



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102159949 A

(43) 申请公布日 2011. 08. 17

(21) 申请号 200980132220. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 06. 18

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/132, 416 2008. 06. 18 US

61/155, 890 2009. 02. 26 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 02. 18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/047799 2009. 06. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02009/155420 EN 2009. 12. 23

(71) 申请人 加州理工学院

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 希瑟·阿格纽 罗斯玛丽·罗德

史蒂文·米尔沃德 阿伦达蒂·奈格

詹姆士·R·希思

(74) 专利代理机构 北京双收知识产权代理有限公司

公司 11241

代理人 吴杰

权利要求书 4 页 说明书 59 页

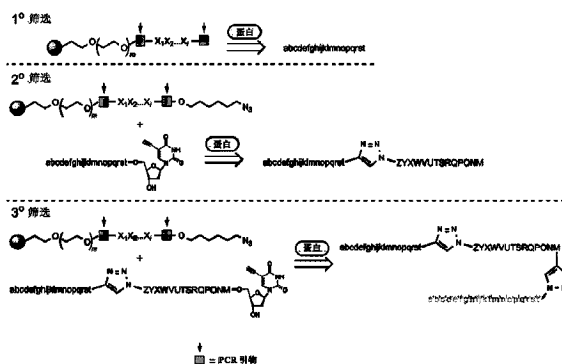
序列表 1 页 附图 21 页

(54) 发明名称

多配位体捕获剂及相关组合物,方法和系统

(57) 摘要

描述了包括两个或两个以上配位体的多配位体捕获剂,以及相关的组合物,方法和系统。



1. 对应靶标的多配位体捕获剂,包括:
两个或两个以上以共价键彼此连接的配位体,
其中两个或两个以上配位体各自特异性结合该靶标,并且彼此是结合可区分的,以及
其中该两个或两个以上配位体在该多配位体捕获剂被布置为,该多配位体捕获剂结合靶标后,该两个或两个以上配位体各自结合该靶标。
2. 权利要求 1 的多配位体捕获剂,其中该两个或两个以上配位体中至少一个和至少一个其它配位体无关和 / 或和该靶标无关。
3. 权利要求 1 或 2 的多配位体捕获剂,其中该两个或两个以上配位体具有相同的或者不同的化学性质。
4. 权利要求 1 至 3 任一项的多配位体配位体捕获剂,其中该两个或两个以上配位体独立地选自肽,多肽,多核苷酸,与小分子。
5. 权利要求 4 的多配位体捕获剂,其中该两个或两个以上配位体中一个或多个配位体是肽,每个肽包括三至一百个单体。
6. 权利要求 1 至 5 任一项的多配位体捕获剂,其中该多配位体捕获剂包含至多十个配位体。
7. 权利要求 1 至 6 任一项的多配位体捕获剂,其中该两个或两个以上配位体被排列为提供直链多配位体捕获剂。
8. 权利要求 1 至 6 任一项的多配位体捕获剂,其中该两个或两个以上配位体被排列为提供支链多配位体捕获剂。
9. 权利要求 1 至 8 任一项的多配位体捕获剂,其中该捕获剂进一步包含其它分子或者官能团,使该捕获剂具有期望的化学或者生物活性。
10. 权利要求 9 的多配位体捕获剂,其中该期望的化学或者生物活性是溶解度,稳定性,生物利用度,免疫原性,探测能力,和反应性。
11. 权利要求 9 或 10 的多配位体捕获剂,其中该其它分子或官能团是亲水性化合物,疏水性化合物,载体或标记物。
12. 多配位体捕获剂,包括
第一配位体和第二配位体,
其中第一配位体和第二配位体以共价键连接,
其中第一配位体可以单独结合靶标,
其中第二配位体可以单独结合靶标,
其中该第一和第二配位体在它们结合至该靶标时是结合可区分的,
其中该多配位体捕获剂可以特异性结合该靶标,和
其中在该多配位体捕获剂结合该靶标时,该第一和第二配位体均接触该靶标。
13. 权利要求 12 的多配位体捕获剂,其进一步包括第三配位体,其中该第三配位体以共价键连接第一和第二配位体,其中在该多配位体捕获剂结合该靶标时,该第三配位体接触该靶标。
14. 权利要求 13 的多配位体捕获剂,其进一步包括第四配位体,其中该第四配位体以共价键连接第一,第二和第三配位体,其中在该多配位体捕获剂结合该靶标时,该第四配位体接触该靶标。

15. 在多配位体中对靶标提供两个或两个以上多配位体捕获剂的配位体的方法,该方法包括

从复数个候选的配位体中选择能相应的结合位点特异性结合靶标的候选配位体,其中这些结合位点排列为容许每个结合在各位点上的配位体与其它配位体共价连接。

16. 权利要求 15 的方法,其中该复数个候选的配位体包括至少一个与另外候选配位体无关的候选配位体和 / 或与该靶标无关。

17. 权利要求 15 或 16 的方法,其中通过将该复数个候选的配位体与该靶标在容许结合至该靶标的候选配位体之间形成共价连接,由该靶标催化形成共价连接的条件下进行该选择。

18. 权利要求 17 的方法,其中候选配位体包括起初不知道能够结合靶标的化合物或者该化合物的一部分。

19. 权利要求 17 或 18 的方法,其中这些候选配位体经过修饰,以在接触该靶标之前或之后引入期望的特征。

20. 权利要求 17 至 19 任一项的方法,其中这些配位体上存在的官能团在这些配位体之间形成共价连接,以使得两个个别的配位体与该靶标结合后,这些官能团反应形成共价键。

21. 权利要求 17 的方法,其中该复数个候选配位体包括第一复数个候选配位体和第二复数个候选配位体,和

通过以下步骤进行选择:

用第一复数个候选配位体接触靶标以选择特异性结合该靶标,并呈现能够在该靶标催化的反应中特异性结合相应的第二官能团的锚配位体;

用该靶标接触该锚配位体,由此提供锚配位体靶标复合物;

用第二复数个候选配位体接触该锚配位体靶标复合物;和

选择该第二复数个候选配位体的能够特异性结合该锚配位体靶标复合物并且共价连接该锚配位体的候选配位体,由此提供多配位体。

22. 权利要求 21 的方法,其中对锚配位体的选择是通过

选择可特异性结合该靶标的候选配位体;和

修饰该选定的候选配位体,以引入能在该靶标催化的反应中特异性结合相应的第二官能团的第一官能团,由此提供存在所述第一官能团的锚配位体。

23. 权利要求 21 或 22 的方法,其中该第一和第二复数个候选配位体完全或部分相同或者不同。

24. 权利要求 21 至 23 任一项的方法,其中采用该多配位体作为锚配位体重复该选择,以向该多配位体添加另外的配位体。

25. 权利要求 21 至 24 任一项的方法,其中重复该选择直到更高阶的多配位体捕获剂对靶标的结合亲和力比该锚配位体的结合亲和力高至少 10^2 。

26. 权利要求 21 至 24 任一项的方法,其中重复该选择直到更高阶的多配位体捕获剂对靶标的结合亲和力比该锚配位体的结合亲和力高至少 10^{10} 。

27. 权利要求 21 至 24 任一项的方法,其中重复该选择直到该多配位体捕获剂结合该靶标的解离常数小于等于 10^{-5}M 。

28. 权利要求 21 至 24 任一项的方法,其中重复该选择直到该多配位体捕获剂结合该靶

标的解离常数小于等于 10^{-16}M 。

29. 权利要求 21 至 28 任一项的方法,其中重复该选择,并且在该选择的一个或多个重复中使用相同的或不同的复数个候选配位体作为第二复数个候选配位体。

30. 权利要求 21 至 29 任一项的方法,其中重复该选择,并且在该选择的一个或多个重复中使用相同的或不同的官能团作为第一和 / 或第二官能团。

31. 权利要求 21 至 30 任一项的方法,其中该两个或两个以上配位体是肽或多肽。

32. 权利要求 31 的方法,其中该多配位体捕获剂由多肽形成的蛋白质捕获剂,并且该方法用于合成多肽。

33. 制造多配位体捕获剂的方法,该方法包括:

将经过修饰的锚配位体和第一复数个候选配位体和靶标接触,该经修饰的锚配位体由此在该靶标催化的反应中以共价键连接一个或多个该候选的配位体,从而形成一个或多个多配位体捕获剂,其中每一个多配位体捕获剂包括经过修饰的锚配位体和候选的配位体之一:

其中该锚配位体可以结合该靶标,其中该经修饰的锚配位体包括第一官能团,其中该第一官能团能够与相应的第二官能团特异性反应,其中每个候选的配位体包括该第二官能团。

34. 权利要求 33 的方法,其进一步包括,

(i) 修饰该多配位体捕获剂之一,以包括第三官能团,其中该第三官能团能够与相应的第四官能团特异性反应,和

(ii) 将经过修饰的锚配位体和第二复数个候选配位体和靶标接触,该经修饰的锚配位体由此在该靶标催化的反应中以共价键连接一个或多个该候选的配位体,从而形成一个或多个更高阶的多配位体捕获剂,其中每一个更高阶的多配位体捕获剂包括经过修饰的多配位体捕获剂和候选的配位体之一,

其中该第二复数个捕获配位体中每一个候选配位体均包括该第四官能团。

35. 权利要求 33 或 34 的方法,其中在接触之前,哪个候选的配位体可以和靶标结合是未知的。

36. 权利要求 33 至 35 任一项的方法,其中该第一和 / 或第二复数个候选配位体包括化合物的组合库。

37. 权利要求 36 的方法,其中该化合物的组合库包括含一组以链式连接的亚单元的序列。

38. 权利要求 37 的方法,其中这些链是直链,支链,环,或其组合。

39. 权利要求 37 或 38 的方法,其中该组亚单元包括氨基酸,经过修饰的氨基酸,或其组合。

40. 权利要求 39 的方法,其中该组亚单元进一步包括一个或多个小的有机分子。

41. 权利要求 39 或 40 的方法,其中该组亚单元中的氨基酸主要由氨基酸的子集组成。

42. 权利要求 39 或 40 的方法,其中该组亚单元中的经修饰的氨基酸主要由经修饰的氨基酸的子集组成。

43. 包括权利要求 1 至 14 任一项的多配位体捕获剂以及媒介物的组合物。

44. 权利要求 43 的组合物,其中该组合物是药物组合物,该媒介物是药学上可接受的

媒介物。

45. 一种检测靶标的方法,该方法包括

将该靶标与权利要求 1 至 14 任一项的多配位体捕获剂在容许该多配位体捕获剂结合该靶标,以形成多配位体捕获剂靶标复合物的条件下接触一段时间;和

检测该多配位体捕获剂靶标复合物。

46. 权利要求 45 的方法,其中,用多配位体捕获剂接触该靶标,并根据单参数分析或多参数分析检测该多配位体捕获剂靶标复合物。

47. 权利要求 46 的方法,其中该多配位体捕获剂是蛋白质捕获剂,该单参数分析或该多参数分析是标准的蛋白质分析。

48. 权利要求 45 至 47 任一项的方法,其中该靶标是和预定条件有关的生物标记物。

49. 用于检测靶标的系统,该系统包括权利要求 1 至 14 任一项的多配位体捕获剂,和至少一种探测多配位体捕获剂靶标复合物所需的试剂。

50. 权利要求 49 的系统,其中该至少一种试剂是标记分子。

51. 在混合物中将靶标与被分析物分离的方法,该方法包括:

将权利要求 1 至 14 任一项的多配位体捕获剂在容许该多配位体捕获剂特异性结合该靶标,以形成多配位体捕获剂靶标复合物的条件下接触该混合物一段时间;和

将该蛋白质捕获剂靶标复合物从混合物中分离。

52. 权利要求 51 的方法,其中,用蛋白质捕获剂接触该靶标,并且根据单参数分析或多参数分析分离该蛋白质捕获剂靶标复合物。

53. 用于在混合物中将靶标与被分析物分离的系统,该系统包括权利要求 1 至 14 任一项的多配位体捕获剂,以及至少一种从该混合物中分离多配位体捕获剂靶标复合物所需的至少一种试剂。

54. 用于提供权利要求 1 至 14 任一项的多配位体捕获剂的系统,该系统包括至少复数个候选配位体,和

用于在所述候选配位体上引入一个或多个官能团的试剂。

55. 权利要求 54 的系统,其进一步包括标记。

多配位体捕获剂及相关组合物,方法和系统

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求文件号为 CIT-5164-P, 2008 年 6 月 18 日递交的题目为“多配位体蛋白捕获剂的蛋白催化形成”, 序号 61/132, 416 的美国临时申请的优先权, 并要求文件号为 P367-USP, 2009 年 2 月 26 日递交的题目为“捕获剂及相关组合物方法和系统”, 序号 61/155, 890 的美国临时申请的优先权, 其公开内容以参考方式被全文合并于此。

[0003] 政府拨款说明

[0004] “依照国家健康学会授予的 No. CA119347 号拨款, 美国政府在本发明中具有某些权利。”

技术领域

[0005] 本文公开的内容涉及用于在样品中检测和 / 或分离一个或多个靶标的捕获剂。

背景技术

[0006] 在生物分子分析领域, 靶标, 特别是生物标记物的高灵敏度检测已成为一种挑战, 特别是在针对复数个靶标的检测和 / 或针对某尺寸的或者以低浓度存在于样品中的靶标的检测时。无论是对于病理检查还是基本生物学研究, 有若干种方法通常被用于各种类别的生物材料和生物分子的检测。

[0007] 一些在实验室中最常用于检测单一生物学靶标的技术包括凝胶电泳, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 蛋白质印迹, 荧光原位杂交 (FISH), 荧光活化细胞分类 (FACS), 聚合酶链式反应 (PCR), 和酶联免疫吸附分析 (ELISA)。这些方法能够在生物样品 (比如血清和组织) 中检测一个或多个生物标记物, 并且适用于诊断目的。

[0008] 随后的多核苷酸编码方法提供了超越现有技术的改进, 特别是, 其允许对靶标进行高灵敏度和选择性多重检测。

[0009] 概要

[0010] 在此提供的是捕获剂, 其在若干实施方式中可具有高亲合力和特异性地被用于有效地检测和 / 或分离一个或多个靶标。

[0011] 根据第一方面, 描述了一种用于靶标的多配位体捕获剂。该多配位体捕获剂包括两个或两个以上彼此以共价键连接的配位体, 其中该两个或两个以上配位体中的每一个配位体可特异性结合靶标, 并且与另一个配位体是结合可区分的, 并且其中该两个或两个以上配位体被布置在该多配位体捕获剂中, 以使得该多配位体捕获剂与该靶标结合后, 该两个或两个以上配位体中每一个配位体特异性结合该靶标。

[0012] 根据第二方面, 描述了一种组合物。该组合物包括: 此处描述的多配位体捕获剂和相容的载体。

[0013] 根据第三方面, 描述了一种检测靶标的方法, 该方法包括用此处描述的多配位体捕获剂在允许该多配位体捕获剂与靶标结合以形成多配位体捕获剂靶标复合物的条件下接触该靶标一段时间; 并且检测该多配位体捕获剂靶标复合物。根据第四方面, 描述了一种

在混合物中将靶标与另外的被分析物分离的方法,该方法包括:在混合物中加入此处描述的多配位体捕获剂,在允许该多配位体捕获剂与靶标特异性结合以形成多配位体捕获剂靶标复合物的条件下经过一段时间;并且从该混合物中分离多配位体捕获剂靶标复合物。

[0014] 根据第五方面,描述了一种用于检测靶标的系统。该系统包括此处描述的多配位体捕获剂,以及至少一种进行多配位体捕获剂靶标复合物检测所需的试剂。根据第六方面,描述了一种用于在混合物中将靶标与另外的被分析物分离的系统。该系统包括此处描述的多配位体捕获剂,以及至少一种将多配位体捕获剂靶标复合物从该混合物中分离所需的试剂。

[0015] 根据第七方面,提供了在多配位体中提供两个或两个以上多配位体捕获剂的配位体的方法。该方法包括提供该靶标;提供复数个候选配位体;以及选择能在相应的结合位点特异性结合该靶标的候选配位体,其中该结合位点被布置为允许结合至每个位点的每个配位体与另一配位体之间共价结合。

[0016] 在若干实施方式中,此处描述的多配位体捕获剂和相关的组合物方法和系统允许生产对于预定目标特异性的捕获剂,而无需了解该靶标的亲合剂的先验知识。

[0017] 在若干实施方式中,此处描述的多配位体捕获剂和相关的组合物方法和系统允许对靶标进行具有至少比得上抗体的灵敏度和选择性的检测,而对于热震,脱水, pH 变化,许多化学过程,而且以及某些天然酶的降解具有增加的稳定性。另外,在若干实施方式中,与现有技术的某些基于抗体的解决方案相比,此处描述的多配位体捕获剂及相关的组合物方法和系统允许快速和/或成本经济的捕获剂研发。

[0018] 此外,在若干实施方式中,此处描述的多配位体捕获剂和相关组合方法和系统允许用不同化学性质的配位体形成捕获剂。

[0019] 另外在若干实施方式中,此处描述多配位体捕获剂和相关的组合方法和系统允许在预定目标分子中的位点特异性标记。

[0020] 在若干实施方式中,此处描述的多配位体捕获剂和相关的组合方法和系统在单参数或者多参数分析中允许该多配位体捕获剂高定向附着于基质或者表面。

[0021] 附图简述

[0022] 这些附图被合并于说明书中并构成说明书一部分,并示范了本公开内容的一个或多个实施方式。它们和详细说明及实施例一起用于解释本公开的原理和实施。

[0023] 图 1 显示了根据此处描述的一些实施方式的共价键示意图。

[0024] 图 2 显示了根据此处描述的一些实施方式的共价键示意图。

[0025] 图 3 显示了根据此处描述的一些实施方式的共价键示意图。

[0026] 图 4 显示了根据此处描述的一些实施方式的共价键示意图。

[0027] 图 5 显示了一种根据本文所述实施方式的双配位体捕获剂。特别地,由 14 个非天然和人工氨基酸组成的双配位体捕获剂可以用高纯度(显示单源质量)。该锚定配位体表示为 1°, 该第二配位体为 2°, 且该 1,2,3-三唑连结物(连接 1° 和 2°)为 Tz1。

[0028] 图 6 显示了根据本文所述一实施方式的一种三配位体捕获剂。特别地,该锚定配位体由暗灰色字体显示,该第二配位体由中灰色字体显示,该第三配位体由淡灰字体显示。这些配位体之间的连接是由 1,2,3-三唑(Tz1 和 Tz2)形成的。

[0029] 图 7 显示了制备根据此处描述的若干实施方式的多配位体捕获剂的方法的示意

图。面板 A 显示了第一步,用标记的靶标接触库中复数个候选分子,以识别初级配位体或者锚定配位体。面板 B 显示了第二步骤,用当前附着连结物的相同的库接触来自第一步的初级配位体,以识别第二配位体,并获得由第一步的初级配位体和该第二配位体形成的双配位体。面板 C 显示了第三步,通过用第二步骤形成的双配位体进行重复,作为新的初级配位体,以允许更高级多配位体的识别。

[0030] 图 8 显示了根据此处描述的若干实施方式的支链多配位体捕获剂的制备方法的示意图。面板 A 显示了第一步,用标记的靶标和存在第一官能团(由图 7A 的方法识别)的锚定配位体接触库,以识别第二配位体。此第二配位体的库包含多个第二官能团取代位点。这种筛选的结果是通过内部分支点连接的由第二配位体组成的双配位体。这种支链双配位体可以用官能团进一步修饰,作为支链三配位体筛选中的锚定物。面板 B 显示了第二步骤,用当前附着有连结物的综合库接触这种支链双配位体锚定物,以在具有一个分支点的多配位体捕获剂中识别第三配位体。面板 C 显示了相同的步骤,用于在具有 2 个分支点的多配位体捕获剂中识别第三配位体。面板 A, 面板 B 和 / 或面板 C 的方法可以被任选地重复,以获得由 n - 分支点和 n - 配位体组成的多配位体。

[0031] 图 9 显示了根据此处所述一实施方式按顺序组成多核苷酸多配位体捕获剂的方法示意图。面板 A 显示了第一步,用标记的靶标接触复数个多核苷酸,以识别初级配位体或者锚定配位体。面板 B 显示了第二步骤,用当前附着连结物的复数个多核苷酸接触来自第一步的初级配位体,以识别第二配位体,并获得由第一步的初级配位体和该第二配位体形成的双配位体。面板 C 显示了第三步,重复通过用第二步骤形成的双配位体作为新的初级配位体,以允许更高级多配位体的识别。

[0032] 图 10 显示了根据此处所述一实施方式按顺序组成小分子多配位体捕获剂的方法示意图。面板 A 显示了第一步,用标记的靶标接触复数个小分子,以识别初级配位体或者锚定配位体。面板 B 显示了第二步骤,用当前附着连结物的相同的库接触来自第一步的初级配位体,以识别第二配位体,并获得由第一步的初级配位体和该第二配位体形成的双配位体。面板 C 显示了第三步,重复通过用第二步骤形成的双配位体作为新的初级配位体,以允许更高级多配位体的识别。

[0033] 图 11 显示了通过按顺序组合不同化学性质的配位体合成嵌合的多配位体捕获剂的方法的示意图。面板 A 显示了第一步,用标记的靶标接触多核苷酸库,以识别初级配位体或者锚定配位体。面板 B 显示了第二步骤,用当前附着连结物的肽库接触来自第一步的初级配位体,以识别第二配位体,并获得由第一步的初级配位体和该第二配位体形成的双配位体。面板 C 显示了第三步,重复通过用第二步骤形成的双配位体作为新的初级配位体,以通过接触相同的或者面板 B 的另外肽库识别更高级的多配位体。

[0034] 图 12 显示了根据此处所述一实施方式的去保护双配位体锚的结构式。具体地,图 12 的去保护双配位体锚由双配位体捕获剂的原始序列组成,以一个附加官能团作为附着位点,用于构建三配位体捕获剂。图 12 的去保护的双配位体锚还包括 15 个非天然的和人工氨基酸,并显示单源质量。

[0035] 图 13 显示了根据此处所述一实施方式的充分保护的双配位体锚的结构式。图 13 所示的充分保护的双配位体锚在该双配位体锚中保持氨基酸侧链的保护,且能被用于合成大批量的多配位体捕获剂。图 13 的充分保护的双配位体锚还可以作为 15- 元序列被高纯

度合成。

[0036] 图 14 显示了根据此处所述一实施方式的生物素化的双配位体锚的结构式。具体地,该生物素化的双配位体锚是图 12 所示的去保护的双配位体锚的扩展,其中生物素使得到的改性多配位体捕获剂具有可检测性。图 14 的生物素化的双配位体锚能作为适宜的试剂用于斑点印迹实验(参见图 21),以及图 29 所示的分析(见实施例 13)。

[0037] 图 15 显示了根据此处所述实施方式的生物素化的三配位体的结构式。具体地,图 15 的生物素化的三配位体捕获剂是图 6 所示的三配位体捕获剂的扩展,其中生物素使得到的修饰多配位体捕获剂具有可检测性。图 14 的生物素化的双配位体锚能作为适宜的试剂用于实施例 16,20 和 21 所示的斑点印迹,蛋白质印迹,和 ELISA- 型分析。

[0038] 图 16 显示了根据此处所述一实施方式的支链多配位体捕获剂的结构和靶标亲合性。面板 A 显示了对应 b(h)CAII 的支链双配位体捕获剂 vkw(Tz1)fw-kfw1k1 的化学结构。面板 B 显示了,由增加该双配位体浓度得到的 SPR 响应传感器(0 至 1656nM)显示对该 bCAII 靶标的结合亲合力为 500nM。与图 5 中类似的被研发的线性双配位体捕获剂的结合亲合力相比,此支化结构的亲合力被提升了五倍。

[0039] 图 17 显示了根据此处所述一实施方式的支链多配位体捕获剂的示意图。面板 A 显示了线性的三配位体捕获剂。面板 B 和 C 显示了支链的三配位体捕获剂,加亮显示了这种结构中具有被阻旋转的键。面板 B 和 C 的这些具有被阻旋转的键相对于类似的已研发的线性多配位体捕获剂(面板 A)具有增加亲合力的潜力。

[0040] 图 18 显示了根据此处描述的若干实施方式的支链三配位体捕获剂的结构。该锚配位体被表示为 1°, 该第二配位体为 2°, 该第三配位体为 3°, 且该两个 1,2,3-三唑连物(连接 1° 和 2°, 及 2° 和 3°)分别为 Tz1 和 Tz2。

[0041] 图 19 显示了根据此处描述的一些实施方式的锚配位体的识别方法的示意图。图 20 显示了根据此处描述的一些实施方式的第二配位体的识别方法的示意图。

[0042] 图 21 图解显示了用根据此处所述一实施方式的图 14 的双配位体和图 15 的三配位体进行的目标检测的灵敏度。面板 A 显示了在 10%猪血清中用图 15 的三配位体进行斑点印迹检测 b(h)CAII(下部),以及相关的图表(上部)。面板 B 显示了在 0.1%猪血清中用图 14 的双配位体进行斑点印迹。

[0043] 图 22 显示了用此处描述的一些实施方式的的多配位体捕获剂进行的天然蛋白质印迹的结果。面板 A 显示了考马斯-着色的天然凝胶,详述了总蛋白质含量。面板 B 显示了天然蛋白质印迹,示意了通过初级抗体结合的特异性蛋白。面板 C 显示了天然的蛋白质印迹,示意通过三配位体捕获剂结合的特异性蛋白。

[0044] 图 23 显示了用根据此处所述一实施方式的的多配位体捕获剂检测靶分子的示意图。面板 A 显示了完全组合的类 ELISA 夹心式吸光率分析法的结构示意图,其使用三配位体捕获剂检测 bCAII 蛋白。面板 B 显示了 bCAII 在不同浓度的 ELISA 分析实验数据,其在 96-孔板的孔中进行。增加的 bCAII 浓度被检测为增加的灰色。面板 C 和 D 显示了示意各种分析条件的图表。靶标存在于面板 C 的缓冲溶液中,而在面板 D 中,靶标存在于 10%猪血清中,其没有和该三配位体捕获剂或者检测抗体特异性结合。

[0045] 图 24 显示了根据此处描述的一些实施方式的两个类型的双配位体筛选的示意图。在面板 A 中,用于第二(2°)配位体的原位筛选,其如图 20 所示,被重新画出用于对

比。在面板 B 中,所示的用于第二 (2°) 配位体的小球上 (on-bead) 筛选用于确认面板 A 筛选是有效的。

[0046] 图 25 显示了根据此处描述的一些实施方式的多配位体捕获剂的初级或者锚配位体的选择方法示意图。面板 A 显示了针对筛选库 A 中分离出的 51 个命中序列的出现频率 vs. D-氨基酸图表 (第一代锚配位体筛选)。面板 B 显示了对于库 A 和 B 的命中率 (第二代锚配位体) 筛选,其导向 2 个锚配位体的选择。

[0047] 图 26 显示了检测根据此处描述的一些实施方式的配位体或者多配位体捕获剂的亲合力的图表。具体地,图 26 的图表示意了用渐增浓度的靶标 (0.2 μ M 至 800 μ M) 滴定荧光化锚配位体的荧光偏振实验结果,并提示此结合相互作用 500 μ M 亲合力。

[0048] 图 27 显示了根据此处描述的一些实施方式的多配位体捕获剂的第二配位体的识别。面板 A 显示了在锚配位体和靶标存在下筛选库分离出的双配位体捕获剂的候选第二配位体的 D-氨基酸 (x 轴) 的频率 (y 轴)。面板 B 显示了从面板 A 的库筛选分离的确切第二配位体序列简表。

[0049] 图 28 显示了用渐增浓度的根据此处所述一实施方式的多配位体捕获剂检测多配位体捕获剂亲合力变化的示意图。具体地,图 28 显示了被固定在传感器表面的靶标分别与两种双配位体捕获剂之间相互作用的表面等离子共振 (SPR) 实验结果。面板 A 显示了用渐增浓度的双配位体 1klwfk-Tz1-kiwiG (2nM 至 5 μ M) 得到的 SPR 响应传感图。面板 B 显示了由渐增浓度的双配位体 kwlwG1-Tz1-kfwlkl (2nM 至 5 μ M) 得到的 SPR 响应传感图。

[0050] 图 29 显示了根据此处描述的一些实施方式检测多配位体捕获剂的配位体之间的连接的方法。具体地,面板 A 显示了用于小球上三唑形成的原位点击分析法示意图,其使用生物素化的双配位体锚,面板 B 显示了紫色球 (显示为暗灰色) 为三唑形成的阳性指示器。

[0051] 图 30 显示了根据此处描述的实施方案的检测多配位体捕获剂的方法的示意图。面板 A 显示了通过 QPCR 检测小球上多配位体的方法示意图,以三配位体的检测作为示范例。面板 B 显示了通过 QPCR 对图 29 的生物素化三配位体的形成进行定量的示意图。面板 C 显示了关于面板的定量数据,并展现了超过对照约 10 : 1 的选择性。

[0052] 图 31 显示了根据此处描述的一些实施方式的第二代配位体的筛选示意图。具体地,图 31 的图表显示了基于对 37 个双配位体命中球的分析在 1-6 位找到的 D-氨基酸的分布。每一位置的氨基酸残基的频率表现一致。

[0053] 图 32 显示了根据此处描述的一些实施方式,对多配位体捕获剂的形成进行确认的方法示意图。具体地,显示了用于产生三配位体的第一代第三配位体筛选,具有 (面板 A) 和不具有 (面板 C) 含叠氮基氨基酸的肽的位置依赖直方图,以及 (面板 B) 第一和第二代 CuAAC 库筛选。最终共有的三配位体序列以灰色字体显示。

[0054] 图 33 显示了根据此处所述一实施方式用渐增浓度的多配位体捕获剂检测多配位体捕获剂的结合亲合力的示意图。具体地,面板 A 和 B 显示了图 15 的三配位体捕获剂 (rfviln-Tz2-kwlwG1-Tz1-kfwlkl) 的 SPR 响应传感图,其通过渐增肽浓度 (0.1nM 至 162nM) 得到,分别测量用于人 (A) 和牛 (B) CAII 靶标。

[0055] 图 34 显示了用根据此处所述一实施方式,多配位体捕获剂的复合物中的靶分子的酶活性的图表。具体地,图 34 的图表显示了三配位体捕获剂存在 (灰色) 和不存在 (黑色) 时,以及作为对照的 bCAII (暗灰色) 不存在时, bCAII 在基质 4-硝基苯基乙酸酯

(4-NPA) 上的酶活性。当三配位体捕获剂存在于该分析中时,该酶活性不随时间变化。

[0056] 图 35 显示了根据此处描述的一实施方式,适合连接识别多配位体捕获剂中的配位体的连接物的识别方法示意图。面板 A 显示了用于筛选备用连接物以替换该对应 b(h) CAII 的三配位体捕获剂中的 1,2,3- 三唑连接物 (Tz1 和 Tz2) 的库组成示意图。面板 B 显示了代表性的命中结果,其指示 D- 氨基酸可能适于置换 Tz1 或者 Tz2。面板 C 显示了表示原始的 1,2,3- 三唑的更紧凑版本的备用酰胺连接物的兼容性示意图。

[0057] 图 36 显示了三种三配位体捕获剂的分子结构,其用酰胺连接物代替 1,2,3- 三唑连接物 (Tz1 和 Tz2): 面板 A, 标示 TzR1, 其中 Tz2 = Gf, Tz1 = nk; 面板 B, 标示 TzR3, 其中 Tz2 = a1, Tz1 = dk; 和面板 C, 标示 TzR2, 其中 Tz2 = ps, 和 Tz1 = vv。

[0058] 图 37 描述了三配位体捕获剂的性能,其配位体之间的连结物已被一个或多个酰胺键代替。面板 A 显示了圆二色性 (CD) 实验结果,其显示三配位体捕获剂 TzR1 和原始三配位体序列 (rfviln-Tz2-kwlwG1-Tz1-kfwlk1, 图 6) 具有类似结构,因为它们均为随机盘绕。面板 B 显示了 TzR1 (0 至 1500nM 被分析物) 和 B(h) CAII 之间的结合相互作用的 SPR 结果,其中平衡离解常数被估计为高 nM。面板 C 显示 1,2,3- 三唑的原子布置和电子性能可以由酰胺键模拟。

[0059] 图 38 显示了为替换图 6 的三配位体捕获剂中的 Tz2 连结物,筛选 3- 氨基酸连结物的方法的实施例。应注意的是,这种筛选方法类似于图 23 的 ELISA 类夹心式分析法,但该基质是小球而非微孔。

[0060] 详细说明

[0061] 在此提供的是捕获剂,其在若干实施方式中可被用于有效地检测和 / 或分离一个或多个具有高亲合力和特异性的靶标。

[0062] 在若干实施方式中,此处描述的多配位体捕获剂可被用于其它用于进行若干分析方法的捕获剂,包括但不限于用于检测和 / 或分离靶标的分析法,这是技术人员依据对本文公开的内容的理解可以确认的。

[0063] 在此应用时,术语“捕获剂”指可以特异性结合靶标的化合物。例如,在此公开的捕获剂可以被设置为特异性结合靶标。这些公开的捕获剂可以包括但不限于有机分子,比如多肽,多核苷酸及其它非聚合物分子,它们是技术人员可以确认的。此处描述的多配位体捕获剂是捕获剂的实例。

[0064] 在此应用时,关于第一分子结合至第二分子的单词“特异性的”“特异性地”或者“特异性”指在第一分子和第二分子之间的识别,接触和形成稳定的复合物,以及在第一分子或第二分子与其它可能存在的分子之间基本上较少识别,接触和形成稳定的复合物。示范性的特异性结合是抗体 - 抗原相互作用,细胞受体 - 配位体相互作用,多核苷酸杂化,酶底物相互作用等等。在此应用时,关于复合物的分子组分的术语“特定的”指该组分与其所属的复合物的独特联系。在此应用时,关于多核苷酸的序列的术语“特定的”指该序列与作为互补序列的单链多核苷酸的独特联系。“稳定的复合物”意思是可检测的复合物,不需要任意水平的稳定性,当然较大的稳定性通常是优选的。

[0065] 此处所用的术语“靶标”指所感兴趣的被分析物。术语“被分析物”指物质,化合物,部分,或者成分,其在样品中的存在或者缺少将要被检测。被分析物包括但不限于生物分子,特别是生物标记物。此处所用的术语“生物分子”指与生物环境有关的物质,化合物或

者成分,其包括但不限于,糖类,氨基酸,肽,蛋白,低聚核苷酸,多核苷酸,多肽,有机分子,半抗原,抗原表位,生物细胞,生物学细胞的部分,维生素,激素及类似物。术语“生物标记物”指与生物环境的特定状态有关的生物分子,其包括但不限于,细胞周期的阶段,健康和疾病状态。生物标记物的存在,缺乏,减少,正相调节和特定状态相关并且可作为特定状态的征兆。“生物环境”指任何生物学环境,其包括,例如,生态系,纲,族,属,种,亚种,有机体,组织,细胞,病毒,细胞器,细胞形亚结构,朊病毒,和生物学来源的样品。

[0066] 本领域已知的示范性的捕获剂包括抗体,多核苷酸和适配子。

[0067] 本文所用的术语“抗体”指一种蛋白,其由活化的 B 细胞受到抗原刺激后产生,并可以特异性结合至该抗原,在生物系统中促进免疫反应。完全的抗体通常由四个子单元组成,包括两个重链和两个轻链。术语抗体包括天然和合成抗体,其包括但不限于单克隆抗体,多克隆抗体或者其片段。示范性的抗体包括 IgA, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgM 以及类似物。示范性的片段包括 Fab Fv, Fab' F(ab')₂ 以及类似物。单克隆抗体是可特异性结合至,因此也被定义为互补于另一个生物分子的单个特定的空间性和极性结构,称为“抗原表位”的抗体。多克隆抗体指不同的单克隆抗体混合物。在一些形式中,多克隆抗体可以是单克隆抗体混合物,其中至少两种单克隆抗体结合至不同的抗原表位。该不同的抗原表位可以在同一靶标,不同靶标,或者组合物上。抗体可以通过本领域众所周知的技术进行制备,比如免疫宿主并收集血清(多克隆)或者通过制备连续的杂交瘤细胞系并采集分泌性蛋白(单克隆)。

[0068] 本文所用的术语“多核苷酸”指由两个或两个以上单体组成的有机聚合物,所述单体包括核苷酸,核苷或者其类似物。术语“核苷酸”指由结合了嘌呤或者嘧啶碱,以及磷酸基的核糖或者脱氧核糖并且为核酸的基本结构单元的若干化合物中的任何一种。术语“核苷”指由和脱氧核糖或者核糖相结合的嘌呤或者嘧啶碱组成的化合物,并且特别在核酸中发现(如鸟嘌呤核苷或者腺嘌呤核苷)。术语“核苷酸类似物”或者“核苷类似物”分别涉及一个或多个的单个原子已被不同的原子或者不同的官能团替换的核苷酸或者核苷。相应地,术语多核苷酸包括任何长度,特别是 DNA, RNA, 类似物及其片段的核酸。三个或者三个以上核苷酸的多核苷酸也被称为核苷酸低聚物或者低聚核苷酸。”

[0069] 本文所用的术语“适配子”指可结合特定靶标的低聚核苷酸或者肽分子。特别地,核酸适配子可以包括,例如,已经通过重复的离体选择循环或等效物,SELEX(指数富集配位体系统进化)进行工程处理,以结合至各种分子靶标,比如小分子,蛋白,核酸,甚至细胞,组织和有机体的核酸物质。适配子可被用于生物工艺和治疗应用,因为它们可提供和抗体竞争的分子识别性能。肽适配子是设计成可与其它蛋白在细胞内部特异性结合以及相互作用的蛋白。肽适配子可以被衍生,例如,根据来源于酵母二杂化(Y2H)系统的选择策略。依据这种策略,附着于转录因子结合域的可变肽适配体环针对附着于转录因子活化域的靶蛋白进行筛选。该肽适配体与其靶标通过此种选择策略进行体内结合,被下游酵母标志基因的表达所检测。

[0070] 此处使用的术语“多配位体捕获剂”指可以通过包含在该试剂中的多配位体的特异性结合与靶标特异性结合的试剂。例如,多配位体捕获剂可以是捕获剂,其被设置为通过包含在该捕获剂中的多配位体的特异性结合与靶标特异性结合。多配位体捕获剂可以包括具有各种化学性质的分子(例如多肽,多核苷酸和/或小分子),并且可以包括由配位体形

成的捕获剂,以及附着在至少一个该配位体上的捕获剂。

[0071] 具体地,此处描述的多配位体捕获剂可以包括两个或两个以上各自能够结合靶标的配位体。此处所用的术语“配位体”指具有结合靶标的亲合力的化合物。这种亲合力可以采取任何形式。例如,此种亲合力可以按照非共价相互作用进行描述,比如在对酶中存在的基质特异性的并且可检测的酶中发生的结合类型。通常这些相互作用包括若干弱相互作用,比如疏水性,范德华力,和氢键,其通常同时出现。示范性的配位体包括由多个子单元组成的分子,所述子单元取自氨基酸,非天然氨基酸,和人工氨基酸,和有机分子,其各自对于特定靶标(例如蛋白靶标)具有可测量的亲合力。更特别地,示范性的配位体包括多肽和肽,或者其它分子,其能够被修饰为包括一个或多个官能团。这些在此公开的配位体,例如,可以具有靶标亲合力,可以与靶标结合,可以和靶标特异性结合,和/或可以与一个或多个其它配位体在结合至靶标时是结合可区分的。通常,这些在此公开的多配位体捕获剂将特异性结合至靶标。虽然包含在多配位体捕获剂中的单独的配位体不必要能够单独地特异性结合至靶标,这也是可以预期的。

[0072] 此处所用的术语“多肽”指由两个或两个以上氨基酸单体和/或其类似物组成的有机直链,环形,或者支化聚合物。术语“多肽”包括任何长度的氨基酸聚合物,包括全长的蛋白和肽,以及其类似物和片段。三个或者三个以上的多肽也被称为蛋白低聚物或者寡肽。具体地,术语“肽”和“寡肽”通常指具有 50 个以下氨基酸单体的多肽。此处所用的术语“氨基酸”,“氨基酸单体”,或者“氨基酸残基”指二十种天然存在的氨基酸,非天然氨基酸,和人工氨基酸中的任何一种,并且包括 D 和 L 旋光异构体。具体地,非天然氨基酸包括天然氨基酸的 D- 立体异构体(其包括可用的配位体结构单元,因为它们对酶降解不敏感)。术语“人工氨基酸”指易于用标准的氨基酸结合化学结合在一起,但是具有和天然氨基酸不相同的分子结构的分子。术语“氨基酸类似物”指其中一个或多个单独原子已经被不同的原子,同位素,或者不同的官能团替换,但还是与衍生该类似物的原始氨基酸相似的氨基酸。所有这些氨基酸均可使用标准的氨基酸结合化学过程(Lam, K. S. et al., 1997)用合成方式结合入肽或者多肽中。此处所用的术语“多肽”包括含一个或多个单体,或者非氨基酸单体的结构单元的聚合物。术语单体,子单元,或者结构单元指在适当的条件下可以化学结合至另外的具有同样的或不同的化学性质的单体,以形成聚合物的化合物。术语“多肽”进一步可以包括聚合物,其中一个或多个结构单元通过非酰胺或者肽键的化学键共价结合至另一个结构单元。在若干实施方式中,两个或两个以上配位体中的至少一个配位体包括一个或多个氨基酸残基,并且其可以由多肽形成。特别地,在若干实施方式中,两个配位体中的至少一个是包括三个至一百个单体的肽,并且特别地,是包括五个至八十个单体的肽。在一些实施方式中,该肽可以包括三至十个单体,并且特别地可以包括五个至七个单体。在一些实施方式中,该多配位体捕获剂可以由蛋白组成。

[0073] 本文所用的术语“蛋白”指具有特定二级和三级结构的多肽,其可以和其它被分析物,生物分子相互作用,特别地,其它生物分子包括其它蛋白, DNA, RNA, 脂质, 代谢物, 激素, 趋化因子, 和小分子。

[0074] 特别地,此处描述的捕获剂中所含蛋白可以是非天然蛋白,即,不存在于自然界并且不含人工助剂的蛋白。非天然蛋白包括可以由天然蛋白修饰衍生的蛋白。

[0075] 更特别地,在若干实施方式中,多配位体捕获剂可以由肽配位体构成,每个配位体

由一套独特的氨基酸构成,其中有一些氨基酸是非天然的,和/或被设计为具有用于特定任务的独特的化学功能。在一些实施方式中,根据预定实验设计,这些肽采用人工氨基酸合成和/或形成结构和/或功能与天然肽类似或者不同的非天然肽。包括一个或多个肽,多肽,或者蛋白配位体的多配位体捕获剂可以称为蛋白性质的多配位体捕获剂。

[0076] 在若干实施方式中,当多配位体捕获剂包括氨基酸配位体,由于氨基酸结构单元易于获取,或者不难以化学方式相对大量地合成,多配位体捕获剂可以低成本批量生产。合成氨基酸和肽的步骤是技术人员周知的,其被示范于实施例 1 的步骤中。

[0077] 在其它实施方式中,多配位体捕获剂包括具有非氨基酸化学性质的配位体。特别地,在一些示范性的实施方式中,多配位体捕获剂可以由多核苷酸(特别地是低聚核苷酸),小分子,和其它各种可能具有生物活性的配位体形成。

[0078] 此处所用的术语“小分子”指合成的或者生物学来源的有机化合物,其虽然可能包括单体和/或初级代谢产物,但不是聚合物。特别地,小分子可以包括非蛋白或者核酸的分子,其执行内源性的(例如靶标抑制或者激活)或者外源性的(例如细胞信号)生物学作用,在分子生物学中被用作工具,或者在医学中适合作为药物。小分子还可以和天然生物分子没有关系。通常,小分子的摩尔量低于 1kg mol^{-1} 。示范性的小分子包括次级代谢产物(比如 actinomycin-D),某些抗病毒药物(比如金刚胺和金刚烷乙胺),致畸形剂和致癌剂(比如大戟二萜醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯),天然产物(比如青霉素,吗啡和紫杉醇),以及技术人员依据对本文公开内容的理解可以确认的分子。

[0079] 在配位体是由非氨基酸性质的化合物形成的实施方式中,配位体还可以用人工化合物(比如核苷酸或者核苷类似物)合成,并且可以形成非天然配位体,其可能能够模拟实际上天然存在的相应分子。合成适合作为配位体的非氨基酸分子的步骤是本领域已知的。例如,组合这些包括了非肽类捕获剂的单体的步骤涉及对特定类别的配位体特异性的反应,比如在多核苷酸捕获剂的两个核苷酸之间形成磷酸二酯键,或者用于小分子捕获剂的常用有机合成通用的许多反应的任何一种(例如,酰胺键形成,C-C 键形成, S_N1 , S_N2 , E1, E2)。另外适于合成该分子的方法是技术人员可以确认的,将不做进一步的具体描述。

[0080] 在一些实施方式中,多配位体捕获剂可以由相同化学性质的配位体形成。在其它实施方式中,多配位体捕获剂可以由不同化学性质的配位体形成,技术人员依据对本文公开内容的理解将能够体会。

[0081] 特别地,在若干实施方式中,多配位体捕获剂的一个或多个配位体可以和同一捕获剂中所包含的其它任何一个配位体的化学性质不同。所得的多配位体捕获剂可以包括至少两种具有不同化学性质的化合物,其在此确定为嵌合捕获剂或者嵌合多配位体捕获剂。示范性的嵌合多配位体捕获剂包括但不限于小分子/肽,小分子/多核苷酸,和多核苷酸/肽。技术人员将能理解,这些包括多配位体捕获剂的配位体的化学性质是非限制性的,因为配位体的连续添加的不是通过这些配位体自身的组合,而是通过这些配位体所附的官能团实现的,如本公开内容所示。

[0082] 在一些实施方式中,多配位体的一个或多个配位体与同一多配位体捕获剂中所含的至少一个其它配位体无关,和/或与靶标无关。此处所用的术语在两个项目之间“无关”指由于在先建立的联系,特别是由于相同世系而缺乏连接或者联合。

[0083] 在此处描述的多配位体捕获剂中,所包含的两个或两个以上配位体的每一个均可

特异性结合该多配位体捕获剂的靶标,并且和其它配位体是结合可区分的。

[0084] 在本文中关于分子,特别是配位体的词语“结合可区分的”指基于其和特定分子特异性结合,并由此被定义为与特定分子互补的能力而可区分的分子。相应地,例如,如果第一分子可特异性结合第三分子,并且第二分子可特异性结合第四分子,该第四分子不同于第三分子,则该第一分子与第二分子是结合可区分的。如果第一和第二分子可特异性结合相同的第三分子,如果该第一分子特异性结合该第三分子的第一部分,而该第二分子特异性结合该第三分子的第二部分,该第三分子的第一部分不同于第二部分,则该第一分子与第二分子是结合可区分的。相应地,例如,如果第一配位体特异性结合靶标的第一部分或者部(例如靶蛋白的第一结合部位),而第二配位体特异性结合该靶标的第二部分或者部(例如靶蛋白的第二结合部位),该靶标的第一部分或者部不同于第二部分或者部,则结合相同靶标的该第一配位体和该第二配位体是结合可区分的。作为另一个实例,如果第一配位体结合靶标的第一部分或者部(例如靶蛋白的第一结合部位),第二配位体结合该靶标的第二部分或者部(例如靶蛋白的第二结合部位),该靶标的第一部分或者部不同于第二部分或者部,并且该第一配位体不结合该第二部分或者部,该第二配位体不结合该第一部分或者部,或者两者,则结合相同靶标的该第一和第二配位体是结合可区分的。

[0085] 特别地,例如,该两个或两个以上配位体可以被布置在该多配位体捕获剂中,以在该捕获剂与靶标结合后使该两个或两个以上配位体各自结合该靶标,比如通过和靶标的特异性结合。特别地,例如,该两个或两个以上配位体可以结合该靶标上的相邻结合位点。在这些实施方式中,该两个或两个以上配位体彼此通过共价键结合。

[0086] 术语“共价键结合”或者“共价连接”或者“共价键”指一种化学结合形式,其特征是在原子之间,或者在原子和其它共价键之间共享一对电子。示范性的连接至少两个配位体的共价键包括但不限于酰胺或者肽键,经修饰的迭氮化合物和三芳基膦之间的斯托丁格连接(参见图1和 E. Saxon et al., Science(2000), Vol. 287, 2007-2010, 其全文以参考方式合并于此),共价连接迭氮化合物和乙炔的1,2,3-三唑(参见图2和 V. D. Bock et al., Eur. J. Org. Chem. (2006), 51-68, 其全文以参考方式合并于此),共价连接磺酰叠氮和硫代酸的芳基磺酰胺(参见图3和 X. Hu et al., J. Am. Chem. Soc. (2008), Vol. 130, 13820-13821, 其全文以参考方式合并于此),以及醛和伯胺的形成瞬态半胺醛或者亚胺的偶合,其可被还原成仲胺或者叔胺(参见图4和 M. Hochgürtel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2002), Vol. 99, 3382-3387, 130, 13820-13821, 其全文以参考方式合并于此)。

[0087] 在一些实施方式中,该多配位体捕获剂包括复数个配位体,并且特别地可以包括两个至五个配位体,或者更多配位体,这取决于技术人员依据对本文公开内容的理解可确认标准下的实验设计。增加长度的多配位体捕获剂(例如,三个或者三个以上配位体)的性能可以包括,在结合至靶标后焓稳定性增强(导致增强的亲合力),以及在此结合相互作用中特异性增加。例如,包括基于肽的多配位体捕获剂的长多肽链可以采用3D折叠结构,从而增加可能的与靶标的三级相互作用数目。较少长度的多配位体捕获剂(例如,三个或者更少配位体)的性能可以包括,用于靶标结合的焓成本减少,并且合成负担减少。

[0088] 在有包括复数个配位体的多配位体捕获剂的实施方式中,所使用的配位体的精确数目可以取决于靶标的性质,配位体的化学性质,以及所期望的和该靶标的最终结合亲合力。

[0089] 此处所用的术语“结合亲和力”或者“亲和力”指与第一分子和第二分子的结合有关的亲和力。特别地,例如,结合亲和力可以指该结合强度的度量。例如,缔合常数,离解常数,上载率,脱载率,其它动力学和结合度量可以是结合亲和力的度量和/或其组成。结合亲和力受两个分子之间的非共价分子间相互作用影响,比如氢键,静电相互作用,疏水性相互作用,和范德华力。缔合常数和离解常数通常以配位体(即,被认为结合至另一个分子的分子)的浓度表示。除非上下文另有陈述,对亲和力和结合亲和力的定量和相对参照(relative references)被表示为第一分子和第二分子结合的离解常数。离解常数越小,该配位体的结合越紧密,或者该两个分子之间的结合亲和力越好。

[0090] 在若干实施方式中,对于配位体(比如6-或者7-肽),该配位体对靶标的结合的离解常数通常可达到 10^{-4} - 10^{-6} M。对于双配位体捕获剂(比如14-肽(参见图5))和三配位体捕获剂(比如22-肽(参见图6)),通常离解常数可分别达到 10^{-6} - 10^{-7} M和 10^{-7} - 10^{-8} M以及 10^{-8} - 10^{-9} M。在一个示范性的例子中,已显示了两个小分子配位体和靶标特异性接触,并且彼此共价反应,以形成离解常数 10^{-15} M的抑制剂(Lewis, W. G. et al., 2002; Manetsch, R. et al., 2004; Boume, Y. et al., 2004; Krasinski, A. et al., 2005)。

[0091] 此处描述的由不同化学性质的配位体组成的多配位体捕获剂在长度以及可实现的亲和力上不表现限制。唯一的要求是该多配位体捕获剂的每个配位体的化学性质容许存在若干官能团之一(例如,迭氮化合物或者乙炔,磺酰叠氮或者硫代酸,三芳基膦或者迭氮化合物,或者醛或者胺),相应地,其容许按顺序组合包括多配位体捕获剂的n-配位体,如图7-11所示,并在本公开内容中被进一步描述。

[0092] 在若干实施方式中,此处描述的多配位体捕获剂是直链捕获剂,即其中两个或两个以上配位体彼此以链状或者类似结构相连的捕获剂。本文公开的示范性的直链多配位体捕获剂在实施例7-21有描述,其包括由两个7-元D-肽配位体(1° 和 2°)组成的双配位体捕获剂(参见图5,图12,图13和图14),以及由三个D-肽配位体(1° , 2° ,和 3°)组成三配位体捕获剂(参见图6和图15)。

[0093] 在若干实施方式中,此处描述的多配位体捕获剂是支链捕获剂,即其中至少两个配位体中至少一个配位体位于或者延伸自该捕获剂的主要部分。特别地,支链捕获剂包括支链分子,比如支链多肽,其被设置为其两个或两个以上配位体中的至少一个配位体存在于该分子的支链部分中。示范性的支链多配位体捕获剂描述于实施例17,其包括,由两个7-元D-肽配位体(1° 和 2°)组成的双配位体捕获剂,其中该 1° 配位体在该 2° 配位体的非末端残基处连接该 2° 配位体,其显现出5-倍于类似的相应直链双配位体捕获剂的亲和力(参见比较图16A与图5),以及由三个7-元D-肽配位体(1° , 2° ,和 3°)组成的支链三配位体捕获剂,其中该 3° 配位体在末端残基连接支链双配位体锚(显示于图17B)(参见比较图18与图6)。

[0094] 在若干实施方式中,该多配位体捕获剂包括至少两个实质上不是以共价键连接的配位体。

[0095] 特别地,在一些实施方式中,多配位体捕获剂包括至少两个配位体不是同一天然分子的部分,以及,特别地,其不是该靶标的同一基质的部分。

[0096] 在一些实施方式中,多配位体捕获剂包括至少一个配位体,其选取及设计是独立于已知的可以结合靶标的化合物的。特别是在一些实施方式中,该多配位体捕获剂的至少

一个配位体不是模仿和 / 或来源于已知的可结合靶标的化合物。

[0097] 在一些实施方式中,多配位体捕获剂包括至少一个能够独自结合靶标的配位体。在一些实施方式中,一个或多个另外的配位体可以包括于该多配位体捕获剂中,该一个或多个另外的配位体在该捕获剂特异性结合靶标后接触该靶标。

[0098] 在此处描述的若干多配位体捕获剂中,捕获剂的结构以及配位体的数量,化学性质和可能的改进可以根据期望的对于所选的靶标的结合亲合力和结合特异性而决定。此处所用的术语“结合特异性”指多配位体捕获剂对靶标的结合亲合力和该多配位体捕获剂对参照分子的结合亲合力之间的倍数差异。

[0099] 在一些实施方式中,该多配位体捕获剂相对于参照分子的结合特异性为至少 5,至少 10,至少 20,或者至少 100。参照分子可以是任何分子,其与多配位体捕获剂的结合亲合力将与靶标和多配位体捕获剂的结合亲合力相比较。在一些描述配位体或者多配位体与不同靶标的结合的实施方式中,参照分子可以是不同于任何靶标的分子。例如,如果靶标是血清蛋白,则参照分子可以是另一种血清蛋白,胞浆蛋白,或者相对于该靶标共享世系的蛋白。在这些实施方式中,参照分子容许,例如,测量和监控配位体或者多配位体对于靶标的结合亲合力以及对于非靶标的参照分子的结合亲合力之间的差异。在一些描述了若干配位体或者多配位体和靶标差异性结合的实施方式中,参照分子可以由该靶标形成。在这些实施方式中,可以利用该参照分子测量和监控相关的该配位体或者多配位体与单一靶标的结合亲合力。在这些实施方式中,参照分子容许,例如,测量和监控各种配位体或者多配位体的结合亲合力之间差异的增加,比如在本公开的生产和 / 或识别多配位体捕获剂的方法期间。如上所示,多配位体捕获剂对于靶标的结合亲合力以及其对于参照分子的结合亲和力的差异可以称之为该多配位体捕获剂的结合特异性。

[0100] 在一些实施方式中,该多配位体捕获剂相对于参照分子的结合特异性可以该多配位体捕获剂对于和靶标相关的参照分子的特异性为基准。特别是在一些这类实施方式中,该和靶标有关的参照分子是该靶标的等位版本,该靶标的同源物和 / 或该靶标的修改形式。

[0101] 在一些实施方式中,该多配位体捕获剂对靶标的结合亲合力可以是,例如,比该锚配位体的结合亲合力高至少 10^6 ,至少 10^7 ,至少 10^8 ,至少 10^9 ,至少 10^{10} ,至少 10^{11} ,至少 10^{12} ,或者至少 10^{13} 。

[0102] 在一些实施方式中,该多配位体捕获剂对该靶标的结合离解常数等于或者低于 10^{-6}M , 10^{-7}M , 10^{-8}M , 10^{-9}M , 10^{-10}M , 10^{-11}M , 10^{-12}M , 10^{-13}M , 10^{-14}M , 10^{-15}M , 或者 10^{-16}M 。

[0103] 在若干实施方式中,该多配位体捕获剂可以被合成或者修饰以在该捕获剂中引进期望的特征。示范性的期望的特征是可以使多配位体捕获剂具有化学或者生物活性或者对其改进的特征。示范性的化学或者生物活性包括溶解度,特别是,水溶性,可检测性(包括在特殊环境中的可检测性),生物利用率(特别是到达被给予该捕获剂的个体的体循环的能力),致免疫力(特别是该捕获剂在被给予该捕获剂的个体中引起体液或者细胞介导免疫反应的能力),以及反应性(包括和化合物或者材料反应或者结合的能力,特别是结合另一种所感兴趣的化合物或者分子和 / 或表面的能力。通常可以在多配位体捕获剂合成期间或者之后通过添加另外的分子或者官能团引入期望的特征。示范性的可以带来化学或者生物活性或者对其改进的分子或者官能团包括亲水性或者疏水性的分子或者官能团(例如

聚醚或者多核苷酸),载体(例如疫苗载体),和标记(例如使该捕获剂可检测的分子或者官能团,比如编码分子,如编码多核苷酸,荧光染料或者金纳米微粒)。

[0104] 示范性的经修饰的多配位体捕获剂包括由两个 7-元 D-肽配位体组成的,并且在 N-末端被修饰以呈现用于和第三配位体结合的乙炔官能团的双配位体捕获剂(参见图 12),用具有链保护基的氨基酸侧链残基修饰的捕获剂,所述保护基可以在中性和碱性 pH 下进行的有机反应中稳定该捕获剂(见图 13 的结构),在 N-或者 C-末端被修饰以包含生物素分子,以允许该捕获剂在斑点印迹,蛋白质印迹,和 ELISA 类分析中可检测的的捕获剂(参见图 14 和 15),以及在 N-末端被修饰以包含荧光染料分子,以在包括荧光偏振,免疫细胞化学,和免疫组织化学的生物学分析中允许该捕获剂被检测的捕获剂(见实施例 6)。

[0105] 在一些实施方式中,多配位体捕获剂,特别是包括肽配位体的多配位体捕获剂,可以被合成或者修饰为包括一个或多个保护基(例如醇保护,胺保护,羰基保护基等等)。例如在一些实施方式中,该多配位体捕获剂可以在固相树脂上合成,并且在标准侧链保护基无损的条件下无损释放。在其它示范性的实施方式中,一个或多个残基的侧链保护可被用于使该多配位体捕获剂与其它化合物结合,特别是在这种结合被期望的应用中与其它配位体(例如 CuAAC,见实施例 12)结合。这些应用的实施例包括通过片段缩合整体合成该捕获剂的批量合成。在其它实施方式中,侧链保护可被用于获得多配位体环合。特别是多配位体捕获剂可以用第一官能团(例如 -SH)在该捕获剂的一端功能化,用第二官能团(例如 -SH)在另一端功能化。该第一和第二官能团即可彼此反应,以形成单闭环结构(例如二硫键)。此闭环结构显现出减少的构象熵,其可以进一步稳定该多配位体捕获剂和靶标的结合反应。在其它实施方式中,侧链保护可在单参数或者多参数分析中用于实现该多配位体捕获剂与基质或者表面的高定向附着。在任何这些实施方式中,一旦这三种应用中所述的任何化学转变完成后,则可以去除侧链保护(例如通过酸处理)。

[0106] 在若干实施方式中,多配位体捕获剂可以被合成或者修饰,以加入能使该多配位体捕获剂具有水溶性的化合物。示范性的化合物包括但不限于亲水性分子,比如聚醚(例如聚乙二醇(PEG)或者低聚核苷酸)及其它非离子的,无毒的,生物相容的,和高亲水性的聚合物。例如聚乙二醇化的捕获剂具有增强的水溶性和生物利用率而具有更好的治疗学的性能。

[0107] 在若干实施方式中,多配位体捕获剂的合成中可以采用或者被修饰为包含稳定的非放射性的(例如 ^2H , ^{15}N , 或者 ^{13}C) 或者放射性的同位素(例如 ^3T , ^{14}C , ^{35}S , 或者 ^{32}P),其可以允许定量测定,包括该靶标在捕获剂存在下的活性和/或该捕获剂对于该靶标的结合亲和力的表征。

[0108] 在若干实施方式中,多配位体捕获剂可以被修饰为接合至载体(比如钥孔血蓝素(KLH), BSA, 或者卵清蛋白)以培育抗该捕获剂的多克隆抗体,用于生化或者免疫定位研究。该多配位体捕获剂和该载体之间的接合可以通过马来酰亚胺(maleimide)方法实现,该方法可以将该多配位体捕获剂的半胱氨酸残基结合至载体蛋白。

[0109] 在若干实施方式中,多配位体捕获剂可以被修饰为结合生物素分子,以允许或者增强可检测性。生物素标记的多配位体捕获剂可以用链霉亲和素(streptavidin)连接的蛋白(比如碱性磷酸酶或者辣根过氧化物酶)进一步标记,其可以用于放大该捕获剂与其靶标的相互作用。在另一个实施方式中,通过适配子蛋白(比如链霉亲和素-Cy5),生物素标

记可以被转变成荧光发生团标记。

[0110] 在若干实施方式中,多配位体捕获剂可以被修饰为结合金纳米微粒标记,其允许通过包括暗场和电子显微镜检查在内的方法检验该捕获剂与复杂试样(例如组织切片)中的靶标的结合。此结合可以通过马来酰亚胺方法实现,该方法可以将该多配位体捕获剂的自由硫醇(例如-SH)结合至金纳米微粒。此结合还可以通过磺基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(磺基-NHS)方法实现,其中金纳米微粒在温和条件(pH 7.5至8.2)下与该多配位体捕获剂中的伯胺反应。自由硫醇和伯胺是官能团的例子,其为捕获剂的先存组分,或者可通过技术人员可以确认的化学作用来实现常规的修饰。

[0111] 在一些实施方式中,多配位体捕获剂可以通过添加另外所感兴趣的分子的而被修饰,比如另外的肽,小分子,或者蛋白,其对于某一靶标而不是该多配位体捕获剂的(多个)靶标具有预定的亲合力。在两个靶标均为蛋白的实施方式中,经修饰的多配位体捕获剂可被用于分析蛋白-蛋白相互作用。

[0112] 在若干实施方式中,此处描述的多配位体捕获剂是多配位体蛋白捕获剂,即至少包括对于特定蛋白具有结合亲合力的部分的捕获剂。示范性的多配位体蛋白捕获剂包括但不限于,具有任何能够特异性识别,接触并与具有蛋白质性质的靶标形成稳定复合物的化学性质的捕获剂。特别地,该多配位体蛋白捕获剂与靶蛋白的结合可以通过该蛋白捕获剂的一个或多个部分与该靶蛋白的一个或多个结合位点的特异性结合进行。在多配位体捕获剂是多配位体蛋白捕获剂的实施方式中,该两个或两个以上配位体可以相邻地结合该靶蛋白的相邻的结合位点。

[0113] 在一些实施方式中,多配位体捕获剂可以识别其它的具有生物学特性但非蛋白质性质的靶标。示范性的多配位体捕获剂包括但不限于,具有能够特异性识别,接触并且能够和具有非蛋白质性质的生物学靶标形成稳定复合物的任何化学性质的捕获剂,所述生物学靶标包括核酸,糖类,肽,小分子,和/或细菌孢子靶标。特别地,该多配位体捕获剂与该非蛋白靶标的结合可以通过该捕获剂的一个或多个部分与该靶标的一个或多个相邻的结合位点的结合进行。特别地,在DNA靶标上的聚酰胺二聚反应已被验证(Poulin-Kerstien, A. T. 和 P. B. Dervan, 2003)。在一些实施方式中,包括两个或两个以上天然产物的多配位体可以与核酸靶标特异性结合(Tse, W. C. 和 D. L. Boger, 2004)。此外,包括两个或两个以上肽的多配位体可以与糖类(Landon, L. A. et al., 2004),荧光染料(Marks, K. M. et al., 2004),或者细菌孢子靶标(Lusvardi, S. et al., 2009)特异性结合。此外,包括两个或两个以上多核苷酸的多配位体可以与肽靶标特异性结合(Williams, K. P. et al., 1997)。

[0114] 在一些实施方式中,多配位体捕获剂还可以识别非生物特性的靶标。示范性的多配位体捕获剂包括但不限于,具有能够特异性识别,接触并且能够和具有非生物学靶标形成稳定复合物的任何化学性质的捕获剂,所述生物学靶标包括金属和金属离子,半导体,和导电聚合物。特别地,该多配位体捕获剂与该非生物学靶标的结合可以通过该捕获剂的一个或多个部分与该靶标的一个或多个相邻的结合位点的结合,特别是特异性结合进行。在一些实施方式中,包括两个或两个以上天然产物的多配位体可以与Au或者Cr(Brown, S., 1997),砷化镓(Whaley, S. R. et al., 2000),二氧化硅(Eteshola, E. et al., 2005),或者聚吡咯聚合物(Sanghvi, A. B. et al., 2005)特异性结合。

[0115] 在若干实施方式中,对于靶标特异性的多配位体捕获剂的配位体是采用所得多配

位体捕获剂的相同的靶标进行识别。特别地,根据一些实施方式,该多配位体捕获剂的配位体的识别可以通过选择配位体进行,该配位体能在所选择的靶标上的相应的位点非共价地附着于该靶标,这些位点被布置为允许各结合的配位体与另外配位体之间形成共价键。

[0116] 在若干实施方式中,配位体的选择可以从候选配位体中进行,例如通过用靶标在允许被结合至该靶标,被该靶标催化的于候选配位体之间形成共价键的条件下接触候选的配位体一段时间。

[0117] 在若干实施方式中,至少一个候选的配位体与至少一个其它候选的配位体无关和/或与该靶标无关。在一些实施方式中,所有被提供的候选配位体彼此无关和/或与该靶标无关。特别地,在一些实施方式中,候选的配位体包括起初不知道能够结合该靶标的化合物。

[0118] 在一些实施方式中,候选的配位体包括起初就知道能够结合该靶标的化合物或者其一部分。

[0119] 在一些实施方式中,可以根据候选配位体已知的对该靶标的结合能力选择配位体,在一些这类实施方式中,是根据在该靶标上所感兴趣的特异性位点(例如抗体结合位点和相应的抗原表位)。与该配位体结合该靶标的能力(例如结合亲合力和/或特异性)有关的其它特点也可以在进行选择时被考虑。

[0120] 在一些实施方式的任何情况下,进行配位体选择可以通过设计配位体和/或候选的配位体以在该配位体上选择或者引进期望的特征。

[0121] 示范性的期望的特征是可以该配位体能够结合或更好地结合所选择靶标和/或所选择靶标中的特异性位点的特征。例如在一些实施方式中,该两个或两个以上配位体中至少一个可以被修饰为获得该靶标上的特异性位点的结合(例如,基于该靶标上的该位点的配位体亲合力和特异性)。在一些实施方式中,配位体还可以被设计成模拟能够被该靶标,更特别的是能够被该靶标上所感兴趣的特异性位点特异性识别的分子结构(比如核苷酸序列)。在一些实施方式中,可以通过在候选的配位体上插入一个或多个官能团修饰配位体,以获得特异性结合所感兴趣的靶标的能力。在一些实施方式中,配位体可以来自预筛选程序,其根据特异性结合所感兴趣的靶标或者其上的特异性位点的能力预先选自候选的配位体。在一些这类实施方式中,还可以根据以预定亲合力或者选择性结合所感兴趣的位点的能力对配位体进行选择。

[0122] 其它示范性的期望的特征取决于实验设计。例如在一些实施方式中,配位体或者候选的配位体可以被设计成确保所得的多配位体捕获剂具有水溶性。特别地,在一些这类实施方式中,配位体可以被设计成包括配位体的亲水性结构单元,比如包含聚(亚乙基)乙二醇,胺,羧酸,羟基,或者迭氮官能团的单体。在其它的示范性的实施方式中,配位体或者候选的配位体可以被设计成呈现对生物分子酶(比如蛋白酶)的稳定性。在一些这类实施方式中,由于生物分子酶对于立体化学,序列,和官能团是高选择性的,可以根据这种限制设计生物学耐受的候选配位体。非天然氨基酸包括任何天然氨基酸的D旋光异构体,且示范于实施例2的库中。人工氨基酸指易于用标准的氨基酸耦合化学作用彼此结合,但是具有不同于天然氨基酸的分子结构的分子。实施例1的Fmoc-Az4-OH, Fmoc-Az8-OH, 和 Fmoc-D-Pra-OH 是示范性的人工氨基酸。

[0123] 在配位体或者候选配位体上被选择或者引入的其它期望的特征是可以使配位体

或者候选的配位体能够或更好地与多配位体捕获剂中的其它配位体连接的能力。

[0124] 特别地,在此处描述的多配位体捕获剂中,成对配位体之间通过该配位体上存在的官能团进行共价结合,以使得该两个个体配位体与该靶标结合后,这些官能团能够反应形成共价键。

[0125] 此处所用的术语“官能团”指分子结构内的特定原子基团,其负责该结构的特定化学反应。示范性的官能团包括技术人员可以确认的碳氢化合物,含卤素基团,含氧基团,含氮基团和含磷基团以及硫。特别地,在本文公开内容意义上的官能团包括羧酸,胺,三芳基膦,迭氮化合物,乙炔,磺酰叠氮,硫代酸和醛。特别地,例如,第一官能团和第二官能团可以被选择为包括以下结合搭配:羧基和胺基,叠氮化物和乙炔基团,叠氮化物和三芳基膦基团,磺酰叠氮和硫代酸,以及醛和伯胺。技术人员依据对本文公开内容的理解可以确定其它官能团。此处所用的术语“相应的官能团”指可以和另一官能团反应的官能团。因此,可以彼此反应的官能团可以被称为相应的官能团。

[0126] 术语“存在”在用于关于化合物或者官能团时指为保持附着的化合物或者官能团的化学反应性而进行的附着。相应地,存在于配位体上的官能团能在适当的条件下进行一种或多种化学反应,其可以化学表征(chemically characterize)该官能团。

[0127] 特别地,在两个或两个以上配位体通过修饰的斯托丁格连接以共价键联系的实施方式中,这些官能团由叠氮化物和三芳基膦形成,并且该反应为化学选择性连接,其即使在液相环境中也可通过在叠氮化物和三芳基膦基团之间形成酰胺键而形成稳定的共价加合物(图1)。在两个或两个以上配位体通过生物正交的酰胺化反应以共价键联系的实施方式中,这些官能团由磺酰叠氮和硫代酸形成,其反应形成酰基磺酰胺(图3)。在两个或两个以上配位体通过还原瞬态半酰胺和亚胺以共价键联系的实施方式中,这些官能团由醛和伯胺之间的相互作用形成(图4)。

[0128] 在两个或两个以上配位体通过生物正交的1,3-两极Huisgen环化加成反应以共价键联系的实施方式中,这些官能团由叠氮化物和乙炔形成,它们进行反应,以形成1,2,3-三唑基团(图2)。

[0129] 在一些实施方式中,该官能团原存在于选定的配位体或者候选的配位体中。在一些实施方式中,用于连接该配位体与另一配位体而存在的官能团是被引入配位体或者候选配位体的期望的特征。特别地,在一些这类实施方式中,有可能修饰配位体或者候选的配位体,以引入官能团,其能够特异性地使该候选配位体和另外配位体之间形成共价键。

[0130] 在一些实施方式中,存在于配位体和/或候选配位体上的用于连接其它配位体的官能团对于所感兴趣的靶标和其上存在的官能团不起反应(例如,当该靶标是生物学靶标时,要在修饰的斯托丁格连接中被连接的叠氮化物和三芳基膦(E. Saxon et al., Science(2000), Vol. 287, 2007-2010,其全文以参考方式合并于此)。

[0131] 在一些实施方式中,选定的配位体包括至少一个锚或者初级配位体,以及至少一个第二配位体,其可以用此处描述的方法根据它们对于靶标的亲合力进行选择。

[0132] 特别地,初级配位体可以通过将候选的配位体与靶标接触,并选择可特异性结合该靶标以形成候选配位体靶标复合物的候选初级配位体,从复数个候选的初级配位体中进行选取。

[0133] 第二配位体因此可以通过将复数个候选的第二配位体与初级配位体靶标复合物

在允许形成第二配位体初级配位体靶标复合物的条件下接触一段时间,并选择可特异性结合该初级配位体靶标复合物并且共价连接该初级配位体的第二配位体,而进行选择。

[0134] 特别地,初级配位体可以任选地被修饰,以引入能在靶标催化的反应中特异性结合相应的第二官能团的第一官能团。该修饰的初级配位体因此可以与靶标接触而形成被修饰的初级配位体靶标复合物,其被用于选择该第二配位体。

[0135] 另外的配位体可以根据实验设计用类似的用于识别第三配位体,第四配位体等诸如此类的配位体的方法进一步选取,直到达到所期望的配位体数量。

[0136] 在若干实施方式中,复数个各种候选的配位体(例如候选的初级配位体,候选的第二配位体,候选的第三配位体,等等)中的至少两个可以彼此不同。特别地,可以用来源于候选配位体的先前选取信息对复数个候选的配位体进行选择。例如,该复数个候选的第二配位体可以用来源于该第一复数个候选配位体的信息从复数个候选的第二配位体中选取,以增加该候选配位体的亲合力。

[0137] 在若干实施方式中,该复数个候选的配位体中至少一个被附着于基质。此处所用的术语“附着”或者“附着的”指通过键,连接,力或者束缚连接或者组合,以使两个或两个以上组分保持在一起,包括直接或者间接的附着,其中,例如,第一分子直接与第二分子或者材料结合,或者一个或多个中间分子被布置在第一分子和第二分子或者材料之间。此处所用的术语“基质”指置于下面的支持体或者基层。示范性的基质包括固体基质,比如玻璃板,微量滴定孔板(microtiter well plates),磁性小球,硅片,以及技术人员依据对本文公开的内容可以确认的另外的基质或者表面。

[0138] 特别地,在一些实施方式中,复数个候选的配位体各自被附着于不同的基质或者基质的部分,以使得包括各候选配位体的复合物可以有别于另外复合物被分隔检测。在一些这类实施方式中,这些候选的配位体被附着于小球上,候选的配位体各自以一配位体一小球的方式特异性附着于单个的小球上。在另一个实施方式中,这些候选的配位体被附着于表面上的特定位置,候选的配位体各自以一配位体一位置的方式附着于预定的位置。

[0139] 特别地,在若干实施方式中,可以在库的帮助下选择用于多配位体捕获剂的配位体。例如,初级和第二候选配位体可以被提供于库中,然后用初级配位体的靶分子和/或靶分子的复合物筛选该库。

[0140] 在被引入多配位体捕获剂的配位体包括多肽,特别是肽的实施方式中,蛋白库可被用于识别该配位体,其包括用于筛选的候选的多肽,比如3至10元肽。特别地,在一些实施方式中,候选的配位体可以存在于一小球一化合物(OBOC)的肽文库上,该方法被描述在例如Lam, K. S. et al., 1997; Furka, A. et al., 1991; Geysen, H. M. 和 T. J. Mason, 1993等文献中,其全文以参考方式被合并于此。技术人员依据对本文公开内容的理解可以确认的另外的库也可以使用。接触所感兴趣的靶标后,可以根据技术人员可以确认的若干方法进行命中检测,其包括实施例部分进一步示意的的方法。

[0141] 在被引入该多配位体捕获剂的配位体包括多核苷酸,特别是低聚核苷酸的实施方式中(参见图9),可以合成低聚核苷酸配位体的库以识别这些配位体,例如在聚苯乙烯小球上用标准的亚磷酰胺和硫代亚磷酰胺化学反应使用一小球一低聚核苷酸(S-ODN或者S₂-ODN)方法(Yang, X. et al., 2002)。特别地,在这些实施方式中,多核苷酸捕获剂的每个配位体在长度上通常可以包括20-30个核苷酸。接触靶标后,可以用序列进行命中检测,该

序列包括但不限于,由于序列结合 5' 和 3' 固定引物序列而可以进行的测序,所述固定的引物序列啮合该低聚核苷酸配位体的组合的库片段,允许在测序之前实现下游 PCR 扩增。基于小球的 S-ODN 库的多样性要素可以从标准单体 (例如, A, T, G, C, U) 增加,以包括存在一个或多个官能团的非天然单体,其可以包括乙炔负载的嘧啶三磷酸盐 (Gramlich, P. M. E. et al., 2008) 和 5' - 溴己基亚磷酰胺 (其通过用叠氮化钠处理被迅速转变为 5' - 叠氮己基修饰的小球上单体)。非天然修饰增加了这些捕获剂的核酸酶稳定性,并提供了用于从个体初级配位体构建多配位体的官能团。通过将复数个候选的配位体 (经第二官能团修饰) 与初级配位体 / 靶标复合物接触,使该两个配位体之间特异性结合和共价反应,来选择第二配位体。这些官能团可以是叠氮化物和乙炔 (如图 9 所示),不过其还可以包括如图 1 或者图 3 所示的官能团。第三,第四,等等配位体可通过类似方法识别。

[0142] 在被引入该多配位体捕获剂的配位体包括小分子的实施方式中,小分子的库可以由标准的固相有机合成 (SPOS) 和一小球一分子方法制备。小分子捕获剂的各配位体可以包括一个 (如图 10 所示) 或一个以上分子结构单元。库通常包含几十个结构单元,其形成 10^2 至 10^3 个配位体。通过光可裂解的 (例如 2- 硝基苯基) 或者 CNBr- 可裂解的 (例如甲硫氨酸) 连结点释放单个小球所连化合物可以解码命中物,随后质谱分析。另外,各组合步骤之后的分子标记编码容许通过间接手段解码命中物 (Baldwin, J. J. et al., 1995)。小分子捕获剂的各初级配位体被合成为存在官能团。通过将复数个候选的配位体 (经第二官能团修饰) 与初级配位体 / 靶标复合物接触,以允许该两个配位体特异性结合和共价反应,来选取第二配位体。这些官能团可以是叠氮化物和乙炔 (如图 10 所示),不过其还可以包括如图 1 或者图 3 或者图 4 所示的官能团。第三,第四,等等配位体可通过类似方法识别。在一些情形下,这些官能团可以与靶标特异性结合,变成该捕获剂的组成部分。小分子捕获剂可以具有作为药物的效能。

[0143] 在多配位体捕获剂是由嵌合的捕获剂 (比如小分子 / 肽,小分子 / 多核苷酸,和多核苷酸 / 肽 (例如参见图 11,作为方案之一)) 形成的实施方式中,有关的配位体通过结合了特定的跟识别具有如上所述的期望的化学性质的配位体有关的步骤的方法进行识别 (参见对于多核苷酸的图 9,对于小分子的图 10,和对于肽的图 7 和 8)。在这些实施方式中,识别这些配位体和可能产生捕获剂的全部方法类似于用于其它捕获剂的方法,因为通过用两个被合成为显现互补官能团的个体配位体接触靶标并且促进它们之间的反应,会发生连续的多配位体组合。有效的肽与低聚核苷酸的结合已有显示 (Halpin, D. R. et al., 2004),其证明了大量合成嵌合的多配位体捕获剂是可行的。如果在一个或多个配位体的内部位点存在官能团,任何嵌合的多配位体捕获剂都可以具有支链组合物。嵌合的捕获剂可以有效地与具有不同化学性质的抗原表位的蛋白反应,比如包括两个结合槽的蛋白 (例如,一个槽用于 DNA 结合,第二个槽用于结合其它蛋白)。

[0144] 在多配位体捕获剂是支链捕获剂的实施方式中,支链结构可以通过在组成该捕获剂的一个或多个配位体的内部位点处存在官能团而获得,与该配位体的化学性质无关。在多配位体捕获剂是直链捕获剂的实施方式中,官能团可以换为存在于该配位体的末端之一。

[0145] 在配位体用叠氮化物和乙炔之间的生物正交的 1,3- 两极 (dipolar) Huisgen 环化加成反应连接的实施方式中,为了和靶标的特异性反应而筛选大库 (比如图 7 所示的库)。

用乙炔官能团修饰最佳结合配位体,使之变成“锚配位体。”在二次筛选中,该乙炔修饰的锚配位体在附有叠氮化物官能团的第二配位体的综合小球库的存在下进行培育 (incubate)。此筛选的结果是由接触该靶标的两个配位体之间的 1,2,3- 三唑共价连接形成的“双配位体”。该双配位体可以作为新的锚配位体 (经乙炔修饰),并且相同的小球库被用于识别三配位体捕获剂的第三配位体,等等。相反,如果该锚配位体包含叠氮基官能团,则该第二,第三,等等候选配位体可以包含乙炔官能团。此处所用的术语“锚配位体”指第二配位体结合的配位体。通常,在所公开方法的上下文中,在靶标催化反应中第二配位体是以共价键连接该锚配位体。

[0146] 在配位体用经过修饰的斯托丁格连接连接的实施方式中,可以根据类似于图 7 所示的方法构建用于合成多配位体捕获剂的库,除了 1° 和 2° 筛选的锚配位体用三芳基膦而非乙炔基团功能化。

[0147] 在配位体用酰胺化反应连接的实施方式中,合成多配位体捕获剂的库可以根据类似于图 7 所示的方法构建,除了 1° 和 2° 筛选的锚配位体用硫代酸而非乙炔基团功能化并且小球库用磺酰叠氮官能团修饰。另外,在锚配位体附有磺酰叠氮官能团以及小球库附有该硫代酸的情况下,极性可以逆转。

[0148] 在配位体通过还原氨基化作用连接的实施方式中,合成多配位体捕获剂的库可以根据类似于图 7 所示的方法构建,除了 1° 和 2° 筛选的锚配位体用醛而非乙炔基团功能化并且该小球库用胺官能团 (例如 N- 末端的肽配位体) 修饰。另外,在锚配位体附有胺官能团和小球库附有醛的情况下,极性可以逆转。

[0149] 在一些实施方式中,对应靶标的该多配位体捕获剂的两个或两个以上配位体可以用此处描述的方法被提供于多配位体中,其包括选择能在相应的结合位点特异性结合该靶标的候选配位体,其中这些结合位点在该靶标上被布置为允许结合在各位点上的各配位体之间共价连接。在若干实施方式中,至少一个候选的配位体与至少一个其它候选的配位体无关和 / 或与该靶标无关。此处所用的术语“相应的结合位点”指分子在另一分子上的结合位点。因此,靶标上的给定配位体的位点可以被描述为该配位体的相应的结合位点。

[0150] 特别地,在一些实施方式中,这些候选的配位体包括第一复数个候选配位体和第一复数个候选配位体,其各自可能包括与该复数个候选配位体的至少一个其它配位体无关的至少一个配位体。在这些实施方式中,配位体的选择可以通过以下步骤进行:将该靶标与第一复数个候选配位体接触,以选定可特异性结合该靶标的锚配位体,其存在可在该靶标催化的反应中与相应的第二官能团特异性结合的第一官能团。这样提供的锚配位体即可与该靶标接触以提供锚配位体靶标复合物;其随后接触复数个存在第二官能团的第二候选配位体。然后选择可特异性结合该锚配位体靶标复合物,并且共价连接该锚配位体的该第二复数个候选配位体的候选配位体,由此提供多配位体。候选配位体的选择步骤可以任选地被重复,其可采用该多配位体作为锚配位体,以在该多配位体中加入另外的配位体。

[0151] 特别地,在一些实施方式中,锚配位体的选择可以通过选择可特异性结合靶标的候选配位体;以及修饰该选定的候选配位体以引入能在该靶标催化的反应中特异性结合相应的第二官能团的第一官能团,由此提供存在第一官能团的锚配位体。

[0152] 在一些实施方式中,候选配位体的选择可以重复,即用该多配位体作为锚两次或者两次以上,三次或者三次以上,四次或者四次以上,五次或者五次以上,六次或者六次以

上,或者七次或者七次以上,以在该多配位体中加入另外的配位体。

[0153] 在一些实施方式中,采用该多配位体作为锚,重复选择候选的配位体,直至更高阶的多配位体捕获剂对靶标的结合亲和力比该锚配位体的结合亲和力高至少 10^2 ,至少 10^3 ,至少 10^4 ,至少 10^5 ,至少 10^6 ,至少 10^7 ,至少 10^8 ,至少 10^9 ,至少 10^{10} ,至少 10^{11} ,至少 10^{12} ,或者至少 10^{13} 。此处所用的更高阶的多配位体捕获剂指具有三个或者三个以上配位体的多配位体捕获剂。在一些在此公开的识别和生产多配位体捕获剂的方法的实施方式中,第三,第四,第五,第六,第七,等等配位体可以被添加至双配位体捕获剂。这可以用,例如,用多配位体捕获剂作为锚配位体重复该靶标催化添加步骤来实现。得到的多配位体捕获剂为更高阶的多配位体捕获剂。具有两个,三个,四个,五个,六个,和七个配位体的多配位体捕获剂可以分别被称为双配位体,三配位体,四配位体,五配位体,六配位体,和七配位体。

[0154] 在一些实施方式中,重复选择候选配位体,直至该多配位体捕获剂对该靶标的结合离解常数等于或者低于 10^{-6}M , 10^{-7}M , 10^{-8}M , 10^{-9}M , 10^{-10}M , 10^{-11}M , 10^{-12}M , 10^{-13}M , 10^{-14}M , 10^{-15}M , 或者 10^{-16}M 。

[0155] 在一些实施方式中,第一和第二复数个候选配位体总体上或者部分上相同或者不同。

[0156] 在一些实施方式中,在一个或多个,并且可能全部选择候选配位体的循环中,相同的或者不同的复数个候选配位体被用作第二复数个候选配位体,其中锚配位体的选择是通过:选择能够特异性结合靶标的候选配位体;以及修饰选定的候选配位体以引入第一官能团。

[0157] 在一些实施方式中,在一个或多个,并且可能全部选择候选配位体的循环中,相同的或者不同的复数个候选配位体被用作第一和/或第二官能团,其中锚配位体的选择是通过:选择能够特异性结合靶标的候选配位体;以及修饰选定的候选配位体以引入第一官能团。

[0158] 在一些两个或两个以上配位体由肽或者多肽形成的实施方式中,该多配位体捕获剂可以形成蛋白性质的多配位体捕获剂,并且以上方法可用于合成蛋白性质的多配位体捕获剂。

[0159] 在一些实施方式中,可以进行实施例部分示范的关于肽配位体,蛋白靶标和三唑连接的步骤。技术人员将理解,该方法加以必要的变更可以用其它的配位体,靶分子和共价连接进行。

[0160] 根据该方法,肽锚配位体可以用第一大肽文库识别,该第一大肽文库可以用技术人员已知的方法合成的肽进行制备。特别地,采用筛选法,该肽锚配位体在该第一库中进行选择,以具有对于所感兴趣的蛋白的预定亲和力。特别地,该肽锚配位体的选择方法可以包括,选择序列以使该肽锚配位体实现期望的亲和力和/或选择性。

[0161] 然后第二配位体可以用第二大肽文库进行识别,该第二大肽文库可以由和第一库相同(或者甚至不同)类型的氨基酸结构单元制备。如果该肽锚配位体具有一个或多个叠氮化物功能化的氨基酸,则来自第二库的该肽将包含至少一个或多个乙炔功能化的人工氨基酸。进行第二筛选,其涉及针对相同蛋白,但是在过量该肽锚配位体存在下的第二肽文库。只有那些能够恰好以正确的方向接触到该蛋白质表面以及该肽锚配位体的第二配位体会反应形成 1,2,3-三唑连接。因此,通过将该锚配位体和该第二配位体相对于彼此或者相

对于该蛋白质表面正确地定向,该蛋白质表面提供了用于此方法的催化剂。

[0162] 根据此处描述的一些实施方式的方法被示意于图 19。特别地,在图 19 的图示中,有荧光性标记的所感兴趣的蛋白 (11) 从肽库 (12) 被筛选出来。

[0163] 该库可以用一小球一化合物 (OBOC) 方法在小球上构建 (Lam, K. S. et al., 1997; Furka, A. et al., 1991; Geysen, H. M. 和 T. J. Mason, 1993)。通过这种方式,各小球包括独特的肽 (13),且该肽由天然氨基酸,非天然氨基酸 (D- 立体异构体),或者人工氨基酸 (其可以包含叠氨基或者乙炔官能团) 组成。

[0164] 该库本身可用标准的耦合化学过程组合 (Carpino, L. A. et al., 1994)。该蛋白 (11) 和该库 (12) 在特定蛋白浓度下被培育一段时间,然后通过它们的荧光识别被‘命中’的小球 (14)。通常 0.1% 或者更少的小球会被识别为命中的小球,并和非命中的小球 (15) 分离。用标准的化学过程从该小球去除该蛋白,并且用诸如 Edman 降解法 (Laursen, R. A. 1971) 或者质谱分析 (Wang, X. et al., 2005; Lewis, J. K. et al., 2000) 对小球上的肽进行测序。

[0165] 一旦肽序列 (16) 被识别,即可制备关于氨基酸频率对氨基酸的直方图 (17)。然后可以制备更集中的第二库 (18),其采用大多数经常被识别的氨基酸,针对蛋白 (11) 进行再筛选,并且被命中小球再次通过它们的肽序列 (16) 识别。此第二库可以包含稍长的肽,该筛选过程可以包括较低浓度的蛋白 (11)。可以重复此方法直至获得一个或多个具有期望的亲合力肽锚配位体 (19)。然后大量制备这些肽,用于筛选过程中的第二阶段,以识别双配位体捕获剂。其它用于识别锚配位体的方法也可以被使用,它们各有利弊。例如,可以用噬菌体展示方法识别肽 (Smith, G. P. 和 V. A. Petrenko, 1997),然后可以用叠氮化物或者含乙炔的人工氨基酸修饰该肽,以产生集中的 (focused) 库,然后针对所感兴趣的蛋白筛选该库。其它方法同样可以适用。在各种其它因素中,该肽锚配位体的亲合力将取决于该肽中的氨基酸数目,以及其筛选所针对的蛋白。在若干实施方式中,对于捕获剂 (比如 6- 元或者 7- 元),通常可实现约为 10^{-4} - 10^{-6} M 的亲合力,其至少与某些现有技术的捕获剂类同。

[0166] 然后可以根据图 20 所示的此处描述的一些实施方式的方法进行第二配位体的识别以及双配位体捕获剂的形成。来自上述筛选程序的肽锚配位体 (19) 之一被添加至含所感兴趣的蛋白 (11) 的溶液,其溶液浓度取决于该肽锚分子的结合亲合力。通常对于 10^{-6} M 的结合亲合力,几微摩尔至十微摩尔的浓度已经足够。

[0167] 然后针对第二候选配位体 (21) 的库筛选该肽锚配位体 / 蛋白溶液。此库的构成类似于肽锚配位体 (12) 的候选库,除了一些肽锚配位体是叠氮化物功能化时人工氨基酸组分 (22) 包含乙炔功能团。相反,如果该肽锚配位体包括乙炔功能化的氨基酸成分,则该候选第二配位体将包含叠氨基功能化的氨基酸组分。如同先前描述的筛选一样,该命中的小球 (23) 通过它们的荧光而被识别,并和非命中的小球 (15) 分离。而命中的小球可以包含一定量的双配位体捕获剂,其由该小球结合的肽与该肽锚配位体经蛋白催化耦合形成,大多数在命中小球 (23) 上的肽可能是非反应的第二配位体。用标准化学方法从该小球去除该蛋白和任何非反应的肽锚配位体,用标准方法对该小球上的肽 (24) 进行测序,并制备关于氨基酸频率对氨基酸的直方图 (25)。然后制备更集中的第二库 (26),其采用大多数通常被识别的氨基酸,针对该蛋白 (11) 再次筛选,然后通过它们的肽序列 (24) 再次识别命中的小球。此第二配位体的第二库可以包含稍长的肽,并且该筛选过程可以包括较低浓度

的蛋白 (11)。

[0168] 由第二配位体的筛选测定双配位体是否形成可以根据若干方法进行。一种可能的方法是以来自该第二配位体肽序列的检测信息为基础。序列同源性,特别是关于同一性和该肽内的人工氨基酸的位置可以提供线索。另外的可能的方法以大量合成第二配位体,随后用该肽锚配位体和该蛋白进行原位点击实验为基础。此外,可以进行另外的筛选,其类似于图 19 中的描述,但是全部双配位体在小球上合成,可能有一些序列变化,对照 (controls) 的添加等等。最后,被识别的候选双配位体捕获剂 (27) 可以被大量合成,测量它们对于该蛋白的结合亲和力,将其与该肽锚配位体 (19) 的结合亲和力比较。该双配位体捕获和该肽锚配位体相比,可以获得 10 到 100 之间的结合亲和力增加 (即亲和力从 10^{-6}M 增加至 10^{-7}M 或者 10^{-8}M 或以下)。

[0169] 如果期望的亲和力和 / 或选择性没有实现和 / 或如果根据实验设计,期望更长的捕获剂,该双配位体本身可以被用作锚配位体,并且如果需要制备三配位体,可以重复图 20 所述的方法。

[0170] 图 7 提供了参考,并显示了提供三配位体的方法示意图。在初级 (1°) 筛选中,完整的 OBOC 库和标记靶标被一起培育。通过直接或者间接检测该标记识别命中物,如实施例 3-5,7,和 11 所述。用第一官能团修饰该 1° 筛选中的命中物,然后其在对该标记的靶标和用第二官能团修饰的第二 (2°) 配位体组成的第二 OBOC 库的筛选中被作为锚配位体。在一定条件下,该锚配位体和第二配位体同时与该靶标结合,并且官能团彼此共价连接。所得的捕获剂为双配位体,如实施例 7 所述。在第三 (3°) 筛选中,重复该方法,但是这次用来自该 2° 筛选的双配位体 (参见图 12) 作为新的锚单元,其允许快速识别三配位体捕获剂 (参见实施例 11)。

[0171] 通过使用由选定的初级配位体和选定的第二配位体的共价连接获得的 n -配位体,然后使用此构造作为锚配位体,用于选择进一步的 n -阶配位体,可以添加另外的配位体。实施例 11 显示了示范性的例子,其中由三个配位体组成的三配位体捕获剂被识别。应注意此三配位体可以用官能团进一步修饰,并针对由第二官能团修饰的第四 (4°) 配位体组成的 OBOC 库进行筛选。用官能团修饰该 $(n-1)$ -捕获剂以及针对由第二官能团修饰的 n -配位体组成的 OBOC 库筛选此构造的方法可以重复多次,直至达到期望的物理,化学,和 / 或生物学性质。例如,但不限于,可以添加至多个配位体,特别是至多七个配位体或者两个至五个配位体。

[0172] 在若干实施方式中,由于包括多配位体捕获剂的配位体数目增加,该捕获剂对于所感兴趣的靶分子的亲和力将显著地增加。在一些实施方式中,这种效应非常大,如果形成双配位体,可以使两个对于蛋白呈现 10^{-6}M 亲和力的配位体呈现 10^{-12}M 亲和力。特别地,该 n -配位体的亲和力可以和该个别配位体组分的亲和力产品一样高。在若干实施方式中,每个额外配位体可实现 10^2 - 10^3 的产品亲和力增加 (见实施例 10,14,和 17)。

[0173] 在一些实施方式中,由于包括该多配位体捕获剂的配位体数目增加,该捕获剂对于所感兴趣的蛋白的选择性也增加。此处提供非限制目的,只是以指导为目的的可能解释是,包括该捕获剂的配位体是在更大区域的蛋白质表面取样,并且该蛋白质表面是该蛋白的独特指纹。由于包含在该多配位体捕获剂中的配位体数目增加,在此配位体和该靶标之间的接触通常也会增加。这些接触可以包括范德华力,氢键,静电,和疏水性相互作用。增

加的特定接触的数目通常可促进增加该捕获剂对于该靶标的选择性。

[0174] 在一些该多配位体捕获剂种有任意的配位体连接另外配位体,以使其从该肽第二配位体内的非末端氨基酸分叉的实施方式中,可以生产支链多配位体捕获剂。图 8 提供了参考,其中显示了提供支链三配位体捕获剂的方法示意图。该用于选择支链双配位体的方法(通过图 8 的 2° 筛选)接近等同于图 7。如图 8 所示,图 7 识别的相同的存在第一官能团的锚配位体在针对该标记靶标和由第二官能团修饰的第二(2°)配位体组成的第二 OBOC 库的筛选中被用作锚配位体,但是应注意,存在此第二官能团的人工氨基酸位于该库中的第二(2°)配位体的非末端位置。在一定条件下,该锚配位体和第二配位体同时与靶标结合,并且该官能团彼此共价结合。

[0175] 所得的捕获剂是支链双配位体,如实施例 17 和图 16A 所示。在第三(3°)筛选中,重复该方法,但是这次使用来自该 2° 筛选的支链双配位体作为新的锚单元,以允许快速识别三配位体捕获剂(参见图 18)。在图 8 的 3° 筛选中,第三(3°)配位体的 OBOC 库可以在末端位置存在官能团并形成具有单个分支点的三配位体捕获剂(参见图 18),或者在非末端位置存在官能团并形成具有两个分支点的三配位体捕获剂。可以重复此方法,直至获得 n-配位体和 n-分支点的多配位体。此类多配位体捕获剂可以模仿折叠的免疫球蛋白(抗体)内的可变区的效应,而保持相当低的分子量。图 17B(一个分支点)和图 17C(两个分支点)显示了支链三配位体捕获剂的代表性结构。同直链多配位体比较而言,以及在支链捕获剂类别中,支链多配位体中的分支点可以给予不同的构象动力学。在一些实施方式中,相对于类似的已被研发但是直链的多配位体捕获剂,该支链多配位体结构中的键的被阻旋转可以增加亲合力。

[0176] 技术人员依据对本文公开内容的理解可以确认合成和筛选大库肽的其它方法。特别地,可以通过利用肽微阵列提供非 OBOC 的其它方法(见 R. C. Panicker et al., *Combinatorial Chemistry High Throughput screening*(2004), Vol. 7, 547-556)。特别地,在一些实施方式中,肽可以通过非共价吸附(“点样”)或者共价固定被附着在玻璃基质上。在非共价吸附方法中,肽通过静电相互作用粘合至该表面,其为随机定向。在共价固定方法中,肽和基质通过化学键相连,此种附着通常以位点特异性方式实现(例如,在马来酰亚胺功能化的基质和硫醇化肽之间发生的 Michael 加成)。肽微阵列在玻片上具有唯一的空间性编码的内在优点,因此个别的肽或者肽组合物可通过其位置识别。该肽库可通过常规的固相肽合成并附着于阵列(非共价或者共价方式均可)的方法制备。然而在这些实施方式中,在制作该阵列之前先要制作肽库(例如在小球上),并且提纯这些组分。还可以在该基质自身上通过原位法合成肽(比如影印法(photolithography),见 S. Li et al., *Chem. Commun.* (2005), 581-583, 和 S. Li et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2004), Vol. 126, 4088-4089)。

[0177] 在一些实施方式中,由于亲合力和选择性不是依折叠结构而定,该多配位体捕获剂的组合物结合靶标的能力不受变性作用的影响。示范性情形是图 15 的多配位体捕获剂,其为三个配位体组成的非结构化的直链捕获剂,并且在斑点印迹(实施例 16),天然蛋白质印迹(实施例 20),和 ELISA 类分析(实施例 21)中显示是有效的。特别地,在若干实施方式中,多配位体捕获剂由短长度而非天然和人工单体的配位体组成,其通常不采用高度折叠的三级结构。这些实施方式不同于现有技术的某些捕获剂,比如抗体,其长度大约长出 30 倍,并且由天然单体组成,其促进高度折叠的三级结构(包括二硫键,其可能对于变

性作用不稳定)。

[0178] 在若干实施方式中,在配位体选择过程之前,期间,或者之后,可以将期望的性质构建入该捕获剂中。示范性的性质包括水溶性,或者将该多配位体捕获剂以特定的所期望的方向附着于表面的能力,以及技术人员可以确认的其它性能。在一些实施方式中,可以通过引入相关的期望特征(比如可以在和所期望的性质有关的特定反应中被开发(exploited)的官能团),在该多配位体捕获剂上引入期望的性质。

[0179] 例如,在选择多配位体捕获剂的配位体之前,期间或者之后,官能团及其它分子标记可以被构建入该捕获剂,在单参数或者多参数分析中,它们可以使该多配位体捕获剂特异性,高定向附着于基质或者表面。特别地,在一些这类实施方式中,可以引入可结合基质上存在的第二官能团的官能团。能被用作结合搭配的示范性的官能团包括:羧基和胺基,叠氮化物和乙炔,以及醛和胺。例如,胺化的表面可以通过用硅烷化剂处理玻璃或者硅进行制备,并且此表面可以进一步的共价结合存在羧酸的捕获剂(McAlpine, M. C. et al., 2008)。在第二个实施例中,乙炔(Rohde, R. D. et al., 2006)或者叠氮化物(Cao, P. et al., 2008)修饰的硅表面分别可以通过将铜(I)-催化的叠氮化物-炔环加成(CuAAC)进行制备并共价结合至叠氮化物或者乙炔修饰的捕获剂。将多配位体捕获剂方向特异性地固制备在表面上的修饰还可以包括共价标记,比如短的多核苷酸序列,其允许通过对其互补链的杂化将该捕获剂固定在核酸阵列上(例如,通过Fan, R. et al., 2008的方法)。在所有这些实施例中,均易于实现表面的方向特异性固定,其提高了测量该靶标至表面的特异性结合的分析方法之间的一致性。

[0180] 一旦两个或两个以上配位体被识别,可以使用技术人员可以确认的方法合成该多配位体捕获剂,这取决于该配位体的化学性质。特别地,在两个或两个以上配位体是肽的实施方式中,一旦该肽被识别,则可以用技术人员可以确认的聚合氨基酸单体的方法合成蛋白多配位体捕获剂。

[0181] 可以对合成的多配位体捕获剂进行另外的修饰。例如,在一些实施方式中,该多配位体捕获剂可以被修饰,以引入细胞穿透性肽序列,使其专门作为捕获剂用于体内标记或者成像。该多配位体捕获剂还可以用脂质分子修饰,其促进和细胞膜的缔合并因此可被用作细胞-细胞识别的探针。

[0182] 在一些实施方式中,多配位体捕获剂可以通过制造多配位体捕获剂的方法被提供,该方法包括:将修饰的锚配位体与第一复数个候选配位体和靶标接触,该修饰的锚配位体由此在该靶标催化的反应中以共价键连接一个或多个该候选配位体,从而形成一个或多个多配位体捕获剂。每一多配位体捕获剂包括修饰的锚配位体和候选的配位体之一,该锚配位体可以结合该靶标,并且该修饰的锚配位体包括第一官能团,其中该第一官能团能够与相应的第二官能团特异性反应,并且其中候选的各配位体均包括第二官能团。

[0183] 该方法可以进一步包括,(i)修饰该多配位体捕获剂之一,以包括第三官能团,其中该第三官能团能够与相应的第四官能团特异性反应,和(ii)将该修饰的多配位体捕获剂和第二复数个候选配位体和靶标接触,该修饰的多配位体捕获剂由此在该靶标催化的反应中以共价键连接一个或多个该候选的配位体,从而形成一个或多个更高阶的多配位体捕获剂。该更高阶的多配位体捕获剂可以各自包括该修饰的多配位体捕获剂和候选的配位体之一,并且该第二复数个捕获配位体中每一个候选的配位体可以包括第四官能团。

[0184] 该方法可以进一步包含,重复步骤 (i) 和 (ii) 一次或多次,其中对于每一次步骤 (i) 和 (ii) 的重复,在最后一次重复步骤 (ii) 过程中形成的更高阶的多配位体捕获剂被用作下一次重复步骤 (i) 过程中修饰的多配位体捕获剂。步骤 (i) 和 (ii) 可以重复重复两次或者两次以上,三次或者三次以上,四次或者四次以上,五次或者五次以上,六次或者六次以上,七次或者七次以上。可以重复步骤 (i) 和 (ii) 直到该高阶多配位体配位体捕获剂对于靶标的结合亲和力比该锚配位体的结合亲和力高至少 10^7 , 至少 10^8 , 至少 10^9 , 至少 10^{10} , 至少 10^{11} , 至少 10^{12} , 或者至少 10^{13} 。可以重复步骤 (i) 和 (ii) 直到该多配位体捕获剂对该靶标的结合亲和力能够使该多配位体结合靶标的解离常数小于等于 10^{-6}M , 10^{-7}M , 10^{-8}M , 10^{-9}M , 10^{-10}M , 10^{-11}M , 10^{-12}M , 10^{-13}M , 10^{-14}M , 10^{-15}M , 或者 10^{-16}M 。

[0185] 该第二复数个候选配位体可以和该第一复数个候选配位体相同。该第二复数个候选配位体可以和该第一复数个候选配位体不同。该第二复数个候选配位体中的一些候选配位体可以和该第一复数个候选配位体中的一些候选配位体相同。该第二复数个候选配位体中的一些候选配位体可以和该第一复数个候选配位体中的一些候选配位体不同。该第二复数个候选配位体中的一些候选配位体可以和该第一复数个候选配位体中的一些候选配位体相同。该第二复数个候选配位体中的一些候选配位体可以和该第一复数个候选配位体中的一些候选配位体不同。

[0186] 在一个或多个对于步骤 (i) 和 (ii) 的重复步骤中,不同的复数个候选配位体能被用作该第二复数个候选配位体。在全部对于步骤 (i) 和 (ii) 的重复步骤中,不同的复数个候选配位体能被用作该第二复数个候选配位体。在一个或多个对于步骤 (i) 和 (ii) 的重复步骤中,相同的复数个候选配位体能被用作该第二复数个候选配位体。在全部对于步骤 (i) 和 (ii) 的重复步骤中,相同的复数个候选配位体能被用作该第二复数个候选配位体。在对于步骤 (i) 和 (ii) 的重复步骤中,多个复数个不同的候选配位体能被用作该第二复数个候选配位体。

[0187] 第三官能团可以和第一官能团相同。第四官能团可以和第二官能团相同。第三官能团可以和第二官能团相同。第四官能团可以和第一官能团相同。第三官能团可以与第一官能团不同。第三官能团可以与第二官能团不同。第四官能团可以与第一官能团不同。第四官能团可以与第二官能团不同。

[0188] 在一些形式的方法中,相同的第三官能团能被用于步骤 (i) 和 (ii) 的各重复步骤。在一些形式的方法中,相同的第四官能团能被用于步骤 (i) 和 (ii) 的各重复步骤。在一些形式的方法中,不同的第三官能团能被用于步骤 (i) 和 (ii) 的各重复步骤。在一些形式的方法中,不同的第四官能团能被用于步骤 (i) 和 (ii) 的各重复步骤。在一些形式的方法中,相同的第三官能团能被用于步骤 (i) 和 (ii) 的各重复步骤。在一些形式的方法中,相同的第四官能团能被用于步骤 (i) 和 (ii) 的各重复步骤。在一些形式的方法中,不同的第四官能团能被用于步骤 (i) 和 (ii) 的各重复步骤。

[0189] 在将具有该第一复数个候选配位体的经修饰的锚配位体和靶标接触之前,该方法可以进一步包含,用第三复数个候选配位体接触靶标,并且识别与该靶标结合的候选配位体,其中该识别的候选配位体之一被用作锚配位体。

[0190] 在将具有该第一复数个候选配位体的经修饰的锚配位体和靶标接触之前,该方法可以进一步包含制备修饰的锚配位体。

[0191] 该修饰的锚配位体可以通过合成含有第一官能团的锚配位体形式进行制备。该修饰的锚配位体可以通过完成已部分合成的锚配位体的合成进行制备,其中第一官能团在完成该合成期间被添加至该锚配位体。该修饰的锚配位体可以通过向该锚配位体添加第一官能团而进行制备。更高阶的多配位体捕获剂可以通过该方法制备的多配位体捕获剂。在步骤(ii)的最后的重复步骤中形成的高阶多配位体捕获剂可以通过该方法制备的多配位体捕获剂。该修饰的锚配位体可以通过第一官能团和第二官能团之间的反应以共价键联系一个或多个候选的配位体。该多配位体捕获剂可以结合该靶标。

[0192] 在一些形式的方法中,在接触之前并不知道候选配位体可以和靶标结合。

[0193] 该复数个候选配位体可以包含化合物的组合库。该化合物的组合库可以包括含有一组链式连接的亚单元的排列。该链可以是直链,支链,环状或者其组合。该亚单元组可以包含氨基酸,修饰的氨基酸,或者其组合。该亚单元组可以进一步包含一个或多个小的有机分子。该亚单元组中的氨基酸可以主要由氨基酸的子集组成。该亚单元组中的修饰的氨基酸可以主要由修饰的氨基酸的子集组成。该亚单元组可以组要由氨基酸组成。该亚单元组可以主要由氨基酸的子集组成。

[0194] 该多配位体捕获剂相对于参照分子的结合特异性可以是至少 5,至少 10,至少 20,或者至少 100。该多配位体捕获剂与参照分子的结合在参照分析中可以是不可检测的。该参照分子可以是与靶标相关的分子。该参照分子可以是该靶标。该参照靶标可以是该靶标的等位型式。该参照靶标可以是该靶标的同源物。该参照分子可以是参考样品。该参考样品可以是没有具有和含有受测靶标的样品相同类型的靶标的样品。该参考样品可以是没有具有和含有受测靶标的样品相同来源的靶标的样品。

[0195] 该多配位体捕获剂对靶标的结合亲合力可以比锚配位体对靶标的结合亲合力高至少 10^6 ,至少 10^7 ,至少 10^8 ,至少 10^9 ,至少 10^{10} ,至少 10^{11} ,至少 10^{12} ,或者至少 10^{13} 。该多配位体捕获剂对该靶标的结合解离常数可以小于或等于 10^{-6}M , 10^{-7}M , 10^{-8}M , 10^{-9}M , 10^{-10}M , 10^{-11}M , 10^{-12}M , 10^{-13}M , 10^{-14}M , 10^{-15}M , 或者 10^{-16}M 。

[0196] 在一些形式中,该修饰的锚配位体不是靶标的天然基质。在一些形式中,该修饰的锚配位体不是靶标的基质。在一些形式中,第一复数个候选配位体不包含靶标的天然基质。在一些形式中,第一复数个候选配位体不包含靶标基质。在一些形式中,第一复数个候选配位体不包含在已知的可结合靶标的化合物上塑造的化合物。在一些形式中,第一复数个候选配位体不包含由已知的可以结合靶标的化合物衍生而来的化合物。在一些形式中,第一复数个候选配位体不包含任何已知的可结合靶标的化合物。在一些形式中,第一复数个候选配位体不包含任何被确定为结合靶标的化合物。在一些形式中,第一复数个候选配位体不包含在接触该修饰的锚配位体,第一复数个候选配位体和靶标前已知的可以和该靶标结合的化合物上塑造的化合物。在一些形式中,第一复数个候选配位体不包含由接触该修饰的锚配位体,第一复数个候选配位体和靶标的步骤前已知的可以结合靶标的化合物衍生而来的化合物。在一些形式中,第一复数个候选配位体不包含任何在接触该修饰的锚配位体,第一复数个候选配位体和靶标的步骤前已知的可以结合靶标的化合物。在一些形式中,第一复数个候选配位体不包含任何在接触该修饰的锚配位体,第一复数个候选配位体和靶标的步骤前被确定为结合该靶标的化合物。

[0197] 还描述的是通过任何在此公开方法制备的多配位体捕获剂。还描述的是包含了通

过任何在此公开方法制备的多配位体捕获剂的修改型的多配位体捕获剂。该多配位体捕获剂的一个或多个官能团部分可以被修饰。该多配位体捕获剂的官能团部分可以通过用连接物替代该官能团部分而被修饰。该多配位体捕获剂的官能团部分可以通过用子单元替代该官能团部分而被修饰。该子单元可以包含氨基酸或者修饰的氨基酸。该子单元可以包含小的有机分子。该多配位体捕获剂可以包含两个或两个以上链式连接的亚单元,其中一个或多个该亚单元经过修饰。该子单元可以通过用不同的子单元替代该子单元而被修饰。该子单元可以包含氨基酸或者修饰的氨基酸。该子单元可以包含小的有机分子。

[0198] 还在此公开的是含有第一配位体和第二配位体的多配位体捕获剂,其中第一配位体和第二配位体以共价键连接,其中第一配位体可以单独结合该靶标,其中第二配位体可以单独结合该靶标,其中第一配位体和第二配位体在它们结合该靶标时是结合可区分的,其中该多配位体捕获剂可以特异性结合该靶标,其中当该多配位体捕获剂结合该靶标时,第一配位体和第二配位体均接触该靶标。在一些形式中,第一配位体和第二配位体本质上不是以共价键连接。在一些形式中,第一配位体和第二配位体不是同一天然分子的不同部分。在一些形式中,第一配位体和第二配位体不是该靶标的同一基质的不同部分。在一些形式中,第一配位体不是被塑造在已知可以结合该靶标的化合物上。在一些形式中,第一配位体不是由已知的可以结合该靶标的化合物衍生而来的。在一些形式中,第二配位体不是塑造在已知的可结合该靶标的化合物上。在一些形式中,第二配位体不是由已知的可结合该靶标的化合物衍生而来的。

[0199] 在一些形式中,可以通过将带有复数个候选配位体的经修饰的锚配位体和靶标接触来确定第二配位体,从而在该靶标催化的反应中,该修饰的锚配位体以共价键连接该候选的配位体之一,其中第二配位体是以共价键连接该修饰的锚配位体的候选配位体,其中该修饰的锚配位体包含第一官能团,其中第一官能团能够和相应的第二官能团特异性反应,其中候选的配位体各自包含第二官能团。该锚配位体可以已经包含第一配位体。

[0200] 该多配位体捕获剂可以包含第三配位体,其中第三配位体以共价键连接第一和第二配位体,其中当该多配位体捕获剂结合靶标时,第三配位体接触该靶标。在一些形式中,第三配位体可以单独结合该靶标。第一配位体和第三配位体在它们结合靶标时可以是结合可区分的。第二配位体和第三配位体在它们结合该靶标时可以是结合可区分的。第三配位体可以直接连接第一配位体。第三配位体可以直接连接第二配位体。第三配位体可以通过第一配位体连接第二配位体。第三配位体可以通过第二配位体连接第一配位体。在一些形式中,第一配位体和第三配位体本质上不是以共价键连接。在一些形式中,第一配位体和第三配位体不是同一天然分子的不同部分。在一些形式中,第一配位体和第三配位体不是该靶标的同一基质的不同部分。在一些形式中,第二配位体和第三配位体本质上不是以共价键连接。在一些形式中,第二配位体和第三配位体不是同一天然分子的不同部分。在一些形式中,第二配位体和第三配位体不是该靶标的同一基质的不同部分。在一些形式中,第三配位体不是塑造在已知的可以结合该靶标的化合物上。在一些形式中,第三配位体不是由已知的可以结合该靶标的化合物衍生而来。

[0201] 可以通过将带有复数个候选配位体的经修饰的锚配位体和靶标接触来确定第三配位体,从而在该靶标催化的反应中,该修饰的锚配位体以共价键连接该候选的配位体之一,其中第三配位体是以共价键连接该修饰的锚配位体的候选配位体,其中该修饰的锚配

位体包含第一官能团,其中第一官能团能够和相应的第二官能团特异性反应,其中候选的配位体各自包含第二官能团。该锚配位体可以已经包含第一配位体。该锚配位体可以已经包含第二配位体。

[0202] 该多配位体捕获剂可以包含第四配位体,其中第四配位体以共价键连接第一,第二,和第三配位体,其中当该多配位体捕获剂结合靶标时,第四配位体接触该靶标。在一些形式中,第四配位体可以单独结合该靶标。第一配位体和第四配位体在它们结合靶标时可以是结合可区分的。第二配位体和第四配位体在它们结合该靶标时可以是结合可区分的。第三配位体和第四配位体在它们结合该靶标时可以是结合可区分的。第四配位体可以直接连接第一配位体。第四配位体可以直接连接第二配位体。第四配位体可以直接连接第三配位体。第四配位体可以通过第二配位体连接第一配位体。第四配位体可以通过第二配位体连接第三配位体。第四配位体可以通过第一配位体连接第二配位体。第四配位体可以通过第一配位体连接第三配位体。第四配位体可以通过第三配位体连接第一配位体。第四配位体可以通过第三配位体连接第二配位体。在一些形式中,第一配位体和第四配位体本质上不是以共价键连接。在一些形式中,第一配位体和第四配位体不是同一天然分子的不同部分。在一些形式中,第一配位体和第四配位体不是该靶标的同一基质的不同部分。在一些形式中,第二配位体和第四配位体本质上不是以共价键连接。在一些形式中,第二配位体和第四配位体不是同一天然分子的不同部分。在一些形式中,第二配位体和第四配位体不是该靶标的同一基质的不同部分。在一些形式中,第三配位体和第四配位体本质上不是以共价键连接。在一些形式中,第三配位体和第四配位体不是同一天然分子的不同部分。在一些形式中,第三配位体和第四配位体不是该靶标的同一基质的不同部分。在一些形式中,第四配位体不是塑造在已知的可以结合该靶标的化合物上。在一些形式中,第四配位体不是由已知的可以结合该靶标的化合物衍生而来。

[0203] 可以通过将带有复数个候选配位体的经修饰的锚配位体和靶标接触来确定第四配位体,从而在该靶标催化的反应中,该修饰的锚配位体以共价键连接该候选的配位体之一,其中第四配位体是以共价键连接该修饰的锚配位体的候选配位体,其中该修饰的锚配位体包含第一官能团,其中第一官能团能够和相应的第二官能团特异性反应,其中候选的配位体各自包含第二官能团。该锚配位体可以已经包含第一配位体。该锚配位体可以已经包含第二配位体。该锚配位体可以已经包含第三配位体。

[0204] 在一些实施方式中,此处描述的该多配位体捕获剂和适宜的媒介物一起被包括于组合物中。此处使用的术语“媒介物”指各种介质,其通常作为该多配位体捕获剂的溶剂,载体,结合剂或者稀释剂,而该多配位体捕获剂在该组合物中为活性成分。特别地,包括该多配位体捕获剂的组合物可被用于此处描述的方法或者系统中。

[0205] 此处描述的多配位体捕获剂可被用于检测和/或分离一个或多个样品中的靶标。

[0206] 此处使用的术语“检测”或者“探测”指在空间的有限部分中测定靶标的存在,出现或者事实,空间的有限部分包括但不限于样品,反应混合物,分子复合物和基质。此处使用的术语“检测”或者“探测”可以包括对靶标化学和/或生物学性质的测定,靶标的化学和/或生物学性质包括但不限于相互作用能力,特别是结合其它化合物的能力,激活另一化合物的能力,以及技术人员依据对本文公开内容的理解可识别的其它性能。探测可以是定量或者定性的。当探测是指、关于、或者涉及包括靶标或者信号的量或者数量时,探测是“定

量的”(也称为定量),其包括但不限于,被设计成测定靶标或者信号的数量或者比例的任何分析法。当探测是指、关于、或者涉及靶标或者信号以相对于另外的靶标或者信号的相对丰度来鉴定其性质或者种类,而非定量时,探测是“定性的”。

[0207] 此处使用的术语“分离”指在项目与其它项目之间,特别是在靶标和另外不是所感兴趣的被分析物之间设置,保持分离或者形成区别,并且包括复数个所感兴趣靶标的分类。此处使用的术语“分类”指基于任何共同特征建立组。特别地,此处描述的多配位体捕获剂可用于分离靶标和 / 或分类一个样品中的复数个靶标。

[0208] 本文所用的术语“样品”指有限量的事物,其象征更大量的该事物,包括但不限于来自生物环境的液体,标本,培养物,组织,商业的重组蛋白,合成化合物或者其部分。

[0209] 特别地,此处描述的多配位体捕获剂可被用于执行探测靶标的分析法的方法和系统中,包括单参数分析和多参数分析,其全部可以多重分析的方式进行。

[0210] 本文所用的术语“单参数分析”指为测定一个靶标的存在,缺乏,或者数量所进行的分析。术语“多参数分析”指为了测定复数个靶标的存在,缺乏,或者数量所进行的分析。术语“多重的”或者“多重化的”分析指在一个分析中进行多重分析反应,例如多个被分析物的同时分析可以在单个反应室中进行,和 / 或以一次分离及检测形式进行的分析。

[0211] 可以用此处描述的多配位体捕获剂进行的单参数分析包括但不限于,用于血清中单一标记物检测,生物样品中单一蛋白检测,根据表面标记物的细胞分类,以及技术人员依据对本文公开内容的理解可以确认的可以用捕获剂进行的其它分析中的任何分析方法。本领域技术人员已知许多能够用于探测的被分析物和靶标,并且它们可以用在此公开的多配位体捕获剂和方法检测和 / 或俘获。许多分析和检测方法,包括许多不同的已为本领域技术人员所知的分析形式适用在此公开的多配位体捕获剂。特别地,任何使用抗体的分析或者检测方法均可适用一个或多个在此公开的多配位体捕获剂,其可以在该分析或者方法中使用的任何抗体一起使用,也可以代替所述抗体。

[0212] 可以用此处描述的多配位体捕获剂进行的多参数分析包括但不限于任何蛋白组分析,组织分析,血清诊断,生物标记物,血清描绘 (serum profiling), 多参数细胞分类,单细胞研究,和本领域技术人员依据对本文公开内容的理解可以确认的其它分析方法。

[0213] 在一些实施方式中,此处描述的多配位体捕获剂可以有利地用于进行诊断分析,其中受检测的(单个或多个)靶标是和预定状况有关的预定的生物标记物。此处所用的关于两个项目的词语“有关”指该两个项目之间的联系,第一项目伴随第二项目出现,其包括但不限于,原因-结果效应联系和信号 / 症状-疾病联系。示范性的生物标记物包括临床信息性生物标记物,和诊断性生物标记物。

[0214] 在由于对不同类别的生物材料和生物分子各自从一典型的异质组织样品的不同区域进行测量,引入了不可避免的干扰源而以至于难以测定的诊断方法中,这些实施方式特别有利。

[0215] 可以用此处描述的多配位体捕获剂进行的示范性的分析包括但不限于,血清诊断法,免疫组织化学,细胞分类,单细胞研究,斑点印迹,蛋白质印迹,亲和纯化法及其它分离方法,以及酶联免疫吸附分析法,如实施例 16, 20, 和 21 的图 21, 图 22, 和图 23 所示。

[0216] 在另外的实施方式中,此处描述的多配位体捕获剂可用于进行基于微流的分析。此处所用的术语“微流”指具有微流特征的成分或者系统,例如通常以微米或者亚微米尺

度制造的通道和 / 或腔室。例如,典型的通道或者腔室的具有至少一个尺寸为约 0.1 微米至约 1500 微米的横截面,更典型地为约 0.2 微米至约 1000 微米,更典型地为约 0.4 微米至约 500 微米。个体微流特征通常保持非常小量的流体,例如约 10 纳升至约 5 毫升,更典型地为约 100 纳升至约 2 毫升,更典型地为约 200 纳升至约 500 微升,或者更典型地为约 500 纳升至约 200 微升。

[0217] 此处描述的方法和系统允许对所感兴趣的生物标记物进行多重的多参数检测,分类和相关的诊断分析。

[0218] 如此处所述,该多配位体捕获可以作为进行任何分析的系统的部分,包括此处描述的任何分析。这些系统可以被提供为成套的阵列或者试剂盒的形式。阵列,有时候称为“微阵列”,可以包括任何一维,二维,或者三维排布的可寻址区域,其负有和该区域相关联的特定分子。通常该特征尺寸是微米。

[0219] 在成套试剂盒中,该多配位体捕获剂及其它进行分析的试剂可以被分别包括在试剂盒内。该多配位体捕获剂可以被引入一个或多个组合物中,并且各捕获剂可以和适合的媒介物一起存在于组合物中。

[0220] 另外的组分可以包括标记分子,特别是标记的多核苷酸,标记的抗体,标记物,微流芯片,参照标准物,和技术人员依据对本文公开内容的理解可以确认的另外组分。此处所用的作为复合物或者分子的成分的术语“标记物”和“标记分子”指能被检测的分子,其包括但不限于放射性同位素,荧光发生团,化学发光染料,发色团,酶,酶基质,酶协同因子,酶抑制剂,染料,金属离子,纳米微粒,金属溶胶,配位体(比如生物素,抗生物素蛋白,链霉亲和素或者半抗原)以及类似物。术语“荧光发生团”指能够在可检测的图像中展现荧光的物质或其部分。因此,此处所用的词语“标记信号”指从标记发出,而容许该标记被检测的信号,其包括但不限于放射性,荧光,化学发光,酶促反应产物中形成的化合物以及类似物。

[0221] 在一些实施方式中,可以用基于荧光的读数进行多配位体捕获剂检测,其中该标记的抗体用荧光发生团标记,其包括,但不是穷举,小分子染料,蛋白发色团,量子点,和金纳米微粒。对于技术人员依据对本文公开内容的理解可以确认的另外技术将不作进一步的详细讨论。

[0222] 特别地,试剂盒的组分可以被提供为具有适合的说明及其它必要的试剂,以施行此处描述的方法。该试剂盒通常将所述组合物包含在单独的容器中。用于进行分析的说明,例如书面的或者声音的,在纸上或者电子载体(磁带或者 CD-ROM)上的说明,通常会被引入该试剂盒。根据特定的使用方法,该试剂盒还可以包含其它包装试剂和材料(即洗涤缓冲剂以及类似物)。

[0223] 在一些实施方式中,此处描述的多配位体捕获剂可以与赋形剂或者稀释剂一起被引入药物组合物。特别地,在一些实施方式中,在此公开的药物组合物包含至少一种此处描述的多配位体捕获剂,及一种或多种相容的并且药学上可接受的媒介物,特别是药学上可接受的稀释剂或者赋形剂。在这些药物组合物中,该多配位体捕获剂可以作为活性成分进行给药,用于治疗或者预防个体中的症状。

[0224] 此处所用的术语“治疗”指任何行动,其作为医学上或者手术上用于,或者处理症状的医疗护理的一部分。

[0225] 此处所用的术语“预防”指可以使减少由个体的症状导致的致命性或者致病性负

担的任何行动。这发生在初级,二级和三级预防水平,其中:a) 初级预防避免疾病疾病发展;b) 二级预防活动针对早期的疾病治疗,从而增加抑制该疾病发展和症状出现的干预时机;以及c) 三级预防通过恢复功能以及减少疾病相关的并发症,减少已经形成的疾病的负面影响。

[0226] 此处所用的术语“症状”指个体的身体(作为总体或者一个或多个部分)的身体状态,其不符合标准的与该个体的完全良好的身体,心理和社会状态有关的身体状态。此处描述的症状包括但不限于失调和疾病,其中术语“失调”指活的个体的症状,其与身体或者任何其部分的功能反常有关,术语“疾病”指活的个体的症状,其损害身体或者任何其部分的正常功能,并且通常可以通过区别性的征象显露出来。

[0227] 此处所用的在治疗方面的术语“个体”包括单一生物学有机体,包括但不限于,动物,特别是高等动物,特别是脊椎动物,比如哺乳动物,特别是人类。

[0228] 此处所用的术语“赋形剂”指用作药物的活性成分载体的非活性物质。适合的用于此处描述的药物组合物的赋形剂包括任何可以增强个体的身体吸收该多配位体捕获剂或者其组合物能力的物质。适合的赋形剂还包括任何可被用于具有肽或者其组合物,以供方便和精确剂量之用的扩大制剂的物质。在被用于单一剂量的制剂之外,赋形剂可被用于制造过程中,以帮助处理所涉及的肽或者其组合物。根据给药途径,以及药物形式,可以使用不同的赋形剂。示范性的赋形剂包括但不限于,抗粘附剂,结合剂,涂层,崩解剂,填料,调味剂(比如增甜剂)和着色剂,助流剂,润滑剂,防腐剂,吸附剂。

[0229] 此处所用的术语“稀释剂”指配制用于稀释或者携带组合物的活性成分的稀释剂。适合的稀释剂包括任何可以降低药物制剂粘性的物质。

[0230] 通过以下详细公开或举例说明及参照实验部分,本文所公开内容的进一步的优点和特性将变得更显而易见的。

实施例

[0231] 此处描述的捕获剂,方法和系统被进一步示范于以下的实施例中,这些实施例提供了举例说明,而不具限制性。特别地,在以下实施例中,参照配位体由多肽形成的蛋白性质的多配位体捕获剂提供了本文公开的多配位体捕获剂和相关方法和系统的说明。本领域技术人员将能理解所详细描述由氨基酸化学性质的配位体形成的捕获剂的特征对于通过另外化学性质的配位体总体或者部分形成的捕获剂的适用性。特别地,阅读本文公开内容的技术人员将理解,肽化学性质的多配位体捕获剂只是捕获剂的一个示范例,并且多配位体捕获剂可以包括低聚和多核苷酸,小分子,及其它有生物学活性的配位体。

[0232] 特别地,根据示范性的配位体由类肽分子提供的实施方式,描述和论证了用于开发多配位体捕获剂的方法,该多配位体捕获剂包括多配位体捕获蛋白剂和蛋白性质的多配位体捕获剂,其可以替换现行标准,抗体。特别地,各配位体是由天然,人工,或者非天然氨基酸及其它有机分子结构单元组成的类肽分子。各多配位体由两个或两个以上配位体组成,各配位体由多个结构单元(氨基酸等等)组成。当包括该多配位体的配位体数目增加,该多配位体对于所感兴趣的蛋白的选择性和亲合力迅速增加。该靶蛋白本身被用作催化剂,以组装其自己的多配位体捕获剂。个别的配位体自身(和它们的组成氨基酸)也为此催化过程进行特别设计。化学和生化稳定性,水溶性,热稳定性,及其它期望的特性可以被

添加叠氮丁基溴化物 1a(4.82g,0.027mol) 并搅拌。在室温下搅拌该反应混合物 2 小时,并在 80℃回流 6 小时。冷却整夜后,浓缩该反应混合物至干,用二乙醚提取残余物。用水,饱和 NaHCO₃ 溶液,水和浓盐水洗涤该组合的乙醚提取物,并用 MgSO₄ 干燥,然后浓缩。硅胶色谱法(Hex : EtOAc = 1 : 1) 形成澄清的粘性油状产物(63%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) : δ 6.77(1H, s), 4.24(4H, q, J = 6.9Hz), 3.26(2H, t, J = 6.9Hz), 2.31-2.37(2H, m), 2.04(3H, s), 1.59(2H, p, J = 7.5Hz), 1.26(6H, t, J = 6Hz), 1.16-1.27(2H, m). ESI-MSm/e315。

[0242] 二乙基 2-乙酸胺基-2-(4-叠氮辛基)丙二酸酯(2b)。采用与 2a 类似的合成方案,只是用叠氮辛基溴化物 1b 作为起始材料。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) : δ 6.76(1H, s), 4.24(4H, q, J = 7.2Hz), 3.24(2H, t, J = 6.9Hz), 2.27-2.33(2H, m), 2.04(3H, s), 1.56(2H, p, J = 7.5Hz), 1.25(6H, t, J = 7.2Hz), 1.06-1.16, 1.2-1.4(10H, m). ESI-MSm/e371。

[0243] 2-叠氮丁基氨基酸(3a)。根据标准方法,加热回流二酯 2a(2.8mmol) 的 25ml 的 10% NaOH 溶液 4 小时(van Hest, J. C. M. et al., 2000)。然后用浓 HCl 中和并挥发。将残余物溶解在 25ml 的 1M HCl 中,并被加热回流 3 小时。减少溶剂和用 MeOH 提取,得到氨基酸 3a 的盐酸盐(85%)。¹H NMR(300MHz, CD₃OD) : δ 3.98(1H, t, J = 6.3Hz), 3.35(2H, t, J = 7.8Hz), 1.45-1.7, 1.85-2.05(6H, m). MALDI-MSm/e173。

[0244] 2-叠氮辛基氨基酸(3b)。用二酯 2b 作为起始材料进行如上所述的合成。¹H NMR(300MHz, CD₃OD) : δ 3.94(1H, t, J = 6.3Hz), 3.27(2H, t, J = 6.9Hz), 1.3-1.52, 1.52-1.62, 1.8-1.98(14H, m). ESI-MS m/e 229。

[0245] Fmoc-2-叠氮丁基氨基酸(Fmoc-Az4-OH)。根据已公开的方法(Lee, H.-S. et al., 2003),将氨基酸 3a(26.3mmol) 溶解于 0.45 : 0.55 的 H₂O : THF(150ml) 中,并添加 NaHCO₃(22.1g, 263mmol)。该混合物冷却至 0℃后,逐滴添加 Fmoc-OSu(9.7g, 28.9mmol) 超过 5 分钟。使反应混合物回到室温并搅拌过夜。在真空中挥发 THF,并用二乙醚(2×200ml) 洗涤该水性残余物。然后在用乙酸乙酯(4×100ml) 提取之前收集水层并用浓盐酸酸化至 pH 2。用浓盐水洗涤该组合的有机层,用 MgSO₄ 干燥,过滤并浓缩。通过柱色谱法(甲醇的 2% DCM 溶液) 提纯该有机残余物,产生白色粉末(48%产率)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) : δ 7.76(2H, d, J = 7.5Hz), 7.59(2H, d, J = 6.9Hz), 7.40(2H, t, J = 7.5Hz), 7.31(2H, t, J = 7.5Hz), 5.34(1H, d, J = 7.8Hz), 4.49-4.59(1H, m), 4.43(2H, d, J = 6.6Hz), 4.22(1H, t, J = 6.6Hz), 3.27(2H, t, J = 6.6Hz), 1.3-2.0(6H, m). ESI-MS m/e395。

[0246] Fmoc-2-叠氮辛基氨基酸(Fmoc-Az8-OH)。处理氨基酸 3b 以进行如上所述的 Fmoc 保护。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) : δ 7.75(2H, d, J = 7.5Hz), 7.57-7.61(2H, m), 7.39(2H, t, J = 7.5Hz), 7.30(2H, t, J = 7.2Hz), 5.40(1H, d, J = 8.1Hz), 4.42-4.52(1H, m), 4.40(2H, d, J = 7.2Hz), 4.21(1H, t, J = 7.2Hz), 3.23(2H, t, J = 6.9Hz), 1.18-1.98(14H, m). ESI-MSm/e 450。

[0247] 实施例 2:构建一小球一化合物肽库

[0248] 材料。Fmoc-D-Ala-OH(Fmoc, 氟-9-基甲氧基羰基), Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH(Pbf, 五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基), Fmoc-D-Asn(Trt)-OH(Trt, 三苯甲基), Fmoc-D-Asp(OtBu)-OH(tBu, 叔丁基), Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-D-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-His(Trt)-OH, Fmoc-D-Ile-OH, Fmoc-D-Leu-OH,

Fmoc-D-Lys(Boc)-OH(Boc,叔丁氧羰基), Fmoc-D-Met-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-D-Ser(tBu)-OH, Fmoc-D-Thr(tBu)-OH, Fmoc-D-Trp(Boc)-OH, Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH, 和 Fmoc-D-Val-OH 购买自 Anaspec(San Jose, CA) 并以收到物使用。TentaGelS-NH₂ 树脂(90微米, 0.31mmol/g) 由 Anaspec(San Jose, CA) 获得, 用于 OBOC 库构建。Fmoc-Rink Amide MBHA 树脂(50微米, 0.67mmol/g) 从 Anaspec(San Jose, CA) 获得, 用于大量合成命中的肽序列。在 1-甲基-2-吡咯烷酮(NMP, 99%) 中用 HATU(2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲铵六氟磷酸铵, ChemPep, Miami, FL) 和 N,N-二异丙基乙胺(DIEA)(99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 进行氨基酸偶联反应。为了去除 N^α-Fmoc 保护基, 使用哌啶的 20% NMP 溶液。为了该肽库的最终脱保护, 使用三氟乙酸(98%最小滴定) 和三乙基硅烷(TEA)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。

[0249] 构建肽库。用一小球一化合物(OBOC) 组合库方法通过先报道的分裂-和-混合合成方法合成随机化的五至七元肽库(Lam, K. S. et al., 1997; Furka, A. et al., 1991; Geysen, H. M. 和 T. J. Mason, 1993)。

[0250] 特别地, 通过标准的分裂-和-混合固相肽合成方法在 90 μm 聚乙二醇接合的聚苯乙烯小球(TentaGel S-NH₂, 0.31mmol/g, 2.86×10⁶ 小球/g) 上人工合成随机化的五至七元肽的 OBOC 库(Lam, K. S. et al., 1997; Furka, A. et al., 1991; Geysen, H. M. 和 T. J. Mason, 1993)。在该肽序列中每个可能的位置均有使用非天然 D 立体异构体(用小写的一字母氨基酸码表示)。在每个库合成中使用至少 5-倍过量的小球, 以确保各库元素的足够存在。使用具有 Fmoc 化学作用的固相肽合成方法(Coin, I. et al., 2007)。所有的洗涤, 脱保护, 和耦合步骤通过树脂的 180 度振动而被促进。在塑料烧结的反应容器中该树脂在 NMP 中被预膨胀, 并被分为多等分。各等分与 2-倍摩尔过量(相对于树脂) 的单 N^α-Fmoc-氨基酸反应。通过添加 2-倍摩尔过量的 HATU 和 6-倍摩尔过量的 DIEA(Carpino, L. A. et al., 1994) 引发酰胺耦合。该偶联反应进行 15 分钟。另外添加 2 当量 N^α-Fmoc-氨基酸, 2 当量 HATU, 和 6 当量 DIEA, 反应 15 分钟(“双耦合”)。在一些情形下, 可以用第三套耦合试剂和 N^α-Fmoc-氨基酸进行“三耦合”(表 1, 库 D, E, F, 和 G)。耦合之后, 彻底洗涤这些等分(5×NMP), 彼此混合入一容器中, 并用哌啶的 20% NMP 溶液去保护(30 分钟)。彻底洗涤该树脂(5×NMP), 干燥(5×DCM), 并重新分为多个相等的质量等分, 用于下次耦合循环。重复该方法直至获得期望长度的肽。

[0251] 然后通过三氟乙酸(95%), 水(5%), 和三乙基硅烷(每保护侧链 2-倍摩尔过量) 中于 25°C 培育 2 小时去除氨基酸侧链保护基。然后用 DMF 中和该库树脂, 并用 DMF(5×), 水(5×), 甲醇(MeOH, 5×), 和二氯甲烷(DCM, 5×) 彻底洗涤(Dixon, S. M. et al., 2006), 然后在真空下干燥, 并在 25°C 于磷酸盐缓冲盐水 [PBS(pH 7.4)]+0.05% Na₂S₂O₃ 中存储。

[0252] 表 1 列出了在开发直链和支链双配位体和三配位体捕获剂中使用的库

[0253] 表 1. 合成和筛选的库. †

[0254]

| 库 | 结构式 | 组成 | #独有序列 |
|---|--|--|------------|
| A | $X_1X_2X_3X_4X_5$ | $x_i = 19$ 个 D-氨基酸 (无 D-Cys) | 2,476,099 |
| B | $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ | $x_i = r, k, l, w, f, h, y$ | 117,649 |
| C | $Az_n-X_2X_3X_4X_5X_6-Az_n$ | $x_i = 19$ 个 D-氨基酸 (无 D-Cys) $Az_n = 1/3$ $Az_4, 1/3$ $Az_8, 1/3$ 完全无氨基酸 | 22,284,891 |
| D | $X_1X_2X_3X_4X_5X_6-Tz1-kfwlkl$ | $x_i = k, l, w, f, i, g, v$ | 117,649 |
| Tz1 = Az4(在末端 k)和 D-Pra(在 x_6)之间形成的三唑 | | | |
| E | $X_7X_6X_5X_4X_3X_2-Tz2-kwlwGl-Tz1-kfwlkl$ | $x_i = d, r, s, w, G, f, l$ | 117,649 |
| Tz1 = Az4(在末端 k)和 D-Pra(在 l)之间形成的三唑 | | | |
| Tz2 = Az4(在末端 x_2)和 D-Pra(在 k)之间形成的三唑 | | | |
| F | $Az_4-X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ | $x_2 = r, n, l, i;$ $x_3 = w, f, l,$ | 3200 |
| G | $X_7X_6X_5X_4X_3X_2-Tz2-kwlwGl-Tz1-kfwlkl$ | $i;$ $x_4 = r, w, f,$ $l, i;$ $x_5 = w, f, v,$ $l;$ $x_6 = r, w, f,$ $l, k;$ $x_7 = f, r$ | 3200 |

[0255] 表 1. 合成和筛选的库. †

[0256]

| 库 | 结构式 | 组成 | #独有序列 |
|----------|--------------------------|---|---------|
| H | $x_1x_2x_3x_4x_5x_6$ | $x_i = k, w, f,$ $i, g, l, v, Az4$ | 262,144 |
| I | $x_1x_2x_3-Az4-x_5x_6$ | $x_i = k, w, i,$ g, v, l, f | 16,807 |
| J | $x_0x_1-k-x_3-Az4-x_5-w$ | $x_0 = a, G, l,$ $i, v, y, w, f,$ $s, t, e, d,$ $h, p, r, n, q,$ k $x_1 =$ $k(N^{\epsilon}-Aloc),$ w, v $x_3 = v, w, r,$ $n, q, d, k, s,$ $t, h, G, a.$ $x_5 = f, l, r, n,$ $q, d, k, s, t,$ h, G, a | 7776 |

[0257] †随机化的位置以 x (D-氨基酸) 和 Az_n (含叠氮基的人工氨基酸) 表示。

[0258] 实施例 3 : 总体筛选程序

[0259] 提供蛋白靶标。碳酸酐酶 II (bCAII) 作为靶标用于概念验证多配位体蛋白捕获剂的开发。该 bCAII (C2522) 来自牛红血球冻干粉末, $\geq 3,000W-A$ 单位 /mg 蛋白, 其获得自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 并以收到物使用。该蛋白用 AlexaFluor 647 微量蛋白标记试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 按照制造商的低标记度 (DOL) 方案进行染料标记。简而言之, 用 6 摩尔当量的 Alexa Fluor 647NHS 酯在 25°C 培育 100 μ g 蛋白 15 分钟。通过 BioGel P-6 尺寸排除树脂去除过量染料。经标记的蛋白 (bCAII-Alexa647) 由 UV-Vis 和质谱分析表征。

[0260] 适于配体筛选的筛选程序概述如下。进行典型的肽锚配位体筛选 (Lehman, A. et al., 2006) 首先在 PBS (pH 7.4) + 0.1% 吐温 20 + 0.1% 牛血清清蛋白 (BSA) + 0.05% NaN₃ (PBSTBNaN₃) 中培育库 1 小时, 并振动, 以阻止非特异性的蛋白质结合。然后用 3 × 5 毫升 PBSTBNaN₃ 洗涤该库。在适当的 bCAII-AlexaFluor 647 稀释液中进行小球上多配位体筛选 (见表 2 和图 24 中的方案), 然后用 3 × 5 毫升 PBSTBNaN₃, 3 × 5 毫升 PBS (pH 7.4) + 0.1%

吐温 20, 最后用 6×5 毫升 PBS (pH 7.4) 洗涤。所有的原位多配位体筛选包含用肽锚配位体 (通常 ≥ 2000 当量, 相对于蛋白) 预培育 bCAII-Alexa Fluor 647 预培育 2 小时, 其后将小球库加入此混合物, 并继续筛选 (见表 2 和图 24 中的方案)。筛选原位多配位体之后, 用 3×5 毫升 PBSTBNaN₃, 3×5 毫升 PBS (pH 7.4)+0.1% 吐温 20, 然后用 6×5 毫升 PBS (pH 7.4) 洗涤小球。

[0261] 下表 2 记录了实施例 2 中用于库 A 至 J 的筛选条件摘要信息。

[0262]

表2. 筛选摘要. 除非注明, 所有筛选在pH=7.4和T=25°C下进行。

| Screen | Library | [bCAII-AF647] | Time (h) | % hit beads | Buffer | Other components |
|--------|---------|-----------------|---------------------------------|--------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| An1 | A | 100 nM | 1 h | 0.02% | PBS | |
| An2a | B | 50 nM | 1 h | 0.09% | PBS | |
| An2b | B | 8 nM | 24 h | 2 hits | PBS | |
| Bi1 | C | 50 nM | 2 h; 37° (no beads) + 48 h; 37° | 0.007% | PBS + 1% DMSO (v/v) | 100 μM of Iklwfk-(D-Pra) |
| Bi2a | D | 50 nM | 17 h | 0.07% | PBSTBNaN ₃ | |
| Bi2b | D | 10 nM | 17 h | 0.008% | PBSTBNaN ₃ | |
| Tri1 | C | 50 nM | 2 h (no beads) + 15 h | 0.007% | PBSTBNaN ₃ + 1% DMSO (v/v) | 100 μM of (D-Pra)-kwlwGl-Tz1-kfwlkl |
| Tri2 | E | 10 nM | 17 h | 0.008% | PBSTBNaN ₃ | |
| TriX | A | 10 nM | 17 h | 0.007% | PBSTBNaN ₃ + 1% DMSO (v/v) | 100 μM of (D-Pra)-kwlwGl-Tz1-kfwlkl |
| Tri3 | F | 0.5 nM | 2 h (no beads) + 18 h | 0.005-0.01% | PBSTBNaN ₃ + 1% DMSO (v/v) | 100 μM of (D-Pra)-kwlwGl-Tz1-kfwlkl |
| Tri4 | G | 0.25 nM | 18 h | 0.005-0.01% | PBSTBNaN ₃ | |
| BrBi1 | H | 50 nM | 2 h; 37° (no beads) + 18 h; 37° | 0.01% | PBSTBNaN ₃ + 1% DMSO (v/v) | 100 μM of Iklwfk-(D-Pra) |
| BrBi2 | I | 10 nM to 500 pM | 2 h (no beads) + 15 h | 0.06%-0.006% | PBSTBNaN ₃ + 1% DMSO (v/v) | 40 μM of Iklwfk-(D-Pra) |
| BrBi3 | J | 10 nM | 2 h (no beads) + 6 h; 37°C | 0.07% | PBSTBNaN ₃ + 1% DMSO (v/v) | 40 μM of Iklwfk-(D-Pra) |
| BrTri1 | C | 50 nM | 2 h (no beads) + 16 h | 0.003% | PBSTBNaN ₃ + 1% DMSO (v/v) | 100 μM branched biligand anchor |

[0263] 将筛选出的小球转移到显微镜载玻片上, 并且立刻用 GenePix 4200 阵列扫描器成像 ($\lambda_{ex} = 635$ 纳米)。通过玻璃微量吸管人工选取命中的小球。各命中小球在 7.5M 盐酸胍 (pH 2.0) 中培育 1 小时, 然后用水漂洗十次, 以去除结合的蛋白。

[0264] 通过 Edman 降解法对单个命中小球测序。特别地, Edman 测序是在 Model494Procise cLC 测序系统 (Applied BioSystems, Foster City, CA) 上进行的。重复的 N-末端化学降解循环产生直接的氨基酸位置信息。每个降解循环产生一个 PTH-氨基酸

(PTH = 乙内酰苯硫脲) 产物, 其通过 HPLC 分析并通过和标准 PTH- 氨基酸比较保留时间进行鉴别。为了通过此方法解析人工的含叠氮基的氨基酸, 可使用定制的 Edman 降解法方法, 其包括扩展梯度和烧瓶循环。

[0265] 相应于洗脱 Az2, Az4, Az6 和 Az8 的 Edman 踪迹证明了对于每两个添加至该叠氮烷基侧链的亚甲基单元其保留时间会增加 6 分钟。Fmoc-Az2-OH 根据文献方案合成 (Roice, M. et al., 2004), 而 Fmoc-Az6-OH 根据以上实施例 1 的方案 1 合成。

[0266] 实施例 4: 筛选方法: 第一代锚配位体

[0267] 锚配位体筛选。特别地, 第一代筛选是用以上实施例 2 以及图 19 所示的五聚物库 A (4g, ~ 2, 500, 000 小球) 进行的。特别地, 库 A 在聚丙烯烧结管中被分为 10 毫克等分。然后 bCAII-Alexa647 在 1 毫升 PBS [20mM 磷酸钠, 150mM NaCl (pH 7.4)] 中的 100nM 稀释液和各库等分在 25°C 下培育 1 小时, 同时振动。用 3×5 毫升 PBS (pH 7.4) 和 7×5 毫升水洗涤筛选出的小球。将小球与最小水量转移到载玻片上, 并用 GenePix 4200 阵列扫描器即刻荧光成像。由玻璃微量吸管人工选取命中物。各命中中的小球在 7.5M 盐酸胍 (pH 2.0) 中培育 1 小时, 然后用水漂洗十次, 以去除结合的蛋白。

[0268] 然后通过 Edman 降解法解码命中序列。用直方图分析法分析命中序列的样本间的氨基酸频率和位置序列同源性。图 25 呈现了第一代锚配位体分析的实施例。

[0269] 特别地, 在图 25 的图例中, 面板 A 显示了从筛选 An1 中分离出的 51 个命中序列的频率 vs. D- 氨基酸。图 25 的面板 B 显示了筛选 An2a 和 An3b 的命中率, 其导向 2 个肽锚配位体的选择。

[0270] 由此可以确定, 碱基 / 带电基 (k, r) 和芳香残基 (y, f, w) 在 bCAII 的锚配位体中是重要的氨基酸, 并且用这些氨基酸根据以下实施例 5 构建集中的库 B。

[0271] 实施例 5: 筛选方法: 第二代锚配位体

[0272] 根据实施例 2 所示范的方法构建集中的库 B, 以反映根据实施例 4 所示范的方法鉴别的高出现率的氨基酸。

[0273] 特别地, 包括了氨基酸 k, r, y, f, w, h, 和 l, 且该肽的长度被增加至六聚体。氨基酸组成的更紧密分布和增加的肽长度显示出可以富集第二代筛选, 以选择更多的特异性锚配位体。

[0274] 然后根据以上实施例 3 所示的筛选 An1 类似的流程用库 B 的一个拷贝 (40mg, ~ 120, 000 小球) 进行第二代锚配位体筛选。用该库在 25°C 培育 8 至 50nM 的 bCAII-Alexa647 的 4 毫升 PBS (pH 7.4) 稀释物 1 至 24 小时, 并振动。

[0275] 参照图 25, 显示了第二代筛选 An2a 和 An2b 的结果 (参见图 19)。在更低蛋白浓度下用更低频率分离命中物。

[0276] 最严格的筛选产生两个命中物, hlyf1r 和 1klwfk, 其表示两个选定的锚配位体。

[0277] 实施例 6: 锚配位体的合成和亲合力测量。

[0278] 肽合成。重新合成来自筛选 An2b 的命中物, 以在其末端获得适当的人工氨基酸 (叠氮化物 / 乙炔) 连接物, 使其适于点击化学作用。在 Fmoc-Rink 酰胺 MBHA (50 μm, 0.67mmol/g) 或者 2- 氯三苯甲基氯化物 (1.5mmol/g) 树脂 (Anaspec; San Jose, CA) 上, 以通常的每序列 0.3g 的树脂比例大量合成命中的肽序列。用醚沉淀粗肽, 然后通过 HPLC 在 C₁₈ 反相半制备柱 (Phenomenex Luna 10 μm, 250×10mm) 上提纯至 > 98% (Beckman Coulter

System Gold 126Solvent Module 和 168 检测器, Fullerton, CA)。该纯肽被用于亲合力测量, 筛选, 和结合分析。命中的肽序列也可在 TentaGel S-NH₂ 上以类似的树脂比例被重新合成, 并被用于小球上结合分析。

[0279] 通过荧光偏振测定 KD。按照已公开的流程 (Yin, H. et al., 2006) 用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记该锚配位体的 N- 末端。树脂分裂后, 用醚沉淀粗荧光化锚配位体, 然后通过 C₁₈ 反相 HPLC 提纯至 > 98%。

[0280] 由 Beckman Laser Resource Center (Pasadena, CA) 的 Fluorolog 2 荧光分光计 (Jobin Yvon, Longjumeau, 法国) 记录荧光光谱。所有样品均包含在 PBS (pH7.4) +3% (v/v) DMSO 中的 6 μM 荧光化的锚配位体, 以及不同浓度的 bCAII (0.2 μM 至 800 μM)。对于荧光化锚配位体, 通过 UV-Vis 用 $\epsilon_{280}(\text{bCAII}) = 57,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 或者 $\epsilon_{494}(\text{FITC}, 0.1\text{N NaOH}) = 68,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 检验库存蛋白和配位体浓度。在 488nm 激发样品 (2-nm 频带 - 通过), 获得在 500nm 和 700nm 之间的荧光光谱 (4-nm 频带 - 通过)。所有测量均在 25°C 以 0.5 秒整合时间内在 2nm 区间内进行。所有荧光光谱均扣除背景。

[0281] 通过方程式 $G = \text{IHH}/\text{IHV}$, 用来自仅有肽的样品的 IHH 和 IHV 荧光光谱计算该系统垂直和水平面偏光的灵敏度 (G) 比率。积分该荧光光谱 IVV 和 IVH, 应用方程式 1 获得荧光偏振值 (P)。

$$[0282] \quad P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}} \quad (1)$$

[0283] 用 Origin 6.1 (Northampton, MA) 以 sigmodial 剂量-反应曲线拟合这些偏振值。

[0284] 通过这种方法, 测量了该荧光化的锚配位体 1klwfk-(D-Pra) 对于 bCAII 的 500-μM 亲合力。用渐增浓度的靶标 (0.2 μM 至 800 μM) 滴定该荧光化的锚配位体, 并对此结合相互作用显示了 500 μM 亲合力 (图 26)。

[0285] 实施例 7: 识别第二配位体: 双配位体筛选

[0286] 通过两个互补的方法鉴别第二配位体: 1) 原位双配位体筛选; 2) 小球上双配位体筛选。(参见图 24)

[0287] 原位双配位体筛选: 在第一种方法中 (参见图 20 和图 24A), 肽锚配位体和蛋白位于溶液中, 并且第二配位体的同源库在小球上。该蛋白作为催化剂用于小球上双配位体的原位组合。

[0288] 在筛选 Bi1 中, 用肽锚配位体 (1klwfk-(D-Pra), 相对于蛋白 2000×) 在 37°C 预培育 50nM bCAII-Alexa647 的溶液 2 小时。用分为每聚丙烯烧管 60mg 的叠氮化物七聚物库 C (4g, ~ 2,250,000 小球) 进行筛选。将该锚配位体/蛋白溶液加入该小球库并在 37°C 培育 48 小时, 伴随振动。用 3×5 毫升 PBS (pH 7.4) 和 7×5 毫升水洗涤筛选出的小球。用实施例 3 所示方案对小球荧光成像。通过微量吸管人工选取存在原位双配位体的命中物。然后处理被选取的小球以去除结合蛋白 [7.5M 盐酸胍 (pH 2.0)], 并通过 Edman 降解法获得第二配位体的序列。

[0289] 图 27 显示了第一代原位双配位体筛选 Bi1 的结果。由第一代原位双配位体筛选 Bi1 中命中的第二配位体的直方图分析和粗分析可见, 第二候选配位体显现出来 (Az4-kiwiG), 其基序在若干命中的样品间重复。特别地, 图 8A 和 27A 显示了频率 vs. D-氨基酸直方图, 其对应应在 100 μM 锚配位体 (1klwfk-(D-Pra)) 存在下筛选库 C 分离出的第二

候选配位体。图 27B 显示了针对 50nMbCAII-Alexa647 筛选库 C 分离出的命中序列简表。

[0290] 通过原位双配位体组合筛选第二配位体的方法可以由成对筛选验证。特别地,在蛋白靶标存在下,将锚配位体和第二配位体的配对在溶液中组合。通过分析法,比如 Manetsch, Krasinski et al., 2004 和 Krasinski, Radić et al., 2005 等所述方法,监控双配位体捕获剂的蛋白催化的组合。

[0291] 成对筛选。在 DMSO 中制备第二配位体 (叠氮化物, Az4-kiwiG, 13.1mM) 和锚配位体 (乙炔, 1klwfk-(D-Pra), 2.1mM) 的储备溶液。在 PBS (pH 7.4) 中制备 bCAII 和牛血清清蛋白 (BSA) 的储备溶液。每一反应在 100 μ L PBS (pH7.4) +6% DMSO (v/v) 中包含 394 μ M 叠氮化物, 65 μ M 炔, 和 36 μ M 蛋白。在 37°C 下进行反应 48 小时, 然后在 25°C 下 5 天。用 100 μ L 的 7.5M 盐酸胍 (pH2.0) 停止反应, 随后通过离心过滤去除蛋白 (Microcon YM-3, Millipore, Billerica, MA)。

[0292] 通过 MALDI-TOF 质谱分析鉴别原位双配位体的形成。进行对照实验:(1) 在没有 bCAII 的情况下, 和 (2) 用 BSA 替代 bCAII, 以检验该叠氮化物和炔之间的点击反应对于该 bCAII 蛋白靶标是特异性的。在没有蛋白的情况下进行的第三对照显示叠氮化物和炔的溶液之间的热驱动反应缓慢。

[0293] 在成对筛选的 MALDI-MS 结果中, 蛋白 bCAII 在其中已催化了原位双配位体的翻转, 如图 28 所示。BSA 催化的背景反应或者热点击反应低, 这证明许多双配位体形成是由于 bCAII。在某些实施方式中, 可以对成对筛选的产品进行放大, 如实施例 13 的图 29 和图 30 所示。

[0294] 小球上双配位体的筛选: 在用于识别第二配位体的第二方法中 (参见图 24B), 肽锚配位体通过铜 (I) 催化的叠氮化物-炔环加成 (CuAAC) 共价结合第二配位体的小球上的库。特别地, 此预组合的双配位体的库针对该蛋白靶标进行筛选, 以产生第二候选配位体。在此方法中该蛋白靶标不是催化剂; 此筛选作为确认工具, 用于和原位捕获剂筛选进行比较。

[0295] 根据以上实施例 3, 在聚丙烯烧结管中用库 D (40mg, \sim 120,000 小球) 进行 Bi2a 和 Bi2b 筛选。在 PBS (pH 7.4) +0.1% 吐温 20+0.1% 牛血清清蛋白 (BSA)+0.05% NaN_3 (PBSTB NaN_3) 先培育该库 1 小时, 伴随振动, 以阻挡非特异性蛋白质结合 (Lehman, A. et al., 2006)。此预阻挡步骤之后, 用 3 \times 5 毫升 PBSTB NaN_3 洗涤该库。bCAII-Alexa647 在 4 毫升 PBSTB NaN_3 中以 10 至 50nM 的稀释溶液和该库在 25°C 培育 17 小时, 伴随振动。筛选出的小球用 3 \times 5 毫升 PBSTB NaN_3 洗涤, 然后用 3 \times 5 毫升 PBS (pH 7.4) +0.1% 吐温 20, 最后用 6 \times 5 毫升 pH 7.4 的 PBS 洗涤。对这些小球进行荧光成像, 并通过微量吸管选择命中物。按照以上实施例 3, 洗涤去除结合蛋白 [7.5M 盐酸胍 (pH 2.0)] 后, 通过 Edman 降解法测定它们的序列。

[0296] 通过筛选 Bi2a 和 Bi2b 获得的所有第二配位体序列显示了显著的序列同源性。一些序列被重复不止一次, 包括 kwlwG1 和 kwiwGw。

[0297] 全部第二配位体的命中物的残基-接-残基直方图分析 (图 31) 均显示了, 在双配位体捕获剂的第二配位体组分中的各残基 1 (k), 2 (w), 4 (w), 和 5 (G) 处只对一个氨基酸具有强烈倾向性。特别地, 图 31 中显示的基于 37 个双配位体命中小球的分析的 1-6 位 D-氨基酸的分布提示了共有序列 k-w-x3-w-G (其中 x3 = 疏水性氨基酸)。

[0298] 实施例 8 :利用双配位体作为较长的多配位体捕获剂的锚配位体

[0299] 一旦双配位体被确定,该双配位体可以作为图 7 的锚配位体,并且可用相同的 OBOC 库识别三配位体,以此类推。

[0300] 如图 7 所示,连续原位点击化学作用筛选以制备多配位体捕获剂。1°) 在 TentaGel (TG) 小球上 (xi = 可变区) 和荧光性标记的蛋白靶标一起培育综合 OBOC 肽库。通过它们的荧光强度鉴别命中物,如实施例 4 和 5 所述。2°) 使用来自 1° 的命中的肽作为锚配位体并在当前附着有叠氮化物连结物 (n = 4, 8) 的 OBOC 肽库存在下进行培育。选择双配位体,如实施例 7 所述。3°) 重复该方法,但是用来自 2° 筛选的双配位体作为新的锚单元,以允许快速识别更高阶的多配位体。

[0301] 在添加各配位体至捕获剂时,该捕获剂对于其同源蛋白的亲合力和选择性迅速增加。用图 7 的筛选识别 1klwfk-(D-Pra) 作为锚配位体, (D-Pra)-kwlwG1-Tz1-kfw1kl 作为双配位体,并且按照实施例 2 至 7 的示范,最终完成的 (D-Pra)-kwlwG1-Tz1-kfw1kl 作为锚配位体用于针对 bCAII 识别三配位体。

[0302] 该针对 bCAII 的双配位体 kwlwG1-Tz1-kfw1kl 对 bCAII 显示出 3 μ M 的结合亲合力,如以下实施例 9 所示的表面等离子共振 (SPR) 测量结果 (参见实施例 10 的 SPR 方法)。此双配位体的离解常数比锚配位体 1klwfk-(D-Pra) 和靶标相互作用的离解常数强 150 倍。

[0303] 实施例 9 :用小球上点击反应合成双配位体。

[0304] 如下所述进行 bCAII 的特异性双配位体识别,及亲合力测量。

[0305] 材料。对于肽双配位体合成,乙酰化试剂 (乙酸酐, 2,6- 二甲基吡啶, 和 N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF)) 购买自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。对于小球上的铜催化点击反应,铜 (I) 碘化物, L- 抗坏血酸, 和二乙基二硫代氨基甲酸钠三水合物购买自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。

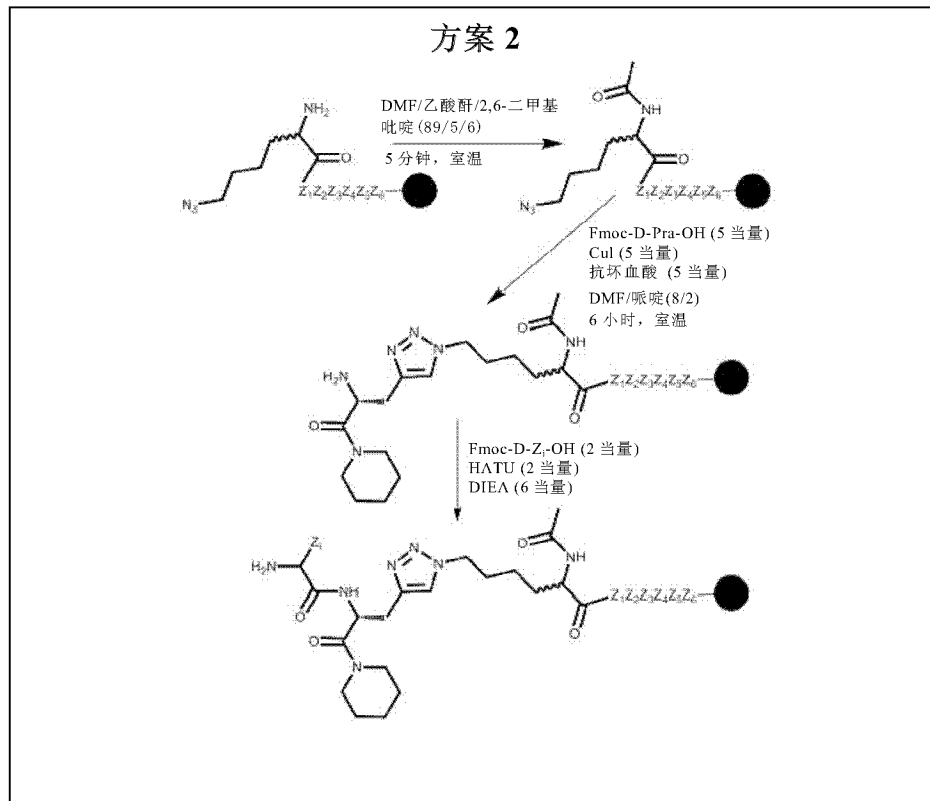
[0306] 小球上的双配位体合成。双配位体合成分四步完成 : (1) 锚配位体合成, (2) 乙酰化, (3) 点击反应, 和 (4) 根据前述的实施例所示方法添加第二配位体序列。方案 2 示范了乙酰化和点击反应。对于乙酰化,用含催化量 2,6- 二甲基吡啶的乙酸酐 (1mmol) 的 DMF 溶液封盖完全保护的 TentaGel S-NH₂ 小球结合的序列 (0.420g, 0.13mmol)。

[0307] 该乙酰化物肽与 Fmoc-D-Pra-OH (0.218g, 0.65mmol) 在铜 (I) 碘化物 (0.124g, 0.65mmol), L- 抗坏血酸 (0.114g, 0.65mmol), 和 DMF/ 哌啶 (8/2) 存在下在 25°C 反应 6 小时 (Zhang, Z. 和 E. Fan, 2006)。点击反应后,将该反应溶液从树脂排空,用 5×5 毫升含 1% DIEA (v/v) 的 DMF 溶液的二乙基二硫代氨基甲酸钠三水合物 (Et₂NCSSNa · 3H₂O, 1% w/v) 去除过量的配位铜 (Weterings, J. J. et al., 2006)。

[0308] 特别地,该双配位体锚 (D-Pra)-kwlwG1-Tz1-kfw1kl 是采用方案 2 被合成于 2- 氯三苯甲基氯化物 (1.6mmol/g) 树脂 (Anaspec, San Jose, CA) 上。该双配位体锚由 95 : 5 的 TFA : 水 (每侧链保护基 +2 摩尔当量三乙基硅烷净化剂) 裂解为完全去保护的肽,或者由 99 : 1 的 DCM : TFA 裂解为完全保护肽 (García-Martín, F. et al., 2007)。应注意 1° 配位体在此被合成为 Az4-kfw1kl (显示 N- 末端 Azn 修饰),以促进该小球上的点击反应,并且 D-Pra 和该 2° 配位体被结合于此序列,以产生直链双配位体。

[0309] 方案 2 示意了用于装配 1,2,3- 三唑以将锚配位体连接至双配位体或者更长的多配位体的第二配位体的方法。

[0310]

[0311] 实施例 10: 双配位体亲和力测量

[0312] 通过表面等离子共振 (SPR) 测定 K_D 。由 Biacore T 100SPR (California Institute of Technology Protein Expression Center, Pasadena, CA) 进行固定和双配位体感测实验。根据标准程序以 bCAII 固定一个生物传感器表面的流细胞 (Biacore CM 5), 其采用在 10mM 乙酸钠 (pH 5.0) 缓冲液和 0.1mM NHS 与 0.4mM EDC 的 1 : 1 溶液中的 0.25mg/mL bCAII (Papalia, G. A. et al., 2006)。类似地, 根据标准程序以 hCAII 固定第二流细胞, 其采用制备于 10mM 乙酸钠 (pH 5.5) 缓冲液中的 0.25mg/mL hCAII (Svedhem, S. et al., 2001)。用 100 μ L/分钟 的流速 420 秒实现 ~ 4000 RU 的固定水平。剩余的两个流细胞维持非衍生化, 以修正整体折射指数的变化以及评估非特异性结合。运行的缓冲液为包含 10mM HEPES+150mM NaCl+0.05% 吐温 20+3% DMSO, 此缓冲液用于所有实验。在肽被分析物实验之前, 完成 8 个单独缓冲液循环以制定基准稳定性。在 100 μ L/分钟 流速下 120–180 秒内跨越 4 个流细胞地注入一系列浓度的双配位体样品 (5 μ M 至 2nM)。背景扣除后, 用 BiaEvaluation 软件拟合被分析物响应数据, 得到 1 : 1 结合亲和力。

[0313] 结合响应 (图 28) 显示两个双配位体对 bCAII 的亲和力为 10^{-6} M。这证明, 图 28A 所示的选定双配位体的原位双配位体筛选, 以及图 28B 所示的选定双配位体的小球上双配位体库筛选, 在相似的双配位体序列上收敛为相似的亲和力。

[0314] 特别地, 图 28A 显示了用库 C 选自原位筛选 Bi1 的双配位体的 SPR 数据集, 指示 $K_D = 11 \mu$ M。图 28B 显示了用库 B 选自小球上筛选 Bi2b 的双配位体的 SPR 数据集, 工具库 D 指示 $K_D = 3 \mu$ M。与锚配位体和靶标之间的相互作用相比, 这些均衡离解常数表现出 150 倍的亲和力提高。

[0315] 根据上述内容, 合成双配位体锚 (D-Pra)-kwlwG1-Tz1-kfwlkl (分子量,

1993. 49)。

[0316] 实施例 11:识别三配位体捕获剂

[0317] 用该双配位体 (D-Pra)-kwlwG1-Tz1-kfwlkl 作为新的锚单元,以库 C (见实施例 2, 3, 和 7) 重复图 7 筛选,以识别三配位体 rfviln-Tz2-kwlwG1-Tz1-kfwlkl (图 6),并且通过 SPR 方法对于 bCAII 和 hCAII 分别显示出 60nM 和 45nM 的结合亲和力。

[0318] 用图 7 形成原位三配位体筛选的观察到的在命中的小球中氨基酸的位置依赖性频率的直方图 (图 32)。共有的第三配位体是 Az4-nlivfr。

[0319] 图 32 显示了对于具有含叠氮基氨基酸的肽 (a) 和不具有含叠氮基氨基酸的肽 (c),以形成三配位体的第一代原位点击筛选的位置从属性直方图,(a) 对于原位筛选 (Tri1),1/3 的小球在 x1 或者 x7 位没有叠氮化物,但是所有命中的小球包含叠氮基。(b) 第一和第二代 CuAAC 库筛选 (Tri2 和 Tri4),其中该 3° 配位体可变区通过 CuAAC(Tz2;图 32) 结合至该双配位体,形成独立的原位结果确认。最终共有的三配位体序列以灰色字体显示。其在小球上三配位体筛选,以及原位筛选中均产生相同的共有序列,并证实这两个类型筛选等效。(c) 在没有叠氮化物的情况下,该原位三配位体筛选产生完全不同的,并且同源性差很多的命中序列,因为该三配位体捕获剂被阻止形成(对照完成的筛选 TriX)。此结果说明了官能团的重要性,比如叠氮化物和乙炔,它们在靶标的表面上相互作用以形成多配位体捕获剂。样本量:原位=25 命中;原位无叠氮化物=24 命中;CuAAC 库=21 命中。

[0320] 通过第二代原位筛选 Tri3 获得的共有序列第三配位体几乎完全相似于第一代筛选 (Tri1) 分离的第三配位体。这种序列同源性是该原位筛选独有的,其显示了靶标导向性选择。

[0321] 实施例 12:用小球上的点击反应合成三配位体

[0322] 由个别的 6-元聚合物组成的三配位体可以通过标准的固相合成大量制备,然后这些个别的片段通过 Cu(I) 催化的叠氮化物-炔环加成 (CuAAC) 连接 [Tornøe and Meldal, "Peptidotriazoles: Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions on Solid-Phase" in Peptides: The Wave of the Future (Lebel and Houghten, eds., 2001), p. 263; Tornøe et al., J. Org. Chem. 67 (9): 3057-3064 (2002); Rostovtsev, V. V. et al., 2002]。

[0323] 另外,三配位体合成可以在小球上进行。在小球上进行铜 (I) 催化的点击化学反应,一般分四个步骤:(1) 锚配位体合成,(2) 乙酰化,(3) 点击反应,和 (4) 根据前述的实施例 9 所示方法添加 2° 配位体序列。特别地,三配位体通过完全保护的双配位体锚 (D-Pra)-kwlwG1-Tz1-kfwlkl (0.274g, 0.1mmol, > 98% HPLC) 和小球结合的 3° 配位体 Az4-nlivfr (0.1g, 0.03mmol) 之间的点击反应用碘化亚铜 (0.021g, 0.1mmol) 和 L-抗坏血酸 (0.020g, 0.1mmol) 在 DMF/哌啶 (8/2) 在 25°C 反应整夜合成。

[0324] 上述方法被用于制备库 D, E, 和 G (见实施例 2 的表 1),以及候选三配位体的大量合成。

[0325] 实施例 13:确认蛋白催化的原位多配位体形成

[0326] 根据图 7 的方案制备蛋白催化的多配位体捕获剂,其中示范了三配位体捕获剂的生产。

[0327] 特别地,图 7 中显示了用于开发蛋白催化的多配位体捕获剂的方案。应该注意的

是在包括该多配位体的个别的肽配位体之间桥接的三唑连接有两个可能的结构。该两个可能的结构只显示了一个。

[0328] 当根据图 7 进行原位多配位体筛选时,只有非常少部分的小球上 n 阶配位体通过该蛋白共价结合液相锚配位体。用标准方法进行的该小球上 n 阶配位体的分析得到的信息大都是关于该 n 阶配位体自身的序列,因为它们包括 > 99% 的与小球结合的分子,而不是完全的多配位体。对于在先公开的原位点击化学作用筛选方法,三唑产物用色谱分离法然后用质谱分析鉴别 [Lewis, W. G. et al., 2002; Manetsch, R. et al., 2004; Bourne, Y. et al., 2004; Mocharla, V. P. et al., 2005; Whiting, M. et al., 2006]。对于原位采用图 7 的双配位体筛选的情形,则使用实施例 7 的成对筛选方法。这不是广泛可适用的方法,但在一个示范性的例子中显示有效(图 28)。因此,其它的策略可以用于证明蛋白催化的多配位体捕获剂化学作用已经获得成功。

[0329] 两种其它策略包括:序列同源性分析,和包括放大一个或多个标记配位体的分析。

[0330] 序列同源性:对于第一代双配位体和三配位体筛选,显著的结果是可观察到命中小球的极高的序列同源性。例如,对于来自筛选 Bi1 的第一次命中的 17 个小球,两种肽相同,且第三种肽只有单个氨基酸变化。对于筛选 Tri1(针对同一个库),在各个位置上最通常观察到的氨基酸(图 32)几乎精确反映第二代(集中)筛选 Tri3 中的共有序列。这种序列同源性是原位筛选独有的,其证明这些筛选能产生高选择性的命中物。

[0331] 对于三配位体筛选的情形,采用原位(图 7),形成在命中的小球中观察到的位置依赖的氨基酸频率直方图(图 32a)。基于该直方图构成两个集中的 OBOC 库。第一库仅包含 3° 配位体可变区,并被用于原位筛选 Tri3 中。第二库(库 G)包含相同的 3° 配位体可变区,并通过 CuAAC(Tz2;图 6)结合至该双配位体。该小球上的三配位体筛选 Tri4,以及该原位筛选 Tri3 两者均产生相同的共有序列。这证实这两个类型的筛选具有等效性。此外,进行了第三原位筛选 TriX,但是 Az_n (含叠氮基)氨基酸不包括在 OBOC 库中,因此阻止了三唑连接的形成。该筛选产生非常不同的,同源性相差许多的命中序列组合(图 32)。此结果证实了三唑连接在提供多配位体过程中的重要性。

[0332] 以标记的配位体进行分析:开发了酶连接的比色定量方法,用于检测小球上的,以蛋白为模板的多配位体(图 29)。此方法依赖于小分子的附着,比如生物素,其附着于该筛选使用的液相锚配位体。一旦筛选完成,只有包含该蛋白催化的多配位体的小球还会包含该小分子。该分子即提供可用于组成可以产生可检测信号的化学构造的柄。最成功的方法将有赖于可以被放大的信号。例如,如果将酶附加至该小分子,则酶可以用于催化一些化学过程,然后该化学过程本身使该小球上的蛋白催化的多配位体显现放大的特征。通过该酶促反应生成的产物分子可以具有独特的颜色,荧光,或者其它不常见的可以被检测的化学或者物理性质,其由此可以证明该小球上的多配位体产物的形成。图 29 展示了此种分析结果,其用于检测图 7 显示的 3° 配位体筛选得到的三配位体在小球上的形成。

[0333] 特别地,图 29A 显示了用于小球上三唑形成的原位点击分析方法示意图,其采用生物素化的双配位体锚[生物素-(EG)₅-(D-Pra)-kwlwGl-Tz1-kfwlk1]。靶标解离后,图 29B 显示了用碱性磷酸酶-链霉亲和素(AP-SA),随后用 BCIP(5-溴代-4-氯代-3-碘基磷酸盐;根据 Liu, G. 和 K. S. Lam, 2000)处理,形成紫色小球(显示为暗灰色),作为多配位体形成的阳性指标。原位三配位体仅在 b(h)CAII 蛋白存在下形成,而在蛋白是人传递蛋白

(Tf), BSA, 或者不存在时不能形成。当该双配位体锚序列不正确时, 也不能观察到三配位体。

[0334] 用于检测和定量小球上的, 蛋白催化的多配位体蛋白捕获剂形成的 PCR 分析。此分析被显示于图 21。基于 PCR 的分析是酶催化分析的变体, 其中 AP-SA 被替换为结合了小模板低聚核苷酸 (5' ... NH₂-(CH₂)₆-GGGACAATTACTATTTACAATTACAATGCTCACGTGGTACGAGTTCGTCTCCCAGG... 3' -SEQ ID NO :1) 的链霉亲和素。此试剂结合至生物素化的三配位体可以使该模板低聚核苷酸扩充至该小球表面, 在该处其可以被 PCR 放大。放大的长度与该小球表面的低聚核苷酸的量成正比, 其提供该组装的三配位体的定量性读数。

[0335] 该链霉亲和素低聚物试剂可按如下所述进行制备: 根据先前的公开的方案进行 SAC 表达 (Sano, T. 和 C. R. Cantor, 1990)。

[0336] 在使用之前, 用脱盐柱 (Pierce) 将库存的 SAC (链霉亲和素-半胱氨酸) 更换缓冲液为含 5mM Tris (2-羧乙基) 膦酸盐 (TCEP) 的生理盐水 (TBS)。向 SAC 加入 300 : 1 摩尔过量的 MHPH (3-N-马来酰亚胺基-6-胍吡啶盐酸盐, Solulink) 的 DMF 溶液。同时, 以 40 : 1 的摩尔过量向该 5' 氨基低聚物添加 SFB 的 DMF (琥珀酰亚胺基-4-甲酰基苯甲酸酯, Solulink) 溶液。使混合物在室温下反应 3-4 小时。去除过量 MHPH 和 SFB, 并且将样品用 zeba 脱盐离心柱 (Pierce) 更换缓冲液为柠檬酸盐缓冲液 (50mM 柠檬酸钠, 150mM NaCl, pH 6.0)。然后以 20 : 1 摩尔过量将 SFB 标记的低聚物和衍生的 SAC 混合, 使其在室温下反应 2-3 小时, 随后转移至 4°C 培育整夜。用 Pharmacia Superdex 200 凝胶过滤柱以 0.5ml/分钟等浓度 PBS 流去除未反应的低聚物。用 10K mwco 浓缩过滤器 (微孔) 浓缩含 SAC-低聚物轭合物的部分。通过非还原的 8% Tris-HCl SDS-PAGE 确认 SAC-低聚物结构的合成。

[0337] 如上所述制备含三配位体的小球 (参见图 29A)。靶标解离后, 在水中洗涤 0.5mg 小球 10 次, 并将其再悬浮于阻滞缓冲液中 (0.15% BSA (w/v), 0.1% 吐温 20, 150 μg/mL 切变鲑精 DNA, pH 7.4 PBS 溶液)。将小球在 100 μL 阻滞缓冲液中洗涤 3 次, 并于 25°C 在 100 μL 阻滞缓冲液中培育 1 小时。然后过滤并在 100 μL 阻滞缓冲液中再洗涤小球两次。添加 100 μL 链霉亲和素-低聚物 (170ng/mL 的阻滞缓冲液溶液), 并在 25°C 下培育小球 1 小时。在 250 μL 阻滞缓冲液中洗涤小球 5 次, 然后在 250 μL PBS 中洗涤三次。将小球再悬浮于 dH₂O 中, 并点样在玻片上。蒸发后, 人工拾取小球, 并将其放入薄壁 PCR 管。

[0338] 在 Bio-Rad Real Time PCR 系统上进行定量 PCR (QPCR)。向含 1-5 个小球的各管添加 12.5 μL iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 11.5 μL dH₂O, 100nM 正向引物 (5' ... TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA... 3' -SEQ ID NO :2), 以及 100nM 反向引物 (5' ... ACCGCTGCCAGACCCCGATTTGGCCTGGGAGACGAACTCG... 3' SEQ IDNO :3)。用以下的热曲线进行 30 个实时 PCR 循环: 94°C, 30 秒, 50°C, 45 秒, 72°C, 60 秒。用已知的 0.01nM 至 0.01pM 的模板浓度生成标准曲线。绘出每一已知浓度针对模板浓度的对数的 Ct 值, 以形成线性的标准曲线, 然后用其确定每一样品管中的低聚物浓度。基于 SDS-PAGE 评估的每链霉亲和素四聚物存在的低聚核苷酸数目对其进行调整。

[0339] 实施例 14: 三配位体的亲和力测量

[0340] 用实施例 10 所示方法进行结合亲和力测量, 其描述三配位体捕获剂和 b(h)CAII 之间的特异性相互作用。然后以 100 μL/分钟流速, 120-180 秒的接触时间, 以及 300 秒的洗脱相在四个流细胞间收集三配位体 (图 33) 被分析物在不同浓度下的响应数据。背景扣

除之后,用 BiaEvaluation 软件拟合被分析物响应数据,获得 1 : 1 结合亲和力。在图 33 中显示了代表性的结果(图 33A 和图 33B)。

[0341] 特别地,图 33A 显示了通过渐增的该三配位体 rfviln-Tz2-kwlwG1-Tz1-kfwlkl (0.1nM 至 162nM) 获得的 SPR 响应传感图,并且分别显示了对于人(图 33A)和牛(图 33B)的 CA II 的 45nM 和 64nM 亲和力。与双配位体和靶标之间的相互作用相比,这些平均离解常数显示出 50 倍的亲和力提高(参见图 28)。

[0342] 实施例 15 :在三配位体存在下的酶活性分析

[0343] 测量了存在与不存在三配位体捕获剂时 bCAII 在基质 4-硝基苯基乙酸酯(4-NPA; Pocker, Y. 和 J. T. Stone, 1967) 上的酶活性,并且以不存在 bCAII 作为对照。当三配位体捕获剂存在于分析中时,酯酶活性不随时间变化。

[0344] 图 34 显示了实验结果。可观察到该三配位体没有干涉 bCAII 的酶活性,使其结合明显地远离正常催化作用的活性部位,或者至少不干涉该活性部位的正常催化作用。这种位点空闲,而高选择性的结合对于抗蛋白的自然抗体是普遍的,并且预示着此技术的前景良好。

[0345] 实施例 16 :血清中的斑点印迹选择性 / 灵敏度分析

[0346] 斑点印迹是检测蛋白的常规方法。在 10% 的猪血清中通过使用斑点印迹实验论证了在复杂环境中多配位体(双配位体和三配位体)捕获剂对于 b(h)CAII 的灵敏度和选择性。将含所感兴趣蛋白的溶液点样于吸收剂膜材料上(通常是硝化纤维),用于斑点印迹。用生物素分子标记捕获剂(通常是抗体),并将其施加于相同的点。漂洗该点,然后添加辣根过氧化酶(HRP)-标记的链霉亲和素,结合至和该蛋白结合的生物素。通常利用光学法检测此种结合。

[0347] 对于这些测试,生物素-PEG-NovaTag 树脂(0.48mmol/g; Novabiochem) 被用于 C-末端生物素标记的多配位体的大量合成。树脂分裂后,用醚沉淀该生物素化的多配位体粗品然后通过 C₁₈ 反相 HPLC 提纯至 > 98%。

[0348] 用于斑点印迹分析的步骤如下:将 b(h)CAII 抗原制备为 1mg/mL 的 PBS(pH7.4) 储存溶液。将一系列稀释度的抗原添加至硝化纤维膜,通常为每点 2 μg 至 0.5ng。在含 5% 乳的生理盐水(TBS) [25mM Tris, 150mM NaCl, 2mMKCl (pH 8.0)] 溶液中,于 4°C 阻滞过夜。然后用 TBS 洗涤该膜。在 10% 猪血清的 TBS+0.1% DMSO 溶液中以 1 μM 制备生物素化的多配位体,并于 4°C 在该膜上培育过夜。用 TBS 洗涤 1 小时后,向该膜加入在含 0.5% 乳/TBS 中制备的 1 : 3000 的链霉亲和素-HRP(Abcam, Cambridge, MA), 并培育 1 小时。用 TBS 洗涤 1 小时后,将该膜用化学发光试剂处理(SuperSignal West Pico 化学发光增强剂和基质溶液, Pierce, Rockford, IL), 然后即刻在膜上显影。

[0349] 使用该双配位体(图 14) 和该三配位体(图 15) 检测来自猪血清的 hCAII 和 bCAII 的斑点印迹分析结果显示于图 21。应注意 bCAII 和 hCAII 的序列 > 80% 相同(PDB ID: 1CA2, 1V9E)。

[0350] 特别地,图 21A 显示了斑点印迹分析,其示出该三配位体在 10% 猪血清中对于 b(h)CAII 的检出限。该检出限是 20ng 蛋白。图 21B 显示,当该双配位体锚(D-Pra)-kwlwG1-Tz1-kfwlkl 在 0.1% 血清中被用作捕获剂时,灵敏度减少 > 10 倍。

[0351] 实施例 17 :支链多配位体捕获剂

[0352] 直链多肽链可以采用折叠结构,因此和可能的蛋白靶标可显现许多可能的第三级相互作用。支链寡肽可以模仿这种折叠结构,但是其主要优点是具有小得多的印迹(并且因此制作起来便宜得多)。图8所示方法制备的支链多配位体捕获剂还可以呈现许多期望的化学,物理,和生化性质-即,在各种使抗体和天然多肽不稳定的环境中的稳定性。

[0353] 和用低分子量肽改进捕获剂亲和力有关的是支链和直链多配位体捕获剂的比较结合动力学和热力学。图17以图示说明了此效应。

[0354] 特别地,图17以图示方式比较了直链和支链的三配位体捕获剂。图17A显示了单一肽链的直链三配位体捕获剂。图17B(一分支点)和图17C(两分支点)显示了支链三配位体捕获剂的代表性结构。和直链多配位体以及在支链捕获剂中相比较,该支链多配位体中的分支点形成不同的构象动力学的。相对于类似的已经开发的但是直链的多配位体捕获剂,在该支链多配位体结构中围绕这些键的被阻旋转具有增加亲和力的潜能。

[0355] 已经用图8所示的方法针对b(h)CAII蛋白开发了支链多配位体捕获剂。作为直链的情形(图7),在两代原位双配位体筛选中使用了锚配位体1klwfk-(D-Pra)。第一代筛选BrBi1鉴别第二(2°)配位体(库H)中能够容许分支的位置。在筛选BrBi1中,将50nM bCAII-Alexa647的溶液和肽锚配位体(1klwfk-(D-Pra),相对于蛋白2000×)在PBS(pH 7.4)+0.1%吐温20+0.1%BSA+0.05%NaN₃+1%DMSO(v/v)中,于37°C下培育2小时。向库H加入该锚配位体/蛋白溶液并在37°C下培育18小时,伴随振动。筛选出的小球用6×5mL PBS(pH 7.4)+0.1%吐温20+0.1%BSA+0.05%NaN₃,2×5mL PBS(pH 7.4)+0.1%吐温20,和4×5mL PBS进行洗涤。用实施例3所示出的方案对这些小球荧光成像。通过微量吸管选取命中物(表示原位双配位体),将其用7.5M盐酸胍(pH 2.0)处理以去除结合蛋白,然后由Edman降解法分析,以对该第二配位体的序列进行译码。

[0356] 表3显示了筛选BrBi1的结果。Az4作为选定的第二配位体中的第四残基的高保留显示图8所示的我们的方法对于分支点选择是成功的。

[0357] 表3

[0358]

| x ₁ | x ₂ | x ₃ | x ₄ | x ₅ | x ₆ |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| i | k | f | Az4 | v | w |
| i | k | v | Az4 | i | w |
| f | k | w | Az4 | i | w |
| f | k | w | Az4 | i | w |
| v | k | v | Az4 | i | w |
| w | k | v | Az4 | i | w |
| w | k | i | Az4 | i | w |
| f | k | l | f | i | k |
| f | k | l | w | i | k |
| i | f | i | k | i | k |
| i | v | k | w | k | k |
| f | k | f | Az4 | f | f |
| Az4 | k | w | G | G | l |
| Az4 | k | f | Az4 | i | w |

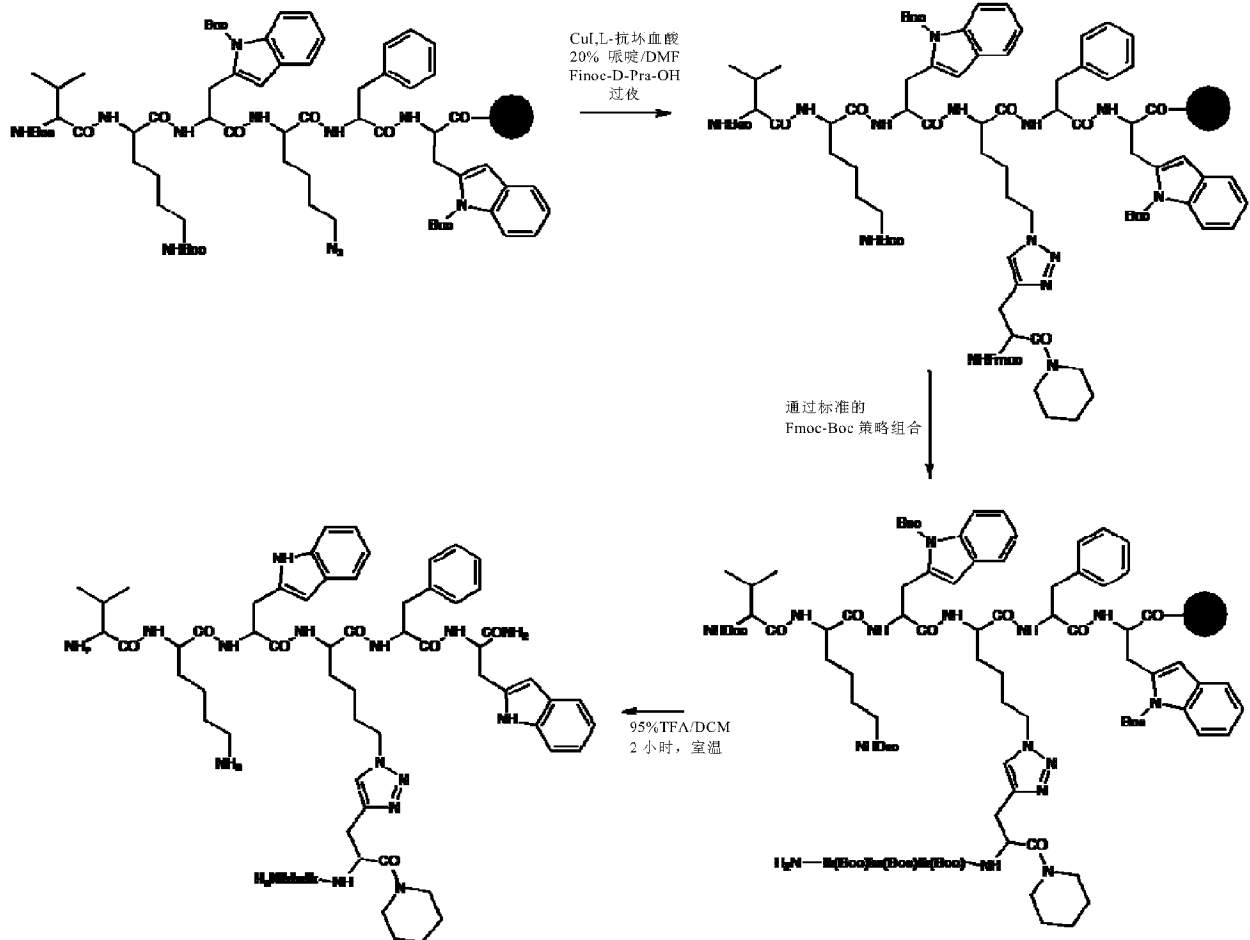
[0359] 二代筛选BrBi2用第二(2°)配位体(库I)的集中库确定vkw(Az4)fw和wkv(Az4)lw为两个最佳化的第二候选配位体。在筛选BrBi2中,将10nM至500pM的bCAII-Alexa647溶液和肽锚配位体(1klwfk-(D-Pra),40μM)在PBS(pH7.4)+0.1%吐温

20+0.1% BSA+0.05% NaN₃+1% DMSO(v/v) 中,于 25℃ 预培育 2 小时。向库 I 加入该锚配位体/蛋白溶液并在 25℃ 下培育 15 小时,伴以振动。洗涤这些筛选出的小球,荧光成像,并用实施例 3 示出的方案选取。用 7.5M 盐酸胍 (pH 2.0) 处理以去除结合蛋白后,通过 Edman 降解法分析产生最佳化的第二配位体序列列表,将其用于实施例 7 所述的直方图分析。直方图分析显示,所有来自筛选 BrBi2 的命中物均包含单一的共有序列, x1-k-x3-Az4-x5-w。两个候选的支链双配位体捕获剂, vkw(Tz1)fw-kfwlk1 和 wkv(Tz1)lw-kfwlk1(前者由图 16A 的分子结构显示)显现出优越性,因为在同一筛选期间它们被观察到两次,并在最低蛋白浓度测试(即 ≤ 1nM 靶标)中是仅有被分离的命中物。

[0360] 利用小球上点击反应合成支链双配位体。如方案 4 所示,通过直链双配位体合成的修饰方法进行支链双配位体合成(实施例 9 的方案 2)。首先在 Fmoc-Rink 酰胺 MBHA 树脂 (0.67mmol/g) 上用 N^α-Fmoc 保护策略合成第二 (2°) 配位体。末端氨基酸(例如方案 4 所示的 D-Val) 被安装为 N^α-Boc 保护形式,其在此片段上封盖进一步的合成。之后,使用碘化亚铜 (0.15mmol) 和 L-抗坏血酸 (0.15mmol) 的 DMF/哌啶 (8/2) 溶液,在 25℃ 过夜,使该 Fmoc-D-Pra-OH(0.15mmol) 通过 CuAAC 以共价键连接该小球结合的第二配位体 (0.03mmol)。其对于进一步的肽合成在此分支点显现一末端胺,通过标准的 N^α-Fmoc 保护策略结合该锚配位体序列 (1klwfk) 的剩余部分。用 95 : 5 的 TFA : 三乙基硅烷 (TES) 净化剂处理后,通过 HPLC 将此支链双配位体提纯至 > 95%。

[0361] 方案 4

[0362]



[0363] 图 16A 显示了对应 bCAII 的支链双配位体捕获剂的化学结构 vkw (Tz1) fw-kfw1k1。用实施例 10 所述的 SPR 方法进行结合亲和力测量,其描述支链双配位体捕获剂和 bCAII 之间的特异性相互作用。图 16B 显示了以渐增浓度的双配位体 (0 至 1656nM) 获得的 SPR 响应传感图,其证明了对 bCAII 的 500nM 双配位体亲和力。与类似的已经开发的直链双配位体捕获剂的结合亲和力相比,此支链体的亲和力增加了五倍。相应地,支链三配位体可以遵循同样的亲和力提高幅度,并应当显现 pM 亲和力。

[0364] 利用支链双配位体作为较长的支链多配位体捕获剂的锚配位体。

[0365] 一旦支链双配位体被确定,该支链双配位体即可作为图 8 的锚配位体,并且可以在第三 (3°) 筛选中选择支链三配位体。第三代筛选 BrBi3 用更集中的第二 (2°) 配位体库 (库 J) 确定了 D-Lys 是适合的氨基酸,可用于在位置 x_0 装配新的分支点。在该筛选 BrBi3 中,10nM bCAII-Alexa647 的溶液和肽锚配位体 (1k1wfk-(D-Pra), 40 μ M) 在 PBS (pH 7.4)+0.1% 吐温 20+0.1% BSA+0.05% NaN_3 +1% DMSO (v/v) 中,于 25°C 下预培育 2 小时。向库 J 加入该锚配位体/蛋白溶液并在 25°C 下培育 15 小时,并进行振动。洗涤筛选此的小球,荧光成像,用实施例 3 示出的方案选取。用 7.5M 盐酸胍 (pH 2.0) 处理以去除结合蛋白之后,通过 Edman 降解法分析得到表 4 所示的序列。表 4 的分析可确定,在 x_0 具有第二分支点的 kwkv (Az4) 1w 适于构建支链双配位体锚。

[0366] 表 4

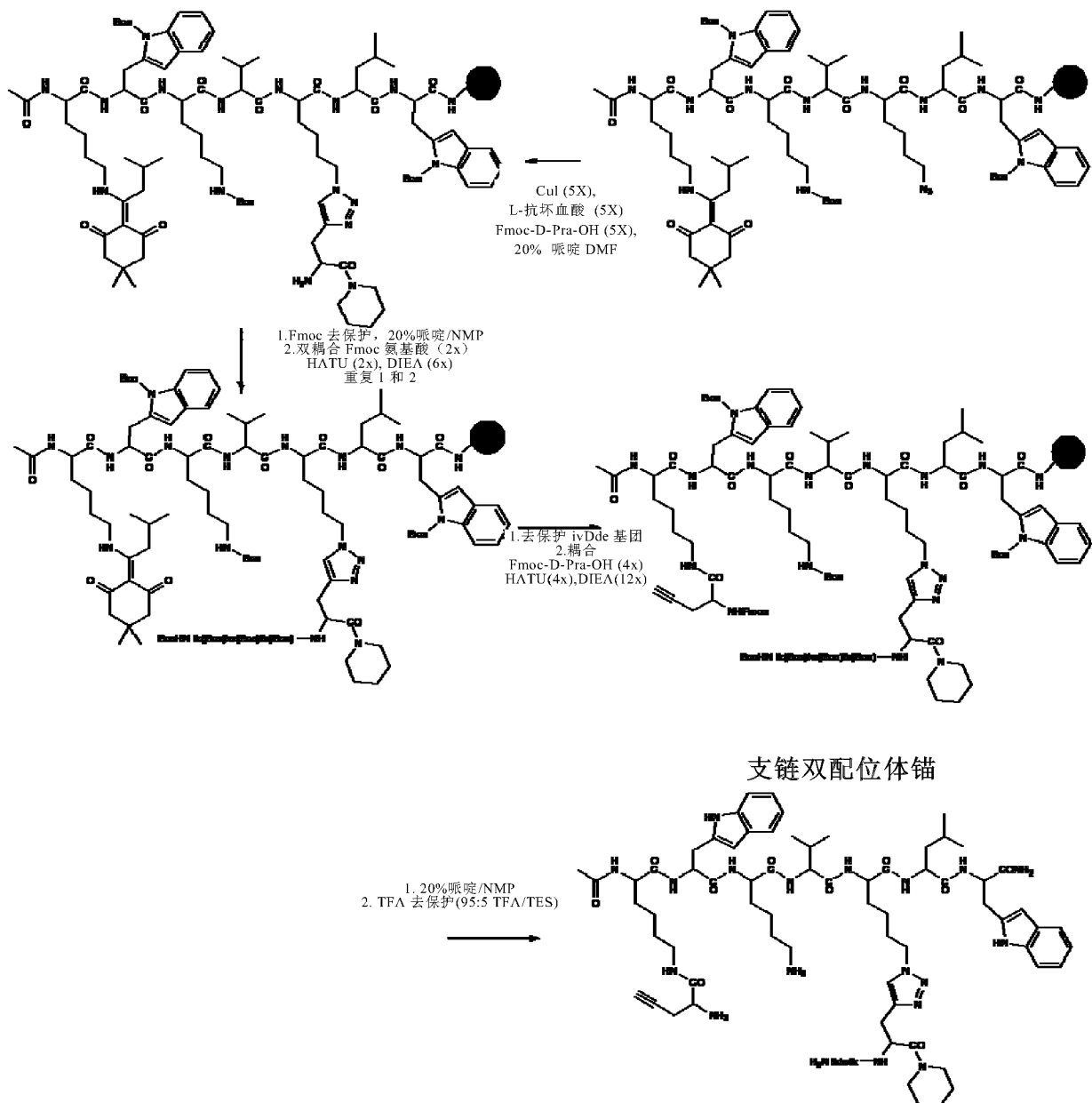
[0367]

| x_0 | x_1 | x_2 | x_3 | x_4 | x_5 | x_6 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| K | w | K | w | Az4 | L | w |
| R | v | K | w | Az4 | I | w |
| V | w | K | v | Az4 | I | w |
| K | w | K | v | Az4 | L | w |
| A | v | K | v | Az4 | L | w |
| I | v | K | w | Az4 | L | w |
| I | w | K | v | Az4 | F | w |

[0368] 可以用三配位体,四配位体等重复该 BrBi3 筛选方法,用于识别 n 阶锚中的用于选择 n 阶支链多配位体捕获剂的新分支点位置。

[0369] 如方案 5 所示,通过略微改变方案 4 进行支链双配位体锚的合成。首先在 Fmoc-Rink 酰胺 MBHA 树脂 (0.67mmol/g) 上用标准的 N^{α} -Fmoc 保护策略合成第二 (2°) 配位体。合成该第二 (2°) 配位体的 N-末端位置,以通过结合 D-Lys(ivDde) (ivDde = 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己基-1-亚基)-3-甲基丁基) 呈现第二分支点,其允许选择性脱保护以及在之后的步骤和 D-Lys 侧链反应。应注意 D-Lys 是通过 BrBi3 筛选选定的 x_0 残基。在该 D-Lys(ivDde) 用乙酸酐结合并封盖之后 (见实施例 9),获得修饰的第二配位体 Ac-k(ivDde)wkv(Az4)lw。之后,用碘化亚铜 (0.15mmol) 和 1-抗坏血酸 (0.15mmol) 的 DMF/哌啶 (8/2) 溶液在 25°C 反应过夜,通过 CuAAC 将 Fmoc-D-Pra-OH (0.15mmol) 以共价键连接至该小球结合的修饰的第二配位体 (0.03mmol)。剩余部分的锚配位体序列 (1k1wfk) 通过标准的 N^{α} -Fmoc 保护策略被结合到显示可用于进一步肽合成的末端胺分支点上。最后,用肼在 DMF 中的 2% 溶液处理,以选择性脱除 ivDde 保护基,其显示 Fmoc-D-Pra-OH 通过标准的酰胺结合化学作用结合的伯胺。

[0370]



[0371] 支链三配位体捕获剂的识别。遵循图 8 所示的方法,用方案 5 的支链双配位体锚 (D-Pra)-kwkv(Tz1)lw-kfwlkl 针对 bCAII 和库 C 进行第三 (3°) 筛选,以识别支链三配位体捕获剂。在筛选 BrTri1 中,用 100 μ M 支链双配位体锚在 PBS (pH 7.4)+0.1%吐温 20+0.1% BSA+0.05% Na_3N +1% DMSO (v/v) 中,于 25°C 下预培育 50nM bCAII-Alexa647 的溶液 16 小时,同时振动。洗涤筛选出的小球,荧光成像,用实施例 3 的方案选取。用 7.5M 盐酸胍 (pH 2.0) 处理以去除结合蛋白后,Edman 降解法分析得到第三 (3°) 配位体序列。按照实施例 11 方法进行第三配位体序列的直方图分析,得到支链的三配位体捕获剂,如图 17B 所示例子,以及图 18 的分子结构所示。

[0372] 实施例 18:用于合成多配位体捕获剂的方法

[0373] 官能团,比如叠氮基和乙炔基 (图 2),可以功能化多配位体捕获剂的蛋白质催化组件,如实施例 5 和实施例 17 所示。官能团仅是是筛选工具,在诊断分析,分离等方法中实行的捕获剂中不一定是期望的。用于大量合成用于这类分析的多配位体捕获剂的步骤包括用 2-氨基酸连接替换叠氮化物-炔 1,2,3-三唑连接。此种替换连接可以不更改现有的自

动化肽合成仪器进行高吞吐量的捕获剂生产。图 35A 显示了一个用于筛选替换连接物的 OBOC 库的组成,其在该三配位体捕获剂中针对 bCAII 替换 1,2,3-三唑连接物 (Tz1 和 Tz2)。按照上述的实施例 3 用该库进行筛选。

[0374] 图 35B 显示了代表性的命中物,其指示哪一个 D-氨基酸适合置换 Tz1 或者 Tz2。若干这些命中物的分子结构被显示于图 36:图 36A 表示 TzR1,其中 Tz2 = Gf, Tz1 = nk;图 36B 表示 TzR3,其中 Tz2 = a1, Tz1 = dk;以及图 36C 表示 TzR2,其中 Tz2 = ps,并且 Tz1 = vv。

[0375] 应注意,该 1,2,3-三唑的新的代用品本身是一个骨架酰胺键,如图 37C 所示(转载自 Bock, V. D. et al., 2006)。这些酰胺键基团作为刚性联接单元可以模仿 1,2,3-三唑的原子位以及电子性能(Kolb, H. C. 和 K. B. Sharpless, 2003; Bock, V. D. et al., 2006)。该 Tz1 和 Tz2 连接物代表叠氮丁基和丙炔侧链基团之间的 1,2,3-三唑的共价合成(参见图 6),而因此两个至五个酰胺键可以理想模仿完整连接物的原子位和电子性能。图 35C 显示了一个例子,被选取的酰胺连接物可以比原 Tz1 和 Tz2 连接物更紧凑。可以开发酰胺连接物仿制品作为调节用于实施例 16, 20, 和 21 所述的蛋白质分析(例如,蛋白质印迹,斑点印迹膜,和类 ELISA 分析法)的捕获剂性能的手段。

[0376] 图 37 示范了具有酰胺键替代品的三配位体捕获剂的性能。通过圆二色性(CD)试验,发现三配位体捕获剂 TzR1 和原有的三配位体序列(rfviln-Tz2-kwlg1-Tz1-kfwlkl, 图 6)共享相似的结构;它们均为随机盘绕(图 37A)。相反, TzR2 和 TzR3 基于其强烈的 α -螺旋特性与图 6 的三配位体不同而被排除为适合的候选配位体。当通过 SPR 测量 TzR1 和 b(h)CAII 之间的结合交互作用时,平衡解离常数被估计为高 nM(图 33B)。具有酰胺键替代品的三配位体的第二代筛选集中在随机盘绕结构以及更长的 3-至 5-氨基酸连接物长度上,其可以产生 K_D 为 45-64nM 或者超过原三配位体的替代品三配位体。

[0377] 图 38 显示了用于识别替换 Tz2 连结物的 3-氨基酸连结物的筛选方法。应注意这种筛选方法是类 ELISA 的夹心式分析(见实施例 21),但是基质是小球而非微孔。在此方法中,总共 5832 个序列的 3-氨基酸连接物(Xi = D-Met 和 D-Cys 除外的任何 D-立体异构体)首先在阻滞缓冲液(25mM Tris-Cl, 10mM MgCl₂, 150mM NaCl, 14mM 2-巯基乙醇, 0.1% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) 吐温 20, pH 7.5)中,于 25°C 阻滞整夜。阻滞之后,用靶标(例如, 10nM 至 1 μ M bCAII)接触的该综合性数据库。在 25°C 接触 1 小时之后,用 5 \times 1mL 阻滞缓冲液洗涤该库/靶标复合物,以去除过量靶标,然后用第一抗体(例如 1 : 5000 稀释的兔多克隆抗 bCAII 抗体)培育 1 小时。用阻滞缓冲液洗涤小球以去除过量的初级抗体,然后用第二抗体(例如, 1 : 2000 稀释的,结合碱性磷酸酶(AP)的,抗兔 IgG 抗体)在阻滞缓冲液中培育 30 分钟并振动。用 5 \times 1mL 洗涤 1 缓冲液(25mM Tris-Cl, 10mM MgCl₂, 700mM NaCl, 14mM 2-巯基乙醇, pH 7.5),然后用 5 \times 1mL 洗涤 2 缓冲液(25mM Tris-Cl, 14mM 2-巯基乙醇, pH 7.5)洗涤小球以去除过量的第二抗体。将小球在显色底物 BCIP 中显影 20 分钟。选取暗紫色小球作为命中物,用盐酸胍(pH 2.0)洗涤以去除结合蛋白质,然后通过实施例 3 所述的 Edman 降解法测序,以识别 X₁, X₂, 和 X₃。

[0378] 实施例 19:双配位体和三配位体捕获剂-构造上的考虑。

[0379] 图 5 和图 6 分别显示了蛋白质催化的双配位体捕获剂和蛋白质催化的三配位体捕获剂的结构。这些捕获剂是根据实施例 4-12 的方法制造的。

[0380] 用非天然氨基酸 (D- 立体异构体) 和人工氨基酸组成的 1° 肽配位体开始, 连续地组合图 5 和图 6 所示的捕获剂。由该 1° 肽配位体, 蛋白质 bCAII, 和大型的一小球一化合物库组成的蛋白质催化筛选被用于识别双配位体 ($1^\circ + 2^\circ$)。类似地制备三配位体 ($1^\circ + 2^\circ + 3^\circ$), 只是用该双配位体和蛋白质 bCAII 筛选一小球一化合物库。

[0381] 这些捕获剂可以通过向配位体组件之一的终端加入生物素分子进行修饰, 如图 14 和图 15 所示, 锚配位体 (图 26) 和双配位体可以用能够位点特异性地结合捕获剂的异硫氰酸荧光素 (FITC), 其它小分子标记, 低聚核苷酸, 和蛋白进行修饰。

[0382] 实施例 20: 用多配位体捕获剂进行的蛋白质印迹。

[0383] 蛋白质印迹是第二常见的蛋白检测方法。天然蛋白质印迹和蛋白质印迹方法之间的差异在于, 标准的蛋白质印迹中受检测的蛋白质被变性。

[0384] 在用于检测蛋白的天然蛋白质印迹方法中, 样品中的蛋白经过非变性凝胶电泳并被转移吸收质膜上。捕获剂包括但不限于抗体或者多配位体, 其被用于检验该膜上的蛋白。该捕获剂特异性结合至靶标之后, 添加第二检测剂以特异性结合该捕获剂。该第二检测剂 (例如, 链霉亲和素 -HRP) 通常展现化学发光性, 使结果可视化。

[0385] 图 22 显示了天然蛋白质印迹从 10% 血清中检测 bCAII 的示范方法, 直接比较了三配位体和商业抗体。

[0386] 图 22A 显示了考马斯着色的天然凝胶, 其记载了总蛋白质含量。用第一抗体 (图 22B) 或者三配位体捕获剂 (图 22C) 探测的天然蛋白质印迹显示了甚至是在血清存在下对于 bCAII 的强烈的选择性, 并显示该三配位体敏感度接近于商业的抗体。

[0387] 实施例 21: 用多配位体捕获剂进行的 ELISA 类夹心式分析。

[0388] 夹心式分析是第三常用的蛋白检测方法。夹心式分析依赖于两个抗体, 第一捕获抗体 (1°) 和标记探测抗体 (2° 抗体), 用于检测所感兴趣的靶标 (蛋白质)。该 1° 抗体通常被涂覆在表面上, 比如 96- 孔板的孔表面。包含蛋白质的溶液 (比如血清) 被添加至该孔, 并使该蛋白质扩散到该表面, 在该处其被该 1° 抗体捕获。然后添加该 2° 抗体至同一个孔。此抗体被设计为可以结合受检测蛋白质的不同的结合位点, 或者抗原表位, 并且此 2° 抗体可以进行标记使得完整的蛋白质 + 抗体复合物可以用光学方式或者一些其它方式被检测。对于光学检测, 标记通常是光学吸收的染料分子或者荧光染料分子, 并且该标记通常通过先将生物素接合至该 2° 抗体, 然后将标记蛋白质 (例如链霉亲和素) 结合至该生物素的方式结合附着于该 2° 抗体。其它方法也是可行的, 比如直接将荧光性标记附着于该 2° 抗体, 或者用金纳米微粒作为标记代替荧光性或者光学吸收性染料分子, 或者使用放射性分子作为标记, 此种情况可用闪烁计数器或者适当的敏化膜进行最终探测。

[0389] 在典型的 ELISA 夹心式分析中, 第一捕获抗体 (1°) 被涂覆在表面上 (例如, 96 孔板的孔中), 然后将含有靶分子的溶液扩散至该表面并特异性结合。标记 (例如生物素) 探测抗体 (2°) 通过特异性结合至该靶分子上的正交位点完成“夹心”。然后通过荧光或者其它的光学方法检测该标记, 信号强度与分析中俘获的靶分子量成正比。

[0390] 图 23 示范了在链霉亲和素功能化的微量滴定板上进行夹心式类型的 ELISA 分析, 以检测 bCAII, 使用结合的商业抗体 (2° 捕获剂) 和三配位体 (作为 1° 捕获剂)。

[0391] 图 23, 24 显示了用三配位体检测 bCAII 蛋白质的 ELISA- 类夹心式吸光分析法。具体地, 图 23A 显示充分组合的分析法的架构。图 23B 显示了在 96 孔板的孔中进行的变浓

度的 bCAII 的 ELISA 分析试验数据。增加的 bCAII 浓度被检测为增加的灰色。图 23C-23D 显示了两种典型的分析条件。图 23C 用缓冲溶液中存在的 bCAII 进行分析,而图 23D 在 10% 猪血清中进行分析且三配位体捕获剂或者探测抗体的特异性结合均未受影响。

[0392] 以上所述实施例旨在向本领域普通技术人员提供如何制作和使用在此公开的装置,系统和方法的实施方式的完整公开和说明,其不是为了限制发明人所认为的公开范围。本公开内容中所有提及的专利和出版物提示了在此公开内容涉及的本领域技术人员的技术水平。本公开内容中全部引用的参考文献以引证的方式被结合,其程度如同各参考资料已经以参考方式被各自地全部合并于此。

[0393] 各引用文件(包括专利,专利申请,杂志文章,摘要,实验手册,书籍,或者其它公开内容)以参考方式被合并于此。

[0394] 进一步地,一同递交的序列表的硬拷贝与相应的计算机可读形式均以参考方式被完全合并于此。

[0395] 应当理解,在此公开的内容不局限于特定的组合物或者生物系统,其可以毫无疑问地变化。还应当理解此处使用的术语仅仅是为了描述特定实施方式的目的,不是为了作为限制。在此说明书和后附权利要求中使用,除非内容中有明确限定,单数形式“一”,和“该”包括复数个指示物。除非有明确限定的内容,术语“多个”和“复数个”包括两个或两个以上指示物。除非另外定义,此处所用的本公开内容涉及的全部学术和科学术语具有和本领域普通技术人员通常理解相同的含义。

[0396] 本公开内容的许多实施方式已有叙述。不过应当理解,在不离开本文公开内容的精神和范围前提下,可以作出各种改进。特别地,对于本领域技术人员显而易见的用于实施在此公开内容的上述方式的改进也在本文公开的内容范围内。相应地,其它实施方式也落入以下权利要求的范围。

[0397] 参考文献

[0398] Atherton, E. and R. C. Sheppard, in *Solid Phase Peptide Synthesis—A Practical Approach*, Oxford University Press, USA, 1989, p. 136.

[0399] Baldwin, J. J., J. J. Burbaum, I. Henderson, and M. H. J. Ohlmeyer (1995). “Synthesis of a Small Molecule Combinatorial Library Encoded with Molecular Tags”. *J. Am. Chem. Soc.* 117(20) :5588–5589.

[0400] Bock, V. D., H. Hiemstra, and J. H. van Maarseveen, (2006). “CuI-Catalyzed Azide-Alkyne “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective.” *Eur. J. Org. Chem.* :51–68.

[0401] Bourne, Y., H. C. Kolb, Z. Radić, K. B. Sharpless, P. Taylor, and P. Marchot (2004). “Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(6) :1449–1454.

[0402] Brown, S. (1997). “Metal-recognition by repeating polypeptides.” *Nat. Biotechnol.* 15 :269–272.

[0403] Cao, P., K. Xu, and J. R. Heath (2008). “Azidation of Silicon(111) Surfaces.” *J. Am. Chem. Soc.* 130(45) :14910–14911.

[0404] Carpino, L. A., A. El-Faham, C. A. Minor, and F. Albericio (1994). “Advantageous

applications of azabenzotriazole(triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis. ” J. Chem. Soc., Chem. Commun. 2 :201-203.

[0405] Chenault, H. K., J. Dahmer, and G. M. Whitesides(1989). “Kinetic resolution of unnatural and rarely occurring amino acids;Enantioselective hydrolysis of N-acyl amino acids catalyzed by acylase I. ” J. Am. Chem. Soc. 111(16) :6354-6364.

[0406] Coin, I., M. Beyermann, and M. Bienert(2007). “Solid-phase peptide synthesis :From standard procedures to the synthesis of difficult sequences. ” Nat. Protocols2(12) :3247-3256.

[0407] Dixon, S. M. ;P. Li, R. Liu, H. Wolosker, K. S. Lam, M. J. Kurth, and M. D. Toney (2006). “Slow-binding human serine racemase inhibitors from high-throughput screening of combinatorial libraries. ” J. Med. Chem. 49(8) :2388-2397.

[0408] Eteshola, E., L. J. Brillson, and S. C. Lee(2005). “Selection and characteristics of peptides that bind thermally grown silicon dioxide films. ” Biomol. Eng. 22 :201-204.

[0409] Fan, R., O. Vermesh, A. Srivastava, B. K. H. Yen, L. Qin, H. Ahmad, G. A. Kwong, C. -C. Liu, J. Gould, L. Hood, and J. R. Heath(2008). “Integrated barcode chips for rapid,multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood. ” Nat. Biotechnol. 26 :1373-1378.

[0410] Furka, A., F. Sebestyén, M. Asgedom, and G. Dibo, (1991). “General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. ” Int. J. Pept. Protein Res. 37 : 487-493.

[0411] García-Martín, F., N. Bayó-Puxan, L. J. Cruz, J. C. Bohling, and F. Albericio(2007). “Chlorotriyl Chloride(CTC)Resin as a Reusable Carboxyl Protecting Group. ” QSAR Comb. Sci. 26(10),1027-1035.

[0412] Geysen, H. M. and T. J. Mason(1993). “Screening chemically synthesized peptide libraries for biologically-relevant molecules. ” Bioorg. Med. Chem. Lett. 3(3) :397-404.

[0413] Gramlich, P. M. E., C. T. Wirges, J. Gierlich, and T. Carell(2008). “Synthesis of Modified DNA by PCR with Alkyne-Bearing Purines Followed by a Click Reaction. ” Org. Lett. 10(2) :249-251.

[0414] Halpin, D. R., J. A. Lee, S. J. Wrenn, and P. B. Harbury(2004). “DNA Display III. Solid-Phase Organic Synthesis on Unprotected DNA. ” PLoS Biology2(7) :1031-1038.

[0415] Hochgürtel, M., H. Kroth, D. Piecha, M. W. Hofmann, C. Nicolau, S. Krause, O. Schaaf, G. Sonnenmoser, and A. V. Eliseev(2002). “Target-induced formation of neuraminidase inhibitors from in vitro virtual combinatorial libraries. ” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(6) :3382-3387.

[0416] Hu, X., J. Sun, H. -G. Wang, and R. Manetsch(2008). “Bcl-XL-Templated Assembly of Its Own Protein-Protein Interaction Modulator from Fragments Decorated with Thio Acids and Sulfonyl Azides. ” J. Am. Chem. Soc. 130(42) :13820-13821.

- [0417] Kolb, H. C. and K. B. Sharpless (2003). "The growing impact of click chemistry on drug discovery." Drug Disc. Today 8(24) :1128-1137.
- [0418] Krasinski, A., Z. Radić, R. Manetsch, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, and H. C. Kolb (2005). "In situ selection of lead compounds by click chemistry: Target-guided optimization of acetylcholinesterase inhibitors." J. Am. Chem. Soc. 127(18) :6686-6692.
- [0419] Lam, K. S., M. Lebl, and V. Krchňák (1997). "The 'one-bead-one-compound' combinatorial library method." Chem. Rev. 97(2) :411-448.
- [0420] Landon, L. A., J. Zou, and S. L. Deutscher (2004). "Effective combinatorial strategy carbohydrate to increase affinity of carbohydrate binding by peptides." Mol. Diversity 8 :35-50.
- [0421] Laursen, R. A. (1971). "Solid-phase Edman degradation: An automatic peptide sequencer." Eur. J. Biochem. 20 :89-102.
- [0422] Lee, H.-S., J.-S. Park, B. M. Kim, and S. H. Gellman (2003). "Efficient synthesis of enantiomerically pure β^2 -amino acids via chiral isoxazolidinones." J. Org. Chem. 68(4) :1575-1578.
- [0423] Lehman, A., S. Gholami, M. Hahn, and K. S. Lam (2006). "Image subtraction approach to screening one-bead-one-compound combinatorial libraries with complex protein mixtures." J. Comb. Chem. 8(4) :562-570.
- [0424] Lewis, W. G., L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radić, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, and K. B. Sharpless (2002). "Click chemistry in situ: Acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks." Angew. Chem. 114(6) :1095-1099; Angew. Chem. Int. Ed. 41(6) :1053-1057.
- [0425] Lewis, J. K., J. Wei, and G. Siuzdak (2000). "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis." In Encyclopedia of Analytical Chemistry, R. A. Meyers (ed.), 5880-5894.
- [0426] Li, S., D. Bowerman, N. Marthandan, S. Klyza, K. J. Luebke, H. R. Garner, and T. Kodadek (2004). "Photolithographic Synthesis of Peptoids." J. Am. Chem. Soc. 126(13) : 4088-4089.
- [0427] Li, S., N. Marthandan, D. Bowerman, H. R. Garner, and T. Kodadek (2005). "Photolithographic synthesis of cyclic peptide arrays using a differential deprotection strategy." Chem. Commun. 581-583.
- [0428] Liu, G. and K. S. Lam, in Combinatorial Chemistry-A Practical Approach, Ed. H. Fenniri, Oxford University Press, USA, 2000, pp. 43-44.
- [0429] Lusvardi, S., J. M. Kim, Y. Creeger, and B. A. Armitage (2009). "Refined multivalent display of bacterial spore-binding peptides." Org. Biomol. Chem. 7 : 1815-1820.
- [0430] Manetsch, R., A. Krasinski, Z. Radić, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, and

H. C. Kolb(2004). "In situ click chemistry :Enzyme inhibitors made to their own specifications." J. Am. Chem. Soc. 126(40) :12809-12818.

[0431] Marks, K. M. , M. Rosinov, and G. P. Nolan(2004). "In Vivo Targeting of Organic Calcium Sensors via Genetically Selected Peptides." Chem. Biol. 11 :347-356.

[0432] McAlpine, M. C. , H. D. Agnew, R. D. Rohde, M. Blanco, H. Ahmad, A. D. Stuparu, W. A. Goddard, and J. R. Heath(2008).

[0433] "Peptide-Nanowire Hybrid Materials for Selective Sensing of Small Molecules." J. Am. Chem. Soc. 130(29) :9583-9589.

[0434] Mocharla V. P. , B. Colasson, L. V. Lee, S. Röper, K. B. Sharpless, C. -H. Wong, and H. C. Kolb(2005). "In Situ Click Chemistry :Enzyme-Generated Inhibitors of Carbonic Anhydrase II." Angew. Chem. 117(1) :118-122 ;Angew. Chem. Int. Ed. 44(1) : 116-120.

[0435] Panicker, R. C. , X. Huang, and S. Q. Yao(2004). "Recent Advances in Peptide-Based Microarray Technologies." Comb. Chem. High Throughput Screen. 7(6) : 547-556.

[0436] Papalia, G. A. , S. Leavitt, M. A. Bynum, P. S. Katsamba, R. Wilton, H. Qiu, M. Steukers, S. Wang, L. Bindu, S. Phogat, A. M. Giannetti, T. E. Ryan, V. A. Pudlak, K. Matusiewicz, K. M. Michelson, A. Nowakowski, A. Pham-Baginski, J. Brooks, B. C. Tieman, B. D. Bruee, M. Vaughn, M. Baksh, Y. H. Cho, M. De Wit, A. Smets, J. Vandersmissen, L. Michiels, and D. G. Myszka(2006). "Comparative analysis of 10 small molecules binding to carbonic anhydrase II by different investigators using Biacore technology." Anal. Biochem. 359 :94-105.

[0437] Pocker, Y. and J. T. Stone(1967). "The Catalytic Versatility of Erythrocyte Carbonic Anhydrase. III. Kinetic Studies of the Enzyme-Catalyzed Hydrolysis of p-Nitrophenyl Acetate." Biochemistry 6(3) :668-678.

[0438] Poulin-Kerstien, A. T. And P. B. Dervan(2003). "DNA-Templated Dimerization of Hairpin Polyamides." J. Am. Chem. Soc. 125(51) :15811-15821.

[0439] Roice, M. , I. Johannsen, and M. Meldal(2004). "High Capacity Poly(ethylene glycol)Based Amino Polymers for Peptide and Organic Synthesis." QSAR Comb. Sci. 23(8) :662-673.

[0440] Rohde, R. D. , H. D. Agnew, W. -S. Yeo, R. C. Bailey, and J. R. Heath (2006). "A Non-Oxidative Approach toward Chemically and Electrochemically Functionalizing Si(111)." J. Am. Chem. Soc. 128(29) :9518-9525.

[0441] Rostovtsev V. V. , L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless(2002). "A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process :Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes." Angew. Chem. 114(14) : 2708-2711 ;Angew. Chem. Int. Ed. 41(14) :2596-2599.

[0442] Sanghvi, A. B. , K. P-H Miller, A. M. Belcher, and C. E. Schmidt(2005). "Biomaterials functionalization using a novel peptide that

selectively binds to a conducting polymer.” Nat. Mater. 4 :496–502.

[0443] Sano, T. and C. R. Cantor (1990). “Expression of a Cloned Streptavidin Gene in *Escherichia coli*.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(1) :142–146.

[0444] Saxon, E. and Bertozzi, C. R. (2000). “Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction.” Science 287(5460) :2007–2010.

[0445] Smith, G. P. and V. A. Petrenko (1997). “Phage display.” Chem. Rev. 97(2) :391–410.

[0446] Svedhem, S., K. Enander, M. Karlsson, H. Sjöbom, B. Liedberg, S. Löfås, L. -G. Mårtensson, S. E. Sjöstrand, S. Svensson, U. Carlsson, and I. Lundström (2001). “Subtle Differences in Dissociation Rates of Interactions between Destabilized Human Carbonic Anhydrase II Mutants and Immobilized Benzenesulfonamide Inhibitors Probed by a Surface Plasmon Resonance Biosensor.” Anal. Biochem. 296(2) :188–196.

[0447] Tornøe and Meldal, “Peptidotriazoles: Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions on Solid-Phase” in *Peptides: The Wave of the Future* (Lebel and Houghten, eds., 2001), p. 263 ;

[0448] Tornøe et al., J. Org. Chem. 67(9) :3057–3064 (2002) ; Rostovtsev, V. V. et al., 2002]. Tse, W. C. and D. L. Boger (2004). “Sequence-Selective DNA Recognition: Natural Products and Nature’s Lessons.” Chem. Biol. 11 :1607–1617.

[0449] van Hest, J. C. M., K. L. Kiick, and D. A. Tirrell (2000). “Efficient incorporation of unsaturated methionine analogues into proteins in vivo.” J. Am. Chem. Soc. 122(7) :1282–1288.

[0450] Wang, X., L. Peng, R. Liu, S. S. Gill, and Kit S. Lam (2005). “Partial Alloc-deprotection approach for ladder synthesis of ‘one-bead one-compound’ combinatorial libraries.” J. Comb. Chem. 7(2) :197–209.

[0451] Weterings, J. J., S. Khan, G. J. van der Heden, J. W. Drijfhout, C. J. M. Melief, H. S. Overkleeft, S. H. van der Burg, F. Ossendorp, G. A. van der Marel, and D. V. Filippov (2006). “Synthesis of 2-alkoxy-8-hydroxyadenylpeptides: Towards synthetic epitope-based vaccines.” Bioorg. Med. Chem. Lett. 16(12) :3258–3261.

Whaley, S. R., D. S. English, E. L. Hu, P. F. Barbara, and A. M. Belcher (2000). “Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly.” Nature 405 :665–668.

[0452] Whiting M., J. Muldoon, Y. -C. Lin, S. M. Silverman, W. Lindstrom, A. J. Olson, H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, J. H. Elder, and V. V. Fokin (2006). “Inhibitors of HIV-1 Protease by Using In Situ Click Chemistry.” Angew. Chem. 118(9) :1463–1467 ; Angew. Chem. Int. Ed. 45(9) :1435–1439.

[0453] Williams, K. P., X. -H. Liu, T. N. M. Schumacher, H. Y. Lin, D. A. Ausiello, P. S. Kim, and D. P. Bartel (1997). “Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 :11285–11290.

- [0454] Yang, X. , S. E. Bassett, X. Li, B. A. Luxon, N. K. Herzog, R. E. Shope, J. Aronson, T. W. Prow, J. F. Leary, R. Kirby, A. D. Ellington, and D. G. Gorenstein(2002).
- [0455] “Construction and selection of bead-bound combinatorial oligonucleoside phosphorothioate and phosphorodithioate aptamer libraries designed for rapid PCR-based sequencing.” Nucleic Acids Res. 30(23) :e132.
- [0456] Yin, H. , R. I. Litvinov, G. Vilaire, H. Zhu, W. Li, G. A. Caputo, D. T. Moore, J. D. Lear, J. W. Weisel, W. F. DeGrado, J. S. Bennett(2006). “Activation of platelet α IIb β 3 by an exogenous peptide corresponding to the transmembrane domain of α IIb. ” J. Biol. Chem. 281(48) :36732-36741.
- [0457] Zhang, Z. and E. Fan(2006). “Solid phase synthesis of peptidotriazoles with multiple cycles of triazole formation.” Tetrahedron Lett. 47(5) :665-669.

[0001]

Sequence Listing Text File.txt
SEQUENCE LISTING

<110> California Institute of Technology
 Agnew, Heather
 Rosemary , Rohde
 Millward, Steven
 Nag , Arundhati
 James , Heath

<120> Capture Agents and related Compositions, Methods and Systems

<130> P367-PCT

<140> To be determined
 <141> 2009-06-18

<150> 61/132,416
 <151> 2008-06-18

<150> 61/155,890
 <151> 2009-02-26

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> Aminoethyl modification on G residue

<400> 1
 gggacaatta ctatttaca ttacaatgct cacgtggtac gagttcgtct cccagg 56

<210> 2
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

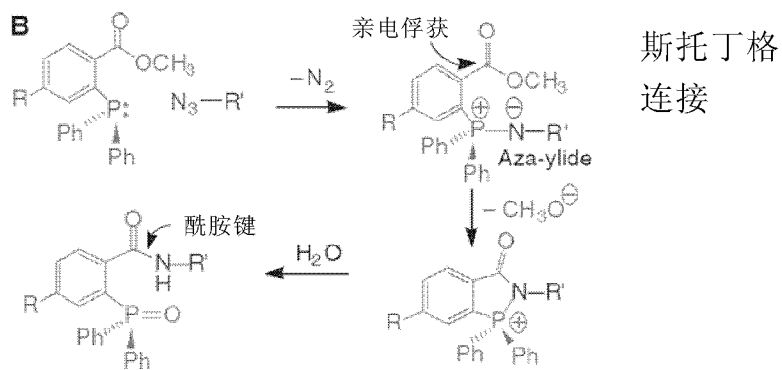
<400> 2
 taatacgact cactataggg acaattacta ttacaatta ca 42

<210> 3
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

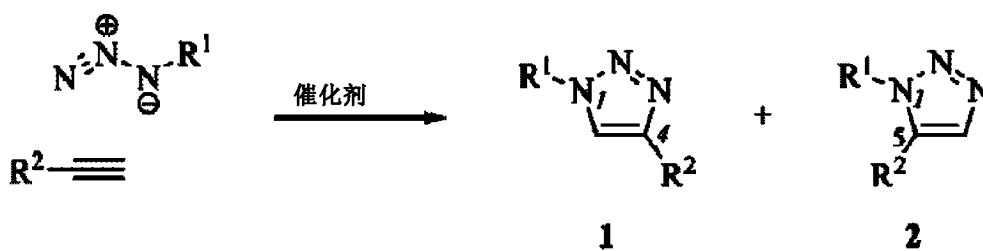
<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

<400> 3
 accgctgccca gaccccgatt tggcctggga gacgaactcg 40

叠氮化物+三芳基磷

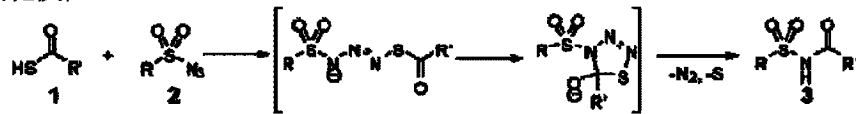


叠氮化物+乙炔



磺酰叠氮+硫代酸

A) 酰胺化反应



B) Bcl-X_L-模板化筛选

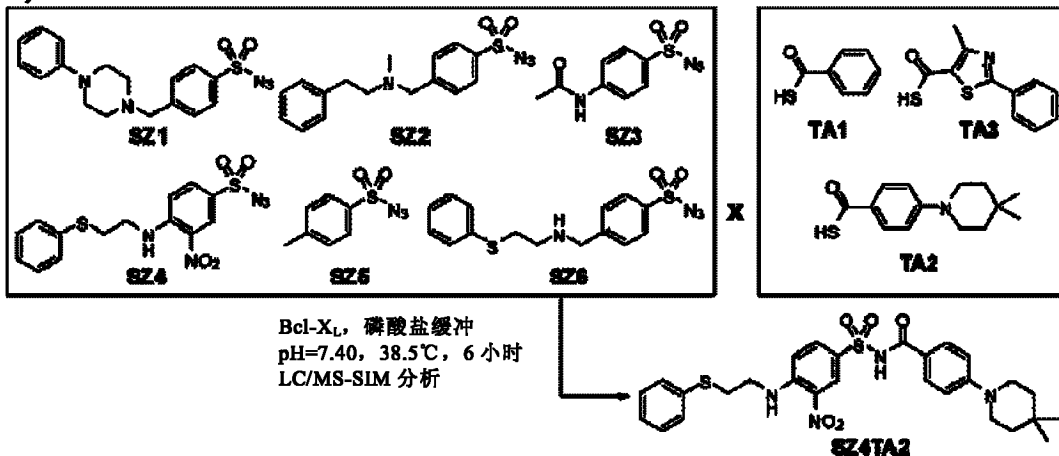


图 3

氨+醛

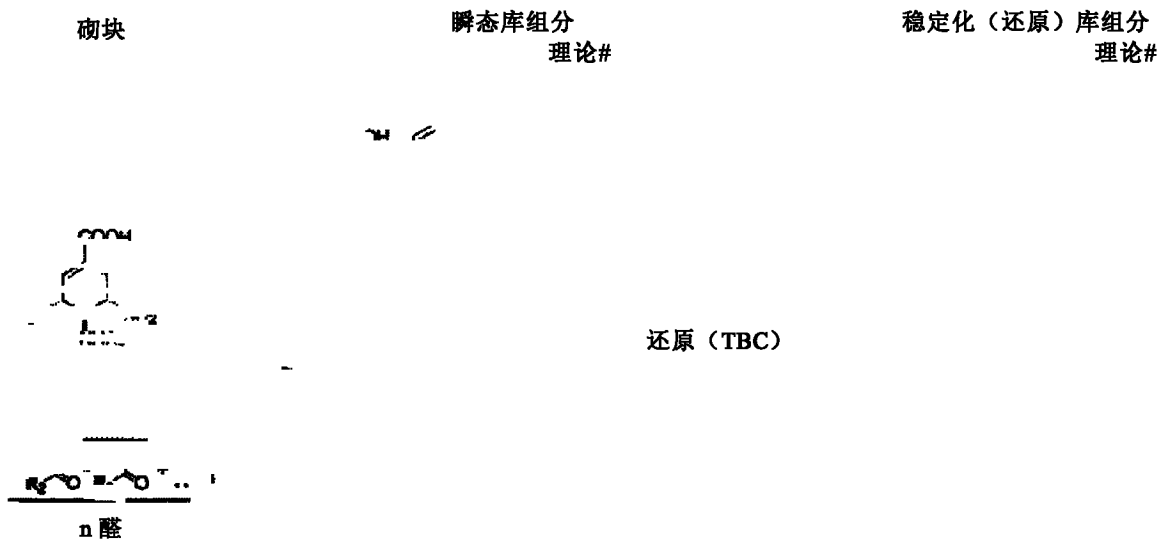


图 4

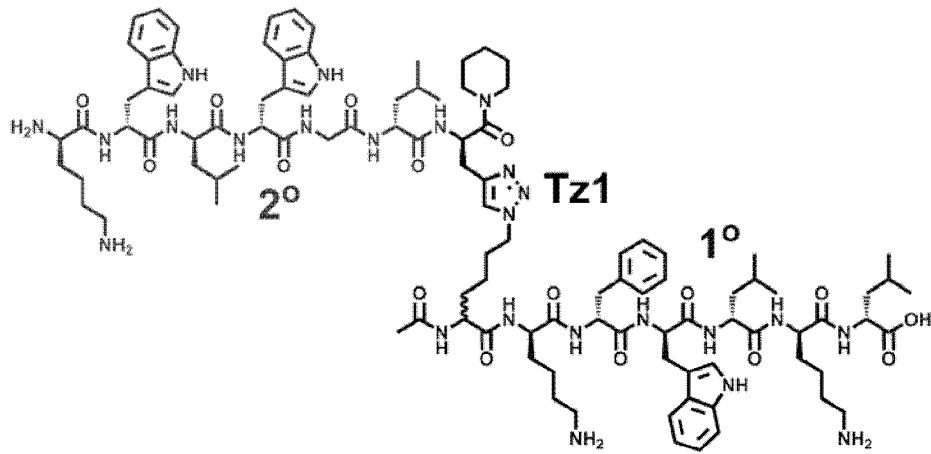


图 5

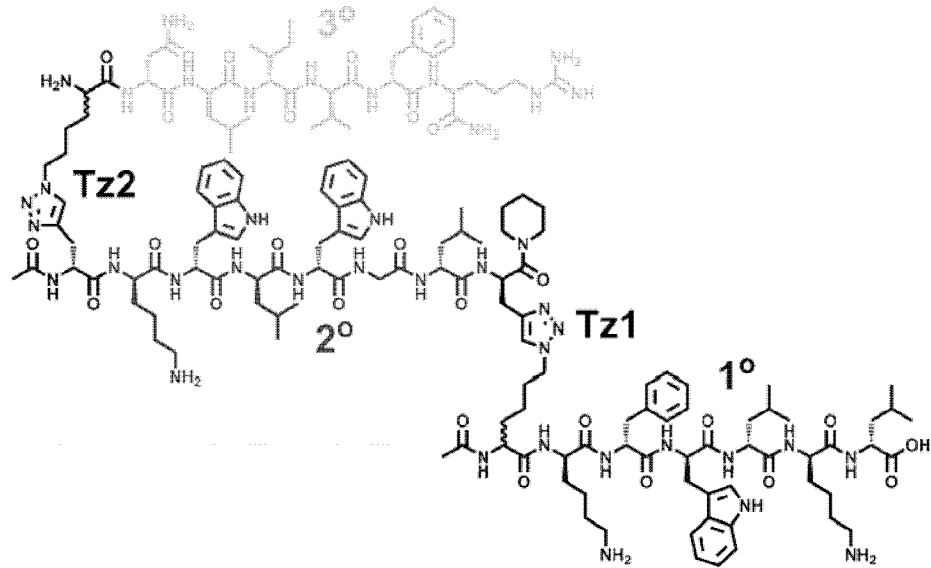


图 6

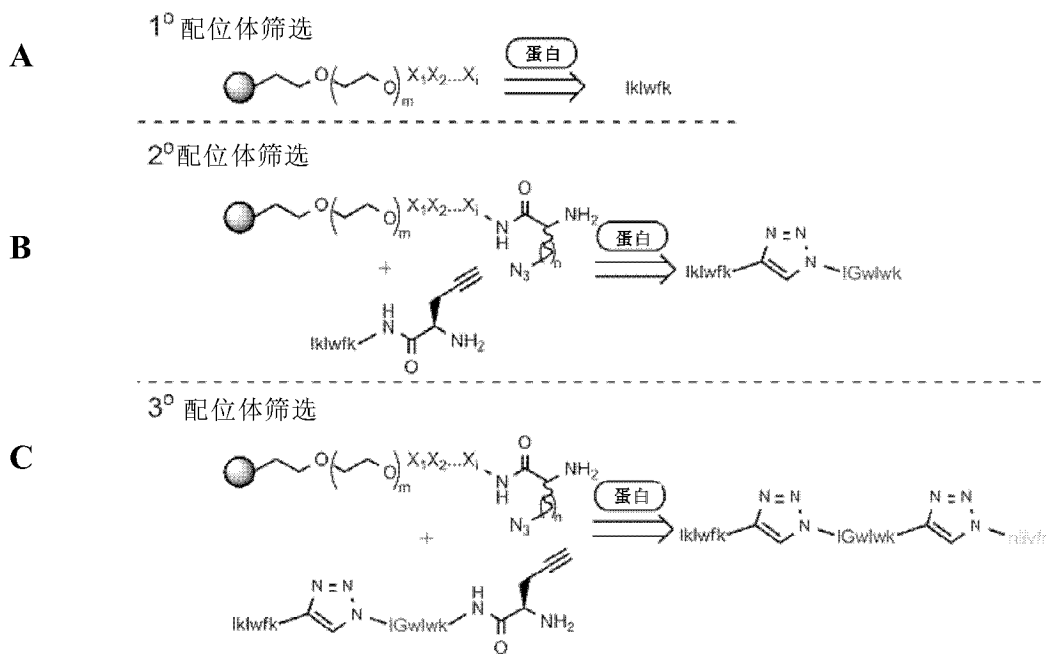


图 7

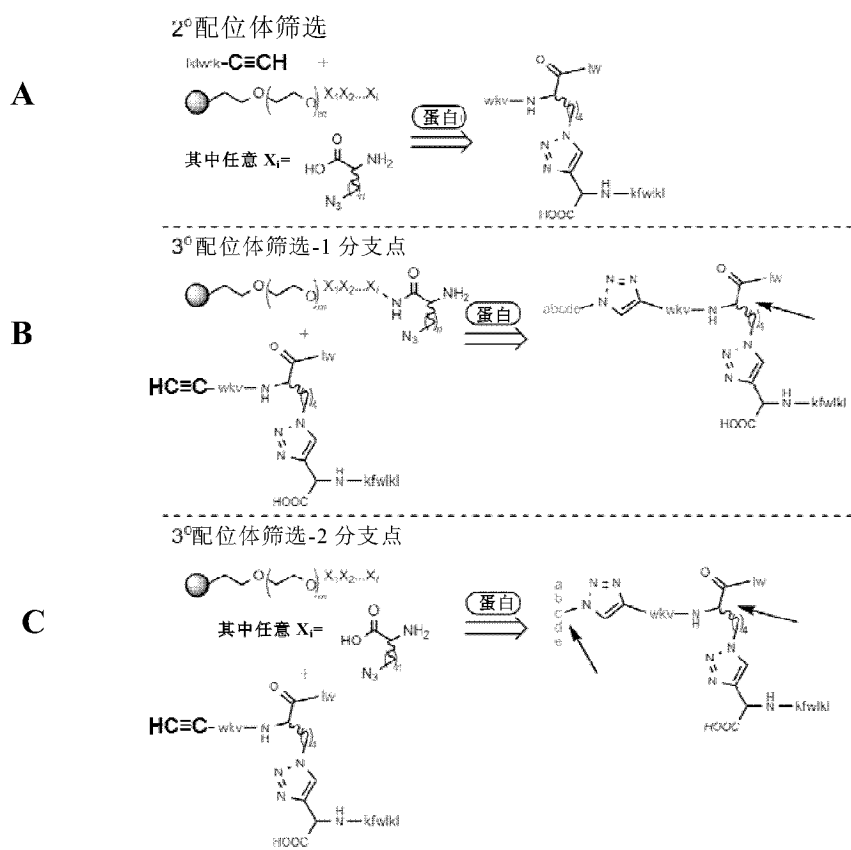


图 8

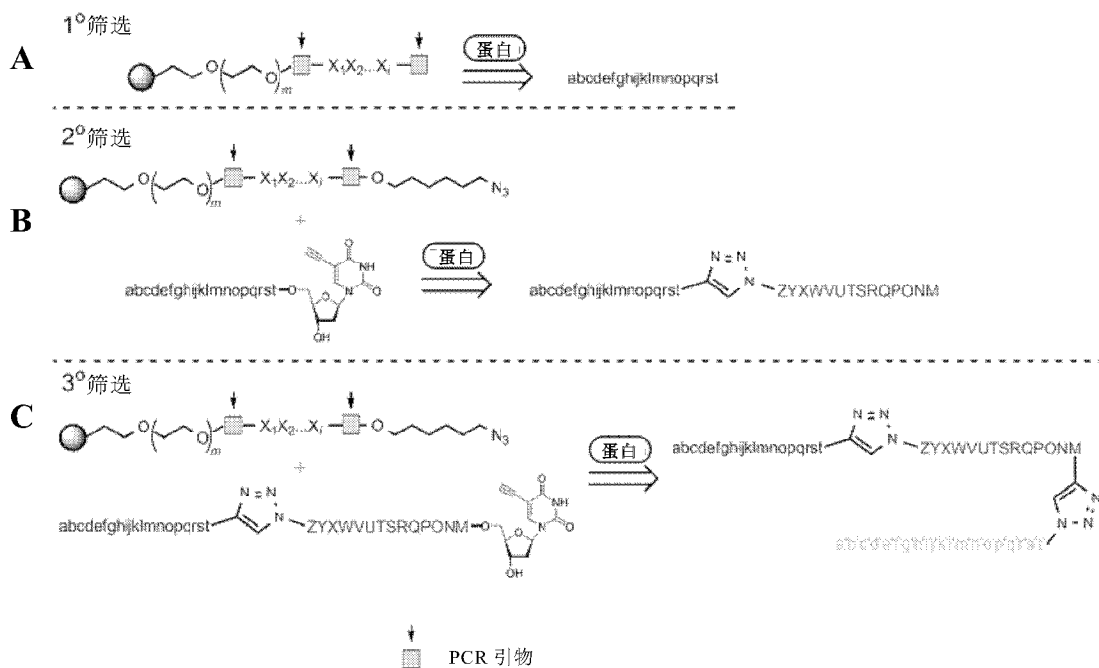


图 9

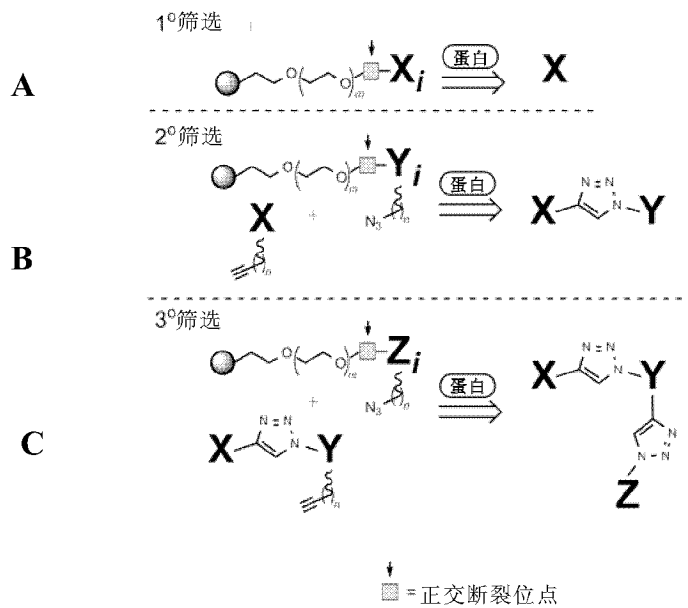


图 10

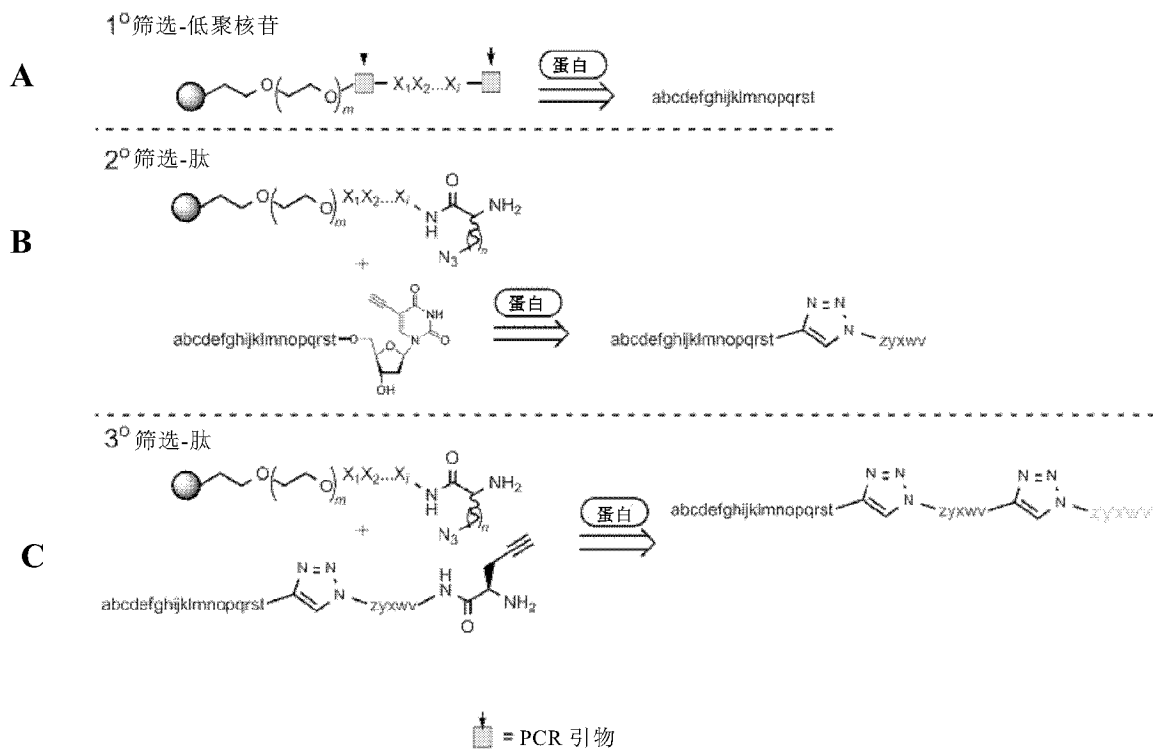


图 11

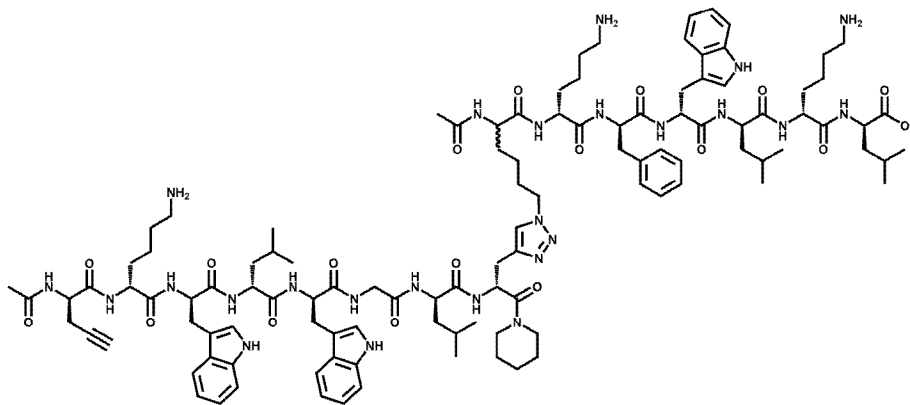


图 12

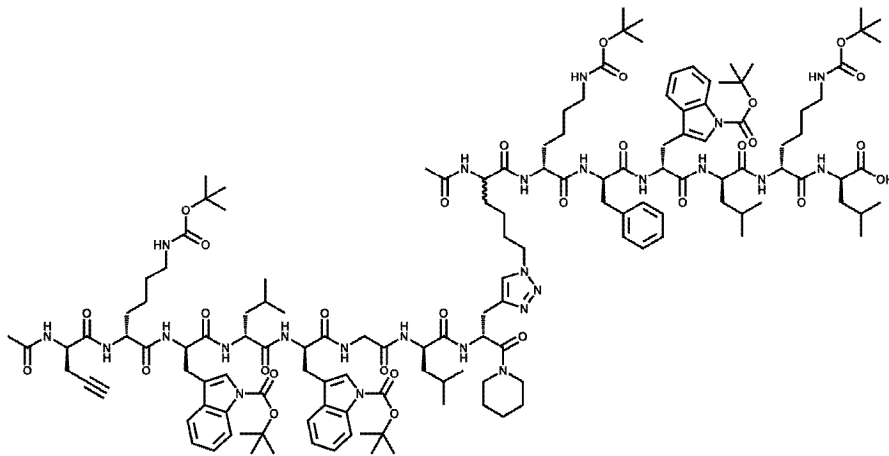


图 13

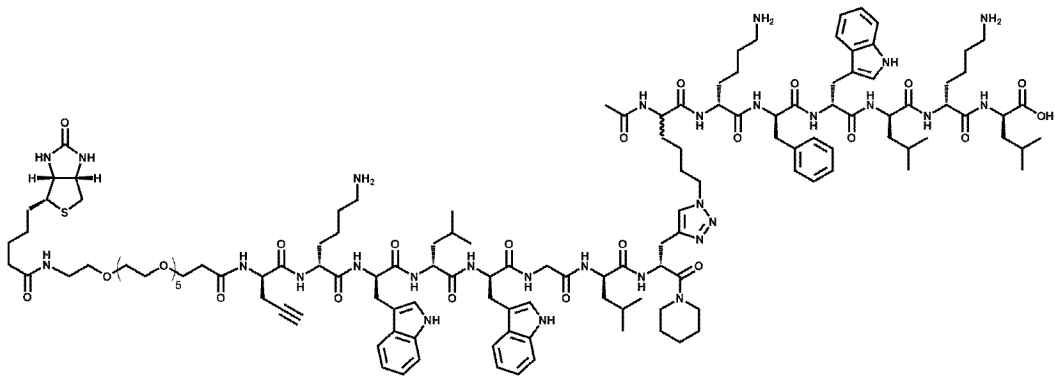


图 14

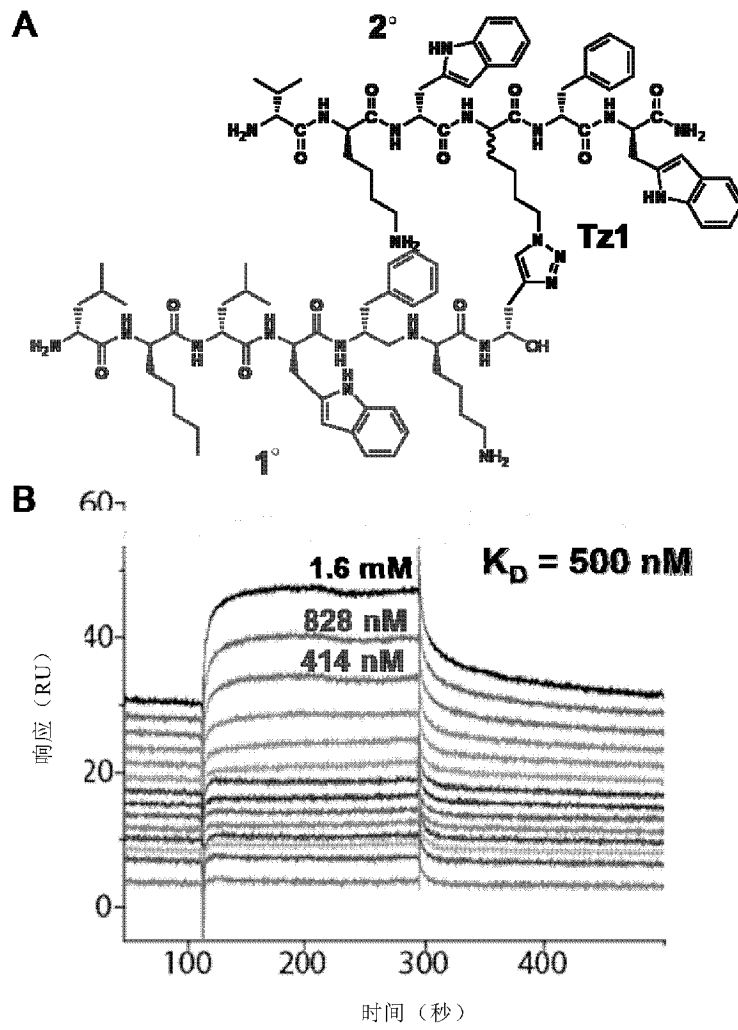


图 16

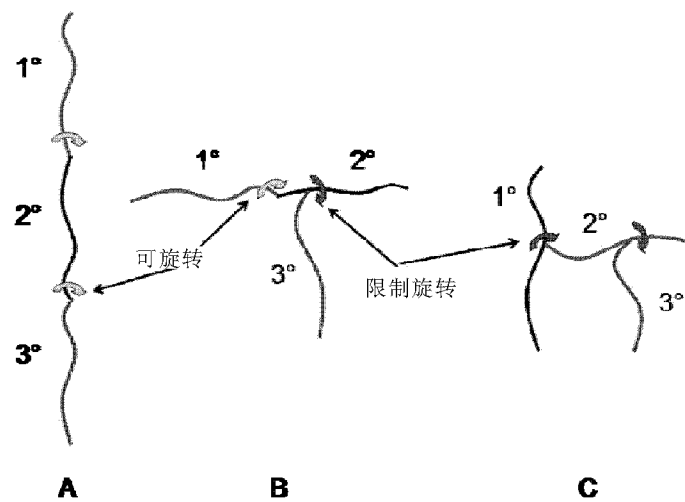


图 17

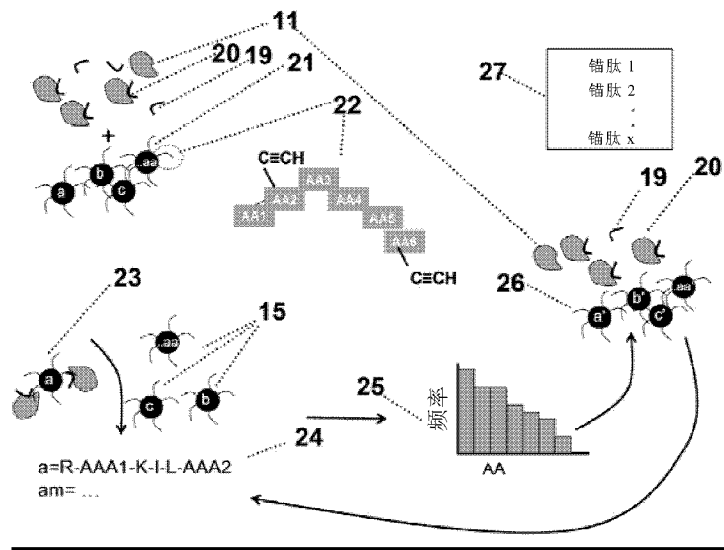


图 20

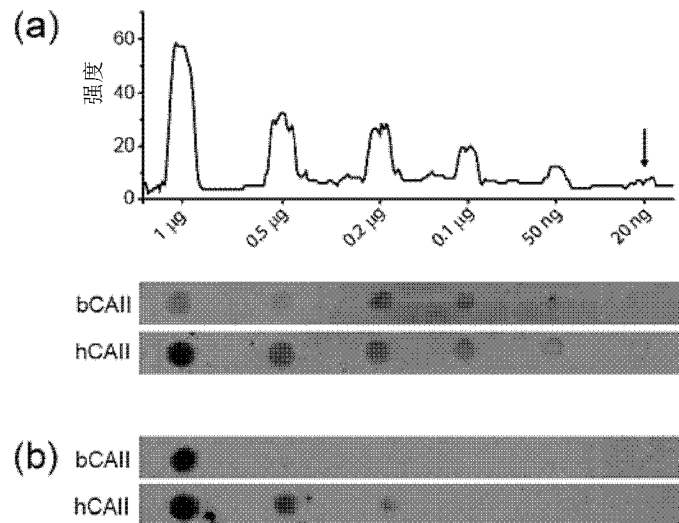


图 21

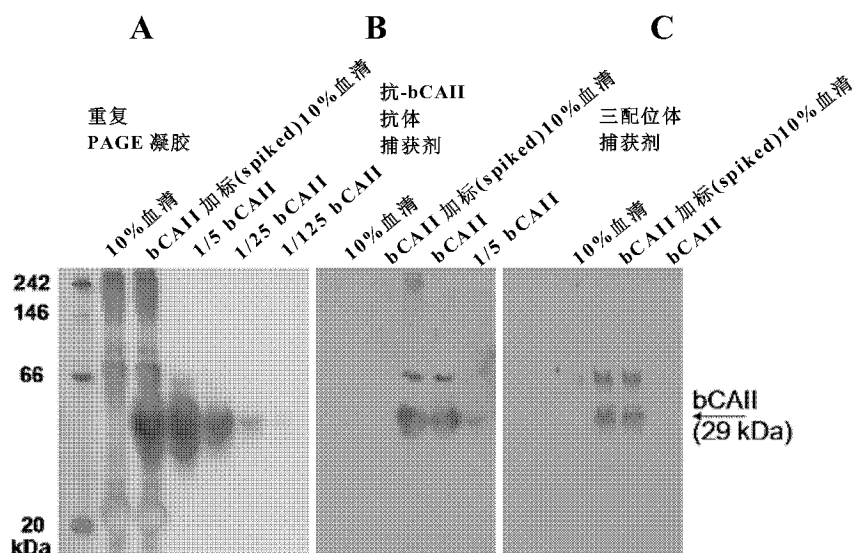


图 22

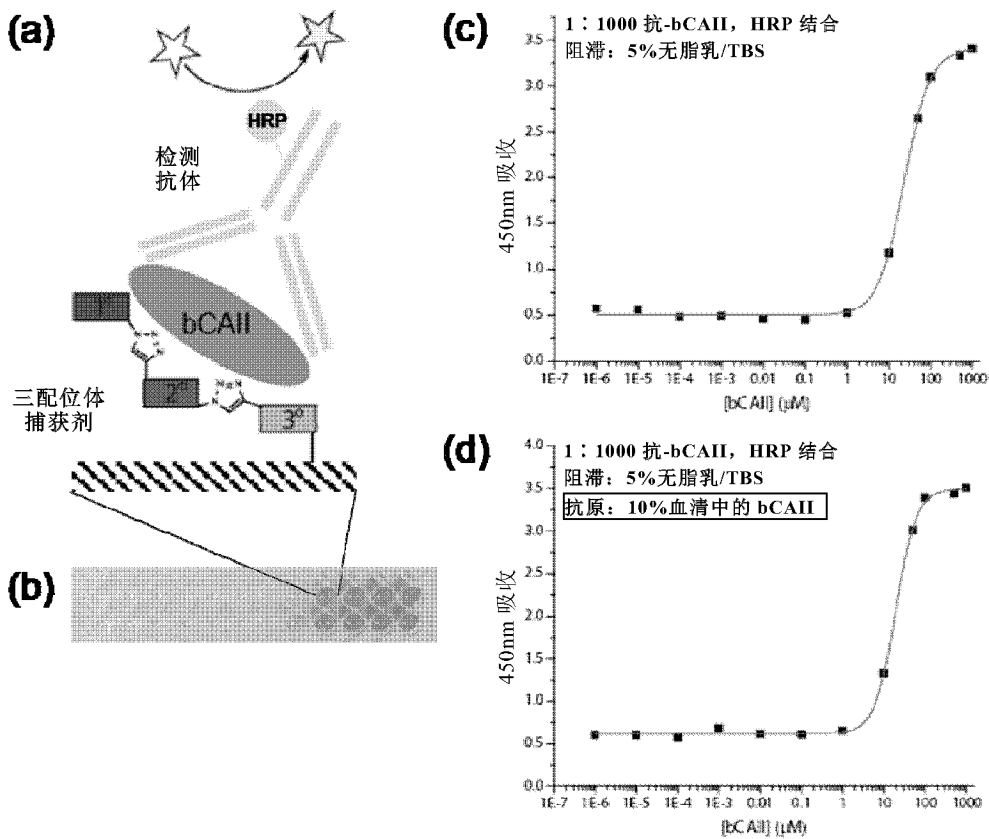


图 23

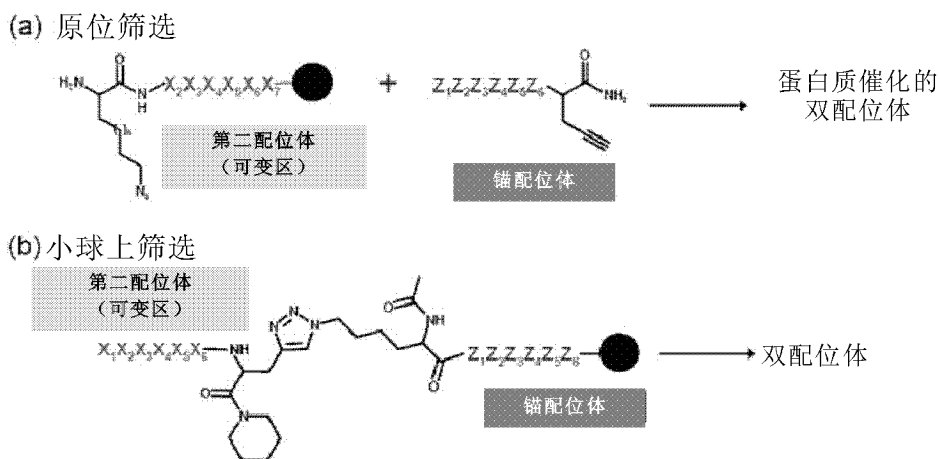


图 24

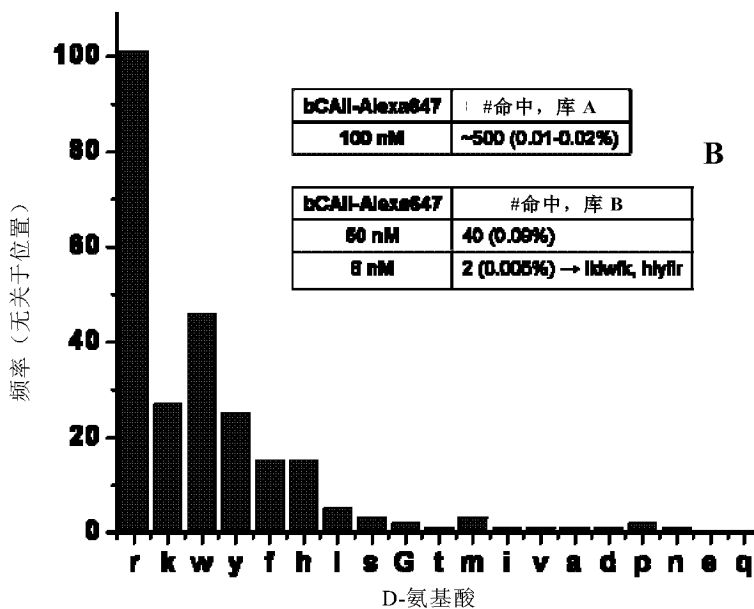


图 25

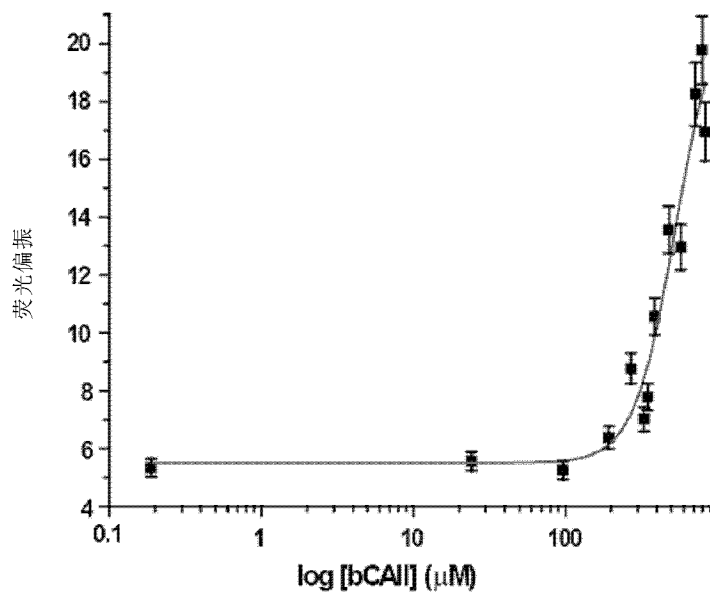


图 26

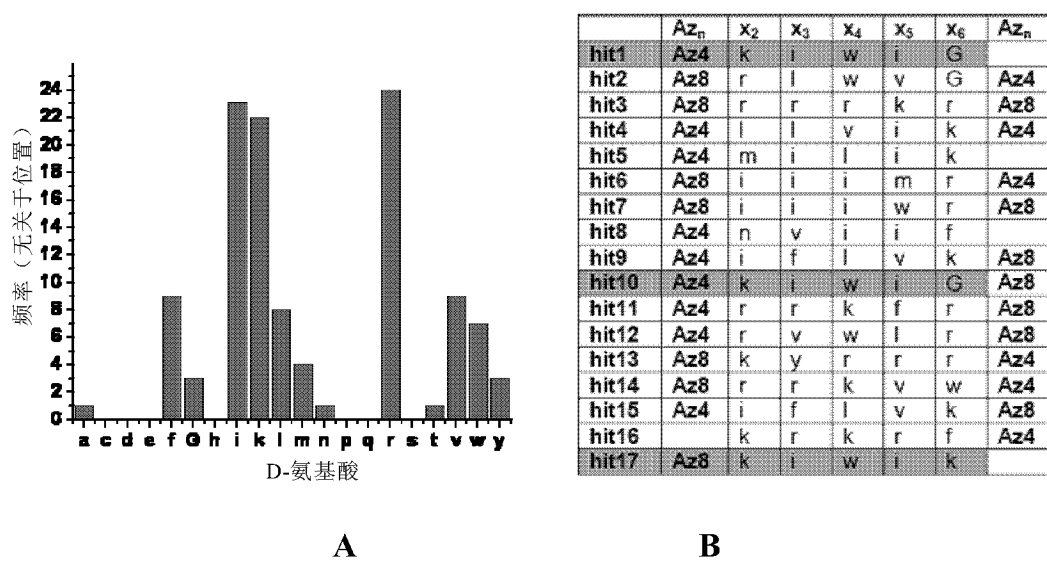


图 27

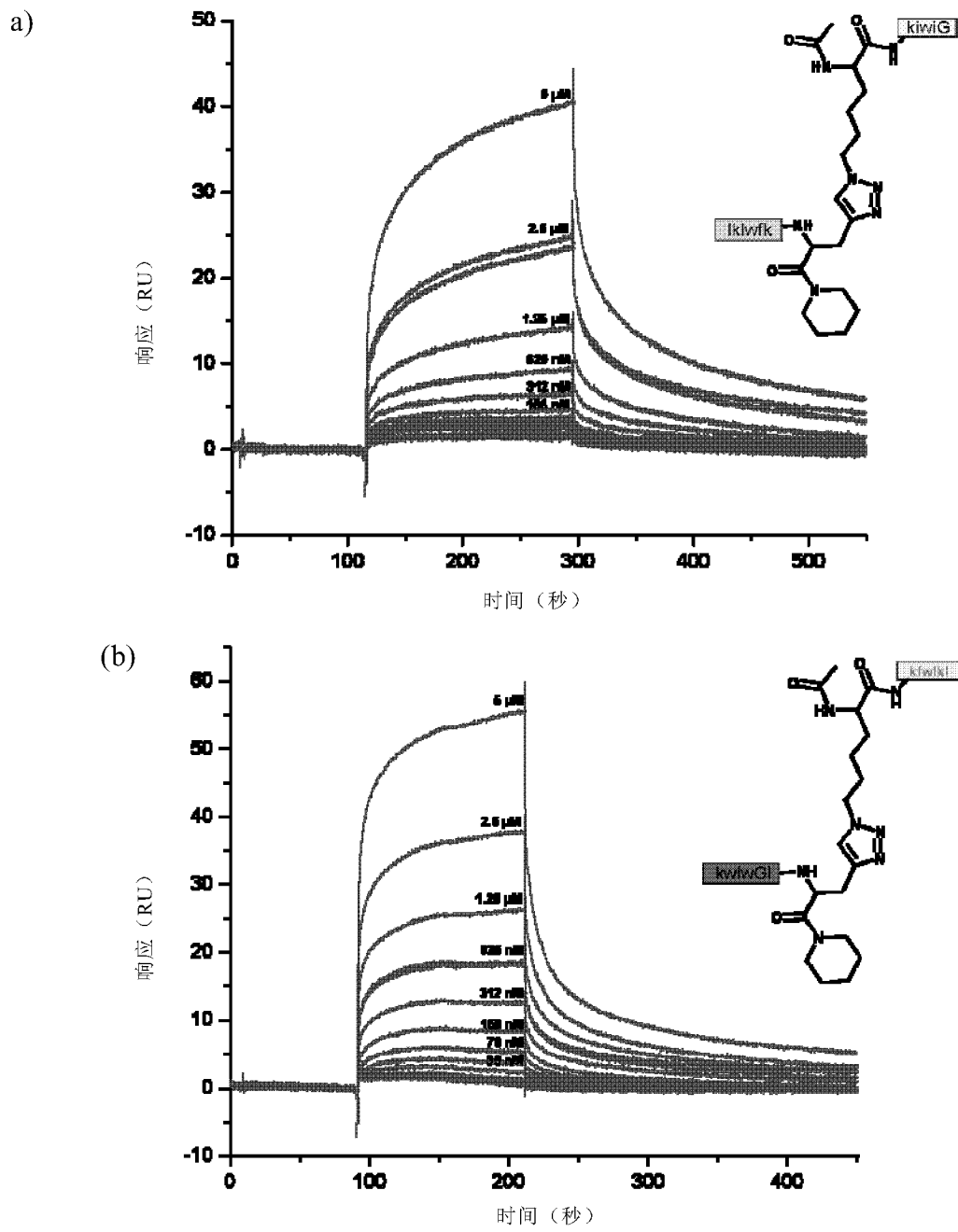


图 28

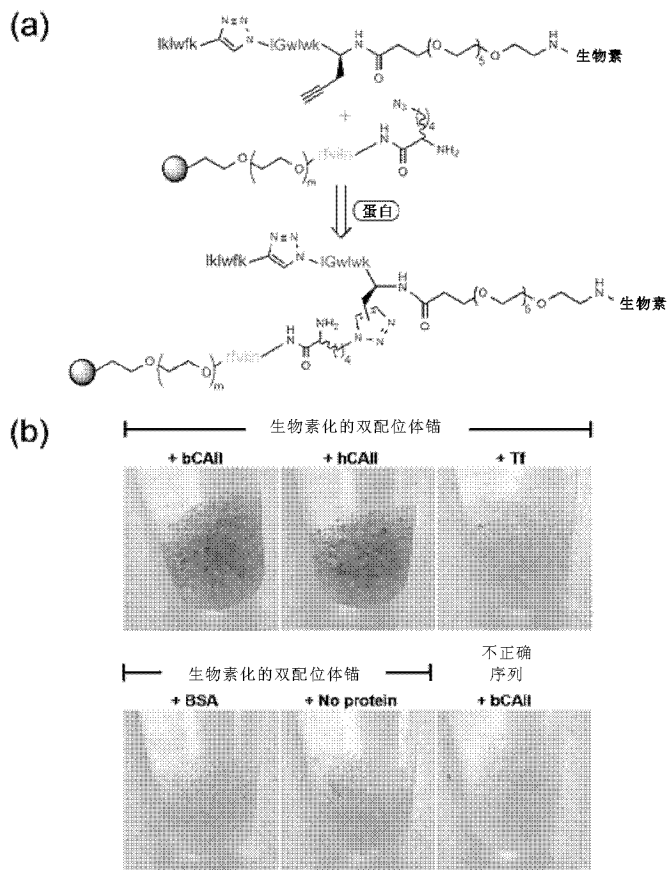


图 29

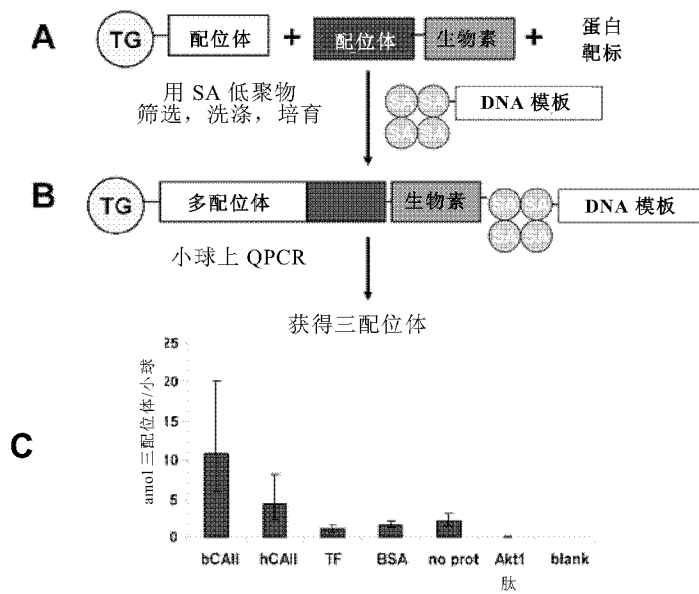


图 30

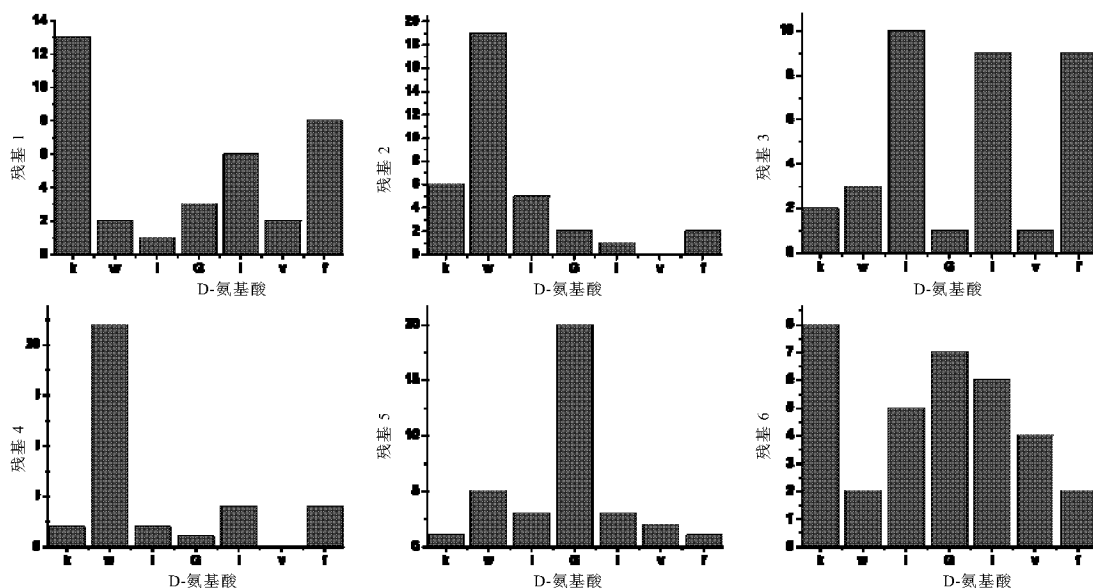
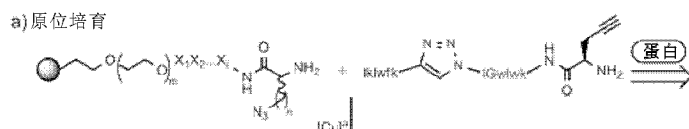


图 31

对比筛选

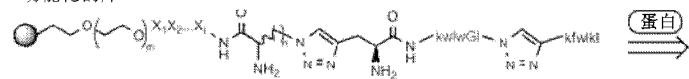
a) 原位培育



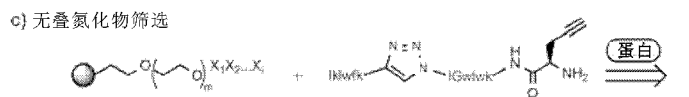
位置依赖的直方图



b) CuAAC 功能化的库



c) 无叠氮化物筛选



^a CuAAC 条件: 完全保护的(D-Pra)-kwlwG1-Tz1-kfwlkl (0.274 g, 0.1 mmol, >98% HPLC), 0.03 mmol 库 C, CuI (0.021 g, 0.1 mmol)以及 L-抗坏血酸(0.020 g, 0.1 mmol)在 DMF/吡啶(8/2)中 25°C 下搅拌过夜

图 32

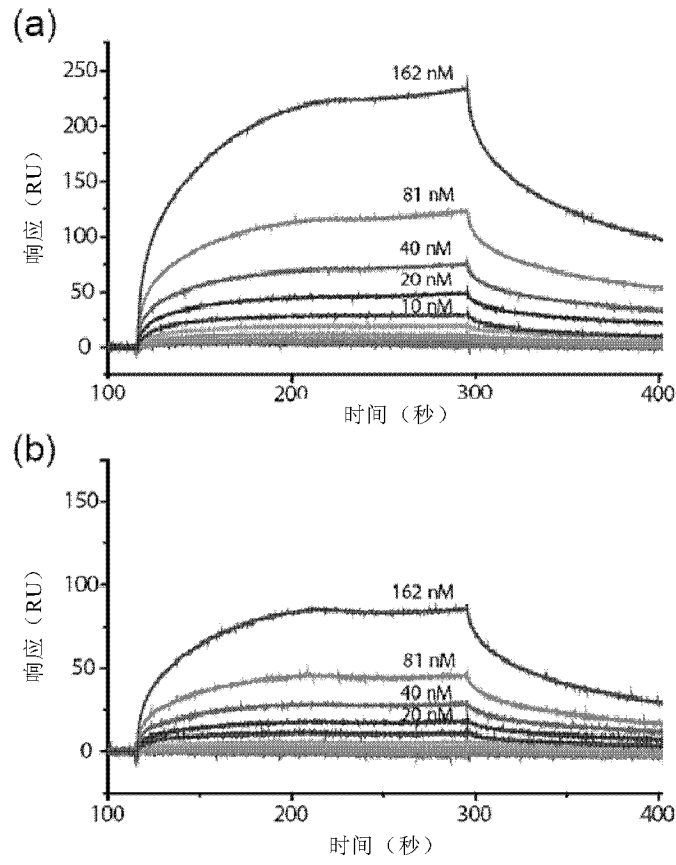


图 33

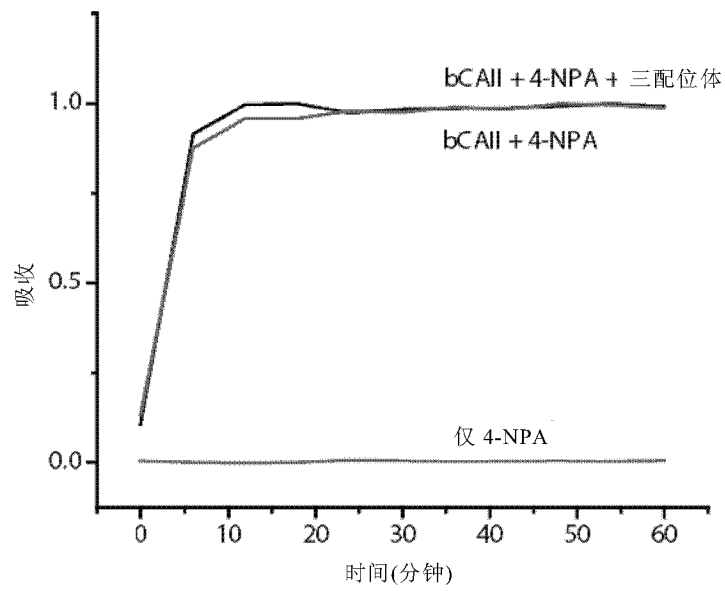


图 34

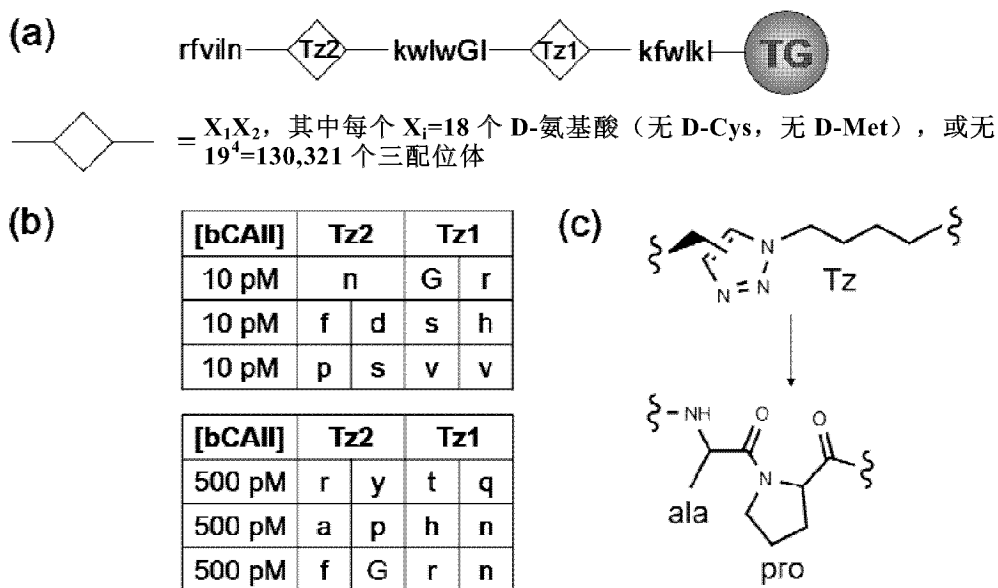


图 35

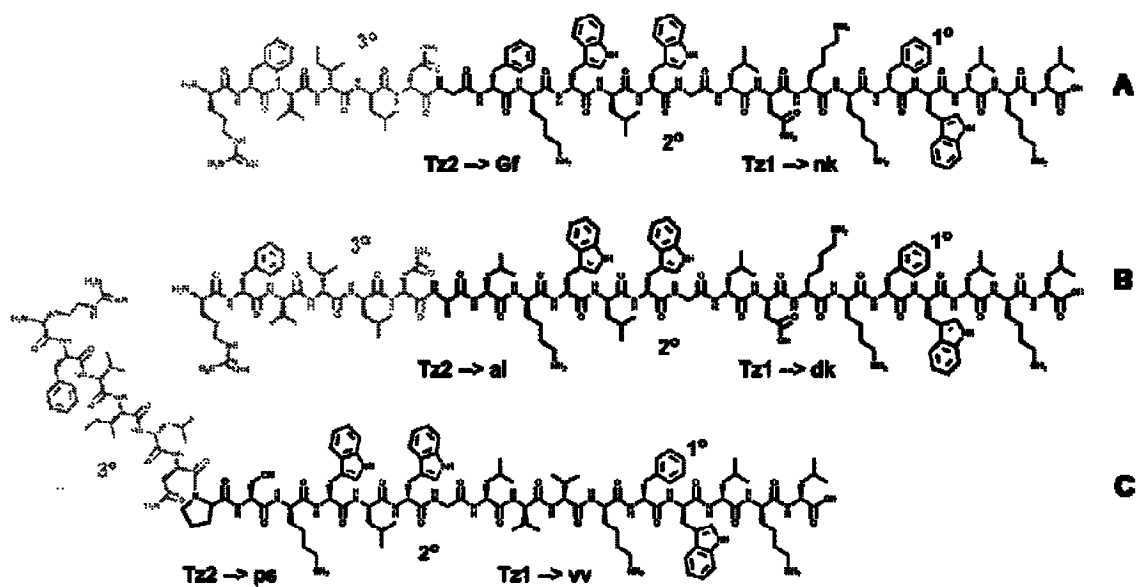


图 36

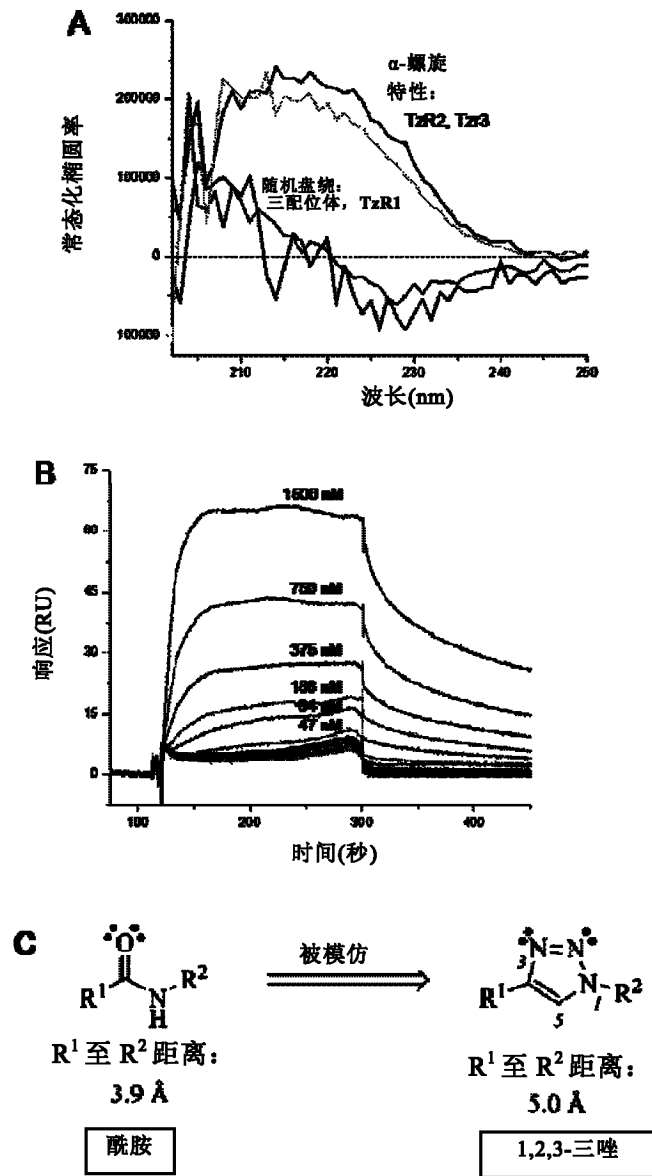


图 37

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 多配位体捕获剂及相关组合物,方法和系统 | | |
| 公开(公告)号 | CN102159949A | 公开(公告)日 | 2011-08-17 |
| 申请号 | CN200980132220.7 | 申请日 | 2009-06-18 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 加州理工学院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 加州理工学院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 加州理工学院 | | |
| [标]发明人 | 希瑟阿格纽 罗斯玛丽罗德 史蒂文米尔沃德 阿伦达蒂奈格 詹姆士R希思 | | |
| 发明人 | 希瑟·阿格纽 罗斯玛丽·罗德 史蒂文·米尔沃德 阿伦达蒂·奈格 詹姆士·R·希思 | | |
| IPC分类号 | G01N33/531 G01N33/543 | | |
| CPC分类号 | G01N33/531 C40B30/04 C07D249/04 C12Q2523/109 G01N33/54306 A61K38/02 C07K1/00 | | |
| 代理人(译) | 吴杰 | | |
| 优先权 | 61/132416 2008-06-18 US 61/155890 2009-02-26 US | | |
| 其他公开文献 | CN102159949B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

描述了包括两个或两个以上配位体的多配位体捕获剂，以及相关的组合物，方法和系统。

