌细胞的细胞培养物,其中基因表达状态可以被操纵以探索基因之间的关系并且表达报告分子(例如, β -半乳糖苷酶)。

[0036] 生物介质还可以包括被纯化的生物分子的溶液,包括例如蛋白质、肽、DNA、RNA、多糖、以及脂类的溶液。这些生物分子可以是天然的或重组的。

[0037] 带标签的、固定化的肽底物可以用生物介质孵育持续足以允许在生物介质中的酶与带标签的、固定化的肽底物的至少一部分反应的时间段。

[0038] 例如,如果生物介质包含对肽底物是特异性的蛋白酶,则蛋白酶可以在带标签的、固定化的肽底物上进行蛋白水解。蛋白水解反应将带标签的、固定化的肽底物裂解成第一部分(包含附接至带元素标签的支持体的第一氨基酸)和第二部分(包含附接至元素标签的末尾氨基酸)。

[0039] 如果期望,更完全的反应可以通过增加孵育的持续时间、调整生物介质的pH、调整生物介质的温度、和/或增加酶浓度来获得。生物介质的最优的pH和温度将取决于特定的酶,所述特定的酶如本领域技术人员所理解的是活性的。

[0040] “微米颗粒、微米球、微米珠、纳米珠、纳米颗粒、珠、或颗粒”可交换地被使用并且可以表示各种尺寸和形状的颗粒并且为了本发明的目的,具有相似的功能(functionality)。

[0041] “元素污染的颗粒(element stained particle)(或特别地吸收镧系元素的颗粒)”包含被用以标记微米球的多种元素(同位素)。污染元素(stain element)均匀地扩散在整个所述微米球的主体中,或以导致以有区别的方式形成元素的体积分布的方式渗透所述微米球。这些乳胶微米球可以由聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、丙烯腈等等形成。颗粒的表面可以用羧基衍生物、氨基衍生物、羟基衍生物、巯基衍生物、酰肼衍生物或类似物被化学地官能化。微米球的平均尺寸可以在直径0.3微米至10微米之间的范围。合适的颗粒,例如在美国申请公布号2010/0144056中被描述,该申请通过引用以其整体并入。

[0042] 在孵育步骤之后,固定化的肽底物可以任选地从生物介质中分离。

[0043] 通常,固定化的肽底物可以使用本领域已知的色谱法、离心法、过滤法、或透析法从生物介质中分离。例如,AMICON[®] ULTRA-0.5离心过滤器装置可以被用于从被裂解的底物中分离小的纳米珠(0.3-1.0微米)。在此情况下,肽底物的带元素标签的被裂解的部分可以从在底部的自旋过滤器的溢流道(flow-through)被收集,同时固定化的被裂解的底物可以被保持在上部室中。颗粒的多重洗涤可以使用这些装置进行。具有较大尺寸(1-10微米)的固定化的肽底物的微米颗粒可以经受在10,000G下离心持续10分钟以实现颗粒的完全沉降。在形成小球的微米颗粒的顶部的液体将包含带元素标签的肽底物的被裂解的部分。

[0044] 当固定化的肽底物从生物介质中分离时,生物介质的剩余组分被称为“分析物溶液(analyte solution)”。分析物溶液的组分(例如,元素标签)可以被检测,例如使用元素分析。

[0045] 在分析法的另外的步骤中,元素分析被用以检测在生物介质中的元素标签的存在。

[0046] 通常,元素分析指的是其中样品被分析其元素组成和任选地其同位素组成的过程。元素分析法的非限制性实例包括探测原子的外层电子结构的原子光谱法,例如火焰原子吸收法、石墨炉原子吸收法、以及电感耦合等离子体原子发射法;探测原子的质量的质谱原子光谱法,例如电感耦合质谱法;以及探测原子的内层电子结构的x射线荧光法、颗粒诱导x射线发射法、x射线光电子光谱法、以及俄歇电子光谱法(Auger electron spectroscopy)。

[0047] 如本文所使用,术语“体积元素分析(volume elemental analysis)”指的是其中被分析的样品以检测关于该样品的全部体积的平均原子组成的方式被询问的过程。

[0048] 如本文所使用,术语“颗粒元素分析”指的是其中包含分散在液体中的固体颗粒的被分析的样品以使得原子组成对于单独的颗粒被记录的方式被询问的过程。颗粒元素分析的实例是质谱细胞计量术,其中分析仪器是基于质谱仪的流式细胞仪。

[0049] 元素分析可以被用以检测元素标签和/或带元素标签的支持体。例如,在带元素标签的支持体是编码的珠的情况下,元素分析可以被用以检测元素标签和带元素标签的编码的珠两者。在固定化的肽底物(例如,附接至带元素标签的支持体的肽底物或其第一部分)已经从生物介质中分离的情况下,元素分析可以被用以检测在生物介质中的元素标签。

[0050] 元素分析可以被用以提供元素标签和/或带元素标签的支持体的定量测量。

[0051] 在某些实施方案中,生物介质使用颗粒元素分析被分析。此方法允许精确测量酶活性,而不需要分离带标签的、固定化的肽底物。例如,尚未被裂解的带标签的、固定化的底物(即,尚未经过蛋白水解的带标签的、固定化的肽底物)将提供指示元素标签和带元素标签的支持体两者的存在的信号。相反地,已经被裂解的带标签的底物将提供有区别的且可鉴定的信号,其对应于如上文描述的第一部分(附接至带元素标签的支持体)或第二部分(附接至元素标签)。

[0052] 因此,颗粒元素分析可以被用以鉴定且定量在单独的颗粒的水平下的酶活性的存在。此外,因为被裂解的带标签的肽底物提供与完整的、未反应的带标签的、固定化的肽底物相比有区别的且可鉴定的信号,所以该过程可以在单步骤中进行,而不需要在分析之前分离。

[0053] 通常,酶动力学通过米氏常数(Michaelis constant) K_M 和最大反应速率 $V_{最大}$ 来表征。首先,保持酶底物的不变的浓度,产物形成的速率可以通过测量作为时间的函数的产物浓度来确定。例如,在元素编码的珠上的带标签的、固定化的肽底物可以与特定的蛋白酶组合以形成反应混合物,并且如上文对于被裂解的产物的元素分析所描述的,等份部分在特定的时间间隔(例如,2分钟、4分钟、6分钟等等)被取出并且被处理以获得反应速率 V 。其次,可以对于在不变的蛋白酶浓度下的不同的初始的带标签的、固定化的肽底物浓度确定产物形成的速率。假定单底物蛋白酶动力学反应,米-曼氏方程(Michaelis-Menten equation)可以被用以从获得的数据确定 K_M 和 $V_{最大}$ 。

[0054] 本文描述的方法可以以多重形式进行,其中多种酶的活性同时地被测量。

[0055] 如本文所使用,“多重测定(multiplexed assay)”指的是其中多个测定反应(例如,涉及多种分析物的同时的、有区别的反应)在单个反应室中进行和/或其中多种分析物在单个检测步骤中被分析的测定。

[0056] 例如,在本文描述的孵育步骤中,多种有区别的带标签的、固定化的肽底物可以在相同的生物介质中被孵育。每种底物可以用有区别的元素标签来加标签,并且被固定化在有区别的带元素标签的支持体上。这允许每种肽底物使用元素分析(例如,使用质谱细胞计量术)唯一地被鉴定。

[0057] 生物介质还可以包含多种酶。因为通过有区别的元素标签的存在,每种肽底物可以唯一地被鉴定,因此每种对应的酶(即,对该底物特异性的酶)的活性也可以被定量地确定。

[0058] 例如,生物介质可以包含两种或更多种肽底物,所述两种或更多种肽底物是用于两种或更多种不同的蛋白酶的底物。

[0059] 另外,至少五种不同的肽底物可以有区别地被加标签且被固定化以形成至少五种有区别的带标签的、固定化的肽底物,其中每种肽底物是用于不同的蛋白酶的底物。至少五种元素标签中的每种和带元素标签的支持体可以被检测且被定量,例如通过质谱细胞计量术。

[0060] 进一步地,至少十种不同的肽底物可以有区别地被加标签且被固定化以形成至少十种有区别的带标签的、固定化的肽底物,其中每种肽底物是用于不同的蛋白酶的底物。至少十种不同的元素标签中的每种和带元素标签的支持体可以被检测且被定量,例如通过质谱细胞计量术。

[0061] 进一步地,至少十五种不同的肽底物可以有区别地被加标签且被固定化以形成至少十五种有区别的带标签的、固定化的肽底物,其中每种肽底物是用于不同的蛋白酶的底物。至少十五种不同的元素标签中的每种和带元素标签的支持体可以被检测且被定量,例如通过质谱细胞计量术。

[0062] 进一步地,至少二十种不同的肽底物可以有区别地被加标签且被固定化以形成至少二十种有区别的带标签的、固定化的肽底物,其中每种肽底物是用于不同的蛋白酶的底物。至少二十种不同的元素标签中的每种和带元素标签的支持体可以被检测且被定量,例如通过质谱细胞计量术。

[0063] 因为考虑到元素标签可以不同于带元素标签的支持体,在单测定中可以被多重化的不同的肽底物的最大数通常取决于可以通过质谱细胞计量术同时地被检测且被定量的可区分的元素标签的数目。此外,以使用用于鉴定不同的珠类型的多种比率的若干不同的金属相似的方式,用于附接至不同的肽底物的元素标签也可以选自不同的金属的唯一的组合。因为金属和其稳定的同位素的数目可以大于50,所以不同的肽底物的数目可以是非常大的(超过 10^6 个不同元素标签是可行的)。然而,它遵守质谱细胞计量术的操作限值并且数据收集能力有助于确定可以同时地被分析的肽底物的最大数。因此,预计至少100种不同的肽底物可以有区别地被加标签且被固定化以形成至少100种有区别的带标签的、固定化的肽底物是合理的。更具体地,10种至100种不同的肽底物的上限可以有区别地被加标签且被固定化以形成至少100种有区别的带标签的、固定化的肽底物。

[0064] 生物介质还可以包含多种酶激活剂和/或抑制剂。例如,生物介质可以包含对两种或更多种不同的酶是特异性的两种或更多种不同的酶抑制剂。

[0065] 本文描述的过程和方法有助于,例如用于基因报告表达的有效的、精确的、以及定量的测定的准备。

[0066] 在生物医学和药学研究中,报告基因测定广泛地被用于研究基因调节和鉴定影响基因表达的因素。将由一个或多个基因调节元件(即,对于功能性mRNA的转录所必需的序列区连同对于报告蛋白所必需的编码序列)组成的报告基因构建物引入到活细胞中,然后是表达的蛋白或其酶活性的定量,这使得能够间接测量基因表达。因此,转染的 β -半乳糖苷酶报告基因可以指示用于在给定的细胞中的感兴趣的蛋白质的调节元件的存在。在测试样品的单一等分部分中检测多种酶的能力,如在本文陈述的方法中描述的,有助于鉴定内源酶活性和由转染到细胞中的基因编码的报告酶活性(例如, β -半乳糖苷酶)。

[0067] 特定应用的一个实例是作为用于前列腺癌的预测标志物(prognostic marker)的多种激肽释放酶(kallikrein)的用途,所述激肽释放酶是丝氨酸蛋白酶。已知,不同的激肽释放酶蛋白影响前列腺并且这些蛋白酶具有已知的氨基酸序列。已经提议,在血清中与前列腺特异性抗原(PSA)浓度结合的激肽释放酶蛋白酶浓度可以被用以比单独地测量PSA浓度更精确地确定前列腺癌的发病率并且从而降低前列腺活检的数目。PSA也是激肽释放酶蛋白酶家族的成员。

[0068] 另外,在受影响的组织中的胰蛋白酶浓度可以被用以确定结肠直肠癌(CRC)的发病率。胰蛋白酶激活基质金属蛋白酶(在CRC中的MMP-2、MMP-7、MMP-9)并且与该基质金属蛋白酶共表达。在肿瘤环境内的胰蛋白酶和MMP的共分离(co-segregation)对激活MMP是重要的;此过程可以解释随着增加的胰蛋白酶浓度,在结肠直肠癌中的差的预后。胰蛋白酶和MMP一起在结肠直肠的增殖、进展、和侵入中是特别地重要的。

[0069] 这些仅仅是由本公开内容提供的方法可以提供关于在特定的生物过程中多种酶的活性的有利信息的许多各种应用中的两种。

[0070] 另外,本文公开的方法还有助于产生用于酶活性的高通量筛选的底物悬浮阵列。筛选测定通常包括两组反应的比较:没有效应物的第一组反应,以及除了效应物存在之外,第二组相同的反应。例如,包含蛋白酶和选择的酶效应物的生物介质可以在每种反应物的不同浓度下被制备。然后,可以将元素编码的珠上的固定化的底物添加至每种生物介质并且孵育直到反应完成。获得的混合物典型地被稀释至 10^6 个珠/mL,并且珠通过质谱细胞计量术被分析。然后,可以比较在有和没有酶效应物下的反应之间的数据。

[0071] 如本文所使用,术语“支持体”指的是肽底物可以被附接至的固体表面。

[0072] 支持体的非限制性实例包括合成的膜、珠(例如,弹性体、琼脂糖、硅酸盐)、以及在塑料微孔(plastic microwell)、载玻片、以及反应管中的平面表面。

[0073] 例如,支持体可以包括固体珠。固体珠可以包括聚合物的、玻璃的、或陶瓷的珠。玻璃的或陶瓷的珠还可以包括金属涂层。金属涂层可以包括金属、金属合金、或其组合。

[0074] 在珠是聚合物的珠的情况下,珠可以包含聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、丙烯腈、或其组合。在某些实施方案中,珠包含聚苯乙烯。

[0075] 固体支持体可以是编码的珠(即,其中一种或更多种有区别的元素被附接至珠和/或被包含在珠内的固体珠,从而当通过元素分析询问时,提供有区别的信号)。例如,支持体可以包含如在美国申请公布号2010/0144056 A1中描述的元素污染的珠,该申请通过引用以其整体并入。

[0076] 编码的珠可以包含两种或更多种有区别的污染元素。例如,编码的珠可以包含两种或更多种有区别的镧系元素。

[0077] 在某些实施方案中,支持体包含其中污染元素在整个珠的主体中均匀地扩散的元素污染的珠。

[0078] 可选择地,支持体包含其中污染元素以导致所述污染元素的有区别的体积分布的方式渗透所述微米球的元素污染的珠。

[0079] 固体支持体可以具有从约0.1微米至约10微米、从约0.3微米至约10微米、从约0.5微米至约10微米、从约0.8微米至约10微米、以及从约1微米至约10微米的颗粒尺寸。

[0080] 如本文所使用,术语“元素标签”指的是包含附接至支持分子结构的元素或多种元

素,并且基于其元素组成与分析物以及与其他元素标签是可区分的化学部分。

[0081] 为了与分析物是可区分的,元素标签可以包含在分析物中不存在,或仅以痕量存在的一种或更多种元素。例如,元素标签可以包含金属元素。

[0082] 在某些实施方案中,元素标签可以包含镧系元素或过渡元素。典型的镧系元素的非限制性实例包括铈、钐、铕、以及镱。元素标签可以包含选自由以下组成的组的过渡后金属元素(post-transition metal element):铝、镓、铟、锡、铊、铅、以及铋。

[0083] 元素分析(例如,质谱细胞计量术)可以被用以精确地检测且区别相同元素的不同同位素。因此,元素标签可以基于其同位素组成是可区分的。例如,元素标签可以包含元素的多种同位素。

[0084] 在相同的样品中,元素标签在功能上与众多其他元素标签是可区分的,因为元素标签的元素组成或同位素组成不同于其他标签的元素组成或同位素组成。

[0085] 使用对本领域普通技术人员熟知的标准化学,肽底物可以通过标准的连接部分被连接至元素标签或聚合物元素标签。

[0086] 在元素标签包含金属元素的情况下,元素标签还可以包含一种或更多种螯合基团。

[0087] 元素标签可以包含包括多个共价附接的螯合基团的聚合物载体。

[0088] 如本文所使用,术语“聚合物”指的是包含如下分子的物质:所述分子的特征为以足以在添加或除去一个或几个构成单元下提供不显著地变化的一组性质的量彼此连接的一种或更多种原子或原子团的物质(构成单位)的多个重复。更通常地,聚合物分子可以在其主链和侧基方面被描述,所述主链是跨越该分子的长度的原子的被连接的连接物(connected link),所述侧基被附接至每个组成单元的主链部分。侧基可以在化学上和和功能上不同于主链。

[0089] 例如,元素标签可以包含聚合物,其中聚合物包含对金属离子具有高亲和力,并且可以充当用于这些离子的螯合基团或配体的多个侧基。

[0090] 元素标签可以是如在美国申请公布号2008/0003616 A1中描述的基于聚合物的元素标签,该申请通过引用以其整体并入。

[0091] 例如,元素标签可以包含聚合物,其中聚合物包含包括二乙烯三胺五乙酸酯(DTPA)配体或1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)配体、或其酰胺或酯的至少一种结合金属的侧基,以及至少一种金属原子。

[0092] 结合金属的侧基的数目可以是在约10和约250之间。例如,元素标签可以包含包括从约10种至约50种过渡金属或镧系原子的聚合物。在某些实施方案中,聚合物包含从约20种至约50种过渡金属或镧系原子。特别地,聚合物包含从约25种至约35种过渡金属或镧系原子。

[0093] 元素标签包含至少一种过渡金属或其他金属原子。可选择地,元素标签包含至少一种镧系原子。

[0094] 聚合物可以选自由以下组成的组:直链聚合物、共聚物、支链聚合物、接枝共聚物、嵌段共聚物、星形聚合物、以及超支化聚合物。例如,聚合物的主链可以衍生自被取代的聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、或聚甲基丙烯酰胺。

[0095] 通常,本文描述的过程和方法可以被用以检测具有对肽底物特异性的活性的任何

类型的酶的存在。

[0096] 在某些实施方案中,酶是蛋白酶,蛋白酶宽泛地指的是进行蛋白水解的任何酶。更特别地,蛋白酶催化将氨基酸(例如,在肽链、多肽链、或蛋白质链中连接的氨基酸)连接在一起的肽键的水解。

[0097] 可以根据本文公开的方法鉴定的蛋白酶的非限制性实例包括丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、以及金属蛋白酶。

[0098] 丝氨酸蛋白酶的非限制性实例包括胰蛋白酶、糜蛋白酶、角蛋白酶、纤溶酶、凝血酶、纤维蛋白溶酶、胶原酶、枯草杆菌蛋白酶、以及弹性蛋白酶。

[0099] 半胱氨酸蛋白酶的非限制性实例包括calpain、组织蛋白酶(A、B、和C)、胰天蛋白酶、木瓜蛋白酶、以及菠萝蛋白酶。

[0100] 天冬氨酸蛋白酶的非限制性实例包括胃蛋白酶、早老蛋白-1、早老蛋白-2、肾素、 γ -分泌酶、plasmepsin、组织蛋白酶-D、以及组织蛋白酶-E。

[0101] 本文描述的过程和方法还可被用以检测在生物介质中的酶激活剂或抑制剂的存在。例如,酶激活剂或抑制剂的活性可以使用如上文描述的筛选测定来检测,其中来自具有预期的激活剂或抑制剂的反应的数据与来自其中激活剂或抑制剂不存在的另外相同的反应的数据比较。

[0102] 如本文所使用,术语“肽底物”通常指的是包含通过肽键连接的两个或更多个氨基酸的分子。

[0103] 例如,肽底物可以包括肽、多肽、或蛋白质。如本领域技术人员所理解,在肽、多肽、和蛋白质之间的尺寸边界不是固定的,并且如本文所使用,这些术语可交换地指的是包含通过一个或更多个共价化学键连接的两个或更多个氨基酸的化合物。

[0104] 底物可以是合成的或天然存在的实体。

[0105] 天然存在的肽底物的非限制性实例包括蛋白质,例如血红蛋白、肌红蛋白、血影蛋白、纤连蛋白、胶原蛋白、角蛋白、弹性蛋白、明胶、胰岛素、以及白蛋白。

[0106] 肽底物的第一氨基酸和末尾氨基酸可以是C-末端氨基酸或N-末端氨基酸。当肽底物的第一氨基酸是C-末端氨基酸时,肽底物的末尾氨基酸是N-末端氨基酸。相反地,当肽底物的第一氨基酸是N-末端氨基酸时,肽底物的末尾氨基酸是C-末端氨基酸。

[0107] 生物介质还可以包含一种或更多种另外的组分。

[0108] 例如,生物介质还可以包含酶活性的候选效应物。如本文所使用,术语“效应物”指的是能够直接地或间接地增加或降低酶的活性的分子。如本文所使用,术语“候选效应物”指的是可以对增加或降低酶的活性起作用的分子。

[0109] 效应物的非限制性实例包括大分子,例如蛋白质、糖蛋白、多糖、糖胺聚糖、蛋白聚糖、整合素、酶、凝集素、选择素(selectin)、细胞粘附分子、毒素、细菌菌毛、转运蛋白、激素、抗体、主要组织相容性复合物、免疫球蛋白超家族、以及钙粘蛋白。效应物的另外的非限制性实例包括小分子,例如公认的药物(putative drug)、单糖、二糖、寡糖、氨基酸、寡肽、核苷、核苷酸、寡核苷酸、脂类、类视黄醇类、类固醇类、以及糖肽。

[0110] 生物介质还可以包含一种或更多种内标(internal standard)。通常,内标指的是向生物介质添加的区别于分析物的已知量的化合物。

[0111] 将内标添加至生物介质在质谱法作为分析法被使用时是特别地有用的。当生物介

质被分析时,从内标获得的信号可以被用以校正分析结果。例如,通过将来自分析物的质谱信号的强度与以已知量存在的内标的信号强度比较,可以得出分析物的定量测量。

[0112] 已经详细地描述了本发明,将明显的是,修改和变型是可能的而不偏离在所附的权利要求书中定义的本发明的范围。

实施例

[0113] 提供以下非限制性实施例以进一步例证本发明。

[0114] 实施例1:使用质谱细胞计量术的颗粒元素分析

[0115] 对于蛋白酶,钙蛋白酶-1、胱天蛋白酶-3、MMP-9以及ADAM10,合成四种正交的肽底物。每种底物在C-末端处携带生物素标签并且在N-末端处携带基于DTPSA的镧系复合物。蛋白酶属于酶的四种不同的家族并且在正常的生理过程中以及在多种疾病中起重要作用。例如,基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在骨发育和伤口愈合期间重新构建细胞外基质方面是必需的,并且还涉及癌症转移和关节炎。ADAM10,作为另外的实例,在蛋白酶解加工淀粉样前体蛋白以形成 β -淀粉体中是必需的, β -淀粉体被沉积在阿尔兹海默患者的脑中发现的淀粉样斑块中。

[0116] 然后,每个肽底物通过附接至具有硫醇官能化的表面的唯一编码的珠被固定化。每个编码的珠包含用不同比例的两种镧系元素污染的聚苯乙烯,并且因此当使用质谱细胞计量术询问时提供有区别的信号。

[0117] 然后,每种固定化的底物用元素标签加标签,其中每种元素标签包含过渡金属或镧系元素。当使用元素分析询问时,元素标签提供有区别的信号。

[0118] 然后,将带标签的、固定化的肽底物在包含生物介质的容器中孵育,所述生物介质包含从HeLa细胞裂解物中获得的样品。在约25°C下,底物与样品一起孵育持续2小时。

[0119] 然后,生物介质通过质谱细胞计量术来询问。因为每个颗粒通过质谱细胞计数器,所以获得的质谱信号可以被用以定量肽底物的状态。例如,过渡金属元素或镧系元素的检测对应于特定的元素标签的存在。如果此信号与指示对应的镧系元素污染的编码的珠支持体的存在的第二信号相一致,则推测底物仍旧是完整的,并且尚未经历蛋白水解。相反地,如果没有对应于编码的珠的信号被检测到,则推测被检测的颗粒是已经通过蛋白水解被裂解的底物的第二部分(即,带元素标签的部分)。以此方式,获得在样品中的酶活性的定量分析。

[0120] 例如,激肽释放酶可以被用于前列腺癌的预测标志物。多种激肽释放酶基因把是蛋白酶的激肽释放酶编码;这些蛋白酶具有已知的氨基酸序列。这些激肽释放蛋白酶的底物也是已知的。因此,激肽释放蛋白酶的一种或更多种的已知的肽底物可以具有附接至该肽的C-末端或N-末端氨基酸的编码的珠并且该肽底物的其他氨基酸可以使用本领域已知的方法被附接至元素标签或带元素标签的聚合物。在肽底物通过附接至编码的珠而被固定化并且用元素标签被加标签之后,肽底物可以与感兴趣的生物样品一起孵育并且通过质谱细胞计量术询问。质谱细胞计量术数据可以提供关于特定的激肽释放蛋白酶的活性的信息并且允许关于激肽释放酶浓度的推论。已经提议,激肽释放酶蛋白酶浓度和前列腺特异性抗原(PSA)浓度在血清中的组合可以被用以比单独地测量PSA浓度更精确地确定前列腺癌的发病率。此数据可能可以降低前列腺活检的数目。

[0121] 另外,胰蛋白酶浓度可以被用以确定结肠直肠癌(CRC)的发病率。胰蛋白酶激活基质金属蛋白酶(在CRC中的MMP-2、MMP-7、MMP-9)并且与该基质金属蛋白酶共表达。在肿瘤环境内的胰蛋白酶和MMP的共分离对激活MMP是重要的。用于胰蛋白酶和MMP的底物是已知的并且可以如本文描述的被编码且被加标签以提供固定化的、带标签的肽底物。在底物被固定并且被加标签之后,底物可以通过质谱细胞计量术被询问以提供关于目标酶活性的活性和浓度的信息。收集数据可以解释对于在具有在受影响的组织中增加的胰蛋白酶浓度的患者中的结肠直肠癌所观察到的差的预后。胰蛋白酶和MMP一起在结肠直肠的增殖、进展、以及侵入中是特别地重要的,所以知道这些蛋白酶在特定的组织中的活性可以提供关于结肠直肠癌的进展的另外的信息。

[0122] 当引入本发明或其某(些)实施方案的要素时,冠词“一(a)”、“一(an)”、“该(the)”和“所述(said)”意图意指有一个或更多的该要素。术语“包含(comprising)”、“包括(including)”和“具有(having)”意图是包含性的并且意指除了列出的要素之外可以有另外的要素。

[0123] 鉴于上文,将理解,实现本发明的若干目的并且获得其他有利的结果。

[0124] 因为在上文的产物和方法中可以做出各种变化而不偏离本发明的范围,所以意图是所有在上文的描述中包含的和在附图中示出的内容将被解释为是说明性的并且没有限制性意义。