

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03816492.2

C12Q 1/00

C12Q 1/68

C12Q 1/70

G01N 33/53

G01N 33/566

G01N 33/567

[43] 公开日 2005 年 9 月 21 日

[11] 公开号 CN 1671859A

[22] 申请日 2003.6.20 [21] 申请号 03816492.2

[30] 优先权

[32] 2002.7.11 [33] US [31] 60/395,038

[86] 国际申请 PCT/US2003/019584 2003.6.20

[87] 国际公布 WO2004/007757 英 2004.1.22

[85] 进入国家阶段日期 2005.1.11

[71] 申请人 美国红十字会

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 D·J·哈蒙德 J·T·拉思罗普

J·萨卡 L·乔治乌

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹雯 刘玥

权利要求书 4 页 说明书 19 页 序列表 4 页

[54] 发明名称 从复杂混合物中鉴定出单一活性实体的方法

[57] 摘要

一种为获得活性实体筛选混合物的方法，该方法包括：提供大量配体，其中每个配体连接至支持物以形成大量的配体-支持物复合体，在使至少一个实体与至少一个配体-支持物复合体结合的条件下，将配体-支持物复合体和含有大量实体的混合物接触，由此形成至少一个实体-配体-支持物复合体，将至少一个实体-配体-支持物复合体与未结合的实体分离，将至少一个实体-配体-支持物复合体的至少一个实体进行活性试验，检测活性，以及选择具有展示检测到的活性的实体的至少一个实体-配体-支持物复合体，由此从混合物中筛选活性实体；以及相关的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种为获得活性实体筛选混合物的方法，该方法包括：
- (i) 提供大量配体，其中每个配体连接至支持物以形成大量的配体-支持物复合物，
- 5 (ii) 在使至少一个实体与至少一个配体-支持物复合物结合的条件下，将配体-支持物复合物和含有大量实体的混合物接触，由此形成至少一个实体-配体-支持物复合物，
- (iii) 将至少一个实体-配体-支持物复合物与未结合的实体分离，
- 10 (iv) 测定至少一个分离的实体-配体-支持物复合物中的至少一个实体的活性，
- (v) 检测所述活性，以及
- (vi) 选择具有展示检测到的活性的实体的至少一个实体-配体-支持物复合物，
- 15 由此从混合物中筛选活性实体。
2. 权利要求 1 的方法，其中配体选自细胞、细菌、病毒、酵母、蛋白质、肽、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，上述物质的异构体，以及上述物质的任何组合。
- 20 3. 权利要求 2 的方法，其中配体是肽，且肽是通过组合方法产生的。
4. 权利要求 1 的方法，其中支持物包括的材料选自聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸脂、琼脂糖、聚丙烯酰胺、葡聚糖、纤维素、多糖、硝化纤维素、硅、苯乙烯、聚乙烯涂敷的聚苯乙烯、金属、聚二氟乙烯、尼龙，以及上述材料的任何组合。
- 25 5. 权利要求 1 的方法，其中混合物是生物流体，环境提取物，或包括化合物的组合物。
6. 权利要求 5 的方法，其中生物流体选自血液、血浆、混合血浆、血浆组分的中间物质、血清、细胞匀浆、组织匀浆、条件培养基、发酵液、脑脊液、尿液、唾液、乳汁、导管液、泪液、汗液、淋巴、精液、脐带液，以及羊水。
- 30 7. 权利要求 5 的方法，其中生物流体是包括抗体和抗-独特型抗

体的源自血浆的组分。

8. 权利要求 5 的方法，其中生物流体是从患病的宿主上获得的。

9. 权利要求 5 的方法，其中环境提取物选自土壤提取物，来自天然水体的提取物，来自冰、空气、灰、岩石，或永冻层的样本，以及来自建筑物的擦拭物。

10. 权利要求 5 的方法，其中含有化合物的组合物包括天然或合成的化合物。

11. 权利要求 1 的方法，其中实体选自蛋白质、肽、药物、抗体、细胞、合成分子、有机化合物、蛋白质复合物、细菌、病毒，以及真菌。

12. 权利要求 1 的方法，其中活性是生物学、物理、化学，或生化活性。

13. 权利要求 12 的方法，其中活性是酶活性或酶活性的抑制作用。

14. 权利要求 12 的方法，其中活性是对细胞、细胞群体、组织，或整个有机体的作用。

15. 权利要求 14 的方法，其中活性是对细胞或细胞群体的作用，所述作用选自细胞迁移、细胞增殖、细胞死亡、细胞分化、细胞周期进入、细胞周期停滞、细胞凋亡、细胞裂解、生长停滞、细胞存活、细胞内信号通路的改变、抗原表达、基因上调、基因下调，以及对试剂反应的表型改变。

16. 权利要求 14 的方法，其中细胞、细胞群体、组织，或整个有机体是患病的。

17. 权利要求 16 的方法，其中患病的细胞、细胞群体、组织，或整个有机体是患有癌症、糖尿病、自身免疫病、骨质疏松症，或肺病，或受到寄生虫、病毒，或细菌感染，受伤的、烧伤的、结疤的，或正在愈合的状态。

18. 权利要求 1 的方法，其中多个实体-配体-支持物复合体是在步骤 (ii) 中形成的。

19. 权利要求 1 的方法，其中在步骤 (iii) 之后和步骤 (iv) 之前进一步包括子集合体形成步骤，其中至少一个分离的实体-配体-支持物复合体和配体-支持物复合体分入几个集合体。

20. 权利要求 1 的方法，其进一步包括 (vii) 测定至少一个结合了

至少一个显示检测活性的实体的配体的化学特性。

21. 权利要求 20 的方法，其进一步包括

(viii) 提供步骤 (vii) 中鉴定的至少一个配体的多个拷贝，

(ix) 将每个拷贝连接至支持物，因此获得多个配体-支持物复合
5 体，

(x) 在使配体-支持物复合体与至少一个显示检测活性实体的多个
拷贝结合的条件下，将配体-支持物复合体和含有至少一个显示检测活
性的实体的多个拷贝的组合物接触，由此形成多个实体-配体-支持物
复合体，以及

10 (xi) 将实体从实体-配体-支持物复合体离解，因此从组合物回收
实体。

22. 权利要求 21 的方法，其中步骤 (x) 中的组合物与步骤 (ii) 中
的混合物相同。

23. 权利要求 21 的方法，其进一步包括

15 (xii) 检测显示检测活性的实体的化学或物理特性。

24. 权利要求 19 的方法，其在子集合体形成步骤之后和步骤 (iv)
之前，进一步包括洗脱步骤，其中多个实体-配体-支持物复合体的实
体从复合体离解，且随后将配体-支持物复合体从集合体中去除。

25 25. 权利要求 19 的方法，该方法在子集合体形成步骤之后和步骤
(iv) 之前，包括一个步骤，其中将半固体或黏性材料加入每个集合体
中，其中至少一个实体-配体-支持物复合体的实体从复合体离解并扩
散入材料中，由此形成实体的浓度梯度，其中实体的浓度随着从离解
出实体的配体-支持物复合体距离的增加而逐渐降低。

26. 一种为了获得活性实体筛选混合物的方法，该方法包括：

25 (i) 提供大量配体，其中每个配体连接至支持物上以形成大量配体
-支持物复合体，

(ii) 在使至少一个实体与至少一个配体-支持物复合体结合的条件
下，将配体-支持物复合体和含有大量实体的混合物接触，由此形成
至少一个实体-配体-支持物复合体，

30 (iii) 将至少一个实体-配体-支持物复合体和配体-支持物复合物
与未结合的实体分离，

(iv) 将至少一个实体-配体-支持物复合体和将配体-支持物复合

- 体分离入集合体，
- (v) 从至少一个分离的实体-配体-支持物复合体离解出至少一个实体，
- (vi) 从集合体中去除配体-支持物复合体或步骤(v)中的至少一个
- 5 离解的实体，
- (vii) 将步骤(v)中至少一个离解的实体进行活性试验，
- (viii) 检测活性，以及
- (ix) 选择至少一个展示检测到的活性的实体，
- 由此从混合物中筛选活性实体。
- 10 27. 一种为了获得活性实体筛选混合物的方法，该方法包括：
- (i) 提供大量配体，其中每个配体连接至支持物上以形成大量配体-支持物复合体，
- (ii) 在使至少一个实体与至少一个配体-支持物复合体结合的条件下，将配体-支持物复合体和含有大量实体的混合物接触，由此形成
- 15 至少一个实体-配体-支持物复合体，
- (iii) 将至少一个实体-配体-支持物复合体和配体-支持物复合体与未结合的实体分离，
- (iv) 将至少一个实体-配体-支持物复合体和配体-支持物复合体分离入集合体，
- 20 (v) 给每个集合体加入半固体或粘性材料，其中至少一个分离的实体-配体-支持物复合体的实体从复合物中离解并扩散入材料中，由此形成实体的浓度梯度，其中实体的浓度随着从离解出实体的配体-支持物复合体距离的增加而逐渐降低。
- (vi) 将步骤(v)中至少一个离解的实体进行活性试验，
- 25 (vii) 检测活性，以及
- (viii) 选择至少一个展示检测到的活性的实体，
- 由此从混合物中筛选活性实体。

从复杂混合物中鉴定出单一活性实体的方法

相关专利申请的交叉引用

- 5 该专利申请要求了 2002 年 7 月 11 日提交的美国临时专利申请 No. 60/395, 038 的权利。

发明领域

本发明涉及为获得活性实体的筛选混合物的方法。

发明背景

- 10 常规的蛋白质组学设法产生有机体全部蛋白质组的详尽特征图，以及通过该信息的分析来鉴定潜在的诊断和治疗实体。目前，用于分离蛋白质混合物的优势技术是二维凝胶电泳和多维液相色谱法，都和质谱分析法偶联。显示该方法能力的实例是分离和鉴定了酵母中 1,484 个蛋白质 (Washburn 等, *Nat. Biotechnol.*, 9 (3): 242-2471
- 15 (2001))。蛋白质分离和鉴定的定量方法是同位素编码的亲标记物 (ICAT), 由 Aebersold 和同事发展起来的 (Smolka 等, *Anal. Biochem.*, 297 (1): 25-312 (2001))。ICAT 包括应用同位素地正常或重试剂来对蛋白质进行位点特异性的共价标记, 以定量蛋白质表达的水平。还有另一个分离和鉴定蛋白质方法的实例是酵母双杂交筛选试验的整体形式, 由 Uetz 等 (Uetz 等, *Nature*, 403 (6770): 623-627 (2000))
- 20 和 Ito 等 (Ito 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (8): 4569-4574 (2001)) 发展起来的, 其鉴定了酿酒酵母 (*Saccharmyces cerevisiae*) 中超过 4,000 个蛋白质-蛋白质相互作用。尽管这些方法用于分离和鉴定蛋白质是作用强大的, 但是它们没有鉴定分级分离蛋白质的细胞功能。
- 25

- 在组合产生的固定在珠子上的配体库上已经分离了复杂蛋白质混合物。本领域公知的组合和综合化学技术可以产生上百万的配体的库, (Lam 等, *Nature*, 354: 82-84 (1991) 和国际 (PCT) 专利申请 W092/00091) 其中每个都具有结合分子的能力。例如, 线性六聚体配
- 30 体的库由 18 个天然氨基酸构成, 含有 34×10^6 个不同的结构。当氨基酸类似物和异构体也包括在内时, 潜在结构的数量实际上是无限的。基本上每个珠子在其表面具有单个结构的上百万的拷贝, 不同的珠子含

有不同的序列。此外，库中珠子的总数量可以是巨大的。

在将实体分子暴露于组合库之后，实体将通过亲和性的相互作用结合至库里的特异性配体。在平衡状态中，实体在支持物，例如承载亲和性配体的珠子上的浓度，将依赖于亲和常数与配体和实体的浓度。在公开的筛选方法中，当使用纯化的、放射性标记的初始实体时，结合的实体及其配体的检测可以是直接的（Mondorf 等，*J. Peptide Research*, 52: 526-536 (1998)）。其他方法包括通过对抗实体的抗体来检测（Buettner 等，*International Journal of Peptide & Protein Research*, 47: 70-83 (1996)；Furka 等，*International Journal Peptide Protein Research*, 37 (6): 487-493 (1991)；以及 Lam 等，(1991) 见上文）。可以使用固定在粘合剂上的珠子和扣除筛选方法结合来检测多实体的配体。这称作 QuASAR 方法（国际 (PCT) 专利申请 W001/40265）并用于检测结合病毒和朊病毒蛋白质的配体。

在使用基于珠子的库的相关但不同的方法中，实体蛋白质在其正常的生理环境中与结合至珠子的肽配体库一起温育。在分级分离后，将珠子固定并排列在低熔点琼脂糖薄凝胶上以生成配体的粗略“阵列”。将蛋白质结合性膜（硝化纤维素或 PVDF）放置在胶上，在各种条件下将蛋白质从珠子上洗脱，并通过溶剂扩散通过凝胶的单向毛细管转移将蛋白质捕获到与其在凝胶中相同的相应位置上（与 DNA 的 Southern 转移相似）。由于所有存在于初始混合物中的蛋白质存在于膜上，初始混合物是和固定在珠子上的配体结合的，膜自身可以剥离和再次被不同的已知蛋白质标记。

在所述的方法中，其中使用了固定在珠子上的组合产生的配体库，基于它们和配体的结合简单分离和鉴定了实体蛋白质，而不是基于实体蛋白质的生化或生物学功能。因此，本领域存在这样的需要：从复杂混合物中分离和鉴定蛋白质的方法，该方法基于所鉴定蛋白的化学的、物理的、生物学的，和/或生化功能而不仅仅基于它们结合库中配体的能力。

本发明提供了这样的方法。本发明的这个与其他目的和优点，以及其他的创造性特征，将从本文中提供的本发明的描述中表现出来。

发明概述

本发明提供了用于获得活性实体的筛选混合物的方法。在第一个

方法中包括(i)提供大量配体,其中每个配体连接至支持物以形成大量配体-支持物复合体,(ii)在使至少一个实体与至少一个配体-支持物复合体结合的条件下,将配体-支持物复合体和含有大量实体的混合物接触,由此形成至少一个实体-配体-支持物复合体,(iii)将至少一个
5 实体-配体-支持物复合体与未结合的实体分离,(iv)测定至少一个分离的实体-配体-支持物复合体中的至少一个实体的活性,(v)检测活性,以及(vi)选择至少一个具有实体的实体-配体-支持物复合体,其展示检测到的活性。

在第二个方法中包括(i)提供大量配体,其中每个配体连接至支持
10 物以形成大量配体-支持物复合体,(ii)在使至少一个实体与至少一个配体-支持物复合体结合的条件下,将配体-支持物复合体和含有大量实体的混合物接触,由此形成至少一个实体-配体-支持物复合体,(iii)将至少一个实体-配体-支持物复合体与未结合的实体分离,(iv)将至少一个实体-配体-支持物复合体和将配体-支持物复合体分离入
15 集合体,(v)从至少一个分离的实体-配体-支持物复合体离解出至少一个实体,(vi)从集合体中移除配体-支持物复合体或步骤(v)中的至少一个离解的实体,(vii)将步骤(v)中至少一个离解的实体进行活性试验,(viii)检测活性,以及(ix)选择至少一个展示检测到的活性的实体。

在第三个方法中包括(i)提供大量配体,其中每个配体连接至支持
20 物以形成大量配体-支持物复合体,(ii)在使至少一个实体与至少一个配体-支持物复合体结合的条件下,将配体-支持物复合体和含有大量实体的混合物接触,由此形成至少一个实体-配体-支持物复合体,(iii)将至少一个实体-配体-支持物复合体与未结合的实体分离,(iv)
25 将至少一个实体-配体-支持物复合体和将配体-支持物复合体分离入集合体,(v)给每个集合体中加入半固体或粘性材料,其中至少一个分离实体-配体-支持物复合体的实体从复合物中离解出来,并扩散进材料中,由此形成实体的浓度梯度,其中实体的浓度随着从离解出实体的配体-支持物复合体距离的增加而逐渐降低,(vi)将步骤(v)中至少
30 一个分离的实体进行活性试验,(vii)检测活性,以及(viii)选择至少一个展示检测到的活性的实体。

发明详述

本发明提供了筛选混合物用于获得活性实体的方法。在第一个方法中包括(i)提供大量配体,其中每个配体连接至支持物以形成大量配体-支持物复合体,(ii)在使至少一个实体与至少一个配体-支持物复合体结合的条件下,将配体-支持物复合体和含有大量实体的混合物接触,由此形成至少一个实体-配体-支持物复合体,(iii)将至少一个实体-配体-支持物复合体与未结合的实体分离,(iv)测定至少一个分离的实体-配体-支持物复合体中的至少一个实体的活性,(v)检测活性,以及(vi)选择至少一个具有实体的实体-配体-支持物复合体,其展示检测到的活性。

10 此处所用的术语“混合物”指任何含有多于一种实体的集合,其中此处所用的术语“实体”指任何生物学的、化学的,或生化实体或目标物,如化合物,分子,病毒,或细胞。优选地,混合物是不同实体的集合,每个具有不同的化学特性,例如,分子式、化学结构、核苷酸序列或氨基酸序列,或每个具有不同的物理特性,例如,光谱信号或构象。更优选地,混合物是含有多种不同实体的集合。本领域普通技术人员理解的是混合物可以含有各具有不同化学或物理特性的实体的一个或多个拷贝。

组成混合物的实体可以从天然或合成的产品中分离,以及可以是天然的有机物质或无机物质(例如,合成的无机化合物或合成的有机化合物)。例如,实体可以是药物或药物候选物(如小分子药物候选物)、肥料成分、杀虫剂成分或其衍生物、类似物,或对映体。此外,实体对于任何原核生物或真核生物可以是内源或外源的,例如,细菌、真菌、酵母、植物或哺乳动物。适用于本发明的实体包括,但不限制于,细胞(例如干细胞或培养中的细胞)、蛋白质、肽、药物、抗体、合成分子、有机化合物、蛋白质复合物(例如凝血因子XIII和血纤蛋白原或凝血因子VIII和Von Willebrand因子)、细菌、病毒、真菌、酵母、朊病毒、氨基酸、核酸、碳水化合物、脂类,上述物质的任何同种型,以及上述物质的任何组合。优选地,实体是蛋白质。合适的蛋白质实体包括,例如,受体、抗体、免疫原、酶(例如蛋白酶),以及酶底物。更优选地,蛋白质是源自血浆的蛋白质。最优选地,源自血浆的蛋白质是免疫球蛋白,例如,IgG、IgM、IgA、IgE。免疫球蛋白可以来自患病状态的有机体,(以及任选地在健康被试者血浆中

未发现的) 或作为制剂例如药物施用的结果而生产。或者, 优选的实体是细胞。更优选地, 细胞是干细胞。

5 本发明方法的实体可以从任何来源获得, 即, 含有实体的混合物可以是任何复合混合物, 如土壤、空气、水、食物的提取物, 评估环境污染的棉拭, 中间或末期化学反应混合物, 等等。含有实体的混合物可以是化学或合成混合物, 以及可以在压力、温度等等极端条件下存在于组合库中和/或存在于有机溶剂中。优选地, 混合物是生物流体、环境提取物, 或含有化合物的组合物。

10 “生物流体”意味着得自原核生物或真核生物有机体的任何水溶液。生物流体可以直接从原核生物或真核生物有机体获得, 如血液、淋巴、泪液、唾液、汗液, 以及尿液。或者, 生物流体可以通过培养有机体的细胞获得, 如发酵液和细胞培养基。在本发明方法中适用的生物流体包括, 但不限制于, 血液、血浆、混合血浆、血浆组分的中间物质、血清、细胞匀浆、组织匀浆、条件培养基、发酵液、脑脊液、15 尿液、唾液、乳汁、导管液、泪液、汗液、淋巴、精液、脐带液, 以及羊水。优选地, 生物流体是含有抗体和抗-独特型抗体的源自血浆的级分。此处所用的“抗-独特型抗体”指具有对于另一个抗体的抗原决定区有特异性的表位的抗体。以及优选生物流体是从受疾病折磨的宿主获得的。此处所用的术语“宿主”指任何真核生物或原核生物, 20 例如, 细菌、病毒、酵母、真菌、鸟类、爬行动物, 以及哺乳动物。折磨宿主的疾病, 可以是任何疾病包括任何状况、病症、感染, 等等。例如, 疾病可以是癌症、糖尿病、自身免疫病、骨质疏松症、伤口愈合、肝脏再生, 或肺病。或者, 疾病可以是寄生虫、病毒, 或细菌感染。

25 此处所用的术语“环境提取物”指从环境取得的任何样品。环境可以是天然环境, 如天然产生的水体。或者, 环境可以是人造环境, 如建筑。在这方面, 环境提取物可以是土壤, 土壤提取物, 来自天然产生的水体的提取物, 冰、空气、灰、岩石、或永冻层的样本, 或来自建筑的棉拭。天然产生的水体可以是, 例如, 海洋、湖泊、海、河流、30 木本沼泽、池塘、三角洲, 或海湾。环境提取物可以替换的是来自水处理中心的提取物。建筑可以是任何人造的建筑。优选地, 建筑至少受到一种或多种毒剂的污染, 如萨林、索曼、神经毒剂、爆炸化

学物、杀虫剂、病原体、VX，以及发泡剂。

包括化合物的组合物可以包括天然或合成的化合物。例如，组合物可以是反应产物的化学或合成混合物。或者，组合物可以在气压、温度等等的极端条件下存在于组合库中和/或存在于有机溶剂中。

5 此处所用的术语“配体”指任何结合实体的生物学、化学，或生化试剂，如化合物、分子，或细胞。配体可以从天然或合成制得的材料中分离。配体对于原核生物或真核生物可以是内源的或外源的，例如，细菌、真菌、酵母、植物，或哺乳动物。用于本发明方法的合适配体包括，但不限制于，细胞、细菌、病毒、酵母、蛋白质、肽、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、抗体制剂（如，抗体片段、化学修饰的抗体，等等）、糖类，上述物质的任何同种型，以及上述物质的任何组合。

10 有机分子包括，例如，一般用作药物治疗试剂的合成有机化合物。通过组合合成方法，或，更具体地，通过设计来获得特异性分子的战略性合成来任选地大量生产这样的分子。同样地，有机分子还包括天然产物和类似物，从它们的天然环境提取或经设计合成得到。此处所用的术语“有机”并不限制于仅仅含有碳和氢的分子，而是用于包括生物来源的大分子的更宽范围。

20 优选地，配体是肽。此处所用的术语“肽”指包括至少一个肽键的实体，以及可以包括D和/或L氨基酸。理想地，配体是基本上由约2至约10个氨基酸（例如，约2，3，4，5，6，7，8，9或10个氨基酸）组成的肽。理想地，肽配体是通过组合方法产生的，即，通常用于生产组合库的技术，例如，本领域公知的分裂、偶联、重组方法或其他方法（参见，如，Furka等，*Int. J. Peptide Protein Res.*, 37:487-493 (1991); Lam等，*Nature*, 354:82-84 (1991); 国际专利申请 W092/00091; 以及美国专利 5,010,175, 5,133,866, 和 5,498,538)。肽库的表达也在 Devlin 等，*Science*, 249:404-406 (1990)中有描述。在肽库中，随着进行的偶联反应数量，肽的大小，以及所用的性质不同的氨基酸的数量的增加，不同序列的离散肽数量显著地增加。例如，19个氨基酸随机合成五肽产物就高达2,476,099(19⁵)个各自序列不同的肽(Lam等,见上文)。组合方法使配体库直接在支持物上产生。一般地，配体在支持物介质的颗粒上合

成以致在每个颗粒（如珠子）上合成单个配体的多个拷贝，尽管这在本发明的内容中不需要。

在本发明的方法中，每个配体连至支持物，因此获得配体-支持物复合体的构造。此处所用的术语“支持物”指任何支持基质，如那些本领域公知的可以用于固定配体的固体支持物。合适的支持物包括，但不限制于，膜、滤纸、筛网，或含有纤维素、丙烯酸类树脂、聚丙烯酰胺或多羟基甲基丙烯酸聚合物、聚苯乙烯、葡聚糖、琼脂糖、多糖、亲水的乙烯基聚合物，上述任何的聚合衍生物，以及上述任何的组合的颗粒，以及可以直接连接配体或在其上配体可以合成的任何有孔的或无孔基质。优选地，支持物是惰性的以致和实体和/或固定的配体的化学反应最小化。在这方面，支持物理想地包括聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸脂、琼脂糖、聚丙烯酰胺、葡聚糖、纤维素、多糖、硝化纤维素、硅、苯乙烯、金属、聚乙烯涂敷的聚苯乙烯、聚二氟乙烯、尼龙，或上述任何的组合。尤其优选的支持物材料是聚乙烯涂敷的聚苯乙烯和聚甲基丙烯酸脂。各种树脂是可商业购得的，以及优选地，支持物是树脂珠子，如色谱分析的树脂珠子。

许多展示可能配体的固体支持物是可商业购得的。或者，本发明方法的配体可以使用标准方法间接附着在或直接固定在支持物上（参见，例如，Harlow 和 Lane, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988); Biancala 等, *Letters in Peptide Science* 7(291):297 (2000); MacBeath 等, *Science* 289:1760-1763 (2000); Cass 等编辑, *Proceedings of the Thirteenth American Peptide Symposium*, Leiden, Escom, 975-979 (1994); 美国专利 5,576,220; Cook 等, *Tetrahedron Letters* 35:6777-6780 (1994); 以及 Fodor 等, *Science* 251(4995):767-773 (1991)）。一实施方案中，配体在支持物表面合成，在制备肽库中特别有用。配体可以化学地结合至支持物或可以通过下述衔接物结合，如 β 丙氨酸、甘氨酸、含有甘氨酸-丝氨酸的聚合物、分子式 $-(CH_2)_n-$ 的短链烃、聚乙二醇、 ϵ 氨基己酸、以及包括 $-O(CH_2)_n$ 的衔接物连接，其中 n 为 1-30。如果需要，配体可以通过一种或数种不同的可裂的衔接物连接，例如，对光不稳定或对酸不稳定部分，使配体群体选择性分离用于分析。配体可以用作，例如，用于蛋白质和对映体分离

(例如, 浓缩、分离、检测、表征、定量, 或鉴定样品中的实体) 的亲水性纯化介质, 用作诊断治疗工具、催化剂和化学反应增强剂, 以及用作蛋白质的选择性稳定剂。

一旦配体-支持物复合体形成, 就在使至少一个实体结合至少一个配体-支持物复合体的条件下将其和含有大量实体的混合物接触, 由此形成至少一个实体-配体-支持物复合体。这样的条件, 如本领域普通技术人员公知的, 依赖于混合物(实体)和配体本身, 以及其他因素, 如 pH、温度、接触时间、盐浓度, 等等。使至少一个实体结合至少一个配体-支持物复合体的合适条件的确定是在普通技术范围内的。在本发明的优选实施方案中, 形成多个实体-配体-支持物复合体。

在至少一个实体-配体-支持物复合体形成后, 至少一个实体-配体-支持物复合体和配体-支持物复合体与未结合的实体分离。此处所用的术语“未结合的实体”指未结合或松散地结合任何一个配体-支持物复合体的混合物的实体。将至少一个实体-配体-支持物复合体与未结合的实体分离的方法是本领域公知的, 包括例如, 离心、连续稀释、过滤、透析, 以及在色谱分析的形式下洗涤。

本发明的方法可以任选地包括子集合体形成(sub-pooling)步骤, 其中至少一个实体-配体-支持物复合体和配体-支持物复合体分离成数个集合体或亚群体(sub-population)。优选地, 子集合体形成步骤达到在每个集合体中平均约 10-500 个实体-配体-支持物复合体和配体-支持物复合体。更优选地, 每个集合体中的复合体平均数量是 20-100 个。最期望地, 将复合体子集合体形成, 以致每个集合体中存在 50 个复合体。

进一步, 本发明方法可以任选地在子集合体形成步骤之后包括洗脱步骤, 其中多个实体-配体-支持物复合体的实体从复合体离解, 且随后将配体-支持物复合体从集合体中移除。

在这方面, 本发明提供用于获得活性实体的筛选混合物的第二个方法。该方法包括(i)提供大量配体, 其中每个配体连接至支持物以形成大量配体-支持物复合体, (ii)在使至少一个实体与至少一个配体-支持物复合体结合的条件下, 将配体-支持物复合体和含有大量实体的混合物接触, 由此形成至少一个实体-配体-支持物复合体, (iii)将至少一个实体-配体-支持物复合体与未结合的实体分离, (iv)将至少一

个实体-配体-支持物复合体和将配体-支持物复合体分离入集合体, (v) 从至少一个分离的实体-配体-支持物复合体离解出至少一个实体, (vi) 从集合体中移除配体-支持物复合体或步骤(v)中的至少一个离解的实体, (vii) 将步骤(v)中至少一个离解的实体进行活性试验, (viii) 检测活性, 以及(ix) 选择至少一个展示检测到的活性的实体。

本发明方法的一个有益效果是检测从配体-支持物复合体离解而成为未结合状态的活性的实体。因此, 其不受配体和/或支持物的抑制且和活性试验中所用的酶底物或细胞的相互作用和对后者施加作用是自由的。本领域普通技术人员公知实体从配体-支持物复合体的离解程度不需要100%或完全离解, 因为有可能仅仅部分实体从配体-支持物复合体离解就可以检测其活性。

或者, 方法可以任选地进一步在子集合体形成步骤后包括一个步骤, 其中将半固体或粘性物质加入每个集合体中, 其中至少一个实体-配体-支持物复合体的实体从复合体离解并扩散至材料中, 由此形成实体的浓度梯度, 其中实体的浓度随着从离解出实体的配体-支持物复合体距离的增加而逐渐降低。适用于本发明的半固体材料包括, 例如, 琼脂糖、明胶、甘油、聚乙二醇、丙烯酰胺, 以及血纤蛋白密封胶。优选地, 半固体材料是0.5%w/v的琼脂糖。

在这方面, 本发明提供筛选混合物以获得活性实体的第三个方法。该方法包括(i) 提供大量配体, 其中每个配体连接至支持物以形成大量配体-支持物复合体, (ii) 在使至少一个实体与至少一个配体-支持物复合体结合的条件下, 将配体-支持物复合体和含有大量实体的混合物接触, 由此形成至少一个实体-配体-支持物复合体, (iii) 将至少一个实体-配体-支持物复合体与未结合的实体分离, (iv) 将至少一个实体-配体-支持物复合体和将配体-支持物复合体分离入集合体, (v) 给每个集合体中加入半固体或粘性材料, 其中至少一个分离实体-配体-支持物复合体的实体从复合物中离解出来, 并扩散进材料中, 由此形成实体的浓度梯度, 其中实体的浓度随着从离解出实体的配体-支持物复合体距离的增加而逐渐降低, (vi) 将步骤(v)中至少一个分离的实体进行活性试验, (vii) 检测活性, 以及(viii) 选择至少一个展示检测到的活性的实体。

该方法提供的优势还包括实体是处于游离的、未结合的状态, 且

在活性试验中与所用的酶底物或细胞的相互作用或对后者的作用不受配体-支持物复合体抑制。此外，该方法提供了能够以剂量依赖性的方式来检测实体活性的优势。

在本发明的方法中，通过对至少一个实体-配体-支持物复合体进行活性试验来筛选混合物以获得活性实体。此处所用的术语“活性实体”指任何显示试验活性或偶然发现结果的混合物的实体。在这方面，所给混合物的大多数实体具有作为活性实体的可能，这依赖于方法中试验的特别活性。为了此处的目的，活性实体在结合配体-支持物复合体的意义上也是有活性的。试验活性可以是任何生物学的、物理的、化学的，或生化活性，前提是活性产生可检测的信号，如底物的酶修饰。可以使用化学活性，如，与实体的化学组成直接相关的活性。换句话说，可以通过特异性化学亚单位或部分或化学结构的存在来鉴定实体。检测方法中有用的物理特性包括，例如，光谱信号，其可以分别通过荧光或质谱分析来检测。检测的方法不需要单独检测实体的活性，但是可以选择地鉴定多于一个实体的活性或实体复合体的活性，例如，和其它生物实体如辅因子或酶复合的实体。

优选地，活性可以是酶活性或酶活性的抑制作用。例如，本发明的方法可以包括进行酶活性试验来在生物学活性基础上表征实体。在通过实体对使底物酶修饰以形成产物的条件下，酶底物可以应用至至少一个实体-配体-支持物复合体。然后检测产物，因此鉴定实体的存在。或者，为了鉴定抑制所给酶活性的活性实体可以检测产物形成的缺失。酶活性试验进一步，例如，Haugland，见上文中。

或者活性可以是对细胞、细胞群体、组织，或整个有机体的作用。在这些实例中的任一个中，进行基于细胞的试验，其中至少一个实体-配体-支持物复合体和细胞接触，实体在该细胞上施加一些可观察到的生物作用。纯粹地通过例证的方式，优选实体可以是抗菌剂。本发明方法的配体结合抗菌剂的可能活性位点，因此从混合物（例如，潜在的治疗剂库）中分离抗菌实体。细菌菌苔应用于实体，且通过杀菌活性区域来检测抗菌实体。当活性是对细胞或细胞群体的作用时，作用可以是，例如，细胞迁移、细胞增殖、细胞死亡、细胞分化、细胞周期进入、细胞周期停滞、细胞凋亡、细胞裂解、生长停滞、细胞存活、细胞内信号通路的改变、抗原表达、基因上调、基因下调，或对试剂

反应表型的改变。

在本发明的优选实施方案中，细胞、细胞群体、组织或整个有机体是患病的或来自于患病源。患病的细胞群体、组织或整个有机体可以是任何疾病、病症、感染，等等引起疾病的。优选地，疾病是癌症、糖尿病、自身免疫病、骨质疏松症，或肺病。或者，患病的细胞群体、组织，或整个有机体是受到寄生虫、病毒，或细菌的感染。患病的细胞群体、组织，或整个有机体也可以是受伤的、烧伤的、结疤的，或正在愈合的状态的。患病的细胞也可以是原生动物、线虫，枯氏锥虫 (*T. cruzi*)，以及利什曼原虫。

10 用于检测试验活性的精确技术依赖于活性本身。例如，如果活性是细胞生长，那么活性的检测可以简单地包括使用血细胞计数器、目测，或放射性同位素吸收来细胞计数。如果活性是颜色标记产物的产生，那么检测可以包括通过紫外可见光谱学 (UV-VIS) 来检测颜色。来决定合适的技术用于检测试验活性对本领域普通技术人员来说是公知的。

15 一旦检测到活性，则选择至少一个具有显示检测活性的实体的实体-配体-支持物复合体。此处所用的术语“选择”以及从其中衍生的词指实体-配体-支持物复合体的鉴定，或其所在的集合体的鉴定。在后一种情况中，试验可以仅仅用选择的集合体的成分进行重复，直至选出了单一的实体-配体-支持物复合体。

20 本发明方法的优势是基于生物学、物理、生化，或化学活性鉴定和/或表征活性实体的能力，而无需实体分子特性的现有知识。因此，实体可以展示生物学活性而不需要在实施本发明方法之前经过处理（例如，热失活）。也不需要去除量较大的蛋白质如白蛋白或活性实体如免疫球蛋白。同样地，在试验介质中可以提高或减弱实体影响更特异性细胞功能（例如，特别蛋白质或其他细胞成分的产生）的能力，因此提供了实体有价值的特征。进一步，实体可以是证明了可以抵抗细胞毒性试剂的细胞。因此，本发明提供了用于鉴定有特异性生物学活性的新活性实体或未知活性实体（即，在实施本发明方法之前未被鉴定的蛋白质）的方法。本发明也提供了已知蛋白质的新的或未

30 知的生物活性的鉴定。

可以完成活性实体鉴定的方法中的方式可以包括鉴定结合显示试

5 验活性的实体的配体的化学特性。鉴定配体化学特性的合适方法是本领域公知的，包括，例如，质谱分析、Edman降解测序，等等。一旦鉴定出配体对于特定的实体具有特异性，那些配体可以重新合成并使用例如色谱分离以用于捕获、分离、检测，和/或表征实体。为此，本发明方法进一步包括提供鉴定的配体的多个拷贝，并将鉴定的配体的每个拷贝连接至支持物，因此获得多个配体-支持物复合体。在使配体-支持物复合体可以结合实体多个拷贝的条件下，将多个配体-支持物复合体和含有实体多个拷贝的组合物接触，由此形成多个实体-配体-支持物复合体。将实体从实体-配体-支持物复合体离解，以及如果需要，接受另一轮的筛选和/或表征。用于分离和纯化实体的含有实体多个拷贝的组合物可以和初始用于鉴定作为活性实体的实体的混合物相同。例如，如果血浆是和配体-支持物复合体初始接触的混合物，那么相同来源的血浆在随后的步骤中可以用于分离和纯化实体。

15 在活性实体分离和纯化后，方法可以进一步包括检测实体化学或物理特性或至少进一步表征实体的步骤，如通过进行实体的质谱分析。此处所用的术语“表征”以及此后相关的词语指任何有区别的实体性质或性状的鉴定，而不需要说明所述实体的精确的化学特性，例如，分子式、化学结构、构象、核苷酸序列或氨基酸序列。

20 此外，鉴定的配体也可用于诊断试验来固定或选择性地转移实体，并用作为假的或合成受体（参见，例如，Still, *Acc. Chem. Res.*, 29:155-163(1996)）。此外，配体自身可以用作治疗试剂、催化剂，等等。

实施例

25 下列的实施例将进一步说明本发明，但是，当然，不应解释为以任何形式限制其范围。

为了方便，下列缩写是在此实施例中所使用的：DEPFMU，6,8-二氟-4-methylumbelliferyl；ICAT，同位素编码的亲标记物；UV-VIS，紫外可见；SAP，链霉抗生物素-碱性磷酸酶；FITC，异硫氰酸荧光素；ATCC，美国模式培养物保藏所；IL-2，白细胞介素-2；PNPP，对硝基磷酸苯酯；PPV，猪细小病毒（porcine parvovirus）；PVDF，聚偏二氟乙烯；AP，碱性磷酸酶；以及PI，碘化丙锭。

实施例 1

该实施例证明了利用本发明方法为获得细胞毒性因子筛选混合物。

在分级分离到珠子上以后检测了细胞毒性因子诱导细胞死亡的能力。在该试验中，使结合抗小鼠 TNF- α 抗体 (pharminggen) 的珠子分纯化的小鼠 TNF- α (Pharminggen, San Diego, CA)。对照珠子没有与 TNF- α 温育。此外，对照包括向培养基中加入溶解的 TNF- α 并使不具抗体的珠子与 TNF- α 温育来确保没有由于不良的洗涤而导致的未结合 TNF- α 的遗留。也测量了普通珠子的作用。将指定数量的细胞放入 24 孔平板的各孔中，大约 100 个珠子加入有 WEHI164 细胞 (ATCC) 的每个孔中。与珠子温育 48 小时以后，通过血细胞计数器计数和锥虫蓝排除来观察显示的细胞死亡%以显示死亡细胞数目 (表 1)。

表 1 TNF- α 珠子的细胞毒性试验

	起始细胞数量	死亡%
溶解的 TNF- α	100,000	98
单独的抗- TNF α 珠子	100,000	0.5
假温育	100,000	0.3
普通珠子	100,000	4.1
	50,000	0.1
	25,000	7.7
偶联 TNF- α 的珠子	100,000	9.1
	50,000	29.4
	25,000	12.5

该实施例证明了从这些高亲和性配体洗脱了足够量的蛋白质，并导致了在易感细胞培养物中可检测的细胞死亡。这些数据支持以下论点：在对于生物功能带有限定终点的多重试验中可以检测到活性因子。

实施例 2

该实施例证明了利用本发明方法为获得支持细胞生长的因子筛选细胞因子掺入的血浆。

该试验中所用的细胞是 NK-92 细胞 (从 ATCC 获得，

Manassas, VA)。NK-92 细胞系是人细胞毒性 T-细胞系，其为了生长需要外源的白细胞介素-2 (IL-2)。含有血清或健康人血浆的普通细胞培养基不具有支持 NK-92 生长的 IL-2。因此，NK-92 细胞通常维持在补充了 5ng/ml 重组小鼠 IL-2 的培养基中。

5 作为带有 IL-2 特异性配体珠子的模型，300 μ g 大鼠抗人 IL-2 抗体 (PharMingen, San Diego, CA) 交联上 400 μ l G 蛋白质琼脂糖珠子 (Pierce, Rockford, IL)。使珠子分其中掺入了天然的、分泌的细胞因子混合物的血浆混合物温育过夜。混合物含有数种细胞因子且源自于人单核细胞和白细胞，这些细胞已经用植物凝集素和环丙沙星
10 诱导来分泌细胞因子。随后将来自这些诱导的细胞培养基集合。在掺料血浆中 IL-2 的浓度约为 4ng/ml。珠子用 ~50 柱体积的 PBS + 0.1% Tween-20 洗涤 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)。还包括与 4 ng/ml 纯重组人 IL-2 温育的珠子。对照是带有抗体的珠，没有与 IL-2 温育的作为负对照，培养物中加入了溶解的 IL-2 的作为正对照。

15 以每个孔 1×10^5 个细胞将 NK-92 细胞放入 24 孔平板中，使其在没有加入 IL-2 的培养基中生长 24 小时来耗尽内在的 IL-2 储存。每个孔中加入大约 100 个珠子。培养物生长 96 小时。从每个培养物中收集细胞并通过在血细胞计数器中计数活细胞来测定细胞数量，通过锥虫蓝排除法来排除死细胞。在从配体向细胞提供 IL-2 的孔中，其中 IL-2
20 是重组蛋白质或从分泌的混合物纯化的，细胞数量相对于负对照显示出 8 至 12 倍增加。因此，这些数据证明了蛋白质从高度复杂的混合物中分级分离到高亲和性配体上，蛋白质以足够的速率和浓度从配体扩散至培养基，且通过它支持依赖性细胞生长的能力来检测它的存在。

25 这些结果显示了足够的蛋白质从高亲和性配体扩散出来，并在相关的基于细胞的试验中检测到其活性。这些结果可以外推来预言通过其对培养物细胞的活性和鉴定的结合该蛋白质的配体可以鉴定支持生长的未知蛋白质，大量生产，并通过亲和性色谱纯化活性蛋白质，鉴定并表征。

实施例 3

30 该实施例证明了利用本发明方法来鉴定生长因子。

为了获得支持 NK-92 细胞存活的蛋白质已经使用六聚体肽配体库筛选了复杂细胞因子混合物。源自分离的淋巴细胞和单核细胞的天

然、分泌的细胞因子混合物 (ImmunoRx, Inc, Farmington, NY) 用作起始材料。该混合物含有许多细胞因子, 它们响应于生物学诱导而释放且不存在于正常血清或培养基中。该试验的终点如实施例 2 中所描述的同时是生物学的和荧光的。通过半胱氨酸衍生物在 ToyoPearl 5 605-M 环氧珠子的主链上合成的六聚体库的 11, 000 珠子(由 Peptides International 合成, Louisville, KY) 与细胞因子混合物温育。未结合和弱结合的蛋白质通过用 PBS (150mM NaCl, pH7.4) 洗涤来去除。20-50 个珠子与 40 μ l NK-92 细胞温育, 细胞已经以 2.4×10^4 个细胞/ml 放置在 384 孔的微量滴定板上的孔中。平板在 37 $^{\circ}$ C 保持 48 小时。10 在 20 个孔中大约观察到 30 块生长细胞。在一些情况中细胞的大块生长与珠子的关联比较紧密。数个直接邻近的珠子在其附近没有细胞生长, 通过碘化丙锭 (PI) 吸收来显示死亡细胞显著的小块。收集这些珠子中 (以及少许其他的来自支持生长的相同的孔) 的一个, 通过修饰抗体检测在“珠子印迹 (bead blot)” 试验中来验证珠子上 IL-2 的 15 存在。简言之, 珠子排列在琼脂糖中, 蛋白质从珠子转移下来通过在洗脱缓冲液中毛细管转移至 PVDF 膜上, 膜用抗-IL-2 抗体标记来检测 IL-2。回收十一个珠子, 包括三个可能是阳性的, 洗涤, 与同样的起始材料再温育, 并用相同的细胞系各自培养。三个可能阳性的珠子中的两个在去褶合 (deconvolution) 试验中证实了它们的活性。将另外的 20 珠子测序以及结合的配体鉴定为序列 GVA SED (SEQ ID NO: 9)。合成具有该配体的树脂并发现其结合 IL-2。全部的起始材料将在树脂上分级分离, 并将结合的蛋白质分析来鉴定可以在树脂上纯化并有助于活性的另外的蛋白质。

该类型功能性筛选实验的数个方面可以外推至其他用于生物学活性的筛选。尽管 IL-2 存在于起始材料中是已知的, 还有大量其他的细胞因子以不同水平存在于珠子上, 且在试验中可能有助于细胞存活。已经测试 NK-92 细胞对于 IL-1 和数个其他已知的细胞因子的响应性缺失; 然而, 它们可以对其他, 如存在于起始材料中还未发现的细胞因子有反应。最重要的, 在该类型试验中可以无疑地完成筛选保护性对 30 抗细胞毒性试剂和毒药的因子, 其中细胞生长和 PI 排除是终点。

实施例 4

该实施例证明了利用本发明方法为了获得碱性磷酸酶活性筛选掺

料血浆。

将链霉抗生物素碱性磷酸酶 (500ng) (SAP-Sigma-Aldrich) 掺入 1ml 集合的人血浆中。掺料血浆与 ToyoPearl AF-Amino-650M 珠子 (Tosoh BioSciences, Montgomeryville, PA) 温育, 该珠子具有或不具有配体 HPQFLS (SEQ ID NO: 1) (由 Peptides International 合成, Louisville, KY), 该配体是已知结合链霉抗生物素的序列。珠子用与掺料或未掺料血浆在室温下温育 1 小时, 之后用具有 0.1% Tween-20, pH7.2 的 HEPES 缓冲液洗涤。带有配体的珠子也与盐水单独温育作为对照。珠子以每孔 6 个 HPQFLS 珠子分配到 384-孔平板的孔中, 也中具有 120 μ l 含有 250mM NaCl 和 0.05% Tween 吐温 20-缓冲液的 HEPES 缓冲液。珠子在室温下温育 30 小时。

从孔中回收液体并用对硝基磷酸苯酯 (PNPP) (Sigma-Aldrich) (即, 有颜色的磷酸酶底物) 测试碱性磷酸酶活性的存在。只在那些有来自已经暴露于 AP-掺料血浆的配体珠子的缓冲液的孔中显现黄颜色; 在对照孔中观察到的是无色的。为了证实蛋白质的确从珠子上洗脱了, FITC-标记物链霉抗生物素 (Pierce) 也与上述 HPQFLS (SEQ ID NO: 1) 珠子温育。珠子然后与 120 μ l 的 20mM 柠檬酸盐 140mM 的 NaCl 缓冲液温育 21 小时。收集缓冲液, 在荧光计中测量荧光。超过基线的增加为 11.6%。另外 3 天的洗脱后, 荧光超过基线增加 22.7%。

这些结果证明了酶活性的蛋白质在高亲和性的配体上分级分离并从配体洗脱, 溶液中蛋白质的存在基于其生化活性而检测得到。

实施例 5

该实施例证明了利用本发明方法为了获得黑素瘤特异性抗体筛选血浆。

用于该试验的细胞系是人恶性黑素瘤细胞系 SK-MEL 28。组合库在来自 Tosoh BioScience 的 ToyoPearl 650-M 环氧树脂上合成。该库设计来带有配体, 配体通过半胱氨酸衍生物的巯基基团连接至树脂。作为 IgG, IgA 和 IgM 抗体源的起始材料是已经进一步分级分离去除了血纤蛋白原的血浆级分 I+II+III 浆状糊。珠子与浆状糊温育并洗涤, 且 50-150 个珠子与 40 μ l SK-MEL 28 细胞温育, 细胞已经以 1×10^4 细胞/ml 放置在 384 孔平板的孔中。培养基含有碘化丙锭 (PI) 即只有死细胞吸收的红色荧光染料。以 1 小时间隔在 160 小时内以单个细

胞分辨率获取每个孔的图像。分析图像的 PI 随时间的吸收，将 PI 吸收累积增加超过群体平均值 2 个标准偏差的孔选择作为特定目标。将这些孔中的珠子收集、清洗、用新鲜的等份起始材料再装载，以相同细胞浓度与每个孔 1-2 个珠子温育，并用和原始试验同样的方式成像。

5 将死亡增加超过群体平均值 2 个标准偏差的孔中的珠子收集并将结合的配体测序。

有珠子的或在特异性珠子邻近的孔中死亡增加显示了结合配体的细胞毒性抗体。通过将孔中的珠子稀释至每个孔单个珠子和重复试验来去褶合任何阳性。这证明了结果并显示了结合蛋白质的特异性珠子，将其结合的配体测序。如果在孔中鉴定单个珠子而无去褶合，则收集珠子并将结合的配体测序。

10

实施例 6

该实施例显示了为了获得免疫接种哺乳动物的抗体利用本发明方法筛选抗体混合物。

15 从高达 60,000 个供体的集合体制得源自人血浆的静脉内免疫球蛋白 (IgG)，且该免疫球蛋白包括大量各种不同亲和性的抗体，其中一些结合细胞表面受体。通过用膜制剂来免疫接种小鼠也可以产生直接对抗细胞表面受体的抗体群体。在方法中抗体可以用作筛选起始材料来鉴定它们受体的表位如“珠子印迹”受体结合抗体可以用于 PON1 的增量调节。使用来自正常和免疫接种小鼠的纯化的 IgG 制剂来鉴定在不同筛选中的抗体特异的表位。一个组的小鼠用卵清蛋白免疫接种；未免疫的小鼠用作对照。使用 G 蛋白琼脂糖 (Pierce) 上的亲和性色谱分析从混合血清中纯化来自每组的 IgG 制剂，且两个群体用 Alexa 488 (绿色) 或 Alexa 568 (红色) 染料 (Molecular Probes, Eugene OR) 不同标记。然后混合两个 IgG 且与组合六聚体配体库温育。将珠子充分洗涤并在荧光显微镜下观察。荧光珠子的多数同时具有红色和绿色信号，显示它们结合了存在于两个群体中抗体。只有红色的荧光珠子是只存在于免疫接种群体里抗体的指示。将这些收集并测序。数个显示了和卵清蛋白非常强的序列同源性，如，ILRVIR (SEQ ID NO: 2) 和卵清蛋白序列 RTINKVVRV (SEQ ID NO: 3) 同源，IFDKVQG (SEQ ID NO: 4) 和 RFDKLPFG (SEQ ID NO: 5) 同源，以及 PPFRIHG (SEQ ID NO: 6) 和 MPFRVITE (SEQ ID NO: 7) 同源。数个保留的解码 (decoded)

20

25

30

的序列和确信由免疫接种过程中使用的弗氏辅剂引起的细菌序列具有高度同源性。

实施例 7

该实施例证明了利用本发明方法通过测量对氧磷酶活性鉴定结合
5 库的酶。

为了获得从血浆纯化对氧磷酶的能力通过测量酶的活性来筛选连接 HDL 的配体。对氧磷酶涉及对抗动脉粥样硬化斑积累的保护，以及一些神经毒药（萨林）和杀虫剂的解毒。5 μ l 配体 2'-萘基-丙氨酸 WLHAN (SEQ ID NO: 8) 与 100 μ l 的在 PBS 中 1:10 稀释的兔血清于
10 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。将珠子离心移去上清液，并将上清液保存在 eppendorf 管中。将树脂珠子沉淀在等体积的对氧磷酶试验缓冲剂中重悬浮。使用敏感的、特异的、荧光的底物来测量上清液的对氧磷酶活性。将 100 μ M 的 DEPFMU (6, 8-二氟-4-甲基 umbelliferyl) 和 10
15 μ l 上清液、10 μ l 珠子悬浮液，或 10 μ l 血清于标准微量滴定板中 37 $^{\circ}$ C 混合 20 分钟。使用商业的荧光计测量 355nm 发射和 460nm 激发荧光来定量 DEPFMU 的水解。和 DEPFMU 活性的标准曲线相比较来定量水解。在具有树脂的孔中检测到了 30% 的起始活性，而在血清中剩余了低于 4% 的起始对氧磷酶活性。这些数据显示了通过结合到珠子上的酶的活性可以检测结合酶的配体，以及使用该试验来筛选活性可以从复杂混
20 合中发现酶本身。

实施例 8

该实施例证明了利用本发明方法为了获得结合病毒的配体筛选库，基于筛选病毒关联的细胞毒性。

使用本发明的方法鉴定结合猪细小病毒 (PPV) 的配体。该试验是传统噬斑试验的改变，其中通过培养物中易感哺乳动物细胞的溶解形成的病毒噬斑来测量感染性。作为结合病毒的配体模型，将 2 μ l 多克隆的猪抗 PPV 抗体根据制造商的规程 (Pierce) 连接至 A 蛋白琼脂糖珠子上。通过连续离心使珠子与从 PK13 纯化得到的 8 对数 (log) 的 PPV 温育。这些珠子和低熔点的琼脂糖混合并涂布在 70% 的 PK13 细胞汇合
25 培养物的表面。在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 下培养 5 天后，活细胞用中性红染色剂染色。围绕结合病毒的珠子细胞死亡的面积是明显的。这些结果证明了活性实体 (病毒) 从珠子受控制的扩散鉴定了活性珠子。
30

在此引用的所有参考文献，包括出版物、专利申请，以及专利在此引入作为参考，其程度与每一参考文献单独且特定引入作为参考及在此处整体提出的程度相同。

5 在描述本发明文中使用的术语“a”和“an”和“the”和相似的指示（尤其是在下列权利要求的内容中）解释为同时覆盖了单数和复数，除非在此另外指出或清楚地通过内容反驳。术语“包括”“具有”、“包含”和“包括”是作为开放的术语来解释的（即，意思为“包括，但不限制于，”）除非另外注解。在此值范围的列举仅仅作为涉及各自的各个分开的落入范围内值的简写方法，除非在此另外指出，以及
10 每个分开的值与其在此处单独引用一样整合入说明书中。在此描述的所有方法可以以任何适合的顺序进行，除非在此另外指出或清楚地通过内容反驳。任何一个和所有实施例的用途，或在此所提供的示例性语言（如，“例如”），仅仅是为了更好地说明本发明而不是对本发明范围的限制，除非另外请求保护。说明书中没有语言应解释表示任何
15 何非请求保护的元素对本发明的实践是必须的。

在此描述了本发明的优选实施方案，包括发明者已知的实施本发明的最佳方式。基于阅读前面的描述对本领域技术人员来说那些优选实施方案的改变是显而易见的。发明者期待技术人员来使用这样适当的改变，发明者打算期望本发明除了在此特别描述的应用。因此，本
20 发明包括所有由适用法律批准的所附权利要求叙述的主题的改变和等价方案。此外，所有可能改变的上述元素的任何组合都包括于本发明中，除非在此另外指出或通过内容清楚地反驳。

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 3

Arg Thr Ile Asn Lys Val Val Arg Phe
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 4

Ile Phe Asp Lys Val Gln Gly
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 5

Arg Phe Asp Lys Leu Pro Gly Phe Gly
1 5

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

<220>

<223> 合成的

<400> 9

Gly Val Ala Ser Glu Asp

1 5

1

专利名称(译)	从复杂混合物中鉴定出单一活性实体的方法		
公开(公告)号	CN1671859A	公开(公告)日	2005-09-21
申请号	CN03816492.2	申请日	2003-06-20
申请(专利权)人(译)	美国红十字会		
当前申请(专利权)人(译)	美国红十字会		
[标]发明人	DJ哈蒙德 JT拉思罗普 J萨卡 L乔治乌		
发明人	D·J·哈蒙德 J·T·拉思罗普 J·萨卡 L·乔治乌		
IPC分类号	G01N33/566 C07K7/06 C12Q1/42 C12Q1/44 C12Q1/68 C12Q1/70 C40B30/04 G01N33/53 G01N33/554 G01N33/567 G01N33/569 G01N33/68 C12Q1/00		
CPC分类号	C40B30/04 G01N33/6803 G01N33/569		
代理人(译)	曹雯 刘玥		
优先权	60/395038 2002-07-11 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种为获得活性实体筛选混合物的方法，该方法包括：提供大量配体，其中每个配体连接至支持物以形成大量的配体 - 支持物复合体，在使至少一个实体与至少一个配体 - 支持物复合体结合的条件下，将配体 - 支持物复合体和含有大量实体的混合物接触，由此形成至少一个实体 - 配体 - 支持物复合体，将至少一个实体 - 配体 - 支持物复合体与未结合的实体分离，将至少一个实体 - 配体 - 支持物复合体的至少一个实体进行活性试验，检测活性，以及选择具有展示检测到的活性的实体的至少一个实体 - 配体 - 支持物复合体，由此从混合物中筛选活性实体；以及相关的方法。

表1 TNF- α 珠子的细胞毒性试验

	起始细胞数量	死亡%
溶解的 TNF- α	100,000	98
单独的抗- TNF α 珠子	100,000	0.5
假温育	100,000	0.3
普通珠子	100,000	4.1
	50,000	0.1
	25,000	7.7
偶联 TNF- α 的珠子	100,000	9.1
	50,000	29.4
	25,000	12.5