

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480026353.3

[51] Int. Cl.

C07K 1/14 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C07H 1/06 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年4月22日

[11] 公开号 CN 101415721A

[22] 申请日 2004.7.22

[21] 申请号 200480026353.3

[30] 优先权

[32] 2003.7.24 [33] IL [31] 157086

[86] 国际申请 PCT/IL2004/000669 2004.7.22

[87] 国际公布 WO2005/010141 英 2005.2.3

[85] 进入国家阶段日期 2006.3.13

[71] 申请人 阿菲辛克生物科技有限公司

地址 以色列奥诺村

[72] 发明人 G·帕特科尼克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张轶东 刘 玥

权利要求书5页 说明书23页 附图24页

[54] 发明名称

用于纯化和结晶目的分子的组合物

[57] 摘要

提供一种物质组合物。该组合物包括至少一种能结合靶分子或目的细胞的配体，当与配位体离子或分子共-孵育时，所选的附着于至少一种配位部分的该至少一种配体能指引该物质组合物形成非-共价复合物。还提供了使用该组合物进行靶物质纯化、结晶和免疫的方法。

1. 一种包括至少一种能结合靶分子或目的细胞的配体的物质组合物，当与配位体离子或分子共-孵育时，所选的附着于至少一种配位部分的所述至少一种配体能指引该物质组合物形成非-共价复合物。

2. 权利要求1的组合物，其中所述的复合物是聚合复合物。

3. 权利要求1的组合物，进一步包括所述的配位体离子或分子。

4. 权利要求1的组合物，其中所述的靶分子选自蛋白质、核酸序列、小分子化学试剂和离子。

5. 权利要求1的组合物，其中所述的靶细胞选自真核细胞、原核细胞和病毒细胞。

6. 权利要求1的组合物，其中所述的至少一种配体选自生长因子、激素、核酸序列、抗体、抗原表位标记、亲和素、生物素、酶的底物和酶。

7. 权利要求1的组合物，其中所述的至少一种配体经接头附着于所述的至少一种配位部分。

8. 权利要求1的组合物，其中所述的配位部分选自螯合剂、生物素、核酸序列、抗原表位标记、缺电子分子和富电子分子。

9. 权利要求1的组合物，其中所述的配位体离子或分子选自金属离子、亲和素、核酸序列、缺电子分子和富电子分子。

10. 一种纯化靶分子或目的细胞的方法，该方法包括：

(a) 将包含靶分子或目的细胞的样品和一种组合物接触，该组合物包括：

(i) 至少一种能结合靶分子或目的细胞的配体，所述至少一种配体附着于至少一种配位部分，和

(ii) 能非-共价结合所述的至少一种配位部分的配位体，当共-孵育时所述至少一种配位部分和所述配位体能形成复合物；和

(b) 收集包含结合至靶分子或目的细胞的所述复合物的沉淀，由此纯化靶分子或目的细胞。

11. 权利要求10的方法，其中目的分子选自蛋白质、核酸序列、小分子化学试剂和离子。

12. 权利要求10的方法，其中目的靶细胞选自真核细胞、原核细胞和病毒细胞。

13. 权利要求 10 的方法，其中所述的至少一种配体选自生长因子、激素、核酸序列、抗体、抗原表位标记、亲和素、生物素、酶的底物和酶。

14. 权利要求 10 的方法，其中所述的至少一种配体经接头附着于所述的至少一种配位部分。

15. 权利要求 10 的方法，其中所述的配位部分选自螯合剂、生物素、核酸序列、抗原表位标记、缺电子分子和富电子分子。

16. 权利要求 10 的方法，其中所述的配位体离子或分子选自金属离子、亲和素、核酸序列、缺电子分子和富电子分子。

17. 权利要求 10 的方法，进一步包括从所述沉淀回收目的分子。

18. 一种检测受试者中与目的分子相关的疾病的易感性或存在的方法，该方法包括将获自受试者的生物样品和一种组合物接触，该组合物包括：

(i) 至少一种能结合目的分子的配体，所述的至少一种配体附着于至少一种配位部分；和

(ii) 能非-共价结合所述的至少一种配位部分的配位体，当共-孵育时所述的至少一种配位部分和所述的配位体能形成复合物，其中包含目的分子的复合物的形成指示患者中与目的分子相关的疾病的易感性或存在。

19. 权利要求 18 的方法，其中目的分子选自蛋白质、核酸序列、小分子化学试剂和离子。

20. 权利要求 18 的方法，其中所述的至少一种配体选自生长因子、激素、核酸序列、抗体、抗原表位标记、亲和素、生物素、酶的底物和酶。

21. 权利要求 18 的方法，其中所述的至少一种配体经接头附着于所述的至少一种配位部分。

22. 权利要求 18 的方法，其中所述的配位部分选自螯合剂、生物素、核酸序列、抗原表位标记、缺电子分子和富电子分子。

23. 权利要求 18 的方法，其中所述的配位体离子或分子选自金属离子、亲和素、核酸序列、缺电子分子和富电子分子。

24. 一种用于结晶目的分子的组合物，该组合物包括：

(i) 至少一种能结合目的分子的配体，所述至少一种配体附着

于至少一种配位部分；和

(ii) 能非-共价结合所述的至少一种配位部分的配位体，其中当共-孵育时所述至少一种配位部分和配位体能形成复合物，因此选择组合物以使当目的分子结合至该配位体时能确定所述目的分子的相对空间位置和方向，由此在诱导结晶的条件下促进其中晶体的生成。

25. 权利要求 24 的组合物，其中目的分子选自蛋白质、核酸序列、小分子化学试剂和离子。

26. 权利要求 24 的组合物，其中所述的至少一种配体选自生长因子、激素、核酸序列、抗体、抗原表位标记、亲和素、生物素、酶的底物和酶。

27. 权利要求 24 的组合物，其中所述的至少一种配体经接头附着于所述的至少一种配位体。

28. 权利要求 24 的组合物，其中所述的配位部分选自螯合剂、生物素、核酸序列、抗原表位标记、缺电子分子和富电子分子。

29. 权利要求 24 的组合物，其中所述的配位体离子或分子选自金属离子、亲和素、核酸序列、缺电子分子和富电子分子。

30. 一种使目的分子结晶的方法，该方法包括将包含目的分子的样品和结晶组合物接触，该结晶组合物包括：

(i) 至少一种能结合目的分子的配体，所述至少一种配体附着于至少一种配位部分；和

(ii) 能非-共价结合所述至少一种配位部分的配位体，当共-孵育时所述至少一种配位部分和配位体能形成复合物，因此选择结晶组合物以使当目的分子结合至该配位体时能确定所述目的分子的相对空间位置和方向，由此在诱导结晶的条件下促进其中晶体的生成。

31. 权利要求 30 的方法，其中目的分子选自蛋白质、核酸序列、小分子化学试剂。

32. 权利要求 30 的方法，其中所述的至少一种配体选自生长因子、激素、核酸序列、抗体、抗原表位标记、亲和素、生物素、酶的底物和酶。

33. 权利要求 30 的方法，其中所述的至少一种配体经接头附着于所述的至少一种配位部分。

34. 权利要求 30 的方法，其中所述的配位部分选自螯合剂、生物

素、核酸序列、抗原表位标记、缺电子分子和富电子分子。

35. 权利要求 30 的方法，其中所述的配位体离子或分子选自金属、亲和素、核酸序列、缺电子分子和富电子分子。

36. 一种包含一种分子的物质组合物，所述分子具有能结合目的分子的第一区域和能结合配位体离子或分子的第二区域，所述的第二区域被设计成使得当该分子暴露于所述配位体离子或分子时形成聚合物。

37. 权利要求 36 的组合物，其中所述的第二区域能结合超过两个配位体离子或分子。

38. 权利要求 36 的组合物，其中所述的配位体离子或分子的结合是非共价的结合。

39. 一种除尽来自样品的靶分子或目的细胞的方法，该方法包括：

(a) 将包含靶分子或目的细胞的样品和一种组合物接触，该组合物包括：

(i) 至少一种能结合目的分子的配体，所述至少一种配体附着于至少一种配位部分；和

(ii) 能非-共价结合所述至少一种配位部分的配位体，当共-孵育时所述至少一种配位部分和配位体能形成复合物；和

(b) 除去包含结合至靶分子或目的细胞的复合物的沉淀，由此除尽来自样品的靶分子或目的细胞。

40. 权利要求 39 的方法，其中目的分子选自蛋白质、核酸序列、小分子化学试剂和离子。

41. 权利要求 39 的方法，其中目的靶细胞选自真核细胞、原核细胞和病毒细胞。

42. 权利要求 39 的方法，其中所述的至少一种配体选自生长因子、激素、核酸序列、抗体、抗原表位标记、亲和素、生物素、酶的底物和酶。

43. 权利要求 39 的方法，其中所述的至少一种配体经接头附着于所述的至少一种配位部分。

44. 权利要求 39 的方法，其中所述的配位部分选自螯合剂、生物素、核酸序列、抗原表位标记、缺电子分子和富电子分子。

45. 权利要求 39 的方法，其中所述的配位体离子或分子选自金属、亲和素、核酸序列、缺电子分子和富电子分子。

46. 一种增强目的靶分子的免疫原性的方法，该方法包括将目的靶分子和一种组合物接触，该组合物包括：

(i) 至少一种能结合靶分子或目的细胞的配体，所述的至少一种配体附着于至少一种配位部分；和

(ii) 能非-共价结合所述至少一种配位部分的配位体，

其中进行接触使得所述至少一种配位部分和配位体能形成包含目的靶分子的复合物，由此增强目的靶分子的免疫原性。

47. 权利要求 46 的方法，其中目的分子选自蛋白质、核酸序列、小分子化学试剂和离子。

48. 权利要求 46 的方法，其中所述的至少一种配体选自生长因子、激素、核酸序列、抗体、抗原表位标记、亲和素、生物素、酶的底物和酶。

49. 权利要求 46 的方法，其中所述的至少一种配体经接头附着于所述的至少一种配位部分。

50. 权利要求 46 的方法，其中所述的配位部分选自螯合剂、生物素、核酸序列、抗原表位标记、缺电子分子和富电子分子。

51. 权利要求 46 的方法，其中所述的配位体离子或分子选自金属离子、亲和素、核酸序列、缺电子分子和富电子分子。

用于纯化和结晶目的分子的组合物

发明领域和背景

本发明涉及组合物，该组合物能用于纯化和结晶目的分子。

蛋白质和其他大分子越来越多地用于研究、诊断和治疗中。蛋白质一般通过占生产过程主要成本的（最高占总成本的 60%）大规模纯化的重组技术生产。因此，由于与纯化有关的高成本，重组蛋白质产物的大规模利用受到阻碍。

目前蛋白质的纯化方法依靠使用不同层析技术的组合。这些技术根据蛋白质的电荷、疏水性或大小及其他特性而分离蛋白质混合物。一些不同的层析树脂可用于每种这些技术中，允许对纯化方案进行准确的修正以得到用于分离的特定靶蛋白质。每一种这些分离方法的要点在于可使蛋白质以不同的速率经过长柱，当其进一步通过该柱时实现提高了的物理分离，或者选择性地粘附至分离介质，使得能经不同的溶剂差分洗脱。有时，设计柱使得杂质在那里结合而在“流过的溶液（flow-through）”中发现所需的蛋白质。

亲和沉淀（AP）是用于蛋白质沉淀最有效和最先进的方法 [Mattiasson 1998]；Hilbrig 和 Freitag (2003) *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 790 (1-2) : 79-90]。目前现有技术的 AP 应用配体偶联的“智能聚合物（smart polymers）”。"智能聚合物"[或刺激-响应性"智能"聚合物或亲和大配体（AML）]为那些以很大的性质改变对小的物理或化学刺激，例如 pH、温度、放射线等的变化作出响应的聚合物。这些聚合物可以有很多形态；其可溶于水溶液中，吸附或接枝在水相-固相的接触面上，或交联以形成水凝胶 [Hoffman *J Controlled Release* (1987) 6: 297-305; Hoffman *Intelligent polymers*. In: Park K, ed. *Controlled drug delivery*. Washington: ACS Publications, (1997) 485-98 Hoffman *Intelligent polymers in medicine and biotechnology*. *Artif Organs* (1995) 19: 458-467]。通常，当聚合物的临界响应受刺激时，溶液中的智能聚合物将呈现突然的浑浊如同各分相一样；表面吸附的或接枝的智能聚合物将塌陷，将接触面从亲水的转化至疏水的；而该智能聚合物（以水凝胶形式交联的）将表现

出急剧的塌陷并且释放许多溶胀的溶液。当进行逆向刺激时这些现象也反转，不过在聚合物必须重溶解或凝胶必须重溶胀在水介质中时反转的速率通常较慢。

"智能"聚合物可以物理混合或化学偶联至生物分子以产生聚合物-生物分子系统的大家族，其可对生物学的以及物理的或化学的刺激作出响应。生物分子可以是聚合物-偶联的，包括蛋白质和寡肽、糖和多糖、单-和双-链寡核苷酸和 DNA 质粒、单纯的脂类和磷脂以及广谱的识别配体和合成的药物分子。

许多结构参数控制智能聚合物特异性地沉淀目的蛋白的能力；智能聚合物应当包含配体偶联的活性基团；不与杂质强烈作用；能使配体与靶蛋白有效作用；在介质性质改变时能产生完全的聚合物的分相；形成致密的沉淀；排除杂质在凝胶结构中的截留以及沉淀形成后很容易溶解。

虽然许多不同的天然及合成的聚合物已用于 AP 中 [Mattiasson (1998) *J. Mol. Recognit.* 11: 211]，但是理想的智能聚合物仍是难以确定的，例如用现有智能聚合物进行的亲和沉淀未能满足上述的一种或一些条件 [Hlibrig 和 Freitag (2003)，上文]。

有效的或简单的蛋白质纯化技术的可利用性在蛋白质结晶中也是有用的，其中蛋白质的纯度深远地影响晶体的生长。蛋白质的构象结构是了解其生物学功能以及最终设计新的药物疗法的关键。蛋白质的构象结构通常通过其晶体的 X 射线衍射进行测定。不幸的是，在大多数情况下生成足够高质量的蛋白质晶体是非常困难的，并且该困难是蛋白质样品的科学测定和结构鉴定的主要限制因素。从过饱和溶液生成蛋白质晶体的现有方法是冗长和费时的，并且才有超过 100,000 个不同蛋白质的小于百分之二已经被生长成适于 X 射线衍射研究的晶体。

膜蛋白是对结晶产生最大挑战的蛋白质组。虽然膜蛋白的数量预期将构成蛋白质组的三分之一，可得到的膜蛋白的三维结构的数量仍然在 20 个左右。当希望结晶膜蛋白时必须克服许多障碍。这些包括，天然来源中蛋白质的低丰度、需要从其天然环境中（即脂双分子层）溶解疏水膜蛋白以及在去污剂溶液中其变性、凝集和/或降解的倾向。由于一些去污剂可能会妨碍稳定的配体与靶蛋白的结合，对增溶去污

剂的选择就存在另外的问题。

已在膜蛋白的结晶中尝试了两种方法。

直至最近,利用从蛋白质-去污剂复合物的溶液中直接生长成的晶体测定了大部分的膜蛋白的 X 射线晶体结构。只有当被结晶的溶质是蛋白质和去污剂的复合物而不是单独的蛋白质时,蛋白质-去污剂复合物的晶体生长才可被认为与可溶蛋白质的等同。尽管结晶组装同时将去污剂部分带入闭合的同格中,实际的晶格接触还是由蛋白质-蛋白质相互作用形成的。为了提高有效表面积以使这些蛋白质之间接触,研究表明添加抗体片段将提高产生晶体的几率[Hunte 和 Michel (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 503-508]。然而,由于需要单克隆抗体的产生,其特异于每种膜蛋白,将该技术应用至不同的膜蛋白是困难的。

此外,认为没有哪一种去污剂胶束可以完全和准确地再生蛋白质的脂双层环境。

因此,结晶膜蛋白的工作必须致力于在脂双层环境内产生晶体。利用该方法已经进行了许多尝试以产生膜蛋白的晶体。这些包括在形成包含连续双分子层结构的胶状物质脂质立方相(cubic phase)[Landau 和 Rosenbuch (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14532-14535]中生长的细菌视紫红质晶体的产生,以及在 cubo 中结晶,其在古生物的七个-跨膜螺旋蛋白质的结晶中被证实是成功的[Gordeliy (2002) *Nature* 419: 484-487; Luecke (2001) *Science* 293: 1499-1503; Kolbe (2000) *Science* 288: 1390-1396; Royant (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10131-10136]。然而,使用 cubo 内方法的其他膜蛋白的晶体没有直接从蛋白质-去污剂复合物溶液生成的晶体的高质量[Chiu (2000) *Acta. Crystallogr. D.* 56: 781-784]。

因此对没有上述限制的用于分子纯化和结晶的组合物和其使用方法有广泛认同的需求,并且其也是非常有益的。

发明概述

本发明的一个方面提供包括至少一种能结合靶分子或目的细胞的配体的物质组合物,当与配位体离子或分子共-孵育时,所选的附着于至少一种配位部分的该至少一种配体能指引该物质组合物形成非-共价复合物。

本发明的另一方面提供纯化靶分子或目的细胞的方法,该方法包

括：(a) 将包含靶分子或目的细胞的样品和一种组合物接触，该组合物包括：(i) 至少一种能结合靶分子或目的细胞的配体，该至少一种配体附着于至少一种配位部分；和(ii) 能非-共价结合该至少一种配位部分的配位体，当共-孵育时该至少一种配位部分和配位体能形成复合物；以及(b) 收集包含结合至靶分子或目的细胞的复合物的沉淀，由此纯化靶分子或目的细胞。

根据本发明下述优选实施方案的更进一步的特征，该方法进一步包括从沉淀回收目的分子。

本发明的又一个方面提供检测患者中与目的分子相关的疾病的易感性或存在的方法，该方法包括将获自受体的生物样品和组合物接触，组合物包括：(i) 至少一种能结合靶分子或目的存在的配体，该至少一种配体附着于至少一种配位部分；和(ii) 能非-共价结合该至少一种配位部分的配位体，当共-孵育时该至少一种配位部分和配位体能形成复合物，其中包含目的分子的复合物的形成为患者中与目的分子相关的疾病的易感性或存在的指示。

本发明的又一个方面提供用于结晶目的分子的组合物，该组合物包括：(i) 至少一种能结合靶分子或目的存在的配体，该至少一种配体附着于至少一种配位部分；和(ii) 能非-共价结合该至少一种配位部分的配位体，其中当共-孵育时该至少一种配位部分和配位体能形成复合物，且因此选择组合物以使当目的分子结合至该配位体时能确定该目的分子的相对空间位置和方向，由此在诱导结晶的条件下促进其中晶体的生成。

本发明的另外一个方面提供结晶目的分子的方法，该方法包括将包含目的分子的样品和一种结晶组合物接触，该组合物包括：(i) 至少一种能结合目的分子的配体，该至少一种配体附着于至少一种配位部分；和(ii) 能非-共价结合该至少一种配位部分的配位体，当共-孵育时该至少一种配位部分和配位体能形成复合物，且因此选择组合物以使当目的分子结合至该配位体时能确定该目的分子的相对空间位置和方向，由此在诱导结晶的条件下促进其中晶体的形成。

本发明的仍然另外的一方面提供包含一种分子的物质组合物，该分子具有能结合目的分子的第一区域和能结合配位体离子或分子的第二区域，设计该第二区域使得该分子暴露于配位体离子或分子时形成

聚合物。

本发明仍是另外一个方面提供除尽来自样品的靶分子或目的细胞的方法，该方法包括：(a) 将包含靶分子或目的细胞的样品和组合物接触，组合物包括：(i) 至少一种能结合目的分子的配体，该至少一种配体附着于至少一种配位部分；和(ii) 能非-共价结合该至少一种配位部分的配位体，当共-孵育时该至少一种配位部分和配位体能形成复合物；以及(b) 除去包含结合至靶分子或目的细胞复合物的沉淀，由此除尽来自样品的靶分子或目的细胞。

本发明的另外一个方面提供增强靶分子免疫原性的方法，该方法包括将靶分子和一种组合物接触，该组合物包括：(i) 至少一种能结合靶分子或目的细胞的配体，该至少一种配体附着于至少一种配位部分；和(ii) 能非-共价结合该至少一种配位部分的配位体，其中进行接触使得该至少一种配位部分和配位体能形成包含目的靶分子的复合物，由此增强目的靶分子的免疫原性。

根据所述优选实施方案的更进一步的特征，目的分子选自蛋白质、核酸序列、小分子化学试剂和离子。

根据所述优选实施方案的更进一步的特征，该至少一种配体选自生长因子、激素、核酸序列、抗体、抗原表位标记、亲和素、生物素、酶的底物和酶。

根据所述优选实施方案的更进一步的特征，该至少一种配体通过接头结合至至少一种配位部分。

根据所述优选实施方案的更进一步的特征，配位部分选自螯合剂、生物素、核酸序列、抗原表位标记、缺电子的分子和富电子的分子。

根据所述优选实施方案的更进一步的特征，配位体离子或分子选自金属离子、亲和素、核酸序列、缺电子的分子和富电子的分子。

本发明通过提供用于分子纯化的组合物和方法成功地克服了目前已知构型的不足。

除非另外定义，此处使用的所有技术和科学术语具有本发明所述技术领域的普通技术人员通常理解的相同的意思。虽然与此处所述的类似的或等同的方法和材料可用于本发明的实践或测试，但是合适的方法和材料描述如下。如有冲突，以包含定义的本专利说明书为准。

此外，材料、方法和实施例仅是解释性的而并不试图作为限制。

附图简述

此处参照附图仅举例描述本发明。对于目前对附图详细的具体参考，强调指出所显示的详细说明是举例而言的，且仅是为了本发明优选实施方案的解释性讨论的目的，并且是为了提供什么是最有效的以及很容易地理解本发明原理的描述和概念方面的原因而存在。关于这一点，相比本发明最基本的理解所需并不试图更详细地呈现本发明的构成细节，附图说明使得本领域技术人员显然知晓本发明的一些形式怎样可以体现在实践上。

在附图中：

图 1a-f 用示意图举例说明了本发明组合物的一些构型。图 1a-c 显示结合至两个配位部分的配体。图 1d-f 显示结合至多个配位部分的配体。Z 表示配位部分。图 2a-b 用示意图举例说明了利用本发明的组合物对靶分子的沉淀。共价结合到双整合剂的配体与靶分子孵育（图 2a）。添加金属（ M^+ 、 M^{2+} 、 M^{3+} 、 M^{4+} ）结合整合剂并且形成包含与金属离子非-共价结合的靶分子的阵列（图 2b）。

图 3a-e 用示意图举例说明了靶分子从沉淀中的分级回收。图 3a 显示添加游离整合剂竞争性地参与配体结合的整合剂和金属的结合。图 3b 显示配体结合的靶分子从游离的竞争性整合剂和复合的金属中基于比重的分离。图 3d 显示配体结合的靶分子上样至固定化的金属柱以允许复合物的结合。在合适的洗脱条件下靶分子被洗脱而配体配位部分的分子未洗脱。可另外加入脱盐阶段用于靶分子的进一步纯化。配体整合剂分子的再生通过添加竞争性整合剂至柱，随后经透析或超滤而实现（图 3e）。

图 4 用示意图举例说明了靶分子从沉淀中的直接洗脱，其中整合剂-金属复合物得到维持，而靶分子和配体间的结合降低了。

图 5 用示意图举例说明了在靶分子的洗脱之后沉淀单元（即配体-配位部分）的再生。在这种情况下，通过添加竞争性的整合剂和应用合适的分离步骤，例如透析和超滤而实现回收。

图 6a-c 用示意图举例说明了利用核酸序列作为配位部分沉淀靶分子。在靶分子存在下孵育含有共价结合双核苷酸序列（配位部分）的配体（图 6a）。互补序列的添加导致包含配体-配位部分：靶分子：互

补序列（配位体分子，图 6b）的阵列的形成。还显示了不-对称的配位序列（图 6c）。

图 7a-b 用示意图举例说明了利用生物素作为配位部分来沉淀靶分子。在靶分子的存在下孵育带有共价结合双-生物素或生物素衍生物例如：DSB-X 生物素的配体（图 7a）。亲和素（或其衍生物）的引入产生包括配体-配位部分（生物素）：靶分子：亲和素的网络（图 7b）。

图 8a-c 用示意图举例说明了利用富电子的分子作为配位部分沉淀靶分子。在靶分子存在下孵育带有共价结合的双富电子体的配体（图 8a）。倾向于形成复合物的双（也可以是三、四）缺电子衍生物的添加导致产生包括配体-配位部分（缺电子分子）：靶分子：双-缺电子部分的非-共价网络（图 8b）。苦味酸和吡啶系统也可用于本发明（图 8c）。

图 9 用示意图举例说明了用结合的 A 蛋白（ProA）作为配体沉淀靶抗体。合适的配位体的添加产生 A 蛋白-配位部分：配位体：靶分子的网络。

图 10a-b 用示意图举例说明了用于膜蛋白结晶的本发明复合物的用途。呈现了结晶组合物中 2D（或 3D）结构的一般构型，其中配位体自身相互间并不相连（图 10a）。图 10b 中举例说明了利用以两个抗原和导向该特异性抗原的单克隆抗体（mAb）作为配位体修饰的特异性配体的更具体的实施例。

图 11a-b 用示意图举例说明了用于膜蛋白晶体形成的金属复合物（图 11a）和核-复合物（图 11b）的用途。图 11c 用示意图举例说明了使用本发明组合物的三维膜复合物。蛋白质的疏水结构域由去污剂胶粒环绕。Z 表示多价配位体（即，至少二-价配位体）。

图 12 用示意图举例说明了由通过合适的螯合剂，结合至单个金属配位体的三个配体组成的非-共价组合物的形成其中该螯合剂通过共价接头结合至配体。

图 13a-b 用示意图举例说明了对三个目的配体进行修饰以包含异羟肟酸衍生物（图 13a），使得三非-共价配体复合物在铁离子的存在下形成（图 13b）。

图 14 用示意图举例说明了用于产生配体-螯合剂分子的两步合成方法。

图 15a-b 用示意图举例说明了当仅改变存在于介质中的阳离子

时, 通过利用相同的配体-接头-螯合剂分子来形成双(图 15a)和三(图 15b)非-共价配体。

图 16a-c 用示意图举例说明了通过缺/富电子关系而配位的本发明的组合物。通过用缺电子部分修饰配体(图 16a)并且合成三共价富电子部分(图 16b), 形成了参见图 16c 中结构的复合物。

图 17 用示意图举例说明了用于富电子的配体或缺电子的配体衍生物制备的两步合成方法。

图 18 用示意图举例说明了多肽在利用富电子或缺电子部分用于形成配体复合物的用途。

图 19 用示意图举例说明了利用螯合剂-金属以及富电子和缺电子的关系的配体复合物的形成。

图 20 用示意图举例说明了用于制备螯合剂-缺电子衍生物的单步合成方法。

图 21a-b 用示意图举例说明了通过利用相同的螯合剂-缺电子(儿茶酚-TNB)衍生物并且仅改变介质中的阳离子而形成二和三非共价缺电子部分。

图 22a-b 用示意图举例说明了添加包含一个富电子部分的多肽以形成二聚物和三聚物。

图 23a-b 用示意图举例说明了通过添加包含结合至两个螯合剂的配体的组合物来形成聚合物复合物, 螯合剂通过电子富/缺关系配位。

图 24 用示意图举例说明了限制非共价蛋白质二聚物的运动自由度的一种可能性。通过添加合适的金属经由配体-接头-螯合剂的形成非共价二聚物后, 加入共价缺电子体(例如, 三硝基苯-三硝基苯=TNB-TNB)导致两个邻近的蛋白质上两个易接近的富电子残基(例如, Trp)的同时结合, 由此强加了运动限制并且允许晶体结构的形成。

图 25 用示意图举例说明了分别可用作本发明组合物中的配位部分和配位体离子的螯合剂和金属。

图 26 用示意图举例说明了可用作本发明组合物中的配位部分的富电子和缺电子体。

优选实施方案的描述

本发明为组合物, 其可用于纯化和结晶目的分子。

参考附图和所附的说明, 本发明的原理和操作将得到更好的理

解。

在详细阐明本发明的至少一种实施方案之前，可以理解的是本发明并不限于以下描述中详细阐述或通过实施例例证的应用。本发明有其他的实施方案或能以不同的方式操作或进行。另外，可以理解的是此处所用的词组和术语是用于描述而不应该被认为是限制。

成本有效的蛋白质，例如用于治疗蛋白质的商业规模的生产，主要依赖快速和有效的纯化方法的发展，因为纯化步骤通常占据蛋白质大规模生产所用成本的大部分。

因此对简单的、经济合算的方法有需求，该方法可用于纯化蛋白质及其他商业上重要的分子。

在蛋白质纯化中，现有技术为亲和沉淀（AP），其基于与结合目的蛋白质的识别单元偶联的“智能”聚合物的利用。这些智能聚合物在其物理状态或特性中产生大的、有时不连续的变化而响应环境刺激的微小变化，产生水溶液的分相或者凝胶大小的数量级的变化以及目的分子的沉淀。然而，目前由于一些障碍包括，沉淀过程中杂质的截留、杂质吸附至聚合物基体、蛋白质识别单元的降低的亲和性以及可能导致活性降低的纯化蛋白质的工作条件，还没有实现智能聚合物的前景。

在促使本发明实践的过程中，本发明人设计了新的组合物，其能用于蛋白质以及其他的分子和细胞的成本有效的和有效的纯化。

如在下文和随后的实施例部分举例说明的那样，本发明的组合物特异性地结合靶分子以形成非共价复合物，其可在温和条件下沉淀和收集。此外，与现有的纯化组合物相反，本发明的组合物并没有被固定化（例如固定到智能聚合物上），其会降低配体接近靶分子的亲和力、限制所用配体的量、要求使用需要高级维护的复杂实验设备（HPLC）、导致柱的淤塞和限制对于单一共价结合配体的柱的利用率。

因此，本发明的一个方面提供一种物质组合物，其适合于靶分子或目的细胞的纯化。

靶分子可以是分子例如蛋白质、碳水化合物、糖蛋白或核酸序列（例如，DNA 如质粒、RNA）或小分子例如化学试剂。尽管此处提供的大部分实施例描述了蛋白质类的靶分子，可以理解的是本发明不

限于上述靶物质。

靶细胞可以是真核细胞、原核细胞或病毒细胞。

本发明的物质组合物包括至少一种能结合目的分子或细胞的配体以及所选的当用配位体离子或分子共-孵育时能指引该物质组合物形成非-共价复合物的至少一种配位部分。

如此处使用的术语"配体"是指合成的或天然存在的分子, 优选呈现高亲和力(例如, $K_D < 10^{-5}$)地结合目的靶分子的以及两个之间能特异性地相互作用的分子。当目的靶物质为细胞时, 选择能结合蛋白质、碳水化合物或化学试剂的配体, 其在该细胞表面上表达(例如, 细胞标记物)。优选地, 配体与目的分子或细胞的结合为非共价结合。本发明这方面的配体可以是单、双(抗体、生长因子)或多化合价的配体并且可以呈现对一种或多种目的分子或细胞的亲和力(例如, 双特异性抗体)。可用于本发明的配体的实例包括, 但不限于, 抗体、模拟物(例如, Affibodies®参见: 美国专利 5, 831, 012、6, 534, 628 和 6, 740, 734)或其片段、抗原表位标记、抗原、生物素和其衍生物、亲和素和其衍生物、金属离子、受体和其片段(例如, EGF 结合结构域)、酶(例如, 蛋白酶类)和其突变体(例如, 催化惰性的)、底物(例如, 肝素)、植物凝集素(例如, 刀豆素 A)、碳水化合物(例如, 肝素)、核酸序列[例如、适体和 Spiegelmers [Wlotzka®) (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 8898-02]、染料, 其常模拟天然底物或辅因子的结构而与酶的催化部位相互作用且由生色团组成(例如, 偶氮染料、葱醌或酞菁), 连接至反应基团(例如, 单或二氯代三吡嗪环, 参见, Denizli (2001) J Biochem Biophys Methods. 49 (1-3): 391-416)、小分子化学试剂、受体配体(例如, 生长因子和激素)、具有相同的结合功能的不同的化学结构的模拟物或其片段(例如, EGF 结构域)、离子配体(例如, 钙调蛋白)、A 蛋白、G 蛋白和 L 蛋白或其模拟物(例如, PAM, 参见 Fassina (1996) J. Mol. Recognit. 9: 564-9)、化学试剂(例如, cibacron 蓝、其结合酶和血清白蛋白; 氨基酸例如, 赖氨酸和精氨酸、其结合丝氨酸蛋白酶类)以及磁性分子如高自旋有机分子和聚合物(参见 <http://www.chem.unl.edu/rajca/highspin.html>)。

如此处使用的短语"配位部分"是指对配位体离子或分子具有足够

亲和力（例如， $K_D < 10^{-5}$ ）的任何分子。当与配位体离子或分子共孵育时，该配位部分可指引本发明的物质组合物形成非共价复合物。可用于本发明的配位部分的实例包括但不限于，抗原表位（与抗体的抗体结合部位结合的抗原决定簇抗原）、抗体、螯合剂（例如，His-标记，参见随后实施例部分的实施例 1 中的其他实例，图 1、25 和 26）、生物素（参见图 7）、核酸序列（参见图 6）、A 或 G 蛋白（图 9）、缺电子和富电子分子（参见随后实施例部分的实施例 2 和图 8）及其他上述的分子（参见配体的实例）。

可以理解的是许多配位部分可与上述配体结合（参见图 1a-f）。

进一步可以理解的是，不同的配位部分可以结合至配体如螯合剂和富/缺电子分子以形成如图 19 中所示的复合物。这种结合部分的组合可以介导如图 23a-b 和 24 中分别举例说明的包含目的分子的聚合物或有序的片层（即，网络）的形成。

为了避免在从复合物回收目的分子中的竞争作用和/或另外的问题，选择配位部分以防止配位部分-配体相互作用或配位部分-靶分子相互作用的可能性。例如，如果配体是对目的免疫球蛋白具有亲和力的抗原，则配位部分优选不是能结合该抗原的抗原表位标记或抗体。

如此处使用的短语“配位体离子或分子”是指可溶性实体（即，分子或离子），其对配位部分表现出足够的亲和力（即， $K_D < 10^{-5}$ ）且同样能指引本发明的物质组合物形成非共价复合物。可用于本发明的配位体分子的实例包括但不限于，亲和素及其衍生物、抗体、富电子分子、缺电子分子等。可用于本发明的配位体离子的实例包括但不限于，单、二或三价金属。图 25 举例说明了可用作本发明配位体离子的螯合剂和金属的实例。图 26 列出了可用于本发明的富电子分子或缺电子分子的实例。生成抗体和抗体片段以及单链抗体的方法在 Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, 此处引入作为参考; Goldenberg, 美国专利 4, 036, 945 和 4, 331, 647 和其中包含的参考文献; 也参见 Porter, R.R. [*Biochem. J.* 73: 119-126 (1959)]; Whitlow 和 Filpula, *Methods* 2: 97-105 (1991); Bird 等., *Science* 242: 423-426 (1988); Pack 等., *Bio/Technology* 11: 1271-77 (1993); 以及美国专利 4, 946, 778] 中描述。

优选地，本发明的组合物包括配位体离子或分子。

本发明的配体可以直接结合至配位部分，取决于两个的化学性质。然而要采取措施以维持配体对目的分子的识别（例如，亲和力）。必要时（例如，空间位阻），可经接头将配体连接至配位部分。图 14 显示用于使用常见配体对代表性的螯合剂进行修饰的常规合成途径。Margherita 等. (1993) *J. Biochem. Biophys. Methods* 38: 17-28 提供了可用于将配体附着于本发明的配位部分的合成方法。

当配体和结合到配体上的配位部分都是蛋白质时（例如，分别为生长因子和抗原表位标记），融合蛋白质的合成可经分子生物学方法（例如，PCR）或生化方法（固相肽合成）完成。

本发明的复合物具有不同的复杂度水平，例如，单体（参见图 12 和 13ab 描述了三个配体复合物）、二聚物、聚合物（参见图 23a-b 描述的聚合物经实施例部分实施例 3 所述的结合性接头的形成）、片层（参见图 24，其中当靶分子的单个表面暴露的 Trp 残基与 TNB---TNB 体形成富/缺电子关系时形成片层）以及可形成三维（3D）结构的晶格（如当超过一个表面暴露的 Trp 残基形成富/缺电子关系时）。得到很好地证实的是复合物复杂度越高，结构越刚性使得能够用于如下文进一步描述的结晶方法中。此外，大的复合物将更快地发生分相，不需要使用另外的离心步骤。

如下文所述，本发明的组合物可以被组装在纯化试剂盒中，其可包含另外的缓冲液和添加剂。可以理解的是这种试剂盒可以包括用于纯化来自单一样品的许多分子的许多配体。然而，为了简化沉淀（例如，使用相同的反应缓冲液、温度条件、pH 等）以及进一步的纯化步骤，选择相同的配位部分和配位体离子或分子。

如上文所提及的，本发明的组合物可用于纯化来自样品的目的分子或细胞。

因此，本发明的另一个方面提供纯化目的分子的方法。

如此处使用的术语“纯化”是指至少通过依靠结合至本发明的组合物而改变其溶解度并且沉淀而从样品分离目的分子（即，分相）。

本发明的方法通过将包含目的分子的样品与本发明的组合物接触并且收集包含由本发明的物质组合物和目的分子形成的复合物的沉淀，由此纯化目的分子。

如此处使用的术语"样品"是指包含目的分子以及可能一种或多种污染物（即，不同于所需目的分子的物质）的溶液。例如当目的分子为分泌的重组多肽时，样品可以是条件培养基，其可能包含重组多肽、血清蛋白以及代谢物以外的分泌自该细胞的其他多肽。当样品不包含污染物时，纯化是指浓缩。

为了起始纯化，首先将本发明的物质组合物与样品接触。此优选通过添加结合于配位部分的配体至样品而允许目的分子结合至该配体，随后添加配位体离子或分子以允许目的分子的复合物的形成和沉淀而完成。为了避免复合物的快速形成（其可能导致杂质的截留），优选在搅动时将配位体缓慢添加至样品。还可以通过添加游离的配位体（即，不与配体结合的）实现可控制的沉淀速度，其还可引起在各种应用中有益的较小的复合物的形成，例如下文进一步描述的免疫原的形成。

一旦形成上述复合物（数秒至数小时），可通过离心促进复合物的沉淀（例如，超离心），虽然有时（例如，大复合物的情况）离心不是必须的。

取决于目的分子所需的用途，沉淀可经进一步的纯化步骤以从复合物回收目的分子。此可通过使用本领域熟知的许多生化方法完成。其实例包含，但不限于，经疏水作用层析的分级分离（例如经苯基琼脂糖凝胶）、乙醇沉淀法、等电聚焦、反相 HPLC、二氧化硅层析、肝素琼脂糖凝胶层析、阴离子交换层析、阳离子交换层析、层析聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析（例如使用 A 蛋白、G 蛋白、抗体、特异性底物、配体或抗原作为捕获试剂）。

可以理解的是可以将纯净的反应溶液（例如，缓冲液）简单添加至沉淀以洗脱在复合物形成时被沉淀的低亲和力结合的杂质。

进一步可理解的是任何上述纯化方法可以对样品重复应用（即，沉淀）以提高靶分子的产量和/或纯度。

优选地，选择该物质组合物和配位体离子或分子以使靶分子从形成的复合物快速和简便的分离。例如，目的分子可直接从复合物洗脱，条件是所用的洗脱条件不干扰配位部分结合至配位体（参见图 4-5）。例如，当用于复合物中的配位部分为螯合剂时，可使用高的离子强度

来洗脱目的分子，因为已经很好地确证其不影响金属螯合剂的相互作用。或者，可使用采用离液盐的洗脱，因为已经表明金属螯合剂的相互作用对能使靶分子在这种条件洗脱的高盐条件耐受[Porath (1983) *Biochemistry* 22: 1621-1630]。

可通过与配位体金属竞争的游离的（未修饰的）螯合剂（即，配位部分）的添加而将复合物重新溶解（图3）。其后可使用超滤或透析除去大部分的螯合金属和竞争性的螯合剂。溶解的复合物（即，目的分子：配体-配位部分）随后可被上样至固定化的金属亲和柱[例如，亚氨基二乙酸（IDA）和次氨基三乙酸（NTA）]。可以理解的是当使用高亲和力的螯合剂时（例如，儿茶酚），采取措施而使用采用相同的或对固定化的金属具有类似结合亲和力的其他螯合剂修饰的固定化的金属亲和离子柱，以避免配体：螯合剂试剂从柱上洗脱下来而不是结合在柱上。

合适的洗脱条件的应用将导致靶分子的洗脱而保持配体-配位部分结合在柱上。最终的脱盐步骤可用于获得终产品。

配体-配位部分的再生具有高的经济价值，因为这种融合分子的合成可能耗费此处所述方法涉及的成本以及工作的大部分。因此，例如，可通过将竞争性螯合剂上样到上述柱或者改变柱的pH，随后经可将游离的螯合剂和所需的配体-配位部分分离的超滤，而实现配体-配位部分的回收。

上述纯化方法可应用于各种重组体和天然物质的分离，这些重组体和天然物质具有很高的研究或临床价值如重组生长因子和血液蛋白质产物（例如，冯·威利布兰德因子和凝血因子，其分别是在用于冯·威利布兰德疾病和甲型血友病的替代治疗中有效的治疗性蛋白质）。

如上文所提及的，本发明的组合物也可用于分离特定的细胞群体。

已确认由于人器官的缺乏，体外器官发生作为一个最佳替代而出现。为此，必须分离能分化成任何所需细胞谱系的干细胞。因此，例如，为了分离造血干/祖细胞，可使用结合至细胞群独有的表面标记如CD34和CD105[参见Pierelli(2001) *Leuk. Lymphoma* 42(6): 1195-206]的许多配体。

另一个实例为利用植物凝集素配体，如刀豆素A[Sharon (1972)]

Science 177: 949; Goldstein (1965) Biochemistry4: 876]分离红细胞。

可利用特异于目的病毒细胞的各种配体实现病毒细胞的分离[参见 <http://www.bdbiosciences.com/clontech/archive/JAN04UPD/Adeno-X.shtml>]

具体地，可通过设计成包含肝素配体[Kohleisen (1996) J Virol Methods 60 (1): 89-101]的本发明的组合物来分离反转录病毒。

利用上述方法的细胞分离可经之前的样品分批步骤，实施该步骤以基于细胞密度或大小分离细胞（例如，离心）以及进一步的选择性细胞富集（例如，FACS）步骤而完成。

除了其纯化能力外，本发明的组合物还可用于除尽样品中不想要的分子或细胞。

此通过将包含不想要的靶分子或目的细胞的样品与本发明的组合物接触使得形成复合物（上述）并且除去沉淀而完成。该净化的样品为上清液。

该方法具有各种用途，如用于除尽来自骨髓样品的肿瘤细胞、为了分离和富集 T 细胞和 CD^{8+} 细胞或 CD^{4+} 细胞而除尽来自外周血、脾脏、胸腺、淋巴或骨髓样品的 B 细胞和单核细胞、除尽来自生物样品的病原体和不需要物质（例如，朊病毒、毒素）、蛋白质的纯化（例如，除尽高分子量的蛋白质如 BSA）等。

如上文所提及的，为了从给定样品中除尽大量靶物质，例如为了从生物液体除去高丰度的蛋白质（例如，白蛋白、IgG、抗胰蛋白酶、IgA、转铁蛋白和亲血球蛋白，参见 <http://www.chem.agilent.com/cag/prod/ca/51882709small.pdf>）可使用多个配体。

相对现有沉淀组合物（例如，智能聚合物），本发明新的组合物的独特特性提供了许多优点，一些优点概括如下。

(i) 低成本的纯化；该方法不依赖复杂的实验设备如 HPLC，因此规避了机器维护和运行的成本。

(ii) 易于放大；本方法不受具有扩散限制的亲和柱载量的限制。事实上，对添加的沉淀复合物的量没有限制。

(iii) 温和的沉淀方法；避免了 pH、离子强度或温度很大改变产生的限制。

(iv) 控制整个沉淀过程；沉淀可通过将合适的配位体离子或分子缓慢添加到沉淀混合物；单和/或多价配位体的使用；对配位部分具有不同亲和力的配位体离子或分子的使用；在非共价聚合物、片层或晶格形成之前、之中或之后，添加非固定的游离配位部分以避免杂质的非特异性结合和截留[Mattiasson 等., (1998) *J. Mol. Recognit.* 11: 211-216; Hilbrig 和 Freitag (2003) *J. Chromatogr. B* 790: 79-90]; 以及通过改变温度条件而控制。已证实各种分子在温度降低时呈现较低的溶解度，因此，控制温度条件可以调节沉淀的速率和程度。不过可以理解的是，由于快速的沉淀过程，低温条件可能引起杂质的截留，而高温条件可能引起靶分子的低产量（例如，变性温度）。因此在考虑上述参数时采取措施以达到最适的温度条件。

(v) 降低的杂质本底；杂质不能结合配位体并且同样地其不能紧密结合至非共价的基质，允许在洗脱步骤之前被除去。此外，来自配体生物本底的杂质（与配体共同纯化的分子）连同配体本身可能变为修饰过的[条件是配体和杂质具有相同的化学性质（例如，均为蛋白质）]，并且可能成为沉淀复合物的一部分。在合适的洗脱条件下，靶分子将被回收而修饰的杂质不会被回收。

(vi) 在均匀溶液中的结合；已证实在均匀溶液中的结合比在不均匀的相中更快并且更有效，如在亲和层析中[AC, Schneider 等., (1981) *Ann. NY Acad. Sci.* 369, 257-263; Lowe (2001) *J. Biochem. Biophys. Methods* 49, 561-574]。例如，已知在许多亲和分离策略中，高分子量聚合物（用于 AP）在溶液中形成非常卷曲的和粘滞的结构，其妨碍引入的大分子如靶分子的进入。

(vii) 没有上文进一步所述的配体的固定化。

(viii) 简便的复合物的重溶；复合物通过非共价作用而产生。

(ix) 严格条件下的消毒；该组合物不与基质共价结合并且因而可从任何装置移去，应用允许消毒条件以清除装置（柱）中的非特异性结合的杂质。

本发明组合物将目的分子以有序的复合物如二聚物、三聚物、聚合物、片层或晶格排列的能力还使得其能用于促进大分子如蛋白质，尤其是膜蛋白的结晶。如本领域所熟知的，晶体结构代表分子在三维空间的有序排列。这种有序排列可通过在给定的空间降低游离分子的

数目而产生（参见图 10a-b 和 11a-c）。

因此，本发明的又一个方面提供用于结晶目的分子的组合物。

如此处使用的术语“结晶”是指目的分子的固化以致形成其原子的有规则地重复的内部排列和常见的外部平的表面。

本发明的组合物包含至少一种能结合目的分子的配体，该配体附着于至少一种配位部分；和能非-共价结合该至少一种配位部分的配位体，当共-孵育时该至少一种配位部分和配位体能形成复合物，并且因此选择组合物以使当目的分子结合至配位体时能确定该目的分子的相对空间位置和方向，由此在诱导结晶的条件下促进其中晶体的形成。

可以理解的是共价多配体复合物的使用之前已在可溶性蛋白质的结晶中尝试[Dessen(1995) *Biochemistry* 34: 4933-4942; Moothoo(1998) *Acta. Cryst. D* 54 1023-1025; Bhattacharyya(1987) *J. Biol. Chem.* 262: 1288-1293]。然而，每个分子具有超过两个配体的多配体复合物的合成是技术上困难的和昂贵的；此外，多配体复合物合成之前靶蛋白的三维结构应该已知，其在配体间具有最佳的距离以结合足够的靶分子而在该多配体复合物中占据所有的靶结合位点，因而，这些配体未曾用于膜蛋白的结晶。

通过更快和更便宜地仅合成非共价多配体中的基本单元（具有配体-配位部分的通用结构），其是更容易实现的，本发明克服了这些问题。该基本单元，仅通过多价配位体离子或分子的添加就形成非共价的三-配体。因此，使用单个合成步骤来形成双、三、四或更高的可用于结晶实验的多配体。

为了产生目的分子的晶体（优选膜蛋白），使本发明的组合物与样品接触，样品包含目的分子，优选以预定的纯度和浓度提供。

通常，结晶样品为液态样品。例如，当目的分子为膜蛋白时，本发明的结晶样品为膜制备物。生成膜制备物的方法在 *Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual* CSHL Press (1996) 中描述。

一旦目的分子结合至本发明的组合物，使得其相对空间位置和方向得到很好的确定，样品就经受合适的结晶条件。本领域已知的一些结晶方法可用于样品以促进目的分子的结晶。结晶方法的实例包含，但不限于，自由界面扩散法[Salemme, F.R. (1972) *Arch. Biochem.*

Biophys. 151: 533-539]、在悬浮或滴入方法中的蒸气扩散 (McPherson, A. (1982) Preparation and Analysis of Protein Crystals, John Wiley and Son, New York, pp82-127) 以及液态的透析 (Bailey, K. (1940) Nature 145: 934-935)。

目前, 悬滴法是用从溶液中生长大分子晶体的最常用的方法; 该方法尤其适于生成蛋白质晶体。通常, 将包含蛋白质溶液的小滴点样至盖玻片上并且悬浮在包含具有较高浓度沉淀剂库的密封室中。随着时间的过去, 小滴中的溶液通过来自小滴的水蒸气的扩散而与该库平衡, 因此缓慢提高小滴内蛋白质和沉淀剂的浓度, 其进而导致蛋白质的沉淀或结晶。

利用上述方法获得的晶体具有优选小于 3\AA , 更优选小于 2.5\AA , 更加优选小于 2\AA 的分辨率。

本发明的组合物在检验来自复杂混合物的分析物如血清样品中具有显著的有效性, 其具有显著的诊断优点。

因此, 本发明涉及检测患者中与目的分子相关的疾病的易感性或存在的方法。

与目的分子相关的疾病的实例为前列腺癌, 其可通过前列腺特异性抗原的存在而检测 [PSA, 例如, $>0.4\text{ng/ml}$, Boccon-Gibod Int J Clin Pract. (2004) 58 (4): 382-90]。

本发明的组合物与获自患者的生物样品接触, 借此包含目的分子的复合物形成的水平指示患者中与目的分子相关的疾病的易感性或存在。

如此处使用的短语"生物样品"是指从患者分离的组织或液体样品, 包含但不限于, 例如血浆、血清、脊髓液、淋巴液、皮肤、呼吸的、肠的和泌尿生殖道的外表部分、眼泪、唾液、乳汁、血细胞、肿瘤、神经元组织、器官以及体内细胞培养组分的样品。

为了便于复合物中目的分子的检测和定量, 优选对生物样品或组合物进行标记 (例如, 荧光、放射性标记)。

本发明的组合物还可用于定性或定量存在于液态或气体样品中的物质, 其可能在临床、环境、健康和安安全、遥感学、军事、食物/饮料和化学加工应用中具有重要的作用。

异常蛋白质的相互作用控制许多病原性的病症的发展。例如, 神

经系统中突触蛋白质的异常相互作用和错折叠是各种神经系统病症中导致神经退行性变的重要的发病事件。这些包括阿尔茨海默氏病 (AD)、帕金森氏症 (PD) 和 Lewy 体痴呆 (DLB)。在 AD 中, 错折叠的淀粉状蛋白 β 多肽 1-42 ($A\beta$)、淀粉状蛋白前体蛋白代谢作用的蛋白水解产物在神经元内质网和细胞外累积为凝集体 (即, 血小板)。本发明的组合物可用于打乱这种大分子复合物而因此治疗该病症。

给药和药物组合物产生的方法由例如, Fingl, 等., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch.1 p.1 描述。

本发明的组合物可被包括在诊断或治疗试剂盒内。例如, 特定疾病的组合物可和合适的缓冲液和防腐剂一起被包装在一种或多种容器中并且用于诊断或用于直接的治疗。

因此, 配体和配位部分可被置于一个容器中而配位体分子或离子可被置于第二个容器中。优选地, 容器包含标签。合适的容器包含, 例如瓶子、小瓶、注射器和试管。容器可由各种材料如玻璃或塑料制成。

此外, 也可加入其他添加剂如稳定剂、缓冲液、封阻剂等。

用于增强抗原的免疫原性潜力的许多方法在本领域中已知。例如, 半抗原载体偶联, 其涉及利用将抗原性分子 (例如, 多肽) 交联至更大的载体如 KLH、BSA、甲状腺球蛋白和卵清蛋白来提高该分子的分子大小, 一个已知控制免疫原性的参数 [参见 Harlow 和 Lane (1998) A laboratory manual *Infra*]。然而, 抗原性分子的共价交联导致其中的结构变化, 因此限制了抗原的呈递。已尝试将抗原性分子非共价固定至各种基质来绕过该问题 [Sheibani Frazier (1998) *Bio Techniques* 25: 28]。因此, 本发明的组合物可用于介导同样的作用。

因此, 本发明还涉及利用本发明的组合物增强目的分子免疫原性的方法。如此处使用的术语 "免疫原性" 是指分子激起生物体内免疫应答 (例如, 抗体反应) 的能力。

该方法通过将目的分子与本发明的组合物接触而完成, 借此由此形成的复合物被用作免疫原。可将这种复合物注射至动物宿主以产生免疫应答。

因此, 例如为了产生抗体反应, 将上述免疫原性组合物经皮下注

射入动物宿主中（例如，兔或小鼠）。在 1-4 次注射（即，推进）后，收集血清（约首先注射的 14 周）并且例如通过利用上述样品中分析物检测的方法来测定抗体效价，其中配体为比如 A 蛋白。可选择的或另外，进行亲和层析或 ELISA。

可以理解的是本发明的组合物具有许多其他的用途，其在此处未清楚地描述，例如那些属于亲和层析的用途[参见例如，Wen-Chien 和 Kelvin (2004) *Analytical Biochemistry* 324: 1-10]。

本发明另外的目的、优点和新的特征对于本领域技术人员参阅下列并不试图限制的实施例后将是显而易见的。另外，上文所述以及下列权利要求部分要求的本发明的每个不同实施方案和方面将在下列实施例中找到实验性的支持。

实施例

参考下列实施例，与上述说明书一起以非-限制性方式举例说明本发明。

通常，此处所用的术语和本发明中所用的实验方法包括分子的、生化的、微生物学的和重组的 DNA 技术。所述技术在文献中得到充分说明。参见，例如，"Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook 等., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R.M., ed.(1994); Ausubel 等., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley 和 Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson 等., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren 等. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 美国专利 4, 666, 828; 4, 683, 202; 4, 801, 531; 5, 192, 659 和 5, 272, 057 中阐述的方法; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J.E., ed.(1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes 1-111 Coligan J.E., ed. (1994); Stites 等. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (第 8 版), Appleton & Lange, Norwalk, CT(1994); Mishell 和 Shiigi(eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", H.Freeman 和 Co., New York (1980); 可用的免疫测定法在专利和科学文献中被广泛地描述，参见，例如，美

国专利 3, 791, 932; 3, 839, 153; 3, 850, 752; 3, 850, 578; 3, 853, 987; 3, 867, 517; 3, 879, 262; 3, 901, 654; 3, 935, 074; 3, 984, 533; 3, 996, 345; 4, 034, 074; 4, 098, 876; 4, 879, 219; 5, 011, 771 和 5, 281, 521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M.J., ed.(1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B.D., 和 Higgins S.J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B.D., 以及 Higgins S.J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R.I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) 和 "Methods in Enzymology" Vol.1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA(1990); Marshak 等., "Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); 此处所有这些引入作为参考就如完全阐述一样。其他的一般参考文献贯穿该说明书而提供。为了方便阅读而提供其中被认为是本领域熟知的方法。其中包含的全部信息此处引入作为参考。

实施例 I

利用螯合剂-金属复合物合成非共价多配体复合物

螯合剂以不同特异性和亲和力结合金属的能力在文献中得到很好的描述。为了产生本发明的非共价多配体复合物, 修饰接头(具有所需长度)结合特定的配体和螯合剂以产生下列配体----接头----螯合剂的通用结构。

随后, 通过添加合适的金属, 将形成非共价多配体复合物。(图 12)。

例如, 合成异羟肟酸(其为已知的铁螯合剂)衍生物(图 13a)以使在 Fe^{3+} 离子存在时形成非共价多配体复合物(图 13b)。图 14 显示用于使用常见配体修饰典型的螯合剂的常规合成途径。上述合成可与上文 Margherita 等., 1999 所述的类似。

螯合剂的用于制备非共价多配体复合物的用途可具有一个另外的优点, 该优点来自一些螯合剂以不同的化学计量结合不同金属的能力, 如在 $[1, 10\text{-菲咯啉}]_2\text{-Cu}^{2+}$ 或 $[1, 10\text{-菲咯啉}]_3\text{-Ru}^{3+}$ [Onfelt 等., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 5708-5713] 的情况下。

该现象可用于利用相同的：配体---接头---螯合剂衍生物来形成双（图 15a）和三（图 15b）非共价多配体复合物。

实施例 2

利用富电子-缺电子复合物合成非共价多配体复合物

电子受体很容易和" π 过度的"杂环吡啶环体系形成分子复合物。吡啶苦味酸是约 130 年前描述的该类型的第一个复合物[Baeyer, 和 Caro, (1877) Ber. 10: 1262]并且数年后使用相同的电子受体从茉莉花油分离出了吡啶。苦味酸此后常常被用于分离和鉴定来自反应混合物的吡啶复合物。后来, 引入 1, 3, 5-三硝基苯作为络合剂并且常用于相同的目的[Merchant 和 Salagar, (1963) Current Sci. 32: 18]。已经用电子受体例如: 收敛酸[Marion, L., 和 Oldfield, C.W., (1947) Cdn. J. Res. 25B 1]、间三硝基苯基卤化物[Triebs, W., (1961) Chem. Ber. 94: 2142]、2, 4, 5, 7-四硝基-9-芴酮[Hutzinger, O., 和 Jamieson, W.D., Anal. Biochem. (1970) 35, 351-358], 以及用 1-氟代-2, 4-二硝基苯和 1-氟代-2, 4-二硝基苯[Elguero 等., (1967) Anals Real Soc. Espan. Fis. Quim. (Madrid) ser. B 63, 905 (1967); Wilshire, J.F.K., Australian J. Chem. 19, 1935 (1966)]制备了吡啶的其他固体复合物。

图 16a, 举例说明了配体---接头---缺电子 (缺 E.) 衍生物的一个实例, 而图 16b, 呈现了可使用的富电子共价三聚物的一个实例。可预料的是, 通过将三硝基苯 (图 16a) 和吡啶 (图 16b) 衍生物混合将形成多配体复合物 (图 16c)。可以理解的是也可以合成反向复合物, 即, 含有富电子部分的配体衍生物和缺电子的共价三聚物。

图 17 显示了用于上述配体衍生物制备的可能的合成途径。

包含 Trp 残基 (或任何其他富电子或缺电子部分) 的合成肽 (或任何多肽) 也可用于非共价多配体复合物的制备。图 18 显示了可形成具有四个 Trp 残基 (四个富电子部分) 合成肽的一个实例, 一个具有用缺电子体 (三硝基苯) 修饰的配体衍生物的四-非共价配体。

实施例 3

利用富电子-缺电子和螯合剂-金属的关系合成非共价多配体复合物

可组合上述实施例 1 和 2 中所述的两种复合能力以形成非共价多配体复合物。这种非共价多配体复合物的通用结构的一个实例在图 19

中显示。

为此，需要与缺电子部分共价结合的螯合剂。用于生成这种组合的合成途径在图 20 中呈现。

例如，能结合 M^{2+} 和 M^{3+} 金属的螯合剂（例如，儿茶酚）在 M^{2+} 和 M^{3+} 金属存在时能形成非共价-二配体（图 21a）或者非共价-三配体（图 21b）。

具有 Trp 残基（或任何其他富电子残基）的肽（或多肽）的存在可能会引起图 22a-b 中所示结构的形成。

上述两种结合关系的组合（螯合剂-金属和富电子-缺电子）可以带来另外的优点。例如，形成非共价多配体聚合复合物的能力。这可通过将两个螯合剂和一个处于其间的富电子部分合成而实现（图 23a）。在配体---缺电子衍生物存在时预期将形成图 23b 中所绘的复合物，其代表一种配体的非共价聚合物。

一旦形成二聚物、三聚物、四聚物等（通过例如配体---螯合剂衍生物），将会希望限制上述运动的自由度以便实现高度的有序排列。如果目的蛋白质具有富电子部分（例如 Trp），该富电子部分能接近共价的二-缺电子部分（如例如二-三硝基苯、TNB---TNB），则可在两个非共价二聚物之间形成复合物（图 24）。这将导致蛋白质和多配体的有序片层的形成。

可以理解的是也可将本发明的为了解释而在上下文的各个实施方案中描述的某些特征组合用于单个实施方案中。反之，本发明的为了简便起见而在上下文的单个实施方案中所述的不同特征也可单独或以任何合适的亚组合形式提供。

虽然联系本发明的具体的实施方案对本发明进行了描述，但显然许多替换、改进和改变对于本领域技术人员是显而易见的。因此，其目的是包括所有这样的替换、改进和改变，其落入附加的权利要求的精神和较宽的范围内。说明书提及的所有出版物、专利和专利申请此处整体引入说明书作为参考，就如每个单独的出版物、专利或专利申请此处具体和单独地引入作为参考一样。此外，该申请中任何参考文献的引用或标识将不会被解释成承认所述参考文献可被利用作为本发明的现有技术。

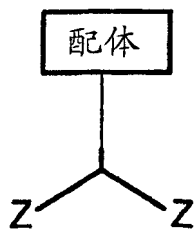


图 1a

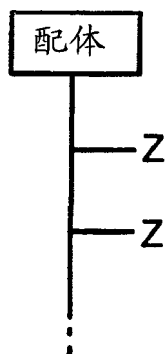


图 1b

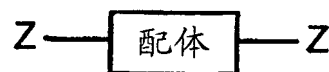


图 1c

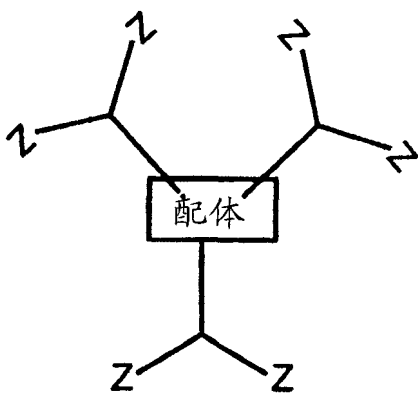


图 1d

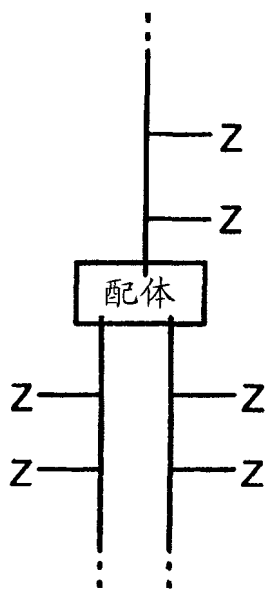


图 1e

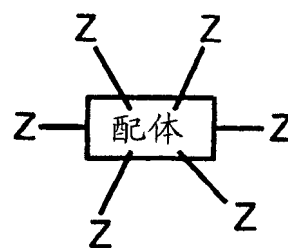


图 1f

Z=螯合剂和/核酸序列和/生物素(和其衍生物)
和/富或缺电子体等等

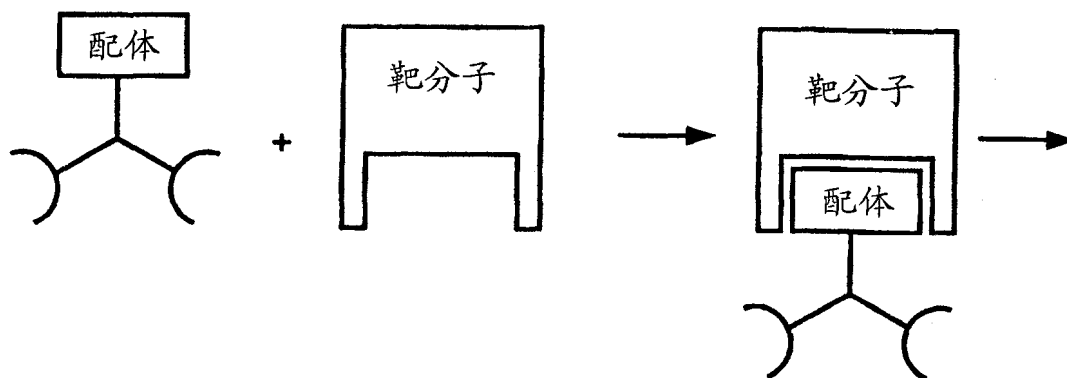


图 2a

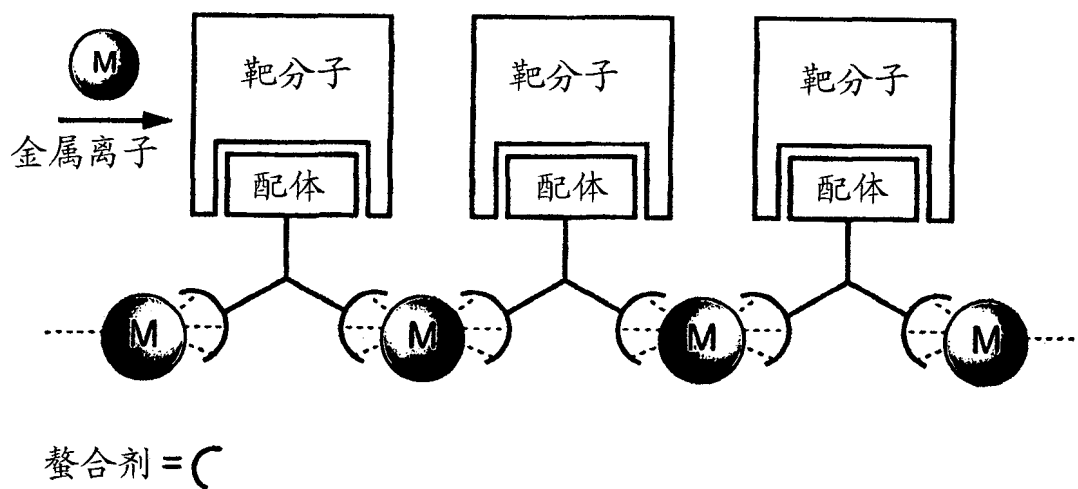


图 2b

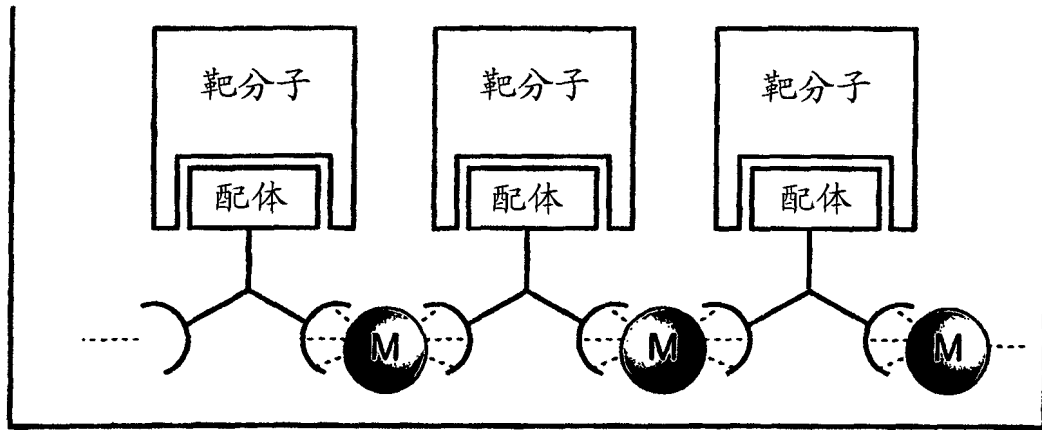


图 3a

加入竞争性游离螯合剂

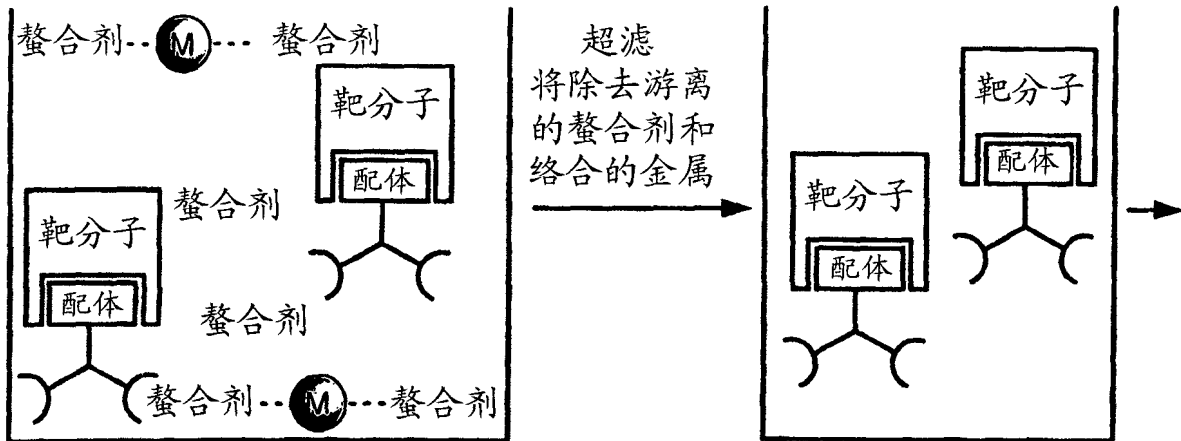


图 3b

图 3c

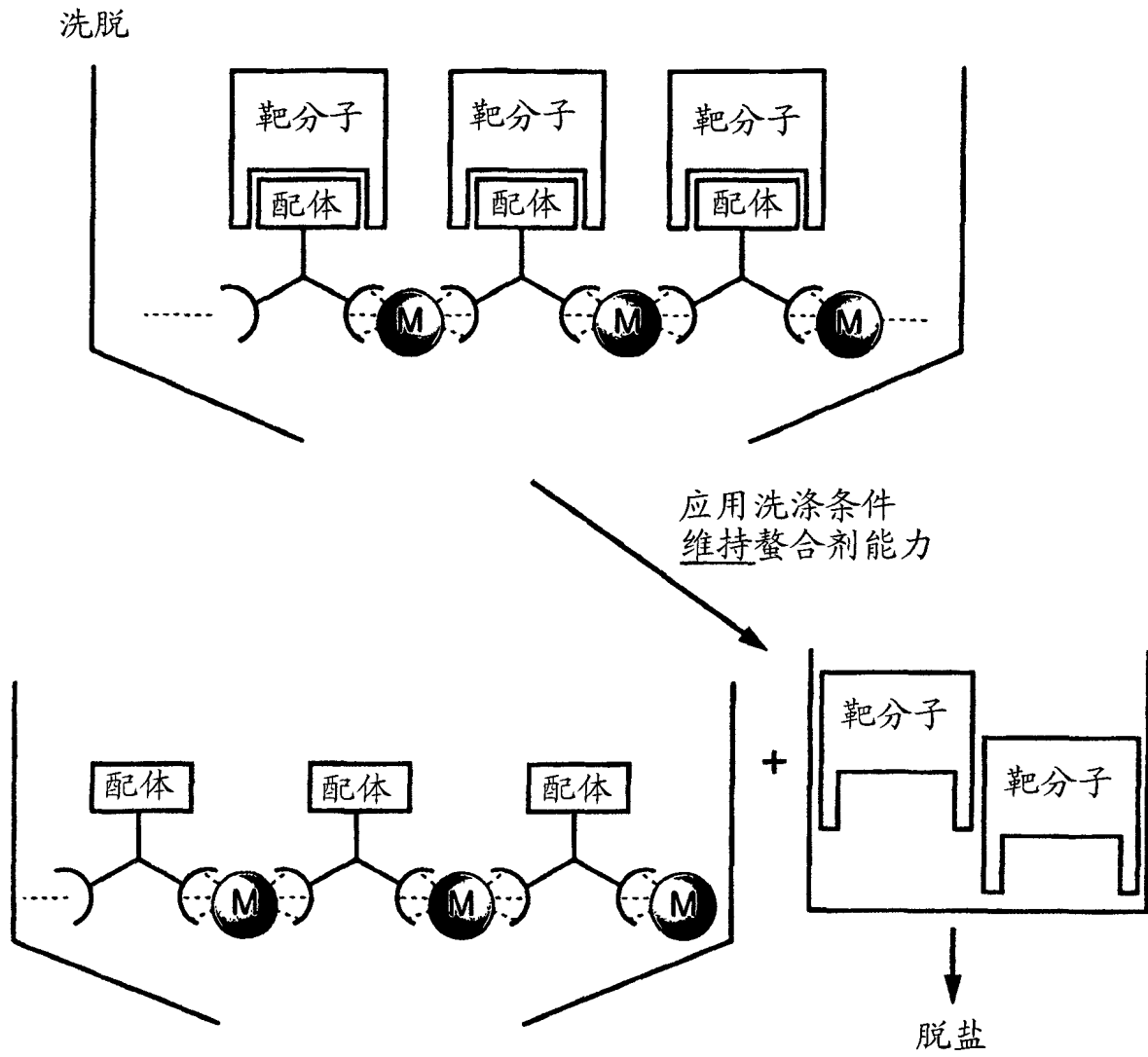


图 4

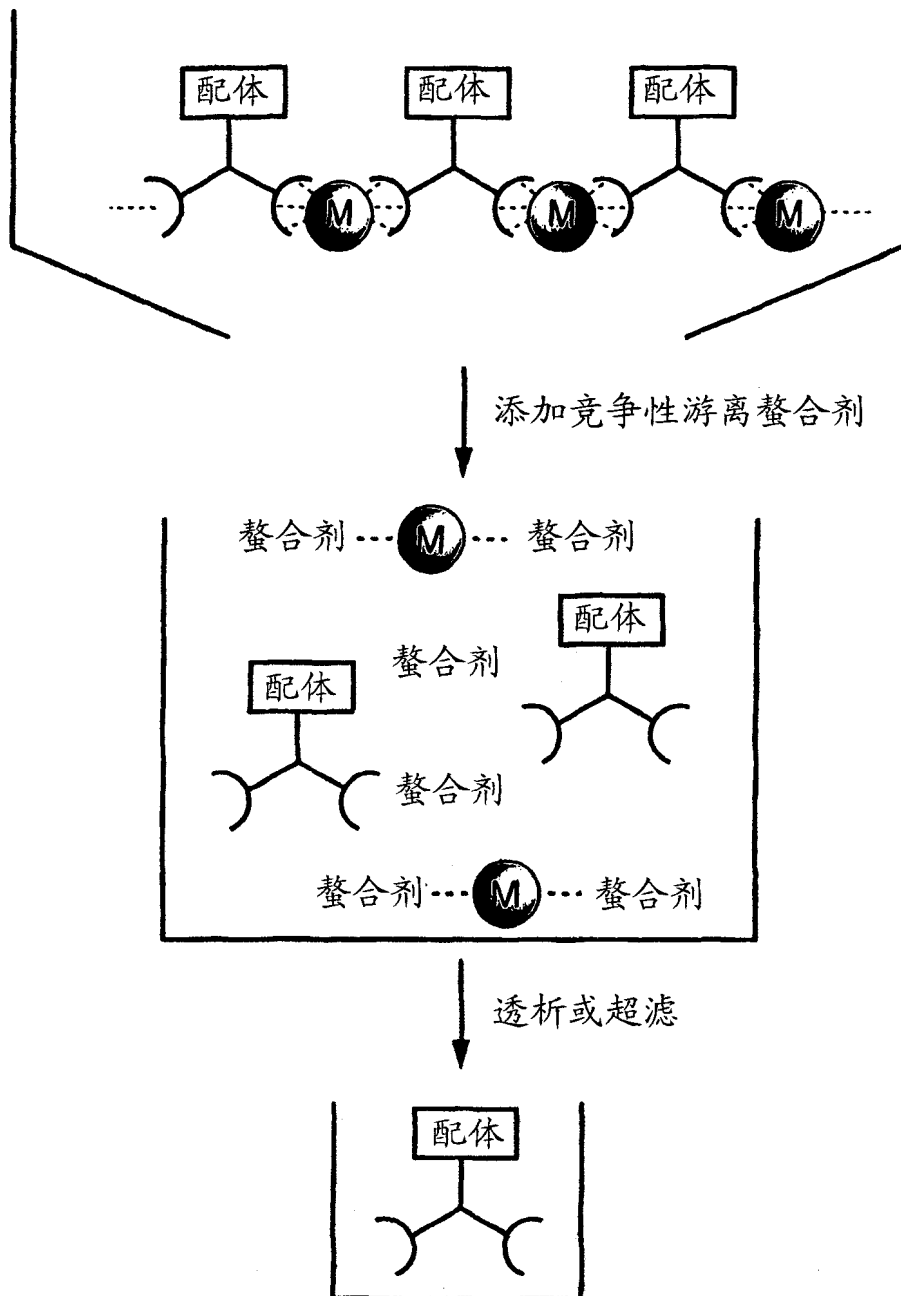


图 5

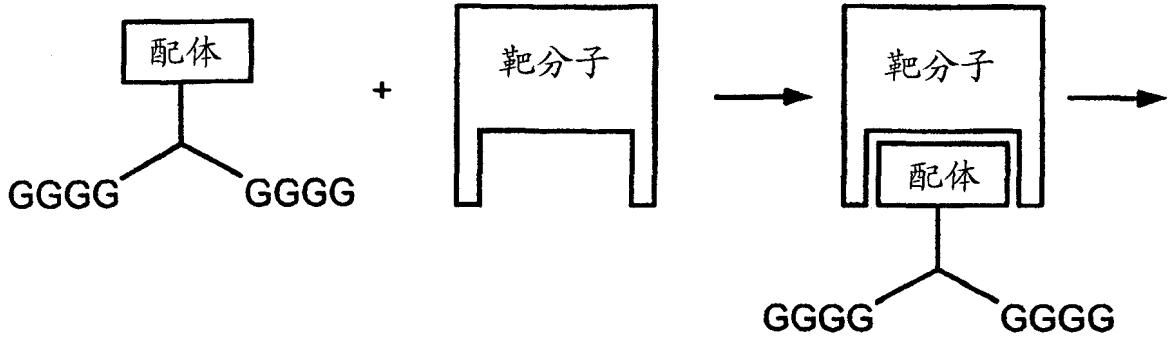


图 6a

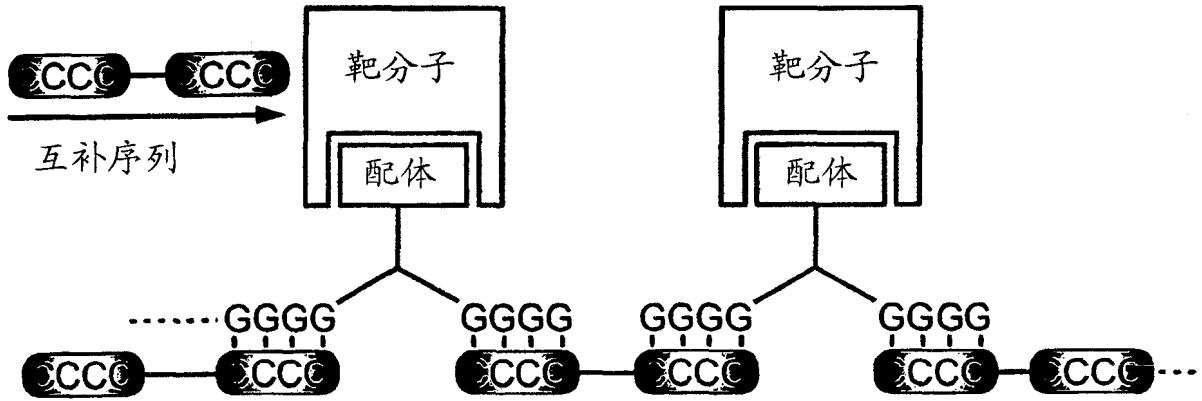
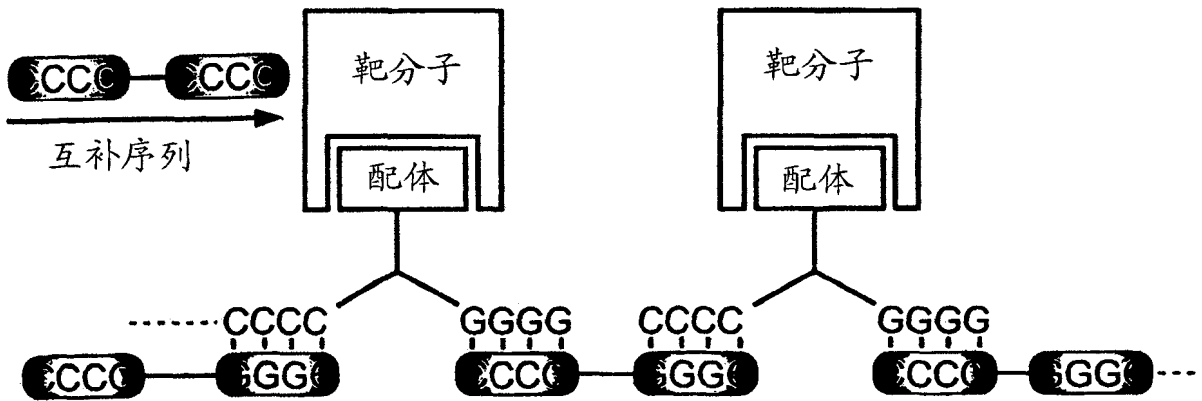


图 6b



G = 鸟嘌呤 C = 胞嘧啶

图 6c

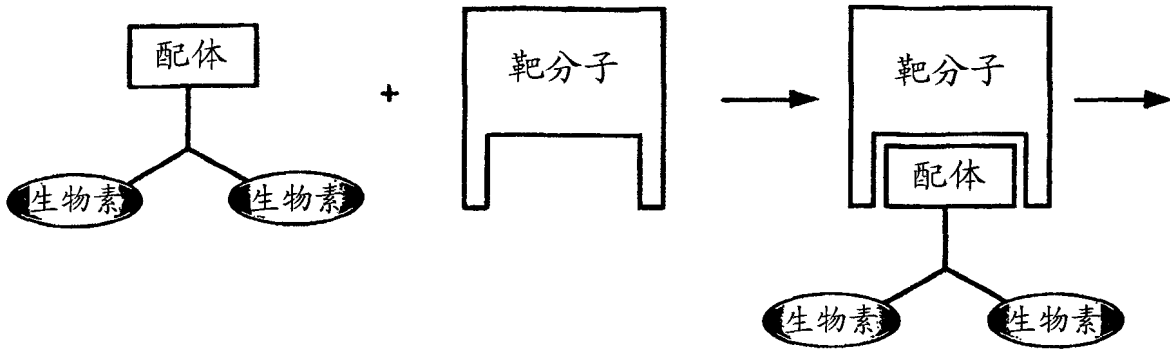
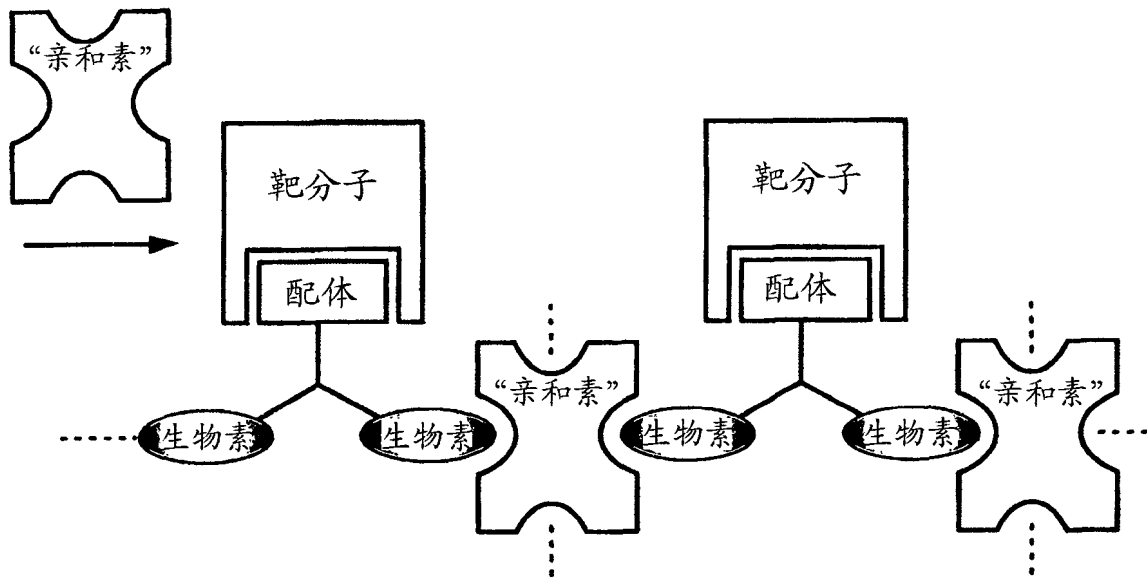


图 7a



“亲和素”=亲和素、硝基亲和素、吲哚基亲和素或任何其他亲和素衍生物。
生物素=生物素、DSB-X生物素或任何其他生物素衍生物。

图 7b

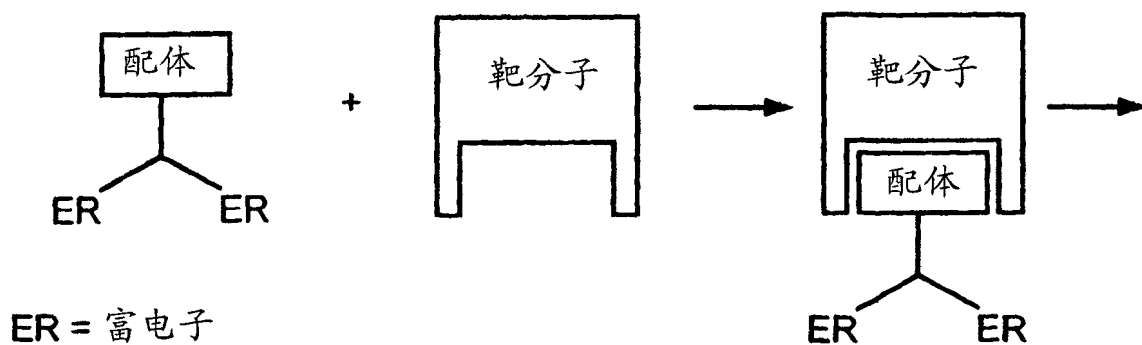


图 8a

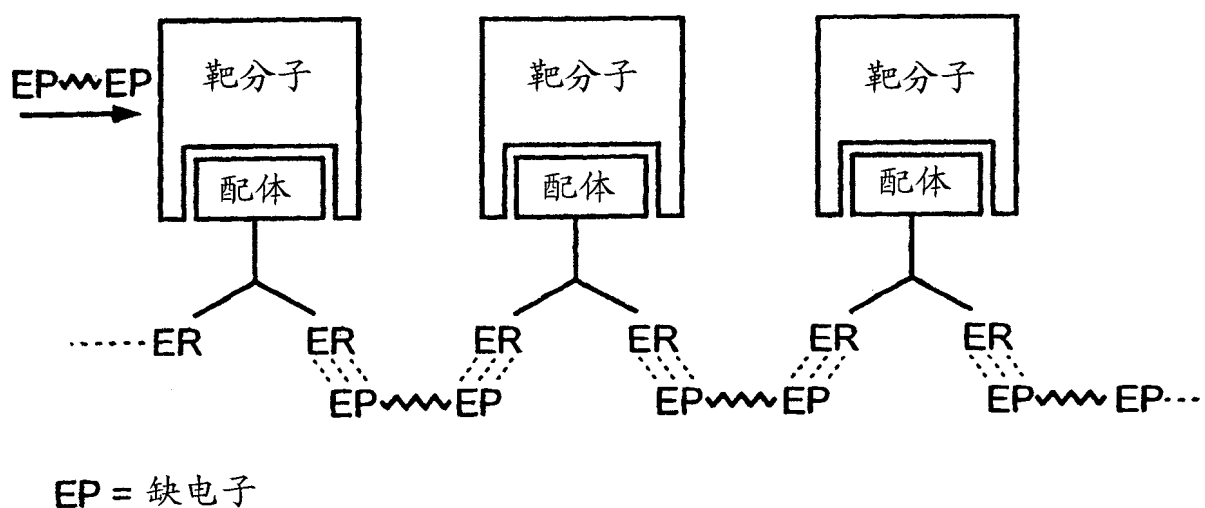


图 8b

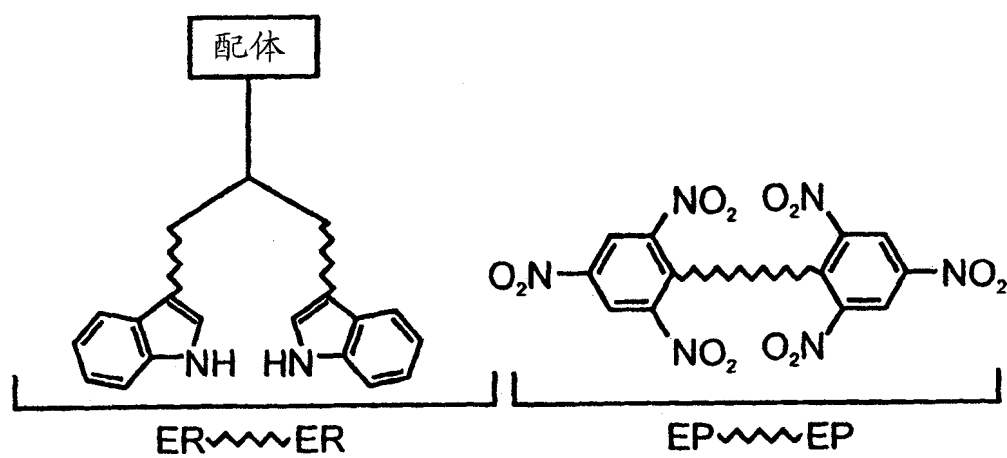
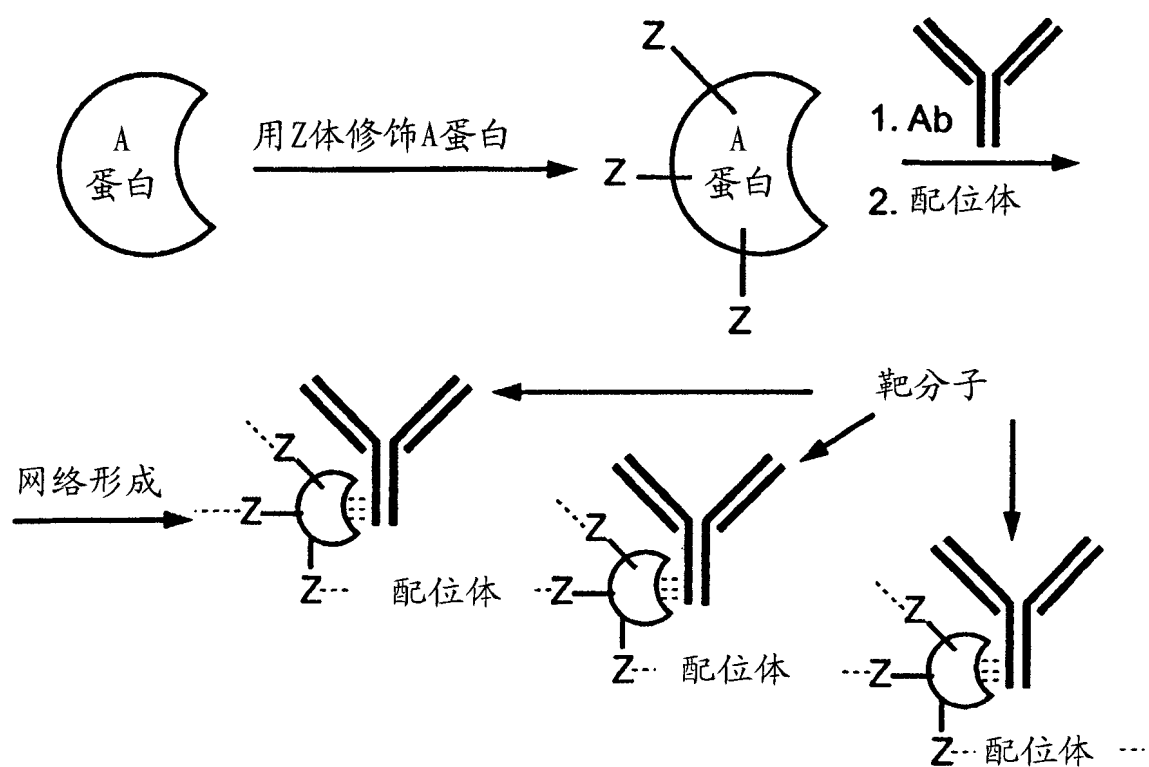


图 8c



Z=螯合剂、生物素、核苷酸序列、富/缺电子体等。

配位体=金属、亲和素、互补核苷酸序列、
富电子/缺电子体等。

图 9

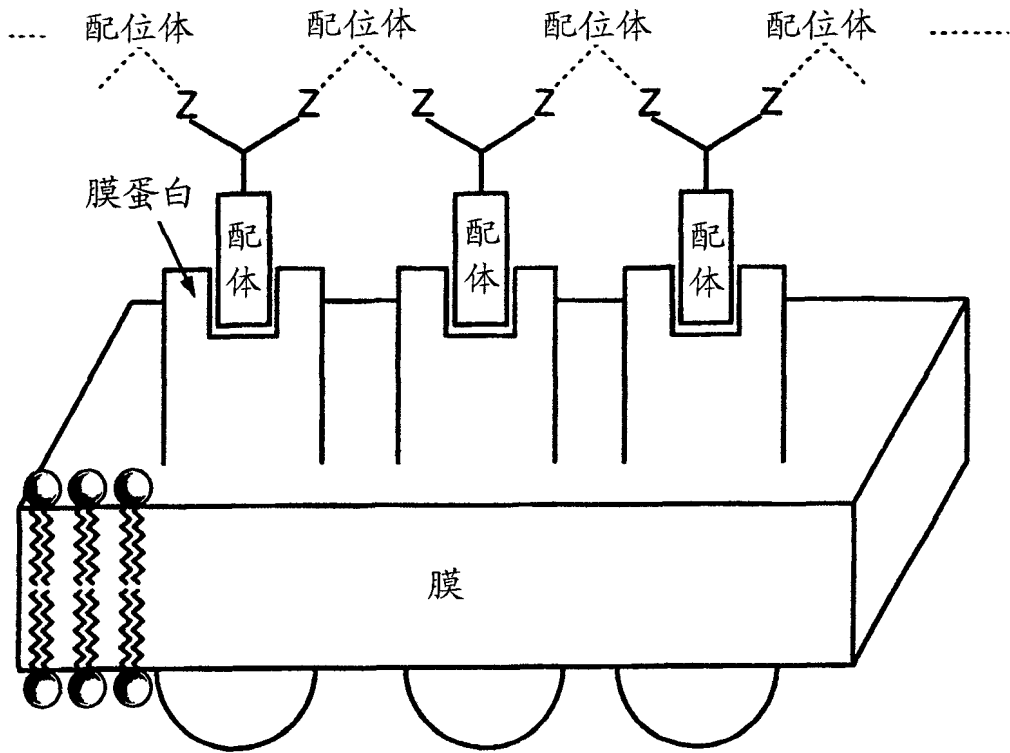


图 10a

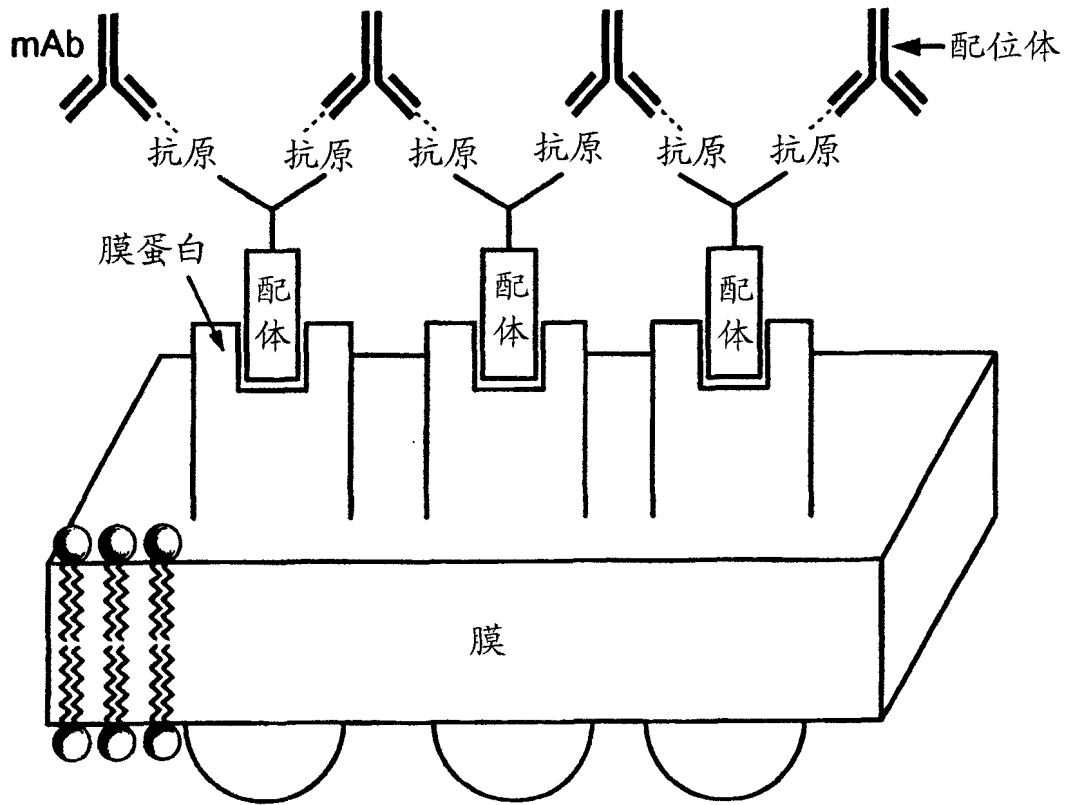


图 10b

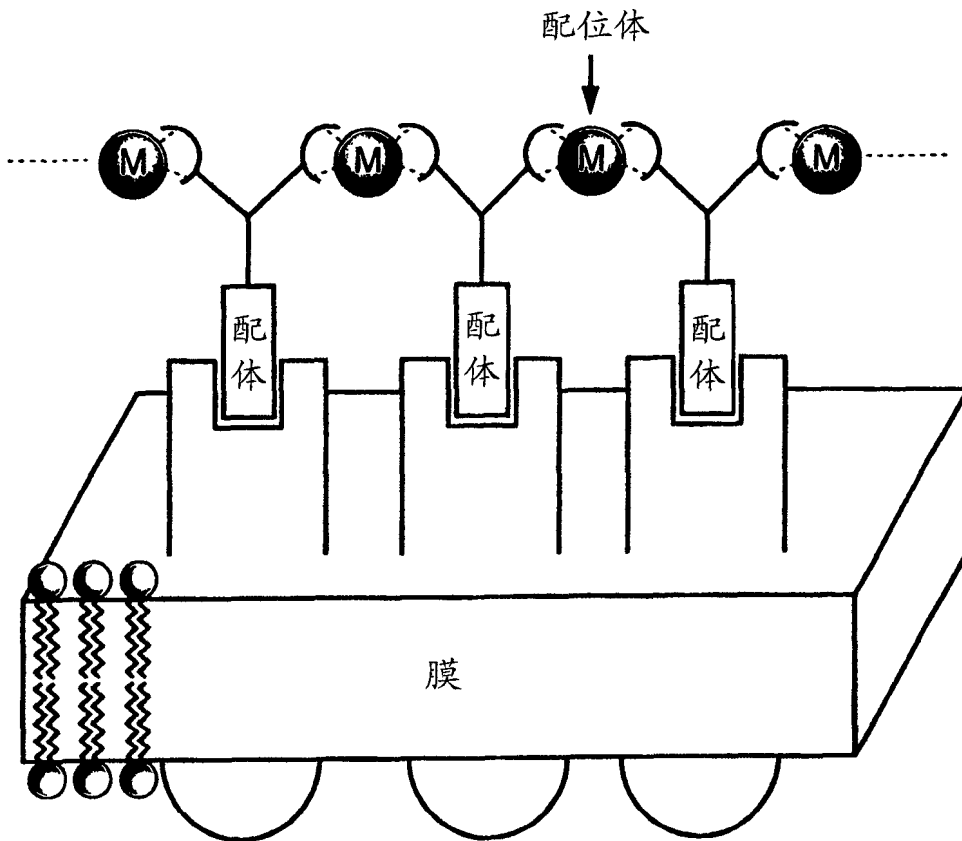


图 11a

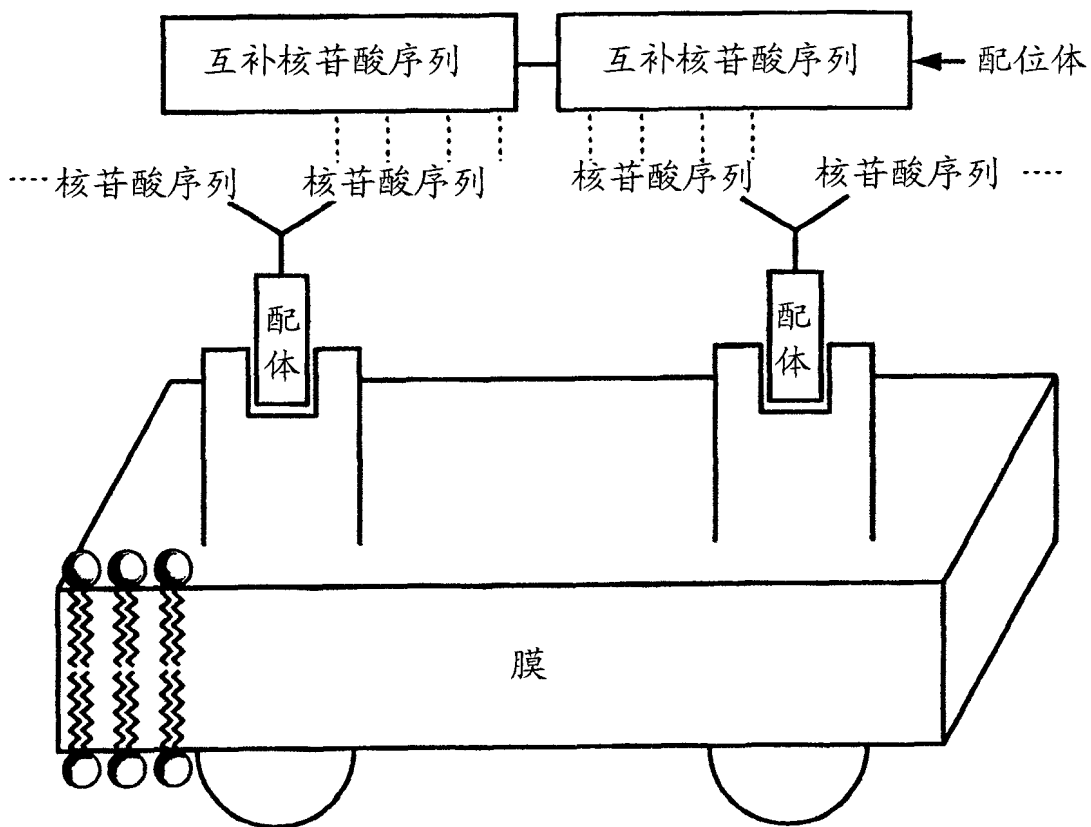


图 11b

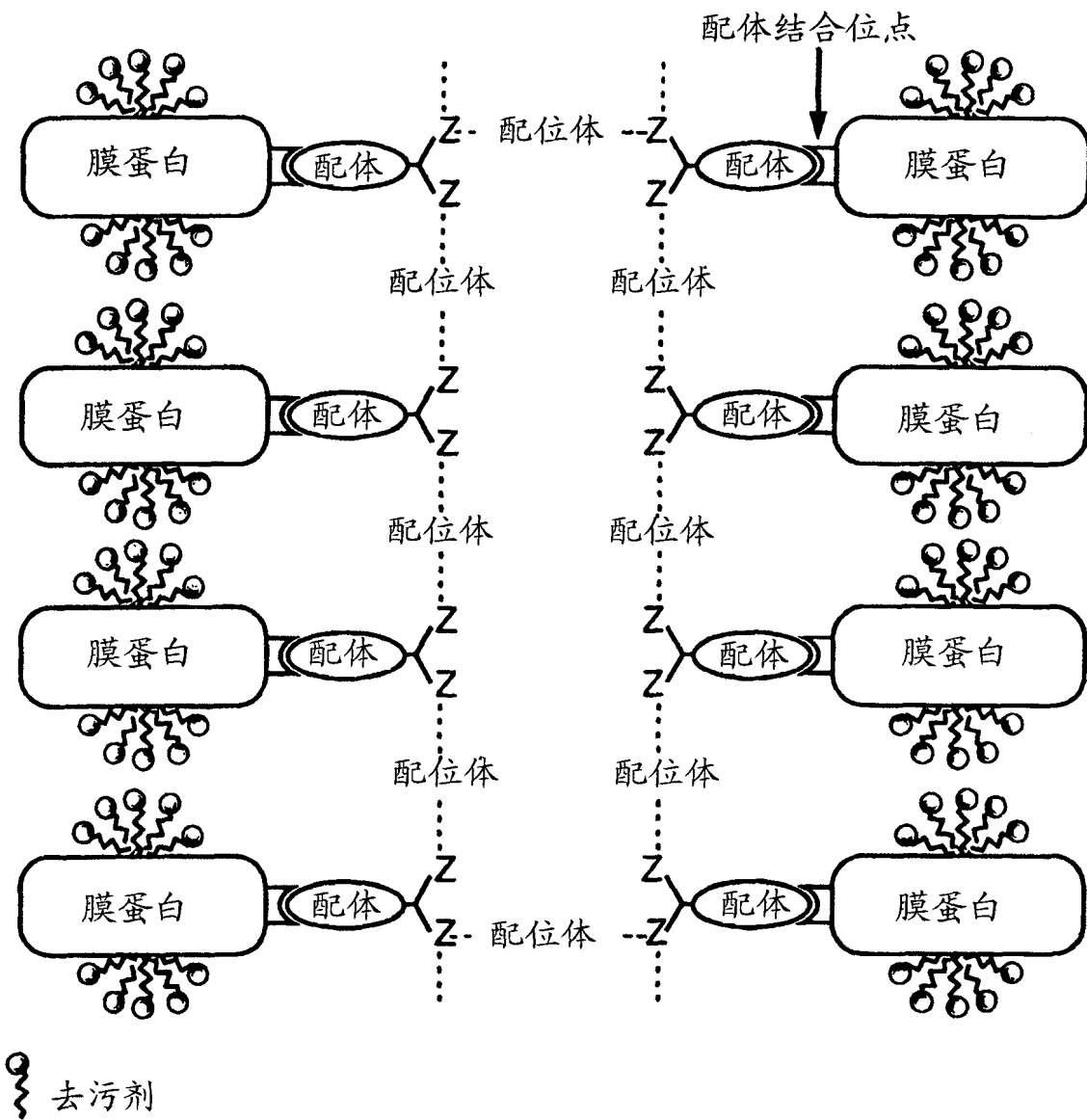


图 11c

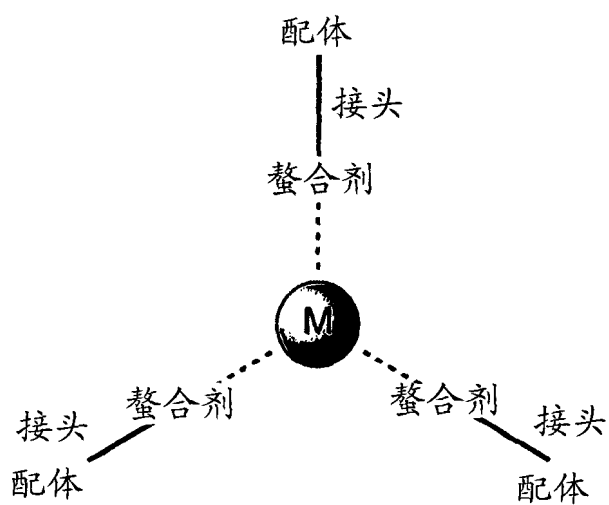


图 12

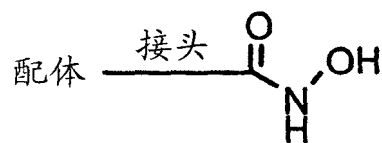


图 13a

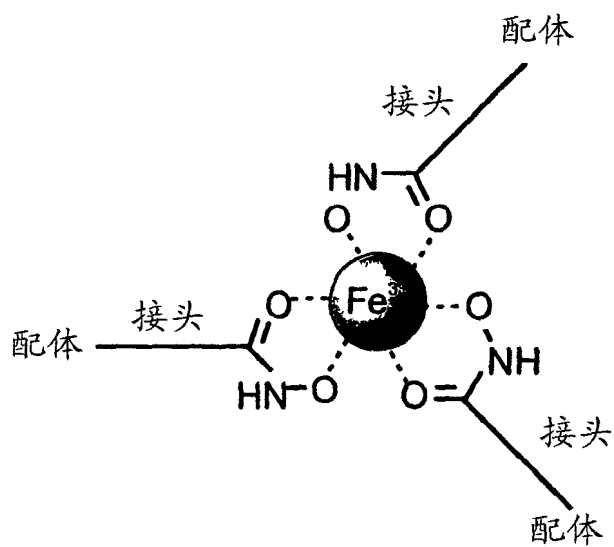
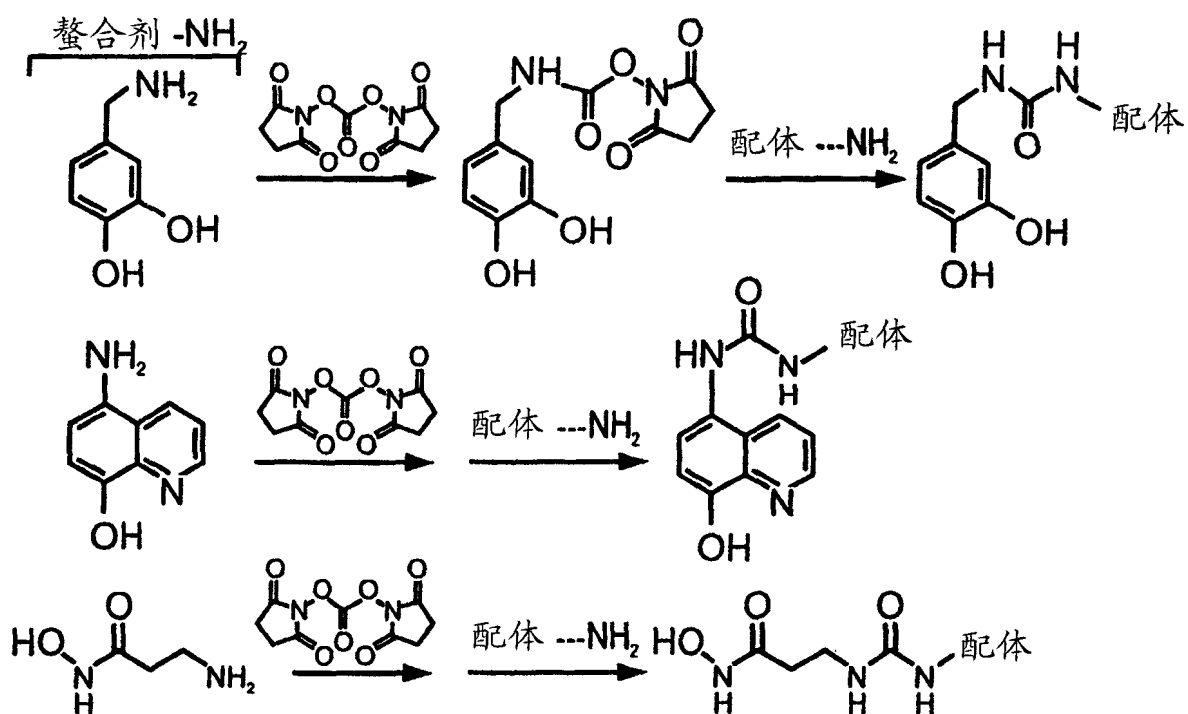


图 13b



同样可用于：配体 $---OH$ 配体 $---SH$ 配体 $---COOH$

图 14

Cu^{2+} 离子存在时双-配体的形成：

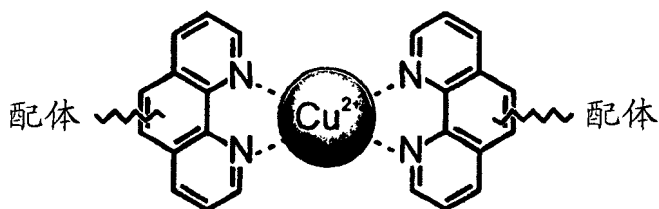


图 15a

Ru^{3+} 离子存在时三-配体的形成：

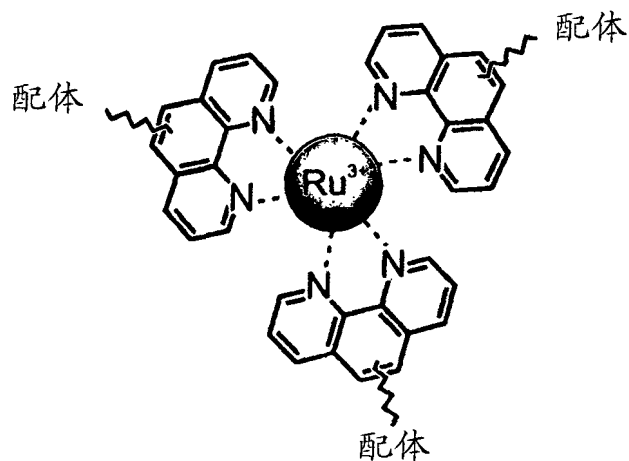


图 15b

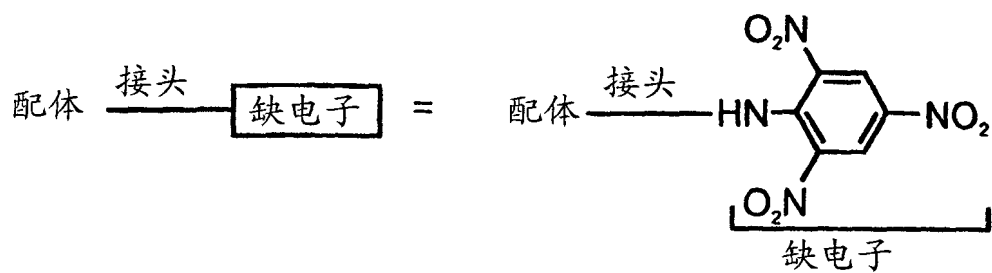


图 16a

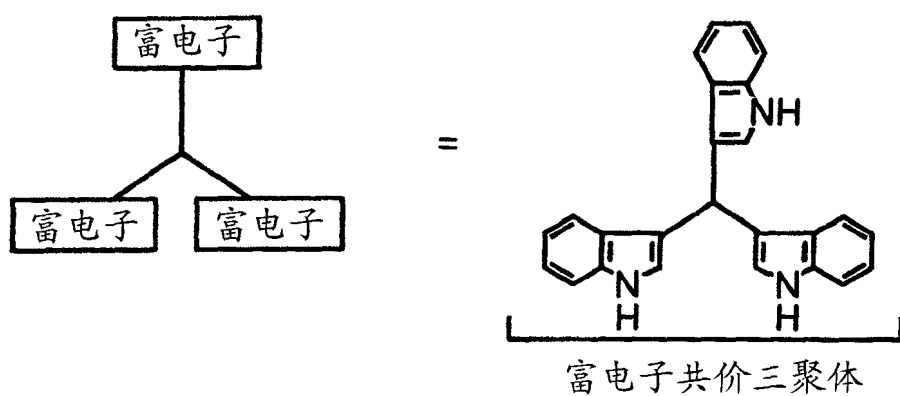


图 16b

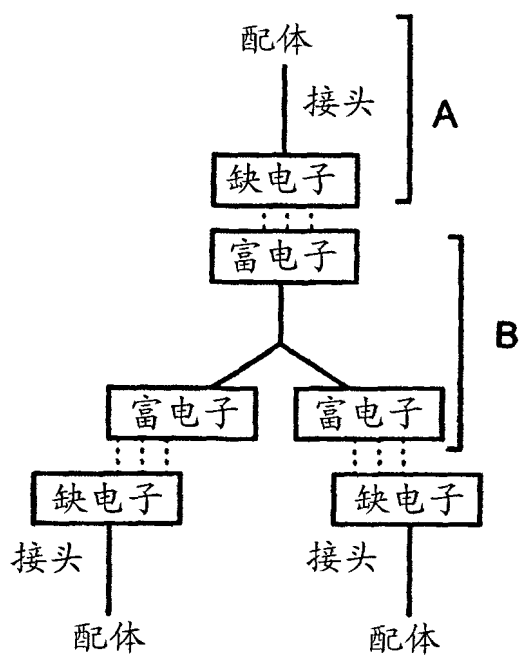


图 16c

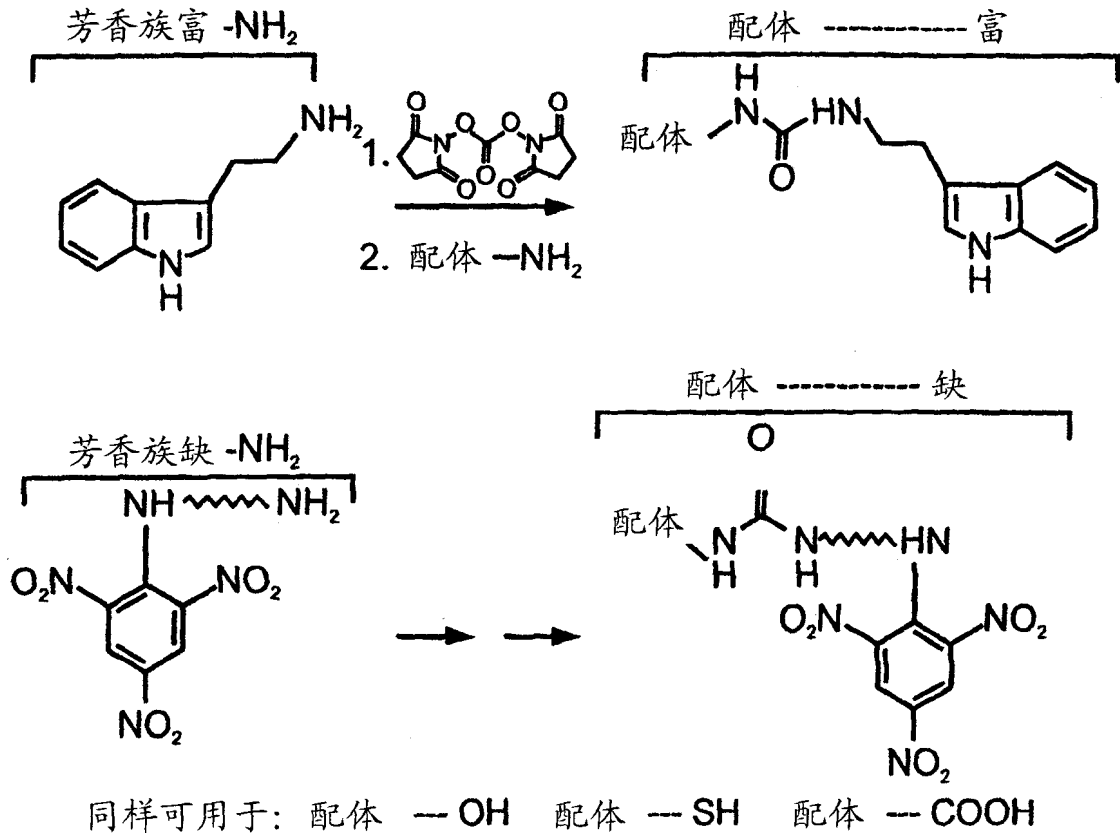


图 17

具有4个Trp残基的合成肽

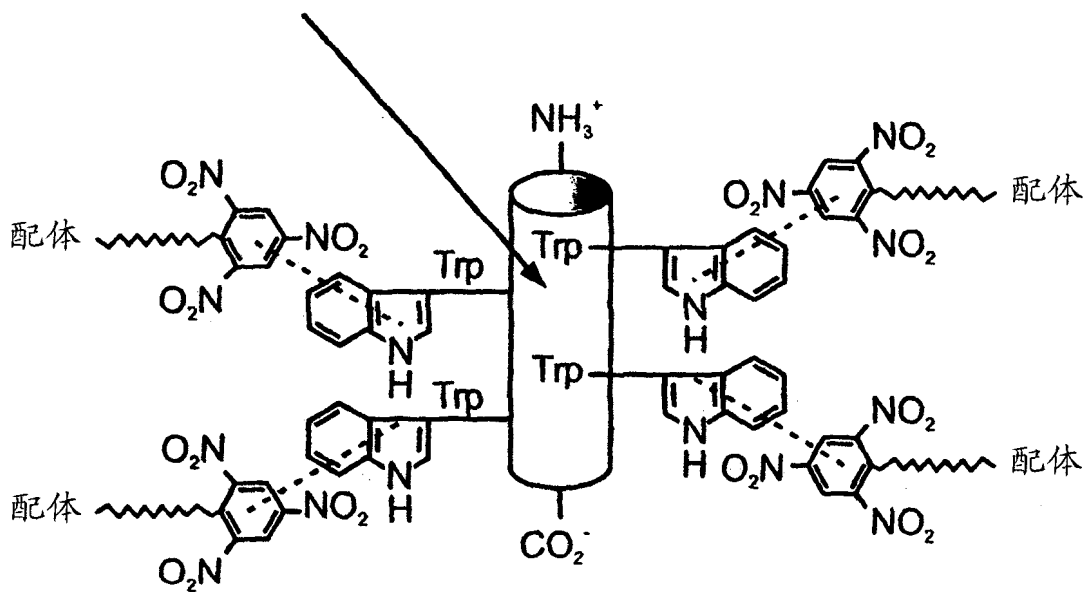


图 18

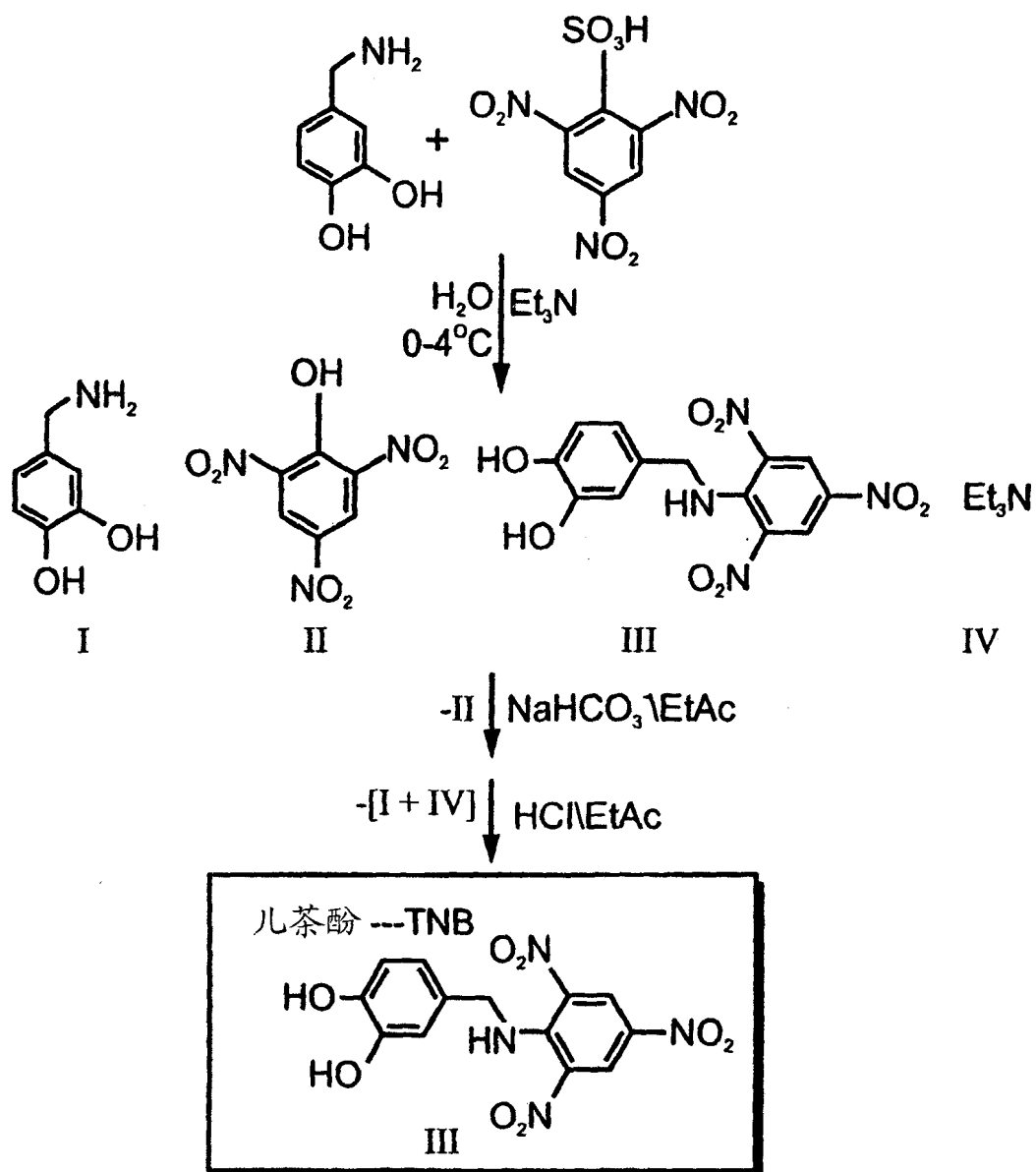


图 20

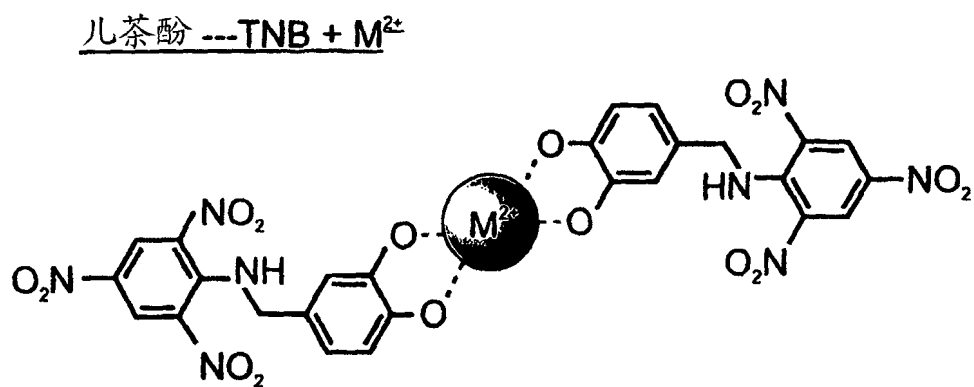


图 21a

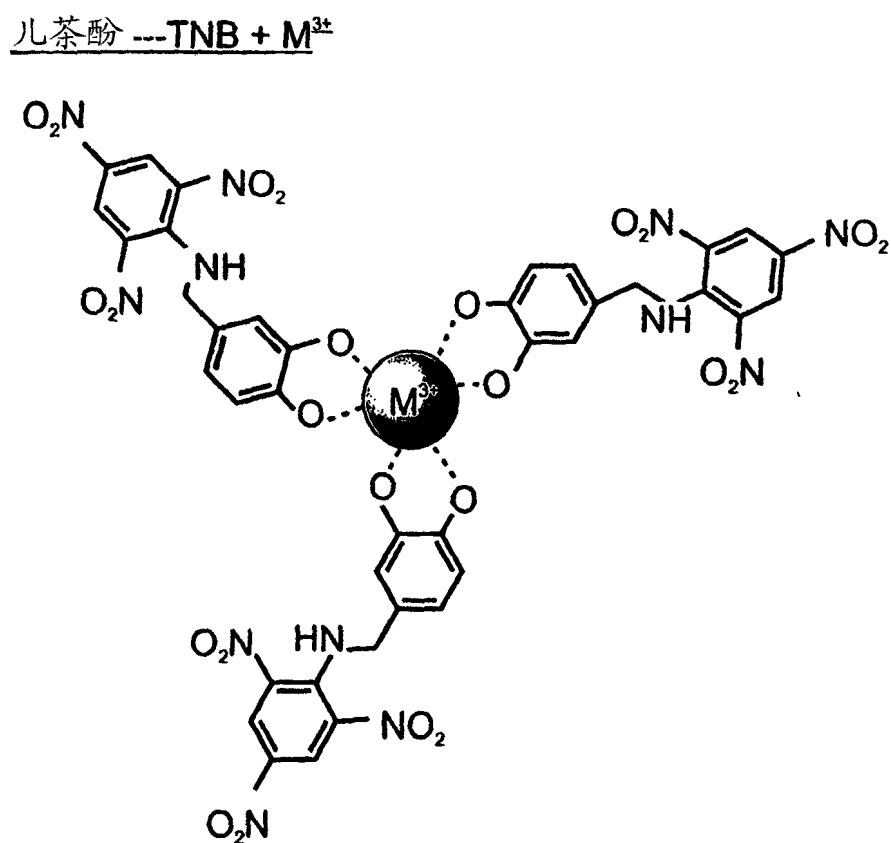


图 21b

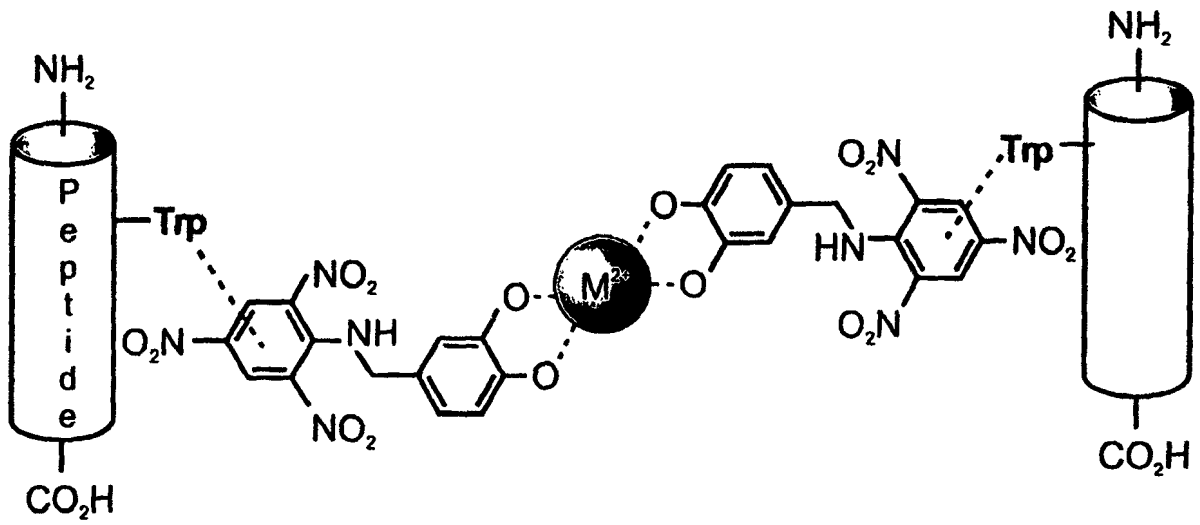


图 22a

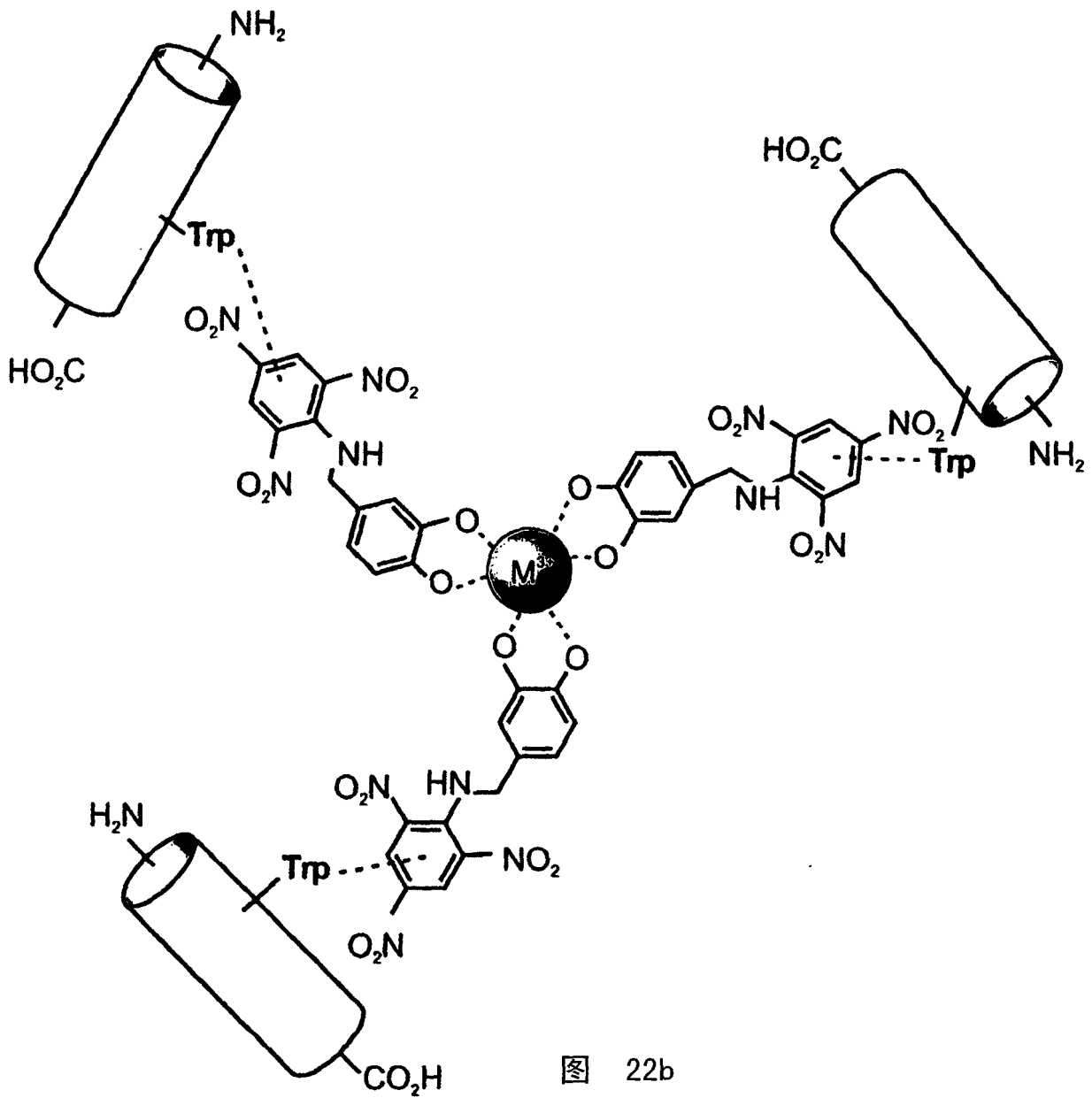


图 22b

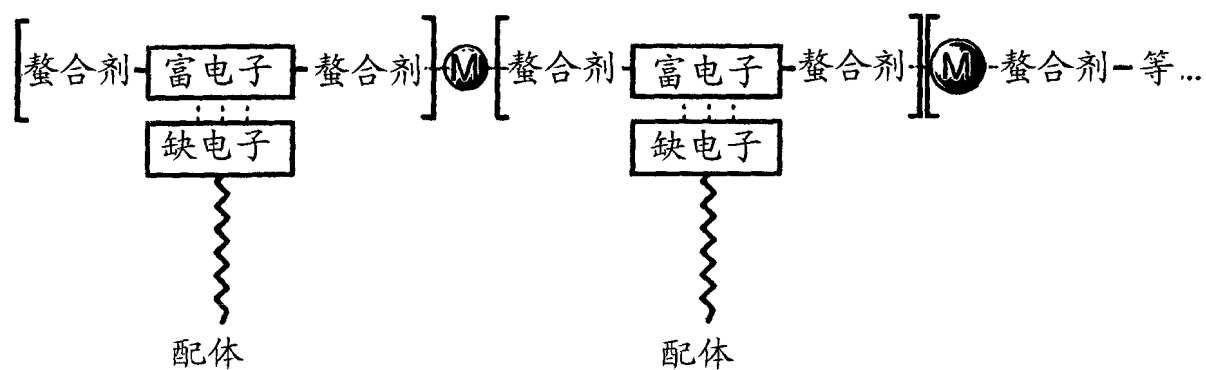
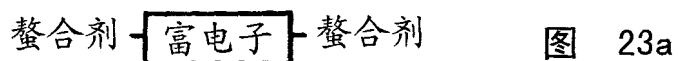


图 23b

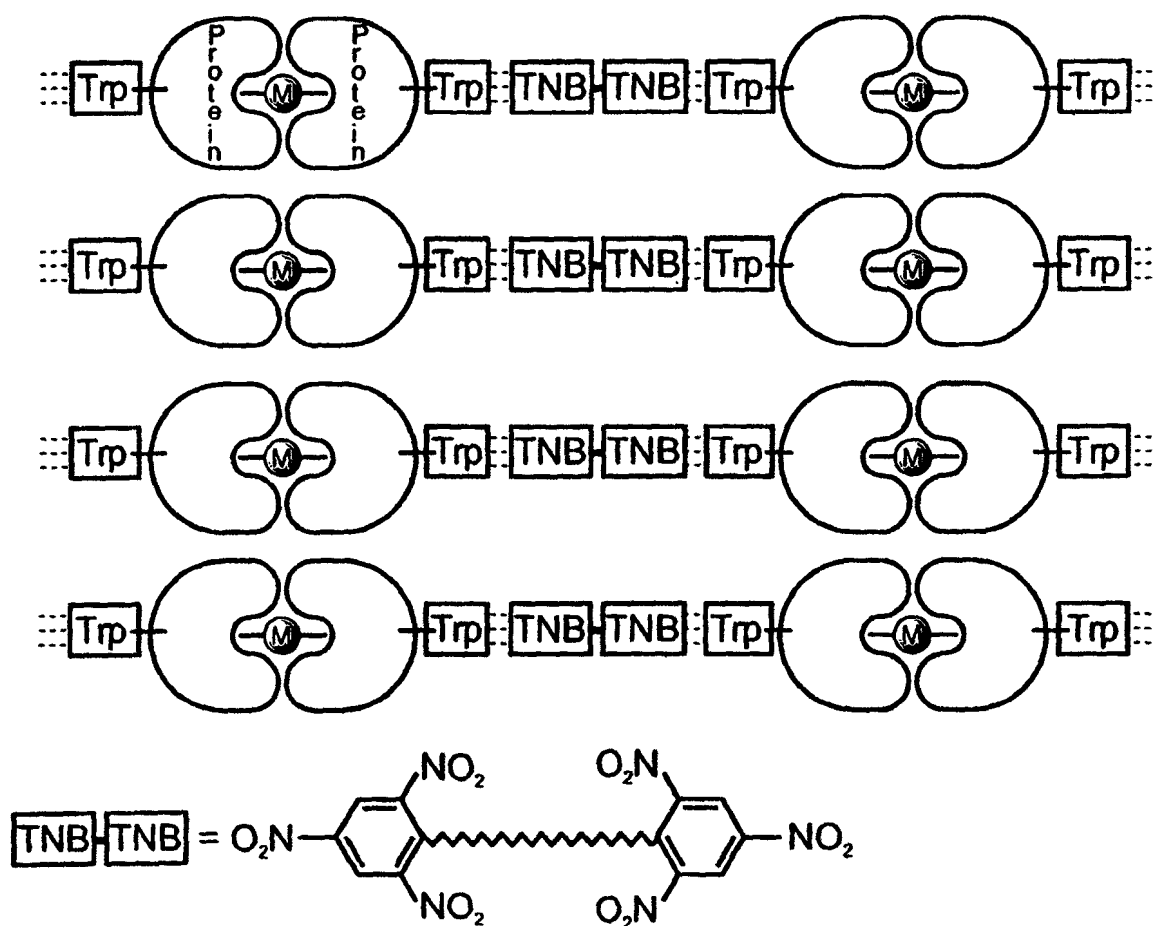
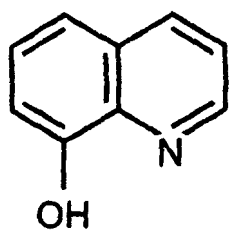
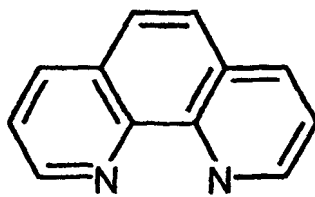


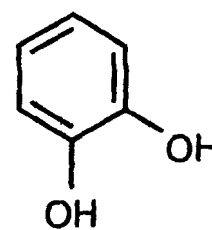
图 24

螯合剂的实例:

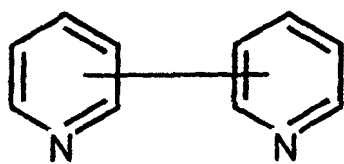
8-羟基喹啉



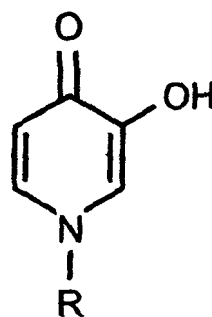
1,10-菲咯啉



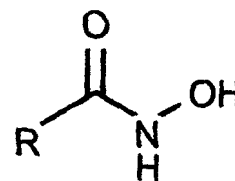
儿茶酚



联吡啶



吡啶-4-酮



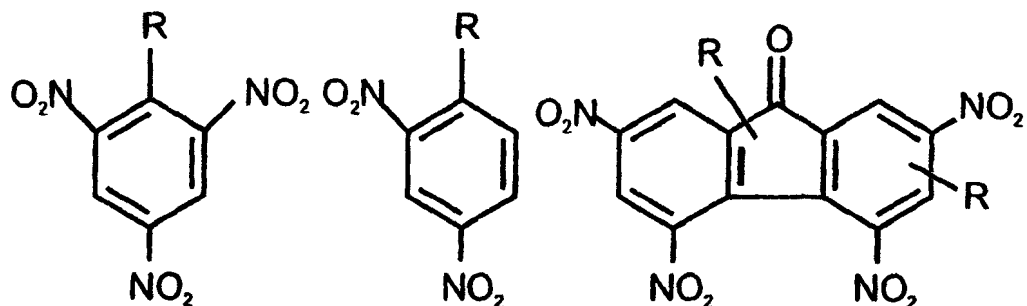
异羟肟酸

螯合剂的金属:

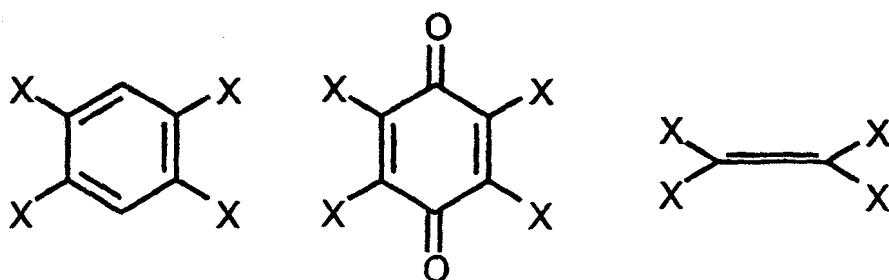
任何 M^{2+} 、 M^{3+} 、等 M^{4+}

例如： Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ru^{3+} 、 Al^{3+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、等 ...

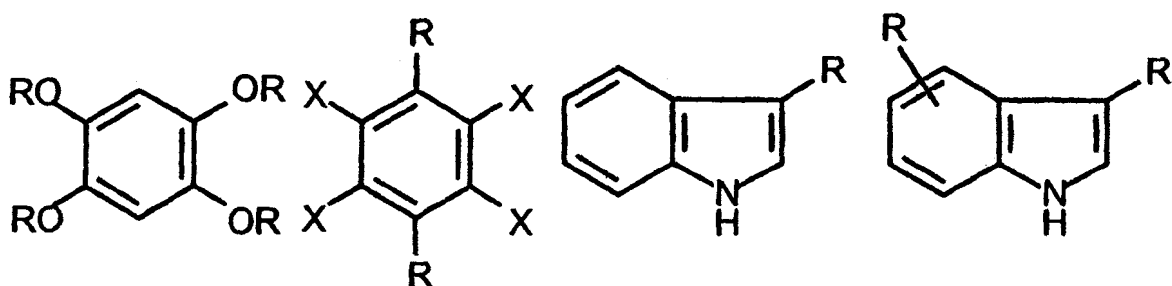
图 25

缺电子分子的实例:

R=NHR, NR₂, OR, SR, NHCOR, 等 ...



X=Cl, Br, I, F, CN, 或任何离去基团

富电子分子的实例:

X=Cl, Br, I, F, CN, 或任何离去基团

R=NHR, NR₂, OR, SR, NHCOR, 等 ...

图 26

| | | | |
|---------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于纯化和结晶目的分子的组合物 | | |
| 公开(公告)号 | CN101415721A | 公开(公告)日 | 2009-04-22 |
| 申请号 | CN200480026353.3 | 申请日 | 2004-07-22 |
| [标]发明人 | G 帕特科尼克 | | |
| 发明人 | G·帕特科尼克 | | |
| IPC分类号 | C07K1/14 C07H21/00 C07H1/06 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/53 A61K47/48 C07D C12N | | |
| CPC分类号 | A61K47/4813 C07H21/00 A61K47/555 | | |
| 代理人(译) | 刘玥 | | |
| 优先权 | 157086 2003-07-24 IL | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

提供一种物质组合物。该组合物包括至少一种能结合靶分子或目的细胞的配体，当与配位体离子或分子共-孵育时，所选的附着于至少一种配位部分的该至少一种配体能指引该物质组合物形成非-共价复合物。还提供了使用该组合物进行靶物质纯化、结晶和免疫的方法。

