



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109564215 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(21)申请号 201780047062.X

(22)申请日 2017.06.12

(30)优先权数据

62/348,722 2016.06.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.01.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2017/050719 2017.06.12

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/210801 EN 2017.12.14

(71)申请人 李顺成

地址 加拿大安大略省

(72)发明人 李顺成 刘旭光

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 余颖 陈扬扬

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 1/34(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书2页 说明书58页

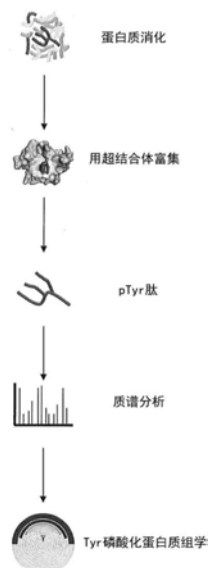
序列表15页 附图22页

(54)发明名称

用于以变体SH2结构域对蛋白质酪氨酸磷酸化进行概述的方法

(57)摘要

本文提供了对样品的蛋白质酪氨酸磷酸化进行概述的方法,所述方法包括:将样品与SH2超结合体接触,从而使包含于样品的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从样品分离;和鉴定分离的含pTyr的肽。



1. 一种对测试样品的蛋白质酪氨酸磷酸化进行概述的方法,所述方法包括:  
将所述测试样品与SH2超结合体接触,从而使包含于所述测试样品的含pTyr的肽与所述SH2超结合体结合;  
将所述结合的含pTyr的肽从所述测试样品分离;和  
鉴定所述分离的含pTyr的肽。
2. 如权利要求1所述的方法,还包括对所述分离的含pTyr的肽定量。
3. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述鉴定或所述定量包括质谱技术。
4. 如权利要求3所述的方法,包括多重反应监测、选择性反应监测或平行反应监测技术。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中,所述SH2超结合体是哺乳动物SH2结构域的变体。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,所述SH2超结合体是Src、Grb2或Fyn SH2结构域的变体。
7. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中,所述SH2超结合体是三突变型SH2变体。
8. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中,所述SH2超结合体是四突变型SH2变体。
9. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中,所述SH2超结合体包含SEQ ID NO:5、7、9、11、12、13、14或15的序列。
10. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中,所述SH2超结合体包含在融合蛋白内,所述融合蛋白包含一个或多个其他SH2超结合体。
11. 如权利要求1-10中任一项所述的方法,其中,所述SH2超结合体固定于固体支持物。
12. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中,所述分离包括高效液相色谱技术或超高效色谱技术。
13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中,所述样品获自对象。
14. 如权利要求13所述的方法,其中,所述对象是人对象。
15. 如权利要求13或14所述的方法,其中,所述样品是血清、血浆、尿、血液、组织或组织提取物。
16. 如权利要求13-15中任一项所述的方法,其中,所述对象将被诊断患有癌症,或已知所述对象患有癌症。
17. 如权利要求16所述的方法,其中,所述癌症是乳腺癌、肺癌、前列腺癌或白血病。
18. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中,所述样品已经暴露于酪氨酸激酶抑制剂、化疗剂、PD-1抑制剂或CTLA-4抑制剂。
19. 如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中,所述鉴定包括鉴定对应于特定蛋白质酪氨酸激酶底物的特定含pTyr的肽。
20. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中,所述鉴定包括鉴定对应于特定蛋白质酪氨酸磷酸酶底物的特定含pTyr的肽。
21. 如权利要求1-20中任一项所述的方法,其中,所述鉴定包括由蛋白质激酶的活化环或由所述蛋白质激酶的活化环外鉴定含含pTyr的肽。
22. 如权利要求21所述的方法,其中,所述蛋白质酪氨酸激酶是酪氨酸激酶,丝氨酸/苏氨酸激酶,双特异性激酶,MAP激酶或脂质激酶。

23. 如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中,所述鉴定包括由免疫受体的ITRM鉴定含pTyr的肽。

24. 如权利要求23所述的方法,所述ITRM是ITIM、ITSM或ITAM。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的方法,其中,所述鉴定包括由蛋白质酪氨酸磷酸酶的调节区鉴定含pTyr的肽。

26. 如权利要求25所述的方法,其中,所述蛋白质酪氨酸磷酸酶的调节区是正调节区或负调节区。

27. 如权利要求1-26中任一项所述的方法,还包括:

将对照样品与所述SH2超结合体接触,从而使包含于所述对照样品的含pTyr的肽与所述SH2超结合体结合;

将所述结合的含pTyr的肽从所述对照样品分离;

鉴定所述分离的含含pTyr的肽;和

将针对所述测试样品获得的概况与针对对照样品获得的概况进行比较。

28. 如权利要求27所述的方法,其中,所述对照样品是:来自与所述测试样品相同来源、但与所述测试样品获取时间点不同的样品,来自与所述测试样品相同来源、但相较于所述测试样品对于药物的暴露不同的样品,来自已知无疾病来源的样品,或来自已知患有疾病或疾病涉及的来源的样品。

## 用于以变体SH2结构域对蛋白质酪氨酸磷酸化进行概述的方法

[0001] 相关申请的交叉援引

[0002] 本申请要求2016年6月10日提交的美国临时申请第62/384,722号的优先权和权益,其内容通过引用纳入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开涉及在样品中检测蛋白质酪氨酸磷酸化的方法,包括与免疫功能和蛋白质激酶活性相关的磷酸化,所述方法包括使用质谱技术。

### 技术背景

[0004] 通过各种蛋白质激酶的蛋白质磷酸化作用在多种真核细胞过程中具有重要作用,包括代谢,细胞生长,细胞周期进展,细胞凋亡,细胞骨架结构和分化。蛋白质磷酸化对于细胞信号传导尤其重要,其中磷酸化起着控制酶活性、免疫应答、蛋白质亚细胞定位、蛋白质降解和蛋白质-蛋白质相互作用等作用。

[0005] 在真核细胞中,蛋白质磷酸化几乎只发生在酪氨酸(Tyr)、丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)残基上。在人基因组编码的大约518种蛋白质激酶中,约90种被分成Tyr激酶(TK),而余下的大部分被分成Ser/Thr激酶(STK)以及使Tyr和Ser/Thr磷酸化的双特异性激酶的较小亚组(Manning,G.等,“人基因组的蛋白质激酶补体(The protein kinase complement of the human genome)”,(2002)Science 298:1912)。根据定义,蛋白质激酶具有使蛋白质磷酸化的保守催化结构域,但是其还可以具有其他结构域,如蛋白质-蛋白质相互作用结构域(Manning,G.等,“人基因组的蛋白质激酶补体(The protein kinase complement of the human genome)”,(2002)Science 298:1912)。

[0006] 蛋白质激酶活性常常需要激酶自身的磷酸化。通常,TK的激酶活性通过所谓的活化环中的一个或多个Tyr残基的磷酸化来活化。该活化环是位于激酶催化核心内的短、保守肽。在大多数TK以及多个STK或双特异性激酶(例如,MAP激酶)和脂质激酶(例如,磷脂酰肌醇3-激酶)中,活化环具有1-3个酪氨酸残基,它们属于激酶活化期间最初被磷酸化的酪氨酸(Huse,M.和Kuriyan,J.“蛋白质激酶的构象可塑性(The conformational plasticity of protein kinases)”(2002),Cell 109:275-282;Taylor,S.S.,等“真核蛋白质激酶作为动力学分子开关的研究(Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches)”(2012)Phil.Trans.R.Soc.B.367:2517-2528;Bayliss,R.,等“论有丝分裂激酶活化的细胞机制(On the molecular mechanisms of mitotic kinase activation)”,(2012)Open Biology 2:120136)。结构研究已经揭示,活化环的磷酸化能够使激酶底物和ATP结合(Hubbard,S.R.等,“人体胰岛素受体酪氨酸激酶结构域的晶体结构(Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor)”,(1994)Nature 372:746-754;Lemmon,M.A.和Schlessinger,J.“通过受体酪氨酸激酶的细胞信号传导(Cell signaling by receptor tyrosine kinases)”,(2010)Cell

141:1117-1134)。

[0007] 此外,许多TK在活化环之外或甚至激酶结构域自身之外还具有Tyr残基。这些额外的Tyr残基的磷酸化可以正向或负向自动调节激酶结构域的活性或结合其他蛋白质上的相互作用结构域等。

[0008] 90种人TK中超过半数与一种或多种癌症、炎性疾病或其他疾病相关(Drake等., “Clinical targeting of mutated and wild-type protein tyrosine kinases in cancer” (2014) *Mol. Cell. Biol.* 34:1722-1732; Melnikova, I. 和 Golden, J., “靶向蛋白质激酶(Targeting protein kinases)” (2004) *Nature Rev. Drug Discov.* 3:993-994)。因此,认为酪氨酸激酶是药物靶标最重要的组之一,并且现在,靶向TK的许多药物已获批准,并且更多的药物处于临床前和临床评估的各阶段(Gross, S. 等, “用激酶抑制剂靶向癌症(Targeting cancer with kinase inhibitors)” (2015) *J. Clin. Invest.* 125:1780-1789; Patterson, H. 等, “炎性和自身免疫性疾病治疗中的蛋白质激酶抑制剂(Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases)” (2013) *Clin. Exp. Immunol.* 176:1-10; Vlahovic, G. 和 Crawford, J., “在癌症中活化酪氨酸激酶(Activation of tyrosine kinases in cancer)” (2003) *Oncologist* 8:531-538; Cohen P., “蛋白质激酶—21世纪主要的药物靶标?(Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century?)” (2002) *Nat. Rev. Drug Discov.* 1:309-315)。

[0009] 激酶,特别是酪氨酸激酶,还在通过使包含在免疫受体细胞质结构域内的特定酪氨酸残基磷酸化来调节免疫功能中起重要作用。具体地,免疫信号传导通过基于免疫受体Tyr的调节基序(ITRM)来调节,所述基于免疫受体Tyr的调节基序(ITRM)包括基于免疫受体Tyr的活化基序(ITAM)、基于免疫受体Tyr的抑制基序(ITIM)和基于免疫受体Tyr的转换基序(ITSM)(Liu, H. 等, “通过蛋白质-肽双向阵列筛选揭示的一种基于广泛免疫受体磷酸化的信号传导网络(A comprehensive immunoreceptor phosphotyrosine-based signaling network revealed by reciprocal protein-peptide array screening)” (2015) *Mol. Cell. Proteomics* 14:1846-1858)。

[0010] 基于质谱(MS)的蛋白质组学中的进展已经使其有可能鉴定由人基因组编码的所有蛋白质中约90%。最近的蛋白质组学分析表明,表达的人蛋白质中超过3/4可以被磷酸化(Sharma, K. 等, “超深入磷酸化蛋白质组学揭示了基于tyr和ser/thr的信号传导不同的调节性质(Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of tyr and ser/thr-based signaling)”, (2014) *Cell Rep.* 8:1583-94)。

[0011] 鉴定磷酸化氨基酸中重要的步骤是在MS分析前富集磷蛋白或磷酸肽。固定的金属离子亲和色谱(IMAC)(常常包括使用TiO<sub>2</sub>或Ti<sup>4+</sup>)可以用于富集磷酸肽。在Sharma等中,使用TiO<sub>2</sub>珠富集来自HeLa S3细胞的磷酸肽。在鉴定的大约38,000个磷酸位点中,84.1%是pSer,15.5%是pThr,且0.4%是磷酸酪氨酸(pTyr)。这些相对比例与十多年前使用放射性同位素标记估计的那些相似。

[0012] 通过MS鉴定细胞Tyr磷酸位点可以通过用抗-pTyr抗体(例如,4G10, p-Tyr-100)的富集和通过用过钒酸盐(pervanadate)(一种蛋白质磷酸酶的抑制剂)预处理细胞来改善。在Sharma等中,将过钒酸盐预处理与用抗-pTyr抗体富集组合允许从HeLa S3细胞中约1,300个蛋白质中鉴定超过2,000个Tyr磷酸化的肽。通过Sharma等鉴定的Tyr磷酸位点中仅有

约18%似乎是新型的。这些作者总结到,尽管Ser/Thr磷酸化事件的覆盖似乎是非常复杂的,但是Tyr磷酸化蛋白质组还远未完成。

[0013] 细胞信号传导依赖于受调节的和动力学的蛋白质-蛋白质相互作用,而其常常通过模块结构域介导。一个示例是Src同源性2 (SH2) 结构域,其结合含pTyr的肽。人基因组编码约120个SH2结构域。所有已知的SH2结构域结构被确认是保守的结构域折叠。通常,SH2结构域具有这样的pTyr-结合口袋以及第二口袋或亚位点,其赋予残基C-末端对连接配体中pTyr的特异性 (Huang, H. 等, “限定人SRC同源性2结构域的特异性空间 (Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain)” (2008) Mol.Cell.Proteomics 7:768-784)。

[0014] 此外,SH2结构域已知结合至ITRM (Liu, H. 等, “通过蛋白质-肽双向阵列筛选揭示的基于全面免疫还艘体磷酸酪氨酸的信号传导网络 (A comprehensive immunoreceptor phosphotyrosine-based signaling network revealed by reciprocal protein-peptide array screening)” (2015) Mol.Cell.Proteomics 14:1846-1858)。

### 发明内容

[0015] 本公开涉及使用称之为超结合体 (Superbinder) 的变体SH2结构域对生物样品内的蛋白质酪氨酸磷酸化进行概述。该方法提供了通过对酪氨酸磷酸化的肽基于超结合体的富集与质谱进行组合来检测和任选地定量与细胞过程相关的酪氨酸磷酸化,包括ITRM介导的免疫信号传导和蛋白质激酶的活性。

[0016] 最近已经发现,SH2结构域对于具有pTyr残基的肽的亲和力可以被显著地增强。例如,通过取代pTyr-结合口袋中的1、2或3个特定残基,可以获得显著增强的亲和力 (Kaneko, T. 等, “SH2超结合体作为细胞信号传导的拮抗剂 (SH2Superbinders act as antagonists of cell signaling)”, (2012) Sci.Signal.5:ra68;美国专利申请号14/388,592)。由酪氨酸激酶Src、酪氨酸激酶Fyn和衔接子蛋白Grb2这3个人蛋白质将这些取代引入SH2结构域中类似的位置显著增强了这些结构域对含pTyr的肽的亲和力。

[0017] 例如,具有这类取代的变体Src SH2结构域显示了对生理性和人工含pTyr的肽增强的亲和力 (表1;显示了 $\mu\text{M}$ 单位的平衡解链常数 ( $K_d$ ) 值。

[0018] 表1:野生型和变体Src SH2结构域对pTyr肽组的结合亲和力

[0019]

pTyr 肽	序列	野生型	Lys15Leu	Thr8Val/ Cys10Ala	三突变体
VEGFR1-pTyr <sup>12</sup> 13	DVRpYVNAAKF	6.5	1.7	1.8	0.023
EGFR-pTyr <sup>978</sup>	PQRpYLVIQGD	3.7	0.82	0.39	0.0077
EGFR-pTyr <sup>1110</sup>	NPVpYHNQPLN	6.9	1.7	4.5	0.076
MidT-pTyr <sup>324</sup>	EPQpYEEIPIYL	0.13	0.051	0.027	0.0038
RSKL-pTyr <sup>423</sup>	YQHpYDLDLKD	3.9	1.6	0.90	0.013
ShcA-pTyr <sup>239</sup>	DHQpYYNDFPG	0.70	0.20	0.10	0.0038
ShcA-pTyr <sup>317</sup>	DPSpYVNVQNL	2.2	0.49	0.39	0.0075
设计	GGpYGG	(>30)	25	25	0.51

[0020] 相似的,在3个特定氨基酸位置具有3个特定氨基酸取代的变体Fyn SH2结构域(如本文所述的“三突变体”或“TrM”)结合含pTyr的肽,所述含pTyr的肽存在于具有9.7纳摩尔的平衡解离常数(K<sub>d</sub>)的受体酪氨酸激酶EGFR的序列中。野生型Fyn SH2结构域以3.7微摩尔( $\mu$ m)的K<sub>d</sub>结合相同的肽,这表明TrM Fyn SH2结构域的结合约380倍更紧密。

[0021] 现在已经出人意料地发现,SH2超结合体对含pTyr的肽增加的亲和力足够敏感,从而允许在细胞里的磷酸化状态中检测改变(包括小改变),如可能由于疾病或对药物治疗的暴露而产生的那些。

[0022] 通过比较不同样品之间的磷酸化状态,有可能使用本公开的方法来评估与磷酸化相关的细胞过程的不同方面,包括与疾病和治疗相关的方面,例如,疾病状态,疾病预后,疾病进展,治疗的适宜性或有效性,抗药性,激酶活性状态或免疫信号传导状态。

[0023] 因此,本公开首次提供了鉴定数百个Tyr磷酸位点并任选地同时在这类位点定量磷酸化发生率的方法,包括从微小的细胞、组织、活检或其他生物样本,因此允许在生物样品内系统性概述蛋白质酪氨酸磷酸化状态。

[0024] 这类概述可以表示pTyr信号传导的模式以及(任选地)其强度,包括蛋白质激酶-和ITRM-介导的信号转导,继而其可以提供生物样品内细胞的各种状态的指示,包括免疫功能和疾病状态,如癌症。在一些实施方式中,这些方法允许检测反应基本上全部已知TK激酶活性水平的pTyr状态。例如,在一些实施方式中该方法允许鉴定并且任选地定量89/90已知TK的活性。当方法包括与适当对照样品获得的概况进行比较时,在不同实施方式中的方法可以检测细胞内调节事件中可能与疾病或旨在抑制特定TK的治疗相关的改变

[0025] 根据本公开的方面,本文提供了对测试样品的蛋白质酪氨酸磷酸化进行概述的方法,该方法包括将测试样品与SH2超结合体接触,从而使包含于测试样品含pTyr的肽与SH2

超结合体结合;从测试样品分离结合的含pTyr的肽分离;和鉴定分离的含pTyr的肽。

[0026] 该方法还包括对分离的含pTyr的肽进行定量。

[0027] 鉴定和/或定量可以包括质谱技术,包括例如多重反应监测(MRM)、选择性反应监测(SRM)或平行反应监测(PRM)技术。

[0028] SH2超结合体可以是哺乳动物SH2结构域的变体,并且可以是Src、Grb2或Fyn SH2结构域的变体。SH2超结合体可以是三突变型SH2变体,或者可以是四突变型SH2变体。SH2超结合体可以包含序列SEQ ID NO:5、7、9、11、12、13、14或15。SH2超结合体可以包含于融合蛋白内,所述融合蛋白包含一个或多个其他SH2超结合体。

[0029] 可以将SH2超结合体固定于固体支持物。

[0030] 分离可以包括高效液相色谱技术或超高效色谱技术。

[0031] 样品可以获得自对象,包括人对象,并且对象可以将被诊断患有癌症,或者可以是已知患有癌症,包括例如乳腺癌、肺癌、前列腺癌或白血病。例如,样品可以是血清、血浆、尿、血液、组织或组织提取物。

[0032] 样品可以是已经暴露于酪氨酸激酶抑制剂、化疗剂、PD-1抑制剂或CTLA-4抑制剂。

[0033] 该方法可以包括鉴定对应于特定蛋白质酪氨酸激酶底物的含pTyr的肽,对应于特定蛋白质酪氨酸磷酸酶底物的含pTyr的肽,来自激酶的含pTyr的肽,包括来自蛋白质激酶活化环和来自蛋白质激酶活化环外的含pTyr的肽,包含ITIM、ITSM或ITAM的免疫受体的ITRM,和/或蛋白质酪氨酸磷酸酶的调节区,包括正调节区或负调节区。激酶可以是酪氨酸激酶,丝氨酸/苏氨酸激酶,双特异性激酶,MAP激酶或脂质激酶。

[0034] 该方法还可包括使用对照样品。因此,该方法可以包括将对照样品与SH2超结合体接触,从而使包含于对照样品的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从对照样品分离;鉴定分离的含pTyr的肽;并将针对测试样品获得的概况与针对对照样品获得的概况进行比较。

[0035] 例如,对照样品可以是:来自与测试样品相同来源、但与测试样品获取时间点不同的样品,来自与测试样品相同来源、但相较于测试样品对于药物暴露不同的样品,来自已知无疾病的来源的样品,或来自已知患有疾病或疾病涉及的来源的样品。

## 附图说明

[0036] 本申请的附图仅通过示例方式说明本发明的实施方式:

[0037] 图1是考马斯染色的聚丙烯酰胺凝胶的图像,其显示了由大肠杆菌细胞裂解物纯化六聚组氨酸(His<sub>6</sub>)-标签标记的或His<sub>6</sub>-和GST-双标签标记的重组蛋白,即野生型人Src SH2结构域(His<sub>6</sub>/GST-标签标记;SEQ ID NO:10)、TrM人Src SH2超结合体(His<sub>6</sub>/GST-标签标记;SEQ ID NO:11)和四倍突变的(QuadM)人Src SH2超结合体(His<sub>6</sub>-标签标记;SEQ ID NO:13);纯化的蛋白质的近似分子量通过标志物蛋白质的混合物以千道尔顿(kDa)指示。

[0038] 图2A是实验的流程图,所述实验确定不同摩尔量的抗-pTyr抗体(4G10或4G10、PY99和P-TYR-100的抗体混合物)、His<sub>6</sub>/GST-标签标记的TrM Src SH2超结合体(SEQ ID NO:11)和His<sub>6</sub>-标签标记的QuadM Src SH2超结合体(SEQ ID NO:13)鉴定源自过钒酸盐处理的Jurka细胞的含pTyr的肽的相对能力;图2B是表示通过各种亲和力试剂、以各种量、在图2A所述的实验中鉴定的pTyr位点的数量。

[0039] 图3是表示分析来自图2A和2B中实验的数据的示意图,具体显示了,以3个不同当量的摩尔量(即,0.375nmol、1.875nmol和11.25nmol),通过4种亲和力试剂(方格的角,见图例)中的每一种,在含pTyr的肽中侧接pTyr的氨基酸序列之间成对比较(通过线连接各对)中的欧几里得距离(线旁边的值);线的相对厚度(而非距离)还指示相对欧几里得距离;图3中还描述了处于pTyr(Y)C-末端的+1、+2、+3和+4位置的氨基酸在4种亲和力试剂指定的成对比较(即对各方格参数的成对比较)中的特定位置处统计学上显著不同( $P < 0.01$ ,没有Bonferroni校正的二项检验)并且在2种模式之间具有 $>0.08$ 的距离;

[0040] 图4是根据本公开的实施方式用于概述蛋白质酪氨酸磷酸化的方法的流程图,所述蛋白质酪氨酸磷酸化包括ITRM和蛋白质激酶活化环中的Tyr磷酸位点;

[0041] 图5是pTyr位点 $\log_2 m/z$ 峰值强度的盒须图,其使用His<sub>6</sub>-标签标记的/GST-标签标记的TrM Src SH2超结合体(SEQ ID NO:11)由9个人细胞系鉴定,通过位点是否是之前已知或在实验中首次鉴定(新型)进行分类,其中粗黑线(和带有箭头的数字)指示中值;

[0042] 图6A是描述不同功能分类中在图5的磷酸化蛋白质组学分析中经Tyr磷酸化的蛋白质的百分比的盒须图,9个细胞系的中值百分比以粗线描述;图6B是与图6A类似的图表,但是仅显示了各功能分类中pTyr磷酸化的蛋白质的单一百分比,源自未用过钒酸盐处理且用抗体P-Tyr-1000进行亲和力纯化的MKN45细胞的公开的磷酸化蛋白质组学数据;图6C是说明人细胞中明显的Tyr磷酸化典型调节(标有“P”的圆圈)的原理图,其中使底物磷酸化的酪氨酸激酶(TK),使底物去磷酸化的蛋白质酪氨酸磷酸酶(PTP)以及结合Tyr磷酸化的蛋白质自身的包括SH2结构域的蛋白质受到Tyr磷酸化的调节。

[0043] 图7A是由人基因(斜体)编码的PTP结构域代表性列表的压缩序列比对,已经将其分成3组(胞质PTP、受体D1PTP和受体D2PTP),并且针对PTPN1中的PTP结构域比对,其中PTPN1残基数量在比对的氨基酸上提供;比对的柱状图显示了在图5的磷酸化蛋白质组学研究中发现其中的残基(如所比对的)经Tyr磷酸化的PTP的数量;将pTyr位点经颜色编码,在上述研究中鉴定的32个新型pTyr位点为绿色,67个之前鉴定的pTyr位点为蓝色,也在上述研究中鉴定的56个之前鉴定的pTyr位点为灰色,而已经功能注释的pTyr位点通过红色框标记。图7B是PTPN1PTP结构域三维结构(PDB代码1EE0)的示意图,将主要Tyr(Y)磷酸位点指示为标记的球体,并且根据提供的红至蓝梯度,用球体的颜色指示PTP家族内Tyr残基保守型的程度;

[0044] 图8是针对进行图4的磷酸化蛋白质组学分析的9个细胞系各自的注释图,其列出由指定基因编码的TK中活化环pTyr位点的 $\log_2 m/z$ 峰值强度值的Z-评分(针对在给定细胞系中检测到的所有pTyr位点计算),它们自行组织成细胞质TK(CTK)和受体TK(RTK)家族和其各种亚家族(例如,CTK\_FAK、RTK\_EPH等);红色阴影的程度表示正Z分数的量级;蓝色阴影的程度表示负Z分数的量级;将5个细胞系中3个TK(Ddr1、ErbB2、IGF-1R)的结果用于预测哪种TK抑制剂将特异性地阻遏下述图11A-11C中这些细胞系中的一些的生长(粗线条方框);细胞系之间针对给定TK的变异程度由图表右侧垂直的数字和柱状图表示;

[0045] 图9A和图9B是对4个乳腺癌细胞系(MCF-7、BT-474、MDA-MD-231、SK-BR-3)的蛋白质的Western印迹的图像,所述蛋白质通过SDS-PAGE解析,并且源自以抗-ErbB2抗体的免疫沉淀物(IP),源自以抗-IGF-1RB抗体的IP,或源自全血细胞裂解物(WCL);用指定的一对抗对印迹进行免疫印迹(IB);以kDa指示蛋白质的近似分子量(MW);

[0046] 图10A是柱状图,显示了对于来自图6磷酸化蛋白质组学分析的9个细胞系中6个(BT-474, HepG2, Jurkat, MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231)的指定TK来说,活化环Tyr磷酸化的mRNA丰度和强度之间的确定系数( $R^2$ );图10B-10D是散点图,显示了对于来自图10A的6个细胞系(黑色点)来说,3个TK即ERBB2(图10B)、IGF1R/INSR(图10C)和DDR1(图10D)的相对mRNA丰度(基因表达)和活化环Tyr磷酸化之间的关系;

[0047] 图11A是这样的线图,其显示了相对于没有药物暴露,暴露于不同浓度的小分子的4个乳腺癌细胞系(MCF-7、BT-474、MDA-MD-231、SK-BR-3)的增殖,所述小分子抑制特定TK,即拉帕替尼(ErbB2抑制剂)、GSK1838705(IGF-1R抑制剂)和DDR1-IN-1(Ddr1抑制剂);图11B是柱状图,显示了相对于没有药物暴露,当MCF-7细胞暴露于400nM DDR-1N-1、400nM拉帕替尼或400nM这两种抑制剂时的增殖,其中\*指示统计上的显著差异( $p < 0.001$ ),并且各试验一式三份进行。图11C是柱状图,显示了相对于没有药物暴露,当与图11A相同的细胞系和细胞系MCF-10A暴露于200nM GSK1838705、400nM DDR-1N-1、400nM拉帕替尼或组合时的增殖,其中\*和\*\*指示统计上的显著差异(\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.0001$ ),并且各实验一式四份进行;在图11A-11C中,误差线指示1标准偏差;

[0048] 图12A和12B是线图,描述了来自曲妥珠单抗敏感克隆SK-BR-3细胞(图12A)和曲妥珠单抗耐受克隆SK-BR-3细胞(图12B)超结合体-MRM分析的总离子色谱(TIC)的质谱,其中峰值对应于鉴定的c-KIT RTK和ErbB2(HER-2) RTK的活化环中含pTyr的肽;图12C是线图,其描述了显示子离子(曲线图上的图)的MRM分析代表性示例的质谱,以及包含pY877的ErbB2(HER2)的活化环肽检测到的对应的子离子谱;

[0049] 图13A是柱状图,其显示了来自图12A的曲妥珠单抗敏感克隆(原始克隆)的SK-BR-3细胞和来自图12B的曲妥珠单抗亢龙的SK-BR-3细胞在没有暴露于曲妥珠单抗(蓝色柱)或暴露于4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曲妥珠单抗(橙色柱)48小时后的相对细胞增殖;图13B是柱状图,其显示了与图13A中相同的克隆暴露于0nM(浅蓝色)、200nM(橙色)、400nM(灰色)、800nM(黄色)、1600nM(深蓝色)或3200nM(绿色)伊马替尼48小时后的相对细胞增殖;图13C是柱状图,其显示了与图13A中相同的克隆暴露于无曲妥珠单抗(对照,蓝色)、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曲妥珠单抗(红色)、2 $\mu\text{M}$ 伊马替尼(绿色)或4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曲妥珠单抗和2 $\mu\text{M}$ 伊马替尼两者(紫色)4天后的相对细胞增殖;在图13C中,相较于单独暴露于各药物,将曲妥珠单抗耐性克隆暴露于两种药物导致统计学上显著增加的细胞增殖( $P < 0.01$ );在图13A、13B和13C中,误差线表示来自3次独立实验的标准偏差。

[0050] 图14A、14C和14D是线图,其各自描述了来自30 $\mu\text{g}$ 胰蛋白酶蛋白消化物的超结合体亲和力纯化(SAP)预定PRM分析的质谱;这3种蛋白质消化物来自3种速冻的、三阴性(ER-/PR-/HER2-)乳腺癌样品;内源性GSK3活化环中含pTyr的肽作为内部对照(GSK3 $\alpha$ 和GSK3 $\beta$ 具有相同的含pTyr的肽);图14B是与图14A相同的质谱,但是显示了较少活化的TK,其中将LMTK2和GSK3峰值去除,并且降低了y轴(大约对应于图14A方框中的区域);

[0051] 图15A是线图,其描述了来自30 $\mu\text{g}$ 胰蛋白酶蛋白消化物的超结合体亲和力纯化(SAP)的预定PRM分析的质谱,所述胰蛋白酶蛋白消化物是来自图14D的三阴性(ER-/PR-/HER2-)乳腺癌样品的胰蛋白酶蛋白消化物。图15B是线图,其描述了来自与用于获得图15A中谱图相同的6 $\mu\text{g}$ 胰蛋白酶蛋白质消化物的SAP-PRM分析的质谱;

[0052] 图16A和16B是线图,其各自描述了来自不同的2 $\mu\text{g}$ 等分胰蛋白酶蛋白质消化物的

SAP-PRM分析的质谱,所述胰蛋白酶蛋白质消化物来自SK-BR-3细胞;

[0053] 图17A是线图,其描述了来自90 $\mu$ g胰蛋白酶蛋白质消化物的超结合体亲和力纯化(SAP)的预定PRM分析的质谱;所述蛋白质分离自急性髓细胞样白血病(AML)患者的速冻外周血样品。图17B是来自正常个体的血液样品( $\sim$ 30 $\mu$ g胰蛋白酶蛋白质消化物)的SAP-PRM分析的质谱,使用与获得图17A相同的方法;

[0054] 图18A是描述由BPS生物科学公司(BPS Bioscience)(美国加利福尼亚州)研发的细胞系统测试PD-1/PD-1相互作用并表征PD-1或PD-L1抑制剂的作用的图表。图18B是这样的线图,其描述了来自50 $\mu$ g胰蛋白酶蛋白质消化物的超结合体亲和力纯化(SAP)的预定MRM分析的质谱;所述蛋白质消化物来自与表达PD-L1的CHO细胞共培养的表达PD-1的Jurkat T细胞。图18C是来自与图18B中相同的细胞的蛋白质消化物的质谱,但是用抗-PD-L1抗体过夜处理(BPS生物科学公司);

[0055] 图19A和19B是线图,其各自描述了来自福尔马林固定的、石蜡包埋的(FFPE)肿瘤活检物的超结合体亲和力纯化(SAP)的预定PRM分析的质谱;图19A来自非小细胞肺癌活检物,而图19B来自乳腺癌活检物;标记出对应于活性最高的激酶(即,FGFR1、GSK3、TXK)或浸润的T细胞(即,CD3 $\delta$ 、CD3 $\zeta$ )的峰;

[0056] 图20是线图,其描述了对来自酪氨酸激酶EPHA8活化环的含pTyr的蛋白质检测到的子离子的质谱。该谱在以预定PRM模式运行的Q-Exactive质谱仪上记录。将源自TK活化环的54个不同的含pTyr的肽(各自为10pmole)的混合物(表9)进行野生型SH2结构域或超结合体亲和力纯化(SAP),然后进行预定PRM分析。将相同摩尔量(10nmole)的野生型(wt)人Src SH2结构域和DM和TrM人Src SH2超结合体(分别为SEQ ID NO:14和5)用于由肽混合物捕获包括Tyr的肽。左侧,来自wt SH2结构域纯化的PRM谱图,其显示了对EPHA8 pTyr793没有信号;中间,获自DM人Src超结合体亲和力纯化的PRM谱图;右侧,获自TrM人Src超结合体亲和力纯化的PRM谱图。不同的线条表示由EPHA8 pTyr793肽产生的不同的子离子。

## 具体实施方式

[0057] 简言之,人们已经意识到在各种生物样品中,包括健康和患病人细胞和组织中,涉及蛋白质激酶活化和基于免疫受体pTyr的信号传导的蛋白质酪氨酸磷酸化,包括酪氨酸磷酸化,可以通过使用使用特定变体SH2结构域(本文称之为Superbinders,如本文所述)富集含pTyr的肽来进行概述。也已经发现SH2超结合体允许比较获自测试样品和各种对照的概况,并且允许确定测试样品内激酶活性的特定状态。这允许将这些方法用于各种不同应用中,包括疾病诊断和预后,在疾病途径中阐明激酶活化,包括与免疫信号传导相关的,以及TK抑制疗法的抗性或敏感性。

[0058] 源自Tyr位点的含pTyr的肽,如蛋白质激酶活化环中的那些或ITRM上的那些,可以在接触后结合至超结合体,并且可以将结合的肽移出样品中的大多数其他肽,进行鉴定,并且任选地进行定量,从而提供磷酸酪氨酸信号传导活性的概况,包括相对于样品中的ITRM,TK(和在其活性环中具有含pTyr的肽的其他激酶)和免疫受体的活性。

[0059] 本公开的方法在不同实施方式中允许从微小量的细胞、组织、活检或其他生物样本鉴定成百个pTyr位点,并任选地同时定量这类位点处的磷酸化发生率,因此能够在样品内系统性概述蛋白质酪氨酸磷酸化。这样的概述根据对样品中含pTyr肽的鉴定和任选的定

量,提供了鉴定的Tyr磷酸位点的磷酸化状态,并且因此可以用作以样品的pTyr信号传导模式和强度的指示,包括与样品内蛋白质激酶活性相关的酪氨酸磷酸化,以及与样品内ITRM介导的信号传导相关的酪氨酸磷酸化。这样的概述依赖于使用一个或多个SH2超结合体从样品分离一组包含pTyr的肽,相较于其他分离方法,由于SH2超结合体比亲本SH2结构对包含pTyr的肽增强的亲和力,使用一个或多个SH2超结合体的分离可以被增强。相较于独立评估样品中的一个或一小组磷蛋白的现有方法,所述方法提供了基于单次试验对存在于任何给定样品中的蛋白质酪氨酸磷酸化更全面的评估。

[0060] 因此,如本文将更详细地描述,当前考虑的是通过使用一个或多个SH2超结合体(包括诸如下述实施例中所述的那些)来富集源自生物样品中细胞或组织的含pTyr的肽,并且通过靶向的MS技术来鉴定和任选地定量含pTyr的肽(例如,来自TK活化环或ITRM),可以地对蛋白质酪氨酸磷酸化进行最好地概述。将可捕获的pTyr位点的富集以及通过质谱提供的鉴定和任选的定量有利地组合在一起可以允许本文所述的这些方法各种不同的用途和应用。

[0061] 如本文所使用,对蛋白质酪氨酸磷酸化进行概述表示在样品中鉴定和任选的定量一组含pTyr的蛋白。

[0062] 相似地,如本文所述,概况表示由对样品进行概述而获得的结果。因此,蛋白质酪氨酸磷酸化的概况表示由这类概述获得的结果。

[0063] 通过概述鉴定的一组含pTyr的肽可以包括可通过与超结合体结合并后续鉴定和任选的定量而检测的样品中所有含pTyr的肽,或者可以是所有这类可检测的含pTyr的肽的一些亚组。取决于概述所需的信息,源自一个或多个pTyr位点的一个或多个特定的含pTyr的肽可以是鉴定和任选的定量的关注焦点,例如,来自蛋白质激酶活化环中、免疫受体ITRM中或蛋白质酪氨酸磷酸酶调节区域中pTyr位点的一个或多个特定的含pTyr的肽。

[0064] 蛋白质酪氨酸磷酸化的概述可以包括蛋白质激酶活性的概述或免疫受体磷酸酪氨酸信号传导的概述,其根据鉴定的一组含pTyr的肽,以及与免疫受体ITRM内特定已知的含pTyr的肽或特定蛋白质激酶活化环和磷酸化靶标的相关性而进行。根据本公开的方法对蛋白质酪氨酸磷酸化进行概述的不同实施方式还在本文进一步描述。

[0065] 蛋白质酪氨酸磷酸化概况因此可以用作存在于样品中的激酶或其他pTyr信号传导活性(包括TK或免疫受体活性)的指标,并且可以进行蛋白质酪氨酸磷酸化的概述,例如,针对特定TK,磷酸酶或免疫受体,或一组TK、磷酸酶或免疫受体;针对具体条件,如特定药物或药物组合的治疗;或者用于在治疗过程中监控治疗。

[0066] 因此,蛋白质酪氨酸磷酸化的概述可以包括蛋白质激酶活性的概述。如本文所用,蛋白质酪氨酸激酶活性的概述表示通过对源自蛋白质激酶(包括来自激酶活化环内或外)的含pTyr的肽进行鉴定和任选的定量而在样品中鉴定一个或多个蛋白质激酶的活性。这类蛋白质激酶包括TK、STK或其他双特异性激酶,MAP激酶或脂质激酶。

[0067] 同样,蛋白质酪氨酸磷酸化的概述可以因此包括免疫受体磷酸酪氨酸信号传导的概述。如本文所用,免疫受体磷酸酪氨酸信号传导活性的概述或免疫概述表示通过对源自ITRM或其他免疫功能调节物的含pTyr的肽进行鉴定和任选的定量而在样品中鉴定一个或多个蛋白质免疫受体或其他免疫功能调节物的活性。免疫受体磷酸酪氨酸信号传导的概述可以通过鉴定和任选地定量含pTyr的肽进行,所述含pTyr的肽对应于ITAM、ITIM和ITSM序

列(例如,表2中所列出的那些)。免疫受体中存在的ITAM、ITIM或ITSM序列中酪氨酸残基的磷酸化是对应的免疫受体活化的指示,包括涉及经由ITAM序列的正免疫调节或经由ITIM序列的负免疫调节的免疫受体。ITAM、ITIM和ITSM序列可以在不同的免疫细胞中找到,包括B细胞、T细胞、自然杀伤细胞或巨噬细胞。

[0068] 表2:与人免疫受体相关的ITIM/ITAM/ITSM

序列	类型	UniProt 编号	Tyr 位置
PLDpYEFLATEG	ITAM	VSIG4_HUMAN	388
PLDpYEFLATEG	ITIM	VSIG4_HUMAN	388
NGNpYARLLDTV	ITAM	VSIG4_HUMAN	377
GQEpYQIIAQIN	ITAM	VSIG4_HUMAN	367
KTGpYLSIIMDP	ITSM	VGFR3_HUMAN	812
KTGpYLSIVMDP	ITSM	VGFR2_HUMAN	801
ASpYYPGVKIDE	ITIM	VGFR2_HUMAN	1106
ASepYKALMTEL	ITIM	VGFR1_HUMAN	872
KTDpYLSIIMDP	ITSM	VGFR1_HUMAN	794
GSPpYPGVQMDE	ITIM	VGFR1_HUMAN	1100
[0069] TSCpYCLLDPA	ITIM	UNC5D_HUMAN	658
LSTpYALVGHST	ITIM	UNC5C_HUMAN	667
HLYpYCQLEASA	ITIM	UNC5A_HUMAN	560
VVRpYRVRKSYS	ITIM	UFO_HUMAN	490
QTPpYAGIENAE	ITSM	TYRO3_HUMAN	733
ESPpYQELQGQR	ITAM	TYOBP_HUMAN	91
ESPpYQELQGQR	ITIM	TYOBP_HUMAN	91
SDVpYSDLNTQR	ITAM	TYOBP_HUMAN	102
LLQpYLSLPFFR	ITIM	TUTLA_HUMAN	926
PVTpYATVIFPG	ITIM	TRML1_HUMAN	281
RSRpYVRLRQRL	ITIM	TLR9_HUMAN	980
HSQpYLRLRQRI	ITIM	TLR8_HUMAN	989

	HLFpYWDVWFIY	ITIM	TLR8_HUMAN	853
	HVApYSQVFKET	ITIM	TLR7_HUMAN	1041
	ISFpYWNVSVHR	ITIM	TLR3_HUMAN	733
	PSSpYHKLKSLM	ITIM	TLR1_HUMAN	743
	YAPpYGNLLDFL	ITAM	TIE1_HUMAN	922
	PLSpYPVLEWED	ITIM	TIE1_HUMAN	831
	YSVpYSKLHPPA	ITAM	STAM2_HUMAN	374
	LELpYNKLVNEA	ITAM	STAM2_HUMAN	361
	YSMpYAKLQNQP	ITAM	STAM1_HUMAN	384
	LSLpYTKLMNED	ITAM	STAM1_HUMAN	371
	NTVpYSTVEIPK	ITSM	SLAF7_HUMAN	304
	NTEpYDTIPHTN	ITSM	SLAF7_HUMAN	284
	ITIpYSTINHSK	ITSM	SLAF6_HUMAN	308
	NTVpYASVTHSN	ITSM	SLAF6_HUMAN	284
[0070]	NLEpYVSVSPTN	ITIM	SLAF6_HUMAN	273
	NTVpYSEVQFAD	ITSM	SLAF5_HUMAN	316
	ITVpYASVTLPE	ITSM	SLAF1_HUMAN	327
	LTIpYAQVQKPG	ITSM	SLAF1_HUMAN	281
	PVKpYSEVVLDS	ITIM	SIT1_HUMAN	148
	DTEpYSEIKIHR	ITSM	SIGL9_HUMAN	456
	ELQpYASLSFQM	ITIM	SIGL9_HUMAN	433
	ELHpYATLSFHK	ITIM	SIGL8_HUMAN	447
	EIQpYAPLSFHK	ITIM	SIGL7_HUMAN	437
	DTEpYSEIKIHK	ITSM	SIGL6_HUMAN	435
	ELHpYAVLHFHK	ITIM	SIGL6_HUMAN	415
	TTEpYSEIKTSK	ITSM	SIGL5_HUMAN	544
	ELHpYASLSFSE	ITIM	SIGL5_HUMAN	520
	KVRpYRPVEGDP	ITIM	SIGIR_HUMAN	313
	EIQpYASLSFHK	ITIM	SIG12_HUMAN	565

	TTEpYSEIKIHT	ITSM	SIG11_HUMAN	656
	ELHpYASLSFQG	ITIM	SIG11_HUMAN	632
	ELHpYATLNFPG	ITIM	SIG10_HUMAN	667
	ILDpYINVVPTA	ITIM	SIG10_HUMAN	597
	FSEpYASVQVPR	ITIM	SHPS1_HUMAN	495
	HTEpYASIQTSP	ITSM	SHPS1_HUMAN	452
	DITpYADLNLPK	ITIM	SHPS1_HUMAN	428
	VLVpYDKLNVKI	ITIM	ROR2_HUMAN	624
	PVQpYNIVEQNK	ITIM	ROBO1_HUMAN	1114
	STVpYGDVDLSN	ITSM	ROBO1_HUMAN	1038
	HVSpYSAVSREN	ITIM	PVR_HUMAN	398
	VLEpYVDLGDLK	ITIM	PTK7_HUMAN	877
	GIVpYASLALSS	ITIM	PILRA_HUMAN	269
	EQFpYNAIKRGY	ITAM	PGFRB_HUMAN	914
[0071]	GTPpYPELPMNE	ITAM	PGFRB_HUMAN	904
	NSLpYTTLSDVW	ITIM	PGFRB_HUMAN	880
	VLSpYMDLVGFS	ITIM	PGFRB_HUMAN	797
	SVLpYTAVQPNE	ITIM	PGFRB_HUMAN	1009
	ETVpYSEVRKAV	ITSM	PECA1_HUMAN	713
	DVQpYTEVQVSS	ITIM	PECA1_HUMAN	690
	QTEpYATIVFPS	ITSM	PDCD1_HUMAN	248
	SVDpYGELDFQW	ITIM	PDCD1_HUMAN	223
	STDpYYRVGGHT	ITSM	NTRK2_HUMAN	706
	STDpYYRVGGRT	ITSM	NTRK1_HUMAN	680
	GVIpYSDLNLPP	ITIM	NKG2A_HUMAN	8
	TEVpYACIENED	ITAM	NFAM1_HUMAN	231
	ESVpYTALQRRE	ITAM	NFAM1_HUMAN	220
	ESVpYTALQRRE	ITIM	NFAM1_HUMAN	220
	EILpYHTVARTK	ITIM	NCTR2_HUMAN	259

	PVLpYAMLDHSR	ITIM	MYP0_HUMAN	220
	PVLpYAMLDHS	ITIM	MYP0_HUMAN	219
	PVIpYAQLDHS	ITIM	MPZL1_HUMAN	241
	MTPpYPGVQNHE	ITSM	MERTK_HUMAN	801
	YLLpYSRLETGP	ITIM	MERTK_HUMAN	685
	ATIpYCSIRKPQ	ITSM	LY9_HUMAN	626
	NTMpYAQVFNLQ	ITSM	LY9_HUMAN	603
	PSTpYAHLSPAK	ITIM	LSR_HUMAN	328
	QVPpYCNLQSLG	ITAM	LRC25_HUMAN	284
	YINpYKDIDLAS	ITAM	LRC25_HUMAN	273
	TVTpYVNLERLG	ITIM	LRC21_HUMAN	571
	PSIpYAPLAIH	ITIM	LIRB5_HUMAN	584
	DVTpYAQLHSFT	ITIM	LIRB4_HUMAN	412
	AVTpYAKVKHSR	ITIM	LIRB4_HUMAN	360
[0072]	AVTpYAPVKHSS	ITIM	LIRB3_HUMAN	543
	PSIpYATLAIH	ITIM	LIRB2_HUMAN	592
	ENLpYAAVKDTQ	ITIM	LIRB2_HUMAN	533
	DVTpYAQLHSLT	ITIM	LIRB1_HUMAN	614
	AVTpYAEVKHSR	ITIM	LIRB1_HUMAN	562
	DLApYQTLPLRA	ITIM	LIME1_HUMAN	235
	DVLpYSRVCKPK	ITIM	LIME1_HUMAN	200
	FVKpYATLISNS	ITIM	LEPR_HUMAN	986
	SIYpYLGVTSIK	ITIM	LEPR_HUMAN	1079
	QVPpYLRVTVM	ITIM	LAX1_HUMAN	71
	SSDpYENVLTAK	ITIM	LAX1_HUMAN	373
	VTSpYPPLSQPD	ITSM	LAT_HUMAN	71
	SITpYAAVARH	ITIM	LAIR1_HUMAN	281
	EVTpYAQLDHWA	ITIM	LAIR1_HUMAN	251
	ATApYGLIKSDA	ITSM	KIT_HUMAN	609

	SSGpYAQLNTYS	ITIM	KIRR1_HUMAN	647
	TSVpYTELPNAE	ITIM	KI3L2_HUMAN	428
	TILpYTELPNAK	ITIM	KI3L1_HUMAN	428
	EVTpYAQLDHCV	ITIM	KI2LB_HUMAN	298
	EVTpYAQLDHCI	ITIM	KI2L4_HUMAN	300
	EVTpYAQLNHCV	ITIM	KI2L3_HUMAN	303
	IIVpYAELPNAE	ITIM	KI2L2_HUMAN	332
	EVTpYTQLNHCV	ITIM	KI2L1_HUMAN	302
	YLSpYTKVDQDT	ITIM	IRPL2_HUMAN	408
	YLSpYTKVDPDQ	ITIM	IRPL1_HUMAN	411
	ESKpYVSLITSY	ITIM	INGR1_HUMAN	304
	TVQpYSTVVHSG	ITIM	IL6RB_HUMAN	759
	GIVpYSALTCHL	ITIM	IL4RA_HUMAN	713
	DSCpYDFLPIKA	ITIM	IL1R1_HUMAN	372
[0073]	LVQpYKAVKETK	ITIM	IL1AP_HUMAN	503
	VLFpYRHLTRRD	ITIM	IL18R_HUMAN	359
	ESTpYLPLTSMQ	ITIM	ICAM3_HUMAN	527
	SLLpYADLDHLA	ITIM	G6B_HUMAN	212
	VNPpYYPGIPVDA	ITAM	FLT3_HUMAN	889
	GSPpYPGVPVEE	ITIM	FGFR1_HUMAN	701
	GVVpYSVVHRTS	ITIM	FCRL6_HUMAN	371
	PIIpYSEVKVAS	ITIM	FCRL5_HUMAN	954
	NVVpYSEVRIIQ	ITIM	FCRL5_HUMAN	924
	DVVpYSQVWSMQ	ITIM	FCRL2_HUMAN	474
	TITpYSLLMHPD	ITIM	FCG2B_HUMAN	292
	KNIpYLTLPPND	ITAM	FCG2A_HUMAN	304
	DGGpYMTLNPR	ITAM	FCG2A_HUMAN	288
	QETpYETLKHEK	ITAM	FCERG_HUMAN	76
	DGVpYTGLSTRN	ITAM	FCERG_HUMAN	65

	SATpYSELEDPG	ITAM	FCERB_HUMAN	229
	DRVpYEELNIYS	ITAM	FCERB_HUMAN	219
	KLLpYEHVTEVD	ITIM	ERMAP_HUMAN	188
	HLKpYLYLVVSD	ITIM	EPOR_HUMAN	454
	KSDpYCNLPLYA	ITIM	DSCL1_HUMAN	1898
	SSTpYEELARAY	ITIM	DSCAM_HUMAN	1811
	TVHpYQSVSQAT	ITIM	DSCAM_HUMAN	1708
	KVPpYTPLLSQP	ITIM	DCC_HUMAN	1363
	CLPpYLGVSHQW	ITIM	CXCR6_HUMAN	311
	KTQpYNQVPSED	ITSM	CXAR_HUMAN	318
	QVLpYGQLLGSP	ITIM	CSF3R_HUMAN	752
	LNPpYPGILVNS	ITAM	CSF1R_HUMAN	856
	ELHpYASVVFDS	ITIM	CM35H_HUMAN	267
	EVEpYSTVASPR	ITIM	CM35H_HUMAN	255
[0074]	ELHpYANLELLM	ITIM	CM35H_HUMAN	231
	DISpYASLTLGA	ITIM	CLM1_HUMAN	249
	EDGpYTQLHFDS	ITAM	CLC7A_HUMAN	15
	EITpYAEVRFKN	ITIM	CLC4A_HUMAN	7
	ASIpYEELLKHD	ITIM	CEAM3_HUMAN	230
	EVTpYSTLNFEA	ITIM	CEAM1_HUMAN	493
	ESIpYEVLGMQQ	ITIM	CEA20_HUMAN	578
	SSGpYSHLHHKV	ITIM	CDON_HUMAN	1046
	MVDpYTTLSGAS	ITIM	CDON_HUMAN	1019
	TATpYEDIVTLR	ITAM	CD79B_HUMAN	207
	ENLpYEGLNLDD	ITAM	CD79A_HUMAN	191
	AITpYADLRFVK	ITIM	CD72_HUMAN	7
	EITpYENVQVPA	ITIM	CD72_HUMAN	39
	LSApYPALEGVL	ITIM	CD5_HUMAN	465
	ELKpYRVVSWFS	ITIM	CD47_HUMAN	131

	REEpYDVLDKRR	ITAM	CD3Z_HUMAN	83
	APApYQGGQNQL	ITAM	CD3Z_HUMAN	64
	KDTpYDALHMQA	ITAM	CD3Z_HUMAN	153
	DGLpYQGLSTAT	ITAM	CD3Z_HUMAN	142
	AEApYSEIGMKG	ITAM	CD3Z_HUMAN	123
	EGLpYNELQKDK	ITAM	CD3Z_HUMAN	111
	DDQpYSHLQGNQ	ITAM	CD3G_HUMAN	171
	DQLpYQPLKDRE	ITAM	CD3G_HUMAN	160
	RDLpYSGLNQRR	ITAM	CD3E_HUMAN	199
	NPDpYEPIRKGQ	ITAM	CD3E_HUMAN	188
	DQVpYQPLRDRD	ITAM	CD3D_HUMAN	149
	ELHpYASLNFGH	ITIM	CD33_HUMAN	340
	STIpYEVIGKSQ	ITSM	CD244_HUMAN	342
[0075]	YTLpYSLIQPSR	ITSM	CD244_HUMAN	317
	STIpYSMIQSQS	ITSM	CD244_HUMAN	297
	LTIpYEDVKDLK	ITSM	CD244_HUMAN	271
	GIHpYSELIQFG	ITIM	CD22_HUMAN	822
	TVTpYSALHKRQ	ITIM	CD22_HUMAN	796
	GISpYTTLRFPE	ITIM	CD22_HUMAN	762
	PSLpYAQVQKPP	ITIM	CADH6_HUMAN	685
	DVDpYDFLNDWG	ITIM	CADH5_HUMAN	755
	GCEpYFVLAPHR	ITAM	BTNL9_HUMAN	430
	EHLpYFTLNPRF	ITAM	BTNL8_HUMAN	388
	SLIpYTLLTCQF	ITIM	BTNL3_HUMAN	430
	PTEpYASICVRS	ITSM	BTLA_HUMAN	282
	GIVpYASLNHSV	ITIM	BTLA_HUMAN	257
	ISFpYNAVDGSH	ITIM	BT3A1_HUMAN	474

[0076] 本文所用术语“肽”或“多肽”定义为氨基酸残基链，其通过肽键结合并且通常具有限定序列。本文所用术语“肽”或“多肽”可以(但不必然)指不具有任何N末端和/或C末端氨基酸残基的氨基酸残基链。也就是，本文所用“肽”或“多肽”可以指嵌入更长氨基酸链的氨基酸链。本文所用术语“肽”包括术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”。

[0077] “含pTyr的肽”指如上所定义的肽，其中氨基酸残基中的一个为磷酸化的酪氨酸。“Tyr磷酸位点”指如酪氨酸激酶底物的肽内的酪氨酸残基，包括ITRM和酪氨酸激酶中的活化环Tyr残基，也就是激酶活性的靶标，并且其可以因此经磷酸化。蛋白质可以具有一个或多个Tyr磷酸位点。如本领域技术人员所知，Tyr磷酸位点的识别，以及因此样品中对应这类Tyr磷酸位点的含pTyr的肽的识别由侧接Tyr磷酸位点的氨基酸序列赋予。如本文所用术语，鉴定含pTyr的肽指鉴定一组含pTyr的肽所对应的独特的Tyr磷酸位点，而这可能包括使用靶向的MS技术。

[0078] SH2结构域是本领域已知并且结合含pTyr的肽的蛋白质结构域家族，并且具有已知的SH2结构折叠。如本文所用术语，SH2结构域指本领域技术人员鉴定或理解为SH2结构域的任何自然产生的或工程改造的多肽，包括与已知SH2结构域具有高度序列相似性或序列相同性的多肽。与已知SH2结构域的高度序列相同性可以是50%或更高、55%或更高、60%或更高、65%或更高、70%或更高、75%或更高、80%或更高、85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高或99%或更高。

[0079] 如本文所定义，变体SH2结构域是这样的SH2结构域，其基于已知SH2结构域的已知序列（也称之为针对特定变体SH2结构域的参照SH2结构域或亲本SH2结构域），但是相较于已知SH2结构域的已知序列，在SH2结构域内具有特定位置的取代。因此，变体SH2结构域在其序列中具有一个或多个这样的位置，相较于与变体SH2结构域不同的已知SH2结构域，所述位置中的氨基酸已经被不同的氨基酸取代。相应地，任何特定变体SH2结构域将相对于特定的已知SH2结构域限定，并且一个变体SH2结构域不必然与作为不同变体SH2结构域的相同的已知SH2结构域相关。

[0080] 亲本SH2结构域可以是在生物医学文献中鉴定为SH2结构域的任何多肽，其在进行取代之前的用作变体的起始序列。在一些实施方式中，亲本SH2结构域可以是自然产生的SH2结构域，包括天然产生的野生型SH2结构域。在一些实施方式中，亲本SH2结构域可以是具有经设计的序列（未知是否天然产生）的经工程改造的SH2结构域。

[0081] 变体SH2结构域可以具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个，或1个或多个、2个或多个、3个或多个、4个或多个、5个或多个、6个或多个、7个或多个、8个或多个、9个或多个或10个或多个与亲本SH2结构域不同的位置。氨基酸取代的位置可以出现在pTyr结合口袋、特异性结合口袋或SH2结构域的另一区域内。变体SH2结构域和与其不同的已知SH2结构域可以具有至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列相同性。

[0082] 变体SH2结构域包括三突变体、四突变体和如本文所定义的SH2超结合体。

[0083] 在pTyr结合口袋中3个特定氨基酸位置具有3个特定氨基酸取代的变体SH2结构域在本文被称为三突变型(TrM) SH2结构域。除了pTyr结合口袋内3个取代外，在特异性结合口袋内具有第4个氨基酸取代的变体SH2结构域被称为四突变型(QuadM)，例如，在人Src蛋白质的特异性结合口袋中具有额外的突变(Thr218Trp)的来自该人Src蛋白质的TrM SH2结构域变体在本文被称为QuadM Src SH2结构域。

[0084] 在一些实施方式中，变体SH2结构域可以是重组SH2结构域，其经设计以相对于其亲本结构域具有一组特定的氨基酸取代，并且使用例如遗传工程改造技术产生。

[0085] 因此,在该方法中,为了对样品内的蛋白质酪氨酸磷酸化进行概述,包括蛋白质激酶活性或免疫受体磷酸酪氨酸信号传导,将样品与变体SH2结构域接触,所述变体SH2结构域是SH2超结合体。

[0086] 样品可以是需要获得蛋白质酪氨酸磷酸化的概况的任何样品,所述蛋白质酪氨酸磷酸化的概况包括蛋白质激酶活性或免疫受体磷酸酪氨酸信号传导的概况。因此,样品可以是包含生物材料的任何样品,并且其包含或怀疑包含活性蛋白质激酶或由活性蛋白质激酶修饰的肽(如含pTyr的肽),包括在激酶(如激酶活化环)内,在磷酸酶调节区内,在ITRM内,和在激酶和磷酸酶下游靶标内。

[0087] 样品可以包括但不限于:建立的细胞系;细胞培养物,包括原代细胞培养物;生物流体,如血清、血浆、尿或血液;组织样品;或组织提取物。样品可以是人或非人源的,或者可以包含人或非人蛋白质激酶活性或人或非人的含pTyr的肽。

[0088] 样品可以是可以通过侵入性或非侵入性技术从对象获得的任何样品,所述对象可以是或可以不是人。这些样品可以通过本领域已知的任何标准方法获得,例如,手指棒血液样品,口腔拭子,活检物,包括来自肿瘤,胶带条等。样品可以是正常样品(例如,健康的或未患病的)或患病的样品(例如取自肿瘤或患有疾病的对象的样品,诸如癌症,包括阿尔茨海默病在内的脑疾病,病毒感染,或任何其他疾病,或怀疑患有此类疾病的对象的样品)。样品可以来自肿瘤的活检物,所述肿瘤包括可能怀疑已经从与活检部位不同的位置转移的肿瘤。

[0089] 样品可以是已经暴露于疾病的药物治疗的样品,包括组合药物治疗,包括暴露于一种或多种激酶抑制剂或磷酸酶抑制剂,或者可以不暴露于这种治疗。

[0090] 在接触之前,可以处理样品,从而增加SH2超结合体与样品内任何含pTyr的肽的结合。可以处理样品以裂解样品中包含的细胞,并且以其他方式在该方法期间保留含pTyr的肽。通过以信号传导分子的活化或抑制来扰乱样品,包括例如PDL1、CD28或TCR刺激。

[0091] 例如,可以用一种或多种蛋白酶处理样品,从而消化全长蛋白质以产生较短的含pTyr的肽,例如,以肽链内切酶如胰蛋白酶处理。如果需要,在将处理的样品与SH2超结合体接触之前,可以抑制或灭活蛋白酶。

[0092] 在另一实施方式中,可以用磷酸酶抑制剂处理样品,从而在与SH2超结合体接触之前,防止含pTyr的肽内的pTyr降解。

[0093] 为了进行概述,样品与SH2超结合体接触。

[0094] 因此,术语SH2超结合体或超结合体指在pTyr结合口袋中包括一个或多个氨基酸取代的变体SH2结构域,其中取代导致SH2超结合体相较于亲本SH2结构域,具有对pTyr残基或位于含pTyr的肽内的pTyr残基增加的亲和力,所述亲本SH2结构域与SH2超结合体不同并且不具有这样的取代。通常,SH2超结合体的亲和力相对于亲本SH2结构域增加约10倍或更多倍,包括约20倍或更多倍、约30倍或更多倍、约40倍或更多倍、约50倍或更多倍、约100倍或更多倍、约200倍或更多倍、约300倍或更多倍或约500倍或更多倍。

[0095] 相较于有关的亲本SH2结构域的亲和力,使用本领域已知的结合试验,包括Kaneko, T.等,“SH2超结合体作为细胞信号传导的拮抗剂(SH2 Superbinders act as antagonists of cell signaling)”,(2012) Sci.Signal.5:ra68;和美国专利申请号14/388,592所述内容,可以容易地评估变体SH2结构域(包括SH2超结合体)的相对亲和力。

[0096] SH2超结合体包括来自人蛋白质Src、Grb2和Fyn的单、双、三或四突变型SH2结构域。例如,下述是SH2超结合体:(i)在Thr183Val(位置1)、Cys188Ala(位置2)和/或Lys206Leu(位置3)处具有取代的TrM人Src SH2结构域变体(氨基酸序号是相对于SEQ ID NO:1提供的全长野生型人Src蛋白质);(ii)在上述所有3个位置处具有取代的TrM人Src SH2结构域变体;(iii)在Ala91Val(位置1)、Ser96Ala(位置2)和/或Lys109Leu(位置3)处具有取代的人Grb2SH2结构域变体(氨基酸序号是相对于SEQ ID NO:2提供的全长野生型人Grb2蛋白质);(iv)在上述所有3个位置处具有取代的TrM人Grb2SH2结构域变体;(v)在Thr181Val(位置1)、Ser186Ala(位置2)和/或Lys204Leu(位置3)处具有取代的人Fyn SH2结构域变体(氨基酸序号是相对于SEQ ID NO:3提供的全长野生型人Fyn蛋白质);和(vi)在上述所有3个位置处具有取代的人Fyn SH2结构域变体。先前已经证明所有这些变体SH2结构域相对于亲本SH2结构域对含pTyr的肽具有增强的亲和力。

[0097] SH2超结合体可以还包括任何其他亲本SH2结构域的TrM变体,这表明在位置1到3的TrM SH2结构域具有与存在于位置1到3的TrM人Src SH2结构域中氨基酸相同的氨基酸,并且通过比对亲本SH2结构域和野生型人Src SH2结构域的序列可以发现位置1到3。由于SH2结构域家族的结构是保守的,可以预期的是在其他SH2结构域的同源位置中进行相同的3个取代也将显著地增强它们对于含pTyr的肽的亲和力。

[0098] 具体地,SH2超结合体可以包括TrM变体,其中亲本SH2结构域是自然产生的肽,如通过人基因组编码的肽,并且产生的SH2超结合体对自然产生的肽具有高度的序列相似性或序列相同性。对自然产生的亲本序列的高度序列相似性或序列相同性可以是50%或更高、60%或更高、70%或更高、75%或更高、80%或更高、85%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高或99%或更高。

[0099] SH2超结合体可以基于pTyr结合口袋内的单个、两个、三个取代,包括TrM变体,但是可以还包括一个或多个其他取代,包括pTyr结合口袋外的取代,其中相较于没有这类其他取代的SH2超结合体变体增强的亲和力,其他取代可以或不具有对含pTyr的肽结合亲和力的任何作用。除了限定SH2超结合体的取代,例如,pTyr结合口袋中的取代,以及在QuadM情况中,特异性结合口袋中的其他取代,相对于亲本SH2结构域以及限定SH2超结合体的取代,超结合体可以具有额外的一个或多个、两个或多个、三个或多个、四个或多个、五个或多个、六个或多个、七个或多个、八个或多个、九个或多个或十个或多个氨基酸取代。

[0100] 也就是,例如,SH2超结合体可以是具有限定TrM SH2超结合体的3个取代的变体SH2结构域,并且相较于亲本,其可以对含pTyr的肽具有至少与TrM SH2超结合体相同的增加的亲和力,并且可以相对于亲本SH2结构域除了限定TrM变体SH2超结合体的3个取代外,还包括额外的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方式中,相较于没有这类取代的TrM变体,这类额外的取代可以降低TrM变体SH2超结合体的亲和力,但是相较于本文所限定的亲本SH2结构,仍然产生具有增加的pTyr结合亲和力的SH2超结合体。

[0101] 因此,SH2超结合体可以包括pTyr结合口袋中的3个限定的取代(即,TrM的)或由其组成或基本上由其组成,或可以包括pTyr结合口袋中(即,QuadM)的3个限定的取代和特异性结合口袋中的1个限定的取代或由其组成或基本上由其组成。如本文所用,基本上由...组成表示超结合体除了限定的3或4个取代以外,相对于亲本SH2结构域,可以具有一个或多

个、两个或多个、三个或多个、四个或多个、五个或多个、六个或多个、七个或多个、八个或多个、九个或多个、十个或多个,或1-10个,或1-5个额外的氨基酸取代,这些额外的取代中的任一个可以在pTyr结合口袋、特异性结合口袋或SH2结构域的其他区域内,前提是相较于亲本SH2结构域,额外的氨基酸取代不影响超结合体的亲和力增加并且相对亲本的序列相同性百分比是至少约30%。

[0102] SH2超结合体可以包含下述序列或由下述序列组成,所述序列示于SEQ ID NO:5、7、9、12或14。

[0103] SH2超结合体可以包括美国专利申请号14/388,592中所鉴定的其他变体SH2结构域,所述美国专利申请通过引用全部纳入本文。

[0104] 还可以通过本领域技术人员已知的方法发现在亲本SH2结构域中产生对应的SH2超结合体的取代,包括通过噬菌体展示筛选通过随机取代15个氨基酸残基中一个或多个产生的变体SH2结构域文库,所述氨基酸残基在亲本SH2结构域中与20个自然产生的氨基酸中的一个形成pTyr结合口袋,如美国专利申请号14/388,592中所述。

[0105] 可以通过比较各氨基酸残基序列中的位置来确定肽之间的序列相同性,所述各氨基酸残基序列已经进行比对用于比较目的。序列之间的序列相同性是在比对中序列共有的匹配位置的比例。本领域技术人员应当理解的是,可以通过已知的、标准的算法比对两个或多个氨基酸序列,所述算法寻求使氨基酸相同性和/或相似性方面最大化以实现最佳或优选的比对。

[0106] 应当意识到的是,SH2超结合体的亲本SH2结构域可以是这样的SH2结构域,其来自人类以外的真核生物(包括哺乳动物),来自病毒,来自以及人造的序列。

[0107] 作为来自其他真核生物的亲本SH2结构域的示例,亲本SH2结构域可以是蛋白质的部分,其是人Src蛋白(SEQ ID NO:1)、人Grb2蛋白(SEQ ID NO:2)、人Fyn蛋白(SEQ ID NO:3)或包括在生物医学文献中鉴定的SH2结构域的任何其他的人蛋白质的同源物,其中该同源物由任何真核生物、动物或哺乳动物的基因或基因组编码。应当意识并理解的是,亲本SH2结构域不必是由自然存在的基因或基因组编码的,但可以包括具有氨基酸取代的SH2结构域,所述氨基酸取代不影响对含pTyr的肽的亲和力。

[0108] 作为来自病毒的亲本SH2结构域的示例,亲本SH2结构域可以是v-Src,其由劳氏肉瘤病毒编码,其是人Src的病毒同源物。

[0109] 作为人造的序列的亲本SH2结构域的示例,本领域技术人员应当意识到的是,人们可以通过将一个或多个哺乳动物SH2结构域序列的序列进行组合来设计SH2结构域序列,其可以代表共有或典型的SH2结构域序列,但不会与任何哺乳动物SH2相同。

[0110] 同样应当意识并理解的是,SH2超结合体可以是较大肽的部分,所述较大肽包括形成亲和力标签的氨基酸,如六聚组氨酸(His<sub>6</sub>)标签,谷胱甘肽-S-转移酶(GST)标签,FLAG标签等。例如,SH2超结合体可以包含或可以由SEQ ID NO:11或13中所示序列组成。

[0111] 超过一个SH2超结合体可以用于接触样品,并且因此进行概述。本领域技术人员应当意识到的是,将超过一个SH2超结合体在该方法中用作对含pTyr的肽的亲和力试剂可允许更好的Tyr磷酸化蛋白质组覆盖,其通过降低或消除可能由于个体SH2超结合体的序列特异性而导致的富集的含pTyr的肽群中的任何偏差来实现。

[0112] 相似地,SH2超结合体可以具有特异性口袋中氨基酸的取代,这可以减少、消除或

改变对配体肽中C末端残基的序列特异性。一个示例是前述的QuadM Src SH2结构域变体，如在实施例中进行进一步描述。

[0113] 或者，可以设计蛋白质以包含多个SH2结构域，其中，它们中的至少之一是SH2超结合体。例如，可以设计并产生包含多个SH2超结合体的蛋白质，多个SH2超结合体各自靶向不同的含pTyr的肽。在多SH2结构域构建体中使用SH2超结合体可以进一步增加对特定靶蛋白质的结合亲和力，包括在单个多肽分子中包含多个pTyr残基的靶蛋白质。在这类构建体中，SH2结构域可以通过柔性接头连接，所述接头优选包含甘氨酸的多肽。接头长度和组合物的变化可以调节多SH2结构域蛋白质的结合亲和力。多SH2结构域蛋白质可以具有对多pTyr区域增加的亲和力，如对单个蛋白的基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 基序。多SH2结构域蛋白质还可以用于通过靶蛋白质中的pTyr位点桥接多个蛋白质。因此，本公开的方法包括所有这样的包含多个SH2结构域的新型蛋白质，其中至少一个是超结合体。

[0114] 还可以设计蛋白质以包括一个或多个SH2超结合体和其他模块蛋白结构域，如其他含pTyr的结构域 (例如，PTB结构域)、pSer/pThr结合结构域 (例如，某些14-3-3和WD40结构域) 和泛素结合结构域。本公开的方法因此包括所有这些新型蛋白质。

[0115] 因此，SH2超结合体可以包含或可以由SEQ ID NO:15中所示序列组成。

[0116] 可以通过肽合成领域中任何已知的方法合成本公开的SH2超结合体，包括固相合成 (Merrifield, J. Am. Chem. Assoc. 65:2149 (1964); J. Amer. Chem. Soc. 85:2149 (1963); 和 Int. J. Peptide Protein Res. 35:161-214 (1990)) 或在均匀溶液中合成 (Methods of Organic Chemistry, E. Wansch (Ed.), 第15卷, 部分I和II, 蒂米, 斯图加特 (1987)) 以生成合成的肽。

[0117] 或者，更简单的，本公开的变体SH2结构域可以标准的重组DNA技术产生。例如，可以用编码亲和力标签标记的SH2超结合体的质粒转化大肠杆菌，可以诱导SH2超结合体的高表达，并且SH2超结合体可以用对应于亲和力标签的亲和力试剂由大肠杆菌细胞裂解物纯化。

[0118] 在该方法中，为了获得概况，SH2超结合体与样品接触。

[0119] SH2超结合体可以与样品以饱和量或浓度接触或以低于饱和量或浓度接触。

[0120] 本领域技术人员将理解的是，SH2超结合体的饱和量或浓度指在与含pTyr的肽发生结合反应的溶液体积内SH2超结合体的最低量，在该量下富集最大或接近最大数量的含pTyr的肽，如之后通过这些肽的鉴定和定量而确定。也就是，因为结合反应中SH2超结合体的量增加，能够预期的是，通过SH2超结合体结合的含pTyr的肽的数量 (并且后来经鉴定和定量) 将会增加，直到所有或几乎所有能够通过SH2超结合体结合的含pTyr的肽如此结合的点。在该点处，SH2超结合体的量被称为饱和的。将进一步意识到的是，比饱和量或浓度高的任何量的SH2超结合体也是饱和量或浓度。

[0121] 本领域普通技术人员使用常规实验室方法可以容易地确定给定试验的饱和量或浓度，所述方法包括对已知量的某些样品类型采用使用增加浓度的SH2超结合体的标准结合曲线。

[0122] 将样品与SH2超结合体接触之后，该方法包括将现在与SH2超结合体结合的任何含pTyr的肽从样品移出或分离，然后鉴定因此由样品移出的含pTyr的肽。

[0123] 因此，在该方法中，纯化的SH2超结合体可以用于分离样品中包含的含pTyr的肽，

用于鉴定,从而富集包含pTyr的肽的部分。可以使用本领域技术人员所熟知的技术进行分离,包括例如液相色谱方法,包括高效或超高效液相色谱,免疫沉淀方法,尺寸排阻方法和质谱。

[0124] 为了便于从剩余的样品内容物分离,可以将SH2超结合体固定在固体支持物上,以协助从样品中分离和鉴定含pTyr的肽。

[0125] 本文所用术语“固体支持物”、“基质”和“树脂”指代并且包括能够结合本文所公开的亲和力试剂的任何支持物。熟知的支持物或运载体包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、琼脂糖、聚丙烯酰胺和磁铁矿。支持物材料实际上可以具有任何结构构造,只要偶联的亲和力试剂能够结合肽和/或蛋白质。因此,支持物构造可以是球形的,如珠,或圆柱形,如在试管的内表面中,或杆的外表面。或者,该表面可以是平面,例如片层,测试条等。固体支持物可以是琼脂糖或聚苯乙烯珠。本领域技术人员将知晓用于结合亲和力试剂的许多其它合适的运载体,或将能够采用常规实验确定此类载体。

[0126] 例如,共价地(例如,经由铰链或直接偶联)或非共价地(例如,经由亲和力标签)结合固体支持物的SH2超结合体可与肽的混合物接触,所述肽获自生物样品并且已经溶解于合适的缓冲溶液中。尽管预期SH2超结合体可以结合全长蛋白质,但是可能需要在超结合体富集之前,用内肽酶(例如,胰蛋白酶)消化来自生物样品的蛋白质。一旦含pTyr的肽与SH2超结合体结合,将固体支持物由肽溶液移出,用适当洗涤溶液洗涤一次或多次。然后将与SH2超结合体保持结合的含pTyr的肽洗脱,从超结合体分离,并任选地使用另一亲和力试剂(例如,IMAC)进一步富集。将意识到的是,对于结合、洗涤和洗脱步骤,与固体支持物结合的SH2超结合体可以在柱中。或者,固体支持物可以不存在于各种溶液中,并且可以通过离心分离,例如,在洗涤和洗脱步骤期间。

[0127] 一旦从剩余样品经由与SH2超结合体结合而分离,可以用本领域已知的任何方法鉴定并且任选地定量含pTyr的肽,其中方法可以包括适当类型的质谱,其可以在一维(1D)或二维(2D)液相色谱(LC)之前。

[0128] 部分地取决于待鉴定以及任选地待定量的一组pTyr结合肽,可以选择鉴定技术。

[0129] 例如,概述质谱技术可以用于鉴定以及任选地定量一组广泛的pTyr结合的肽,包括包含来自样品的所有或基本上所有可检测的pTyr结合肽的一组。

[0130] 在另一示例中,靶向的质谱技术可以用于鉴定和任选地定量具体的一组pTyr结合肽,包括包含来自样品的所有可检测的pTyr结合肽的限定亚组的一组,例如,靶向来自一个或多个具体激酶的pTyr结合肽的一组,包括活化环内或活化环外的pTyr结合肽,包括正调节区或负调节区。该组可以包括来自一个或多个免疫受体的含pTyr的肽,所述一个或多个免疫受体包括一个或多个ITRM,例如来自ITIM,和ITAM或ITSM。该组可以包括来自一个或多个特定蛋白质酪氨酸磷酸酶的含pTyr的肽,包括来自调节区的含pTyr的肽,所述调节区包括正调节区或负调节区。该组可以包括来自激酶的一个或多个下游靶标底物的含pTyr的肽,或蛋白质酪氨酸磷酸酶的一个或多个下游靶标底物。

[0131] 该组可以包括与对给定药物治疗的阳性或阴性反应相关或在已知将被药物治疗抑制的激酶内的含pTyr的肽。该组可以包括与信号传导通路相关的含pTyr的肽。

[0132] 该组可以包括来自细胞或组织标记物的含pTyr的肽,以允许鉴定产生样品中细胞

的特定细胞或组织类型。例如,含pTyr的肽可以来自对应活检物位点的细胞或组织类型,或可以来自与转移性癌症相关细胞或组织类型,例如,乳腺、脑或肺组织。含pTyr的肽可以与一个或多个免疫细胞类型相关联,包括B细胞、T细胞、自然杀伤细胞或巨噬细胞。

[0133] 因此,如下所述,所述方法可以经进一步定制或自定义,包括关于各种所述参数的选择。

[0134] 本领域已知各种质谱 (MS) 技术,参见例如Mann等,Ann.Rev.Biochem., (2001) 70: 437-473;Wissing等,Mol.Cell.Proteomics, (2007) 6:537-547。MS技术的示例包括:串联MS (MS/MS) (Gerber等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., (2003) 100:6940-6945;WO 2006/134056);多重反应监测 (MRM) (Hardt等,2008Thermo Scientific Application note:451, (2008);Kuhn等,Proteomics, (2004) 4:1175-1186);平行反应监测 (Peterson等, Mol.Cell.Proteomics, (2012) 11:1475-1488);以细胞培养物中氨基酸的稳定同位素标记 (SILAC) (US 2010/0279891;Daub等, Mol. Cell, (2008) 31:438-448; Ong等, Mol.Cell.Proteomics, (2002) 1:376-386);超SILAC, SILAC的渗入 (spike-in) 混合物 (Geiger等, Nat.Meth., (2010) 7:383-387;Geiger等, Nat.Prot. (2011) 6:147-157;和磷酸肽的二氧化钛富集 (Thingholm等, Nat.Prot. (2006) 1:1929-1935)。

[0135] 使用MS,磷酸化的相对定量可以通过确定峰体积通过无标记定量单个含pTyr的肽来获得。这样的定量可以还包括比较组成性磷酸化的含pTyr的肽,如GSK-3 $\beta$ 活化环内的位点Tyr216 (Cole, A.等,“进一步证明哺乳动物细胞中糖原合成酶激酶-3 (GSK3) 的酪氨酸磷酸化是一种自身磷酸化事件 (Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event)”, (2004) Biochem.J. 377:249-255;Hughes, K.等,“通过酪氨酸磷酸化调节糖原合成酶激酶-3家族 (Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation)”, (1993) EMBO J. 12:803-808)。此外,通过将代表感兴趣磷酸肽的预定量的稳定同位素标记的肽渗入MS样品,可以实现绝对定量 (Gillette, M.A.和Carr, S.A.,“生物医学中通过靶向的质谱的肽和蛋白质的定量分析 (Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry)”, (2013) Nat.Methods 10,28-34)。

[0136] 具体地,可以使用靶向的MS技术如MRM、SRM或平行反应监测 (PRM) (Liebler, D.C.和Zimmerman, L.J.,“通过质谱蛋白质的靶向的定量 (Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry)”, (2013) Biochemistry 52:3797-3806)。MRM使用子离子预定列表以检测亲本肽。MRM比鸟枪LC-MS/MS方法更加敏感1-2个数量级 (Picotti P.和 Aebersold R.,“基于蛋白质组学的选择反应监测:工作流程、潜能、误区和未来方向 (Selected reaction monitoring-based proteomics:workflows,potential,pitfalls and future directions)”, (2012) Nat.Methods 9:555-566;Liu H.等,“用于系统性映射蛋白质赖氨酸甲基化的方法鉴定HP1 $\beta$ 在DNA损失响应中的功能 (A method for systematic mapping of protein lysine methylation identifies functions for HP1beta in DNA damage response)”, (2013) Mol.Cell 50:723-735)。

[0137] 除了待进行概述的样品,可以使用对照或比较性样品进行该方法,并且获自测试样品的概况可以与获自对照或比较性样品的概况进行比较。与标准实验室方法一致,对照

或比较性样品可以设计成给定测试样品的任何适当阳性或阴性对照。

[0138] 例如,对照或比较性样品可以是这样的样品,其获自健康个体或已知不存在待监测疾病的细胞,或者获自己知具有具体疾病或显示出与具体疾病或紊乱相关的表型的来源。对照样品可以来自特定细胞或组织类型。对照或比较性样品可以是这样的样品,其已经或者尚未暴露于药物或治疗方案或激酶或磷酸酶抑制剂,而测试样品可以具有与对照相同或相反的治疗状态。可以在治疗方案期间不同的时间由与测试样品相同的来源或对象获得比较性或对照样品。比较性或对照样品可以具有对一种或多种具体激酶或蛋白质酪氨酸磷酸酶已知激酶上调或下调,例如,可以是来自己知具有对具体激酶突变的或已知转基因表达具体激酶的细胞的样品。

[0139] SH2超结合体的结合亲和力可以与选定的鉴定技术和具体样品类型组合,以允许将本公开的方法用于各种不同的引用或分析。例如,如本文所述,通过具体选择下述内容,概述可以各不相同:使用的测试样品和/或对照样品的类型,包括在用于本方法之前,测试样品和/或对照样品已经暴露的条件,使用的具体鉴定和任选的定量技术,和待鉴定的具体组的含pTyr的肽。改变这些参数可以导致不同的概述,适合不同的应用或分析。所有的这些变化和实施方式都包括在本公开的范围之内。

[0140] 因此,使用本文所述方法在样品内进行磷酸酪氨酸信号传导的概述可以提供对任何细胞状态的进一步理解,包括任何疾病状态。考虑到TK在人癌症中的重要性,以及肿瘤对治疗的反应,包括TK靶向的治疗和免疫治疗,本公开的方法可以在人癌症的研究、诊断、预后和疗法中特别有用。

[0141] 本公开方法的下述变化为示例性的。

[0142] 该方法可以是一种对测试样品的蛋白质酪氨酸磷酸化进行概述的方法,所述方法包括:将测试样品与饱和量的SH2超结合体接触,从而将测试样品中包含的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从测试样品分离;和使用概述MS技术鉴定并任选地定量分离的含pTyr的肽,从而鉴定并任选地定量在分离的部分中可检测的所有或基本上所有含pTyr的肽。

[0143] 该方法可以是一种对测试样品的蛋白质酪氨酸磷酸化的一个亚组进行概述的方法,所述方法包括:将测试样品与SH2超结合体接触,从而将测试样品中包含的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从测试样品分离;和使用靶向MS技术鉴定并任选地定量分离的含pTyr的肽,从而鉴定并任选地定量在分离的部分中可检测的含pTyr的肽的亚组。该亚组可以包括例如来自一个或多个激酶活化环、一个或多个ITRM或蛋白质酪氨酸磷酸酶的一个或多个调节区的含pTyr的肽。接触可以包括使用饱和量的或低于饱和量的SH2超结合体。MS技术可以包括PRM、SRM和/或MRM MS技术。测试样品可以来自健康细胞或组织的来源,或疾病细胞或组织的来源,包括已知具有或涉及癌症、阿尔茨海默病或将用病毒感染的细胞或组织。

[0144] 通过将鉴定和任选地定量的含pTyr的肽的组聚焦于位于激酶(包括TK、STK、双特异性激酶、MAP激酶和脂质激酶)活化环内的那些,有可能因此对样品内的激酶活性进行概述。

[0145] 例如,概述TK活性可以鉴定驱动癌症细胞增殖、扩散或抗药性的TK。这类癌症驱动剂反过来可以被证明是药物干预有效的靶标。这类概述可以提供特定优势,作为降低或避

免对癌症治疗抗性的方法。尽管TK靶向的治疗常常展现出对患者短期的益处,但是抗性可以快速地出现。抗性的机制各不相同,但是活化非靶向的酪氨酸激酶对于传统的治疗和TK靶向的治疗是常见原因 (Holohan, C. 等, “癌症耐药性: 演化范式 (Cancer drug resistance: an evolving paradigm)”, (2013) *Nature Reviews Cancer* 13:714-726)。通常, 异常的酪氨酸激酶仅有MAPK和PI3K信号传导途径刺激细胞增殖和永生性, 这是许多 (如果不是全部) 癌症细胞的重要特性。

[0146] 对于传统癌症治疗, 如抗代谢物和拓扑异构酶抑制剂, ErbB2受体酪氨酸激酶的活性增加可能是抗性的原因 (Hurwitz, J.L. 等, “恶性间皮瘤细胞中伏立诺他/SAHA诱导的凋亡是FLIP/半胱天冬酶8依赖性和HR23B非依赖性的 (Vorinostat/SAHA-induced apoptosis in malignant mesothelioma is FLIP/caspase 8-dependent and HR23B-independent)” (2012) *Eur. J. Cancer* 48:1096-1107; Wilson, T.R. 等, “非小细胞肺癌中前体半胱天冬酶8促进通过FLIP沉默诱导的细胞凋亡 (Procaspase 8 overexpression in non-small-cell lung cancer promotes apoptosis induced by FLIP silencing)” (2009) *Cell Death Differ.* 16:1352-1361)。

[0147] 当特异性地靶向TK时, 由于酪氨酸激酶中的功能冗余和交叉活化, 抗药性更常见。作为一个示例, 诊断为ErbB2过度活化的HER2致癌基因占上至30%的所有乳腺癌 (Slamon, D.J. 等, “人乳腺癌: HER-2/neu致癌基因的扩增与复发和存活的关联 (Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene)”, (1987) *Science* 235:182-191)。曲妥单抗 (trastuzumab) (赫塞汀 (Herceptin)®) 是对于这种癌症类型首个批准的靶向治疗。然而, 大约70%患有HER2阳性乳腺癌的患者具有固有抗性并且并不响应曲妥单抗 (Vogel, C.L. 等, “曲妥单抗作为HER2过表达转移性乳腺癌一线治疗的单一试剂的效力和安全性 (Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer)”, (2002) *Journal of Clinical Oncology* 20:719-726)。此外, 多达70%最初响应曲妥单抗的患者在治疗一年内遭受疾病复发 (Gajria, D. 和 Chandarlapaty, S., “HER2扩增的乳腺癌: 新型靶向治疗和曲妥单抗抗性的机制 (HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies)”, (2011) *Expert Rev. Anticancer Ther.* 11:263-275), 这表明快速进展的获得性抗性。

[0148] 鉴于获得性抗性的问题, TK活性的系统评估对于理解抗性机制和设计组合治疗以克服抗性是重要的。这种方法有可能在肿瘤复发之前很好地预测抗性, 以确定癌症预后并改善治疗方案的有效性。

[0149] 对蛋白质激酶活性或免疫信号传导活性进行概述可以用于测量, 并且促进免疫细胞功能的新型分析的潜在发展。

[0150] 这类概述还可以为靶向或免疫治疗的患者分群提供有用的信息。例如, 活化的TK的存在可以用作利用靶向该TK的治疗的生物标记物; 可以通过使用SAP-MRM或SAP-PRM方法鉴定T细胞受体或T细胞信号传导的其他调节物CD3亚基的磷酸化来检测浸润T细胞的存在, 浸润T细胞的存在将表明对旨在增加T细胞活性的免疫疗法的有利响应。

[0151] 作为一个示例, 本公开的实施方式可以用于预测和监测涉及程序性细胞死亡蛋白

质1 (PD-1) 和其配体PD-L1的治疗的反应。与PD-1的配体结合 (PD-L1) 导致后者在ITIM和ITSM Tyr残基上的磷酸化,其继而招募包含SH2结构域的磷酸酶2 (SHP2) 以使TK ZAP-70去磷酸化,导致T细胞失活。用单克隆抗体阻断PD-1将逆转这一过程,表现为PD-1中ITIM和ITSM Tyr的磷酸化减少,以及ZAP-70和TCR共受体活化环的磷酸化增加。通过针肿瘤活检物或通过收集循环的T细胞来监测PD-1的ITIM和ITSM、TCR共受体的ITAM序列和ZAP-70活化环的Tyr磷酸化可以用于:(i) 评估抗-PD-1抗体疗法的效力(例如,PD-1ITSM/ITIM磷酸化减少和TCR/ZAP-70磷酸化增加);(ii) 预测患者对抗-PD-1抗体疗法的反应,并且在观察到表型反应之前很久就有可能对患者进行分层。这些方法和相关方法可以还涉及监测通过JAK1/STAT途径的细胞因子信号传导,如通过对JAK1/2/3、TYK1/2和STAT1/2/3Tyr磷酸化进行定量。

[0152] 因此,如上所述,概述可以涉及蛋白质激酶活性的概述。这类实施方式可以包括鉴定和任选的定量来自一种或多种激酶的含pTyr的肽,包括来自一种或多种激酶的激酶活化环或激酶活化环外的含pTyr的肽,包括来自已知涉及疾病(如癌症)生发或进展的一种或多种激酶的含pTyr的肽。在一些实施方式中,使用的样品可以来自暴露于具体疾病(包括例如癌症)的药物治疗方案的来源或样品,或者可以来自怀疑患有或者涉及具体疾病或紊乱(包括癌症)或已知患有或涉及具体疾病(包括癌症)的来源或样品。癌症可以是任何类型的癌症,包括例如乳腺癌、肺癌、前列腺癌或白血病。可以对取自药物治疗之前和之后的样品进行概述并且比较概况,以确定样品内激酶对使用的药物的敏感性或抗性。

[0153] 因此,该方法可以是一种对测试样品的酪氨酸激酶活性进行概述的方法,所述方法包括:将测试样品与SH2超结合体接触,从而使包含于测试样品的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从测试样品分离;和使用靶向MS技术鉴定并任选地定量从测试样品分离的含pTyr的肽,所述靶向MS技术可以包括PRM、SRM和/或MRM MS,从而鉴定酪氨酸激酶的激酶活化环内含pTyr的肽。该方法可以还包括将对照样品与SH2超结合体接触,从而使包含于对照样品中的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从对照样品分离;和使用靶向MS技术鉴定并任选地定量从对照样品分离的含pTyr的肽,从而鉴定酪氨酸激酶的激酶活化环内的含pTyr的肽,并将针对测试样品获得的概况与针对对照样品获得的概况进行比较。测试样品可以是疾病细胞或组织的,包括来自患有或怀疑患有疾病的人对象。这类疾病细胞或组织可以包括这样的细胞或组织,所述细胞或组织已知具有癌症、阿尔茨海默病,或由癌症、阿尔茨海默病所涉及,或将用病毒感染。对照样品可以获自健康细胞或组织,或者可以来自与测试样品相同的来源。例如,与无阿尔茨海默病疾病样品或未用病毒感染的样品比较可能适用于该疾病的诊断或预后。

[0154] 因此,该方法可以用于与酪氨酸磷酸化中改变相关的任何疾病的诊断或预后,所述酪氨酸磷酸化中改变包括具体酪氨酸激酶活性的增加或减少。

[0155] 在不同实施方式中,可以用激酶抑制剂或已知或待测试用于疾病(诸如癌症)治疗的药物处理测试样品,而对照样品与测试样品的不同之处仅在于它没有这种治疗。这种比较(包括随时间的变化)可以指示治疗的功效,包括随时间的变化,例如通过测试样品中酪氨酸磷酸化减少来评估。

[0156] 该方法还可以是一种检测测试样品对药物的细胞反应的方法,所述方法包括:将测试样品与SH2超结合体接触,从而使包含于测试样品的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;

将结合的含pTyr的肽从测试样品分离;和使用靶向MS技术鉴定并任选地定量从测试样品分离的含pTyr的肽,所述靶向MS技术可以包括PRM、SRM和/或MRM MS,从而鉴定在分离的部分中可检测的含pTyr的肽的亚组。该亚组可以包括来自一个或多个激酶活化环的含pTyr的肽,或激酶的一个或多个下游靶标底物。测试样品可以来自疾病细胞或组织的来源。这类疾病细胞或组织可以包括这样的细胞或组织,所述细胞或组织已知具有或涉及癌症、阿尔茨海默病或将用病毒感染,并且可以是活检物样品。可以用激酶抑制剂或其他调节抑制剂或已知或待测试用于疾病治疗的药物处理测试样品。以此方式,该方法可以用于检测疾病的合适治疗方案,或用于检测对治疗抗性的发展。

[0157] 因此,该方法还可以是一种检测对药物治疗方法的响应性的方法,所述方法包括:将测试样品与SH2超结合体接触,从而使包含于测试样品的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从测试样品分离;和使用靶向MS技术鉴定并任选地定量从测试样品分离的含pTyr的肽,所述靶向MS技术可以包括PRM、SRM和/或MRM MS,从而鉴定这样的含pTyr的肽,所述含pTyr的肽与对药物治疗的阳性或阴性反应相关或在已知将被药物治疗抑制的激酶内。测试样品可以来自疾病细胞或组织的来源。这类疾病细胞或组织可以包括这样的细胞或组织,所述细胞或组织已知具有或涉及癌症、阿尔茨海默病或将用病毒感染,包括活检物样品。可以用一种或多种激酶抑制剂或已知或待测试用于疾病治疗的一种或多种药物处理测试样品。以此方式,有可能评估对象对治疗方案的预测反应,并且有可能鉴定合适用于治疗的药物或药物组合物。因此,该方法可以是一种确定治疗方案(包括药物疗法或组合药物疗法)的方法。还可以随时间检测对药物治疗具有抗性或产生抗性的细胞中的激酶活性,以及设计靶激酶的进一步治疗,所述靶激酶响应最初治疗方案而被活化。

[0158] 通过将鉴定和任选地定量的含pTyr的肽的组聚焦于位于免疫受体ITRM(包括ITIM、ITAM或ITSM)内的那些,有可能因此对样品内免疫反应的调节进行概述。

[0159] 因此,作为另一示例,本公开的实施方式能够用于提供个性化方法,以减缓病态和减少治疗中断,其是由于细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的治疗性阻断所导致的。阻断CTLA-4导致免疫相关不良事件(irAE)的高发生率,并且可以预期的是,这可能与受CTLA-4抑制影响的相关激酶或具有ITAM/ITIM/ITSM的免疫受体的Tyr磷酸化相关。

[0160] 在免疫治疗前、期间和之后以本公开的方法表征对象的原位免疫细胞反应还可提供新的诊断和预后见解。通过ITAM/ITIM/ITSM Tyr磷酸化基于其免疫信号模式表征响应者和非响应者可以实现更精确的个性化方法以优化免疫疗法治疗。

[0161] 因此,概述可以涉及免疫受体磷酸酪氨酸信号传导的概述。这类实施方式可以包括由一个或多个免疫受体鉴定和任选地定量含pTyr的肽,包括由一个或多个免疫受体的一个或多个ITRM,其各自可以是ITIM,和ITSM或ITAM。在一些实施方式走好哪个,使用的样品可以来自或包括免疫细胞,包括B细胞,T信标,自然杀伤细胞或巨噬细胞。在一些实施方式中,ITRM已知涉及与疾病发生或进展(诸如癌症)相关的免疫信号传导。在一些实施方式中,使用的样品可以来自暴露于具体疾病(包括例如癌症)的药物治疗方案的来源或样品,或者可以来自怀疑患有或者涉及具体疾病或紊乱(包括癌症)或已知患有或涉及具体疾病(包括癌症)的来源或样品。癌症可以是任何类型的癌症,包括例如乳腺癌、肺癌、前列腺癌或白血病。可以对取自药物治疗之前和之后的样品进行概述并且比较概况,以确定样品内免疫信号传导途径对使用的药物的敏感性或抗性。

[0162] 在一些实施方式中,蛋白质激酶活性的概述可以与免疫受体磷酸酪氨酸信号传导的概述通过选择这样的一组含pTyr的肽组合,所述一组含pTyr的肽经鉴定并任选地定量来自一个或多个蛋白质激酶或来自一个或多个ITRM的含pTyr的肽。

[0163] 在其他实施方式中,在生物样品中这样概述蛋白质激酶活性,通过在对于特异性激酶底物的样品中鉴定和任选地定量含pTyr的肽,包括一个或多个TK,STK或其他双特异性激酶,MAP激酶或脂质激酶。特异性激酶的一些底物是已知的,并且可以由生物医学文献鉴定。

[0164] 具体激酶(例如,TK)的底物还可以通过本公开的另一个修改的实施方式鉴定,这通过以下实现:将源自其中具体TK或相关TK的具体家族的活性已经被药理学上和/或遗传学上干扰的生物材料的样品中含pTyr的肽的概况与来自并未经历这类干扰的生物材料样品(即,对照样品,如来自健康各自或细胞来源,或未处理的个体或细胞来源)中含pTyr的肽的概况进行比较。

[0165] 药理学上和/或遗传学上干扰具体TK的活性的方法为本领域技术人员已知,并且下述示例仅意在说明。通过将细胞暴露于抑制剂可以药理学上降低具体TK的活性,如已知将优先结合具体TK的活性位点的细胞穿透性小分子。已经在文献中鉴定了许多这类小分子,包括许多已经被FDA批准用于患者。可以通过选择结合受体TK胞外区的抗体来降低具体受体TK的活性。许多人源化的抗体已经被FDA批准用于患者。遗传学上降低具体TK的活性可以通过阻遏、降低或抑制该TK的表达,包括用RNAi,通过表达该具体TK的显性阴性型,或通过敲除所有或部分编码该具体TK的基因(例如,使用CRISPR/Cas9技术)。具体地,通过用改变的敏感性-等位基因(as-等位基因)替代在细胞或生物体中编码该TK的等位基因的遗传策略,可以高度特异性的方式降低具体TK的活性。该as-等位基因编码以高度特异性的方式被细胞穿透性小分子抑制的TK(Bishop,A.C.等,“用于任何蛋白质激酶的抑制剂敏感性等位基因的化学开关(A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase)”,(2000)Nature 407:395-401)。

[0166] 通过选择一组鉴定的并任选地定量的含pTyr的肽作为蛋白质酪氨酸磷酸酶调节区内包含的那些,该方法可以包括对样品中蛋白质酪氨酸磷酸酶活性进行概述的方法。

[0167] 因此,在其他实施方式中,通过对样品中对应蛋白质酪氨酸磷酸酶(PTP)一个或多个调节区的含pTyr的肽进行鉴定和定量,PTP活性在样品中被概述。如下述实施例中进一步讨论,PTP似乎包括许多调节pTyr残基。本领域技术人员将意识到的是,上述对TK采取的一般方法可以扩展到PTP,如在靶向的蛋白质组学方法中结合基于超结合体的纯化和MRM或PRM。

[0168] 在其他实施方式中,通过对样品中对应具体PTP底物的含pTyr的肽进行鉴定和定量,PTP活性在样品中被概述。本领域技术人员将意识到的是,上述对具体TK底物进行概述的一般方法可以扩展到对具体PTP底物进行概述,包括以基于磷酸蛋白质组学的分析首先鉴定这类底物,所述分析是对药理学上和/或遗传学上干扰具体PTP或相关PTP家族的活性的影响的分析。

[0169] 因此,该方法可以是一种对测试样品的蛋白质酪氨酸磷酸酶活性进行概述的方法,所述方法包括:将测试样品与SH2超结合体接触,从而使包含于测试样品的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从测试样品分离;和使用靶向MS技术鉴定并任选

地定量从测试样品分离的含pTyr的肽,所述靶向MS技术可以包括PRM、SRM和/或MRM MS,从而鉴定蛋白质酪氨酸磷酸酶的调节区内含pTyr的肽,所述蛋白质酪氨酸磷酸酶的调节区包括阳性或阴性调节区。。该方法可以还包括将对照样品与SH2超结合体接触,从而使包含于对照样品中的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从对照样品分离;和使用靶向MS技术鉴定并任选地定量从对照样品分离的含pTyr的肽,从而鉴定蛋白质酪氨酸磷酸酶的调节区内含pTyr的肽,并将针对测试样品获得的概况与针对对照样品获得的概况进行比较。测试样品可以来自疾病细胞或组织的来源。这类疾病细胞或组织可以包括这样的细胞或组织,所述细胞或组织具有癌症、阿尔茨海默病,或由癌症、阿尔茨海默病所涉及或将用病毒感染。对照样品可以获自健康细胞或组织,或者可以来自与测试样品相同的来源。可以用已知或待测试用于疾病治疗的药物处理测试样品,而对照样品可以不进行这种处理。

[0170] 通过选择一组含pTyr的肽,可以进一步靶向或定制概述方法,以包括来自激酶活化环的那些,例如酪氨酸激酶的那些,以及来自蛋白质酪氨酸磷酸酶调节区的那些,和任选地来自激酶或磷酸酶下游靶标的那些。通过以此方式选择一组含pTyr的肽,有可能尝试在细胞内绘制不同的调节途径。

[0171] 因此,该方法可以是一种对细胞内信号传导途径进行表征的方法,所述方法包括:将测试样品与SH2超结合体接触,从而使包含于测试样品中的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从测试样品分离;和使用靶向MS技术鉴定并任选地定量分离的含pTyr的肽,从而鉴定并任选地定量在分离的部分中可检测的含pTyr的肽的亚组。该亚组可以包括例如来自以下的含pTyr的肽:一个或多个激酶活化环、一个或多个蛋白质酪氨酸磷酸酶的一个或多个调节区、和激酶和/或蛋白质酪氨酸磷酸酶的一个或多个下游靶标底物。接触可以包括使用饱和量的或低于饱和量的SH2超结合体。MS技术可以包括PRM、SRM和/或MRM MS技术。

[0172] 在另一实施方式中,鉴定并定量除了pTyr以外存在于含pTyr的肽中的翻译后氨基酸修饰(PTM)。这类PTM可以进一步指示Tyr磷酸化激酶的活性状态。本领域技术人员将意识到的是,鉴定这类PTM可能涉及用一个或多个超结合体富集未经蛋白质消化(例如,全长蛋白质)的含pTyr的肽。富集后,这些未消化的含pTyr的肽在进行MS分析之前可以进行蛋白质消化(例如,胰蛋白酶消化)。如本领域技术人员将理解的,可以调整MS分析以在获得的肽混合物中检测各种PTM。

[0173] 在其他实施方式中,鉴定并定量与含pTyr的肽共价或非共价结合的肽。这类结合可以进一步指示Tyr磷酸化激酶的活性状态。本领域技术人员将意识到的是,鉴定这类结合的肽可能涉及用一个或多个超结合体富集未经蛋白质消化(例如,全长蛋白质)的含pTyr的肽,在不干扰蛋白质-蛋白质相互作用的条件下。富集后,结合的肽在进行MS分析之前可以进行蛋白质消化(例如,胰蛋白酶消化)。

[0174] 该方法还可以是一种检测测试样品中癌症起源组织的方法,所述方法包括:将测试样品与SH2超结合体接触,从而使包含于测试样品的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从测试样品分离;和使用靶向MS技术鉴定并任选地定量分离的含pTyr的肽,从而鉴定并任选地定量在分离的部分中可检测的含pTyr的肽的亚组。测试样品可以是活检物样品,例如,来自肿瘤的活检物样品。该亚组可以包括来自特定细胞或组织类型的含

pTyr的肽,包括提取活检物的组织类型,和/或与常见转移型癌症相关的细胞或组织类型,如乳腺或肺组织。接触可以包括使用饱和量的或低于饱和量的SH2超结合体。MS技术可以包括PRM、SRM和/或MRM MS技术。以此方式,该方法能够用于检测肿瘤起源组织,从而确定肿瘤是否是从与活检物位点不同的位点转移。

[0175] 该方法还可以是一种检测和/或定量测试样品中癌症细胞的方法,所述方法包括:将测试样品与SH2超结合体接触,从而使包含于测试样品的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从测试样品分离;和使用靶向MS技术鉴定并任选地定量分离的含pTyr的肽,从而鉴定并任选地定量在分离的部分中可检测的含pTyr的肽的亚组。测试样品可以是活检物样品,例如,来自肿瘤的。该亚组可以包括来自特定细胞或组织类型健康细胞的含pTyr的肽,包括提取活检物的组织类型,和/或特定细胞或组织类型的癌症细胞。接触可以包括使用饱和量的或低于饱和量的SH2超结合体。MS技术可以包括PRM、SRM和/或MRM MS技术。以此方式,该方法可以用于确定活检物样品中癌症和非癌症细胞的百分比。

[0176] 该方法还可以是一种检测和/或定量测试样品中一个或多个免疫细胞类型的方法,所述方法包括:将测试样品与SH2超结合体接触,从而使包含于测试样品的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从测试样品分离;和使用靶向MS技术鉴定并任选地定量分离的含pTyr的肽,从而鉴定并任选地定量在分离的部分中可检测的含pTyr的肽的亚组。该亚组可以包括这样的pTyr的肽,其与一个或多个免疫细胞类型中的一个或每一个独特地相关联,包括B细胞、T细胞、自然杀伤细胞或巨噬细胞。MS技术可以包括PRM、SRM和/或MRM MS技术。以此方式,该方法可以用于确定样品中具体免疫细胞的百分比。

[0177] 该方法可以是一种确定一个或多个信号传导途径的活化的方法,所述方法包括:将测试样品与SH2超结合体接触,从而使包含于测试样品的含pTyr的肽与SH2超结合体结合;将结合的含pTyr的肽从测试样品分离;和使用靶向MS技术鉴定并任选地定量分离的含pTyr的肽,从而鉴定并任选地定量在分离的部分中可检测的含pTyr的肽的亚组。该亚组可以包括这样的含pTyr的肽,其与一个或多个信号传导通路中的一个或每一个独特地相关联。含pTyr的肽可以是来自激酶、ITRM或激酶的下游靶标。MS技术可以包括PRM、SRM和/或MRM MS技术。通过以信号传导分子的活化或抑制来扰乱样品,包括例如PDL1、CD28或TCR刺激。以此方式,该方法能够用于区分各种信号传导通路的活化。

[0178] 实施例

[0179] 实施例1-野生型和变体Src SH2结构域的表达和纯化

[0180] 使用本领域的技术标准,在细菌表达载体中制备编码His<sub>6</sub>/GST-标签标记的人Src SH2(残基Asp144-Lys252,SEQ ID NO:10)、His<sub>6</sub>/GST-标签标记的TrM人Src SH2(SEQ ID NO:11)或His<sub>6</sub>-标签标记的QuadM人Src SH2(SEQ ID NO:13)的DNA序列。

[0181] 野生型和变体SH2变体在大肠杆菌BL21(DE3)中表达。用0.5mM IPTG以18°C过夜诱导蛋白质表达。将细胞沉淀重悬在这样的裂解缓冲液,所述裂解缓冲液在磷酸盐缓冲液(PBS)溶液(pH 7.0)中包含2%曲通X-100、1mg/mL溶菌酶、3μL全能核酸酶(benzonase)和20mM咪唑,并以400W超声处理180秒。将细菌裂解物通过25,000g离心30分钟清洁,立即使用获得的上清液或将其等分并储存于-80°C为将来使用。将购自GE医疗公司(GE Healthcare)的Ni<sup>2+</sup>-次氨基三乙酸(Ni-NTA)珠用于纯化野生型和变体SH2结构域蛋白质。通过Bradford试验确定各纯化的蛋白质的浓度。

[0182] 图1是考马斯染色的SDS-PAGE凝胶的图像,其显示了3个蛋白质的纯化。

[0183] 实施例2-基于摩尔量对摩尔量,变体SH2结构域相比抗-pTyr抗体对来自Jurkat细胞的含pTyr的肽是更好的亲和力试剂

[0184] 进行实验以确定变体Src SH2结构域和常用的抗-pTyr抗体作为来自生物样品的含pTyr的亲和力试剂的相对效力。假定每个抗体分子具有两个针对其抗原的结合位点,通过使用相对于SH2结构域变体一半摩尔量的抗体,以功能等同的摩尔量制备His<sub>6</sub>/GST-标签标记的TrM Src SH2结构域(SEQ ID NO:11)和His<sub>6</sub>-标签标记的QuadM Src SH2结构域(SEQ ID NO:13)以及抗-pTyr抗体。

[0185] 第一个实验测试下述亲和力试剂对从由Jurkat细胞制备的肽混合物提取的含pTyr的肽的相对亲和力:His<sub>6</sub>/GST-标签标记的TrM Src SH2(SEQ ID NO:11)、His<sub>6</sub>-tagged QuadM Src SH2(SEQ ID NO:13)、抗-pTyr抗体4G10(琼脂糖偶联物,获自密理博公司(Millipore))和市售可得的抗-pTyr抗体的混合物。各亲和力试剂以1x和5x量测试,如表3所示。2个SH2亲和力试剂也以30x量测试;抗体不以30x量测试,因为这样做成本过高。按照实施例1中所述制备纯化的SH2亲和力试剂。抗体混合物包含4G10(如上所示)、PY99(获自圣克鲁兹生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology))和P-Tyr-100(PTMScan®磷酸-酪氨酸小鼠mAb的浆料,获自细胞信号传导技术公司(Cell Signaling Technology))。因为P-Tyr-100的浓度是未知的,所以以提供商推荐的量使用(即,1mg肽消化物使用4μL)。

[0186] 表3实施例2中所用亲和力试剂的组合物和和量

[0187]

量	Src SH2 结构域变体	4G10	抗体混合物
1x	0.375 nmol	0.1875 nmol	0.0625 nmol 4G10, 0.0625 nmol PY99, 4 μL P-Tyr-100
5x	1.875 nmol	0.9375 nmol	0.3125 nmol 4G10, 0.3125 nmol PY99, 20 μL P-Tyr-100
30x	11.25 nmol	N	N

[0188] 图2A表示实验设计的示意图。每一个量的His<sub>6</sub>-标签标记的SH2结构域变体或抗体与3mg过钒酸盐处理的Jurkat细胞制备的肽混合物进行结合实验。

[0189] Jurkat细胞(获自ATCC)在5%CO<sub>2</sub>的潮湿气氛下以37°C在洛斯维公园纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute)1640培养基(RPMI-1640)中培养,所述培养基补充有10%牛血清和100U/mL链霉素和盘尼西林。通过离心收集细胞,在PBS中洗涤3次,并用1mM新鲜培养的过钒酸钠在37°C处理15分钟,根据Boersema,P.等,“使用磷酸肽免疫亲和力纯化和稳定的同位素二甲基标记深度定性和定量概述酪氨酸磷酸化(In-depth qualitative and quantitative profiling of tyrosine phosphorylation using a combination of phosphopeptide immunoaffinity purification and stable isotope dimethyl labeling)”,(2009)Molecular&Cellular Proteomics 9:84-99。

[0190] 再次通过离心收集细胞。将细胞沉淀物在冰冷裂解缓冲液中逐渐地均质化,所述冰冷裂解缓冲液包含8M尿素,50mM tris(羟甲基)氨基甲烷(Tris)-HCl(pH 7.4),2%蛋白酶抑制剂混合物(v/v,获自西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)),1%Triton X-100(v/

v), 1mM NaF和1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 然后在400W超声处理120秒。以25,000g离心1小时后,蛋白质在冰冷丙酮/乙醇/乙酸(50/50/0.1, V/V/V)溶液中沉淀。随后,将蛋白质在还原缓冲液中稀释,所述还原缓冲液包含100mM三乙基碳酸氢铵(TEAB)缓冲液(pH 8.2)和8M尿素,而最终蛋白质浓度通过Bradford试验确定。将蛋白质悬浮液在10mM二硫苏糖醇(DTT)中以37°C还原2小时,然后将其在20mM碘乙酰胺(IAA)中在黑暗中以室温下烷基化另外30分钟。以1/25(w/w)的酶对蛋白质比例在37°C过夜进行酪氨酸消化。所得肽混合物储存于-80°C,用于进一步的分析。

[0191] 将脱盐的Jurkat肽(30mg)溶解于冰冷免疫亲和力纯化(IAP)缓冲液中,然后分成10等分,各自具有3mg的Jurkat肽。以表1和图2A中所示量的抗体(1x、5x)或SH2结构域变体(1x、5x、30x)进行结合实验。

[0192] 对于基于抗体的富集,将4G10或抗体混合物与样品在4°C过夜孵育,同时转动。用冰冷IAP缓冲液洗涤珠3次,并用冰冷水洗涤2次。为了释放结合的肽,室温下用200μL 0.15%三氟乙酸(TFA)洗脱珠2次15分钟。

[0193] 对于基于SH2的富集,包含纯化的SH2蛋白质的Ni-NTA珠在包含20mM咪唑的20柱体积PBS缓冲液(pH 7.0)中充分洗涤。立即使用前,用包含50mM Tris-HCl(pH 7.2)、50mM NaCl和10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>的2柱体积的冰冷免疫亲和力纯化(IAP)缓冲液洗涤SH2-Ni-NTA珠。将洗涤的珠在肽混合物中在4°C过夜孵育,同时转动。第二天清晨用至少10柱的冰冷IAP缓冲液将珠洗涤,然后用包含500mM咪唑的PBS缓冲液(pH 7.0)洗脱。将洗脱物在OASIS HLB柱上脱盐。用80%乙腈(ACN)和0.1%三氟乙酸(TFA)的溶液将肽洗脱。洗脱的肽进行针对磷酸肽的固定钛(IV)离子亲和力色谱(Ti<sup>4+</sup>-IMAC),如在先的Zhou, H.等,“用于磷酸化蛋白质组分析的固定钛离子亲和力色谱吸附剂的特异性磷酸肽富集(Specific phosphopeptide enrichment with immobilized titanium ion affinity chromatography adsorbent for phosphoproteome analysis)”,(2008) Journal of Proteome Research 7:3957-3967;和Zhou, H.等,“使用基于单分散微球的固定钛(IV)离子亲和力色谱的稳健磷酸化蛋白质组富集(Robust phosphoproteome enrichment using monodisperse microsphere-based immobilized titanium(IV) ion affinity chromatography)”(2013) Nature Protocols 8:461-480所述。简言之,首先将肽混合物与Ti<sup>4+</sup>-IMAC珠在加载缓冲液(80%乙腈或CAN和6%TFA)中在室温孵育30分钟。离心后,去除上清液。然后顺序地在2个洗涤缓冲液中洗涤Ti<sup>4+</sup>-IMAC珠,以去除非特异性吸收的肽。洗涤缓冲液1包含50%CAN、6%TFA和200mM NaCl;洗涤缓冲液2包含30%CAN和0.1%TFA。然后通过氨(10%, v/v)洗脱结合的肽。以20,000g离心5分钟后,收集上清液并冻干。

[0194] 通过一维(1D)LC-MS/MS检测肽,通常在装配有四进制测量(quaternary survey)或MS泵的LTQ Orbitrap Velos(获自塞默飞科学公司(Thermo Fischer))上进行。对于1D LC-MS/MS分析,将样品溶解于0.1%甲酸(FA)并以5μL/min流速与100%流动相A自动加载到C18捕获柱(3cm×200μm内径)。将分析柱(内径75μm)用Daisogel C18AQ颗粒(5μm、12nm)在内部包装到长度为15cm。流动相A是H<sub>2</sub>O中的0.1%甲酸(v/v),而流动相B是ACN中的0.1%FA。反相(RP)分离梯度为86分钟内流动相B从2%至25%,分开后流速调整为200nL/分钟。将样品分析3次,各次20μL。

[0195] 以数据依赖性MS/MS获取模式操作LTQ-Orbitrap Velos质谱仪。将喷雾电压设置

在2.0kV,并将标准化的碰撞能量设置为35.0%。通过Orbitrap从m/z400至2000获得完全调查扫描质谱(MS)(分辨率=60000在m/z 400),并且对于具有250ms最大注射时间的Orbitrap,靶标离子设定为 $5e^5$ 。MS/MS扫描通过以 $3e^4$ 靶标离子设定和50ms最大注射时间的LTQ获得。动态排除设置如下:重复计数1,重复持续时间30秒,排除持续时间60秒。

[0196] 原始MS谱用MaxQuant版本1.3.0.5处理。针对UniProt人数据库(2013年12月11日公布,并且包含88473个蛋白质序列)搜索MS/MS谱系,辅以经常观察到的污染物,并与所有序列的反向形式串联。酶特异性设置为针对酪氨酸,并且允许至多2个丢失的切割位点。选择磷(S、T、Y),氧化(M),氨和水的损失用于可变修饰;选择脲基甲基用于固定修饰。对肽和蛋白质的最大假发现率(FDR)设置成1%。最小所需肽长度设置在6个氨基酸。在该研究中报告的所有磷酸化位点为I型位点,通过将蛋白质FDR<1%、肽FDR<1%、局部化概率>0.75和 $\Delta$ PTM评分 $\geq 5$ 的组合的截止值限定。这些参数通常用于磷酸化蛋白质组学研究(参见例如,Sharma等;Olsen,J.V.,等,“信号传导网络中的全局、体内和位点特异性的磷酸化动力学(Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks)”(2006)Cell 127:635-48;Lundby,A.,等,“14个不同大鼠器官和组织的蛋白质磷酸化位点定量映射(Quantitative maps of protein phosphorylation sites across 14 different rat organs and tissues)”,(2012)Nature Communications 3:876)。

[0197] 基于摩尔量对摩尔量(mole-for-mole)(针对pTyr结合位点中的不同而调节后;即,抗体包含2个pTyr结合位点,然而SH2结构域变体每个分子包含1个pTyr结合位点),当以1x量(即,0.375nmol的pTyr结合位点)或5x量(即,1.875nmol的pTyr结合位点)比较时,TrM和QuadM Src结构域变体从Jurkat细胞鉴定出比4G10或抗体混合物更多的pTyr位点。在各结合实验中鉴定的pTyr位点的数量在表4中表示,并且将相同的数据在图2B中制图。

[0198] 表4通过不同亲和力试剂从过钒酸盐处理的Jurkat细胞鉴定的pTyr位点的数量

[0199]

亲和力试剂	使用的亲和力试剂中 pTyr 结合位点的量(nmol)		
	0.375 (1x)	1.875 (5x)	11.25 (30x)
TrM Src SH2	578	1060	1165
QuadM Src SH2	679	938	1186
抗体 4G10	454	925	
抗体混合物	340	753	

[0200] 实施例3-当TrM和QuadM Src SH2结构域变体以较高浓度存在时,它们的序列选择性变得较不明显

[0201] 对实施例2中鉴定的含pTyr的肽进行分析以计算不同亲和力试剂对含pTyr的肽之间的选择性距离。通过鉴定的磷酸肽中围绕pTyr残基的氨基酸残基的分布模式测量选择性。通过相应图案的欧几里德距离测量两种亲和试剂之间的选择性距离。

[0202] 图3显示了4G10(角#1)、抗体混合物(角#2)、TrM Src SH2(角#3)和QuadM Src SH2(角#4)之间的1x量(即,0.375nmol的pTyr结合位点)、5x量(即,1.875nmol的pTyr结合位点)和30x量(即11.25nmol的pTyr结合位点)的选择性距离。通过亲和力试剂在各组合中鉴定的序列之间的欧几里德距离沿着连接两个亲和力试剂的线示出,而连接4个亲和力试剂的线的相对厚度(不是距离)还指示相对欧几里德距离。

[0203] 图3还描述了位于pTyr(Y)C末端的+1、+2、+3和+4位置的氨基酸,它们在指定位置统计学上显著不同( $P < 0.01$ ,没有Bonferroni校正的二项检验),并且在两种模式之间具有 $> 0.08$ 的距离。

[0204] 当施用相对小的量(即,能力等同于0.375nmol SH2结构域)时,不同的亲和力试剂展现出不同的特异性(图3)。在TrM和QuadM Src SH2结构域之间和各SH2结构域和抗体制备物(4G10或抗体混合物)之间观测到基序选择的显著差异。

[0205] 然而,当施用的亲和力试剂的量增加(即,增加5倍至1.875nmol或增加30倍至11.25nmol;图3)时,基序选择性中的差异变得较不显著或不显著。

[0206] 图3指示TrM和QuadM Src SH2的序列特异性随着结合反应中SH2结构域变体的量增加而降低。

[0207] 实施例4-超结合体亲和力试剂提供了迄今为止酪氨酸磷酸化蛋白质组最广泛的观测使用SH2超结合体作为亲和力试剂在9个常用细胞系中确定Tyr磷酸化蛋白质组。实验的示意图在图4中示出。

[0208] 细胞系是HeLa(子宫颈癌);Bel7402和HepG2(肝癌);MDA-MB-231、BT-474、SK-BR-3和MCF-7(乳腺癌);MCF-10A(乳腺上皮细胞);和Jurkat细胞(T细胞)。所有细胞系购自ATCC(除了人肝细胞瘤Bel7402细胞,其获自中国医学科学院血液所(Institute of Blood, Chinese Academy of Medical Sciences))。将HeLa、Jurkat、Bel7402、Hep-G2和MCF-7细胞在补充了10%牛血清的RPMI-1640培养基中培养。BT-474细胞在RPMI-1640中生长,所述RPMI-1640补充有15%胎牛血清、2.5g/L葡萄糖和0.11g/L丙酮酸钠。SK-BR-3细胞在补充有15%胎牛血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)中生长。

[0209] MDA-MB-231细胞在补充有10%胎牛血清的RPMI-1640中培养。MCF-10A细胞在DMEM/F12(达尔伯克改良伊格尔培养基:营养混合物F-12)中生长,所述DMEM/F12补充有5%马血清、20ng/mL表皮生长因子(EGF)、10 $\mu$ g/mL胰岛素、0.51 $\mu$ g/mL氢化可的松和100ng/mL霍乱毒素(Debnath, J.等,“三维基底膜培养物中生长的MCF-10A乳腺上皮腺泡的形态发生和肿瘤形成(Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures)”,(2003)Methods 30:256-268)。所有的细胞在5%CO<sub>2</sub>潮湿气氛下在37 $^{\circ}$ C培养,并且所有的培养基补充有100U/mL的链霉素和盘尼西林。

[0210] 为了使pTyr鉴定最大化,对各细胞系进行过钒酸钠处理(如实施例2),并且对来自各细胞系的10mg蛋白质进行胰蛋白酶消化,并且后续通过37.5nmol(1.5mg)的His<sub>6</sub>/GST-标签标记的TrM Src SH2(SEQ ID NO:11)和Ti<sup>4+</sup>-IMAC富集。纯化来自各细胞系的含pTyr的肽如实施例2中所述。

[0211] 洗脱的肽通过运行24小时的SCX-RPLC-MS/MS分析而鉴定。如之前Wang, F.,等,“具有在线样品加载、同位素二甲基标记和多维度分离用于高通量定量蛋白质组分析的全自动

系统(A fully automated system with online sample loading, isotope dimethyl labeling and multidimensional separation for high-through put quantitative proteome analysis)”, (2010) Anal. Chem. 82:3007-3015所述, 制备14cm的RP-SCX(反相强阳离子交换)双相柱(内径200 $\mu$ m)。将肽再次溶解于0.1%FA中, 并且自动加载到RP-SCX双相捕获柱的RP片段上。保留在RP片段上的肽通过SCX整体柱上的RP梯度洗脱。随后, 使用以10、20、30、50、75、100、200、1000或10、30、50、100、1000mM乙酸铵的一系列逐步洗脱将肽从SCX整体柱洗脱到第二维度的C18分析柱。各洗脱持续10分钟, 然后用0.1%FA进行10分钟平衡。最后, 进行RP分离。如实施例2中所述进行MS/MS分析。

[0212] 9个细胞系的该磷酸化蛋白质组学概述导致鉴定19,570个不同的含pTyr的肽和10,030个独特的pTyr位点(表5)。含pTyr的肽源自4,773个蛋白质。这似乎是迄今为止在单个研究中获得的最大数量的pTyr位点。大约36%鉴定的pTyr位点是新型的, 因为它们没有列于ProteomeScout数据库(版本:2015/10/11), 该数据库包含了在多个其他数据库中收集的磷酸化位点, 包括PhosphoSitePlus、dbPTM和UniProtKB(Matlock, M.K., 等, “ProteomeScout: 翻译后修饰和蛋白质的库和分析源(ProteomeScout: a repository and analysis resource for post-translational modifications and proteins).” (2015) Nucleic Acids Res. 43:D521-30)。事实上, 该工作将ProteomeScout数据库扩大了约10%。

[0213] 本研究和之前的研究就各细胞鉴定的全部和新型pTyr位点而言的比较更加令人惊讶(表5)。例如, 在乳腺癌细胞系SK-BR-3的单个研究中之前鉴定的pTyr位点的最大数量是158; 而基于超结合体的方法在SK-BR-3中鉴定了3,187个pTyr位点, 其中692个是新型的(表5)。因此, 基于超结合体的亲和力纯化(AP)-MS/MS方法相比之前的方法能够实现Tyr磷酸化蛋白质组更广和更深的覆盖。

[0214] 表5使用基于超结合体的AP-MS/MS方法鉴定的pTyr位点

[0215]

细胞系	组织	已知的 pTyr 位点*	在该研究中鉴定的 pTyr 位点	
		迄今为止由单个研究鉴定的最多位点	所有	新型
Jurkat	T 细胞	2,738 (ID:12495)	5,326	1,557
HeLa	子宫颈	1,131 (ID: 9059)	3,267	750
BT-474	乳腺	590 (ID: 7219)	3,745	914
SK-BR-3	乳腺	158 (ID: 776)	3,187	692
MCF-7	乳腺	101 (ID: 775)	2,588	504
MCF-10A	乳腺	429 (ID: 753)	3,279	681
MDA-MB-231	乳腺	866 (PMID: 20562096)	3,152	743
HepG2	肝脏	321 (ID: 7353)	4,671	1,276
BEL7402	肝脏	-	4,424	1,040
总计			<b>10,030</b>	<b>3,575</b>

[0216] \*经由抗体P-Tyr-100 (CST有限公司 (Cell Signaling Technology, Inc) 或CST) 富

集的pTyr肽;包括CST治疗组ID作为参照,除了MDA-MB-231,对应研究的PubMed ID在括号中给出。

[0217] 实施例5-通过SH2超结合体揭示的酪氨酸磷酸化蛋白质组的分析

[0218] 将获自实施例4的磷酸化蛋白质组学信息进行不同的分析。

[0219] 9个细胞系具有显著不同的Tyr磷酸化概况。11个人细胞系的在先分析揭示大约73%鉴定的蛋白质对于所有细胞是常见的(Geiger,T.等.“11个常见细胞系的比较性蛋白质组织分析揭示大多数蛋白质的泛在性但表达各异(Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins)”(2012)Mol.Cell.Proteomics 11:M111.014050)。

[0220] 两种或多种细胞类型之间共有的pTyr位点的数量遵循与在所有9个细胞系中检测到的仅为约5.8%(584/10,030)的pTyr位点相似的趋势(表6)。此外,在该研究中鉴定的大约50%新型pTyr位点对单个细胞类型具有特异性(表6)。通常,pTyr位点的细胞类型特异性越高,它就越有可能成为新型的(即,在该研究中第一个鉴定的,表6)。

[0221] 表6实施例4的磷酸化蛋白质组学分析中发现的对2到9的细胞系具有细胞类型特异性或常见的pTyr位点的数量

[0222]

细胞特异性	pTyr位点数	新型pTyr位点数	新型pTyr位点%
1	3,470	1,758	50.7%
2	1,661	708	42.6%
3	1,127	397	35.2%
4	865	254	29.4%
5	731	174	23.8%
6	545	110	20.2%
7	551	74	13.4%
8	496	54	10.9%
9	584	44	7.5%
总计	10,030	3,575	35.6%

[0223] 所有9个细胞系中发现的相对高丰度的pTyr位点可以解释为什么在该组内通过超结合体鉴定的相对较少的新位点(约7.5%)。也就是,当有限量的亲和力试剂用于之前的AP-MS/MS分析(即,使用抗-pTyr抗体作为亲和力试剂)时,这些高丰度的pTyr肽可能已经被优先地分离。按照该原理,预测使用饱和量的超结合体鉴定的新型pTyr位点相对于迄今为止报道的那些将通常具有较低的丰度。与预测一致,对应已知pTyr位点的肽的平均m/z峰强度是新型pTyr位点的约2.5倍(图5)。新型pTyr位点的丰度显著地低于已知的( $P < 2.2 \times 10^{-16}$ ,斯氏t检验)。

[0224] 如KEGG数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>)所限定,发现经Tyr磷酸化的蛋白质的不同功能性类别的比例示于图6A。与涉及代谢的蛋白质中仅有小部分(~5%)被磷酸化相反,在所有细胞系中发现大约43%的所有TK、大约47%的包括SH2结构域的蛋白质和约54%的PTP经Tyr磷酸化。

[0225] 使用来自MKN45细胞公开的磷酸化蛋白质组学数据在进行Tyr磷酸化的蛋白质功

能性分类中观测到相似的趋势,所述MKN45细胞未用过钒酸盐处理并且其消化的肽用P-Tyr-100亲和力纯化(图6B),这表明过钒酸盐处理或基于Superbinder的亲和力纯化改变了pTyr信号传导的典型特征。将图6B中示出的分析与来自用激酶抑制剂SU11274或十字孢碱或载剂DMSO处理的细胞的磷酸化蛋白质组学数据组合(Stokes, M.P.等,“通过免疫亲和力和IMAC方法与总蛋白质组分析互补性PTM概述人胃癌中的药物反应(Complementary PTM Profiling of Drug Response in Human Gastric Carcinoma by Immunoaffinity and IMAC Methods with Total Proteome Analysis)”(2015) *Proteomes* 3:160-183)。

[0226] 这些发现表明,pTyr信号传导——TK、PTP和包括SH2的蛋白质中的核心机制是其自身通过Tyr磷酸化进行大量调节(图6)。

[0227] 图6C是说明人细胞中明显的Tyr磷酸化典型调节(标有“P”的圆圈)的原理图,其中使底物磷酸化的酪氨酸激酶(TK),使底物去磷酸化的蛋白质酪氨酸磷酸酶(PTP)以及结合Tyr磷酸化的蛋白质自身的包括SH2结构域的蛋白质受到Tyr-磷酸化的调节。

[0228] 实施例6-PTP上的酪氨酸磷酸化指示可能的调节位点

[0229] 已知TK的Tyr磷酸化可以调节它们的活性,并且包括SH2结构域的肽的Tyr磷酸化可以修饰它们的结合特异性或亲和力(例如,Hubbard, S.R.等,“蛋白质酪氨酸激酶中的自身调节机制(Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases)”,(1998) *J. Biol. Chem.* 273:11987-90; Qian, X.等,“包括其SH2结构域的张力蛋白-3蛋白质被Src磷酸化并且导致肿瘤发生和转移(The Tensin-3 protein, including its SH2 domain, is phosphorylated by Src and contributes to tumorigenesis and metastasis)”(2009) *Cancer Cell* 16:246-58; Jin, L.L.等,“Lyn Src同源性2(SH2)结构域的酪氨酸磷酸化调节其结合亲和力和特异性(Tyrosine phosphorylation of the Lyn Src homology 2(SH2) domain modulates its binding affinity and specificity)”(2015) *Mol. Cell. Proteomics* 14:695-706)。但是令人吃惊的是,在实施例4和5中所述的磷酸化蛋白质组学数据中PTP普遍地经Tyr磷酸化。

[0230] PTP中鉴定的大部分pTyr位点(56%)位于PTP结构域内。PTP中大约36%鉴定的pTyr位点是新型的,该工作拓展了约27%鉴定的PTP结构域内Tyr磷酸化位点。此外,在不同的细胞系之间发现PTP结构域中保守基序内的许多保守的Tyr残基被磷酸化(例如,在图7A和7B参见Tyr46、Tyr52、Tyr66、Tyr267,残基编号基于PTPN1)。具体地,Tyr46、Tyr52和Tyr66(编号基于PTPN1)是最保守的(大约70%)以及最频繁地经Tyr磷酸化的残基(图7A)。在PTPN1的三维结构中将Tyr46、Tyr52和Tyr66聚类(图7B)。

[0231] 文献进一步表明可以预测许多这些保守的残基(例如,Tyr46、Tyr66、Tyr267)的磷酸化,以通过调节磷酸酶活性和/或通过产生其他信号传导蛋白质的停靠点来影响PTP功能。

[0232] 例如,已知基序1内的Tyr46(编号基于PTPN1)在通过与底物的pTyr残基疏水性包装来限定PTP底物特异性中起重要作用(Andersen, J.N.等,“Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains”,(2001) *Mol. Cell. Biol.* 21:7117-36)。因此,预测Tyr46的磷酸化对底物识别有负面影响。事实上,已经证明与PTPN1中Tyr46等价的PTPN11上Tyr279(SHP-2)的磷酸化降低PTPN11活性(Mitra, S.等,“SHP-2是细胞增殖期间Ab1激酶的新型靶标(SHP-2 is a novel target of

Abl kinases during cell proliferation)”(2008),*J.Cell Sci.*121:3335-46)。

[0233] 另一示例是,已知基序3内的Tyr66(编号基于PTPN1)有助于PTP结构域疏水性核型的形成(Andersen等)之前已经证明PTPN1中Tyr66或PTPN11中的等价残基的磷酸化介导对应的PTP与Grb2SH2结构域的结合,以增强磷酸酶活性(Mitra等;Liu,F.和Chernoff,J.,“蛋白质酪氨酸磷酸酶1B与表皮生长因子受体相互作用并被其酪氨酸磷酸化(Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor)”(1997)*Biochem.J.*327(Pt 1):139-45)。

[0234] 另一个示例是,Q环(基序10)内的Tyr267(编号基于PTPN1)的磷酸化可以改变PTP活性(Andersen,J.N.等,“蛋白质酪氨酸磷酸酶结构域之间的结合和进化关系(Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains)”(2001)*Mol.Cell.Biol.*21:7117-36;Mitra,S.et al.)。

[0235] 实施例7-TK活化环上的pTyr指示TK活性

[0236] 通过对源自TK活化环的含pTyr的肽进行鉴定和定量,将获自实施例4的磷酸化蛋白质组学数据用于确定9个不同细胞系中TK的相对活性。

[0237] TK活化环中可能的pTyr位点通过文献搜索和通过生物信息学确定。例如,收集自数据库PhosphoSitePlus([www.phosphosite.org](http://www.phosphosite.org))的数据提供了已经证明其磷酸化将增加激酶活性的TK活化环中的Tyr的35个示例,(表7)。

[0238] 表7TK活化环中的pTyr的35个示例,已经记录其活化将增加激酶活性

[0239]

编号	蛋白质	Swissprot ID	活化环中 pTyr 的残基编号
1	BTK	Q06187	551
2	EGFR	P00533	869
3	EPHA3	P29320	779
4	FER	P16591	714
5	FES	P07332	713
6	FGFR1	P11362	653
7	FGFR1	P11362	654
8	IGF1R	P08069	1165
9	IGF1R	P08069	1166
10	INSR	P06213	1189
11	INSR	P06213	1190
12	JAK3	P52333	980
13	KDR	P35968	1059
14	LCK	P06239	394
15	LYN	P07948	397
16	MERTK	Q12866	753
17	MERTK	Q12866	754
18	MET	P08581	1234
19	MET	P08581	1235
20	MST1R	Q04912	1238
21	NTRK1	P04629	680
22	NTRK1	P04629	681
23	PDGFRB	P09619	857
24	PTK2	Q05397	576
25	PTK2	Q05397	577
26	PTK6	Q13882	342
27	RET	P07949	905
28	SRC	P12931	419

[0240]

29	SYK	P43405	525
30	SYK	P43405	526
31	TEC	P42680	519
32	TNK2	Q07912	284
33	TYK2	P29597	1054
34	TYK2	P29597	1055
35	ZAP70	P43403	493

[0241] 对90种人酪氨酸激酶的86种人酪氨酸激酶进一步的序列分析鉴定了126个可能的

调节pTyr位点,包括活化环内的86个(表8)。一些TK(即EPHA6/7、EPHA3/4/5、ABL1/2、IGF1R/INSR、VGFR2/3、NTRK2/3)具有相同的活化环序列。

[0242] 表8包含来自人TK活化环的Tyr残基的79个胰蛋白酶肽

[0243]

编号	TK 的名称	序列	长度
1	TNK1	YVMGGPRPIPYAWCAPESLR	20
2	RYK	DLFPMDYHCLGDNENRPVR	19
3	EPHB1	YLQDDTSDPTYTSSLGGK	18
4	EPHB2	FLEDDTSDPTYTSALGGK	18
5	EPHB3	FLEDDPSDPTYTSSLGGK	18
6	EPHB4	FLEENSSDPTYTSSLGGK	18
7	EPHA2	VLEDDPEATYTTSGGK	16
8	EPHA6/7	VLEDDPEAAYTTTGK	16
9	EPHA8	VLEDDPDAAYTTTGK	16
10	ACK1	ALPQNDDHYVMQEHR	15
11	EPHA1	LLDDFDGTYETQGGK	15
12	ERBB2	LLDIDETEYHADGGK	15
13	LMTK1	EDYFVTADQLWVPLR	15
14	ABL1/2	LMTGDTYTAHAGAK	14
15	BMX	YVLDDQYVSSVGTK	14
16	BTK	YVLDDQYVSSVGTK	14
17	FES	EEADGVYAASGGLR	14
18	ITK	FVLDDQYVSSVGTK	14
19	PTK6	EDVYLSHDHNIPYK	14
20	TEC	YVLDDQYVSSVGTK	14
21	TXK	YVLDDQYVSSVGTK	14
22	BLK	IIDSEYTAQEGAK	13
23	EPHA3/4/5	VLEDDPEAAYTTR	13
24	FER	QEDGGVYSSSLK	13
25	ZAP70	ALGADDSYYTAR	12

[0244]

26	CSF1R	DIMNDSNYIVK	11
27	FGR	DDEYNPCQGSK	11
28	FLT3	DIMSDSNYVVR	11
29	PGFRA	DIMHDSNYVSK	11
30	PTK7	DVYNSEYYHFR	11
31	SRMS	DDIYSPSSSSK	11
32	FRK	VDNEDIYESR	10
33	FYN	LIEDNEYTAR	10
34	HCK	VIEDNEYTAR	10
35	LCK	LIEDNEYTAR	10
36	LYN	VIEDNEYTAR	10
37	RET	DVYEEDSYVK	10
38	SRC	LIEDNEYTAR	10
39	TYK2	AVPEGHEYR	10
40	TYK2	AVPEGHEYR	10
41	YES	LIEDNEYTAR	10
42	DDR1	NLYAGDYR	9
43	DDR2	NLYSGDYR	9
44	FAK1	YMEDSTYYK	9
45	FAK2	YIEDEDYYK	9
46	FGFR1	DIHHIDYYK	9
47	FGFR2	DINNIDYYK	9
48	FGFR3	DVHNLDDYYK	9
49	FGFR4	GVHHIDYYK	9
50	IGF1R/INSR	DIYETDYR	9
51	INSRR	DVYETDYR	9
52	LMTK2	EDYIETDDK	9
53	LMTK3	EDYYLTPER	9
54	MUSK	NIYSADYYK	9
55	NTRK1	DIYSTDYR	9
56	NTRK2/3	DVYSTDYR	9
57	RON	EYYSVQQHR	9
58	ROR1	EIYSADYYR	9
59	ROR2	EVYAADYYK	9
60	EGFR	EYHAEGGK	8
61	ERBB3	QLLYSEAK	8
62	ERBB4	EYNADGGK	8
63	KIT	NDSNYVVK	8
64	MERTK	IYSGDYR	8
65	MET	EYYSVHVK	8
66	TYRO3	IYSGDYR	8

[0245]

67	UFO	IYNGDYR	8
68	KSYK	ADENYYK	7
69	PGFRB	DSNYISK	7
70	TIE1	GEEVYVK	7
71	TIE2	GQEVYVK	7
72	JAK1	EYYTVK	6
73	JAK3	DYYVVR	6
74	VGFR1	NPDYVR	6
75	VGFR2/3	DPDYVR	6
76	ALK	ASYR	5
77	LTK	ASYR	5
78	ROS1	NDYR	5
79	JAK2	EYYK	4

[0246] 对9个不同细胞系中每一个细胞系,使用质谱的无标记定量生成31个TK中活化环Tyr磷酸化的概况。很明显不同的细胞系具有不同的概况,这表明TK活化是细胞类型特异性的,例如,Jurkat细胞似乎通常具有相对活性的CTK和相对无活性的RTK。这表明磷酸酪氨酸信号传导在Jurkat T细胞中由CTK主导,并且在其他造血细胞类型中可能也占主导,而RTK与之相反,其可能在本文所检测的上皮癌细胞中发挥更重要的作用。

[0247] 为了确定磷酸化蛋白质组学数据是否忠实地重现体内蛋白质磷酸化,在来自实施例4的4个乳腺癌细胞系(MDA-MB-231、BT-474、SK-BR-3和MCF-7)的裂解物上进行免疫沉淀(IP)以及免疫印迹(IB,也称之为Western印迹)。

[0248] 15分钟过钒酸盐处理后收集MDA-MB-231、BT-474、SK-BR-3和MCF-7的全部细胞裂解物。对于IP,将1mg细胞裂解物与2 $\mu$ g抗-ErbB2或抗-IGF-1R $\beta$ 抗体在4 $^{\circ}$ C孵育4小时。然后将蛋白质G珠用于抗体沉淀。通过SDS-PAGE将样品分离,然后分别用抗-ErbB2、抗-pY877-ErbB2、抗-IGF1R $\beta$ 、抗-pY1161/1165/1166 IGF-1R $\beta$ 、抗-Grb2和抗-IRS-1进行免疫印迹。作为对照,全部细胞裂解物分别针对Grb2、IRS-1和 $\beta$ -微管蛋白进行免疫印迹。

[0249] 图9A和9B示出IP/IB分析的结果,其与图8所示的活化环磷酸化概况基本一致。具体而言,ErbB2在BT-474和SK-BR-3细胞中的Tyr877上被高度磷酸化(FIG. 9A);而IGF-1R中的活化环Tyr残基在MCF-7细胞中被高度磷酸化,在BT-474和MDA-MB-231细胞中被中度磷酸化,但是在SK-BR-3细胞中无可检测到的磷酸化(图9B)。

[0250] 为了确定通过磷酸化蛋白质组学确定的TK活化环磷酸化水平是否预测激酶活性,在相同的IP/IB实验中检测下游蛋白质Grb2对ErbB2以及IRS-1对IGF-1R的活化依赖性招募(Xie, Y.M.等,“Grb2的显性阴性突变体诱导由点突变激活的大鼠HER-2/Neu引起的转化表型的逆转(Dominant-negative mutants of Grb2 induced reversal of the transformed phenotypes caused by the point mutation-activated rat HER-2/Neu)”,(1995) J.Biol.Chem.270:30717-30724;SeppLorenzino, L.等,“MDA-MB-453乳腺癌细胞中调蛋白诱导的信号传导途径(Signal transduction pathways induced by heregulin in MDA-MB-453 breast cancer cells)”,(1996) Oncogene 12:1679-1687;Dey, B.R.等,“胰岛素样因子I受体与IRS-1、Shc和Grb10的直接相互作用的证据(Evidence

for the direct interaction of the insulin-like growth factor I receptor with IRS-1, Shc, and Grb10”, (1996) *Molecular Endocrinology* 10:631-641; Tartare-Deckert, S. 等, “SHC和胰岛素受体底物-1 (IRS-1) 与胰岛素样因子I受体在酵母双杂交系统中差异性相互作用的证据 (Evidence for a differential interaction of SHC and the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) with the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in the yeast two-hybrid system)”, (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 23456-60)。与预测一致, 磷酸化的ErbB2招募更多的Grb2, 而活化的IGF-1R招募更多的IRS-1 (图9A和9B)。

[0251] 在图9A和9B中, ErbB2和IGF-1R活化环残基上可检测到的Tyr磷酸化和IP中ErbB2和IGF-1R的整体丰度之间似乎存在关联。然而, 通常, 由9个细胞系中6个细胞系 (BT-474、HepG2、Jurkat、MCF-7、SK-BR-3、MDA-MB-231) 中关于mRNA丰度的公开数据确定的TK基因表达的相对水平 (Barretina, J. 等, “癌症细胞系百科全书能够对抗癌药物敏感性预测建模 (The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modeling of anticancer drug sensitivity)” (2012) *Nature* 483:603-607) 并不是由通过实施例4的磷酸化蛋白质组学分析所确定 (图10A-10D) 的TK活化环磷酸化的相对水平的可靠指标。

[0252] 尽管在ErbB2的情况下难以辨别磷酸化和增强的蛋白质表达的贡献, 但在IGF-1R的情况下, 似乎清楚的是活化环磷酸化而非蛋白质表达与BT-474细胞中的激酶活化相关。

[0253] 在任何情况下, 鉴定和定量含pTyr的肽可以揭示给定TK中特定位点的Tyr磷酸化的化学计量 (即, 磷酸化的给定TK中给定Tyr残基的比例) 和该TK的总丰度中细胞类型之间的差异。较高的磷酸化化学剂量和较高的丰度可以增加TK活性。

[0254] 实施例8-活化环Tyr磷酸化概况可以预测对具体TK抑制剂和其组合的敏感性

[0255] 分子靶向的疗法中有效的策略是选择性地抑制驱动肿瘤发生的酪氨酸激酶 (参见例如, Barretina等; Takeuchi, K. 和 Ito, F., “受体酪氨酸激酶和靶向的癌症治疗 (Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics)”, (2011) *Biol. Pharm. Bull.* 34: 1774-80; Levitzki, A., “酪氨酸激酶抑制剂: 选择性、敏感性和临床表型的观点 (Tyrosine kinase inhibitors: views of selectivity, sensitivity, and clinical performance)”, (2013) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53: 161-85; Zaman, N. 等, “突变和拷贝数变异的信号传导网络评估预测乳腺癌亚型特异性的药物靶标 (Signaling network assessment of mutations and copy number variations predict breast cancer subtype-specific drug targets)”, (2013) *Cell Rep.* 5: 216-23)。在来自实施例4的四个乳腺癌细胞系 (MCF-7、BT-474、SK-BR-3、MDA-MB-231) 上测试该治疗原则, 其显示了TK活化环中pTyr磷酸化的不同概况, 以及因此, TK活化的不同概况 (图8)。

[0256] 根据生产商的推荐, 用CellTiter 96 Aqueous One Solution细胞增殖试验 (普洛麦格公司 (Promega)) 进行细胞生长抑制试验。

[0257] 首先用ErbB2抑制剂拉帕替尼 (lapatinib) 处理来自4个乳腺癌系的细胞 (Esteva, F. J., 等, “乳腺癌中对曲妥珠单抗和拉帕替尼反应的分子预测物 (Molecular predictors of response to trastuzumab and lapatinib in breast cancer)”, (2010) *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7: 98-107)。其中ErbB2为高活性的BT-474和SK-BR-3对拉帕替尼敏感, 然而其中ErbB2活性为低活性的MCF-7和MDA-MB-231对拉帕替尼不敏感 (图11A)。

[0258] 因为IGF-1R/INSR和DDR1在MCF-7中被选择性活化(图8),我们用GSK1838705(IGF-1R/INSR的特异性抑制剂)和DDR1-IN-1(DDR1的抑制剂)处理四个乳腺癌细胞系(Sabbatini,P.等,“GSK1838705A抑制胰岛素样生长因子-1受体和间变性淋巴瘤激酶并且在人癌症实验模型中显示抗肿瘤活性(GSK1838705A inhibits the insulin-like growth factor-1 receptor and anaplastic lymphoma kinase and shows antitumor activity in experimental models of human cancers)”,(2009)Mol.Cancer Ther.8:2811-20; Kim,H.G.等,“有效和选择性DDR1受体酪氨酸激酶抑制剂的发现(Discovery of a potent and selective DDR1 receptor tyrosine kinase inhibitor)”(2013)ACS Chem.Biol.8:2145-50)。GSK1838705而非DDR1-IN-1以剂量依赖性方式抑制MCF-7的增殖,同时两种抑制剂对剩余的乳腺癌细胞系都没有影响(图11A)。该结果表明IGF-1R/INSR在促进MCF-7细胞增殖中起着比DDR1更重要的作用。

[0259] 为了确定DDR1失活与其他活化的TK协作孵育MCF-7细胞生长优势,将测试的MCF-7细胞与DDR1-IN-1连同拉帕替尼和/或GSK1838705孵育。与MCF-7细胞对DDR1或ErbB2的单一抑制不敏感相反,两种激酶组合的抑制显著地降低增殖(图11B)。显著地,DDR1、ErbB2和IGF-1R/INSR的三抑制进一步减少MCF-7细胞的增殖,但是对MCF-10A细胞没有影响(图11C)。

[0260] 这些数据表明,通过基于超结合体的磷酸化蛋白质组学进行的定量激酶活性概述可以用于报告癌症治疗以特异性地靶向活化的激酶或其组合。

[0261] 实施例9-获取抗药性期间的TK活性概述

[0262] 如图4中流程图所述,将含pTyr的肽基于超结合体的富集与预定的MRM或PRM质谱组合以在培养的细胞中在获取抗药性期间对TK活性进行概述。

[0263] SK-BR-3细胞在RPMI 1640培养基中生长,所述培养基补充有10%FBS、100 $\mu$ g/ml盘尼西林/链霉素和L-谷氨酰胺。细胞在37 $^{\circ}$ C下含5%二氧化碳的潮湿气氛下孵育。

[0264] 为了促进曲妥珠单抗,将SK-BR3在包含4 $\mu$ g/ml(组1)或8 $\mu$ g/ml(组2)曲妥珠单抗的培养基中连续培养3-6个月,同时通过MTT试验检测细胞增殖。然后将来自2个组的抗性克隆汇集,并维持于 $\mu$ g/ml曲妥珠单抗中。

[0265] 将培养的细胞均质化并在冷裂解缓冲(8M尿素、50mM Tris-HCl pH7.4、2%蛋白酶混合物(v/v,西格玛公司(Sigma)P8340)、1%曲通X-100、1mM C3H7Na2P06、1mM Na407P2、1mM NaF)中裂解。通过离心去除细胞碎片,然后将上清液转移到新鲜的管。然后将5x体积冰冷沉淀溶液(丙酮/乙醇/乙酸=50:50:1,v/v/v)与澄清的细胞裂解物混合,并立刻涡旋。将混合物在-20 $^{\circ}$ C孵育至少60分钟,随后以15,000g在4 $^{\circ}$ C离心4分钟以分离沉淀的蛋白质。用75%冰冷乙醇洗涤蛋白质沉淀,然后风干5分钟以允许乙醇蒸发。

[0266] 将蛋白质首先溶解在质谱(MS)级水制备的8M尿素中。通过二硫苏糖醇(DTT)还原并通过碘乙酰胺(IAA)烷基化后,根据生产商的方案,通过胰蛋白酶消化蛋白质。将消化的产物在C18柱中脱盐,并溶解于包含50mM Tris-HCl(pH7.2)、50mM NaCl和10mM Na2HP04的冰冷免疫亲和力纯化(IAP)缓冲液中。对于含pTyr的肽的富集,将固定于Sulfolink琼脂糖珠(赛默飞世尔公司(ThermoFisher))的SH2超结合体(His<sub>6</sub>/GST-标签标记的TrM Src SH2, SEQ ID NO:11)与肽在IAP缓冲液中孵育,并在4 $^{\circ}$ C轻柔地转动4小时。在IPA缓冲液中洗涤3次后,添加2.5%三氟乙酸(TFA)以从琼脂糖珠释放结合的肽。将洗脱物在C18柱脱盐,并再

次溶解于0.1%甲酸中。对肽进行MS分析。

[0267] 根据实施例7中鉴定的126个可能的TK调节位点,从表8中所列的长于8个氨基酸的含Tyr的TK活化环肽中选择67个肽,用于通过MRM分析。这些肽的Tyr磷酸化形式在体外合成,并且用于确定保留时间,并且优化QTRAP-4000杂交三重四极杆/线性离子阱LC/MS系统中的MS检测参数。由此,建立的保留时间预定的多重反应检测(sMRM)方法。

[0268] 所有MS实验通过sMRM在装配有Waters nanoACQUITY UPLC的AB SCIEX 4000 QTRAP系统上进行。使用对应的合成肽优化活化环肽的方案和碰撞条件。对于活化环肽的绝对定量,还合成了对应的稳定的同位素标记的形式。将限定量的这些肽与消化的产物混合,并通过Src超结合体共纯化。同位素标记的肽在MS分析中用作内标。通过Skyline软件基于MRM色谱图(或TIC)中的相应峰值面积确定活化环肽的相对量。

[0269] ErbB2 (HER2) 活化环在SK-BR-3细胞中被高度Tyr磷酸化(图12A)。然而,在汇集的曲妥珠单抗-抗性克隆中,ErbB2 (HER2) 活化环不再被高度Tyr磷酸化,但是RTK c-KIT的活化环被高度Tyr磷酸化(图12B)。ErbB2-pY877 LLDIDETE<sub>p</sub>YHADGGK的检测到的转变示于图12C,作为通过MRM的肽鉴定的示例。

[0270] 实施例10-TK活性概述可以预测药物敏感性

[0271] 来自实施例9的TK活性概述可以预测药物敏感性。

[0272] 原始SK-BR-3克隆具有高ErbB2 (HER2) 活性(图12A)并且对曲妥珠单抗敏感(图13A),而曲妥珠单抗-抗性克隆(此处为单数的“克隆”)的汇集具有较低ErbB2 (HER2) 活性(图12B)并且对曲妥珠单抗较不敏感(图13A)。

[0273] 相似地,相对于其中c-KIT不具有高活性的原始SK-BR-3克隆(图12A),曲妥珠单抗-抗性克隆中的高c-KIT活性(图12B)与对伊马替尼较高的敏感性相关(图13B),所述伊马替尼是c-KIT/Abl激酶抑制剂。曲妥珠单抗-抗性克隆也对通过曲妥珠单抗和伊马替尼的ErbB2 (HER2) 和c-KIT的组合抑制更敏感。

[0274] 通过MTT细胞增殖试验测量药物敏感性。

[0275] 实施例11-用超结合体亲和力纯化和随后进行预定PRM(SAP-PRM),在速冻实体瘤样品中进行TK活性概述

[0276] 使用SAP-PRM在速冻(手术切除30分钟内在液氮中冷冻)、三阴性乳腺癌(TNBC)活检物的3个样品中对TK活性进行概述。三阴性乳腺癌(ER-/PR-/HER2-)特征:不存在雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)的表达,以及缺乏HER2基因的扩增。根据对应的活化环肽的峰面积(图14A),LMTK2经检测是除了内部对照GSK3外最活化的TK,并且可以在所有3个样品中观测到(图14A、C和D)。当从一个样品中去除这两个峰并且比例减小时(图14B),可以观察到较少活化的TK(例如,EPHA5/7、BMX、BTK)。

[0277] SAP-PRM分析可以是高度敏感性的。图14A-D中的TK活性概况各自获自30μg来自癌症活检物的胰蛋白酶蛋白质消化物的SAP-PRM分析。但是,6μg来自活检物之一的胰蛋白酶蛋白质消化物(图15B)的SAP-PRM分析鉴定了原始概况中主要的峰值(例如,LMTK2、GSK3、TXK)(图15A)。此外,仅2μg来自SK-BR-3细胞的胰蛋白酶蛋白质消化物的SAP-PRM分析再现性地鉴定了3个活化的TK(图16A-B)。

[0278] 图14-16中的TK活性概况通过如下的SAP-PRM分析获得。

[0279] 组织和细胞:将来自患有三阴性乳腺癌的三名患者的肿瘤活检物在液氮中迅速冷

冻并储存在液氮中。使用新鲜培养的SK-BR-3细胞。

[0280] 来自各活检物和细胞样品的澄清的裂解物:对于冷冻活检物,在液氮预冷却的研钵中从冷冻活检物切下适当大小的样品。然后在微组织研磨器中用300 $\mu$ L的4 $^{\circ}$ C新鲜制备的裂解缓冲液(8M尿素,2%蛋白酶抑制剂混合物(v/v,西格玛公司P8340)、50mM Tris-HCl(pH 7.6)、1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)将活检物样品研磨。以与实施例9中所述相同的方法处理SK-BR-3细胞。

[0281] 将组织和细胞裂解物转移到新鲜1.7mL微离心管中,并通过在4 $^{\circ}$ C旋转10分钟混合。然后将管在冰水浴中超声处理,然后以20,000相对离心力(rcf)在4 $^{\circ}$ C离心15分钟。将上清液(澄清的裂解物)转移到1.7mL微离心管。

[0282] 由澄清的裂解物收集蛋白质:将5x体积冷沉淀溶液(丙酮/乙醇/乙酸为50:50:50, v/v/v)添加到各澄清的裂解物,并立刻将管涡旋。将管在-20 $^{\circ}$ C孵育至少2小时,随后以20,000rcf在4 $^{\circ}$ C离心15分钟以沉淀蛋白质。去除上清液,并向各管添加1mL冷75%乙醇。再次将管以20,000rcf在4 $^{\circ}$ C离心15分钟。去除上清液,并将蛋白质沉淀风干1分钟。为了获得蛋白质溶液,将100 $\mu$ L的8M尿素或6M盐酸胍(GuHCl)添加到各管,然后通过旋转或超声处理以再次溶解蛋白质沉淀。

[0283] 制备胰蛋白酶蛋白质裂解物:对于各蛋白质溶液,添加DTT至5mM最终浓度,然后在室温将管旋转1小时。然后,向各蛋白质溶液添加新鲜的1M碘乙酸至14mM的最终浓度,并且在黑暗环境中在室温将管旋转1小时。然后,为了淬灭未反应的碘乙酸,向各蛋白质溶液添加更多的DTT以使最终DTT浓度再增加5mM,并在室温将管旋转1小时。然后确定各蛋白质溶液中的蛋白质浓度。

[0284] 用50mM Tris(pH 7.6)和5mM CaCl<sub>2</sub>的溶液稀释各蛋白质溶液,从而使最终的尿素浓度小于2M或最终的GuHCl浓度小于1M。然后,将胰蛋白酶添加到各稀释的蛋白质溶液中以实现1:20的胰蛋白酶:蛋白质摩尔比,并将管在37 $^{\circ}$ C旋转/摇晃16小时。然后,将TFA添加到各胰蛋白酶/蛋白质溶液至1%(v/v)的最终浓度,并在4 $^{\circ}$ C以20,000rcf将管离心15分钟以沉淀胰蛋白酶。将上清液各自上样并流过调节的C18脱盐柱。然后,用0.1%TFA洗涤各柱,用80%CAN将肽洗脱以获得各样品的胰蛋白酶蛋白质消化物。

[0285] 超结合体亲和力纯化:将超结合体蛋白质(His<sub>6</sub>/GST-标签标记的TrM Src SH2, SEQ ID NO:11)以10 $\mu$ g蛋白质/ $\mu$ L珠粒的浓度固定于Sulfolink琼脂糖珠(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher))。

[0286] 将各胰蛋白酶蛋白质消化物溶解于1.7mL微离心管的500 $\mu$ L的IAP缓冲液中,如实施例9。对于胰蛋白酶消化之前小于500 $\mu$ g的蛋白质样品,添加200 $\mu$ g的Superbinder蛋白质(20 $\mu$ L珠)。对于胰蛋白酶消化之前超高500 $\mu$ g(多至数毫克)的蛋白质样品,添加400 $\mu$ g的超结合体蛋白质(40 $\mu$ L珠)。将管在4 $^{\circ}$ C旋转4小时,然后离心以使珠旋转下降。将上清液从各管中去除。通过将珠上下吸取数次,然后使珠旋转下降并去除上清液,将各管中的珠在500 $\mu$ L的IAP中洗涤4次。然后,将各管中的珠重悬于5%TFA中,于室温孵育10分钟,然后旋转下降。将上清液各自转移到新鲜的管,然后真空干燥。将干燥的肽样品各自溶解于水中,并在4 $^{\circ}$ C以20,000rcf离心15分钟以去除任何颗粒。将上清液各自转移到质谱样品瓶。

[0287] 检测靶向的含pTyr的肽:将装配有Easy-nLC1000液相色谱系统的Q-Exactiva杂交四极杆-Orbitrap质谱仪(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific)用于PRM分析。通过液相色谱使用线性梯度的溶剂A(水中的0.1%甲酸)至B(乙腈中的0.1%甲酸)将通

过SAP富集的肽分离。将肽首先上样到nanoViper捕获柱(C18, 3 $\mu$ m, 100  $\text{\AA}$ , 75 $\mu$ mX20mm, 赛默飞世尔公司)中,然后在EASY-Spray分析柱(C18, 2 $\mu$ m, 100  $\text{\AA}$ , 75 $\mu$ mX500mm, 赛默飞世尔公司)使用预制的电喷雾发射器分离。在45分钟内使用3%-35%B的线性梯度,然后在8分钟内使用35%-95%B的线性梯度,以300nL/分钟的流速洗脱肽。最终,用95%B将柱洗涤7分钟。在Q-Exactive中预定平行反应监测(PRM)方法中获得数据,并在Xcalibur软件中将靶向的肽列入包含列表中,默认电荷+2。将MS2扫描设置在17,500(at m/z 200)的分辨率,AGC靶标 $2 \times 10^5$ ,最大注射时间250毫秒,分离窗2.5m/z,标准化的碰撞能量27。

[0288] 实施例12-用超结合体亲和力纯化和随后进行预定PRM(SAP-PRM),在液体肿瘤样品中进行TK活性概述

[0289] 来自急性髓细胞白血病(AML)患者和正常个体的外周血单核细胞由维多利亚医院(Victoria Hospital)(加拿大安大略省伦敦市)提供,用于使用SAP-PRM方法的激酶组概况。90 $\mu$ g来自AML的蛋白质消化物的分析显示鉴定出的HCK/Lyn、Src、FES、BTK和EPHB2为高度活化的(图17A)。来自健康个体的对照样品(20 $\mu$ g蛋白质消化物)的分析仅鉴定出HCK/Lyn和Src为活化的TK(图17B)。

[0290] 实施例13-用超结合体亲和力纯化和随后进行预定PRM(SAP-PRM),对检查点抑制剂的影响进行概述

[0291] 本公开的的应用将确定免疫调节药物如PD-1或PD-L1抑制剂的药效学或作用机制。数个这类抑制剂已经被FDA批准用于癌症患者。基于免疫检查点抑制剂的疗法的限制是这类疗法的作用机制尚未完全理解,而这成为了预测患者对给定免疫检查点疗法的反应的困难基础。

[0292] 包括BPS生物科学公司(BPS Bioscience)的几家公司已经开发了用于评价PD-1或PD-L1抑制剂的体外细胞系统(即,抑制PD-1和PD-L1之间相互作用的抗体)(图18A)。在该系统中,表达PD-1的Jurkat细胞可以在不存在或存在抑制性抗体的情况下与表达PD-L1的CHO细胞共培养,以确定抑制剂对Jurkat T细胞活化的影响。相较于没有抗体的细胞,在抗-PD-L1抗体(BPS生物科学公司)存在的条件下,表达PD-1的Jurkat T细胞的SAP-PRM分析在TCR共受体CD3 $\zeta$ 和CD3 $\zeta$ 中检测到增加ITAM肽的Tyr磷酸化(图18B)。

[0293] 根据本公开,该发现扩展了免疫概述在其他细胞或组织样品中的应用。免疫受体的分析鉴定了195ITRM(包括ITAM、ITIM和ITSM)序列(表2),其可以通过SAP-PRM或SAP-MRM方法检测。可以预期的是,基于使用SAP-PRM/MRM方法的ITRM磷酸化系统性鉴定的免疫概述将提供免疫系统的全局视图。此外,疾病组织和正常对照之间或在获自治疗之前和之后的样本之间的ITRM磷酸化的定量变化将提供关于免疫调节药物的疾病机制和作用机制的有价值的信息。

[0294] 实施例14-在福尔马林固定的、石蜡包埋(FFPE)的肿瘤标本中进行TK活性和浸润的T细胞的同时概述

[0295] SAP-PRM分析能够在FFPE非小细胞肺癌活检物(图19A)和FFPE乳腺癌活检物(图19B)中对活化的TK和浸润的T细胞进行概述。

[0296] 该发现扩展了根据本公开的TK和免疫概述的应用。作为一个示例,在FFPE活检物中对TK活性进行概述的能力可以允许回顾性研究治疗(例如,放射,药物)和治疗结果(例如,缓解,死亡)如何与一系列不同癌症和其他疾病中的TK活性相关联。来自活检物的样品

通常用福尔马林固定并包埋在石蜡中用于组织学分析。这类样本通常由卫生保健机构存档,并且可以用于TK概述。对TK和浸润的T细胞进行概述的能力可以允许设计这样的组合疗法,所述组合疗法靶向活化的TK和免疫检查点。

[0297] 图9A和B中的TK活性概况通过如下的SAP-PRM分析获得。

[0298] 收集FFPE样品:将FFPE活检物样品各自包埋在5 $\mu$ m厚的石蜡板中,所述石蜡板固定在显微镜载玻片上。这样将载玻片脱蜡:将其连续地浸入三个新鲜的二甲苯瓶中,然后是但个新鲜的乙醇瓶中。脱蜡将活检物样品暴露,将其收集并转移至分离1.7mL微离心管中。

[0299] 来自FFPE样品的澄清的裂解物:向各管添加200 $\mu$ L的新鲜制备的裂解缓冲液(6M GuHCl, 50mM Tris-HCl (pH 7.6), 50mM DTT)。将管置于沸水中20分钟,然后在80 $^{\circ}$ C下加热2小时。然后,以20,000rcf在4 $^{\circ}$ C将管离心15分钟以除去任何未溶解的碎片,然后将上清液(澄清的裂解物)各自转移到新鲜的1.7mL微量离心管中。

[0300] 如实施例12中那样在FFPE样品的SAP-PRM分析中进行剩余步骤,从阶段由澄清的裂解物收集蛋白质开始,但有一个例外。例外是在阶段由澄清的裂解物收集蛋白质中,其中对于FFPE样品,跳过向溶解的蛋白质添加DTT至5mM并旋转管1小时的初始步骤。

[0301] 实施例15-分析源自TK活化环的含pTyr的肽的混合物。

[0302] 将相同摩尔量(10nmole)的野生型(wt)人Src SH2结构域和表达His<sub>6</sub>和GST标签的DM和TrM人Src SH2超结合体(分别为SEQ ID NO:14和5)用于从源自54个TK活化环的54个不同的含pTyr肽(各10pmol)的混合物捕获包括Tyr的肽。通过PRM鉴定分离的肽,并根据对应的MS峰面积进行定量。将1.8%洗脱的肽注射到运行nano-LC系统的Q-Exactive(赛默飞世尔公司)。

[0303] TrM人Src SH2超结合体捕获该混合物中所有54个含pTyr的肽,并通过PRM同时对其进行检测(表9)。与之相对,DM人Src SH2超结合体检测到54个含pTyr的肽中的32个,而wt SH2结构域仅检测到54个含pTyr的肽中的22个(表9)。除了一个含pTyr的肽,TrM人Src SH2超结合体比wt人Src SH2结构域捕获更多,并且在大多数情况下非常多的含pTyr的肽(表9)。通常,DM人Src SH2超结合体比wt人Src SH2结构域捕获更多的含pTyr的肽(表9)。

[0304] 对于在54个含pTyr的肽的混合物中经概述的含pTyr的肽中的一个:EPHA8(pTyr793)肽,图20显示了通过DM和TrM人Src SH2超结合体针对EPHA8检测的子离子质谱,这与使用wt人Src SH2结构域时未检测到相反。本示例证明了在概述蛋白质酪氨酸磷酸化中使用DM或Trm人Src SH2超结合体亲和力纯化(SAP)并随后使用预定的PRM分析的实用性,这是基于超结合体相对于亲本SH2结构域的结合亲和性增加所预期的。

[0305] 表9双突变型(DM)和三突变型(TrM)人Src SH2超结合体比亲本Src SH2结构域(wt)捕获更多的含pTyr的肽。

[0306]

激酶名称(Tyr磷酸位点)	含pTyr的肽的序列	片段离子	PRM信号峰面积		
			wt	DM	TrM
FGFR3 (pTyr647/648)	DVHNLDpYpYK	b3	103,678	64,641	258,435
ROR2 (pTyr645/646)	EVYAADpYpYK	y5	85,894	60,460	334,295
JAK1 (pTyr1034/1035)	EpYpYTVK	y2	58,254	46,193	109,611
FGFR2 (pTyr656/657)	DINNIDpYpYK	y4	51,625	39,469	87,143
DDR1 (pTyr796/797)	NLYAGDpYpYR	b2	47,729	43,173	337,871
MUSK (pTyr755/756)	NIYSADpYpYK	y2	47,647	0	178,086
ERBB3 (pTyr866)	QLLpYSEAK	y2	41,881	151,587	164,128
NTRK2 (pTyr706/707)	DVYSTDpYpYR	y4	39,632	22,794	114,762
ROR1 (pTyr645/646)	EIYSADpYpYR	y6	32,356	27,661	177,244
LMTK3 (pTyr296/297)	EDpYpYLTPER	y3	29,887	78,610	375,974
FGFR4 (pTyr642/643)	GVHHIDpYpYK	b3	29,764	29,983	36,105
FGFR1 (pTyr653/654)	DIHHIDpYpYK	b6	28,495	28,967	51,243
MET (pTyr1234/1235)	EpYpYSVHNK	y2	26,824	70,811	111,218
JAK3 (pTyr980/981)	DpYpYVVR	y2	23,291	10,521	19,712
NTRK1 (pTyr680/681)	DIYSTDpYpYR	b2	21,736	30,204	103,368
DDR2 (pTyr740/741)	NLYSGDpYpYR	y6	15,251	16,232	184,684
TYK2 (pTyr1054/1055)	AVPEGHEpYpYR	y6	11,551	9,679	53,473
EPHB2 (pTyr780)	FLEDDTSDPTpYTSALGGK	y3	10,833	98,045	215,302
RON (pTyr1238/1239)	EpYpYSVQQHR	y4	5,434	17,370	44,290

[0307]

BTK (pTyr551)	YVLDDepYTSSVGSK	b2	4,214	18,246	1,311,693
EPHA6 (pTyr830)	VLEDDPEAApYTTTGGK	b2	2,742	51,066	287,653
TXK (pTyr420)	YVLDDepYVSSFGAK	b2	1,519	46,128	271,650
EPHA8 (pTyr793)	VLEDDPDAApYTTTGGK	y11	0	57,102	585,234
JAK2 (pTyr221)	IQDpYHILTR	y3	0	39,232	85,513
EPHB3 (pTyr792)	FLEDDPSDPTpYTSSLGGK	y10	0	14,654	260,454
EPHA1 (pTyr781)	LLDDFDGTpYETQGGK	y9	0	12,335	188,365
INSRR (pTyr1145/1146)	DVYETDpYpYR	y5	0	7,794	20,796
EPHA2 (pTyr772)	VLEDDPEATpYTTSGGK	y11	0	4,858	347,030
PTK7 (pTyr960/961)	DVYNSEpYpYHFR	b2	0	4,843	8,863
TEC (pTyr519)	YVLDDQpYTSSSGAK	b2	0	4,818	781,110
ERBB2 (pTyr877)	LLDIDETpYHADGGK	b3	0	4,642	42,655
LMTK2 (pTyr295)	EDpYIETDDK	b2	0	1,124	20,896
RET (pTyr905)	DVYEEDSpYVK	b2	0	0	882,529
SRMS (pTyr380)	DDIpYSPSSSSK	y8	0	0	478,598
TIE1 (pTyr1007)	GEEVpYVK	b2	0	0	409,242
ITK (pTyr512)	FVLDDQpYTSSTGTK	y11	0	0	403,125
PGFRB (pTyr857)	DSNpYISK	y2	0	0	398,271
EPHA3 (pTyr779)	VLEDDPEAApYTTR	y8	0	0	394,218
HCK (pTyr411)	VIDNEpYTAR	b2	0	0	383,521
FRK (pTyr387)	VDNEDIpYESR	y6	0	0	290,546
KIT (pTyr823)	NDSNpYVVK	b2	0	0	234,665
TIE2 (pTyr992)	GQEVpYVK	b2	0	0	209,701
EPHB1 (pTyr778)	YLQDDTSDPTpYTSSLGGK	y10	0	0	205,974
VGFR2 (pTyr1059)	DPDpYVR	y3	0	0	196,659
VGFR1 (pTyr1053)	NPDpYVR	y3	0	0	158,244
BLK (pTyr389)	IIDSEpYTAQEGAK	b2	0	0	156,244
BMX (pTyr566)	YVLDDQpYVSSVGTK	b2	0	0	151,470
EPHB4 (pTyr774)	FLEENSSDPTpYTSSLGGK	y10	0	0	134,156

[0308]

SRC (pTyr419)	LIEDNEpYTAR	b2	0	0	99,515
GSK3 (pTyr279/216)	GEPNVSpYICSR	y6	0	0	48,337
FER (pTyr714)	QEDGGVpYSSSGLK	y7	0	0	27,417
MERTK (pTyr753/754)	IYSGDpYpYR	b2	0	0	26,483
FES (pTyr713)	EEADGVpYAASGGLR	y8	0	0	25,101

[0309] 示出的是根据PRM信号对应的峰面积,由亲本Src SH2结构域与DM和Trm人Src SH2超结合体各自捕获的含pTyr的肽的量。

[0310] 实施例16-QuadM-TrM串联超结合体比Trm人Src超结合体捕获更多的含pTyr的肽

[0311] 在大肠杆菌中通过表达这样的重组DNA来产生QuadM-TrM串联超结合体 (SEQ ID NO:15),所述重组DNA包含与编码Trm人Src超结合体 (SEQ ID NO:5) 的基因串联的编码QuadM人Src超结合体 (SEQ ID NO:12) 的基因。将相同摩尔量 (200pmole) 的QuadM-TrM串联超结合体和Trm人Src SH2超结合体用于由源自ITRM的40个不同的含pTyr的肽 (各200fmole) 的混合物捕获含pTyr的肽。通过预定的PRM鉴定分离的肽,并根据对应的MS峰面积进行定量。

[0312] 表10显示了通过将2个不同的SH2超结合体组合到具有串联结构域的单超结合体实现了捕获含pTyr的肽的改善。此外,在QuadM-TrM串联超结合体优选捕获的前10个含pTyr的肽中,8个在pTyr+3位置处缺少疏水性残基。Src SH2TrM优选疏水性pTyr+3残基,但是QuardM并不如此。QuardM超结合体与Grb2SH2结构域的特异性相似,所述Grb2SH2结构域优选在pTyr+2位置处的Asn残基,但对pTyr+3位置没有明显的偏好。串联的两个超结合体的组合使得捕获优选被两个超结合体结合的肽成为可能。作为将两个超结合体组合为单个蛋白质的结果,QuadM-TrM串联超结合体能够以pTyr+3处的亲水性残基结合比Trm人Src超结合体更多的含pTyr的肽。

[0313] 表10:QuadM-TrM串联超结合体比Trm人Src超结合体捕获更多的含pTyr的肽

[0314]

蛋白质名称_Tyr磷酸位点	含pTyr的肽的序列	氨基酸位置		(QT-TrM) /平均值
		0	+3	
TRAF3IP3_pY179	GQQIYpYHK	pY		1.5
CD247_pY72	SADAPAYQQGQNQLpYNELN LGR	pY	L	1.5
CD28_pY218	DFAApYR	pY		1.3
ARHGEF6_pY644	KPSEEEpYVIR	pY	R	1.2
PLCG2_pY1245	EFSVNENQLQLpYQEK	pY	K	1.2
ITK_pY512	FVLDDQpYTSSTGTK	pY	S	1.0
TRAF3IP3_pY178/179	GQQIpYpYHK	pY	K	0.9
C9orf78_pY277	ATDDpYHYEK	pY	E	0.6
RBMX_pY335	SDLpYSSGR	pY	G	0.6
CD3E_pY188	ERPPPVPNPdpYEPIR	pY	I	0.5
EXOC4_pY51	LEEApYEK	pY		0.5
PJA2_pY28	AVWPKPAGGpYQTITGR	pY	I	0.4
CD247_pY142	GHDGLpYQGLSTATK	pY	L	0.4
LCPI1_pY300	AYpYHLLQVAPK	pY	L	0.4
RFTN1_pY20	RPGNIpYSTLK	pY	L	0.3
ASNS_pY216	DVPLHALpYDNVEK	pY	V	0.3
ZAP70_pY292	IDTLNSDGpYTPEPAR	pY	E	0.3
HCLS1_pY175	AALGpYDYK	pY	K	0.3
ARID1A_pY229	SAYPPPAPApYALSSPR	pY	S	0.3
ARFGAP2_pY445	EVDAEpYEAR	pY	R	0.3
CD3D_pY160	DDAQpYSHLGGNWAR	pY	L	0.3
CLPTM1L_pY527	VNEFGESpYEEK	pY	K	0.3
CD28_pY206/209	HpYQPpYAPPR	pY	pY/P	0.3
ARHGAP15_pY219	SSSTELLSHpYDSDIK	pY	D	0.3
LAT_pY220	EpYVNVSQELHPGAAK	pY	V	0.2

[0315]

CD3G_pY160	QTLLPNDQLpYQPLK	pY	L	0.2
ZAP70_pY164	MPWpYHSSLTR	pY	S	0.2
TLR7_pY1041	NALATDNHVApYSQVFK	pY	V	0.1
CD84_pY316	EEPVNTVpYSEVQFADK	pY	V	0.1
LIMD2_pY102	GNpYDEGFGR	pY	G	0.0
CD247_pY111	NPQEGLpYNELQK	pY	L	0.0
DBN1_pY34	ALpYTYEDGSDDLK	pY	E	0.0
CD3G_pY171	EDDQpYSHLQGNQLR	pY	L	0.0
CD3E_pY199	DLpYSGLNQR	pY	L	0.0
PTPN7_pY149	AQSQEDGpYINANYIR	pY	A	0.0
SPEN_pY1399	ASALpYESSR	pY	S	-0.1
CD84_pY296	IpYDEILQSK	pY	I	-0.1
LAT_pY110	DSDGANSVASpYENEGASGIR	pY	E	-0.2
THUMPD1_pY22	AQpYVLAK	pY	A	-0.2
SIT1_pY148	pYSEVVLDSEPK	pY	V	-0.2

[0316] 显示的是通过“(QT-TrM)/平均值”的值限定的各含pTyr的肽对QuadM-TrM串联超结合体相对TrM人Src SH2超结合体的相对偏好,其中“QT”表示通过QuadM-TrM串联超结合体捕获的含pTyr的肽的量,“TrM”表示通过TrM人Src SH2超结合体捕获的含pTyr的肽的量,并且“平均值”表示通过QuadM-TrM串联超结合体和TrM人Src SH2超结合体两者捕获的含pTyr的肽的平均量。黄色和蓝色阴影框分别表示在含pTyr的肽的序列中pTyr+3位置处的疏水性和亲水性残基。

[0317] 结束语

[0318] 本文所引用的所有文件通过引用全部纳入,就好像各发表物或专利申请特定和单独地通过引用纳入本文那样。

[0319] 本文未明确讨论的变化和修改可以是显而易见的,并且可以由本领域技术人员基于本公开做出。

[0320] 应当理解的是,本文所述任何数值范围旨在具体包括给定范围内的任何中间值或子范围,并且单独且具体地公开了所有这些中间值和子范围。

[0321] 应当理解的是,词语“一个”或“一种”旨在表示“一个/种或多个/种”或“至少一个/种”,并且本文任何单数形式旨在包括复数形式,除非上下文清楚地指明。

[0322] 将进一步理解的是,除非另有明确说明,术语“包括”及其任何变型旨在是开放式的,并且表示“包括但不限于”,即包括特定所述元素或组件而不排除任何其他元素或组件。

[0323] 当在本文所给定项目列表的最后一个项目之前带有“或”时,可以选择和使用所列

项目中的任何一个或所列项目中的两个或更多个的任何合适组合。

[0324] 如本说明书和所附权利要求中所用,给出的全部范围或队列均意在表述任何中间值或范围或其中所含的任何子队列。

[0325] 在整个说明书中可以使用以下标准的单字母和三字母的氨基酸残基缩写:A,Ala-丙氨酸;R,Arg-精氨酸;N,Asn-天冬酰胺;D,Asp-天冬氨酸;C,Cys-半胱氨酸;Q,Gln-谷氨酰胺;E,Glu-谷氨酸;G,Gly-甘氨酸;H,His-组氨酸;I,Ile-异亮氨酸;L,Leu-亮氨酸;K,Lys-赖氨酸;M,Met-蛋氨酸;F,Phe-苯丙氨酸;P,Pro-脯氨酸;S,Ser-丝氨酸;T,Thr-苏氨酸;W,Trp-色氨酸;Y,Tyr-酪氨酸;和V,Val-缬氨酸。

[0326] 术语“连接(ligand)”表示结合其他分子或靶标的分子。

[0327] 应当理解的是,本公开的方法在不同的实施方式中提供了通过鉴定和概述存在于激酶中(例如活性环中)或处于激酶中其他Tyr磷酸位点的含pTyr的肽来对激酶活性进行概述的方法。

[0328] 结合SH2超结合体后从样品移出的含pTyr的肽可以通过质谱进行鉴定并通过质谱进行定量,如多重反应监测、选择性反应监测或平行反应监测质谱。

[0329] 在不同实施方式中,本方法可以优选用于通过对人细胞、组织或活检物中酪氨酸激酶活性进行概述来对其中酪氨酸激酶活性失调的任何人疾病(如癌症)进行诊断或预后。本文特别考虑的是乳腺癌、肺癌、前列腺癌和白血病的诊断或预后。

[0330] 同样考虑的是对酪氨酸激酶活性进行概述,以鉴定促进人癌症抗药性、或人癌症的生长、或人癌症的转移的酪氨酸激酶。应当理解的是,由酪氨酸激酶鉴定和定量含pTyr的肽可以进行此类鉴定,例如,通过与来自参照非癌症样品的酪氨酸激酶概况进行比较,或由酪氨酸激酶在来自给定癌症类型的样品的大部分中被激活的发现。

[0331] 还应当意识到的是,在不同实施方式中,酪氨酸激酶或含其他磷酸化酪氨酸的蛋白质可以经鉴定作为药物介入的靶标,例如,通过鉴定这样的酪氨酸激酶或含其他磷酸化酪氨酸的蛋白质,其磷酸化在治疗期间或之后(可能包括酪氨酸激酶抑制、化疗、PD-1抑制和CTLA-4抑制)被改变(例如,量级或频率)。

[0332] 当然,本发明的上述实施方式仅旨在说明,绝非限制。易于对本发明所述实施方式的形式、部件布置、细节和操作顺序进行许多修改。相反,本发明旨在将所有这类修改包括在其范围之内,如由权利要求所限定。

[0333] 序列

[0334] SEQ ID NO:1,智人(Homo sapiens),全长Src蛋白质

[0335] MetGlySerAsnLysSerLysProLysAspAlaSerGlnArgArgArgSerLeuGluProAlaGluAsnValHisGlyAlaGlyGlyGlyAlaPheProAlaSerGlnThrProSerLysProAlaSerAlaAspGlyHisArgGlyProSerAlaAlaPheAlaProAlaAlaAlaGluProLysLeuPheGlyGlyPheAsnSerSerAspThrValThrSerProGlnArgAlaGlyProLeuAlaGlyGlyValThrThrPheValAlaLeuTyrAspTyrGluSerArgThrGluThrAspLeuSerPheLysLysGlyGluArgLeuGlnIleValAsnAsnThrGluGlyAspTrpTrpLeuAlaHisSerLeuSerThrGlyGlnThrGlyTyrIleProSerAsnTyrValAlaProSerAspSerIleGlnAlaGluGluTrpTyrPheGlyLysIleThrArgArgGluSerGluArgLeuLeuLeuAsnAlaGluAsnProArgGlyThrPheLeuValArgGluSerGluThrThrLysGlyAlaTyrCysLeuSerValSerAspPheAspAsnAlaLysGlyLeuAsnValLysHisTyrLysIleArgLysLeuAspSerGlyGlyPheTyrIleThrSerArgThrGlnPheAsnSerL

euGlnGlnLeuValAlaTyrTyrSerLysHisAlaAspGlyLeuCysHisArgLeuThrThrValCysProThrSerLysProGlnThrGlnGlyLeuAlaLysAspAlaTrpGluIleProArgGluSerLeuArgLeuGluValLysLeuGlyGlnGlyCysPheGlyGluValTrpMetGlyThrTrpAsnGlyThrThrArgValAlaIleLysThrLeuLysProGlyThrMetSerProGluAlaPheLeuGlnGluAlaGlnValMetLysLysLeuArgHisGluLysLeuValGlnLeuTyrAlaValValSerGluGluProIleTyrIleValThrGluTyrMetSerLysGlySerLeuLeuAspPheLeuLysGlyGluThrGlyLysTyrLeuArgLeuProGlnLeuValAspMetAlaAlaGlnIleAlaSerGlyMetAlaTyrValGluArgMetAsnTyrValHisArgAspLeuArgAlaAlaAsnIleLeuValGlyGluAsnLeuValCysLysValAlaAspPheGlyLeuAlaArgLeuIleGluAspAsnGluTyrThrAlaArgGlnGlyAlaLysPheProIleLysTrpThrAlaProGluAlaAlaLeuTyrGlyArgPheThrIleLysSerAspValTrpSerPheGlyIleLeuLeuThrGluLeuThrThrLysGlyArgValProTyrProGlyMetValAsnArgGluValLeuAspGlnValGluArgGlyTyrArgMetProCysProProGluCysProGluSerLeuHisAspLeuMetCysGlnCysTrpArgLysGluProGluGluArgProThrPheGluTyrLeuGlnAlaPheLeuGluAspTyrPheThrSerThrGluProGlnTyrGlnProGlyGluAsnLeu

[0336] SEQ ID NO:2, 智人 (Homo sapiens), 全长Grb2蛋白质

[0337] MetGluAlaIleAlaLysTyrAspPheLysAlaThrAlaAspAspGluLeuSerPheLysArgGlyAspIleLeuLysValLeuAsnGluGluCysAspGlnAsnTrpTyrLysAlaGluLeuAsnGlyLysAspGlyPheIleProLysAsnTyrIleGluMetLysProHisProTrpPhePheGlyLysIleProArgAlaLysAlaGluGluMetLeuSerLysGlnArgHisAspGlyAlaPheLeuIleArgGluSerGluSerAlaProGlyAspPheSerLeuSerValLysPheGlyAsnAspValGlnHisPheLysValLeuArgAspGlyAlaGlyLysTyrPheLeuTrpValValLysPheAsnSerLeuAsnGluLeuValAspTyrHisArgSerThrSerValSerArgAsnGlnGlnIlePheLeuArgAspIleGluGlnValProGlnGlnProThrTyrValGlnAlaLeuPheAspPheAspProGlnGluAspGlyGluLeuGlyPheArgArgGlyAspPheIleHisValMetAspAsnSerAspProAsnTrpTrpLysGlyAlaCysHisGlyGlnThrGlyMetPheProArgAsnTyrValThrProValAsnArgAsnVal

[0338] SEQ ID NO:3, 智人 (Homo sapiens), 全长Fyn蛋白质

[0339] MetGlyCysValGlnCysLysAspLysGluAlaThrLysLeuThrGluGluArgAspGlySerLeuAsnGlnSerSerGlyTyrArgTyrGlyThrAspProThrProGlnHisTyrProSerPheGlyValThrSerIleProAsnTyrAsnAsnPheHisAlaAlaGlyGlyGlnGlyLeuThrValPheGlyGlyValAsnSerSerSerHisThrGlyThrLeuArgThrArgGlyGlyThrGlyValThrLeuPheValAlaLeuTyrAspTyrGluAlaArgThrGluAspAspLeuSerPheHisLysGlyGluLysPheGlnIleLeuAsnSerSerGluGlyAspTrpTrpGluAlaArgSerLeuThrThrGlyGluThrGlyTyrIleProSerAsnTyrValAlaProValAspSerIleGlnAlaGluGluTrpTyrPheGlyLysLeuGlyArgLysAspAlaGluArgGlnLeuLeuSerPheGlyAsnProArgGlyThrPheLeuIleArgGluSerGluThrThrLysGlyAlaTyrSerLeuSerIleArgAspTrpAspAspMetLysGlyAspHisValLysHisTyrLysIleArgLysLeuAspAsnGlyGlyTyrTyrIleThrThrArgAlaGlnPheGluThrLeuGlnGlnLeuValGlnHisTyrSerGluArgAlaAlaGlyLeuCysCysArgLeuValValProCysHisLysGlyMetProArgLeuThrAspLeuSerValLysThrLysAspValTrpGluIleProArgGluSerLeuGlnLeuIleLysArgLeuGlyAsnGlyGlnPheGlyGluValTrpMetGlyThrTrpAsnGlyAsnThrLysValAlaIleLysThrLeuLysProGlyThrMetSerProGluSerPheLeuGluGluAlaGlnIleMetLysLysLeuLysHisAspLysLeuValGlnLeuTyrAlaValValSerGluGluProIleTyrIleValThrGluTyrMetAsnLysGlySerLeuLeuAspPheLeuLysAspGlyGluGlyArgAlaLeuLysLeuProAsnLeuValAspMetAlaAlaGlnValAlaAlaGlyM

etAlaTyrIleGluArgMetAsnTyrIleHisArgAspLeuArgSerAlaAsnIleLeuValGlyAsnGlyLeuIleCysLysIleAlaAspPheGlyLeuAlaArgLeuIleGluAspAsnGluTyrThrAlaArgGlnGlyAlaLysPheProIleLysTrpThrAlaProGluAlaAlaLeuTyrGlyArgPheThrIleLysSerAspValTrpSerPheGlyIleLeuLeuThrGluLeuValThrLysGlyArgValProTyrProGlyMetAsnAsnArgGluValLeuGluGlnValGluArgGlyTyrArgMetProCysProGlnAspCysProIleSerLeuHisGluLeuMetIleHisCysTrpLysLysAspProGluGluArgProThrPheGluTyrLeuGlnSerPheLeuGluAspTyrPheThrAlaThrGluProGlnTyrGlnProGlyGluAsnLeu

[0340] SEQ ID NO:4,人工序列,野生型人Src SH2结构域

[0341] AspSerIleGlnAlaGluGluTrpTyrPheGlyLysIleThrArgArgGluSerGluArgLeuLeuLeuAsnAlaGluAsnProArgGlyThrPheLeuValArgGluSerGluThrThrLysGlyAlaTyrCysLeuSerValSerAspPheAspAsnAlaLysGlyLeuAsnValLysHisTyrLysIleArgLysLeuAspSerGlyGlyPheTyrIleThrSerArgThrGlnPheAsnSerLeuGlnGlnLeuValAlaTyrTyrSerLysHisAlaAspGlyLeuCysHisArgLeuThrThrValCysProThrSerLys

[0342] SEQ ID NO:5,人工序列,TrM人Src SH2结构域

[0343] AspSerIleGlnAlaGluGluTrpTyrPheGlyLysIleThrArgArgGluSerGluArgLeuLeuLeuAsnAlaGluAsnProArgGlyThrPheLeuValArgGluSerGluThrThrLysGlyAlaTyrCysLeuSerValSerAspPheAspAsnAlaLysGlyLeuAsnValLysHisTyrLysIleArgLysLeuAspSerGlyGlyPheTyrIleThrSerArgThrGlnPheAsnSerLeuGlnGlnLeuValAlaTyrTyrSerLysHisAlaAspGlyLeuCysHisArgLeuThrThrValCysProThrSerLys

[0344] SEQ ID NO:6,人工序列,野生型人Grb2SH2结构域

[0345] MetLysProHisProTrpPhePheGlyLysIleProArgAlaLysAlaGluGluMetLeuSerLysGlnArgHisAspGlyAlaPheLeuIleArgGluSerGluSerAlaProGlyAspPheSerLeuSerValLysPheGlyAsnAspValGlnHisPheLysValLeuArgAspGlyAlaGlyLysTyrPheLeuTrpValValLysPheAsnSerLeuAsnGluLeuValAspTyrHisArgSerThrSerValSerArgAsnGlnGlnIlePheLeuArgAspIleGluGlnValProGlnGlnPro

[0346] SEQ ID NO:7,人工序列,TrM人Grb2SH2结构域

[0347] MetLysProHisProTrpPhePheGlyLysIleProArgAlaLysAlaGluGluMetLeuSerLysGlnArgHisAspGlyAlaPheLeuIleArgGluSerGluSerValProGlyAspPheAlaLeuSerValLysPheGlyAsnAspValGlnHisPheLeuValLeuArgAspGlyAlaGlyLysTyrPheLeuTrpValValLysPheAsnSerLeuAsnGluLeuValAspTyrHisArgSerThrSerValSerArgAsnGlnGlnIlePheLeuArgAspIleGluGlnValProGlnGlnProLeuIleAsnGluPhe

[0348] SEQ ID NO:8,人工序列,野生型人Fyn SH2结构域

[0349] AlaProValAspSerIleGlnAlaGluGluTrpTyrPheGlyLysLeuGlyArgLysAspAlaGluArgGlnLeuLeuSerPheGlyAsnProArgGlyThrPheLeuIleArgGluSerGluThrThrLysGlyAlaTyrSerLeuSerIleArgAspTrpAspAspMetLysGlyAspHisValLysHisTyrLysIleArgLysLeuAspAsnGlyGlyTyrTyrIleThrThrArgAlaGlnPheGluThrLeuGlnGlnLeuValGlnHisTyrSerGluArgAlaAlaGlyLeuCysCysArgLeuValValProCysHisLysGly

[0350] SEQ ID NO:9,人工序列,TrM人Fyn SH2结构域

[0351] AlaProValAspSerIleGlnAlaGluGluTrpTyrPheGlyLysLeuGlyArgLysAspAlaGluAr

gGlnLeuLeuSerPheGlyAsnProArgGlyThrPheLeuIleArgGluSerGluThrValLysGlyAlaTyrAla  
LeuSerIleArgAspTrpAspAspMetLysGlyAspHisValLysHisTyrLeuIleArgLysLeuAspAsnGlyG  
lyTyrTyrIleThrThrArgAlaGlnPheGluThrLeuGlnGlnLeuValGlnHisTyrSerGluArgAlaAlaGl  
yLeuCysCysArgLeuValValProCysHisLysGly

[0352] SEQ ID NO:10,人工序列,具有六聚组氨酸和GST标签的野生型人Src SH2结构域

[0353] MetLysHisHisHisHisHisHisAsnThrSerSerAsnSerMetSerProIleLeuGlyTyrTrpLys  
sIleLysGlyLeuValGlnProThrArgLeuLeuLeuGluTyrLeuGluGluLysTyrGluGluHisLeuTyrGlu  
ArgAspGluGlyAspLysTrpArgAsnLysLysPheGluLeuGlyLeuGluPheProAsnLeuProTyrTyrIleA  
spGlyAspValLysLeuThrGlnSerMetAlaIleIleArgTyrIleAlaAspLysHisAsnMetLeuGlyGlyCys  
sProLysGluArgAlaGluIleSerMetLeuGluGlyAlaValLeuAspIleArgTyrGlyValSerArgIleAla  
TyrSerLysAspPheGluThrLeuLysValAspPheLeuSerLysLeuProGluMetLeuLysMetPheGluAspA  
rgLeuCysHisLysThrTyrLeuAsnGlyAspHisValThrHisProAspPheMetLeuTyrAspAlaLeuAspVa  
lValLeuTyrMetAspProMetCysLeuAspAlaPheProLysLeuValCysPheLysLysArgIleGluAlaIle  
ProGlnIleAspLysTyrLeuLysSerSerLysTyrIleAlaTrpProLeuGlnGlyTrpGlnAlaThrPheGlyG  
lyGlyAspHisProProThrSerGlySerGlyGlyGlyGlyGlyTrpMetSerGluAsnLeuTyrPheGlnGlyAl  
aMetAspSerIleGlnAlaGluGluTrpTyrPheGlyLysIleThrArgArgGluSerGluArgLeuLeuLeuAsn  
AlaGluAsnProArgGlyThrPheLeuValArgGluSerGluThrThrLysGlyAlaTyrCysLeuSerValSerA  
spPheAspAsnAlaLysGlyLeuAsnValLysHisTyrLysIleArgLysLeuAspSerGlyGlyPheTyrIleTh  
rSerArgThrGlnPheAsnSerLeuGlnGlnLeuValAlaTyrTyrSerLysHisAlaAspGlyLeuCysHisArg  
LeuThrThrValCysProThrSerLys

[0354] SEQ ID NO:11,人工序列,具有六聚组氨酸和GST标签的TrM人Src SH2结构域

[0355] MetLysHisHisHisHisHisHisAsnThrSerSerAsnSerMetSerProIleLeuGlyTyrTrpLys  
sIleLysGlyLeuValGlnProThrArgLeuLeuLeuGluTyrLeuGluGluLysTyrGluGluHisLeuTyrGlu  
ArgAspGluGlyAspLysTrpArgAsnLysLysPheGluLeuGlyLeuGluPheProAsnLeuProTyrTyrIleA  
spGlyAspValLysLeuThrGlnSerMetAlaIleIleArgTyrIleAlaAspLysHisAsnMetLeuGlyGlyCys  
sProLysGluArgAlaGluIleSerMetLeuGluGlyAlaValLeuAspIleArgTyrGlyValSerArgIleAla  
TyrSerLysAspPheGluThrLeuLysValAspPheLeuSerLysLeuProGluMetLeuLysMetPheGluAspA  
rgLeuCysHisLysThrTyrLeuAsnGlyAspHisValThrHisProAspPheMetLeuTyrAspAlaLeuAspVa  
lValLeuTyrMetAspProMetCysLeuAspAlaPheProLysLeuValCysPheLysLysArgIleGluAlaIle  
ProGlnIleAspLysTyrLeuLysSerSerLysTyrIleAlaTrpProLeuGlnGlyTrpGlnAlaThrPheGlyG  
lyGlyAspHisProProThrSerGlySerGlyGlyGlyGlyGlyTrpMetSerGluAsnLeuTyrPheGlnGlyAl  
aMetAspSerIleGlnAlaGluGluTrpTyrPheGlyLysIleThrArgArgGluSerGluArgLeuLeuLeuAsn  
AlaGluAsnProArgGlyThrPheLeuValArgGluSerGluThrValLysGlyAlaTyrAlaLeuSerValSerA  
spPheAspAsnAlaLysGlyLeuAsnValLysHisTyrLeuIleArgLysLeuAspSerGlyGlyPheTyrIleTh  
rSerArgThrGlnPheAsnSerLeuGlnGlnLeuValAlaTyrTyrSerLysHisAlaAspGlyLeuCysHisArg  
LeuThrThrValCysProThrSerLys

[0356] SEQ ID NO:12,人工序列,QuadM人Src SH2结构域

[0357] AspSerIleGlnAlaGluGluTrpTyrPheGlyLysIleThrArgArgGluSerGluArgLeuLeuLe  
uAsnAlaGluAsnProArgGlyThrPheLeuValArgGluSerGluThrValLysGlyAlaTyrAlaLeuSerVal

SerAspPheAspAsnAlaLysGlyLeuAsnValLysHisTyrLeuIleArgLysLeuAspSerGlyGlyPheTyrIleTrpSerArgThrGlnPheAsnSerLeuGlnGlnLeuValAlaTyrTyrSerLysHisAlaAspGlyLeuCysHisArgLeuThrThrValCysProThrSerLys

[0358] SEQ ID NO:13,人工序列,具有六聚组氨酸标签的QuadM人Src SH2结构域

[0359] MetLysHisHisHisHisHisHisProMetSerAspTyrAspIleProThrThrGluAsnLeuTyrPheGlnGlyAlaMetAspSerIleGlnAlaGluGluTrpTyrPheGlyLysIleThrArgArgGluSerGluArgLeuLeuLeuAsnAlaGluAsnProArgGlyThrPheLeuValArgGluSerGluThrValLysGlyAlaTyrAlaLeuSerValSerAspPheAspAsnAlaLysGlyLeuAsnValLysHisTyrLeuIleArgLysLeuAspSerGlyGlyPheTyrIleTrpSerArgThrGlnPheAsnSerLeuGlnGlnLeuValAlaTyrTyrSerLysHisAlaAspGlyLeuCysHisArgLeuThrThrValCysProThrSerLysSEQ ID NO:14,人工序列,双突变型人Src SH2结构域

[0360] AspSerIleGlnAlaGluGluTrpTyrPheGlyLysIleThrArgArgGluSerGluArgLeuLeuLeuAsnAlaGluAsnProArgGlyThrPheLeuValArgGluSerGluThrValLysGlyAlaTyrAlaLeuSerValSerAspPheAspAsnAlaLysGlyLeuAsnValLysHisTyrLysIleArgLysLeuAspSerGlyGlyPheTyrIleThrSerArgThrGlnPheAsnSerLeuGlnGlnLeuValAlaTyrTyrSerLysHisAlaAspGlyLeuCysHisArgLeuThrThrValCysProThrSerLys

[0361] SEQ ID NO:15,人工序列,QuadM-TrM人Src SH2串联结构域

[0362] AspSerIleGlnAlaGluGluTrpTyrPheGlyLysIleThrArgArgGluSerGluArgLeuLeuLeuAsnAlaGluAsnProArgGlyThrPheLeuValArgGluSerGluThrValLysGlyAlaTyrAlaLeuSerValSerAspPheAspAsnAlaLysGlyLeuAsnValArgHisTyrLeuIleArgLysLeuAspSerGlyGlyPheTyrIleTrpSerArgThrGlnPheAsnSerLeuGlnGlnLeuValAlaTyrTyrSerLysHisAlaAspGlyLeuSerHisArgLeuThrThrValSerProThrSerLysGlyGlySerGlyGlySerMetAspSerIleGlnAlaGluGluTrpTyrPheGlyLysIleThrArgArgGluSerGluArgLeuLeuLeuAsnAlaGluAsnProArgGlyThrPheLeuValArgGluSerGluThrValLysGlyAlaTyrAlaLeuSerValSerAspPheAspAsnAlaLysGlyLeuAsnValArgHisTyrLeuIleArgLysLeuAspSerGlyGlyPheTyrIleThrSerArgThrGlnPheAsnSerLeuGlnGlnLeuValAlaTyrTyrSerLysHisAlaAspGlyLeuSerHisArgLeuThrThrValSerProThrSerLys

## 序列表

&lt;110&gt; 李顺成(Li, Shun-Cheng)

&lt;120&gt; 用于以变体SH2结构域对蛋白质酪氨酸磷酸化进行概述的方法

&lt;130&gt; 96403-4T

&lt;150&gt; US 62/384,722

&lt;151&gt; 2016-06-10

&lt;160&gt; 15

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 536

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 1

```

Met Gly Ser Asn Lys Ser Lys Pro Lys Asp Ala Ser Gln Arg Arg Arg
1           5           10           15
Ser Leu Glu Pro Ala Glu Asn Val His Gly Ala Gly Gly Ala Phe
           20           25           30
Pro Ala Ser Gln Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ser Ala Asp Gly His Arg
           35           40           45
Gly Pro Ser Ala Ala Phe Ala Pro Ala Ala Ala Glu Pro Lys Leu Phe
           50           55           60
Gly Gly Phe Asn Ser Ser Asp Thr Val Thr Ser Pro Gln Arg Ala Gly
65           70           75           80
Pro Leu Ala Gly Gly Val Thr Thr Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu
           85           90           95
Ser Arg Thr Glu Thr Asp Leu Ser Phe Lys Lys Gly Glu Arg Leu Gln
           100          105          110
Ile Val Asn Asn Thr Glu Gly Asp Trp Trp Leu Ala His Ser Leu Ser
           115          120          125
Thr Gly Gln Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Ser Asp
           130          135          140
Ser Ile Gln Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg Glu
145          150          155          160
Ser Glu Arg Leu Leu Leu Asn Ala Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe Leu
           165          170          175
Val Arg Glu Ser Glu Thr Thr Lys Gly Ala Tyr Cys Leu Ser Val Ser
           180          185          190
Asp Phe Asp Asn Ala Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Lys Ile Arg

```

195	200	205
Lys Leu Asp Ser Gly Gly Phe Tyr Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe Asn		
210	215	220
Ser Leu Gln Gln Leu Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly Leu		
225	230	235
Cys His Arg Leu Thr Thr Val Cys Pro Thr Ser Lys Pro Gln Thr Gln		
245	250	255
Gly Leu Ala Lys Asp Ala Trp Glu Ile Pro Arg Glu Ser Leu Arg Leu		
260	265	270
Glu Val Lys Leu Gly Gln Gly Cys Phe Gly Glu Val Trp Met Gly Thr		
275	280	285
Trp Asn Gly Thr Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Pro Gly Thr		
290	295	300
Met Ser Pro Glu Ala Phe Leu Gln Glu Ala Gln Val Met Lys Lys Leu		
305	310	315
Arg His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Ala Val Val Ser Glu Glu Pro		
325	330	335
Ile Tyr Ile Val Thr Glu Tyr Met Ser Lys Gly Ser Leu Leu Asp Phe		
340	345	350
Leu Lys Gly Glu Thr Gly Lys Tyr Leu Arg Leu Pro Gln Leu Val Asp		
355	360	365
Met Ala Ala Gln Ile Ala Ser Gly Met Ala Tyr Val Glu Arg Met Asn		
370	375	380
Tyr Val His Arg Asp Leu Arg Ala Ala Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn		
385	390	395
Leu Val Cys Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Ile Glu Asp		
405	410	415
Asn Glu Tyr Thr Ala Arg Gln Gly Ala Lys Phe Pro Ile Lys Trp Thr		
420	425	430
Ala Pro Glu Ala Ala Leu Tyr Gly Arg Phe Thr Ile Lys Ser Asp Val		
435	440	445
Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Thr Glu Leu Thr Thr Lys Gly Arg Val		
450	455	460
Pro Tyr Pro Gly Met Val Asn Arg Glu Val Leu Asp Gln Val Glu Arg		
465	470	475
Gly Tyr Arg Met Pro Cys Pro Pro Glu Cys Pro Glu Ser Leu His Asp		
485	490	495
Leu Met Cys Gln Cys Trp Arg Lys Glu Pro Glu Glu Arg Pro Thr Phe		
500	505	510

Glu Tyr Leu Gln Ala Phe Leu Glu Asp Tyr Phe Thr Ser Thr Glu Pro  
 515 520 525  
 Gln Tyr Gln Pro Gly Glu Asn Leu  
 530 535  
 <210> 2  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 2  
 Met Glu Ala Ile Ala Lys Tyr Asp Phe Lys Ala Thr Ala Asp Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Phe Lys Arg Gly Asp Ile Leu Lys Val Leu Asn Glu Glu Cys  
 20 25 30  
 Asp Gln Asn Trp Tyr Lys Ala Glu Leu Asn Gly Lys Asp Gly Phe Ile  
 35 40 45  
 Pro Lys Asn Tyr Ile Glu Met Lys Pro His Pro Trp Phe Phe Gly Lys  
 50 55 60  
 Ile Pro Arg Ala Lys Ala Glu Glu Met Leu Ser Lys Gln Arg His Asp  
 65 70 75 80  
 Gly Ala Phe Leu Ile Arg Glu Ser Glu Ser Ala Pro Gly Asp Phe Ser  
 85 90 95  
 Leu Ser Val Lys Phe Gly Asn Asp Val Gln His Phe Lys Val Leu Arg  
 100 105 110  
 Asp Gly Ala Gly Lys Tyr Phe Leu Trp Val Val Lys Phe Asn Ser Leu  
 115 120 125  
 Asn Glu Leu Val Asp Tyr His Arg Ser Thr Ser Val Ser Arg Asn Gln  
 130 135 140  
 Gln Ile Phe Leu Arg Asp Ile Glu Gln Val Pro Gln Gln Pro Thr Tyr  
 145 150 155 160  
 Val Gln Ala Leu Phe Asp Phe Asp Pro Gln Glu Asp Gly Glu Leu Gly  
 165 170 175  
 Phe Arg Arg Gly Asp Phe Ile His Val Met Asp Asn Ser Asp Pro Asn  
 180 185 190  
 Trp Trp Lys Gly Ala Cys His Gly Gln Thr Gly Met Phe Pro Arg Asn  
 195 200 205  
 Tyr Val Thr Pro Val Asn Arg Asn Val  
 210 215  
 <210> 3  
 <211> 537

<212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 3  
 Met Gly Cys Val Gln Cys Lys Asp Lys Glu Ala Thr Lys Leu Thr Glu  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Arg Asp Gly Ser Leu Asn Gln Ser Ser Gly Tyr Arg Tyr Gly Thr  
                   20                   25                   30  
 Asp Pro Thr Pro Gln His Tyr Pro Ser Phe Gly Val Thr Ser Ile Pro  
                   35                   40                   45  
 Asn Tyr Asn Asn Phe His Ala Ala Gly Gly Gln Gly Leu Thr Val Phe  
                   50                   55                   60  
 Gly Gly Val Asn Ser Ser Ser His Thr Gly Thr Leu Arg Thr Arg Gly  
 65                   70                   75                   80  
 Gly Thr Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg  
                   85                   90                   95  
 Thr Glu Asp Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu  
                   100                   105                   110  
 Asn Ser Ser Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly  
                   115                   120                   125  
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile  
                   130                   135                   140  
 Gln Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Leu Gly Arg Lys Asp Ala Glu  
 145                   150                   155                   160  
 Arg Gln Leu Leu Ser Phe Gly Asn Pro Arg Gly Thr Phe Leu Ile Arg  
                   165                   170                   175  
 Glu Ser Glu Thr Thr Lys Gly Ala Tyr Ser Leu Ser Ile Arg Asp Trp  
                   180                   185                   190  
 Asp Asp Met Lys Gly Asp His Val Lys His Tyr Lys Ile Arg Lys Leu  
                   195                   200                   205  
 Asp Asn Gly Gly Tyr Tyr Ile Thr Thr Arg Ala Gln Phe Glu Thr Leu  
                   210                   215                   220  
 Gln Gln Leu Val Gln His Tyr Ser Glu Arg Ala Ala Gly Leu Cys Cys  
 225                   230                   235                   240  
 Arg Leu Val Val Pro Cys His Lys Gly Met Pro Arg Leu Thr Asp Leu  
                   245                   250                   255  
 Ser Val Lys Thr Lys Asp Val Trp Glu Ile Pro Arg Glu Ser Leu Gln  
                   260                   265                   270  
 Leu Ile Lys Arg Leu Gly Asn Gly Gln Phe Gly Glu Val Trp Met Gly  
                   275                   280                   285

Thr Trp Asn Gly Asn Thr Lys Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Pro Gly  
 290 295 300  
 Thr Met Ser Pro Glu Ser Phe Leu Glu Glu Ala Gln Ile Met Lys Lys  
 305 310 315 320  
 Leu Lys His Asp Lys Leu Val Gln Leu Tyr Ala Val Val Ser Glu Glu  
 325 330 335  
 Pro Ile Tyr Ile Val Thr Glu Tyr Met Asn Lys Gly Ser Leu Leu Asp  
 340 345 350  
 Phe Leu Lys Asp Gly Glu Gly Arg Ala Leu Lys Leu Pro Asn Leu Val  
 355 360 365  
 Asp Met Ala Ala Gln Val Ala Ala Gly Met Ala Tyr Ile Glu Arg Met  
 370 375 380  
 Asn Tyr Ile His Arg Asp Leu Arg Ser Ala Asn Ile Leu Val Gly Asn  
 385 390 395 400  
 Gly Leu Ile Cys Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Ile Glu  
 405 410 415  
 Asp Asn Glu Tyr Thr Ala Arg Gln Gly Ala Lys Phe Pro Ile Lys Trp  
 420 425 430  
 Thr Ala Pro Glu Ala Ala Leu Tyr Gly Arg Phe Thr Ile Lys Ser Asp  
 435 440 445  
 Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Thr Glu Leu Val Thr Lys Gly Arg  
 450 455 460  
 Val Pro Tyr Pro Gly Met Asn Asn Arg Glu Val Leu Glu Gln Val Glu  
 465 470 475 480  
 Arg Gly Tyr Arg Met Pro Cys Pro Gln Asp Cys Pro Ile Ser Leu His  
 485 490 495  
 Glu Leu Met Ile His Cys Trp Lys Lys Asp Pro Glu Glu Arg Pro Thr  
 500 505 510  
 Phe Glu Tyr Leu Gln Ser Phe Leu Glu Asp Tyr Phe Thr Ala Thr Glu  
 515 520 525  
 Pro Gln Tyr Gln Pro Gly Glu Asn Leu  
 530 535

<210> 4

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> SH2蛋白质结构域

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 野生型人Src SH2结构域

<400> 4

```

Asp Ser Ile Gln Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg
1           5           10           15
Glu Ser Glu Arg Leu Leu Leu Asn Ala Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe
           20           25           30
Leu Val Arg Glu Ser Glu Thr Thr Lys Gly Ala Tyr Cys Leu Ser Val
           35           40           45
Ser Asp Phe Asp Asn Ala Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Lys Ile
           50           55           60
Arg Lys Leu Asp Ser Gly Gly Phe Tyr Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe
65           70           75           80
Asn Ser Leu Gln Gln Leu Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly
           85           90           95
Leu Cys His Arg Leu Thr Thr Val Cys Pro Thr Ser Lys
           100          105

```

<210> 5

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> SH2蛋白质结构域

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> TrM人Src SH2结构域

<400> 5

```

Asp Ser Ile Gln Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg
1           5           10           15
Glu Ser Glu Arg Leu Leu Leu Asn Ala Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe
           20           25           30
Leu Val Arg Glu Ser Glu Thr Val Lys Gly Ala Tyr Ala Leu Ser Val
           35           40           45
Ser Asp Phe Asp Asn Ala Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Leu Ile
           50           55           60
Arg Lys Leu Asp Ser Gly Gly Phe Tyr Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe
65           70           75           80
Asn Ser Leu Gln Gln Leu Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly
           85           90           95

```

Leu Cys His Arg Leu Thr Thr Val Cys Pro Thr Ser Lys  
 100 105

<210> 6

<211> 104

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> SH2蛋白质结构域

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 野生型人Grb2 SH2结构域

<400> 6

Met Lys Pro His Pro Trp Phe Phe Gly Lys Ile Pro Arg Ala Lys Ala  
 1 5 10 15

Glu Glu Met Leu Ser Lys Gln Arg His Asp Gly Ala Phe Leu Ile Arg  
 20 25 30

Glu Ser Glu Ser Ala Pro Gly Asp Phe Ser Leu Ser Val Lys Phe Gly  
 35 40 45

Asn Asp Val Gln His Phe Lys Val Leu Arg Asp Gly Ala Gly Lys Tyr  
 50 55 60

Phe Leu Trp Val Val Lys Phe Asn Ser Leu Asn Glu Leu Val Asp Tyr  
 65 70 75 80

His Arg Ser Thr Ser Val Ser Arg Asn Gln Gln Ile Phe Leu Arg Asp  
 85 90 95

Ile Glu Gln Val Pro Gln Gln Pro  
 100

<210> 7

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> SH2蛋白质结构域

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> TrM人Grb2 SH2结构域

<400> 7

Met Lys Pro His Pro Trp Phe Phe Gly Lys Ile Pro Arg Ala Lys Ala  
 1 5 10 15

Glu Glu Met Leu Ser Lys Gln Arg His Asp Gly Ala Phe Leu Ile Arg

	20		25		30
Glu Ser	Glu Ser Val Pro Gly Asp Phe Ala Leu Ser Val Lys Phe Gly				
	35		40		45
Asn Asp	Val Gln His Phe Leu Val Leu Arg Asp Gly Ala Gly Lys Tyr				
	50		55		60
Phe Leu	Trp Val Val Lys Phe Asn Ser Leu Asn Glu Leu Val Asp Tyr				
65		70		75	80
His Arg	Ser Thr Ser Val Ser Arg Asn Gln Gln Ile Phe Leu Arg Asp				
	85		90		95
Ile Glu	Gln Val Pro Gln Gln Pro Leu Ile Asn Glu Phe				
	100		105		

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SH2蛋白质结构域

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 野生型人Fyn SH2结构域

&lt;400&gt; 8

Ala Pro	Val Asp Ser Ile Gln Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Leu			
1		5	10	15
Gly Arg	Lys Asp Ala Glu Arg Gln Leu Leu Ser Phe Gly Asn Pro Arg			
	20		25	30
Gly Thr	Phe Leu Ile Arg Glu Ser Glu Thr Thr Lys Gly Ala Tyr Ser			
	35		40	45
Leu Ser	Ile Arg Asp Trp Asp Asp Met Lys Gly Asp His Val Lys His			
	50		55	60
Tyr Lys	Ile Arg Lys Leu Asp Asn Gly Gly Tyr Tyr Ile Thr Thr Arg			
65		70		75
Ala Gln	Phe Glu Thr Leu Gln Gln Leu Val Gln His Tyr Ser Glu Arg			
	85		90	95
Ala Ala	Gly Leu Cys Cys Arg Leu Val Val Pro Cys His Lys Gly			
	100		105	110

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

<220>

<223> SH2蛋白质结构域

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> TrM人Fyn SH2结构域

<400> 9

```
Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Leu
1           5           10           15
Gly Arg Lys Asp Ala Glu Arg Gln Leu Leu Ser Phe Gly Asn Pro Arg
           20           25           30
Gly Thr Phe Leu Ile Arg Glu Ser Glu Thr Val Lys Gly Ala Tyr Ala
           35           40           45
Leu Ser Ile Arg Asp Trp Asp Asp Met Lys Gly Asp His Val Lys His
           50           55           60
Tyr Leu Ile Arg Lys Leu Asp Asn Gly Gly Tyr Tyr Ile Thr Thr Arg
65           70           75           80
Ala Gln Phe Glu Thr Leu Gln Gln Leu Val Gln His Tyr Ser Glu Arg
           85           90           95
Ala Ala Gly Leu Cys Cys Arg Leu Val Val Pro Cys His Lys Gly
           100          105          110
```

<210> 10

<211> 361

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> SH2蛋白质结构域

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 具有六聚组氨酸和GST标签的野生型人Src SH2结构域

<400> 10

```
Met Lys His His His His His His Asn Thr Ser Ser Asn Ser Met Ser
1           5           10           15
Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr Arg
           20           25           30
Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr Glu
           35           40           45
Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu
           50           55           60
Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys Leu Thr
```

65		70		75		80
Gln Ser Met Ala Ile	Ile Arg Tyr Ile	Ala Asp Lys His Asn Met Leu				
	85		90		95	
Gly Gly Cys Pro Lys	Glu Arg Ala Glu	Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala				
	100		105		110	
Val Leu Asp Ile Arg	Tyr Gly Val Ser	Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp				
	115		120		125	
Phe Glu Thr Leu Lys	Val Asp Phe Leu	Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu				
	130		135		140	
Lys Met Phe Glu Asp	Arg Leu Cys His	Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp				
145		150		155		160
His Val Thr His Pro	Asp Phe Met Leu	Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val				
	165		170		175	
Leu Tyr Met Asp Pro	Met Cys Leu Asp	Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys				
	180		185		190	
Phe Lys Lys Arg Ile	Glu Ala Ile Pro	Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys				
	195		200		205	
Ser Ser Lys Tyr Ile	Ala Trp Pro Leu	Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe				
	210		215		220	
Gly Gly Gly Asp His	Pro Pro Thr Ser	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly				
225		230		235		240
Trp Met Ser Glu Asn	Leu Tyr Phe Gln	Gly Ala Met Asp Ser Ile Gln				
	245		250		255	
Ala Glu Glu Trp Tyr	Phe Gly Lys Ile	Thr Arg Arg Glu Ser Glu Arg				
	260		265		270	
Leu Leu Leu Asn Ala	Glu Asn Pro Arg	Gly Thr Phe Leu Val Arg Glu				
	275		280		285	
Ser Glu Thr Thr Lys	Gly Ala Tyr Cys	Leu Ser Val Ser Asp Phe Asp				
	290		295		300	
Asn Ala Lys Gly Leu	Asn Val Lys His	Tyr Lys Ile Arg Lys Leu Asp				
305		310		315		320
Ser Gly Gly Phe Tyr	Ile Thr Ser Arg	Thr Gln Phe Asn Ser Leu Gln				
	325		330		335	
Gln Leu Val Ala Tyr	Tyr Ser Lys His	Ala Asp Gly Leu Cys His Arg				
	340		345		350	
Leu Thr Thr Val Cys	Pro Thr Ser Lys					
	355		360			

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 361

<212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> SH2蛋白质结构域  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 具有六聚组氨酸和GST标签的TrM人Src SH2结构域  
 <400> 11  
 Met Lys His His His His His Asn Thr Ser Ser Asn Ser Met Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr Arg  
 20 25 30  
 Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr Glu  
 35 40 45  
 Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn Met Leu  
 85 90 95  
 Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala  
 100 105 110  
 Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp  
 115 120 125  
 Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu  
 130 135 140  
 Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp  
 145 150 155 160  
 His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val  
 165 170 175  
 Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys  
 180 185 190  
 Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys  
 195 200 205  
 Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe  
 210 215 220  
 Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Thr Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Trp Met Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Met Asp Ser Ile Gln

	245	250	255
Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg Glu Ser Glu Arg			
	260	265	270
Leu Leu Leu Asn Ala Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe Leu Val Arg Glu			
	275	280	285
Ser Glu Thr Val Lys Gly Ala Tyr Ala Leu Ser Val Ser Asp Phe Asp			
	290	295	300
Asn Ala Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Leu Ile Arg Lys Leu Asp			
305	310	315	320
Ser Gly Gly Phe Tyr Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe Asn Ser Leu Gln			
	325	330	335
Gln Leu Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly Leu Cys His Arg			
	340	345	350
Leu Thr Thr Val Cys Pro Thr Ser Lys			
	355	360	

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> SH2蛋白质结构域

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> QuadM人Src SH2结构域

<400> 12

Asp Ser Ile Gln Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg			
1	5	10	15
Glu Ser Glu Arg Leu Leu Leu Asn Ala Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe			
	20	25	30
Leu Val Arg Glu Ser Glu Thr Val Lys Gly Ala Tyr Ala Leu Ser Val			
	35	40	45
Ser Asp Phe Asp Asn Ala Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Leu Ile			
	50	55	60
Arg Lys Leu Asp Ser Gly Gly Phe Tyr Ile Trp Ser Arg Thr Gln Phe			
65	70	75	80
Asn Ser Leu Gln Gln Leu Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly			
	85	90	95
Leu Cys His Arg Leu Thr Thr Val Cys Pro Thr Ser Lys			
	100	105	



1	5	10	15
Glu Ser Glu Arg Leu Leu Leu Asn Ala Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe			
	20	25	30
Leu Val Arg Glu Ser Glu Thr Val Lys Gly Ala Tyr Ala Leu Ser Val			
	35	40	45
Ser Asp Phe Asp Asn Ala Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Lys Ile			
	50	55	60
Arg Lys Leu Asp Ser Gly Gly Phe Tyr Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe			
65	70	75	80
Asn Ser Leu Gln Gln Leu Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly			
	85	90	95
Leu Cys His Arg Leu Thr Thr Val Cys Pro Thr Ser Lys			
	100	105	

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 225

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SH2蛋白质结构域

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; QuadM-TrM人Src SH2串联结构域

&lt;400&gt; 15

Asp Ser Ile Gln Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg			
1	5	10	15
Glu Ser Glu Arg Leu Leu Leu Asn Ala Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe			
	20	25	30
Leu Val Arg Glu Ser Glu Thr Val Lys Gly Ala Tyr Ala Leu Ser Val			
	35	40	45
Ser Asp Phe Asp Asn Ala Lys Gly Leu Asn Val Arg His Tyr Leu Ile			
	50	55	60
Arg Lys Leu Asp Ser Gly Gly Phe Tyr Ile Trp Ser Arg Thr Gln Phe			
65	70	75	80
Asn Ser Leu Gln Gln Leu Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly			
	85	90	95
Leu Ser His Arg Leu Thr Thr Val Ser Pro Thr Ser Lys Gly Gly Ser			
	100	105	110
Gly Gly Ser Met Asp Ser Ile Gln Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys			
	115	120	125

Ile	Thr	Arg	Arg	Glu	Ser	Glu	Arg	Leu	Leu	Leu	Asn	Ala	Glu	Asn	Pro
130						135					140				
Arg	Gly	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Glu	Ser	Glu	Thr	Val	Lys	Gly	Ala	Tyr
145				150						155					160
Ala	Leu	Ser	Val	Ser	Asp	Phe	Asp	Asn	Ala	Lys	Gly	Leu	Asn	Val	Arg
				165					170					175	
His	Tyr	Leu	Ile	Arg	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Gly	Phe	Tyr	Ile	Thr	Ser
			180					185						190	
Arg	Thr	Gln	Phe	Asn	Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Val	Ala	Tyr	Tyr	Ser	Lys
		195					200					205			
His	Ala	Asp	Gly	Leu	Ser	His	Arg	Leu	Thr	Thr	Val	Ser	Pro	Thr	Ser
	210						215					220			
Lys															
225															

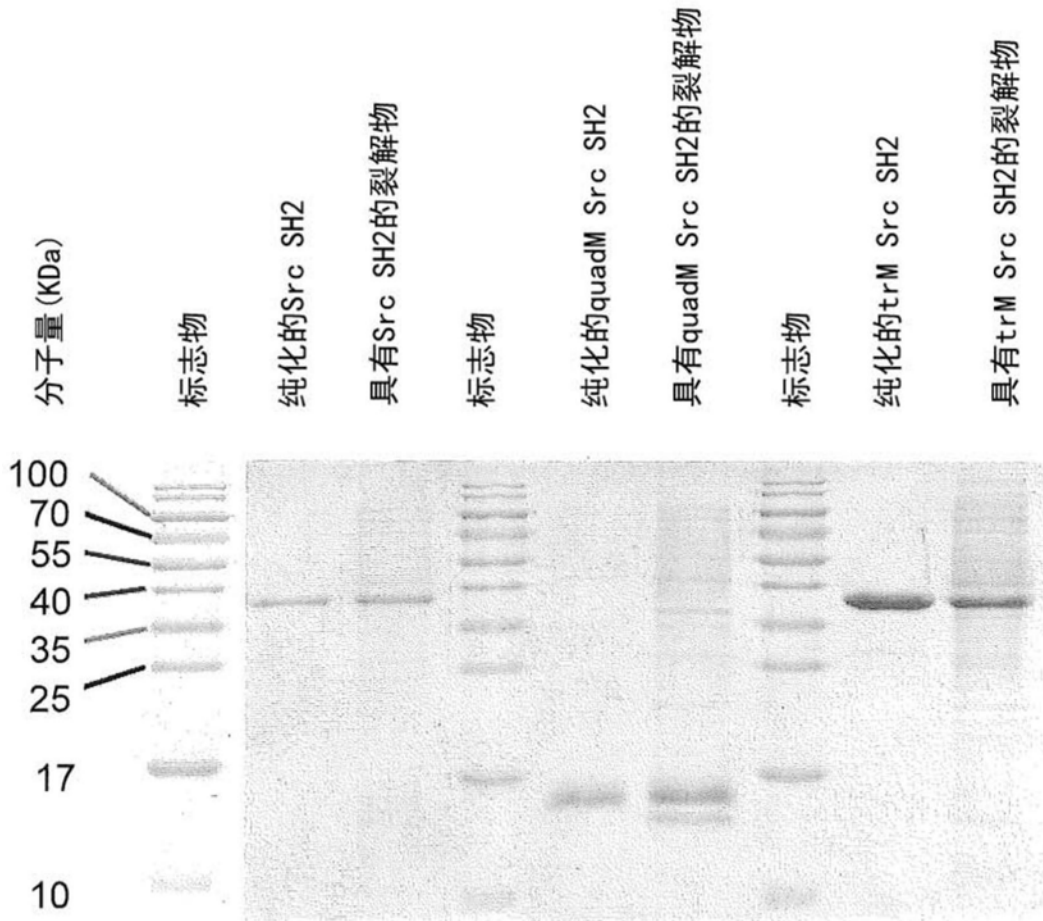


图1

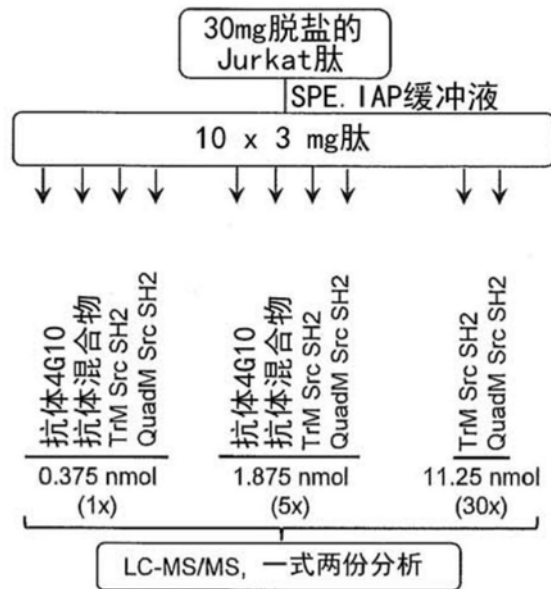


图2A

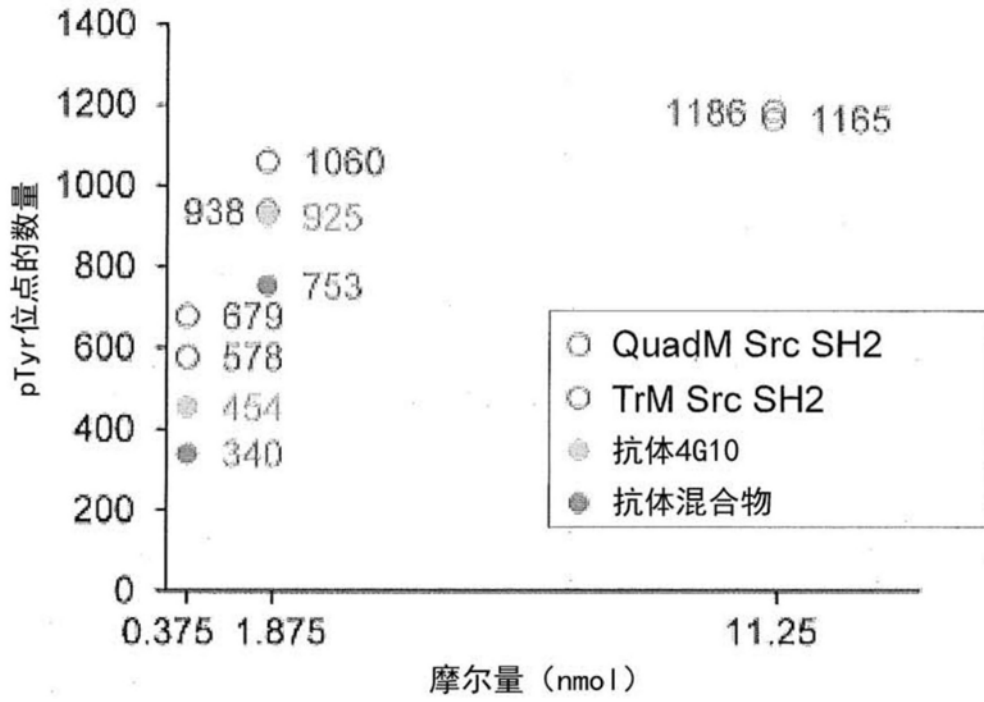


图2B

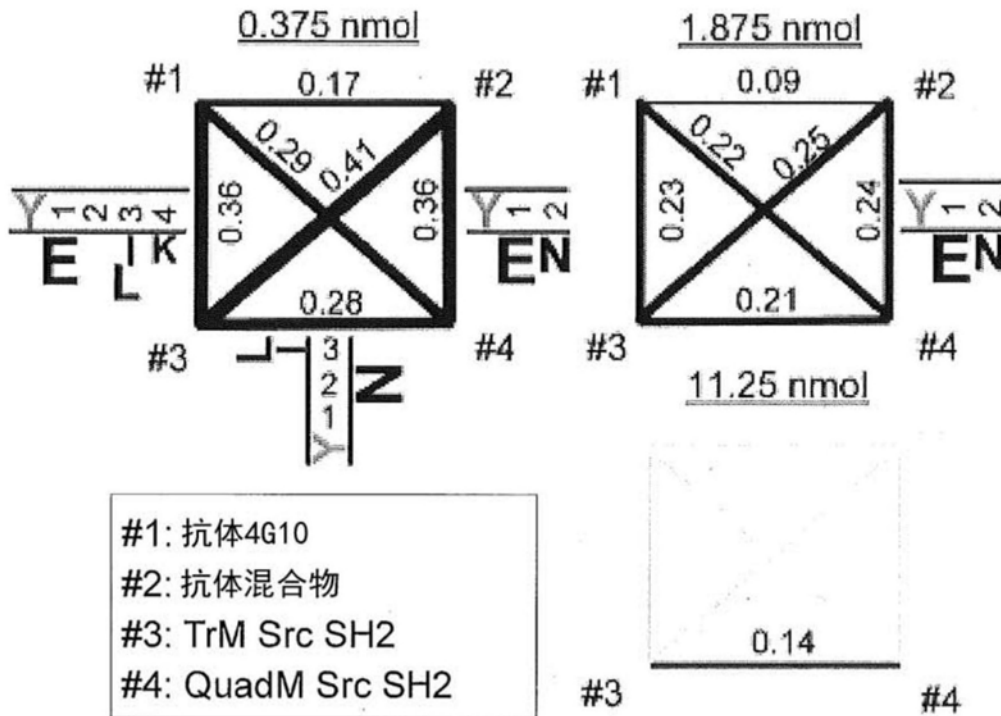


图3

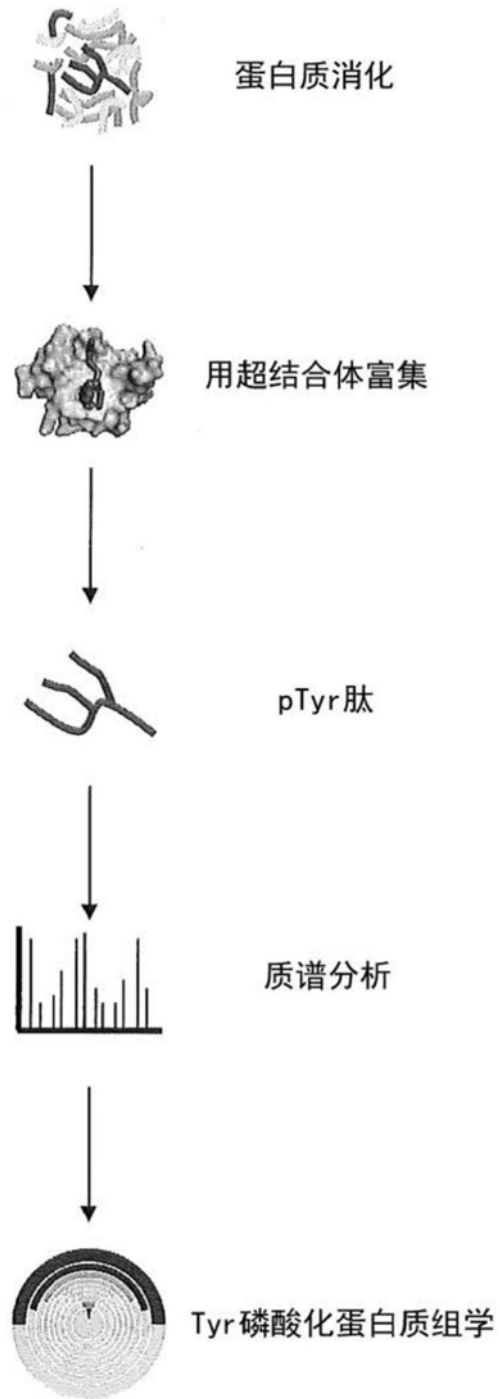


图4

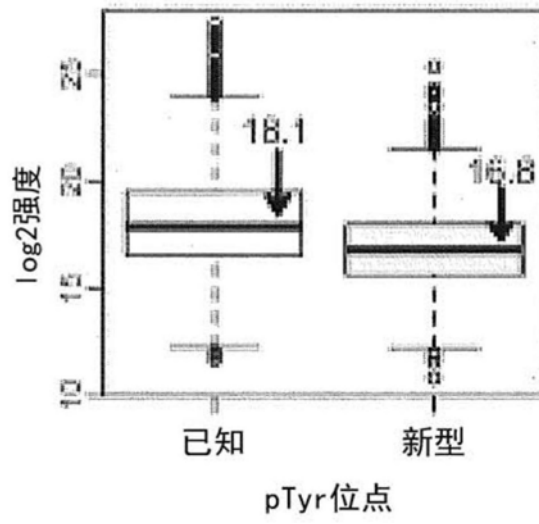


图5

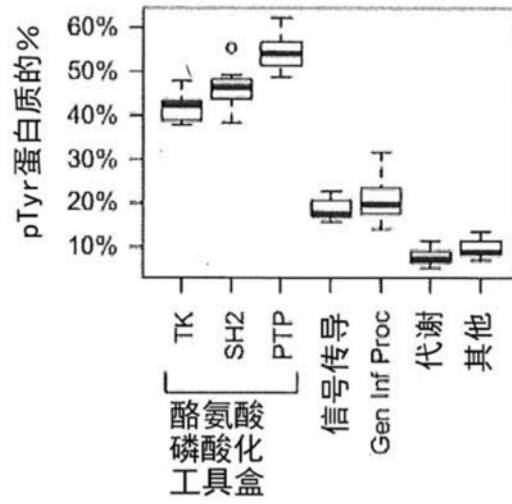


图6A

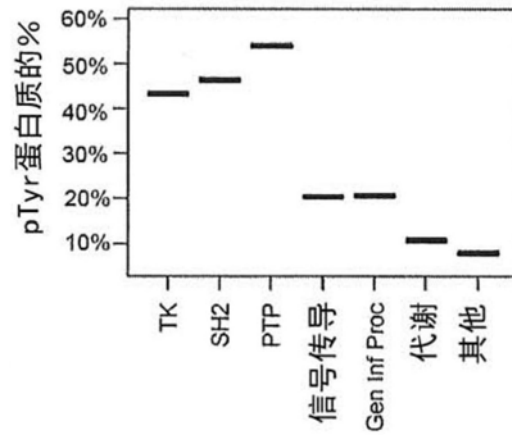


图6B

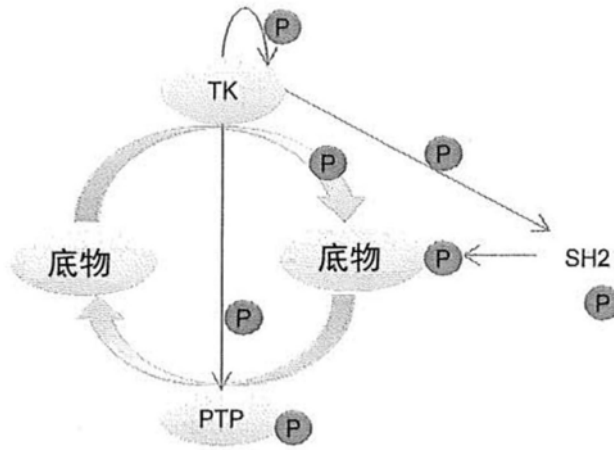


图6C

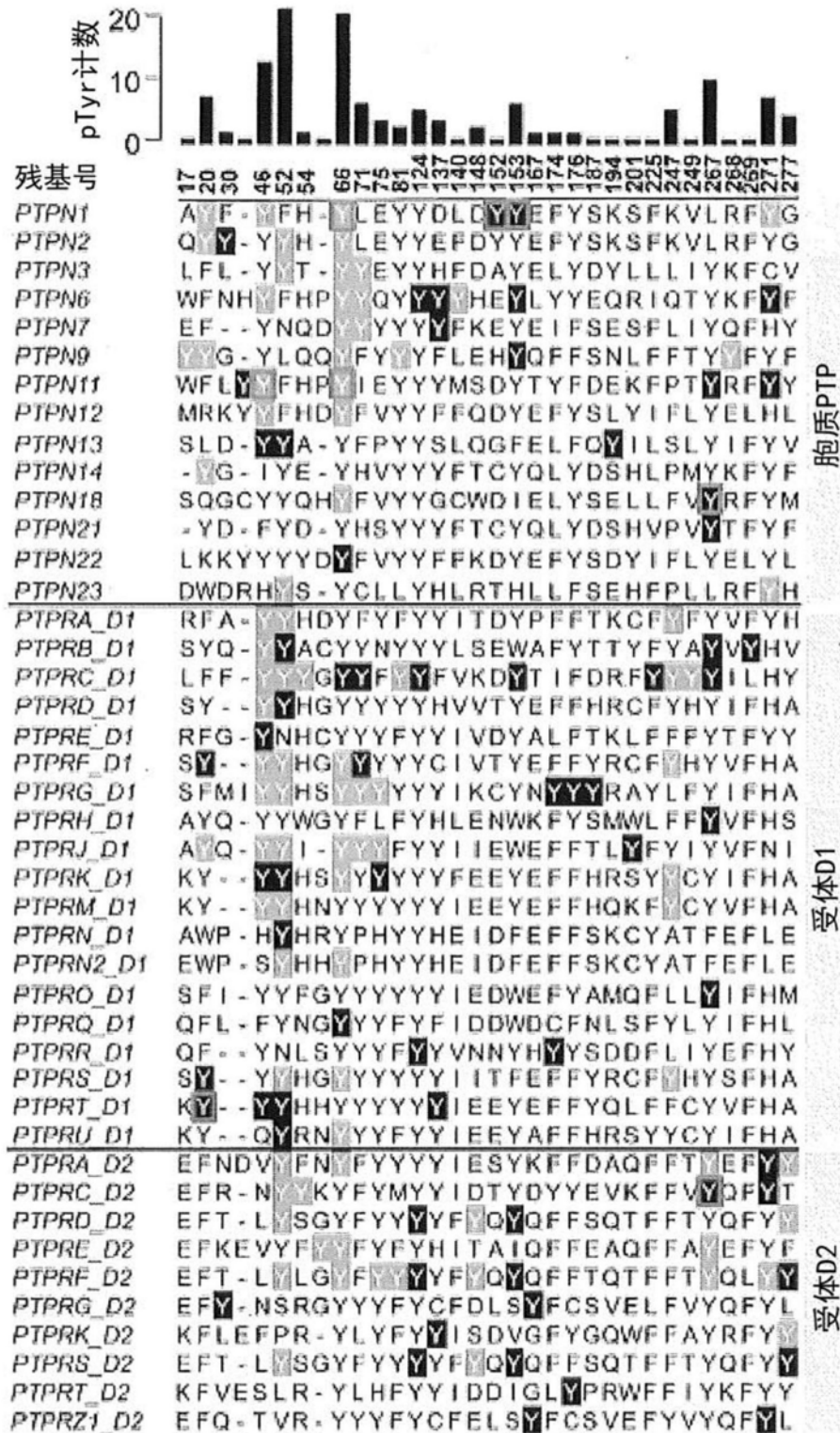


图7A

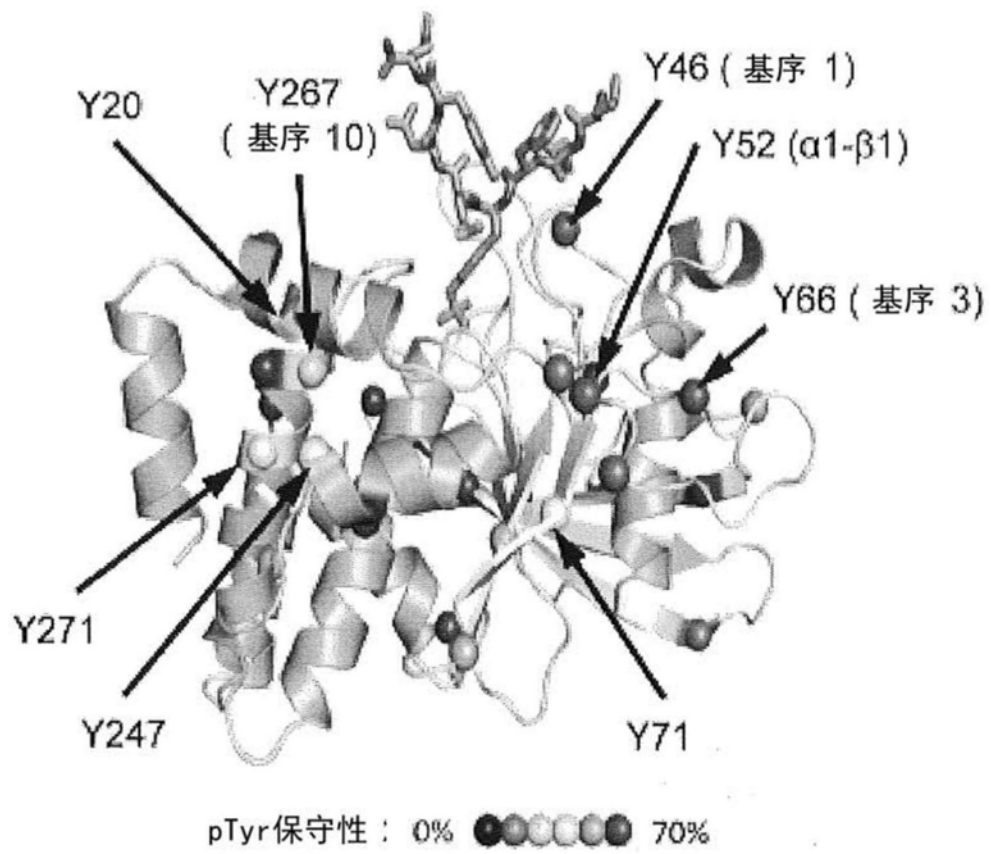


图7B

家族	基因	HELA	BEL7402	HEPG2	MCF10A	MCF7	MD231	BT474	SKBR3	JURKAT	变异
CTK_ABL	ABL1/2		1.1	0.9	-0.1	-0.2			0.3	1.6	0.53
CTK_ACK	TNK2	1.0	0.3	0.5	-0.1	-0.1	0.5	0.5	0.5	0.3	0.11
CTK_BRK	PTK6	0.8			0.9	0.1	-0.3	1.7	0.5		0.47
CTK_FAK	PTK2	-0.7	0.3	1.0	-0.7	-0.3	-1.0	0.1	-0.3	-0.8	0.41
CTK_FAK	PTK2B	0.7	1.8	0.8	2.1	0.7	-0.4	1.0	1.8	1.3	0.53
CTK_FER	FER						-0.8			0.1	
CTK_FER	FES									-0.6	
CTK_JAK	JAK1	1.1	1.3	1.0	0.2	1.1	0.1	1.1	-0.2	1.3	0.35
CTK_JAK	JAK3									-0.2	
CTK_SRC	FRK		-0.9		-1.0	1.0		0.9	1.3		1.24
CTK_SRC	HCK/LYN			-1.3	-0.9		-0.1			-0.4	0.29
CTK_SRC	YES/LCK/FYN/SRC		-0.1	-1.1		-0.4	0.0	-0.3	-0.8	0.9	0.41
CTK_SYK	SYK				0.9						
CTK_SYK	ZAP70	-1.1								1.2	
CTK_TEC	ITK									1.9	
CTK_TEC	TEC	-0.3	-1.4		0.4	-1.1	0.9			-0.2	0.65
RTK_AXL	AXL	-0.2	-0.1	0.1			-0.2				0.03
RTK_AXL	MERTK/TYRO3	-0.6	0.3	-0.2	-0.4			-0.5	-0.9	-0.6	0.15
RTK_DDR	DDR1	1.4	-0.1	0.6	0.4	1.5		0.9	1.4	0.6	0.57
RTK_EGFR	EGFR	-0.8	-0.1	1.0			1.5		0.3		0.80
RTK_EGFR	ERBB2		1.6	1.4		2.3	-0.4	3.8	3.6		2.45
RTK_EPH	EPHA1					1.4		1.8			
RTK_EPH	EPHA2	2.4	0.7	1.2		2.1	1.6	0.7	0.9		0.48
RTK_EPH	EPHA3/4/5					0.4	0.9	-1.2		0.6	0.91
RTK_EPH	EPHA7	-0.3				-0.7		-1.2			0.18
RTK_EPH	EPHB2	0.2	1.9	-0.3	0.5	1.2	2.4	1.0	-0.2	-0.1	0.91
RTK_EPH	EPHB3					0.8		1.3	1.5		0.14
RTK_EPH	EPHB4		1.6	1.6	-0.8	2.0	0.5	2.0	1.3		0.92
RTK_INSR	IGF1R/INSR	2.1	0.9	1.0	0.0	1.6	0.9	1.0	0.3	0.2	0.35
RTK_MET	MET	1.6	0.6	1.9	2.2	0.0	0.9	-0.5	0.0	-0.8	1.09
RTK_MET	MST1R	1.6	-0.1	1.1	1.9	-1.2		-0.6	0.7	-0.9	1.39

图8

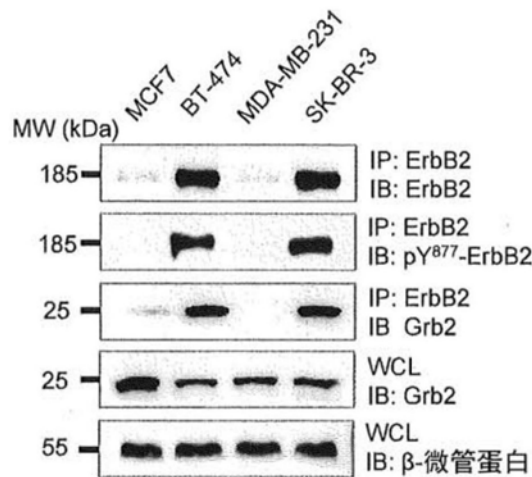


图9A

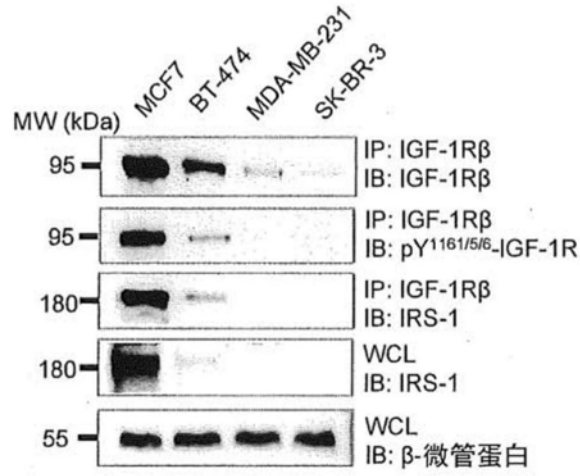


图9B

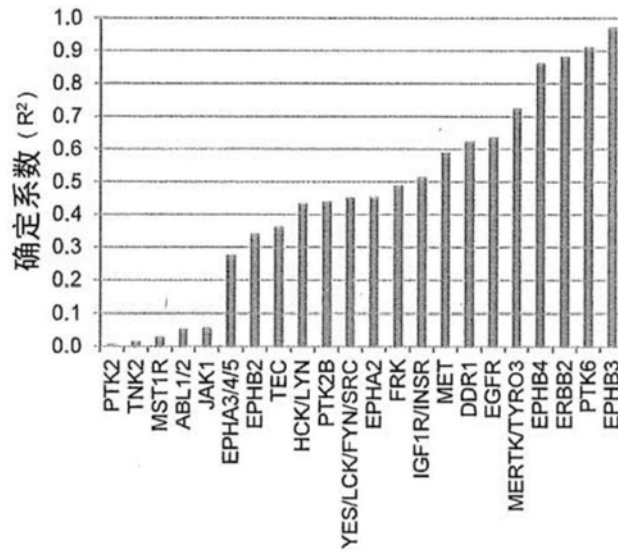


图10A

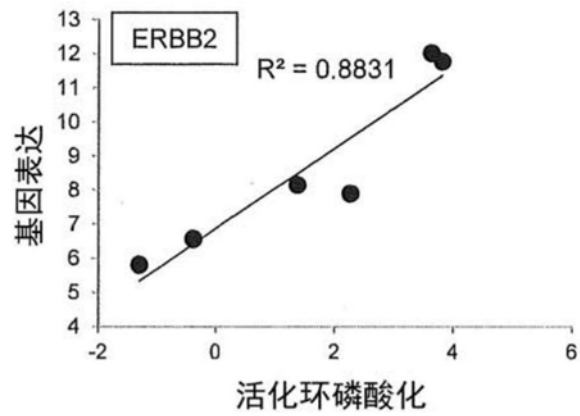


图10B

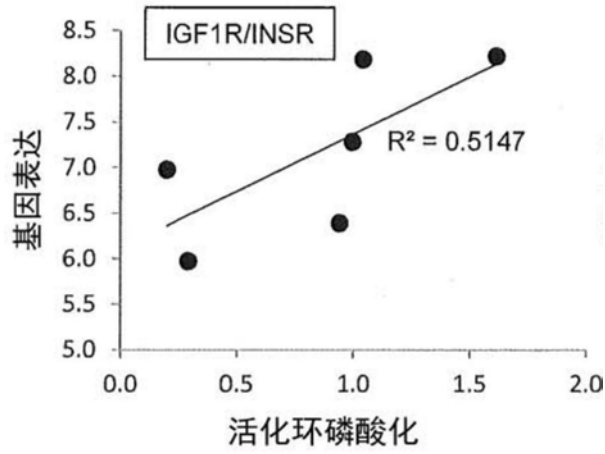


图10C

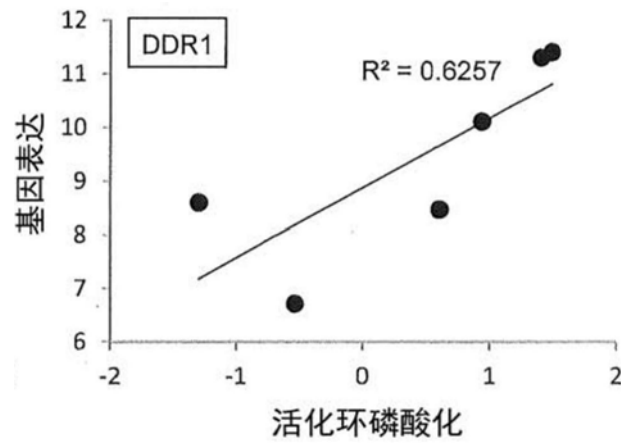


图10D

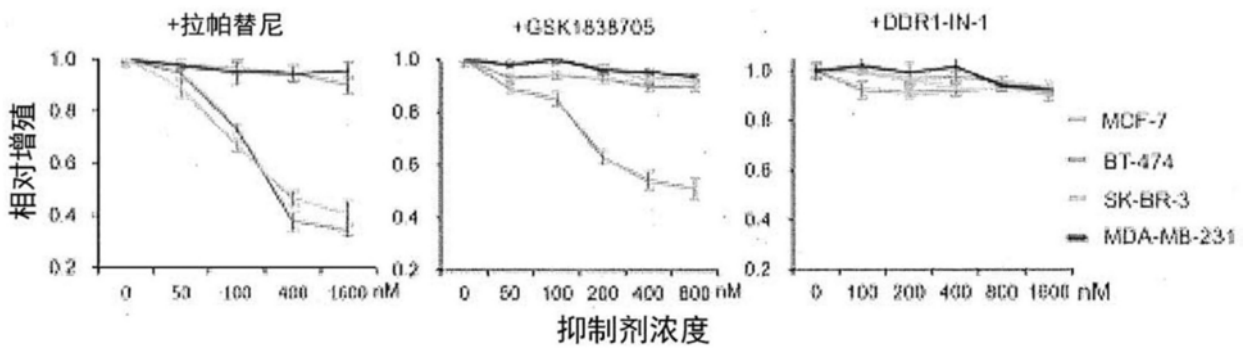


图11A

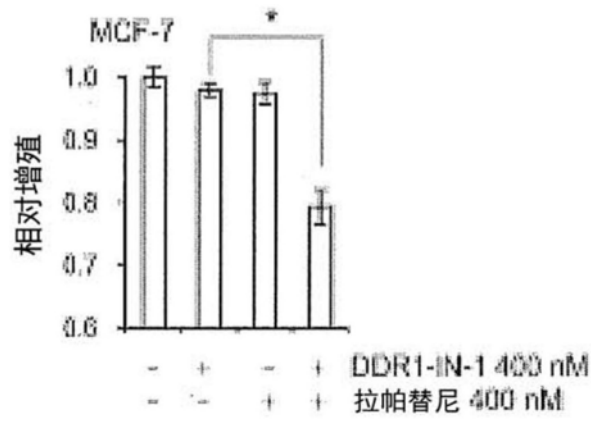


图11B

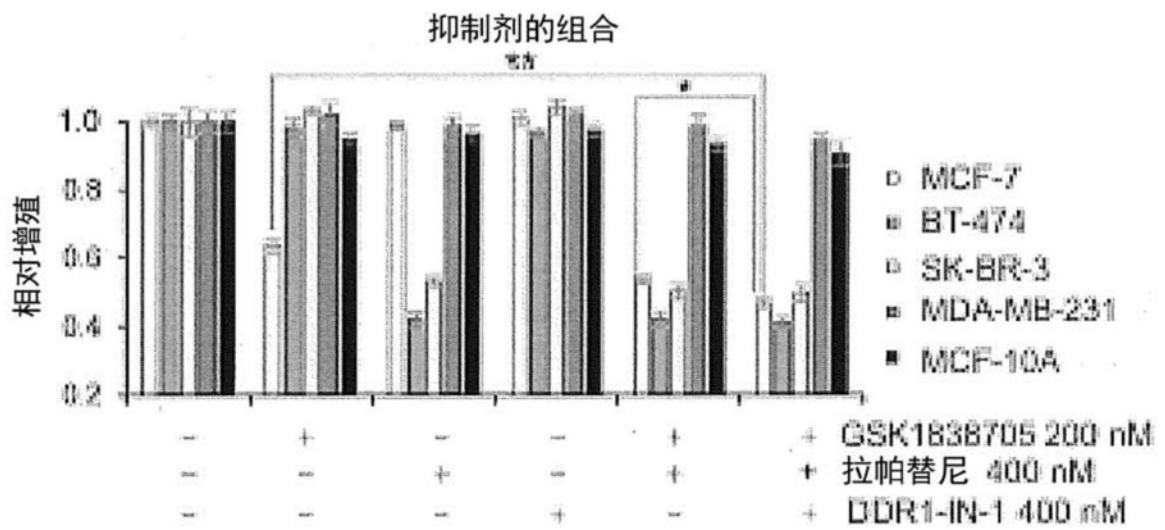


图11C

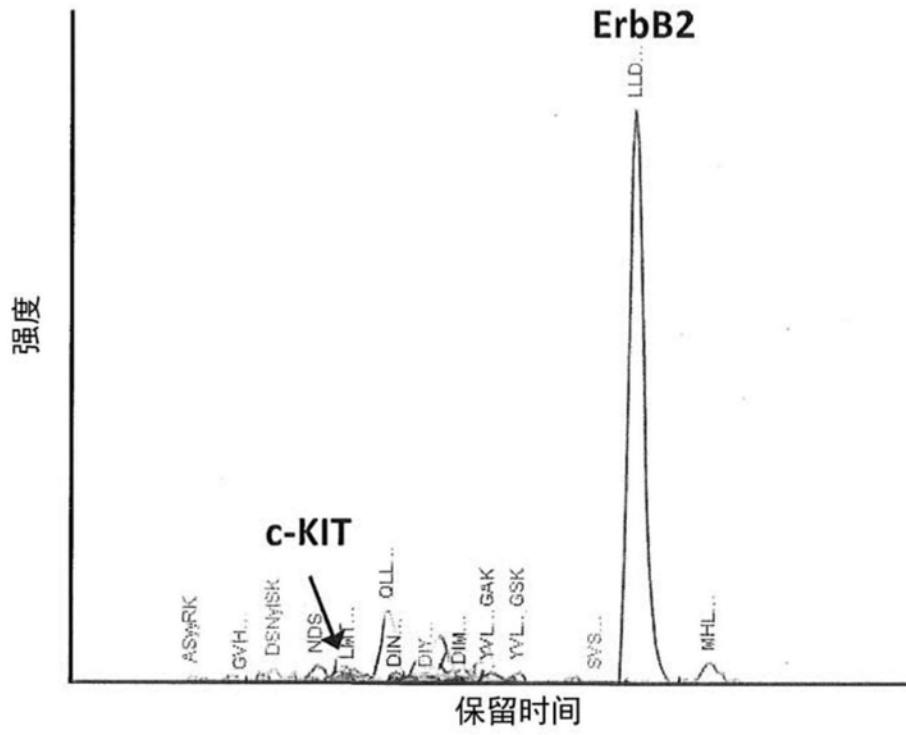


图12A

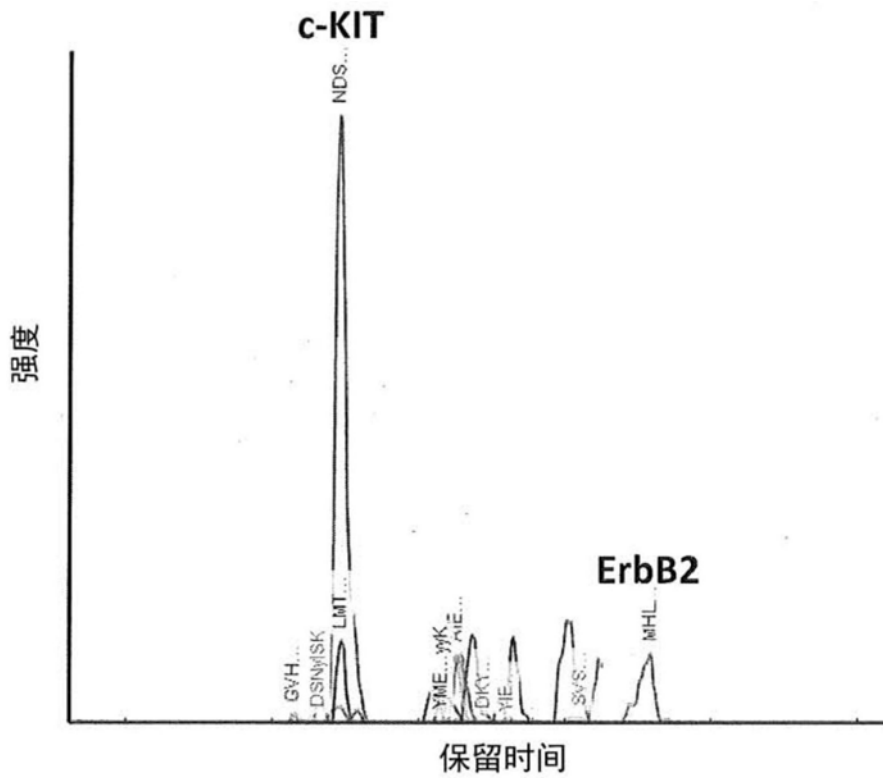


图12B

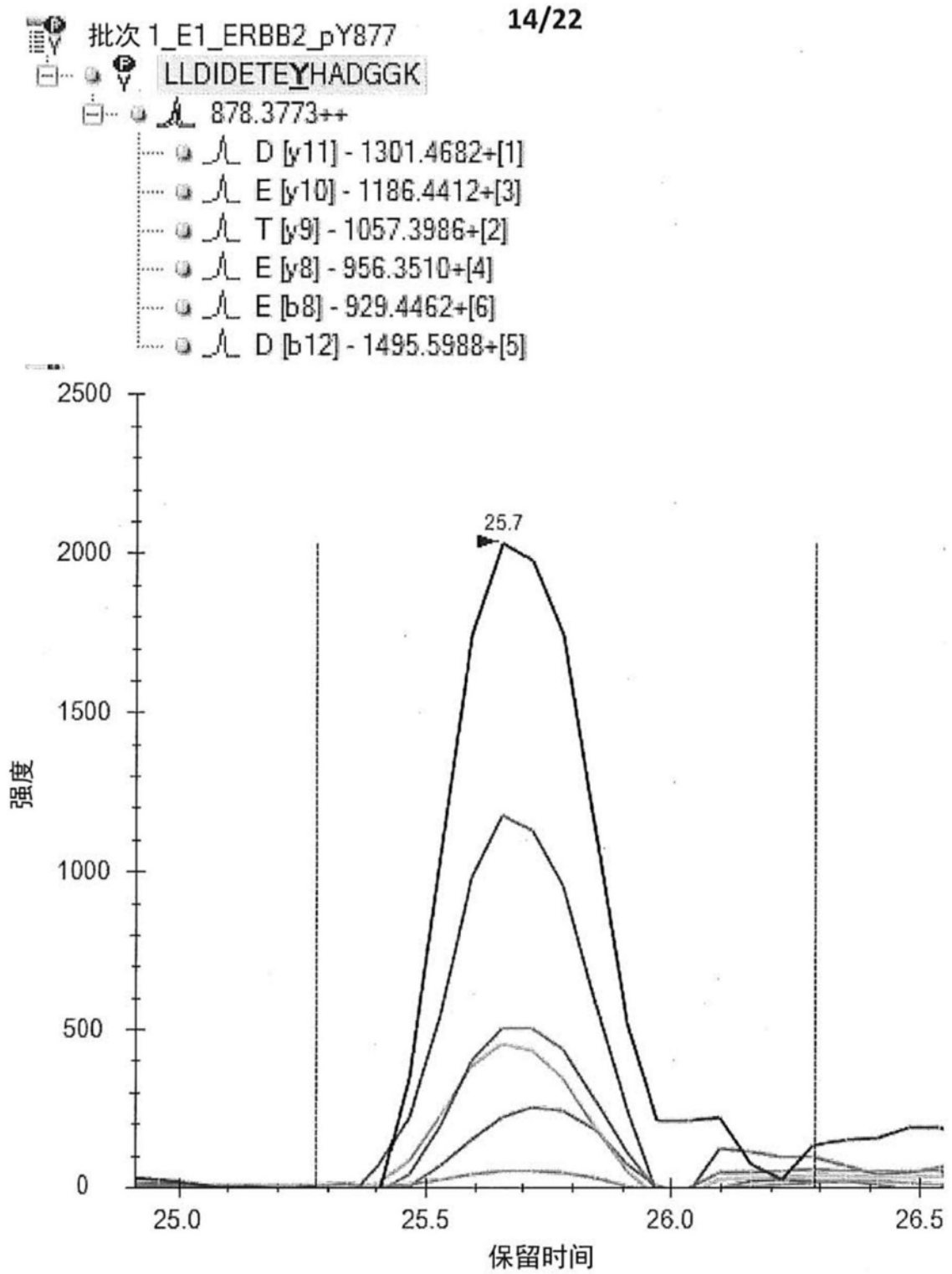


图12C

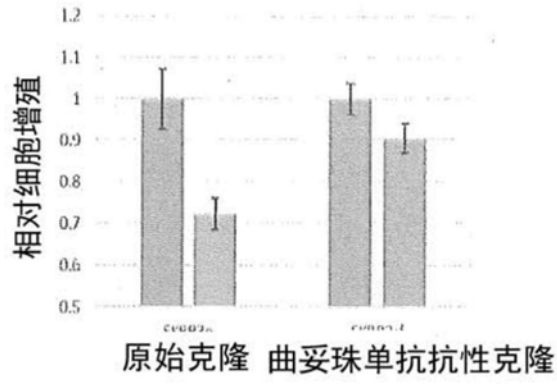


图13A

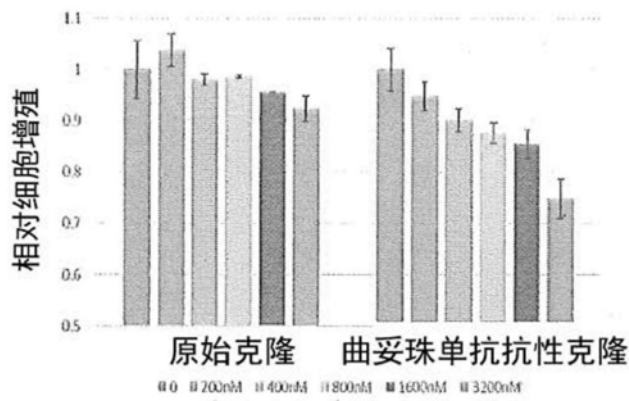


图13B

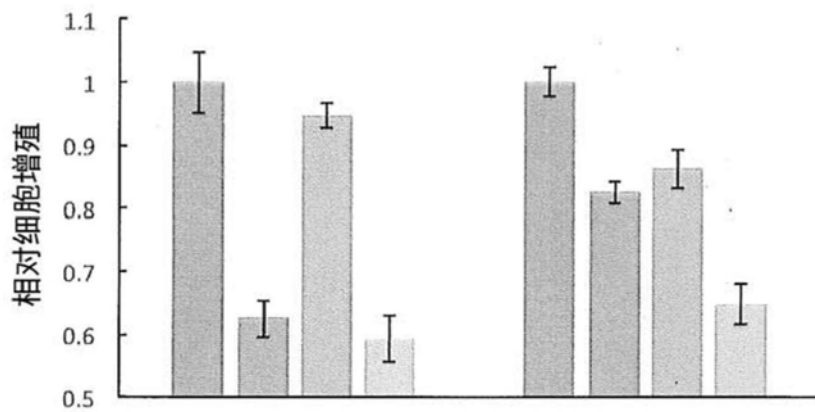


图13C

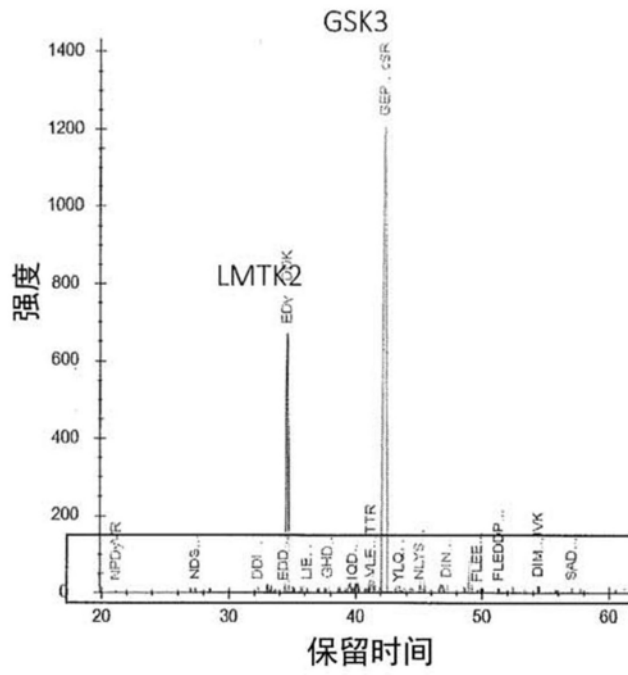


图14A

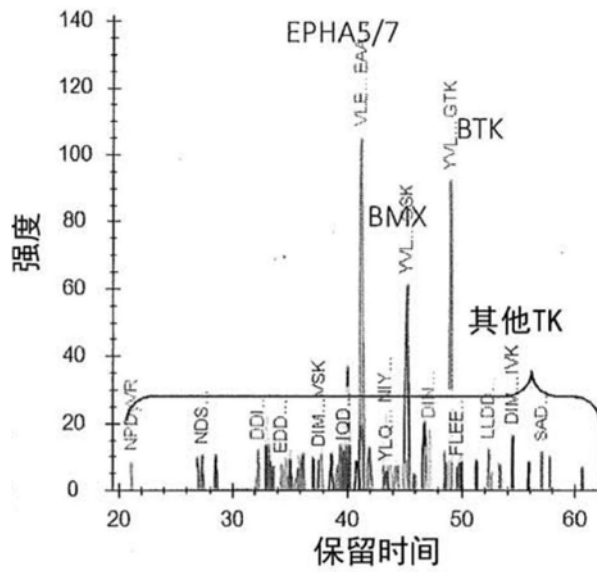


图14B

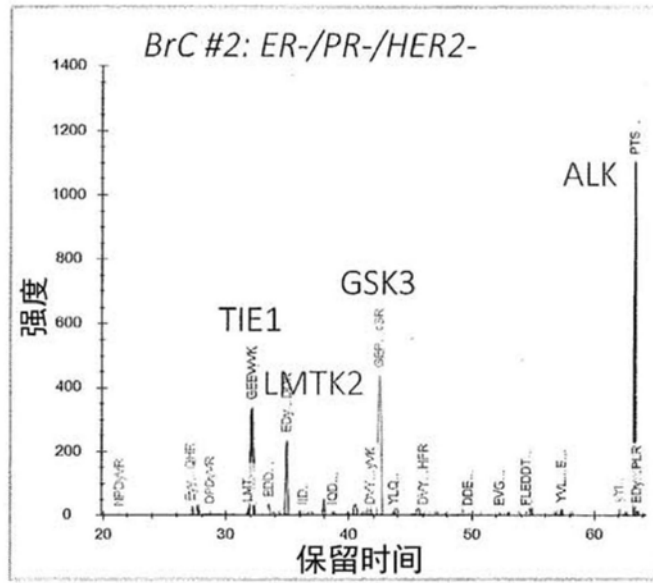


图14C

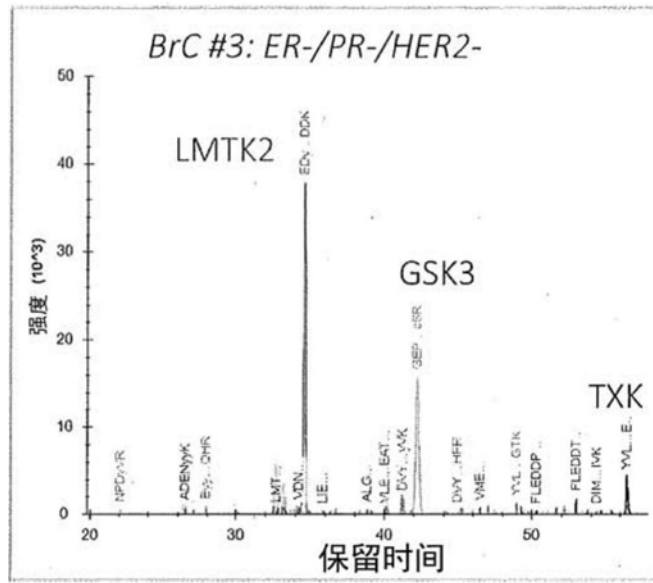


图14D

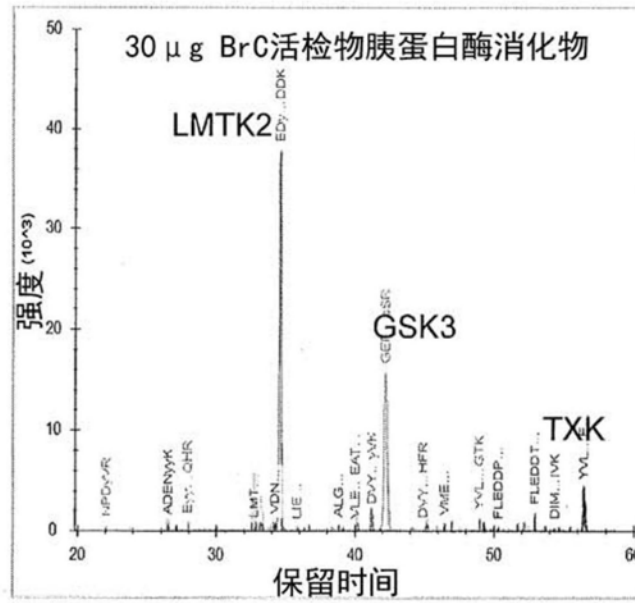


图15A

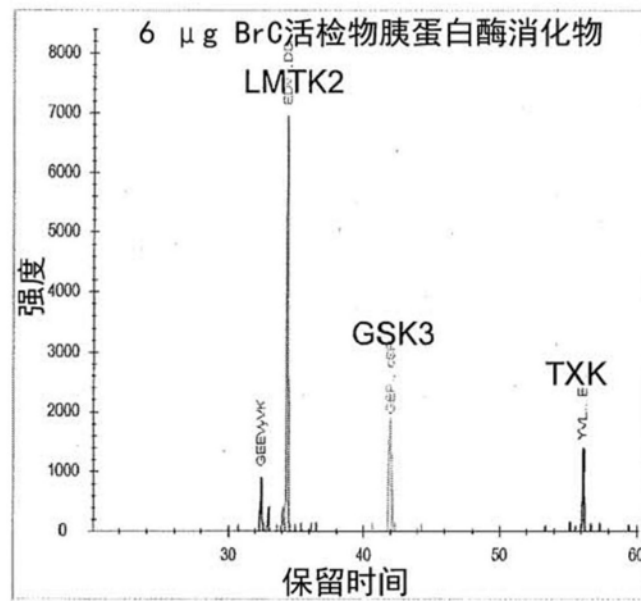


图15B

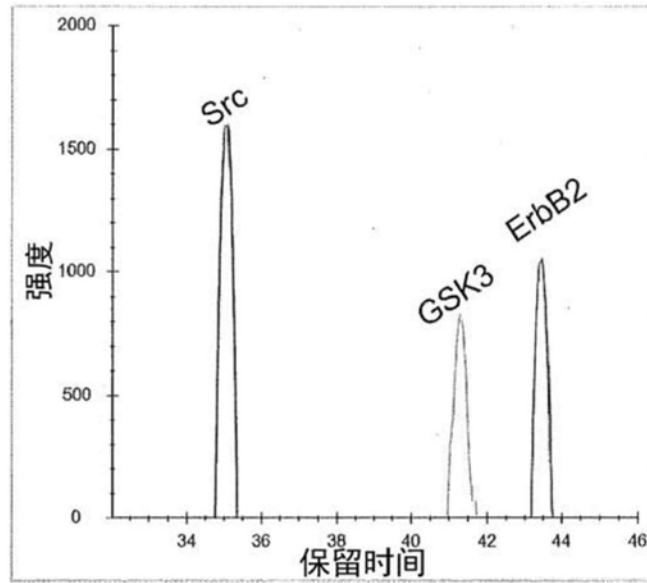


图16A

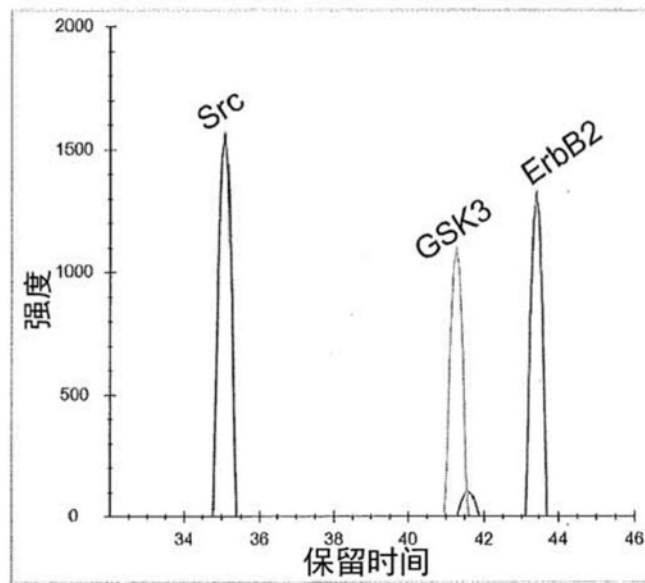


图16B

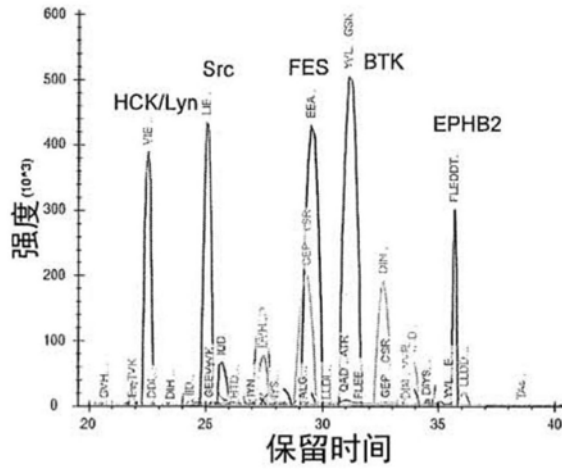


图17A

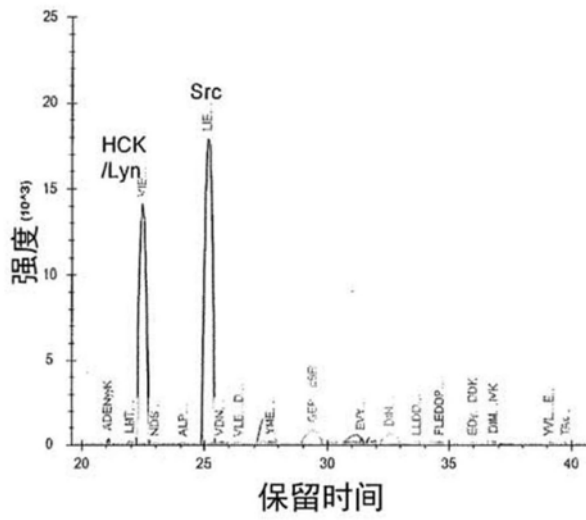


图17B

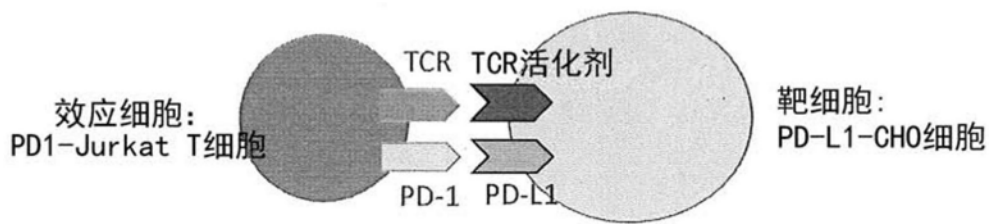


图18A

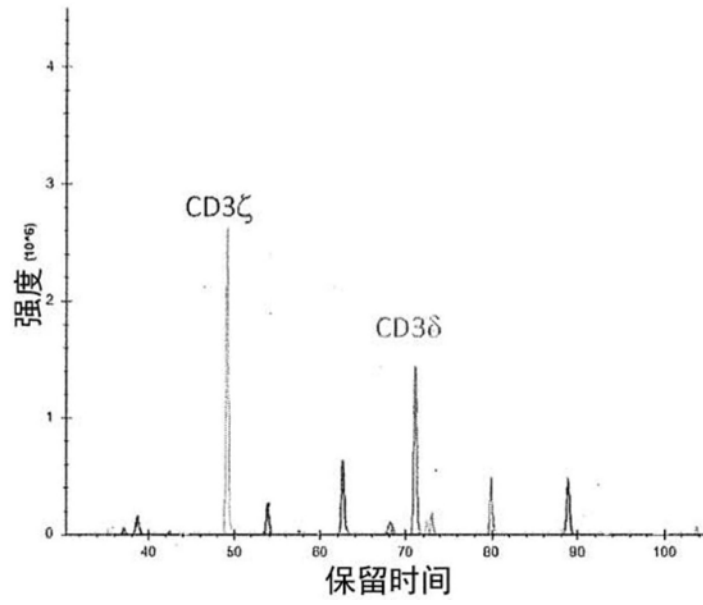


图18B

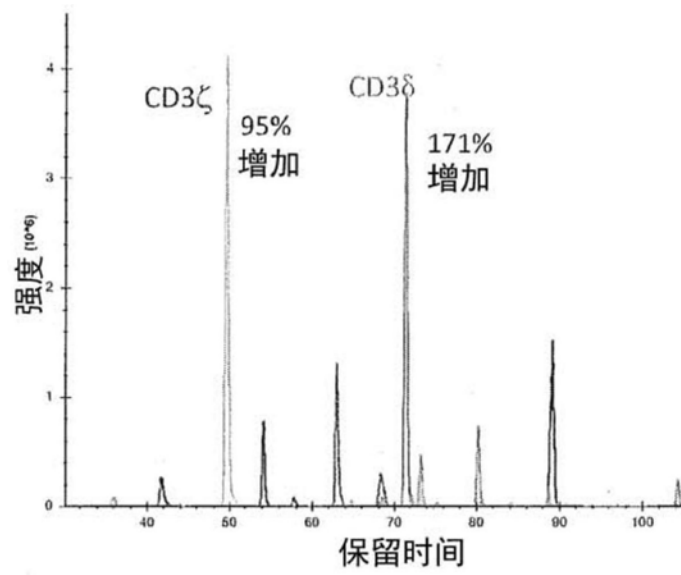


图18C

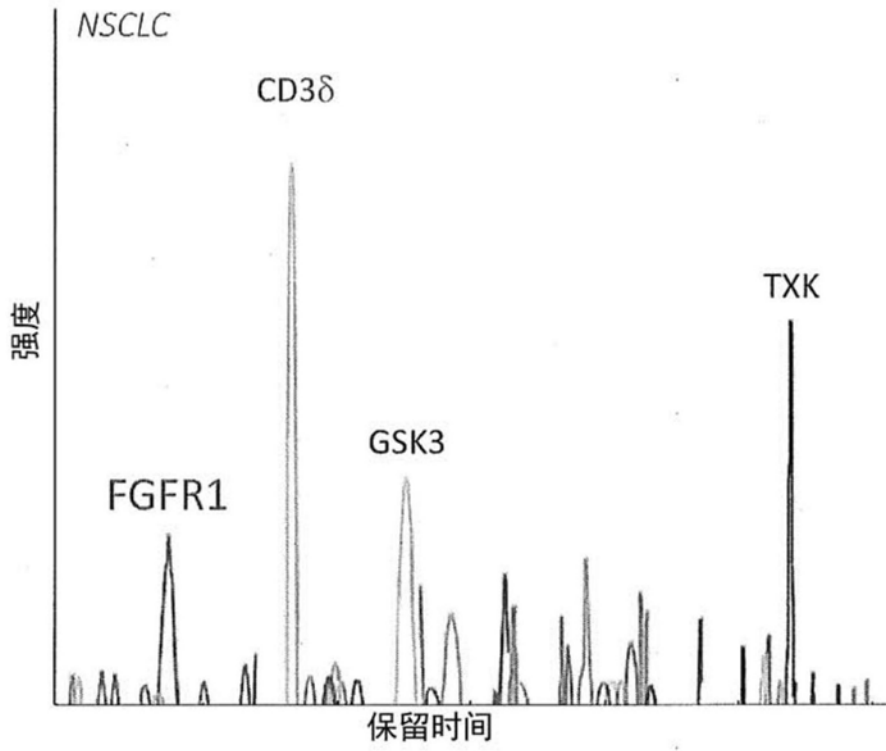


图19A

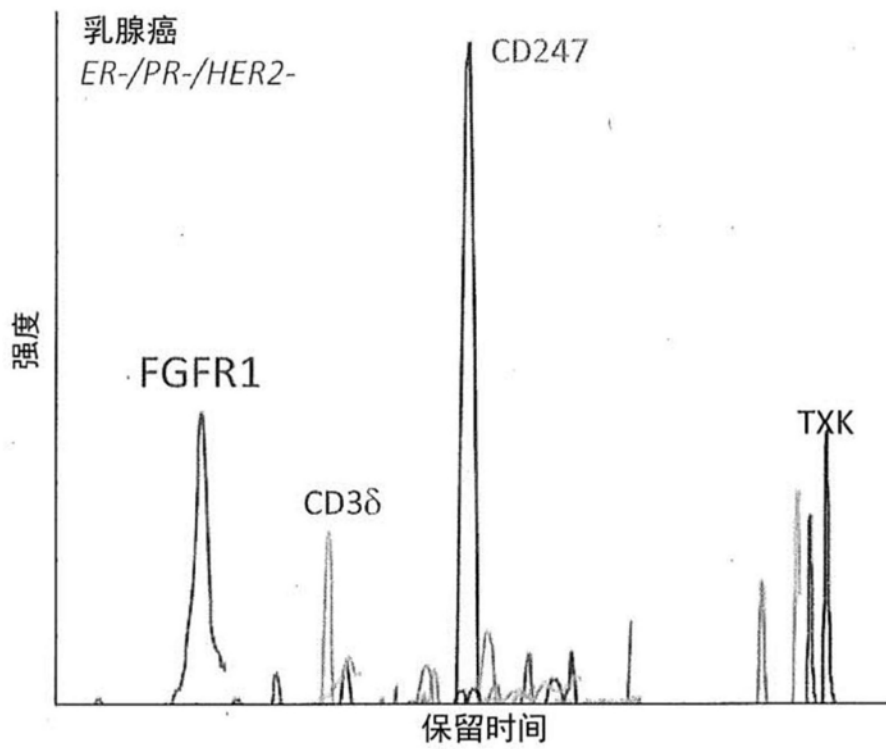


图19B

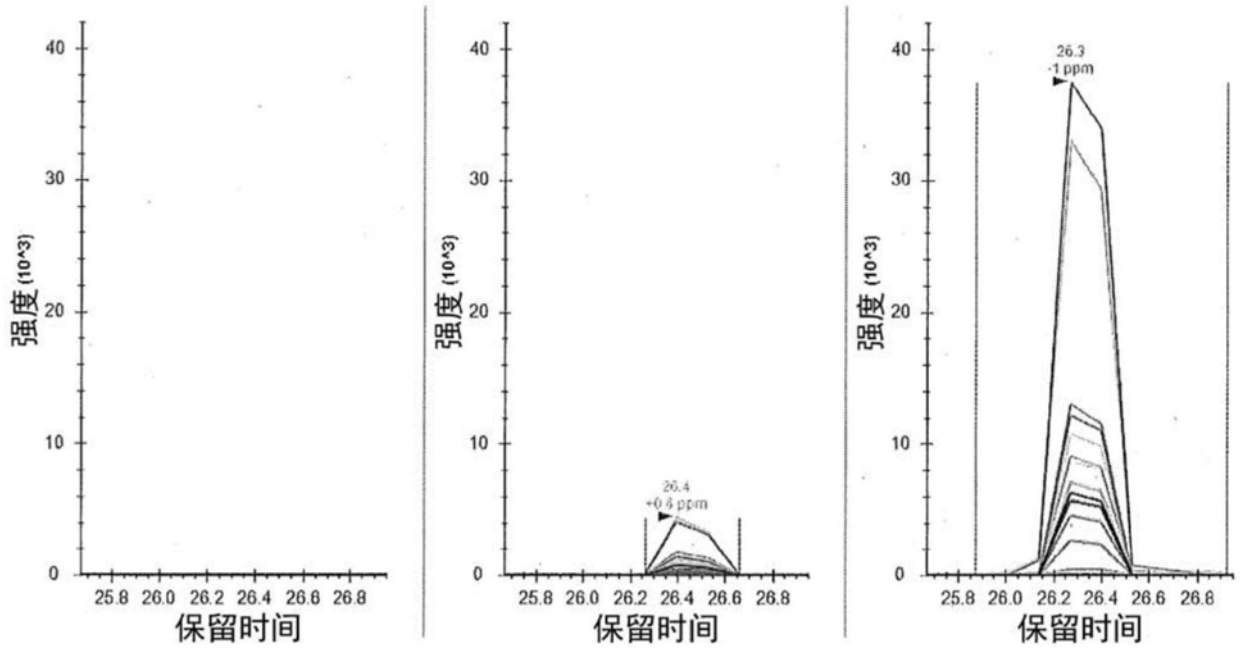


图20

专利名称(译)	用于以变体SH2结构域对蛋白质酪氨酸磷酸化进行概述的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109564215A</a>	公开(公告)日	2019-04-02
申请号	CN201780047062.X	申请日	2017-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	李顺成		
申请(专利权)人(译)	李顺成		
当前申请(专利权)人(译)	李顺成		
[标]发明人	李顺成 刘旭光		
发明人	李顺成 刘旭光		
IPC分类号	G01N33/53 G01N1/34 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 G01N33/6815 G01N33/6848 G01N1/34 G01N33/6812 G01N2440/14 C07K14/435 G01N33/54306 G01N2560/00		
代理人(译)	余颖 陈扬扬		
优先权	62/348722 2016-06-10 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本文提供了对样品的蛋白质酪氨酸磷酸化进行概述的方法，所述方法包括：将样品与SH2超结合体接触，从而使包含于样品的含pTyr的肽与SH2超结合体结合；将结合的含pTyr的肽从样品分离；和鉴定分离的含pTyr的肽。

