

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03813727.5

[51] Int. Cl.

A61K 38/04 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

C07K 5/00 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年8月12日

[11] 授权公告号 CN 100525829C

[22] 申请日 2003.4.14 [21] 申请号 03813727.5

[30] 优先权

[32] 2002.4.15 [33] US [31] 60/372,091

[86] 国际申请 PCT/US2003/011799 2003.4.14

[87] 国际公布 WO2003/089922 英 2003.10.30

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.13

[73] 专利权人 美国国家红十字会

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 D·J·哈蒙德 J·T·拉斯罗普

[56] 参考文献

US5235039A 1993.8.10

Microscale, filtration - type binding assay for studying myosin - erythrocyte protein 4.1 interactions. Richard H. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Vol. 188. 1990

Radioactive screening of synthetic peptide libraries. Christoph W. Turck. METHODS: A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 6. 1994

审查员 曲燕

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘玥 庞立志

权利要求书 7 页 说明书 30 页

[54] 发明名称

检测混合物中配体和靶标的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种表征与配体结合的靶标的方法。该方法包括提供配体，可以是附着于支持物上的配体，将配体与靶标接触，使至少一种靶标结合上至少一种配体。该方法还包括将得到的复合物固定在第一基质上，使每种复合物在第一基质上有不同的位置，再将复合物中的靶标转移到第二基质上。靶标在第二基质上的位置与配体-支持物复合物在第一基质上的位置对应。然后再检测第二基质上的靶标。

1. 一种表征与配体结合的靶标的方法，该方法包括：

(i) 提供一种或多种配体，其中每种配体附着于支持物上以形成一种或多种配体-支持物复合物，

(ii) 将配体-支持物复合物与一种或多种靶标在一定条件下接触，该条件可使至少一种靶标与至少一种配体-支持物复合物结合，从而形成一种或多种靶标-配体-支持物复合物，

(iii) 将配体-支持物复合物和靶标-配体-支持物复合物固定于第一基质，使每个配体-支持物复合物和每个靶标-配体-支持物复合物在第一基质上有不同的位置，

(iv) 将至少一种靶标-配体-支持物复合物中的至少一部分靶标转移到第二基质，使靶标-配体-支持物复合物中的配体-支持物复合物保留在第一基质，其中靶标在第二基质的位置与第一基质中配体-支持物复合物的位置相对应，和

(v) 检测第二基质上的靶标，

于是与配体结合的靶标得到表征。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，在步骤 (i)，提供两种或多种配体。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中，在步骤 (ii)，将配体-支持物复合物与两种或多种靶标在一定条件下接触，该条件可使至少一种靶标与至少一种配体-支持物复合物结合，从而形成一种或多种靶标-配体-支持物复合物。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中靶标存在于生物流体中。

5. 如权利要求 4 所述的方法，其中生物流体选自：血液、血浆、血清、细胞匀浆、组织匀浆、条件培养基、发酵培养基、脑脊液、尿液、唾液、乳汁、导管液、泪液、汗液、淋巴和精液。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中靶标选自：蛋白质、肽类、氨基酸、核酸、碳水化合物、脂类、药物、合成的无机化合物、合成的有机化合物、任意前述物质的同种型、细胞、细菌、病毒、酵母、以及任意前述物质的组合。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中靶标是血浆蛋白质。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其中血浆蛋白质选自：丁酰胆碱脂

酶、纤维蛋白原、 α -1 蛋白酶抑制剂、朊病毒蛋白、载脂蛋白 A1、免疫球蛋白，对氧磷酶、凝血因子及其任意前述物质的组合。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其中配体选自：氨基酸、肽类、核酸、抗体或其抗原结合片段、碳水化合物、脂类及其组合。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中配体是由 2 个至 15 个氨基酸组成的肽类。

11. 如权利要求 1 所述的方法，其中支持物是树脂珠。

12. 如权利要求 1 所述的方法，其中第一基质包含选自如下的材料：琼脂糖、聚丙烯酰胺、葡聚糖、纤维素、以及任意前述材料的组合。

13. 如权利要求 1 所述的方法，其中第二基质包括选自下列的材料：硝酸纤维素、硅、苯乙烯和聚二氟乙烯尼龙。

14. 如权利要求 1 所述的方法，其中步骤 (v) 包括检测生物学特性、化学特性、物理特性、生化特性、或者任意前述特性的组合。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其中步骤 (v) 包括进行结合试验。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其中结合试验包括将第二基质与抗体或其抗原结合片段接触。

17. 如权利要求 15 所述的方法，其中结合试验包括将第二基质与标记了可检测标签的结合部分接触。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其中可检测标签选自：放射性同位素、发色基团和荧光标签。

19. 如权利要求 14 所述的方法，其中步骤 (v) 包括进行酶活性试验。

20. 如权利要求 14 所述的方法，其中步骤 (v) 包括进行以细胞为基础的试验，其中将第二基质与细胞接触并观察靶标对细胞的作用。

21. 如权利要求 14 所述的方法，其进一步包括步骤 (vi)：重复步骤 (v)，但是检测的特性与步骤 (v) 不同，从而可以鉴定靶标的不同特性或者不同的靶标。

22. 如权利要求 1 所述的方法，其进一步包括：

(vi) 鉴定检测的靶标在第二基质上的位置，

(vii) 鉴定与所检测的靶标在第二基质上的位置相对应的配体-

支持物复合物或配体在第一基质上的位置，和

(viii) 确定配体的化学特性。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其进一步包括：

(ix) 提供鉴定出的配体的多个拷贝，

(x) 将鉴定出的配体的每个拷贝附着于支持物上，由此获得多个配体-支持物复合物，

(xi) 将含多拷贝靶标的组合物与多个配体-支持物复合物在一定条件下接触，所述条件允许配体与靶标结合，形成多个靶标-配体-支持物复合物，和

(xii) 将靶标从靶标-配体-支持物复合物上解离。

24. 如权利要求 23 所述的方法，其进一步包括步骤 (xiii)：用质谱分析鉴定靶标。

25. 如权利要求 1 所述的方法，所述方法进一步包括：

(vi) 重复步骤 (iv)，但是基质和条件与前面重复步骤 (iv) 时不同，从而产生一组基质，每种基质含有不同数量或不同群体的靶标，

(vii) 检测步骤 (vi) 中每种基质上的靶标，和

(viii) 比较第二基质和步骤 (vi) 中每种基质上的靶标数量。

26. 如权利要求 1 所述的方法，其进一步包括：

(vi) 鉴定检测的靶标在第二基质上的位置，

(vii) 鉴定与所检测的靶标在第二基质上的位置相对应的配体-支持物复合物或配体在第一基质上的位置，

(viii) 将配体从支持物和/或第一基质上解离，

(ix) 将配体转移到第三基质，使支持物保留在第一基质，其中配体在第三基质的位置与其在第一基质的位置对应，和

(x) 检测第三基质上的配体。

27. 如权利要求 26 所述的方法，其中步骤 (x) 包括确定配体的化学特性。

28. 如权利要求 27 所述的方法，其中配体的化学特性用下列方法确定：质谱分析、Edman 降解、核酸测序、高效液相色谱 (HPLC) 或其任意组合。

29. 如权利要求 1 所述的方法，其中步骤 (iv) 是在含竞争性结

合剂的介质中进行，该竞争性结合剂与至少一种靶标-配体-支持物复合物中的靶标结合，从而使配体从靶标上解离。

30. 如权利要求 29 所述的方法，其中竞争性结合剂选自：炭疽杆菌、马尔他布鲁氏菌、埃博拉病毒、肉毒杆菌神经毒素、葡萄球菌肠毒素 B、西尼罗病毒、蓖麻毒素、硫芥子气、索曼毒剂、沙林毒剂、塔崩毒剂、VX 毒剂和光气。

31. 一种表征与配体结合的靶标的方法，该方法包括：

(i) 提供一种或多种配体，

(ii) 将每种配体固定在第一基质上，使每个配体在第一基质上有不同的位置，

(iii) 将第一基质中的配体与一种或多种靶标在一定条件下接触，该条件允许至少一种靶标与至少一种配体结合，从而在第一基质中形成一种或多种靶标-配体复合物，

(iv) 在促进靶标与配体解离的溶液中，将第一基质中的至少一种靶标-配体复合物中的至少一部分靶标转移到第二基质，使靶标-配体复合物中的配体仍然保留在第一基质中，其中靶标在第二基质中的位置与配体在第一基质中的位置相对应，和

(v) 检测第二基质上的靶标，

于是与配体结合的靶标得到表征。

32. 如权利要求 31 所述的方法，其中，在步骤 (i)，提供两种或多种配体。

33. 如权利要求 31 所述的方法，其中，在步骤 (ii)，将第一基质中的配体与两种或多种靶标在一定条件下接触，该条件可使至少一种靶标与至少一种配体结合，从而形成一种或多种第一基质中的靶标-配体复合物。

34. 如权利要求 31 所述的方法，其中靶标存在于生物流体中。

35. 如权利要求 34 所述的方法，其中生物流体选自：血液、血浆、血清、细胞匀浆、组织匀浆、条件培养基、发酵培养基、脑脊液、尿液、唾液、乳汁、导管液、泪液、汗液、淋巴和精液。

36. 如权利要求 31 所述的方法，其中靶标选自：蛋白质、肽类、氨基酸、核酸、碳水化合物、脂类、药物、合成的无机化合物、合成的有机化合物、任意前述物质的同种型、真核细胞、原核细胞、细菌、

病毒、酵母、及其任意前述物质的组合。

37. 如权利要求 31 所述的方法，其中靶标是血浆蛋白质。

38. 如权利要求 37 所述的方法，其中血浆蛋白质选自：丁酰胆碱脂酶、纤维蛋白原、 α -1 蛋白酶抑制剂、朊病毒蛋白、载脂蛋白 A1、免疫球蛋白，对氧磷酶、凝血因子及其前述物质的任意组合。

39. 如权利要求 31 所述的方法，其中配体选自：氨基酸、肽类、核酸、抗体或其抗原结合片段、碳水化合物、脂类及其组合。

40. 如权利要求 39 所述的方法，其中配体是由 2 个至 15 个氨基酸组成的肽类。

41. 如权利要求 31 所述的方法，其中第一基质包含选自下述的材料：琼脂糖、聚丙烯酰胺、葡聚糖、纤维素、多羧基化甲基丙烯酸酯聚合物、尼龙、棉花、硅、玻璃、苯乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、和任意前述材料的组合。

42. 如权利要求 31 所述的方法，其中第二基质包括选自下列的材料：硝酸纤维素、硅、苯乙烯和聚二氟乙烯尼龙。

43. 如权利要求 31 所述的方法，其中步骤 (v) 中，靶标由一种方法检测，该方法包括检测生物学特性、化学特性、物理特性、生化特性、或者前述特性的任意组合。

44. 如权利要求 43 所述的方法，其中步骤 (v) 包括进行结合试验。

45. 如权利要求 44 所述的方法，其中结合试验包括将第二基质与标记了可检测标签的结合部分接触。

46. 如权利要求 45 所述的方法，其中可检测标签选自：放射性同位素、发色基团和荧光标签。

47. 如权利要求 43 所述的方法，其中步骤 (v) 包括进行酶活性试验。

48. 如权利要求 16 所述的方法，其中步骤 (v) 包括进行以细胞为基础的试验，其中将第二基质与细胞接触并观察靶标对细胞的作用。

49. 如权利要求 43 所述的方法，其进一步包括步骤 (vi)：重复步骤 (v)，但是检测的特性与步骤 (v) 不同，从而可以鉴定靶标的不同特性或者不同的靶标。

50. 如权利要求 31 所述的方法，其进一步包括：

(vi) 鉴定检测的靶标在第二基质上的位置,

(vii) 鉴定与所检测的靶标在第二基质上的位置相对应的配体在第一基质上的位置, 和

(viii) 确定配体的化学特性。

51. 如权利要求 50 所述的方法, 其进一步包括:

(ix) 提供鉴定出的配体的多个拷贝, 将鉴定出的配体的每个拷贝附着于支持物上, 由此获得多个配体-支持物复合物,

(xi) 将含多拷贝靶标的组合物与多个配体-支持物复合物在一定条件下接触, 该条件允许配体与靶标结合, 形成多个靶标-配体-支持物复合物, 和

(xii) 将靶标从靶标-配体-支持物复合物上解离。

52. 如权利要求 51 所述的方法, 其进一步包括步骤 (xiii): 用质谱分析鉴定靶标。

53. 如权利要求 31 所述的方法, 所述方法进一步包括:

(vi) 重复步骤 (iv), 但是基质和条件与前面重复步骤 (iv) 时不同, 从而产生一组基质, 每种基质含有不同数量靶标,

(vii) 检测步骤 (vi) 中每种基质上的靶标, 和

(viii) 比较第二基质和步骤 (vi) 中每种基质上的靶标数量。

54. 如权利要求 31 所述的方法, 其进一步包括:

(vi) 鉴定检测的靶标在第二基质上的位置,

(vii) 鉴定与所检测的靶标在第二基质上的位置相对应的配体在第一基质上的位置,

(viii) 将配体从第一基质上解离,

(ix) 将配体转移到第三基质, 其中配体在第三基质的位置与其在第一基质的位置对应, 和

(x) 检测第三基质上的配体。

55. 如权利要求 54 所述的方法, 其中步骤 (x) 包括确定配体的化学特性。

56. 如权利要求 55 所述的方法, 其中配体的化学特性用下列方法确定: 质谱分析、Edman 降解、核酸测序、高效液相色谱 (HPLC) 或其任意组合。

57. 如权利要求 31 所述的方法, 其中步骤 (iv) 是在含竞争性结

合剂的介质中进行，该竞争性结合剂与至少一种靶标-配体复合物中的靶标结合，从而使配体从靶标上解离。

58. 如权利要求 36 所述的方法，其中所述原核细胞是细菌细胞。

59. 如权利要求 36 所述的方法，其中所述真核细胞选自哺乳动物细胞、酵母细胞和植物细胞。

60. 如权利要求 41 所述的方法，其中第一基质包含选自下述的材料：多羟基化甲基丙烯酸酯聚合物和 650-M 氨基 ToyoPearl 树脂。

检测混合物中配体和靶标的方法

与相关专利申请的交叉引用

本专利申请要求美国临时专利申请 No. 60/372, 091 (2002 年 4 月 15 日提交) 的优先权。

技术领域

本专利是关于表征与配体结合的靶标的方法。

发明背景

亲和层析是从某种样品中浓缩和分离靶分子的常用方法，它是基于靶分子和其结合物（如配体）的特异性的三维相互作用。几乎任何靶分子都可以分离或获得与其结合的配体。潜在的配体包括生物分子如蛋白质、抗体、肽等等。用组合合成技术可以产生含上百万潜在配体的文库，这些技术已被本领域所熟知（可参考 Lam et al., Nature, 354, 82-84 (1991) 和国际专利申请 WO 92/00091）。为有助于从样品中分离靶分子，可以将配体固定到一种固体支持基质上，例如单个的颗粒（如层析树脂珠）或连续的支持物（如芯片）。固定在固体支持基质上的配体可以用来从复杂的溶液中纯化靶标 (Baumbach and Hammond, BioPharm May, 24-31 (1992))。

除了可以从样品中分离靶分子外，亲和层析还提供了检测潜在的配体和靶分子间相互作用的手段。检测靶标-配体的结合是富有挑战性的。已经发展了一些检测靶标-配体复合物的方法，例如放射性标记和免疫学方法（可参考美国专利 5,834,318，国际专利申请 WO 01/40265，和美国专利申请 09/453,115）。但是，目前可获得的检测技术有潜在的缺点，包括需要通过放射性标记来修饰靶标，存在来自配体-靶标-检测系统间相互作用的干扰，以及只能检测比较少的检测方法已经建立的靶标。

鉴于上述原因，有必要建立一种检测靶标-配体结合的方法，该方法不需要修饰待检的靶标，能够检测从配体分离的靶标并鉴定配体，还可以通过其生物的、生化的或化学的特性来检测靶标。本发明

提供了这样的一种方法。本发明的上述和其他一些优点，以及另外的发明特征，将在下面对本发明的说明中得到体现。

发明概述

本发明提供了一种表征与配体结合的靶标的方法。在一个实施方案中，该方法包括：1. 提供一种或多种配体，使每种配体吸附在一种支持物上形成一种或多种配体-支持物复合物；2. 将配体-支持物复合物与一种或多种靶标在一定条件下接触，该条件可使至少一种靶标与至少一种配体-支持物复合物结合，从而形成一种或多种靶标-配体-支持物复合物；3. 将配体-支持物复合物和靶标-配体-支持物复合物固定在第一基质上，使每个配体-支持物复合物和每个靶标-配体-支持物复合物在基质中有不同的位置；4. 将至少一种靶标-配体-支持物复合物中的至少一些靶标转移到第二基质，使靶标-配体-支持物复合物中的配体-支持物复合物仍然保留在第一基质中，而第二基质中的靶标的位置与第一基质中配体-支持物复合物的位置相对应；5. 检测第二基质上的靶标。

作为替代方法，表征与配体结合的靶标的方法包括：1. 提供一种或多种配体；2. 将每种配体固定在第一基质上，使每种配体在第一基质上有不同的位置；3. 将第一基质中的配体与一种或多种靶标在一定条件下接触，使至少一种靶标与至少一种配体结合，从而在第一基质上形成一种或多种靶标-配体复合物；4. 将至少一种靶标-配体复合物中的至少一些靶标转移到第二基质，使靶标-配体复合物中的配体仍然保留在第一基质中，而第二基质中的靶标的位置与第一基质中配体的位置相对应；5. 检测第二基质上的靶标。这些方法用于表征与配体结合的靶标。

发明详述

本发明提供一种方法可以同时检测从样品中分离的靶分子和鉴定能特异性结合靶分子的配体。具体地说，本发明提供了一种表征与配体结合的靶标的方法。该方法包括：1. 提供一种或多种配体，使每种配体吸附在一种支持物上形成一种或多种配体-支持物复合物；2. 将配体-支持物复合物与一种或多种靶标在一定条件下接触，该条件

可使至少一种靶标与至少一种配体-支持物复合物结合，从而形成一种或多种靶标-配体-支持物复合物；3. 将配体-支持物复合物和靶标-配体-支持物复合物固定在第一基质上，使每种配体-支持物复合物和每种靶标-配体-支持物复合物在基质中有不同的位置；4. 将至少一种靶标-配体-支持物复合物中的至少一部分靶标（如一种或多种靶分子）转移到第二基质，使靶标-配体-支持物复合物中的配体-支持物复合物仍然保留在第一基质中，其中靶标在第二基质中的位置与第一基质中配体-支持物复合物的位置相对应；5. 检测第二基质上的靶标。作为替代方法，该方法包括：1. 提供一种或多种配体；2. 将每种配体固定在第一基质上，使每种配体在第一基质上有不同的位置；3. 将第一基质中的配体与一种或多种靶标在一定条件下接触，使至少一种靶标结合上至少一种配体，从而在第一基质中形成一种或多种靶标-配体复合物；4. 将至少一种靶标-配体复合物中的至少一些靶标转移到第二基质，使靶标-配体复合物中的配体仍然保留在第一基质中，其中靶标在第二基质中的位置与第一基质中配体的位置相对应；5. 检测第二基质上的靶标。因此本发明的方法可以表征与配体结合的靶标。

本发明与以往的配体与靶标的筛选方法相比有许多优点。首先，靶标和与其相关的配体可在解离后检测。此外，靶标和配体在被检测时均不需要预先修饰。因此，检测系统的组分和配体、支持物或系统的其他元素间的相互作用就被避免了。第二，因为样品中的所有成分可被捕获在第一或第二基质上的独特位置，所以可以先后或同时从第二基质中筛选多种独立的靶标的存在。而本发明的另一个优点是如果需要可以保持靶标的生物、生化或化学活性。转移条件可以方便的控制，从而在某个时间只转移一部分结合的靶标，这样可以确定靶标的特异性洗脱条件或有选择地转移靶标的不同亚型。事实上，通过不同的洗脱条件，有可能区分化学或一级结构基本相同的分子或生物体或对映体，因此可以展示不同的三维或四级结构。此外，通过用含能竞争结合靶分子上活性位点的分子的转移缓冲液将靶分子转移到第二基质上还可以识别能特异性结合该活性位点的配体。这些优点使本发明的方法比前面提到的本领域的传统方法更具优势。

靶标

基于本发明的目的，术语“靶标”在这里是指能与配体结合的任何生物的、化学的或生化的实体，如某种化合物、分子、病毒或细胞。靶标可以从自然界分离的，也可以是合成制造的，在自然界中可以有机的也可以是无机的（如合成的无机化合物或合成的有机化合物）。举例来说，靶标可以是一种药物或候选药物（如小分子候选药物），一种肥料成分，一种杀虫剂成分，或者是它们的衍生物、类似物或对映体。此外，靶标对任何原核生物或真核生物来说可以是内源的或外源的，这些生物可以是一种细菌、真菌、酵母、植物或哺乳动物。适合本发明方法的靶标包括（并不仅限于）：细胞（如干细胞或培养细胞），细菌，病毒，酵母，蛋白质，肽类，蛋白复合物（如凝血因子 XIII 和纤维蛋白原或凝血因子 VIII 和 Von Willebrand 因子），朊病毒蛋白，氨基酸，核酸，糖类，脂类，以及上述物质的同种型和它们的混合物。优选的靶标是蛋白质。适合的蛋白质靶标包括诸如受体、抗体、免疫原、酶（如蛋白酶）和酶底物等。更优选的蛋白质靶标是血浆蛋白质。血浆蛋白质包括诸如丁酰胆碱脂酶 (BChE)，纤维蛋白原， α -1 蛋白酶抑制剂，载脂蛋白 A1（也称为 Apo-A1 脂蛋白），免疫球蛋白，对氧磷酶 (paraoxonase) 或凝固因子等，所有这些蛋白质是机体在非疾病状态下自然存在的。另外，血浆蛋白质也包括在某种疾病状态下血浆中出现的蛋白（可能在健康个体血浆中没有），或者是在使用了某种药剂（如某种治疗药物）后出现在血浆中。在这点上，血浆蛋白质可以是一种感染性的 PrPsc 朊病毒蛋白。

本发明方法的靶标可以从任何来源获得。含靶标的样品可以是一种复合溶液，如土壤浸出液、空气、水、食物、用于评价环境污染的拭子、化学反应的中间产物或终产物，诸如此类。含靶标的样品可以是一种化学的或合成的混合物，可以存在于一个组合文库和/或极端压力、温度等条件下的有机溶剂中。优选的靶标存在于生物流体中或从生物流体中分离得到。“生物流体”是指从原核生物或真核生物中获得的任何水溶液。生物流体可以从原核生物或真核生物中直接获得，如血液、淋巴、泪液、唾液、汗液和尿液。另外，生物流体也可以从培养细胞中获得，如发酵培养基或细胞培养液。适合本发明方法的生物流体包括（并不仅限于）：血液、血浆、血清、细胞匀浆、组

织匀浆、条件培养基、发酵培养基、脑脊液、尿液、唾液、乳汁、导管液、泪液、汗液、淋巴和精液。优选的生物流体是血液。更优选的生物流体是血浆。

本发明方法的一个优点是能够在生物、生化或化学活性的基础上识别和/或鉴定靶标，不需要预先知道靶标的分子特征。因而，靶标可以具有生物活性，在实施本发明方法时不需要经过加工（如热灭活）。例如，在某种未知靶标（如一种病毒）被转移到相应位置后，第二支持材料上生长的细胞培养物的活力可能增强或减弱。同样的，靶标影响更特异的细胞功能（如产生特殊蛋白质或其他细胞成分）的能力可以被加强或减弱，从而提供靶标的有价值的特性。靶标也可以是一种活细胞，当其被转移到第二基质上后暴露在某种毒性化合物中以鉴定细胞对毒素的抵抗力。因此，本发明提供了一种方法用于鉴定有特异生物学活性的新靶标或未知靶标（如在实施本发明方法前还未被鉴别的蛋白质）。一旦在第二支持物上识别出靶标的独特位置，就可以确定其在第一支持物上的位置，就可以鉴定最初捕获它的配体。

配体

基于本发明的目的，术语“配体”这里指能与靶标结合的任何生物的、化学的或生化的实体，如一种化合物、分子或细胞。配体可以从自然界分离的或是合成制造的材料。配体对一种原核生物或真核生物来说可以是内源的或外源的，这些生物可以是一种细菌、真菌、酵母、植物或哺乳动物。适合本发明的配体包括（并不仅限于）：氨基酸，肽类，核酸，抗体制品（如抗体片段、化学修饰抗体等等），碳水化合物，糖类，脂类，有机分子，以及它们的混合物，所有上述物质可以是潜在的预防或治疗生物学上的机能紊乱的药物。

有机分子包括，例如常被用做治疗药物的有机合成化合物。这样的分子可以用组合合成的方法大量产生，也可以通过某些合成策略设计更特异的分子。同样，有机分子也包括自然界的产物和类似物，无论它们是从自然环境中提取的或是人工合成的。术语“有机的”这里并不仅限于只含有碳和氢的分子，而是采用广义用法，包括生物领域的大分子。

优选的配体是肽类。更优选地肽基本上由大约 1 个至 15 个氨基

酸组成。术语“肽”这里指含至少一个肽键的实体，可以含有D型和/或L型氨基酸。理想的配体是基本上由2个至10个左右氨基酸组成的肽（例如约2、3、4、5、6、7、8、9或10个左右的氨基酸）。如需要，肽配体可以用常用的产生组合文库的方法制备，例如切割、偶联、重组或为本领域所熟知的其他方法（参考Furka et al., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 37, 487-493 (1991); Lam et al., *Nature*, 354, 82-84 (1991); 国际专利申请 WO 92/00091; 美国专利 5,010,175, 5,133,866, 和 5,498,538）。肽文库的表达在Devlin et al., *Science*, 249, 404-406 (1990)中也有描述。在肽文库中，含不同序列的肽的数目随着偶联反应数、肽的大小和使用的不同氨基酸数的增加迅速增加。例如，将19种氨基酸随机插入五肽可获得多达2,476,099 (19^5)种序列不同的肽(Lam et al., *supra*)。组合方法允许直接在支持物上制备配体文库。典型的做法是将配体合成在支持物基质的颗粒上，使每个配体的多个拷贝合成在一个颗粒（如珠子）上，当然这种做法不是实施本发明所必需的。

本发明方法可以通过将两种或多种配体与一种靶标接触从而同时确定靶标的多种配体。同样，本发明方法可同时鉴定和/或确定一个样品中的多种靶标。在这点上，配体或配体-支持物复合物可以在一定条件下与两种或多种靶标接触，使至少一种靶标结合上至少一种配体-支持物复合物，从而形成一种或多种靶标-配体复合物（该复合物可以进一步与支持物结合形成复合物）。

支持物和基质

术语“支持物”这里指用于固定配体的任何支持基质，例如本领域已知的固相支持物。合适的支持物包括（并不仅限于）薄膜、滤纸、筛网、或各种颗粒，这些颗粒是由下列材料构成或是由下列材料包裹：纤维素、丙烯酸树脂、聚丙烯酰胺或多羟基化甲基丙烯酸酯聚合物、聚苯乙烯、葡聚糖、琼脂糖、多糖、亲水乙烯基聚合物、以及它们的聚合衍生物及其任意组合，适当的支持物还包括各种多孔的或无孔的基质，配体可以直接吸附在这些基质上面或在其上合成。优选的支持物是惰性的，因而其与靶标和/或配体的化学反应减到最少。一种特别优选的支持物是多羟基甲基丙烯酸聚合物。多种树脂都可以通

过商业途径购买到, 优选支持物是树脂珠, 如层析用的树脂珠。许多展示潜在配体的固相支持物可以通过商业途径购买到。另外, 本发明方法的一种或多种配体可以用标准方法间接吸附或直接固定在第一支持物上, 这些方法可参考 Harlow and Lane, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988); Biancala et al., *Letters in Peptide Science*, 7 (291), 297 (2000); MacBeath et al., *Science*, 289, 1760-1763 (2000); Cass et al., ed., *Proceedings of the Thirteenth American Peptide Symposium*. Leiden, Escom, 975-979 (1994); U. S. Patent 5,576, 220; Cook et al., *Tetrahedron Letters*; 35, 6777-6780 (1994); and Fodor et al., *Science*, 251 (4995), 767-773 (1991)。在一个实施方案中, 配体合成在支持物的表面, 这种方法对制备肽文库较有利。配体可以直接化学结合到支持物上, 或者通过一些接头与支持物连接, 如链亲和素、 β 丙氨酸、甘氨酸、含有甘氨酸-丝氨酸的聚合物、分子式含 $-(CH_2)_n-$ 的短链碳水化合物、聚乙二醇、 ϵ 氨基己酸, 以及含 $-O(CH_2)_n$ 的接头, 其中 n 为 1-30。如需要, 配体可以通过一个或多个可解离的接头连接, 如对光或对酸不稳定的部分, 这样就可以选择性的解离一部分配体用于分析。解离下来的配体有多种用途, 如作为蛋白亲和纯化的基质, 对映体分离(例如浓缩、分离、检测、鉴定、定量或识别样品中的靶标), 作为诊断治疗工具, 化学反应的催化剂和增强剂, 以及蛋白质的选择性稳定剂。

在本发明方法中, 配体-支持物复合物、靶标-配体-支持物复合物、或者配体(由实施者确定的本发明方法的参数决定)固定在第一基质上。基质可以是任何具有至少二维结构的固相材料, 配体-支持物复合物、靶标-配体-支持物复合物、或者配体可以固定在其上或其内。基质材料的选择应使靶标可以从第一基质上转移到第二种基质上。比较理想的第一基质对靶标和配体来说是一种化学惰性材料。第一基质可以包括如: 琼脂糖、聚丙烯酰胺、葡聚糖、纤维素、多糖, 以及它们的衍生物或其任意组合。另外, 第一基质还可以包含: 尼龙、棉花、聚乙烯二氟尼龙、硅、玻璃、苯乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯, 以及它们的衍生物或其任意组合。基质可以制成胶体、膜或其他适当的表面。

在本发明方法中，结合了一种或多种配体的靶标的至少一部分（也就是一个或多个靶分子）被转移到第二基质上。第二基质可以是任何具有至少二维结构的固相材料，靶标可以从第一基质转移到其上。与第一基质一样，第二基质最好对靶标和配体来说是一种化学惰性材料。适合于第一基质的组成材料也适合于第二基质。较合适的第二基质可以由诸如硝酸纤维素、硅、苯乙烯、玻璃、和/或聚乙烯二氟尼龙等构成。

为让靶标-配体-支持物复合物上的至少一部分靶标转移到第二基质上，可以将第一基质与一种溶液（例如一种“转移溶液”）接触以促进靶标和配体的解离。转移溶液可以选自具有不同的盐浓度、pH值、变性能力、有机溶剂和去离子水的缓冲液。两者择一地或另外，电梯度能够将靶标从靶标-配体-支持物复合物上解离下来。转移溶液还可以含有配体（与靶标-配体-支持物复合物中的配体不同）、靶标的辅助因子、对映异构的特异性分子等等。使用不同的转移溶液可以研究洗脱条件或者将特定的靶标亚群转移到第二基质上。

本发明方法所使用的解离和转移条件应使第一基质上的配体的破坏最小。换句话说，洗脱和解离条件应不使配体（或配体-支持物复合物）从第一基质上释放下来（除非需要如此）。此外，靶标固定在第二基质上的位置应与配体在第一基质上的位置对应。因此，当在第二基质上选择靶标时，可以很容易的从第一基质上的位置确定对应的配体。

靶标和/或配体的检测/表征

本发明方法进一步包括检测第二基质上的靶标，由此与配体结合的靶标得到表征。术语“表征”及其相关词语这里指对靶标的特别的性质和性状的识别，并不需要已知靶标的确切化学特性如分子式、化学结构、核苷酸序列或氨基酸序列等。当然，靶标的特性决定了如何检测第二基质上的靶标。在这方面，检测方法是使用某种可与靶标发生可测相互作用的分子或生物的实体，从而确定第二基质上靶标的存在。许多这样的方法和材料在本领域都是已知的。

靶标可以用诸如免疫学和放射学的方法直接检测。对肽类靶标来说，可以在靶标中掺入含放射性同位素的氨基酸，这样可以通过将第

二基质在放射自显影膜上曝光来进行检测。类似的方法也可以用于检测其他化学靶标。

作为替代方法，靶标也可以通过检测其特性或活性来鉴定，如生物学特性、化学特性、物理特性、生化特性、或者上述特性的结合。任何能产生可测的生物或化学反应的生物或化学特性都可以被测定，如对底物的酶促反应。本发明方法的一个优点就是靶标是在保持其生物学活性不变的条件下转移到第二基质上的。靶标的化学特性，例如与靶标的化学组成直接相关的某种化学特性，可以用于检测。换句话说，靶标可以通过检测特异的化学亚基或部分或化学结构的存在来鉴定。可用于检测的物理特性包括光谱信号和分子量，它们可以分别用荧光或质谱的方法来测定。检测方法无需单独测定靶标，可以有选择的测定靶标复合物，例如含其他生物实体如辅因子或辅酶的靶标复合物。

检测第二基质上的靶标可以进行结合试验。结合试验一般是将第二基质与一个能结合某种底物的检测部分接触。常用于结合试验的检测部分包括抗体或其抗原结合片段、蛋白质或寡核苷酸等。优选的方法是将第二基质与能结合靶标（或靶标的化学或生物副产物，或前述任何之一的片段）的抗体或其抗原结合片段接触。结合部分优选地用某种可检测的标签标记，例如放射性同位素、发色基团、或荧光标签。在这样的结合试验中，可检测的标签发出的信号被检测到就表示靶标的存在。一旦第二基质上的靶标的位置清楚了，第一基质上对应的配体也就得到鉴定。检测靶标的结合试验在下列文献中有进一步的阐述：Harlow and Lane, *supra*; Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (9th ed.), Molecular Probes, Eugene, OR (2002); and Coico et al., *Current Protocols in Immunology*, vl-4, Wiley & Sons, Inc., New York, NY. 本发明方法还可以包含一个洗涤步骤，用于在检测前除去过量的未结合的检测部分或标记物。

作为替代方法，本发明方法可以包含一个酶活性试验从生物活性的角度来表征靶标。将酶底物在一定条件下接触第二基质，该条件可

使靶标对底物产生酶促反应，形成某种产物。该产物在第二基质上被检测出来，从而确定靶标的位置。酶活性检测方法在一些文献中有详细描述，如上文 Haugland 的著作。

可以进行以细胞为基础的试验，将第二基质与细胞接触，使基质上的靶标对细胞产生可测的生物学效应，如改变细胞的生长、迁移、使细胞死亡、产生可测的副产物等。举例来说，优选的靶标可以是一种抗菌剂。本发明方法的配体与抗菌剂的潜在活性位点结合，将抗菌靶标从样品（如潜在治疗剂库）中分离出来。将抗菌靶标转移到第二基质上，再与细菌平板接触。通过观测平板上的杀菌环来鉴定第二基质上的抗菌靶标。除了鉴定抗菌靶标以外，本发明方法还可以进一步鉴定该抗菌靶标的活性位点。

检测多种靶标或一种靶标的多种特性可以仅转移一次靶标到第二基质上，再进行多个独立的检测程序。本发明方法可以包含步骤(6)：重复步骤(5)，但是检测的靶标特性与步骤(5)不同。可以鉴定靶标的不同特性或者一种不同的靶标。例如，如果步骤(5)含酶活性试验，其中的酶是脱氢酶，该方法可以还包含结合试验进一步表征靶标。另外，本发明方法还可以包含第二个酶活性试验，以测定靶标的另一种活性。

除了表征靶标以外，也可以表征结合靶标的配体。在这种实施方案中，本发明方法还包含鉴定待测靶标在第二基质上的位置，根据靶标在第二基质上的位置鉴定配体或配体-支持物复合物在第一基质上的位置，再确定配体的化学特性。如果在第一基质上配体与支持物形成复合物，可以将配体从配体-支持物复合物上解离下来以方便进一步鉴定。也可以将配体转移到第三种基质上（这时如果需要可以将支持物保留在第一基质上），配体在第三种基质上的位置与其在第一基质上的位置对应。然后用任何适当的方法检测第三种基质上的配体，包括上述的各种方法。配体的化学特性可以用一些方法测定，如质谱、Edman 降解、核酸测序、高效液相色谱（HPLC），或上述方法的任意组合。

第二基质可以与第一基质配合来鉴定被测靶标对应的配体-支持物复合物，可以用任何可行的方法。例如，对照小珠或配体可以在第一基质中提供正确排列的参照。到最后，一系列被标记的或用其他方

法确认的靶标或支持物（例如结合了可测标示物的配体或支持物）被用作对照颗粒。一小部分对照包含在靶标-配体-支持物复合物中，随后被固定在第一基质上。检测方法被用来检测靶标和对照物。检测对照位置产生的信号，再结合标记的对照配体或支持物来确定第二基质中固定的支持物的方向。也可以使用额外的或替代的方法。第一基质的方向和第二基质的方向可以用物理方法相互关联，比如用分散的互补的标记将两种基质对应起来，或者通过互补的物理性质诸如交错搭配等的方式来对准基质。

依照本发明的一个实施方案，配体文库固定在支持物上，配体-支持物复合物以一定排列顺序吸附在多孔的第一基质上，如琼脂糖凝胶。包含靶标的样品（如某种溶液）与配体-支持物复合物接触。含靶标的溶液滤过多孔的第一基质，来影响配体-支持物复合物和靶标间的接触。作为选择，可以在将配体-支持物复合物固定在多孔的第一基质上之前，让含靶标的溶液与配体-支持物复合物接触。部分配体会特异性的结合靶标。通常的优选方案是用一个确定的配体与一个单独靶标亲和结合，同时排除靶标的其他相近的化学和/或结构类似物，尽管这并非必需。

靶标从靶标-配体-支持物上解离下来是通过流经多孔的第一基质的转移缓冲液的毛细管作用，转移缓冲液经过靶标-配体-支持物复合物，将靶标从多孔的第一基质上洗脱下来，再被第二基质俘获。一旦转移到第二基质上（如某种膜），靶标可以在第二基质上被鉴定、检测和定位。通过检测第二基质上的靶标以及将靶标在第二基质上的位置与配体-支持物复合物在第一基质上的排列位置相对应，就有可能鉴定对靶标具有亲和性的配体-支持物复合物。

在本发明方法的实施中，靶标-配体复合物可以被重复检测。例如，每个支持物上的部分配体通过可切割的接头与支持物连接，如可用酸切割的接头，或可被聚焦到单个的支持物上的激光切割的光敏感性接头。因此，当配体-支持物复合物得到鉴定时，切割接头就可以将部分配体从支持物上释放下来进入多孔的第一基质中。然后配体就可以被分离和表征。

一旦配体被鉴定对特定靶标具有特异性，这些配体就可以被用来俘获、分离、检测、和/或表征靶标，例如，通过色谱分离的方法。

为达此目的，本发明方法进一步包括提供多拷贝的已被鉴定的配体，将鉴定配体的每个拷贝固定在一个支持物上，从而获得多个配体-支持物复合物。将多个配体-支持物复合物与含多个靶标的组合物在一定条件下接触，使配体结合靶标形成多个靶标-配体-支持物复合物。靶标从靶标-配体-支持物复合物解离，如需要，还可以进行更多轮的筛选。例如，本方法还可以包含对分离纯化的靶标进行质谱分析以确定或进一步表征靶标。被鉴定的配体也可以在诊断试验中使用，用于固定或选择性的转移靶标，以及作为模拟的或合成的受体(参考 Still, Acc. Chem. Res., 29, 155-163 (1996))。另外，配体本身也可以用作治疗剂、催化剂等等。

其他需要考虑的事项

本发明提供了利用配体检测靶标、鉴定结合靶标的配体、以及在靶标的生物学、生物化学或化学活性的基础上从样品(包含潜在的未知配体和已知或新的靶标)中表征未知配体和新靶标的方法。本发明还提供了优化筛选生物和化学实体的方法。

本发明方法可以用于决定将靶标(或任何分子)转移到第二基质(或任何基质)的优选条件。例如，本发明方法可以包含步骤(6)：重复步骤(4)，采用的基质和条件与前面重复步骤(4)时不同。在这点上，用于将靶标转移到第二基质上的转移缓冲液可以改变盐浓度、pH、变性剂含量、特异性竞争分子，等等。然后在不同条件下洗脱得到一组基质，分别含有不同数量或不同种群的靶标。本方法还包含步骤(7)：检测步骤(6)中每种基质上的靶标，和步骤(8)比较第二基质上及步骤(6)中每种基质上的靶标数量。本发明方法的这个实施方案还可以用来决定配体从靶标上解离的优选条件，大量亲和纯化的可能的洗脱条件，或者用于给各种配体排序，探究它们的结合特性。

此外，本发明方法提供了研究靶标和/或配体结合特性的手段。例如，本方法的步骤(4)可以在含竞争性结合剂的介质中进行，竞争性结合剂可以结合至少一个靶标-配体-支持物复合物或靶标-配体复合物中的靶标，从而导致靶标从第一基质中的配体-支持物复合物或配体上解离下来。“竞争性结合剂”是指除配体外能结合靶标的任何生物或化学实体。优选的竞争性结合剂从下列物质中选择：炭疽杆

菌、马尔他布鲁氏菌、埃博拉病毒、肉毒杆菌神经毒素、葡萄球菌肠毒素 B 和西尼罗病毒。竞争性结合剂也可以是上述任何物质的部分或片段。同样，竞争性结合剂也可以从下列物质中选择：蓖麻毒素、硫芥子气、索曼毒剂、沙林毒剂、塔崩毒剂、VX 毒剂和光气，或含有上述任何物质的片段。向第一基质中添加竞争性结合剂可以鉴定配体和靶标间的相互作用（如结合亲和性或特异性）。在潜在底物存在的情况下竞争洗脱靶标还可以鉴定活性位点的拮抗剂和激动剂。

本发明方法还可用于从样品中分离结构同种型和对映体。例如，分离靶标的构象不同型可以通过在特定条件下将靶标转移到第二基质中来实现，该条件只允许一种构象的靶标洗脱下来。此外，还可以使用只特异的针对靶标的一种同种型的检测方法。然后就可以鉴定结合靶标的不同型的配体。这样的配体可在各种情况下分离靶标同种型，包括清除错误折叠或翻译后修饰的蛋白，鉴定突变的靶标等等。

此外，通过采用针对不同蛋白的转移条件或检测系统可以鉴定、分离或定量样品中成分复杂的靶标。同样，第二基质可以先用来检测靶标中的一种成分，再来检测靶标中的第二成分。如需要，可以鉴别能结合靶标中的多种成分的配体，这对从样品中纯化蛋白复合物很有用。本发明方法也可用于对样品中靶标的数量进行定量，检测细胞在不同条件下表达蛋白的差异，或对与疾病或正常状态相关的生物样品（如血浆或其他生物流体）中的蛋白进行分离检测。

下面的实施例进一步说明本发明，但是不应理解为对本发明保护范围的任何限制。

实施例

实施例 1

本实施例用来说明本发明方法的一个优选实施方案。

将肽配体文库合成或固定在色谱树脂珠上产生组合珠文库（配体-支持物复合物文库）。然后将树脂珠与含靶标的混合物（也就是某个样品）接触，如下文所述固定多孔的凝胶基质上（也就是第一基质）。凝胶系统由多层组成，1%的琼脂糖凝胶基底倾倒在托盘中作为“第一基质”的一部分。琼脂糖凝胶形成的基底可以为凝胶系统提供稳定性和坚固性，使其可被重复操作和处理。当第一基质已经凝固但

还没有冷至室温时，取一定体积（与树脂珠组合文库混合后足够在琼脂糖凝胶基底上覆盖上一层，通常是基底的 1/10 体积）的 0.5% 的低熔点（LMT）琼脂糖与一定体积（足够覆盖琼脂糖凝胶基底，形成分隔良好的单层，在这个例子中为 1/10 0.5% LMT 琼脂糖的体积）的组合文库混合。靶标-配体-支持物复合物在约 40℃ 时加入 LMT 琼脂糖中。混合物迅速振荡后立即倒在琼脂糖凝胶基底上。含靶标-配体-支持物复合物的凝胶层覆盖在琼脂糖凝胶基底的表面。这就使靶标-配体-支持物复合物在琼脂糖凝胶基底上以二维排列的方式形成单层，树脂珠被很薄的一层 LMT 琼脂糖覆盖。凝胶系统置于 4℃ 直到凝固。

将凝胶系统放在吸水纸上，常用 3MM 滤纸，浮在转移缓冲液槽中。吸水纸的放置位置使得转移缓冲液可以通过毛细作用流经吸水纸。凝胶系统的放置是将靶标-配体-支持物复合物朝上。结合蛋白的支持物（也就是第二基质），常用硝酸纤维素膜或 PVDF（聚偏二氟乙烯）膜，放置在胶上面。将移液管在膜和凝胶系统上滚动来排除凝胶系统和第二基质间的所有气泡。在膜上放两层吸水纸，再放几层纸巾。在顶上放上能使胶、膜和纸压紧的重物。转移进行一段足够时间，使足够数量的靶蛋白从树脂珠上转移到膜上。这步操作的结果就是使转移缓冲液通过毛细作用从缓冲液槽通过整个凝胶系统和膜，进入上面的吸水纸。这个过程将靶标从树脂珠上带到膜上。通过检测系统产生信号，如在 X-射线膜上显示的化学发光信号，结合第一种支持物能够明确的鉴定结合靶标的含配体的树脂珠。

转移缓冲液的组成可以根据需要选择最合适的条件。在一个例子中，纤维蛋白原在严谨度逐渐提高的条件下从靶标-配体-支持物复合物上洗脱下来。某些靶标-配体-支持物复合物在不同条件下产生信号，表明靶蛋白对配体的亲和性可以通过使用不同的转移缓冲液来测定。在一定条件下将靶蛋白转移到第二基质上可以保持靶蛋白的活性。可以顺序使用或平行使用不同的缓冲液来将靶蛋白转移到第二基质上。

一旦靶蛋白被第二基质俘获，可以通过一些技术来鉴定各个蛋白。代表性的检测技术涉及到抗体技术，如在免疫印迹（Western Blots）中使用的抗体，当然放射性标记的探针和酶活性测定可以用做检测方法。

实施例 2

本实施例是说明使用本发明方法来鉴定能与纯化的护骨素 (Osteoprotegrin) 结合的配体, 这些配体可以用做亲和层析的树脂。

配体-支持物复合物文库 (结合了六肽配体的聚甲基丙烯酸酯珠, 六肽氨基端的氨基酸已知是 D 型; 5mg) 与 200 μ l 的 1% 酪蛋白, 3% 牛血清白蛋白一起于 22 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时, 封闭非特异性的结合位点。护骨素配体蛋白 (OPGL, 330 μ g/ml 取 3 μ l) 加入封闭液中, 树脂珠在 4 $^{\circ}$ C 摇动孵育 15 小时。用配体-支持物复合物的次级文库进行分离反应, 次级库中肽配体的氨基端氨基酸是 16 种天然氨基酸的一种 (除了半胱氨酸、谷氨酸和甲硫氨酸)。孵育完成后, 次级文库被单独用 50ml 的缓冲液 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.1 % Tween-20 (TTBS), pH 7.2) 洗涤, 去除未结合的和结合较弱的靶蛋白。大约 1mg 的各种次级文库与 50 μ l 0.5% 的低熔点琼脂糖 (LMP) 混合。LMP 琼脂糖-树脂珠混合物点在预制的 1% 琼脂糖基底 (10ml) 上形成凝胶系统。在 4 $^{\circ}$ C 放置约 15 分钟使 LMP 琼脂糖-树脂珠混合物凝固。凝固后, 将凝胶系统放在预先用转移缓冲液 (4M 盐酸胍 (GuHCl), pH 5) 浸湿的滤纸上, 滤纸的两头淹没在装有转移缓冲液的槽中。

将一张硝酸纤维素膜 (也就是第二基质) 预先用转移缓冲液浸湿, 剪裁成凝胶系统的大小, 放在凝胶系统上。两张预先浸湿的滤纸放在膜上, 几张干的纸巾放在滤纸上。将一块 300g 的重物放在装置的顶上, 在 22 $^{\circ}$ C 进行转移反应 18 小时。

在将蛋白转移到膜上后, 将膜与凝胶分离, 用 TTBS 缓冲液洗膜, 将膜与 5% 的脱脂奶室温孵育 2 小时封闭膜上的非特异性结合位点。靶蛋白用多克隆的兔抗小鼠 OPGL 抗体检测。用 TTBS 洗膜, 结合的初级抗体用 HRP 标记的羊抗兔二级抗体检测。靶蛋白用加强的化学发光底物检测, 在放射自显影胶片上产生斑点, 从而将结合的蛋白定位在膜上。放射自显影胶片与原始的凝胶对照, 用弯针头将与胶片上的斑点对应的树脂珠从凝胶上挑出来。树脂珠加热到 70 $^{\circ}$ C 熔化掉沾着的琼脂糖, 用 8M 盐酸胍、甲醇和水洗涤。以上面描述的方法重新将树脂珠与 OPGL 蛋白接触、转移和对照。第二次得到的对应的树脂珠被挑出

来, 洗涤后用 ABI 测序仪测定配体的序列。下面的序列是从好几万的配体(它们在 N 端均有一个 D 氨基酸, C 端有一个丙氨酸)中筛选出来的: LVTVWPA (SEQ ID NO: 1), YDYHELA (SEQ ID NO: 2), LHHPPIA (SEQ ID NO: 3), RANKTQA (SEQ ID NO: 4), 和 TTPSKKA (SEQ ID NO: 5)。

本实施例是示范使用本发明方法来鉴定一个已知靶蛋白的配体, 再弄清这些配体的氨基酸序列。

实施例 3

本实施例是说明通过靶蛋白的生物活性来检测靶蛋白。生物活性可用在蛋白或其结合配体的特性都不知道的情况下检测新蛋白的存在和活性。进行生物、生物化学或酶活性试验必须将靶蛋白转移到第二基质, 如某种膜上, 转移条件必须保持蛋白的活性。

将 BChE (2 mg/ml) 固定在结合了色谱树脂珠的 procainimide (PAM) 配体上, 形成靶标-配体-支持物复合物。然后将色谱树脂珠固定在覆盖在 1% 常规琼脂糖凝胶基底上的 0.5% LMP 琼脂糖中, 如上文所述形成凝胶系统。4℃ 放置 15 分钟使 LMP 琼脂糖-树脂珠混合物凝固。凝固后, 将凝胶系统放在一张预先用转移缓冲液 (0.5M 磷酸缓冲液 / 0.5M NaCl, pH 7.2) 浸湿的滤纸上, 滤纸的两头淹没在装有转移缓冲液的槽中。将一张硝酸纤维素膜预先用转移缓冲液浸湿, 剪裁成凝胶系统的大小, 放在凝胶系统上。两张预先浸湿的滤纸放在膜上, 几张干的纸巾放在滤纸上。将一块 100g 的重物放在装置的顶上, 在 22℃ 过夜进行转移反应。

在将蛋白转移到膜上后, 将硝酸纤维素膜与凝胶分离。第二张硝酸纤维素膜浸在转移缓冲液中作为阴性对照。将胆碱脂酶底物溶液 (BTC = 5 mmol/l 碘化丁酰硫代胆碱, 0.25 mmole/l 5,5'-二硫双-2-二硝基苯甲酸, pH 7.2) 用移液管加在膜和凝胶系统上来检测未转移的蛋白。膜和凝胶系统在 22℃ 于暗处孵育 1 小时。转移上靶蛋白的膜上显示黄色。而对照膜上不显示黄色。一些残余的靶蛋白保留在凝胶系统的树脂珠上, 提示在这些条件下并非所有的靶蛋白都被转移。

本实施例说明通过测定生物活性可以在第二基质上检测和鉴定

靶蛋白。特别是转移膜上出现的黄色表明 BChE 从凝胶系统的树脂珠上转移到膜上依然保持活性。

实施例 4

本实施例是说明使用本发明的方法来确定将蛋白从配体上洗脱下来的条件。了解洗脱性质有助于发展亲和纯化工艺从复杂混合物中大量纯化靶标。在能结合特定靶标的多个潜在配体中，能在优选条件下结合和洗脱的配体可以通过顺序或平行使用多种洗脱条件来鉴定。在本实施例中，纤维蛋白原在几种条件下从配体-支持物复合物文库中洗脱下来。研究发现不同的配体洗脱蛋白的条件不同。

配体-支持物复合物文库（树脂珠，32 mg）是将 6 氨基酸的配体合成在 650-M 氨基 ToyoPearl 树脂 (Tosohaas BioScience) 上，以丙氨酸-ε 氨基己酸 (EACA) 为间隔接头。将树脂珠用 20% 甲醇洗涤，在 20mM 柠檬酸缓冲液中溶胀 1 小时。用 1% (w/v) 酪蛋白/3% (w/v) 牛血清白蛋白于 22℃ 封闭树脂珠 1 小时。将树脂珠与 3.2 ml 人血小板缺乏血浆一起于 22℃ 孵育 1 小时，用 50 ml 洗液 (150 mM NaCl, 20 mM 柠檬酸, pH 7.12) 洗涤。将一部分文库 (320μg) 与 240μl 0.5% 的低熔点琼脂糖 (LMP) 混合，覆盖在 30ml 1% 琼脂糖基底 (即第一基质) 上。将靶蛋白转移到第二介质 PVDF 膜上的方法如实施例 1-3 所述。初始的转移缓冲液含 0.45 M NaCl/20 mM 柠檬酸, pH 7.2, 与凝胶系统和 PVDF 膜作用 24 小时。在初始转移后，将凝胶系统从装置中移开，再进行第二轮和第三轮转移。将一张新膜放在凝胶系统上，在转移缓冲液 (1.0 M NaCl (第二轮转移) 或 1.5 M NaCl (第三轮转移)/20 mM 柠檬酸, pH 7.12) 中转移 24 小时。在第三轮转移后，进行最后一次转移，将凝胶系统和新膜置于 6M 盐酸胍中转移 8 小时。所有膜均保存在 4℃，保持湿润，直到所有转移完成之后，再将所有膜同时进行下步操作。

每张膜均用 5% 脱脂奶 22℃ 封闭 2 小时。然后将膜与 1:8000 稀释的多克隆羊抗人纤维蛋白原抗体 (Affinity Biologicals) 22℃ 孵育 1 小时。用 TTBS 洗膜，再将膜与 1:8000 稀释的 HRP 标记羊抗人纤维蛋白原抗体 22℃ 孵育 1 小时，来检测膜上转移的蛋白。结合靶蛋白的抗体信号通过加强的化学发光辣根过氧化物酶 (HRP) 底物 (孵育 10

分钟)检测,在X射线胶片上显示。胶片与凝胶系统对应后将相应的配体-树脂珠从凝胶系统上挑出来。洗涤树脂珠,对其吸附的配体进行测序。下列序列是从筛选的树脂中得到的:IAIWVA (SEQ ID NO: 13)。下列的其他氨基酸序列也被鉴定:AREADVA (SEQ ID NO: 6); YEYARP (SEQ ID NO: 7); WDGATY (SEQ ID NO: 8); FDPHWS (SEQ ID NO: 9); FSDVED (SEQ ID NO: 10); FEYAPS (SEQ ID NO: 11); HGTWEP (SEQ ID NO: 12)。

本实施例是示范使用本发明方法来鉴定针对未知靶蛋白的配体。研究发现不同的配体可在不同条件下洗脱蛋白,这就为在亲和层析方法中使用鉴定出的配体提供了有价值的信息。

实施例 5

本实施例是说明用于鉴定能与某些疾病相关蛋白结合的配体的一种方法,这些蛋白称作朊病毒蛋白,与传染性海绵样脑病相关。

一个 650-M 氨基聚甲基丙烯酸酯树脂珠文库(5 mg),含 2 氨基酸的配体,用 1%酪蛋白 4℃摇动封闭 18 小时。正常仓鼠脑细胞匀浆用 PBS 1:10 稀释,与 0.5% (w/v) sarkosyl 一起孵育 30 分钟。1:10 稀释的处理材料(1ml)与封闭的配体-粘附树脂珠 22℃摇动孵育 1 小时。一部分靶标-配体-树脂珠复合物(90μl)与 800μl 0.5% LMP 琼脂糖混合后倾倒在含 9ml 1%琼脂糖的凝胶基底(即第一基质)上。在 4℃放置大约 15 分钟使 LMP 琼脂糖-树脂珠混合物凝固,形成凝胶系统。将靶蛋白转移到第二基质 PVDF 膜上的方法如实施例 1-3 所述,用 6M 盐酸胍作为转移缓冲液。过夜进行转移反应。转移后,将 PVDF 膜从凝胶系统上分离下来,用 5%牛奶封闭。朊病毒蛋白靶标(PrPc)用 3F4 检测,3F4 是对 PrPc 的变性形式特异的抗体,用做一抗。再用 HRP 标记的羊抗小鼠二抗与加强的化学发光底物来检测膜上结合的 PrPc,信号在 X 射线胶片上显示。胶片与凝胶系统对应后将相应的配体-树脂珠回收并洗涤。对配体进行测序以鉴定其氨基酸序列。

本实施例是示范本发明方法能够鉴定结合疾病相关蛋白的配体。鉴定出的配体可用于在各种复杂混合物(如生物样品)中诊断靶蛋白的存在或是从混合物中清除导致疾病的靶蛋白。

实施例 6

本实施例是说明通过将配体-支持物文库与样品孵育一次，再使用多个检测步骤来鉴定多个靶标。

使用以下树脂：含纤维蛋白原结合配体 (GPRPGG (SEQ ID NO: 23)) 的树脂直接合成在 650-M 氨基 ToyoPearl 树脂 (Tosohaas Bioscience) 上，含绿色琼脂糖 PIKSIT®珠 (API 结合的对照) 的 α -1 蛋白酶抑制剂 (API) 结合树脂，含连接了 N 端为 D 氨基酸的六肽配体的 650-M 氨基树脂 (Tosohaas Bioscience) 的配体-支持物树脂。GPRPGG (SEQ ID NO: 23) 树脂 (2.5 mg, 预溶胀) 和六肽库树脂 (2 mg, 预溶胀) 分别在不同的管中用 1% (w/v) 酪蛋白/3% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA) 于 22℃ 封闭 3 小时，完成后去除封闭液。分别在 GPRPGG (SEQ ID NO: 23) 树脂和六肽库树脂中加入人血小板缺乏血浆 (20 ml)，于 4℃ 摇动结合 18 小时。用 50ml TTBS 洗涤树脂，洗后在管中留下 50 μ l TTBS。每种树脂取部分 (5 μ l) 和 2.5 mg 预先与纯的 API 孵育过的绿色琼脂糖 PIKSIT®珠分别与 330 ml 0.5 % LMP 琼脂糖混合。三种树脂混合物分别点在 1% 琼脂糖基底上，使 GPRPGG (SEQ ID NO: 23) 树脂、六肽库树脂和绿色琼脂糖 PIKSIT®珠分别处于凝胶基底互不重叠的位置。靶蛋白用下列条件梯度洗脱转移到不同的硝酸纤维素膜上：0.2 M NaCl/20 mM 柠檬酸盐，pH 7.12，转移 8 小时，1.5 M NaCl/20 mM 柠檬酸盐，pH 7.2，转移 15 小时，2 M NaCl/20 mM 柠檬酸盐，pH 7.2，转移 8 小时，及 4M 盐酸胍，pH 5，转移 13 小时。膜均保存于 4℃ 备用。

所有膜均同时处理。首先用 5% 脱脂奶 22℃ 封闭 2 小时。然后用羊抗人纤维蛋白原多克隆抗体作为一抗检测纤维蛋白原靶蛋白。洗膜后，将膜与 HRP 标记羊抗人纤维蛋白原抗体一起孵育，该抗体可结合一抗。检测信号通过加强的化学发光过氧化物酶 (HRP) 底物在放射自显影胶片上显示。

检测完纤维蛋白原后，将膜与 TTBS 在 50℃ 孵育来去除膜上结合的抗体。再将膜重新封闭后与羊抗人 α -1 抗胰蛋白酶多克隆抗体孵育。洗膜后，将膜与 HRP 标记兔抗羊 IgG 多克隆抗体一起孵育，检测信号通过加强的化学发光过氧化物酶 (HRP) 底物在 X 射线胶片上显示。

在本实施例中，已知可结合不同血浆蛋白的配体与含靶蛋白的血浆样品混合。使用的检测方法表明纤维蛋白原和 API 被同时从凝胶系统转移到膜上。另外，每种树脂珠仅结合了两种蛋白的一种。所以本实施例表明一张膜上的多种蛋白可通过反复的去除和检测来分别鉴定。

实施例 7

本实施例是说明用本发明的方法来鉴定能优先结合生物流体样品中的靶蛋白 API 的配体。

在 ToyoPearl 650-M 氨基树脂 (Tosoh BioScience) 上建立 N 端为 D 氨基酸的六肽库，得到配体-支持物复合物文库。将约 10mg 配体-支持物复合物文库洗涤、溶胀、洗涤后，与用等体积平衡缓冲液 (140 mM NaCl, 20 mM 柠檬酸盐, pH 7.4) 稀释的 1ml 血浆在 BioRad 柱中室温孵育 1 小时，不停搅动。完成后，将 BioRad 柱流干，用 10 柱体积的平衡缓冲液洗涤树脂珠。将树脂珠 (现在实际为靶标-配体-支持物复合物) 用 1ml 平衡缓冲液混悬。取约 10 μ l 树脂珠与 900 μ l LMP 琼脂糖混合，如实施例 1-3 所述。将树脂珠-琼脂糖混合物铺在凝固的普通琼脂糖基底 (第一基质) 的表面，形成凝胶系统。4 $^{\circ}$ C 放置使树脂珠-琼脂糖混合物凝固。用一张膜做第二基质准备转移系统，如实施例 1-3 所述。用加入 2M NaCl 的平衡缓冲液于室温过夜转移，将血浆蛋白转移到第二基质膜上。将膜与 HRP 标记的多克隆羊抗人 α 1 抗胰蛋白酶抗体 (ICN) 孵育，该抗体能结合 α 1 抗胰蛋白酶 (API)。确定 API 蛋白在膜上的位置。挑选出与 API 蛋白在膜上的位置相对应的树脂珠，洗涤后再与血浆孵育。将血浆蛋白从靶标-配体-支持物复合物转移到膜上，重复检测 API 靶蛋白以确认潜在的阳性，鉴定出能结合靶蛋白的配体-支持物复合物。阳性树脂珠收集洗涤后，用 ABI 测序仪以 Edman 降解法测定树脂珠结合的配体的序列。鉴定出的几种序列合成后用来作为制备用树脂，从去除了纤维蛋白原和 Apo-A1 脂蛋白的血浆中纯化 API。下列序列是鉴定出的序列的一部分：KFQARA (SEQ ID NO: 14) ; KWSITN (SEQ ID NO: 15); KSPRWP (SEQ ID NO: 16); AKVSKG (SEQ ID NO: 17)。结果显示鉴定出的配体能优先结合 API。

用本发明方法可以从肽文库中鉴定出特异结合靶蛋白的配体，如本实施例所示。鉴定出的配体优先俘获已知的靶蛋白，适合用于靶蛋白的大规模纯化。

实施例 8

本实施例是说明鉴定能结合蛋白复合物即因子 VIII (fVIII) 和 von Willebrand 因子 (vWF) 的配体。

约 10mg 含六肽文库的配体-支持物复合物用实施例 7 的方法准备。含六肽文库的树脂珠与用等体积平衡缓冲液稀释的 1ml 血浆在 BioRad 柱中室温孵育 1 小时，不停搅动。完成后，将 BioRad 柱流干，用 10 柱体积的平衡缓冲液洗涤树脂珠。将树脂珠（现在实际为靶标-配体-支持物复合物）用 1ml 平衡缓冲液混悬。取约 10 μ l 树脂珠与 900 μ l LMP 琼脂糖混合，铺在琼脂糖基底上。树脂珠-琼脂糖混合物凝固后形成凝胶系统，靶蛋白转移过程如实施例 1-7 所述。用加入 2M NaCl 的平衡缓冲液于室温过夜转移，将靶蛋白从靶标-配体-支持物复合物转移到第二基质（膜）上。将膜与 HRP 标记的多克隆抗人 vWF 抗体 (Enzyme Research Labs) 孵育 1 小时，用标准的 ECL plus 化学发光底物确定 vWF 靶蛋白在膜上的位置。挑选出与靶蛋白在膜上的位置相对应的树脂珠，洗涤后再与血浆孵育。将靶蛋白转移到第二基质（膜）上，重复检测膜上的靶蛋白以确认潜在的阳性，鉴定出含能结合 vWF 的配体的树脂珠。阳性树脂珠收集洗涤后，用 ABI 测序仪以 Edman 降解法测定树脂珠结合的配体的序列。鉴定出的几种序列合成后用来作为制备用树脂。另外，将与未滤血浆孵育的树脂珠转移到 96 孔微量滴定板中，与 Coatest fVIII 活性试验试剂 (Chromagenix) 共同孵育。用颜色变化（黄色）鉴定出含 fVIII 配体的树脂珠，将其挑选出来用于进一步的评价。鉴定出的能共同纯化 vWF 和 fVIII 的配体包括：FSYDED (SEQ ID NO: 18), LEDna1'EE (SEQ ID NO: 19), WEEPEQ (SEQ ID NO: 20), EADnaLED (SEQ ID NO: 21), YVDEDD (SEQ ID NO: 22)。

本实施例说明了本发明方法的一个实例，用多种检测方法鉴定蛋白复合物，并从生物样品中将起其清除。

如同每篇参考文献在其引用处都单独特别的指出的那样，这里引用的所有参考文献，包括出版物、专利申请书和专利，都是本发明的参考。

“个”、“种”以及类似词在说明书（特别是在下面的权利要求中）的使用应被理解为同时包括单数和复数，除非特别指出或根据上下文明显矛盾。术语“包含”、“有”、“包括”和“含有”应被理解为开放式的词语（即表示“包括，但不仅限于”），除非特别指出。这里列举的数值范围仅意味着对每一个单独落在范围内的数值的一种速记方法，除非特别指出，每个单独的数值都引入说明书中，如同每一个数被单独列举出来一样。这里描述的所有方法可以用任何合适的顺序来完成，除非特别指出或根据上下文明显矛盾。任何或所有实施例的使用，或这里提供的举例语言，如“例如”，仅意味着更好的说明本发明，并不是对本发明应用范围的限制，除非特别申明。本说明书的任何语言都不应理解为指出了本发明实施中任何重要的未主张要素。

这里描述了本发明的优选实施方案，包括本发明的发明者所知的最佳模式。在阅读了前面的描述后，这些优选实施方案的一些变化形式对本领域的普通技术人员来说可能是显而易见的。发明人期望有经验的技术人员恰当的使用这些变化方法，发明人也希望本发明能被用与这里描述不同的方式实施。因此，依据适用的法律，本发明包括所有后面权利要求书中列举的主题的修改或相似形式。此外，本发明还包含所有上述要素及其可能的变化形式的任何联合应用，除非特别指出或根据上下文明显矛盾。

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 3

Leu His His Pro Pro Ile Ala
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 4

Arg Ala Asn Lys Thr Gln Ala
1 5

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 5

Thr Thr Pro Ser Lys Lys Ala
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 6

Ala Arg Glu Ala Asp Val Ala

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 7

Tyr Glu Tyr Ala Arg Pro

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 8

Trp Asp Gly Ala Thr Tyr

1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 9

Phe Asp Pro His Trp Ser

1 5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 10

Phe Ser Asp Val Glu Asp

1 5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 11

Phe Glu Tyr Ala Pro Ser

1 5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 12

His Gly Thr Trp Glu Pro
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 13

Ile Ala Ile Trp Val Ala
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 14

Lys Phe Gln Ala Arg Ala
1 5

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 15

Lys Trp Ser Ile Thr Asn

1 5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 16

Lys Ser Pro Arg Trp Pro

1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 17

Ala Lys Val Ser Lys Gly

1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 18

Phe Ser Tyr Asp Glu Asp

1 5

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_特征
<222> (4)..(4)
<223> Xaa 是苯基丙氨酸

<400> 19

Leu Glu Asp Xaa Glu Glu
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 20

Trp Glu Glu Pro Glu Gln
1 5

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

专利名称(译)	检测混合物中配体和靶标的方法		
公开(公告)号	CN100525829C	公开(公告)日	2009-08-12
申请号	CN03813727.5	申请日	2003-04-14
申请(专利权)人(译)	美国国家红十字会		
当前申请(专利权)人(译)	美国国家红十字会		
[标]发明人	DJ哈蒙德 J T 拉斯罗普		
发明人	D·J·哈蒙德 J·T·拉斯罗普		
IPC分类号	A61K38/04 G01N33/00 C07K5/00 C12Q1/37 C12Q1/70 G01N33/543 C07K1/04 C07K1/14 C07K5/087 C07K5/09 C07K5/097 C07K5/103 C07K7/04 C07K7/06 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/537 G01N33/554 G01N33/567 G01N33/569		
CPC分类号	C07K5/0812 C07K5/0815 C07K7/06 C07K5/1008 G01N33/54386 C07K1/047 C07K1/14 G01N33/54306 G01N33/54313 C07K5/0821 Y02P20/582		
代理人(译)	刘玥 庞立志		
审查员(译)	曲燕		
优先权	60/372091 2002-04-15 US		
其他公开文献	CN1659432A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种表征与配体结合的靶标的方法。该方法包括提供配体，可以是附着于支持物上的配体，将配体与靶标接触，使至少一种靶标结合上至少一种配体。该方法还包括将得到的复合物固定在第一基质上，使每种复合物在第一基质上有不同的位置，再将复合物中的靶标转移到第二基质上。靶标在第二基质上的位置与配体-支持物复合物在第一基质上的位置对应。然后再检测第二基质上的靶标。

Leu Val Thr Val Trp Pro Ala

1 5