

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532387

(P2004-532387A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	2 G O 5 4
BO 1 J 20/24	GO 1 N 33/543 5 2 5 C	4 G O 6 6
BO 1 J 20/28	BO 1 J 20/24 C	
GO 1 N 21/78	BO 1 J 20/28 Z	
GO 1 N 27/447	GO 1 N 21/78 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 83 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-561926 (P2002-561926)	(71) 出願人	598169572
(86) (22) 出願日	平成14年1月31日 (2002.1.31)		シグマ-アルドリッチ・カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月1日 (2003.8.1)		Sigma-Aldrich Co.
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/003109		アメリカ合衆国63103ミズーリ州セン
(87) 国際公開番号	W02002/061406		ト・ルイス、スプリング・ストリート30
(87) 国際公開日	平成14年8月8日 (2002.8.8)		50番
(31) 優先権主張番号	60/265, 952	(74) 代理人	100068526
(32) 優先日	平成13年2月1日 (2001.2.1)		弁理士 田村 恭生
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100096079
(31) 優先権主張番号	60/267, 460		弁理士 大角 美佐子
(32) 優先日	平成13年2月8日 (2001.2.8)	(74) 代理人	100126778
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 品川 永敏
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 分子プルダウンおよび免疫沈降用途のための視感度を強化した改善親和性マトリックス

## (57) 【要約】

親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降方法に使用するための親和性マトリックス。この親和性マトリックスは、ポリマー支持体、ポリマー支持体の光学的検出を可能にするためのポリマー支持体の画分に結合した染料、分子を捕獲するためのポリマー支持体の画分に結合した染料以外の親和性リガンドを含む。また、水性溶液から生体分子を分離するための方法を提供する。この方法は、水性溶液を、ポリマー支持体を含む親和性マトリックスと一緒にし、水性溶液からこの親和性マトリックスを分離することを含む。染料は光学的検出および親和性マトリックスのモニターを可能にするポリマー支持体の画分に結合されており、従って、分離工程中の親和性マトリックスの損失の可能性を減少させる。さらに、染料以外の親和性リガンドもまた、生体分子の捕獲のためのポリマー支持体の画分に結合している。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

水性溶液から分子を分離するための親和性マトリックスであって、ポリマー支持体、ポリマー支持体の光学的検出を可能にするためのポリマー支持体の画分に結合した染料、分子を捕獲するためのポリマー支持体の画分に結合した染料以外の親和性リガンドを含むことを特徴とする、親和性マトリックス。

## 【請求項 2】

親和性マトリックスが、粒状のポリマー支持体を含む、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

## 【請求項 3】

親和性マトリックスが、粒状のポリマー材料および染料を含み、親和性リガンドが粒状材料の種々の画分に結合している、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

10

## 【請求項 4】

染料が、粒状高分子材料の約 1% ~ 約 50% (重量) に結合し、親和性リガンドが、粒状高分子材料の約 50% ~ 約 99% (重量) に結合している、請求項 3 記載の親和性マトリックス。

## 【請求項 5】

染料が、粒状高分子材料の約 1% ~ 約 15% (重量) に結合し、親和性リガンドが、粒状高分子材料の約 85% ~ 約 99% (重量) に結合している、請求項 3 記載の親和性マトリックス。

## 【請求項 6】

染料が、粒状高分子材料の約 2% ~ 約 10% (重量) に結合し、親和性リガンドが、粒状高分子材料の約 90% ~ 約 98% (重量) に結合している、請求項 3 記載の親和性マトリックス。

20

## 【請求項 7】

生理的な塩および pH 条件下、天然 - 由来の哺乳動物の細胞のライセートに存在する非 - 特異的結合タンパク質に対する親和性マトリックスの能力が、染料が、対照マトリックスの粒状材料に結合していないことを除いて、対照マトリックスが親和性マトリックスと実質的に同一であり、同一条件下で対象マトリックスの能力の 100 倍より小である、請求項 3 記載の親和性マトリックス。

## 【請求項 8】

粒子の大きさの平均が、約 1,000 マイクロメートルである、請求項 7 記載の親和性マトリックス。

30

## 【請求項 9】

粒子の大きさの平均が、約 600 マイクロメートルである、請求項 7 記載の親和性マトリックス。

## 【請求項 10】

粒子の大きさの平均が、約 400 マイクロメートルである、請求項 7 記載の親和性マトリックス。

## 【請求項 11】

粒子の大きさの平均が、約 200 マイクロメートルである、請求項 7 記載の親和性マトリックス。

## 【請求項 12】

染料が、アゾ発色団含有染料、アントロキノン発色団含有染料、またはフタロシアニン発色団含有染料を含む、請求項 7 記載の親和性マトリックス。

40

## 【請求項 13】

染料が、ビニルスルホン含有染料、モノまたはジクロロトリアジン含有染料、またはモノクロロ・ジフルオロ・ピリミジウム含有染料を含む、請求項 7 記載の親和性マトリックス。

## 【請求項 14】

染料が、5 - [(4, 6 - ジクロロ - 1, 3, 5 - トリアジン - 2 - イル)アミノ] - 4 - ヒドロキシ - 3 (フェニルアゾ) - 2, 7 - ナフタレンジスルホン酸・二ナトリウム塩(プロシオン・レッド(Procion Red) MX - 5B)、プロシオン・ブルー MX - R、レマゾール・バイオレ

50

ット(Remazol Violet) R - 4B、プロシオン・レッド MX - BRA、5 - (アセチルアミノ) - 4 - ヒドロキシ - 3 - [[2 - ヒドロキシ - 4 - [[2 - (スルホキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ] - 2, 7 - ナフトレンジスルホン酸・銅錯体(Remazol Brilliant Violet 5R)、プロシオン・レッド MX - GBA、ブルー MX - 4RD (Navy Blue 21)、ブルー MX - 2G (Cobalt Blue 22)、ダーマファイアーレッド(Dharma Fire Red) 10、6 - (アセチルアミノ) - 4 - ヒドロキシ - 3 - [[3 - [[2 - (スルホキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ] - 2 - ナフトレンスルホン酸・二ナトリウム塩(レマゾール・ブリリアント・オレンジ(Remazol Brilliant Orange) 3R、リアクティブ・オレンジ(Reactive Orange) 16)、レマゾール・ブリリアント・レッド BB (Reactive Red 21)、プロシオン・ターコイズ H - A、レマゾール・ブリリアント・スカーレット R - 3G、レマゾール・ブリリアント・オレンジ R - FN、およびリアクティブ・ブルー(Reactive Blue) 21からなる群から選ばれる、請求項7記載の親和性マトリックス。

10

【請求項15】

生理的な塩およびpH条件下、天然 - 由来の哺乳動物細胞のライセートに存在する非 - 特異的結合タンパク質に対する親和性マトリックスの能力が、染料が対照マトリックスの粒状材料に結合していないことを除いて、対照マトリックスが親和性マトリックスと実質的に同一であり、同一条件下で対象マトリックスの能力の50倍より小である、請求項3記載の親和性マトリックス。

【請求項16】

粒状材料の大きさの平均が、約1,000マイクロメートルである、請求項15記載の親和性マトリックス。

20

【請求項17】

粒状材料の大きさの平均が、約600マイクロメートルである、請求項15記載の親和性マトリックス。

【請求項18】

粒状材料の大きさの平均が、約400マイクロメートルである、請求項15記載の親和性マトリックス。

【請求項19】

粒状材料の大きさの平均が、約200マイクロメートルである、請求項15記載の親和性マトリックス。

30

【請求項20】

染料が、アゾ発色団含有染料、アントロキノン発色団含有染料、またはフタロシアニン発色団含有染料を含む、請求項15記載の親和性マトリックス。

【請求項21】

染料が、ビニルスルホン含有染料、モノまたはジクロロトリアジン含有染料、またはモノクロロ・ジフルオロ・ピリミジミウム含有染料を含む、請求項15記載の親和性マトリックス。

【請求項22】

染料が、6 - (アセチルアミノ) - 4 - ヒドロキシ - 3 - [[3 - [[2 - (スルホキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ] - 2 - ナフトレンスルホン酸・二ナトリウム塩(レマゾール・ブリリアント・オレンジ(Remazol Brilliant Orange) 3R、リアクティブ・オレンジ(Reactive Orange) 16)、レマゾール・ブリリアント・レッド BB (Reactive Red 21)、プロシオン・ターコイズ H - A、レマゾール・ブリリアント・スカーレット R - 3G、レマゾール・ブリリアント・オレンジ R - FN、レマゾール・バイオレット(Remazol Violet) R - 4B、5 - (アセチルアミノ) 4 - ヒドロキシ - 3 - [[2 - ヒドロキシ - 4 - [[2 - (スルホキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ] - 2, 7 - ナフトレンジスルホン酸・銅錯体(Remazol Brilliant Violet 5R)、およびリアクティブ・ブルー(Reactive Blue) 21からなる群から選ばれる、請求項15記載の親和性マトリックス。

40

【請求項23】

生理的な塩およびpH条件下、天然 - 由来の哺乳動物細胞のライセートに存在する非 - 特

50

異的結合タンパク質に対する親和性マトリックスの能力が、染料が対照マトリックスの粒状材料に結合していないことを除いて、対照マトリックスが親和性マトリックスと実質的に同一であり、同一条件下で対象マトリックスの能力の10倍より小である、請求項3記載の親和性マトリックス。

【請求項24】

粒状材料の大きさの平均が、約1,000マイクロメートルである、請求項23記載の親和性マトリックス。

【請求項25】

粒状材料の大きさの平均が、約600マイクロメートルである、請求項23記載の親和性マトリックス。

10

【請求項26】

粒状材料の大きさの平均が、約400マイクロメートルである、請求項23記載の親和性マトリックス。

【請求項27】

粒状材料の大きさの平均が、約200マイクロメートルである、請求項23記載の親和性マトリックス。

【請求項28】

染料が、アゾ発色団含有染料、アントロキノン発色団含有染料、またはフタロシアニン発色団含有染料を含む、請求項23記載の親和性マトリックス。

【請求項29】

染料が、ビニルスルホン含有染料、モノまたはジクロロトリアジン含有染料、またはモノクロロ・ジフルオロ・ピリミジミウム含有染料を含む、請求項23記載の親和性マトリックス。

20

【請求項30】

染料が、6-(アセチルアミノ)-4-ヒドロキシ-3-[[3-[[2-(スルホキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ]-2-ナフタレンスルホン酸・二ナトリウム塩(レマゾール・ブリリアント・オレンジ(Remazol Brilliant Orange) 3R、リアクティブ・オレンジ(Reactive Orange) 16)、レマゾール・ブリリアント・レッド BB (Reactive Red 21)、レマゾール・ブリリアント・スカーレット R-3G、およびリアクティブ・ブルー(Reactive Blue) 21からなる群から選ばれる、請求項23記載の親和性マトリックス。

30

【請求項31】

生理的な塩およびpH条件下、天然・由来の哺乳動物細胞のライセートに存在する非・特異的結合タンパク質に対する親和性マトリックスの能力が、染料が対照マトリックスの粒状材料に結合していないことを除いて、対照マトリックスが親和性マトリックスと実質的に同一であり、同一条件下で対象マトリックスの能力の3倍より小である、請求項3記載の親和性マトリックス。

【請求項32】

粒状材料の大きさの平均が、約1,000マイクロメートルである、請求項31記載の親和性マトリックス。

【請求項33】

粒状材料の大きさの平均が、約600マイクロメートルである、請求項31記載の親和性マトリックス。

40

【請求項34】

粒状材料の大きさの平均が、約400マイクロメートルである、請求項31記載の親和性マトリックス。

【請求項35】

粒状材料の大きさの平均が、約200マイクロメートルである、請求項31記載の親和性マトリックス。

【請求項36】

染料が、アゾ発色団含有染料、アントロキノン発色団含有染料、またはフタロシアニン発

50

色団含有染料を含む、請求項 3 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 3 7】

染料が、ビニルスルホン含有染料、モノまたはジクロロトリアジン含有染料、またはモノクロロ・ジフルオロ・ピリミジミウム含有染料を含む、請求項 3 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 3 8】

染料が、6 - (アセチルアミノ) - 4 - ヒドロキシ - 3 - [[3 - [[2 - (スルホキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ] - 2 - ナフタレンスルホン酸・二ナトリウム塩(レマゾール・ブリリアント・オレンジ(Remazol Brilliant Orange) 3R、リアクティブ・オレンジ(Reactive Orange) 16)、またはレマゾール・ブリリアント・レッド BB (Reactive Red 21) を含む、請求項 3 1 記載の親和性マトリックス。

10

【請求項 3 9】

染料が、レマゾール・ブリリアント・レッド BB (Reactive Red 21)を含む、請求項 3 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 0】

粒状材料の大きさの平均が、約1,000マイクロメートルである、請求項 3 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 1】

粒状材料の大きさの平均が、約600マイクロメートルである、請求項 3 記載の親和性マトリックス。

20

【請求項 4 2】

粒状材料の大きさの平均が、約400マイクロメートルである、請求項 3 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 3】

粒状材料の大きさの平均が、約200マイクロメートルである、請求項 3 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 4】

親和性マトリックスが、ゼラチン吸着または架橋によって修飾されている、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 5】

染料が、アゾ発色団含有染料、アントロキノン発色団含有染料、またはフタロシアニン発色団含有染料を含む、請求項 4 4 記載の親和性マトリックス。

30

【請求項 4 6】

染料が、ビニルスルホン含有染料、モノまたはジクロロトリアジン含有染料、またはモノクロロ・ジフルオロ・ピリミジミウム含有染料を含む、請求項 4 4 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 7】

染料が、リアクティブ・レッド 120、またはリアクティブ・ブラウン 10を含む、請求項 4 4 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 8】

染料が、フルオレセイン、クマリン誘導体、ピリジルオキサゾール誘導体、またはランタナイド(Lanthanide)金属キレートを含む、請求項 4 4 記載の親和性マトリックス。

40

【請求項 4 9】

染料が、ナフタレン、ピレン、ローダミン、フルオレセイン・イソチオシアナート、テルビウム錯体、ユーロピウム錯体、またはルテニウム錯体を含む、請求項 4 4 記載の親和性マトリックス。

【請求項 5 0】

ポリマー支持体が、天然アガロース、架橋アガロース、架橋デキストラン、またはポリアクリルアミドを含む、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 5 1】

50

粒状ポリマー支持体が、天然アガロース粒子、架橋アガロース粒子、架橋デキストラン粒子、またはポリアクリルアミド粒子を含む、請求項 2 記載の親和性マトリックス。

【請求項 5 2】

架橋アガロースが、直径約 20 ~ 約 300 マイクロメートルの粒子を含む、請求項 5 0 記載の親和性マトリックス。

【請求項 5 3】

架橋アガロースが、直径約 30 ~ 約 250 マイクロメートルの粒子を含む、請求項 5 0 記載の親和性マトリックス。

【請求項 5 4】

架橋アガロースが、直径約 40 ~ 約 165 マイクロメートルの粒子を含む、請求項 5 0 記載の親和性マトリックス。

10

【請求項 5 5】

天然アガロースが、直径約 30 ~ 約 250 マイクロメートルの粒子を含む、請求項 5 0 記載の親和性マトリックス。

【請求項 5 6】

架橋デキストランが、直径約 20 ~ 約 400 マイクロメートルの粒子を含む、請求項 5 0 記載の親和性マトリックス。

【請求項 5 7】

ポリアクリルアミドが、約 30 ~ 約 150 マイクロメートルの粒子を含む、請求項 5 0 記載の親和性マトリックス。

20

【請求項 5 8】

染料が、ポリマーに直接共有結合している、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 5 9】

ポリマー支持体に結合している染料の量が、染料約 0.5 マイクロモル/cm<sup>3</sup> (ポリマー支持体) ~ 染料約 20 マイクロモル/cm<sup>3</sup> (ポリマー支持体) を含む、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 6 0】

ポリマー支持体に結合している染料の量が、染料約 1 マイクロモル/cm<sup>3</sup> (ポリマー支持体) ~ 染料約 6 マイクロモル/cm<sup>3</sup> (ポリマー支持体) を含む、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

30

【請求項 6 1】

ポリマー支持体に結合している染料の量が、染料約 2 マイクロモル/cm<sup>3</sup> (ポリマー支持体) ~ 染料約 4 マイクロモル/cm<sup>3</sup> (ポリマー支持体) を含む、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 6 2】

ポリマーが直径約 30 ~ 約 250 マイクロメートルの架橋アガロース粒子を含み、上記架橋アガロース粒子が上記染料約 1 マイクロモル/cm<sup>3</sup> (架橋アガロース) ~ 上記染料約 6 マイクロモル/cm<sup>3</sup> (架橋アガロース) を有する、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 6 3】

ポリマーが直径約 40 ~ 約 165 マイクロメートルの架橋アガロース粒子を含み、上記架橋アガロース粒子が上記染料約 2 マイクロモル/cm<sup>3</sup> (架橋アガロース) ~ 上記染料約 4 マイクロモル/cm<sup>3</sup> (架橋アガロース) を有する、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

40

【請求項 6 4】

親和性リガンドが、ストレプトアビジン、単量体ストレプトアビジン、ストレプトアビジンの結合特性を有する分子、アビジン、単量体アビジン、アビジンの結合特性を有する分子、ストレプトアクチン、単量体ストレプトアクチン、ストレプトアクチンの結合特性を有する分子、エクストラビジン、単量体エクストラビジン、エクストラビジンの結合特性を有する分子、ニュートラビジン、単量体ニュートラビジン、ニュートラビジンの結合特性を有する分子、プロテイン A、プロテイン A の結合特性を有する分子、プロテイン L、プロテイン L の結合特性を有する分子、プロテイン G、プロテイン G の結合特性を有する

50

分子、プロテイン A / G、プロテイン A / G の結合特性を有する分子、プロテイン L / A、プロテイン L / A の結合特性を有する分子、カルモデュリン、カルモデュリンの結合特性を有する分子、ビオチン、ビオチンの結合特性を有する分子、金属キレート、グルタチオン、および抗体からなる群から選ばれる、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 6 5】

親和性マトリックスが、700 x g より小の遠心分離によって溶液から集められたものである、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 6 6】

非 - 着色親和性マトリックスおよび着色ポリマー支持体の混合物を含み、着色ポリマー支持体がポリマーおよびポリマーに結合した染料を含む、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

10

【請求項 6 7】

着色ポリマー支持体が、約 1% (容量) ~ 約 95% (容量) の親和性マトリックスを含む、請求項 6 6 記載の親和性マトリックス。

【請求項 6 8】

着色ポリマー支持体が、約 2% (容量) ~ 約 50% (容量) の親和性マトリックスを含む、請求項 6 6 記載の親和性マトリックス。

【請求項 6 9】

着色ポリマー支持体が、約 2% (容量) ~ 約 10% (容量) の親和性マトリックスを含む、請求項 6 6 記載の親和性マトリックス。

20

【請求項 7 0】

非 - 着色親和性マトリックスが抗体結合マトリックスを含む、請求項 6 6 記載の親和性マトリックス。

【請求項 7 1】

抗体結合マトリックスが、プロテイン A アガロース、プロテイン A の結合特性を有する分子で修飾されたアガロース、プロテイン G アガロース、プロテイン G の結合特性を有する分子で修飾されたアガロース、プロテイン L アガロース、プロテイン L の結合特性を有する分子で修飾されたアガロース、プロテイン A / G アガロース、プロテイン A / G の結合特性を有する分子で修飾されたアガロース、プロテイン L / A アガロース、およびプロテイン L / A の結合特性を有する分子で修飾されたアガロースからなる群から選ばれる、請求項 7 0 記載の親和性マトリックス。

30

【請求項 7 2】

非 - 着色親和性マトリックスが、結合抗体を有するマトリックスを含む、請求項 6 6 記載の親和性マトリックス。

【請求項 7 3】

結合抗体を有するマトリックスが、特定のタンパク質に対する抗体を有するマトリックスを含む、請求項 7 2 記載の親和性マトリックス。

【請求項 7 4】

結合抗体を有するマトリックスが、融合タンパク質上の特異的ペプチドタグに対する抗体を有するマトリックスを含む、請求項 7 2 記載の親和性マトリックス。

40

【請求項 7 5】

結合抗体を有するマトリックスが、タンパク質内のエピトープに対する抗体を有するマトリックスを含む、請求項 7 2 記載の親和性マトリックス。

【請求項 7 6】

抗体が、アミノ酸配列 D Y K D D D D K の少なくとも一部に対して特異性を有する抗体 (anti - FLAG (登録商標) ("DYKDDDDK")), 抗 - ポリヒスチジン、抗 - グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、抗 - myc - タグ、抗 - Avi - タグ、抗 - HA、抗 - 緑色蛍光タンパク質、抗 - ベータ・ガラクトシダーゼ、抗 - チオレドキシニン、抗 - マルトース結合タンパク質、抗 - セルロース結合ドメイン、抗 - V S V グリコプロテイン、および抗 - ルシフェラーゼからなる群から選ばれる、請求項 7 2 記載の親和性マトリックス。

50

## 【請求項 77】

非 - 着色親和性マトリックスが、結合親和性リガンドを有するマトリックスを含む、請求項 66 記載の親和性マトリックス。

## 【請求項 78】

親和性リガンドが、ストレプトアビジン、単量体ストレプトアビジン、ストレプトアビジンの結合特性を有する分子、アビジン、単量体アビジン、アビジンの結合特性を有する分子、ストレプトアクチン、単量体ストレプトアクチン、ストレプトアクチンの結合特性を有する分子、エクストラビジン、単量体エクストラビジン、エクストラアビジンの結合特性を有する分子、ニュートラビジン、単量体ニュートラビジン、ニュートラビジンの結合特性を有する分子、プロテイン A、プロテイン A の結合特性を有する分子、プロテイン L、プロテイン L の結合特性を有する分子、プロテイン G、プロテイン G の結合特性を有する分子、プロテイン A / G、プロテイン A / G の結合特性を有する分子、プロテイン L / A、プロテイン L / A の結合特性を有する分子、カルモデュリン、カルモデュリンの結合特性を有する分子、ピオチン、ピオチンの結合特性を有する分子、金属キレート、グルタチオンからなる群から選ばれる、請求項 77 記載の親和性マトリックス。

10

## 【請求項 79】

試料水性溶液から生体分子を分離する方法であって、水性溶液を、ポリマー支持体、親和性マトリックスの光学的検出を可能にするためのポリマー支持体の画分に結合した染料、生体分子の捕獲のためのポリマー支持体の画分に結合した染料以外の親和性リガンドを含む親和性マトリックスと混合し、試料水性溶液から親和性マトリックスを分離することを特徴とする方法。

20

## 【請求項 80】

分離工程中に親和性マトリックスを光学的に観察し、親和性マトリックスの損失を避ける、請求項 79 記載の方法。

## 【請求項 81】

分離工程が、手作業で行われ、親和性マトリックスを分離工程中に可視的に観察し、親和性マトリックスの損失を避ける、請求項 79 記載の方法。

## 【請求項 82】

親和性リガンドが、ストレプトアビジン、単量体ストレプトアビジン、ストレプトアビジンの結合特性を有する分子、アビジン、単量体アビジン、アビジンの結合特性を有する分子、ストレプトアクチン、単量体ストレプトアクチン、ストレプトアクチンの結合特性を有する分子、エクストラビジン、単量体エクストラビジン、エクストラビジンの結合特性を有する分子、ニュートラビジン、単量体ニュートラビジン、ニュートラビジンの結合特性を有する分子、プロテイン A、プロテイン A の結合特性を有する分子、プロテイン L、プロテイン L の結合特性を有する分子、プロテイン G、プロテイン G の結合特性を有する分子、プロテイン A / G、プロテイン A / G の結合特性を有する分子、プロテイン L / A、プロテイン L / A の結合特性を有する分子、カルモデュリン、カルモデュリンの結合特性を有する分子、ピオチン、ピオチンの結合特性を有する分子、金属キレート、グルタチオン、および抗体からなる群から選ばれる、請求項 79 記載の方法。

30

## 【請求項 83】

生体分子を含有する試料水性溶液を親和性マトリックスに添加する、請求項 79 記載の方法。

40

## 【請求項 84】

方法が、免疫沈降である、請求項 79 記載の方法。

## 【請求項 85】

生体分子が、天然由来の生体分子、合成生体分子、修飾された天然由来の生体分子、または修飾された合成生体分子を含む、請求項 79 記載の方法。

## 【請求項 86】

生体分子が、(i)ペプチド、ポリペプチド、種々のタンパク質、グリコプロテイン、酵素、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、核酸ポリマー、炭水化物、脂質、および(ii)群(i)

50

の生体分子を含有する複合体からなる群から選ばれる、請求項 8 5 記載の方法。

【請求項 8 7】

生体分子が、タンパク質を含む、請求項 8 5 記載の方法。

【請求項 8 8】

試料水性溶液が、ライセート、ライセート画分、未精製生体分子を含有する緩衝液、および精製生体分子を含有する緩衝液からなる群から選ばれる、請求項 7 9 記載の方法。

【請求項 8 9】

試料水性溶液がライセートを含む、請求項 7 9 記載の方法。

【請求項 9 0】

方法が、さらに、親和性マトリックスが試料溶液から分離された後に、親和性マトリックスを洗浄水性溶液で洗浄し、洗浄水性溶液から親和性マトリックスを分離し、洗浄水性溶液から分離するときに、親和性マトリックスを光学的に観察する工程を含む、請求項 7 9 記載の方法。 10

【請求項 9 1】

洗浄水性溶液が、溶解 (lysis) 緩衝液を含む、請求項 9 0 記載の方法。

【請求項 9 2】

さらに、親和性マトリックスに結合した生体分子を解離させる、請求項 7 9 記載の方法。

【請求項 9 3】

さらに、親和性マトリックスに結合した生体分子を解離させる、請求項 9 0 記載の方法。

【請求項 9 4】

生体分子を、さらに分析方法にかける、請求項 9 2 記載の方法。 20

【請求項 9 5】

生体分子を、さらに分析方法にかける、請求項 9 3 記載の方法。

【請求項 9 6】

分析方法が、S D S - P A G E を含む、請求項 9 5 記載の方法。

【請求項 9 7】

分析方法が、酵素試験法を含む、請求項 9 5 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0 0 0 1】

親和性に基づく分子プルダウン (免疫親和性捕獲) および免疫沈降の実験は、多様な生物学的システムにおけるタンパク質の発現、修飾および相互作用を研究するための強力かつ広範に使用される方法である。親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降の実験は、エピトープタグをつけた組換えタンパク質の急速精製法、可逆的翻訳後タンパク質修飾の発見と特徴づけ、および分子レベルにおける生物学的過程の理解を増大させた種々の他の観察結果をもたらした。 30

【0 0 0 2】

親和性に基づく分子プルダウン技術の背後にある戦略は、溶液中の標的分子を選択する方法として生物分子の親和性を使用することである。抗体のような親和性リガンドがアガロースのような粒状マトリックスに付着され、生成するコンジュゲートが生物学的または生化学的調製物中の特定抗原のような標的を突き止めそれに結合するために使用される。 40

【0 0 0 3】

免疫沈降は、親和性に基づく分子プルダウン実験の一形式である。親和性に基づく分子プルダウン実験は、特定の生物分子標的に特異的親和性を有するポリマー性支持体に直接コンジュゲートした任意の親和性リガンドを用いて複合体を精製する。しかし、親和性に基づく分子プルダウン実験の一般的手順は、免疫沈降実験に関係した手順で説明することができる。免疫沈降の基本的手順は 3 つの段階を包含する。第 1 の段階は抗原溶液の調製である。第 2 の段階は非特異的背景ライセートの予備的除去であり、第 3 の段階は免疫複合体の形成と精製である。一旦精製後は、数々の方法中任意のものを抗原の分析に使用する 50

ことができる。親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降技術に使用できる種々の手順は、Harlow, E.およびLane, D.(eds.), "Antibodies: a Laboratory Manual", Chapter 7, Cold Spring Harbor Press, NY (1988)中に具体的に詳述されており、そのすべてをここに引用して明細書の記載とする。

【0004】

免疫沈降の実施用溶液として任意の水溶液を使用することができるが、免疫沈降は通常細胞または組織から調製したライセートに対して実施される。通常、ライセートはある種の緩和な表面活性剤で細胞または組織を処理して調製される。緩和な表面活性剤は、当抗原のコンホメーションおよび生化学的活性を破壊することなく、膜を除去し、多数の弱い分子間相互作用を妨害し、大部分の抗原を細胞から放出するのに有効である。非特異的に結合するタンパク質による妨害は、当抗原を結合しない抗体で抗原溶液を予備処理して非特異的に結合するタンパク質を除去することにより低減される。

10

【0005】

免疫複合体は、ライセートに特異的抗体を添加することにより形成される。抗体はそれぞれの対応抗原に高い親和性を有し、したがって抗体・抗原複合体の形成は迅速である。ついで複合体は、プロテインAまたはプロテインGビーズ懸濁液のような親和性ビーズ懸濁液を、抗体・抗原複合体を含有する溶液に添加することにより精製される。精製は、プロテインAおよびプロテインGが抗体のFc部分に高い親和性を有するために起る。プロテインA/G-抗体相互作用により複合体がビーズに結合した後、遠心によりビーズを集め、ビーズを洗浄して非結合タンパク質を除去する。ビーズは、溶解緩衝液のような溶液ですすぎ、吸引によりライセートと洗浄緩衝液を除去することにより、洗浄できる。洗浄緩衝液を完全に除去することが、背景を低減しイムノアッセイの効果を増強するために重要である。免疫複合体の形成および精製の完了後、生成する免疫沈降タンパク質をさらに分析することができる。しばしばこの次工程はSDS-PAGEによるタンパク質の分離である。

20

【0006】

一般に行われる親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降法の主要な欠点は、複合体形成および生成段階で使用する管内において親和性マトリックスを可視化するのが困難なことである。この可視化における難点が、効率的でない操作に導き、物質の損失と結果の定量性変動をもたらす。例えば、アガロースまたはポリアクリルアミドビーズは一般に非着色すなわち透明または白色で、管内における可視化が困難であり、このことが方法の操作を冗長にする。この貧弱な視感度のため、非結合タンパク質除去法においてライセート上清の吸引中にビーズが損失されることがある。さらに、ビーズの貧弱な視感度のため洗浄および吸引工程中に管からのアガロースまたはポリアクリルアミドビーズの偶発的除去がありうる。ビーズの貧弱な視感度のために起る難点と不正確さは、親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降実験の主要な限界である。すなわち、分子プルダウンおよび免疫沈降法におけるその機能を変更することなく親和性マトリックスの視感度を改善するような翻案に対する実質的必要性がなお存在する。このような翻案は、分子プルダウンまたは免疫沈降法を行う個人にとって親和性マトリックスの取り扱いをより容易にする。取り扱いの改善は、操作の効果改善をもたらし、物質の損失と結果の定量性変動を減少する。要するに、このような翻案は親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降法の有効性と信頼性を改善する。

30

40

【0007】

タンパク質に対するある種の染料の親和性は既知であり、ときに種々の用途に使用されてきた。染料は古くから親和性クロマトグラフィーにおけるタンパク質精製用親和性リガンドとして利用されてきた。親和性クロマトグラフィーは、支持体上に固定されたりリガンドに対する物質の(非共有結合的相互作用を含む)生物特異的認識および親和性によって混合物から物質を分離する方法である。タンパク質の精製に使用されてきた染料はもともと織物工業において使用するために開発された。これらの染料は、シアヌロン酸(1,3,5-トリクロロトリアジン)化学に基づくトリアジン染料を包含する。トリアジン染料は、そ

50

れらがより普遍的な固定化酵素および種々の他の生物学的基特異的媒体に比較して製造および使用の両面において利点を提供するため、親和性クロマトグラフィーのリガンドとして使用されてきた。これらの利点には、天然の生物特異的媒体のそれより顕著に高くなり得るタンパク質結合能、低いコスト、一般的入手性および製造の容易性が含まれる。例えば、Christopher R. Lowe および James C. Pearson, Affinity Chromatography on Immobilized Dyes, Methods In Enzymology, Vol. 104, 97 - 113 (1984) 参照。

【0008】

U. S. Patent 5,597,485は、合成アニオン性有機染料に化学結合した重合可能な部分を含む少なくとも1種のモノマーから形成されたポリマーを含むポリマー性組成物を使用したタンパク質分離法を開示している。この染料は分離すべきタンパク質に対する親和性を有する。このタンパク質分離法は、タンパク質を染料画分に保持し、ついでタンパク質をポリマーから回収することを含む。この方法は親和性クロマトグラフィーに応用できるが、クロマトグラフィーカラムに限定されてはいない。この方法は、分離すべきタンパク質を含有する溶液にポリマーを接触させ、着色粒子をろ過、遠心または同様な手段により溶液から分離することを含む。しかし、この方法は分離すべきタンパク質に対して特異的親和性を有する染料を意図的に利用し、タンパク質はこの染料に対する特異的結合により分離精製される。

10

【0009】

U. S. Patent 4,546,161は、モノまたはジクロロトリアジン染料を遊離ヒドロキシまたはアミノ基を有する固体支持体マトリックスと反応させることによる親和性クロマトグラフィー媒体の製造法を開示している。固体支持体マトリックスは、アガロース、デキストロース、デキストランもしくはアクリルアミドのポリマーまたはコポリマーである。染料はアルカリ金属水酸化物およびアルカリ金属塩の存在下に反応される。染料は、トリアジン環を介して固体支持体マトリックスに連結され、高度の特異的タンパク質結合能をもたらす。この媒体は、興味があるタンパク質に特異的に結合するように選択したトリアジン染料を使用するタンパク質の効果的および高度特異的分離用親和性クロマトグラフィーにおいて使用するために特に設計されている。

20

【0010】

同様に、U. S. Patent 4,880,915は、ヒトTNFを含む溶液を染料結合架橋アガロースゲルを充填したカラムに適用し、カラムを溶離して結合したヒトTNFを放出させ、精製ヒトTNFのカラム画分を回収することを含む、特定のタンパク質であるヒトTNFの精製法を開示している。架橋アガロースゲルは、染料リガンドが共有結合した架橋アガロースゲル支持体を含む。染料リガンドは、チバクロンブルーF3GA、プロシオンレッドHE3BまたはグリーンAであり、ヒトTNFは染料リガンドと特異的に相互作用することにより保持される。染料は、核酸沈降の特定用途において物質の視感度を増強する能力のためにも使用されてきた。WO 97/12994は、指示薬分子と結合したポリマー性担体分子を添加することによる溶液からの可溶性核酸沈降法を開示している。核酸沈降技術は、核酸ペレットの視感度欠如のため、上清相の除去中に沈降した核酸ペレットを損失するのではしばしば予期しない失敗になりがちである。核酸は十分な量の塩類とアルコールを水溶液に添加して溶液からの核酸沈降を招くことにより、沈降される。アルコールと塩類は核酸沈降技術の一般的な成分であり、エタノールが方法中で最も一般的に使用されるアルコールである。

30

40

【0011】

WO 97/12994に開示された修飾担体分子は、非修飾分子と同一の溶解度および沈降特性を有し核酸と共沈するが、容易に可視化され、使用者が処理試料中の核酸の位置を観察することを可能にする。非修飾および修飾分子両者の溶解度および沈降特性は、核酸沈降で一般に使用される沈降および遠心技術に対して特異的である。具体的には、核酸はより水性の溶液に可溶性であり、水性溶液に対するアルコールの添加のように水性溶液の誘電率が低下したとき凝集する。凝集は、水性溶液から沈降するに十分なマスを核酸に集合的にもたせる。沈降物は、溶液を約5000gの高速遠心に約5分の期間かけることにより水性

50

溶液から分離しなければならない。したがって、修飾担体分子は別の実験に使用できず、WO 97/12994には修飾担体分子が別の技術に適用できる旨の示唆はない。逆に、この方法と担体分子は核酸沈降技術に特異的に限定されている。

【発明の開示】

【0012】

発明の要約

発明の目的の中に、親和性に基づく分子プルダウン実験中により容易にモニターできて分離中における親和性マトリックスの意図しない損失を回避しそれにより親和性複合体の定量的回収を改善する、相対的に低い非特異的タンパク質結合能を有する親和性マトリックスの提供がある。

10

【0013】

したがって、略述すると、この発明は、水性溶液からの分子の分離用親和性マトリックスを指向する。この親和性マトリックスは、ポリマー支持体、ポリマー支持体の画分に付着してポリマー支持体の光学的検出を可能とする染料、および分子の捕獲のためにポリマー支持体の画分に付着する染料以外の親和性リガンドを含む。

【0014】

この発明はさらに、水性溶液からの生物分子の分離法を指向する。この方法は、水性溶液をポリマー支持体を含む親和性マトリックスと合わせ、親和性マトリックスを水性溶液から分離することを含む。染料がポリマー支持体の画分に付着され、親和性マトリックスの光学的検出とモニターを可能にし、したがって分離工程中の親和性マトリックス損失の可能性を減少する。さらに、染料以外の親和性リガンドも生物分子の捕獲のためにポリマー支持体の画分に付着される。

20

【0015】

他の目的は以下から部分的に明らかであり部分的に指摘される。

【0016】

発明の詳細な記載

ここで使用する「着色ポリマー」または「着色ポリマー支持体」は、染料類を付着させたポリマー性材料を意味する。これらの染料類は好ましくは本質的にタンパク質結合性が低いか、またはタンパク質結合性が低いように修飾された染料類である。「非着色ポリマー」または「非着色ポリマー支持体」は、染料類を付着させていない、架橋アガロースのようなポリマー支持体を意味する。「着色ポリマー」または「着色ポリマー支持体」は、染料を付着させたポリマー支持体を意味する。「着色親和性マトリックス」は、着色ポリマー支持体を含む親和性マトリックスである。

30

【0017】

一実施態様において、この発明の親和性マトリックスは、染料および生物分子もしくは他の興味がある分子に対する親和性リガンドを付着させた粒状ポリマー性材料を含む。一般に、親和性マトリックスは、(i)親和性リガンドではなく染料を付着させた粒状ポリマー性材料、(ii)染料ではなく親和性リガンドを付着させた粒状ポリマー性材料、または(ii)染料および親和性リガンドの両者を付着させ、ただし染料を粒状材料のある画分に付着させ親和性材料を粒状材料のある画分に付着させた粒状材料を含み得る。すなわち、例えば、親和性マトリックスは、(i)混合物中の粒子のあるものが染料を含有し他の粒子は親和性リガンドを含有するが、粒子のいずれも染料と親和性リガンドの両者を含有しない粒状材料混合物、(ii)混合物中の粒子のあるものが染料と親和性リガンドの両者を含有し他の粒子は染料または親和性リガンドを含有するが両者は含有しない粒状材料混合物、または(iii)粒子の実質的に全部が染料および親和性リガンドの両者を含有する実質的に均質な粒状材料(この実施態様においては、染料を付着させた親和性マトリックス粒状材料の画分は1であり、親和性リガンドを付着させた親和性マトリックス粒状材料の画分もまた1である)を含み得る。

40

【0018】

好ましくは、染料と親和性マトリックスは粒状ポリマー性材料の別の画分に付着している

50

。例えば、染料は親和性マトリックスを含む粒状ポリマー性材料の約1重量%～約50重量%に付着し得、親和性リガンドは親和性マトリックスを規定する粒状ポリマー性材料の差額すなわち親和性マトリックスを含む粒状ポリマー性材料の約50重量%～約99重量%に付着している。さらに好ましくは、染料は親和性マトリックスを含む粒状ポリマー性材料の約1重量%～約15重量%に結合し、親和性リガンドは親和性マトリックスを規定する粒状ポリマー性材料の差額の残りすなわち親和性マトリックスを含む粒状ポリマー性材料の約85重量%～約99重量%に付着している。その上さらに好ましくは、染料は親和性マトリックスを含む粒状ポリマー性材料の約2重量%～約10重量%に結合し、親和性リガンドは親和性マトリックスを規定する粒状ポリマー性材料の差額の残りすなわち親和性マトリックスを含む粒状ポリマー性材料の約90重量%～約98重量%に付着している。一般に、2つの画分の相対的比率は染料の(光学的または視覚的に測定した)色強度および非特異的タンパク質結合用粒状材料に結合したときの能力に依存する;例えば、それらが結合する粒状材料に大きな非特異的結合能力を付与する染料は、好ましくはそれらが結合する粒状材料に小さな非特異的タンパク質結合能力を付与する染料より低い比率で使用される。

10

**【0019】**

この発明で使用される染料は、好ましくはポリマー支持体に付着したとき相対的に低いタンパク質結合能力を有する染料である。一般に、これらの染料はポリマー支持体に共有結合する;したがって、染料は好ましくは反応性の基を有するかまたは反応性の基を提供するように修飾されてポリマー支持体との共有結合を可能にする能力をもつ。反応性の基の例は、モノおよびジクロロトリアジン、ビニルスルホン基、モノクロルジフルオルピリミジミウム、-スルファトエチルスルホン、およびイソチオシアネートを含むが限定されるものではない。アゾ、アントロキノンおよびフタロシアニンが反応性染料の範囲において優勢な発色団の主要な3タイプである。この発明で使用される染料は、染料をポリマーに付着したとき、染料が付着されたポリマー支持体を含む親和性マトリックスが光学的に検出可能で好ましくは周囲光中肉眼で容易に視覚できる限り、ポリマー支持体に任意の色を提供することができる。

20

**【0020】**

適当な染料は、また、可視化のために適切な波長の光による励起を必要とする蛍光染料のような肉眼で視覚可能な表色染料の範囲を超えた染料を含む。蛍光染料は検出に対して大幅に高い感度をもたらすが、このことはきわめて少量の親和性マトリックスで作業するときに重要である。一例は、マススペクトル法(MALDI)分析用の調製物において分子ブルダウン実験で使用する蛍光親和性マトリックスであろう。親和性マトリックス試料は適用例あたり数マイクロリットルでMALDI標的スライドに直接適用しうる。MALDI標的上の親和性マトリックス試料の存在は、適当な波長の光に露光後蛍光により視覚的に測定できるであろう。

30

**【0021】**

蛍光性分子は励起した電子状態からフォトンを発光し、吸収/励起および発光スペクトルにより特徴づけられる。蛍光染料は蛍光発光が短命または長命であり得、さらにストークスシフトおよび量子収率で特徴づけられる。フルオレスセインイソチオシアネートは、発光が短命な一般的に使用される蛍光マーカーを代表し、相対的に狭いストークスシフトを有し、相対的に高い量子収率をもつ。ローダミンは別の一般的に使用される蛍光染料であり、フルオレスセインより長い波長で発光する。ランタニド金属キレートは、相対的に大きなストークスシフトを有し蛍光発光が長命な一群の蛍光化合物を代表する。この蛍光分子の重要な群は、一般に光エネルギーを転移して強い蛍光を誘導するために別の高吸収分子を必要とする。ランタニド金属の例は、多度配位子キレートにより共通してキレートされるテルビウムおよびユーロピウムである。蛍光性化合物の他の例は、ナフタレン類、ピレン類、クマリン誘導體、ピリジルオキサゾール誘導體、およびルテニウム錯体である。

40

**【0022】**

一般に、ポリマー支持体に付着した染料は、本質的に低いタンパク質結合能をもつ一種(

50

またはそれ以上)であるか、またはポリマー支持体に付着したとき低いタンパク質結合能をもつように修飾された一種(またはそれ以上)であるか、またはそれらの組み合わせである。好ましくは、親和性マトリックスは本質的に低いタンパク質結合能をもつ染料を含む。いずれの場合にも、好ましく選択された染料(類)は親和性マトリックスによる非特異的タンパク質結合を顕著に増加しない; そうでない場合、親和性マトリックスの強化した光学的検出およびモニターによる利益は分子プルダウンまたは免疫沈降法中の非特異的タンパク質結合による相殺より大きい。例えば、生理的塩類およびpH条件下における天然哺乳類細胞ライセート中に存在するタンパク質の非特異的結合に対する重量ベースの親和性マトリックスの能力は、参照マトリックスが参照マトリックスの粒状材料のいずれにも染料が結合していない点を除いて親和性マトリックスと実質的に同一の場合の、同じ条件下における参照マトリックスの能力の100倍より小さい。好ましくは、生理的塩類およびpH条件下における天然哺乳類細胞ライセート中に存在するタンパク質の非特異的結合に対する重量ベースの親和性マトリックスの能力は、同じ条件下における参照マトリックスの能力の50倍より小さい。さらに好ましくは、生理的塩類およびpH条件下における天然哺乳類細胞ライセート中に存在するタンパク質の非特異的結合に対する重量ベースの親和性マトリックスの能力は、同じ条件下における参照マトリックスの能力の10倍より小さい。その上さらに好ましくは、生理的塩類およびpH条件下における天然哺乳類細胞ライセート中に存在するタンパク質の非特異的結合に対する重量ベースの親和性マトリックスの能力は、同じ条件下における参照マトリックスの能力の3倍より小さい。

10

20

30

40

50

### 【0023】

タンパク質結合性が低い染料は、好ましくはアゾ発色団、アントロキノン発色団、およびフタロシアニン発色団を有する染料から選択される。さらに好ましくは、ポリマー支持体に付着したとき低いタンパク質結合能を本質的に有する代表的な染料は、レマゾールファミリーの染料、ビニルスルホン有する染料、プロシオンファミリーの染料、モノまたはジクロロトリアジン有する染料、およびドリマレンファミリーの染料、モノクロロジフルオロピリミジウム環を有する染料から選択しうる。適当なタンパク質結合性が低い染料の例は、5 - [(4,6 - ジクロロ - 1,3,5 - トリアジン - 2 - イル) アミノ] - 4 - ヒドロキシ - 3 - (フェニルアゾ) - 2,7 - ナフタレンジスルホン酸、ジナトリウム塩(プロシオンレッドMX - 5B); プロシオンブルーMX - R; レマゾールバイオレットR - 4B; プロシオンレッドMX - BRA; 5 - (アセチルアミノ) - 4 - ヒドロキシ - 3 - [[2 - ヒドロキシ - 4 - [[2 - (スルホオキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ] - 2,7 - ナフタレンジスルホン酸、銅錯塩(レマゾールブリリアントバイオレット5R); プロシオンレッドMX - GBA; ブルーMX - 4RD(ネービーブルー21); ブルーMX - 2G(コバルトブルー22); ダルマファイアレッド10; 6 - (アセチルアミノ) - 4 - ヒドロキシ - 3 - [[3 - [[2 - (スルホオキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ] - 2 - ナフタレンスルホン酸、ジナトリウム塩(レマゾールブリリアントオレンジ3R、リアクティブオレンジ16); レマゾールブリリアントレッドBB(リアクティブレッド21); プロシオンタークオイズH - A; レマゾールブリリアントスカーレットR - 3G; レマゾールブリリアントオレンジR - FN; およびリアクティブブルー21を含むが限定されるものではない。この発明で使用する好ましいタンパク質結合性が低い染料の例は、6 - (アセチルアミノ) - 4 - ヒドロキシ - 3 - [[3 - [[2 - (スルホオキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ] - 2 - ナフタレンスルホン酸、ジナトリウム塩(レマゾールブリリアントオレンジ3R、リアクティブオレンジ16)、レマゾールブリリアントレッドBB(リアクティブレッド21)、プロシオンタークオイズH - A、レマゾールブリリアントスカーレットR - 3G、レマゾールブリリアントオレンジR - FN、レマゾールバイオレットR - 4B、5 - (アセチルアミノ) - 4 - ヒドロキシ - 3 - [[2 - ヒドロキシ - 4 - [[2 - (スルホオキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ] - 2,7 - ナフタレンジスルホン酸、銅錯塩(レマゾールブリリアントバイオレット5R)およびリアクティブブルー21を含むが限定されるものではない。さらに好ましいタンパク質結合性が低い染料の例は、6 - (アセチルアミノ) - 4 - ヒドロキシ - 3 - [[3 - [[2 - (

スルホオキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ]-2-ナフタレンスルホン酸、ジナトリウム塩(レマゾールブリリアントオレンジ3R、リアクティブオレンジ16)、レマゾールブリリアントレッドBB(リアクティブレッド21)、レマゾールブリリアントスカレットR-3G、レマゾールブリリアントオレンジR-FN、およびリアクティブブルー21を含むが限定されるものではない。その上さらに好ましいタンパク質結合性が低い染料の例は、レマゾールブリリアントレッドBB(リアクティブレッド21)および6-(アセチルアミノ)-4-ヒドロキシ-3-[[3-[[2-(スルホオキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ]-2-ナフタレンスルホン酸、ジナトリウム塩(レマゾールブリリアントオレンジ3R、リアクティブオレンジ16)を含むが限定されるものではない。

10

#### 【0024】

低いタンパク質結合性はまた染料を低いタンパク質結合能をもつように修飾することによっても達成しうる。これらの染料は、また、アゾ発色団、アントロキノン発色団、およびフタロシアニン発色団を有する染料から一般に選択しうる。また蛍光染料のような可視スペクトル中になく、およびUVスペクトルまたはIRスペクトルで視覚可能な染料も使用しうる。好ましくは、染料はレマゾールファミリーの染料、ビニルスルホン反応性基を有する染料、プロシオンファミリーの染料、モノまたはジクロロトリアジン基を有する染料、およびドリマレンファミリーの染料、モノクロロジフルオロピリミジミウム環を有する染料から選択しうる。タンパク質結合性染料の例は、リアクティブブラウン10、およびリアクティブレッド120を含むが限定されるものではない。染料を低いタンパク質結合性にする修飾は、ゼラチン吸収および架橋を含むことができる。ゼラチン吸収および架橋はタンパク質結合性染料がタンパク質に結合する部位を物理的にブロックする。したがって、それらがタンパク質に結合する部位がゼラチンによりブロックされているためタンパク質がほとんど染料に結合しない。ゼラチンはポリマー支持体に付着したタンパク質結合性染料の実際のタンパク質結合部位をブロックするように作用し、架橋はブロックしているゼラチンをポリマー支持体上にロックするように作用する。ゼラチン吸収および架橋は、着色ポリマー支持体を水調製物中のゼラチンで飽和し、ついで1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩のような適当な反応剤で架橋することにより達成することができる。この手順は共有結合で付着したリアクティブレッド120をもつビーズ上のアガロスマトリックスにゼラチンを付着するのに使用された。この手順に対する適当な修飾および別の手順の選択はすべてタンパク質結合をブロックする修飾およびそれらが達成される手順に通じた当業界で通常の技術をもつ者によってなし得るのであろう。

20

30

#### 【0025】

ポリマー支持体に付着できる染料の量は、具体的な親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降実験の目的物に応じてかなり変化できる。ポリマー支持体に付着できる染料量の上限は、ポリマー支持体の機能を変更または傷つける量である。下限はポリマー支持体の光学的または可視的検出、例えば周囲光中での視感度を可能とする染料量によって規定される。ポリマー支持体に付着する染料量を選択するための他の関係する考察は、さらに親和性リガンドで修飾すべき着色ポリマー支持体の能力を含む。これらの変数を評価し具体的分子プルダウンまたは免疫沈降実験の対象物に合うようにポリマー支持体に付着する染料の適切な量を選択することは、当然当業界における通常の実施者の技術範囲内にある。

40

#### 【0026】

しかし、一般にポリマー支持体に付着できる染料量は染料約0.5マイクロモル/ポリマー支持体 $\text{cm}^3$  ~ 染料約20マイクロモル/ポリマー支持体 $\text{cm}^3$ の間である。好ましくは、ポリマー支持体に付着される染料量は染料約1マイクロモル/ポリマー支持体 $\text{cm}^3$  ~ 染料約6マイクロモル/ポリマー支持体 $\text{cm}^3$ の間である。さらに好ましくは、ポリマー支持体に付着される染料量は染料約2マイクロモル/ポリマー支持体 $\text{cm}^3$  ~ 染料約4マイクロモル/ポリマー支持体 $\text{cm}^3$ の間である。

50

## 【0027】

ポリマー支持体は、一般に、染料の付着を可能とする付着部位を含んだ親和性に基づく分子ブルダウンまたは免疫沈降実験で親和性マトリックスとして使用できる任意のポリマーである。ポリマーは、好ましくは、低い非特異的タンパク質結合性を示し、それで修飾され得る染料および任意の親和性リガンドまたはタンパク質結合性リガンドの両者に高い結合能力を示す。ポリマーは天然でも合成でもよい。天然または合成ポリマーは架橋されていてもよい。このようなポリマーは、天然アガロース、架橋アガロース、デキストラン、架橋デキストラン、キシランアルギネート、キトサン、ビーズ化セルロース、ポリアクリルアミド、ポリアクリレート、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリカプロラクトン類、ポリオキシエチレン類、ポリビニル樹脂、アガロース・ポリアクリルアミドコポリマー類、およびデキストランポリアクリルアミドコポリマー類を含むが限定されるものではない。これらおよび他のポリマーの組み合わせもまた、組み合わせられてポリマーが低い非特異的タンパク質結合性および染料および親和性リガンドの両者に対する高い結合能力という意図した特性を有する限り、この発明の範囲に含まれる。好ましいポリマーは、親和性に基づく分子ブルダウンおよび免疫沈降実験でしばしば使用されるものを含む。すなわち、天然アガロース、架橋アガロース、ポリアクリルアミド、および架橋デキストランがこの発明で使用するに好ましいポリマーである。架橋アガロースはこの発明で使用するのにより好ましい。ポリマー支持体は、目的とする親和性に基づく分子ブルダウンまたは免疫沈降用途に適切な任意の形態をとることができる。ポリマー支持体は水性溶液に可溶性でも不溶性でもありうる。好ましくは、ポリマー支持体は水性溶液に不溶性である。多くの親和性に基づく分子ブルダウンまたは免疫沈降用途において、ポリマー支持体は粒子またはビーズの形態である。すなわち、ポリマー支持体が粒子またはビーズの形態であるのが好ましい。

## 【0028】

一般に、親和性マトリックスは、粒子が約1,000マイクロメートルより小さな平均寸法をもつ粒状のポリマー支持体を含む。典型的に、粒状ポリマー支持体中の粒子は約700ミクロンより小さな、さらに典型的に600ミクロンより小さい平均寸法をもつ。例えば、ある種の用途において粒状ポリマー支持体の粒子は約400ミクロンより小さな平均寸法をもち、別の用途において粒子は約200ミクロンより小さな平均寸法をもつ。

## 【0029】

天然および架橋アガロース粒子は、典型的に直径が約20~約300マイクロメートルにわたる。好ましくは、天然および架橋アガロース粒子は、直径が約30~約250マイクロメートルにわたる。さらに好ましくは、天然および架橋アガロース粒子は、直径が約40~約165マイクロメートルにわたる。ポリアクリルアミド粒子は、典型的に直径が約20~約200マイクロメートルにわたる。好ましくは、ポリアクリルアミド粒子は、直径が約30~約150マイクロメートルにわたる。さらに好ましくは、ポリアクリルアミド粒子は、直径が約40~約105マイクロメートルにわたる。デキストランおよび架橋デキストラン粒子は、典型的に直径が約15~約600マイクロメートルにわたる。好ましくは、デキストランおよび架橋デキストラン粒子は、直径が約20~約400マイクロメートルにわたる。さらに好ましくは、デキストランおよび架橋デキストラン粒子は、直径が約50~約300マイクロメートルにわたる。

## 【0030】

すなわち、この発明で使用するに適当な着色ポリマー支持体の例は、直径が約30~約250マイクロメートルにわたり、天然アガロースの $\text{cm}^3$ あたり染料約0.5~約20マイクロモルを有する天然アガロース粒子である。この発明で使用するに適当な着色ポリマー支持体の他の例は、直径が約30~約150マイクロメートルにわたり、ポリアクリルアミドの $\text{cm}^3$ あたり染料約0.5~約20マイクロモルを有するポリアクリルアミド粒子である。この発明で使用するに適当な着色ポリマー支持体の別の例は、直径が約20~約400マイクロメートルにわたり、架橋デキストランの $\text{cm}^3$ あたり染料約0.5~約20マイクロモルを有する架橋デキストラン粒子である。

## 【0031】

この発明で使用するのに好ましい着色ポリマー支持体は、直径が約20～約300マイクロメートルにわたり、架橋アガロースの $\text{cm}^3$ あたり染料約1～約6マイクロモルを有する架橋アガロース粒子である。この発明で使用するのに好ましい別の着色ポリマー支持体は、直径が約20～約300マイクロメートルにわたり、架橋アガロースの $\text{cm}^3$ あたり染料約2～約4マイクロモルを有する架橋アガロース粒子である。

## 【0032】

この発明で使用するのにさらに好ましい着色ポリマー支持体は、直径が約30～約250マイクロメートルにわたり、架橋アガロースの $\text{cm}^3$ あたり染料約1～約6マイクロモルを有する架橋アガロース粒子である。この発明で使用するのにさらに好ましい別の着色ポリマー支持体は、直径が約30～約250マイクロメートルにわたり、架橋アガロースの $\text{cm}^3$ あたり染料約2～約4マイクロモルを有する架橋アガロース粒子である。

10

## 【0033】

この発明で使用するのになおさらに好ましい着色ポリマー支持体は、直径が約40～約165マイクロメートルにわたり、架橋アガロースの $\text{cm}^3$ あたり染料約1～約6マイクロモルを有する架橋アガロース粒子である。この発明で使用するのに好ましい別の着色ポリマー支持体は、直径が約40～約165マイクロメートルにわたり、架橋アガロースの $\text{cm}^3$ あたり染料約2～約4マイクロモルを有する架橋アガロース粒子である。染料は、当業界の技術者が入手できる任意の適当な手段によりポリマー支持体に共有結合で付着しうる。付着は好ましくは染料上の反応性の基とポリマー支持体上の付着部位を通じて起る。ポリマー支持体上の付着部位は、ヒドロキシル基、アミン基、およびカルボキシル基を含むが限定されるものではない。ポリマー上に天然に存在する付着部位のあるものまたは全部を別の付着部位に変換することにより追加的な付着部位を作ることが可能である。例えば、取り上げたポリマー支持体上に見られるヒドロキシル基はアミン、スルフヒドリル基またはカルボン酸のような官能基に変換することができる。同様に、染料上に天然に存在する反応性の基のあるものまたは全部を別の反応性の基に変換することにより追加的な反応性の基を染料上に作ることが可能である。染料は、例えばアミン基を含有するように修飾できよう。

20

## 【0034】

染料は、例えば染料のあるもののトリアジン環中にある塩素原子(類)をポリマーマトリックスのあるもの上にあるヒドロキシル基で置換することにより共有結合されうる。染料はまた、染料のあるもののビニルスルホン基とポリマーのあるものにあるヒドロキシル基を通じて付着しうる。好ましくは、染料はポリマー支持体に直接共有結合される。しかし、好ましくはないが、染料をポリマー支持体に間接的に共有結合することも可能である。このような間接的付着は、ポリマー支持体に染料を付着する際スペーサーまたは別の分子の使用を含み得よう。典型的なスペーサーは、ヘキシルスペーサーのような炭化水素スペーサーを含む。

30

## 【0035】

一実施態様において、染料は当業界で知られる任意の手段によりアガロースに付着される。例えば、アガロースを遠心し、繰り返し洗浄し、重炭酸ナトリウム中にけんたくしうる。ついで染料を塩化ナトリウム中に溶解し、塩/染料溶液を樹脂炭酸スラリーに添加しうる。あわせた塩/染料溶液と樹脂/炭酸スラリーをついで1時間～数時間にわたる期間(例えば25と80の間の温度で)インキュベートし、その後遠心またはろ過して上清を除きうる。着色アガロースペレットを非結合染料が除去されるまで水で繰り返し洗浄する。樹脂を適当なストック緩衝液中に再けんたくする。

40

## 【0036】

染料は、25と80の間の温度で1時間～数時間にわたる期間アルカリ性条件を使用する同様な手順を使用してもアガロースに付着しうる。アルカリ性条件は、手順中でNaOHを使用して供給することができる。結合後、ポリマーを水で繰り返し洗浄して非結合染料を除く。この手順は、アガロースにある種のプロシオンおよびレマゾール染料を付着

50

するために使用された (Hasnaoui, M., et al., J. Chromatogr. A, 766, 49-60, 1997)。別の染料および他のポリマーを結合するとき、付着手順に当業界の技術者に明らかな適当な変更および調節をすることが必要となり得ることが理解される。

【0037】

染料を付着後、着色ポリマー支持体は、好ましくは、染料が結合していない同一ポリマーがもっていたのと同様な溶解度と遠心特性および同様な密度を有する。例えばポリマーが水性溶液に不溶の場合、好ましくは着色ポリマー支持体も水性溶液に不溶である。好ましくは、着色ポリマーもまた700×G未満の遠心により水性溶液から容易に採取できる。

【0038】

この発明の別の実施態様は、この発明の親和性マトリックスを使用する水性試料溶液からの生物分子の分離法を指向するものであり、親和性マトリックスは改善された視覚性を持ち低い非特異的タンパク質結合特性を有することを特徴とする。この興味がある生物分子の分離法で使用する親和性マトリックスは、親和性リガンドで修飾された着色ポリマー支持体を含みうるか、または着色ポリマー支持体と非着色親和性マトリックスの混合物を含みうる。

10

【0039】

着色ポリマー支持体は、具体的な親和性に基づく分子プルダウン用途または免疫沈降用途に適した親和性リガンドで修飾することができる。しばしば使用される親和性リガンドの例は、抗体、金属キレート、グルタチオン、ストレプトアビジン、モノマー性ストレプトアビジン、ストレプトアビジンの修飾形のようなストレプトアビジンの結合特性をもつ分子、アビジン、モノマー性アビジン、アビジンの修飾形のようなアビジンの結合特性をもつ分子、ストレプトアクチン、モノマー性ストレプトアクチン、ストレプトアクチンの修飾形のようなストレプトアクチンの結合特性をもつ分子、エキストラビジン、モノマー性エキストラビジン、エキストラビジンの修飾形のようなエキストラビジンの結合特性をもつ分子、ニュートラビジン、モノマー性ニュートラビジン、ニュートラビジンの修飾形のようなニュートラビジンの結合特性をもつ分子、プロテインA、断片、組み合わせ、組換え形またはプロテインAの他の変形のようなプロテインAの結合特性をもつ分子、プロテインL、断片、組み合わせ、組換え形またはプロテインLの他の変形のようなプロテインLの結合特性をもつ分子、プロテインG、断片、組み合わせ、組換え形またはプロテインGの他の変形のようなプロテインGの結合特性をもつ分子、プロテインA/G、断片、組

20

30

【0040】

親和性マトリックスは同等な非着色親和性マトリックスがもつと同様な遠心および溶解特性を持ち、興味がある生物分子の分離、精製、および分析に異なって機能しないので、親和性リガンドで修飾された後の親和性マトリックスはすべての型の親和性に基づく分子プルダウンまたは免疫沈降法に使用するに適する。親和性リガンドで着色ポリマー支持体を修飾できる方法は当業界で技術をもつものに周知である。

40

【0041】

この発明の親和性マトリックスは、均等な非着色親和性マトリックスと同様な遠心および溶解特性を持ち興味がある生物分子の分離および精製に全く異なって機能しないので、標準的な親和性に基づく分子プルダウン法に対する特別な調節は必要がない。しかし、親和性に基づく分子プルダウン実験(親和性捕獲)の手順は、マトリックスに固定された親和性リガンドの性質およびその標的生物分子に応じて変化する。当業界において通常の技術をもつものは、親和性に基づく分子プルダウン実験の種々の手順に充分通じている。親和性に基づく分子プルダウンの手順は下記の基本的工程をもつ。付着した親和性リガンドを有する親和性マトリックスを、興味がある生物分子を含む水性溶液とインキュベートする。

50

相互作用の強度および持続期間を含む親和性相互作用の性質は、具体的実験または手順の対象に応じて広範に変化できる。すなわち、親和性リガンドと興味がある生物分子間の親和性相互作用は、一過性または親和性リガンドと興味がある生物分子間で特定の複合体を形成するに十分な期間であることができる。複合体が形成されるそれらの実験および手順において、複合体が付着した親和性マトリックスは遠心により水性溶液から分離される。ついで、上清を吸引し複合体を洗浄することにより、非結合タンパク質を除去する。溶解緩衝液のような溶液ですすぎ吸引によりライセートと洗浄緩衝液を除去することにより、粒子を洗浄することができる。複合体を水性溶液から分離するために過も使用しうる。ついで、興味がある生物分子を複合体から取り外すことができ、または複合体の残りの部分が親和性マトリックスに付着したまま活性を分析することができる。複合体から取り外した場 10  
合、生物分子は物理的、化学的、または機能的分析に付することができる。例えば、ついで生物分子の分子量を SDS / PAGE により決定でき、または非結合生物分子について酵素アッセイを行うことができる。

#### 【0042】

免疫沈降は、親和性に基づく分子プルダウン方法の1種である。免疫沈降の基本的な操作は、抗原溶液の調製、抗体-抗原複合体の形成および精製を含む。抗体-抗原複合体はライセートに特異的抗体を添加することによって形成される。各抗原に対する抗体の親和性は、抗体-抗原複合体を迅速に形成させる。親和性ビーズ懸濁液、例えば、プロテインAまたはプロテインG懸濁液は、ついで、複合体を精製するために抗体-抗原複合体を含有する水性溶液に添加される。抗体のFc部のプロテインAおよびプロテインGによって与えられる高親和性は複合体の精製を容易にする。複合体が、プロテインA/G-抗体相互作用によってポリマー支持体の粒子に結合した後、粒子が遠心分離によって水性溶液から分離される。ついで、非結合プロテインが上清液を吸引し、洗浄することによって除去される。洗液は吸引して除く。濾過を親和性マトリックスの粒子を水性溶液から分離するために用いることができる。ついで、当生体分子は複合体から除去するか、またはポリマー支持体に結合した複合体の一部の活性を分析することができる。ハーロウ(Harlow、上掲、ここに引用して明細書の記載とする)は免疫沈降実験に適切な条件を記載している。標準的な免疫沈降方法に特別な調節は必要でなく、なぜなら、着色親和性マトリックスは同じポリマーの非-着色親和性マトリックスと同様の沈降および溶解特性を持っているから 20  
であり、当生体分子の分離および精製において異なって機能しないからである。しかし、 30  
非-着色親和性マトリックスとは反対に、着色親和性マトリックスは免疫沈降方法の種々の手順中可視化される。

#### 【0043】

着色親和性マトリックスの存在のために、親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降の方法に変更はないから、両方の方法において下記の一般的な工程が行われる。当生体分子の精製および分離の親和性に基づく分子プルダウン方法の第1工程は、当生体分子を含有する水性溶液を、改善された視感度および低非-特異的タンパク質結合特性を有する着色親和性マトリックスと混合する。混合は着色親和性マトリックスを生体分子を含有する水性溶液に添加して行うことができる。好ましくは、混合は生体分子を含有する水性溶液を着色親和性マトリックスに添加することによって行う。 40

#### 【0044】

当生体分子を含有する水性溶液は、典型的にはライセート、ライセート画分、または、精製または未精製のタンパク質または他の生体分子または修飾された生体分子を含有する緩衝液であるが、他の生体分子を含有する水性溶液も用いることができる。生体分子は、天然由来または合成起源のものであってよく、またはなんらかの方法で修飾された天然由来または合成起源の生体分子であってもよい。当天然由来の生体分子には、これに限定されるものではないが、ペプチド、ポリペプチド、種々のタンパク質、グリコプロテイン、酵素、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAなどの核酸ポリマー、炭水化物、脂質、およびタンパク質を含有する複合体が含まれる。合成生体分子の例としては、これに限定されるものではないが、合成ペプチド、合成ポリペプチド、種々の合成タンパ 50

ク質、合成グリコプロテイン、合成ヌクレオチド、合成ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAなどの合成核酸ポリマー、合成酵素、合成炭水化物、合成脂質、およびタンパク質を含有する合成複合体が挙げられる。修飾生体分子の例は、これに限定されるものではないが、酵素切断などの方法によって修飾されるかまたは、ビオチニル化またはアミノ酸エピトープタグなどの合成タグを有する、天然由来または合成の生体分子を含む。溶液はこれらの生体分子の混合物を含有していてもよい。

【0045】

この方法の第2工程は、着色親和性マトリックスの水性溶液からの分離を含む。着色親和性マトリックスは、典型的には水性溶液遠心分離および上清液の吸引によって分離される。しかし、具体的な実験に依存して、濾過または他の適当な方法を採用してマトリックスを水性溶液から分離することができる。遠心分離は典型的には8,000 x g、30秒またはそれ以下で行われる。しかし、免疫沈降および親和性に基づく分子プルダウン実験に適した遠心分離はかなり変更することができる。すなわち、免疫沈降および親和性に基づく分子プルダウン実験の種類および実験者の好みによって、より遅い速度の遠心分離を長期間にわたって採用することができる。同じく、短期間の場合はより早い遠心分離を採用することができる。

10

【0046】

非結合生体分子は、着色親和性マトリックスから着色親和性マトリックスを洗浄することによって除くことができる。洗液は吸引して除去する。光学的検出のために、着色親和性マトリックスは、洗浄および吸引工程中光学的にモニターされる。好ましくは、光学的モニターは周囲光中で操作者の視覚によって行われる。しかし、光学的モニターは器具または装置によってもまた、さらに自動でも行うことができる。すなわち、操作者は、洗浄工程中に、着色親和性マトリックスの位置を可視的に確認することができる。吸引によって着色親和性マトリックスの粒子を誤って除去する可能性はない。マトリックスの光学的モニターが可能なのはこの方法の信頼性を増大させ、量的な可変性を減少させる。

20

【0047】

実験の目的に依存して、首尾よい実験では、親和性相互作用によって着色親和性マトリックスに結合した当生体分子を得ることができる。当生体分子の精製および分離方法の追加の工程によって、結合生体分子が放出または処理され、その後の物理的、化学的または機能的分析が可能になる。物理的分析の例には、SDS/PAGEによる分子量測定が含まれる。生化学的分析は翻訳後修飾を含み、機能的分析には、例えば酵素試験が含まれる。

30

【0048】

当生体分子の精製および分離の親和性に基づく分子プルダウン方法に用いられる着色親和性マトリックスは、親和性リガンドで修飾された本発明の着色ポリマー支持体を含むか、または本発明の着色ポリマー支持体および非着色親和性マトリックスの混合物を含むことができる。この混合物は着色ポリマー支持体と非-着色親和性マトリックスを結合させて製造される。

【0049】

着色ポリマー支持体および非-着色親和性マトリックスの密度、溶解度および遠心分離性を、着色親和性マトリックスが、従来非-着色マトリックスに対して改善された光学的検出性を示すようにする。好ましくは、本発明の着色ポリマー支持体は、それが結合される非-着色親和性マトリックスと、実質的に同様の遠心分離および溶解特性、および同じ密度を有する。それらが同様の特性および密度を有するとき、着色ポリマー支持体は、非-着色親和性マトリックスに実質的に均一に分散される傾向にあり、均一な色を示し、具体的実施において、周囲光で操作者の目に見えるか、または光学検出器によって光学的に可視化され得る。均一な分散とは、着色ポリマー支持体が、混合後にむらなく非-着色親和性マトリックス内に分散され、着色親和性マトリックスの外見がマトリックスの特定の領域に色の濃淡がなくむらのないかつ均一な色であることを意味する。非-着色親和性マトリックス内の着色ポリマー支持体のこの分散は、遠心分離後も均一なままである。さらに、着色ポリマー支持体は、変化しないか、または、当分子の分離および精製における非

40

50

- 着色親和性マトリックスの機能を助ける。

【0050】

一般に、着色ポリマー支持体および非着色ポリマー支持体は、同じ種類および同じ大きさのポリマーで調製されるのが好ましい。それらが遠心分離特性、溶解度および密度の項目で十分類似していれば、着色および非 - 着色ポリマー支持体は異なるポリマーの種類または粒子の大きさを含むことができる。同様に、着色ポリマー支持体および非 - 着色ポリマー支持体はそれぞれポリマー支持体の1つまたはそれ以上の種類または大きさを含むことができる。

【0051】

親和性マトリックスは、ポリマー支持体の表面に広範な種類の親和性リガンドを含むことができる。例えば、親和性リガンドは分子の結合ペアのいずれであってもよく(それぞれが特定の結合ペアの構成員である)、天然由来または合成して製造される。分子ペアの一方は、その表面上に、他方の分子の特定の空間的および極性組織と特異的に結合する領域または空洞をもち、従って、相補的であると定義され、そのペアは互いに特異的に結合する性質がある。特異的結合ペアの種類例は、抗原 - 抗体、ビオチン - アビジン、ホルモン - ホルモン受容体、受容体 - リガンド、酵素 - 基質およびIgG - プロテインAである。

【0052】

本発明の1つの態様において、ポリマー支持体は、アガロースおよびアガロースの表面に結合されているのは、プロテインA(「プロテインAアガロース」)またはプロテインAアガロースに匹敵する結合特性を有するその誘導体もしくは類似体、プロテインG(「プロテインGアガロース」)、またはプロテインGアガロースに匹敵する結合特性を有するその誘導体もしくは類似体、アガロースL(「プロテインLアガロース」)、プロテインLアガロースに匹敵する結合特性を有するその誘導体もしくは類似体、およびそれらの組合せ、例えば、プロテインA/Gアガロース、またはプロテインA/Gの結合特性を有する分子で修飾されたアガロース、およびプロテインL/Aアガロース、またはプロテインL/Aの結合特性を有する分子で修飾されたアガロースである。

【0053】

他の具体例において、ポリマー支持体に結合されているのは、融合タンパク質のペプチドタグまたは、タンパク質の構成員と共有することができるタンパク質内のエピトープに特異的である抗体である。マトリックスに結合し得る抗体の例には、アミノ酸配列D Y K D D D D Kの少なくとも一部に対して特異性を有する抗体(シグマ - アルドリッチ社製anti - FLAG(登録商標)抗体)に限定されるものではなく、抗 - ポリヒスチジン、抗 - グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、抗 - myc - タグ、抗 - Avi - タグ、抗 - HA、抗 - 緑色蛍光タンパク質、抗 - ベータ・ガラクトシダーゼ、抗 - チオレドキシニン、抗 - マルトース結合タンパク質、抗 - セルロース結合ドメイン、抗 - V S Vグリコプロテイン、および抗 - ルシフェラーゼが含まれる。

【0054】

別の具体例において、ポリマー支持体に結合された親和性リガンドは、抗体ペアの構成員以外である。例えば、このような親和性リガンドには、ストレプトアビジン、単量体ストレプトアビジン、ストレプトアビジンの結合特性を有する分子、アビジン、単量体アビジン、アビジンの結合特性を有する分子、ストレプトアクチン、単量体ストレプトアクチン、ストレプトアクチンの結合特性を有する分子、エクストラビジン、単量体エクストラビジン、エクストラアビジンの結合特性を有する分子、ニュートラビジン、単量体ニュートラビジン、ニュートラビジンの結合特性を有する分子、カルモデュリン、カルモデュリンの結合特性を有する分子、ビオチン、ビオチンの結合特性を有する分子、グルタチオンおよび金属キレートが含まれる。

【0055】

着色ポリマー支持体は、適当な方法によって非 - 着色親和性マトリックスと結合させることができる。着色ポリマー支持体は、非 - 着色親和性マトリックスと、例えば、各マトリックスをスラリーとしてピペットでとり、混合することができる。すなわち、もし、10%

10

20

30

40

50

の着色ポリマー支持体を含有する着色親和性マトリックスを製造したいならば、50%のスラリーとして9部の非-着色親和性マトリックスの当量を管にピペットでとり、ついで、50%のスラリーとして1部の着色ポリマー支持体の当量を同じ管にピペットでとる。ついでスラリーを混合し、均一な懸濁液を得る。各部は容量または重量で測定する。

**【0056】**

スラリーはまた、濾過、計量され、ついで手作業で混合され、着色親和性マトリックスが得られる。すなわち、10%の着色ポリマー支持体を含有する着色親和性マトリックスを得たいならば、下記の方法を採用することができる。非-着色親和性マトリックスのスラリーおよび着色ポリマー支持体スラリーをそれぞれ濾紙を用いて別々に濾過する。着色ポリマー支持体1部(重量)の当量を測定し、同じ方法で得られた9部(重量)の非-着色親和性マトリックスの当量を一緒にする。一緒にした着色ポリマー支持体および非-着色親和性マトリックスをついで適当な緩衝液に再懸濁させ、得られたスラリーを手作業で混合し、着色親和性マトリックスを得ることができる。適当な方法の選択および条件は当分野の従事者の技術範囲内に十分含まれる。

10

**【0057】**

着色親和性マトリックス内の着色ポリマー支持体の量は、かなりの範囲で変えることができ、下記の3つの基準によって選択することができる。

**【0058】**

着色親和性マトリックスは、所望により検出可能であり、非-着色親和性マトリックスの非特異的タンパク質結合に匹敵する非特異的タンパク質結合を示す。さらに、着色親和性マトリックスは、非-着色親和性マトリックスに匹敵する特異的生体分子結合を示す。所望により、検出可能とは、親和性マトリックスが、所望により機械的に、または操作者もしくは観察者による視角によるかのいずれかで検出され得ることをいう。着色親和性マトリックスは、この方法の種々の操作中に所望により検出される。非-特異的タンパク質結合に匹敵するとは、着色親和性マトリックスが、非-着色親和性マトリックスより以上に、有意に非-特異的タンパク質結合を示さないことを意味する。有意により大きい非-特異的タンパク質結合は、生体分子を標的とするその後の分析を妨害する量である。これは操作者の具体的な適用によって変化する。特異的生体分子結合に匹敵するとは、着色親和性マトリックスが、非-着色親和性マトリックスの免疫試験または分子プルダウン方法における当生体分子に対する親和性または結合能力と、類似の親和性または結合能力を有することをいう。

20

30

**【0059】**

すなわち、特定の分子プルダウンまたは免疫沈降実験で用いられる、着色親和性マトリックス中の着色ポリマー支持体の量は、約1%(容量)~約95%(容量)の範囲で変えることができる。好ましくは、着色親和性マトリックス中の着色ポリマー支持体の量は、約2%(容量)~約50%(容量)である。より好ましくは、着色親和性マトリックス中の着色ポリマー支持体の量は、約2%(容量)~約10%(容量)である。しかし、多くの変数が非-着色親和性マトリックスに添加されるべき着色ポリマー支持体の適当な量の決定に関与しており、これは当業者になじみのあるものである。この変数の1つは、着色ポリマー支持体中に用いられる染料の種類であり、周囲光中でのその色の強度である。すなわち、例えば、レマゾール・イエローGLなどの黄色の染料はレマゾールブリリアント・レッドBBと同じ色強度ではなく、周囲光で十分な視感度を得るために、レマゾールイエローGL着色ポリマーはより高い%を必要とする。別の変数には、分子プルダウン技術の種類が含まれる：ある種の親和性リガンドの機能は、ポリマー支持体中の染料分子の存在により敏感な場合があり、より低い%の着色ポリマー支持体を用いて、当生体分子に対する着色親和性マトリックスの親和性および当生体分子の結合に影響を与えないようにすることができる。

40

**【0060】**

本発明の着色親和性マトリックスはまた、特定の分子プルダウンまたは免疫沈降実験を確認するための手段として有用である；2つの異なる分子プルダウンまたは免疫沈降実験を実験に採用されている親和性マトリックスの色によって区別することができる。すなわち

50

、着色親和性マトリックスはまた、複数の実験の操作者を援助することができる。さらに、親和性に基づく分子プルダウンまたは免疫沈降実験においてこの明細書に記載された種類の着色親和性マトリックスの使用は、実験中の親和性マトリックスの位置を可視化およびモニターし得る能力をもたらす。この方法中で親和性マトリックスの位置を可視化またはモニターし得るこの能力は、親和性に基づく分子プルダウンまたは免疫沈降実験に関連する種々の手作業を、操作者にとってより容易にし、操作の間違いを減らすのに役立つ。現在の親和性に基づく分子プルダウンまたは免疫沈降技術に対するこの改善は、一般にこれらの強力な技術の信頼性を大きく増大する。下記の実施例は本発明を具体的に説明するものであって限定するものではない。

#### 【0061】

10

##### 実施例 1

着色が差異のおよび非 - 着色のマトリックスの適合性の比較

着色が差異のおよび非 - 着色のマトリックスを混合し、続いて遠心分離しそして得られたマトリックスペレットを目視観察することによって比較した。

#### 【0062】

セファロース CL - 4 B アガロース (非 - 着色) およびリアクティブ・レッド (Reactive Red) 120 アガロース (シグマ社製品番号 R9129; 赤色) を膨潤し、標準的な方法によって洗浄して平衡とし、そして 20% エタノール含有のトリス緩衝生理食塩水 (TBS) 中の 50% ゲルスラリーとして保存した。リアクティブ・レッド 120 アガロースを、0%、5%、10%、25%、50%、100% の非 - 着色アガロースに加え、微量遠心機管 (1.5 mL) 中で混合し、そして標準的な微量遠心機中で 30 秒間遠心分離 ( $8,000 \times g$ ) した。

20

#### 【0063】

得られたペレットを、マトリックスペレット中での着色の分布の均一性についておよび全着色の総強度について、周囲光で注意深く目視観察した。全てのペレットが均一な着色 (これは、マトリックスペレット全般にわたって一様に分布することである) を示し、このことはリアクティブ・レッド 120 アガロースの密度および遠心分離の性質が非 - 着色アガロースのものに匹敵することを示す。リアクティブ・レッド・アガロースを含有するペレットの可視強度は、100% リアクティブ・レッド 120 アガロースの場合の暗赤色から 5% 混合物の場合の淡赤色 / 桃色にまで広範にわたり、そして非 - 着色アガロースのみ

30

#### 【0064】

本実験により、非 - 着色アガロースと混合した着色アガロースは所望の遠心分離の性質を有しており、これにより遠心分離後に、容易に可視化である均一に着色したポリマー支持体のペレットを与えることを示した。

#### 【0065】

##### 実施例 2

タンパク質によるブロックおよび架橋

40

公知のタンパク質製品を用いてマトリックスビーズを飽和とし且つタンパク質をアガロースビーズ上に架橋させることにより、染料のタンパク質結合部位を遮蔽し、従って着色性アガロースマトリックスと結合することができるであろう非特異的なライセートタンパク質の量が減少するかどうかを調べた。

#### 【0066】

リアクティブ・レッド 120 アガロース親和性樹脂の 50% 懸濁液 (シグマ製品番号 R0503) (2.4 mL、1.2 mL のパッキング (packed) ゲル) を、各 6 管中に分配し、そして卓上用遠心機中、室温で 5 分間遠心分離 ( $2500 \times g$ ) した。懸濁液を注意深く吸引した。各管へ水 (9 mL) を加え、混合しそして上記の通り遠心分離することによって、樹脂ペレットを洗浄した。洗液の上清を吸引した。ペレットを同じ方法によって 2 回以上洗浄した。種々

50

の被験用タンパク質溶液を以下に示す通り、ペレットに加えた。

管A 水中、5 mg / mL のアルブミン溶液 (4 mL)。

管B 4 M NaCl 中、20 mg / mL のアルブミン溶液 (4 mL)。

管C 水中、20 mg / mL のゼラチン (4 mL)。

管D 水中、20 mg / mL のカゼイン加水分解物 (4 mL)。

管E 水中、40 mg / mL のゼラチン加水分解物 (4 mL)。

管F タンパク質混合物 (5 mg / mL のアルブミン溶液 (1 mL)、20 mg / mL のゼラチン (1 mL)、20 mg / mL のカゼイン加水分解物 (1 mL) および 40 mg / mL のゼラチン加水分解物 (1 mL)) (4 mL)。

#### 【0067】

混合し、管を静かに回転させて混和しながら、4 で1時間、インキュベートした。次いで、管を上記の通り遠心分離して樹脂ペレットを集めた。上清を吸引することによってとり出し、そしてペレットを上記の通り、1回の洗浄につき水 (9 mL) で3回洗浄した。最終的な洗液の上清の吸引後に、各々に水 (1.2 mL) を加えることによって、ペレットを各々50%懸濁液とした (各管当たりの総容量は2.4 mL)。混合した後に、その後の分析のために、0.2 mL を各々からとり出した。

#### 【0068】

次いで、0.1 M EDAC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸; シグマ製品番号E1769) 中での架橋を行なって、吸収されるブロック用タンパク質を樹脂上にロックした。各樹脂管のpHを、小滴の0.1 M HCl を用いてpH約5.4 ~ 5.7に調節した。懸濁した樹脂 (管当たり2.2 mL) の各管に、EDACの新しいストック水溶液 (0.47 mg /  $\mu$ L の89.8  $\mu$ L) を加えた。静かに回転式混合しながら、管を室温で混合し、インキュベートした。反応の最初の2時間中30分毎に、pHを約5.0 ~ 5.7に再調節した。次いで、反応を終夜 (約16 ~ 18時間) 続けた。反応を停止させるために、管を室温で5分間遠心分離 (2500  $\times$  g) した。懸濁液を吸引した後に、ペレットを上記の通り、1回の洗浄につき水 (8 mL) で洗浄した。最終的な洗液の上清の吸引後に、各々に20%エタノール含有のトリス緩衝生理食塩水 (1 mL) を加えることによって、ペレットを50%スラリーとして懸濁し、そしてスラリーを保存のために4ECに置いた。各50%樹脂懸濁液 (50  $\mu$ L のパックスゲル) (100  $\mu$ L) を、以下の擬似免疫沈降プロトコールに記載する通り、哺乳動物組織培養細胞ライセートと結合した非特異的なバックグラウンドタンパク質の量について直接に調べた。

#### 【0069】

##### 擬似免疫沈降プロトコール

1. マイクロチューブ (1.5 mL) 中でアガロースビーズ混合物を調製して、非-着色アガロースとの10%染色アガロース混合物の管当たり50  $\mu$ L のパックスゲルを得る。染色アガロースの50%スラリー (10  $\mu$ L) を非-着色アガロースの50%スラリー (90  $\mu$ L) 中に加え、渦巻き、そして氷上にセットする。

2. アガロースビーズをRIPA溶解緩衝液 (50 mM トリスHCl、pH 8.0、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% DOC、0.1% SDS) 中で洗浄し / 平衡とする: 各管にRIPA緩衝液 (750  $\mu$ L) を加え、渦巻き、そして微量遠心機中で30秒間遠心分離 (8,000  $\times$  g) する。上清を注意深く吸引し (または、マイクロピペットを用いて取り出す)、そしてビーズペレットを有する管を氷上にセットする。上記の通り、洗浄を繰り返す。最終的なペレットを氷上にセットする。

3. 細胞ライセート (100 mm組織培養プレート由来の新しい集密の組織培養セルラインのRIPAライセート (1 mL)) を解凍し、そして氷上にセットする。存在するならば、変性DNA凝集物をピペットを用いて除く。各ライセートをマイクロチューブに移し、低温室 (4 ) 内の微量遠心機中で10分間遠心分離 (8,000  $\times$  g) して、細胞デブリおよび不溶性の変性タンパク質をペレットする。透明な上清をとり出しそして氷上の管中で合わせる。

4. 合わせたライセートを混合し、そして1 mL を各々の洗浄したアガロースビーズ管に

10

20

30

40

50

氷上で加える。簡単に渦巻き、低温室内に置いてインキュベートし、回転ホイール(wheeling)を用いてゆっくりと1時間混合する。

5.微量遠心機中で30秒間遠心分離(8,000×g)する。氷上にセットする。上清を注意深く吸引し(または、マイクロピペットを用いてとり出す)、そしてビーズペレットを有する管を氷上にセットする。

6.各管にRIPA(750μL)を加えることによって、ビーズペレットを洗浄する。簡単に渦巻き、低温室内に置き、インキュベートし、回転ホイールを用いてゆっくりと5分間混合する。低温室(4℃)内の微量遠心機中で30秒間遠心分離(8,000×g)する。上清を注意深く吸引し(または、マイクロピペットを用いてとり出す)、そしてビーズペレットを有する管を氷上にセットする。

10

7.工程6と同様に、2回以上洗浄を繰り返す。

8.各管にRIPA緩衝液(25μL)を加え、簡単に渦巻き、次いで2×層状(Laemmli)タンパク質ゲル試料緩衝液(25μL)を加える。簡単に渦巻き。直ぐに使用しない場合には、保存のために試料を凍結する。

9.試料を5分間沸騰させ、微量遠心管中で30秒間遠心分離(8,000×g)して、アガロースをペレットする。各上清および分子量標準物質の10μLを変性SDS/PAGEゲル上で実験する。

10.コロイドのブルーおよび/またはシルバー染料を用いて染色して、タンパク質バンドを可視化する。考証および/または定量化のために写真撮影または走査型撮影を行なう。

20

【0070】

結果：

チューブA樹脂(アルブミンでブロック)の場合には、アルブミンはリアクティブ・レッド120アガロース樹脂と結合したり、架橋した；非特異的なライセートタンパク質との結合は70～80%だけ減少した。

【0071】

管B樹脂(4M NaCl中のアルブミンでブロック)の場合には、アルブミンはリアクティブ・レッド120樹脂と結合しなかった；非特異的なライセートタンパク質との結合は、減少しなかった。

【0072】

管C樹脂(ゼラチンでブロック)の場合には、ゼラチンはリアクティブ・レッド120アガロース樹脂と十分に結合したり、十分に架橋した；非特異的なライセートタンパク質との結合は、90～98%だけ減少した。

30

【0073】

管D樹脂(カゼイン加水分解物でブロック)の場合には、カゼイン加水分解物はリアクティブ・レッド120アガロース樹脂と結合しなかった；非特異的なライセートタンパク質との結合は、減少しなかった。

【0074】

管E樹脂(ゼラチン加水分解物でブロック)の場合には、ゼラチン加水分解物はリアクティブ・レッド120アガロース樹脂と結合しなかった；非特異的なライセートタンパク質との結合は、減少しなかった。

40

【0075】

管F樹脂(アルブミン、ゼラチン、カゼイン加水分解物、ゼラチン加水分解物の混合物でブロック)の場合には、混合物はリアクティブ・レッド120アガロース樹脂と一部結合したり、架橋した；非特異的なライセートタンパク質との結合は、80～90%だけ減少した。

【0076】

管C樹脂(ブロックされたゼラチン)について使用する条件は、本方法を用いた非特異的なライセートタンパク質との結合を減少させるための最適な性能を与え、そして免疫沈降法および他の分子プルダウン法において十分に実施することができると合理的に想定するこ

50

とができる。

【0077】

### 実施例 3

種々の染料とのアガロース樹脂接合体の非特異的なタンパク質との結合

タンパク質との結合能力について、親和性クロマトグラフィー樹脂を得るのに潜在的に有用である染料をスクリーニングした学術的な文献を参照して、いくつかの染料を選択した。染料の多数が、タンパク質と結合する能力が乏しいために、その利用に不適當であることが分かった。これらの染料のいくつかとのアガロース樹脂接合体を調製し、そして非特異的なタンパク質との結合についてそれらを調べた。

【0078】

プロシオン・レッド(Procion Red)MX - B 5 (アルドリッチ社製品番号404365)およびレマゾール・ブリリアント・オレンジ(Remazol Brilliant Orange)3 R (アルドリッチ社製品番号306509)は、ライセートタンパク質との乏しい結合(Scopes, R. K., J. Chromatogr. A, 766, 49-60, 1997)が報告されている染料の1つである。これらの染料を用いたアガロースの染色を、Hasnaoui, M.らによるJ. Chromatogr. A, 766, 49-60, 1997における染料固定化方法によって実施した。

【0079】

各々の固定化反応のために、セファロースCL - 4 Bアガロース(1 mLのパックドゲル)の50%スラリー(2 mL)を、卓上用遠心機中、室温で5分間遠心分離(2500 x g)し、そして上清を吸引することによってとり出した。アガロース樹脂ペレットを、各々3回水洗(10 mL)した。各々の洗浄のために、水を加えた後に、管を混合し、上記の通り2.5分間遠心分離し、そして上清を吸引によって注意深くとり出した。

【0080】

洗浄したアガロース樹脂ペレットを、固定化溶液(2% NaClを含有する200 mM NaOH)(10 mL)中で3回洗浄することによって平衡とした。各々の洗浄のために、固定化溶液を加えた後に管を混合し、上記の通り2.5分間遠心分離し、そして上清を吸引によって注意深くとり出した。

【0081】

プロシオン・レッドMX - B 5またはレマゾール・ブリリアント・オレンジ3 R染料(21 mg)の固定化溶液(2 mL)を、平衡としたアガロースペレットに加え、混合し、そして静かな回転によって絶えず混合しながら60 分の湯浴中で1時間インキュベートした。

【0082】

反応を停止させ、洗液の上清が完全に透明で無色になるまで、1回の洗浄につき水(10 mL)で連続して洗浄することによって、非結合染料を除去した。最終的な洗液の上清をとり出した後に、着色アガロースペレットを20%エタノール含有のトリス緩衝生理食塩水(1 mL)中に懸濁させて50%スラリーを得て、このものを使用するまで4 日で保存した。

【0083】

実施例2の擬似免疫沈降プロトコールに記載する通り、哺乳動物組織培養細胞ライセートと結合した非特異的なバックグラウンドタンパク質の量について、各50%樹脂懸濁液(50 µLのパックドゲル)(100 µL)を直接に調べるか、または10%で非-着色アガロースと混合したものを調べた。

【0084】

結果：

100%プロシオン・レッドMX - 5 Bアガロースは、非特異的なバックグラウンドタンパク質との結合がコントロールのリアクティブ・レッド120アガロースと比較して70~80%だけ減少し、そしてゼラチンでブロックされ且つEDACを用いて架橋されたりリアクティブ・レッド120アガロース(実施例2を参照)の場合に匹敵することを示した。

100%レマゾール・ブリリアント・オレンジ3 Rアガロースは、非特異的なバックグラ

10

20

30

40

50

ウンドタンパク質との結合がコントロールのリアクティブ・レッド120アガロースと比較して>95%だけ減少することを示した。アガロース中の10%混合物として使用する場合には、レマゾール・ブリリアント・オレンジ3Rアガロースはなお全く可視であるが、非特異的なバックグラウンドタンパク質との結合においては有意な差異は全く示さず、そして非-着色アガロースのみ(100%セファロースCL4B)の場合に匹敵した。

#### 【0085】

上記の方法は、本発明に必要とされる所望の視感度、遠心分離および非常に低いタンパク質結合能力の性質を有する可視アガロース樹脂を製造することができたことを示した。

#### 【0086】

#### 実施例4

炭酸塩を用いる反応性染料とアガロースとのカップリング反応

染料とアガロースとのカップリング反応の別方法は、炭酸塩中でカップリング反応を実施することを含む。各カップリング反応について、セファロースCL-4Bアガロース(1.75mLのバックドゲル)の50%スラリー(3.5mL)を管に分配し、そしてこれらを卓上用遠心機中、室温で5分間遠心分離(2500xg)した。各上清を吸引によってとり出した。アガロース樹脂ペレットを各々、実施例2に記載する通り、3回水洗(10mL)し、そして最終的な洗液の上清を吸引によってとり出した。アガロース樹脂ペレットを各々、0.4M炭酸ナトリウム(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)の0.5バックドゲル容量(0.85mL)中に懸濁した。

#### 【0087】

プロシオン・レッドMX-B5(アルドリッチ社製品番号404365)およびレマゾール・ブリリアント・オレンジ3R(アルドリッチ社製品番号306509)を各々、20mg/mLバックドゲルで秤量(各々35mg)し、そして各々を0.68M NaClの0.5バックドゲル容量(0.85mL)に溶解した。各カップリング反応について、各々の染料/塩溶液(0.85mL)を、上記由来のアガロース/炭酸塩のスラリー(0.85mL)を含有する管に加えた。各カップリング反応管を、十分に且つ絶えず混合するために静かに振り混ぜながら、湯浴中、60℃でインキュベートした。

#### 【0088】

各反応を停止させ、そして非結合染料を遠心分離によって除去し、吸引し、そしてアガロースペレットを上記の通り、洗液の上清が完全に透明で且つ無色になるまで、1回の洗浄につき水(10mL)でアガロースペレットを連続して洗浄した。最終的な洗液の上清をとり出し、着色アガロースペレットを20%エタノール含有のトリス緩衝生理食塩水(1mL)中に懸濁して50%スラリーを得て、そしてこのものを使用するまで4℃で保存した。

#### 【0089】

実施例2の擬似免疫沈降プロトコールに記載する通り、哺乳動物組織培養細胞ライセートと結合した非特異的なバックグラウンドタンパク質の量について、各50%樹脂懸濁液(50μLのバックドゲル)(100μL)を直接に調べるか、または10%で非-着色アガロースと混合したものを調べた。

#### 【0090】

結果：

結果は、実施例3の結果と非常に類似した。100%プロシオン・レッドMX-5Bアガロースは、非特異的なバックグラウンドタンパク質との結合がコントロールのリアクティブ・レッド120アガロースと比較して70~80%だけ減少し、そしてゼラチンでブロックされ且つEDACを用いて架橋されたリアクティブ・レッド120アガロースの場合に匹敵することを示した(実施例2を参照)。100%レマゾールブリリアントオレンジ3Rアガロースは、非特異的なバックグラウンドタンパク質との結合がコントロールのリアクティブ・レッド120アガロースの場合と比較して>95%だけ減少することを示した。アガロース中の10%混合物として使用する場合には、レマゾール・ブリリアント・オレンジ3Rアガロースはなお全く可視であるが、非特異的なバックグラウンドタンパク質

10

20

30

40

50

との結合は全く検出し得ないことを示し、そして非 - 着色アガロースのみ(100%セファロースCL-4B)の場合に匹敵した。

【0091】

本方法により、アルカリ溶液を必要とせずに、本発明に要求する所望する視感度、遠心分離および非常に低いタンパク質結合能力の性質を有する可視アガロース樹脂の製造が可能となる。

【0092】

実施例 5

免疫沈降法における着色した親和性マトリックスの使用

レマゾール・プリリアント・レッドBBを、実施例4に記載する方法を用いてアガロース(セファロースCL-4B)とカップリングさせた。得られた着色樹脂であるプリリアント・レッドBBアガロースについて、実施例2の擬似免疫沈降プロトコールに記載する通り、哺乳動物組織細胞ライセートと結合した非特異的なバックグラウンドタンパク質の量を調べた。100%レマゾール・プリリアント・レッドBBアガロースは、非特異的なバックグラウンドタンパク質がコントロールのリアクティブ・レッド120アガロースと比較して>95%だけ減少することを示した。アガロース中の10%混合物として使用する場合には、レマゾール・プリリアント・レッドBBアガロースはなお全く可視であるが、非特異的なバックグラウンドタンパク質との有意な結合は全く示さず、そして非 - 着色アガロースのみ(100%セファロースCL-4B)の場合に匹敵した。

【0093】

レマゾール・プリリアント・レッドBBアガロースの可視化としての性能は、親和性ベースの分子プルダウン法を以下の免疫沈降実験において評価するのを助ける。実験は、哺乳動物細胞のライセート中にスパイクした組換え融合タンパク質の免疫沈降について、標準的な非 - 着色プロテインAアガロース(レッド・プロテインAアガロース)中の10%レマゾール・プリリアント・レッドBBアガロースを、100%標準非 - 着色プロテインAアガロース(シグマ社製品番号P3391;非 - 着色プロテインAアガロース)と比較した。

【0094】

COS7組織培養細胞を100mm組織培養プレート中で集密まで増殖し、氷冷リン酸緩衝生理食塩水(10mL)を用いて簡単に2回洗浄した。第2の洗浄溶液をプレートから吸引した後に、氷冷のRIPA溶解緩衝液(1mL)を各プレートに加え、細胞を溶解し、細胞スクレーパー(scraper)を用いて収集した。ライセートを各プレートからとり出し、そして氷上で貯蔵した。試料(1mL)を管に分配し、素早く凍結しそして保存のために-70に置いた。

【0095】

レッド・プロテインAアガロースまたは非 - 着色プロテインAアガロースの50%スラリーのアリコート(100 $\mu$ L)を、マイクロチューブ(1.5mL)に分配し、そして1回の洗浄につきRIPA溶解緩衝液(750 $\mu$ L)で4回洗浄した。最終的な洗液の上清をとり出した後に、洗浄したアガロース樹脂ペレットを有する管を氷上にセットした。

【0096】

凍結ライセートを解凍し、このものを実験の直前に氷上にセットした。変性DNA(粘性(slimy)凝集物の形態)を、ピペットを用いて各ライセート試料(1mL)から手動でとり出した。哺乳動物プロテアーゼインヒビターカクテル(シグマ社製品番号P8320)(100 $\mu$ L)を各々に加え、そして試料を渦巻くことによって簡単に混合した。細胞デブリおよび変性タンパク質沈降物を、マイクロチューブ中、4で10分間遠心分離(8,000 $\times$ g)することによって除去した。透明な上清を注意深くとり出し、そして免疫沈降のために清潔な管に移した。

【0097】

清澄したライセートの管の半分について、N - 末端FLAG-BAP(細菌アルカリ性ホスファターゼ)精製の組換え融合タンパク質(シグマ社製品番号P7582)(5.4 $\mu$ g/ $\mu$ L)(1.2 $\mu$ L)を各々に加え、静かに混合しそして氷上にセットした。抗BAPマウスモノク

10

20

30

40

50

ローナル抗体 B A P - 7 7 ( 2 . 6 m g / m L ; シグマ社製品番号 B6804 ) ( 3 . 8 5 μ L ) を清澄したライセートの各管に加え、そして静かに混合した。抗体 - 抗原複合体を生成することができるように、管を 4 で 1 時間回転によって混合した。管を 5 秒間遠心分離し、そして各々の全内容物をピペットを用いて氷上の洗浄したアガロース樹脂ペレットの別個の管に移し、そして簡単に混合した。抗体 - 抗原複合体をプロテイン A アガロースと結合することができるように、管を 4 で 1 時間回転によって混合した。 .

【 0 0 9 8 】

インキュベート後に、アガロース樹脂をマイクロチューブ中、4 で 3 0 秒間遠心分離 ( 8 0 0 0 × g ) することによって集め、そして上清を吸引によってとり出した。各ペレットを 1 回の洗浄につき氷冷 R I P A 緩衝液 ( 7 5 0 μ L ) を用いて 4 回洗浄した。各洗浄について、ペレットを 4 で 5 分間回転することによって混合し、上記の通り遠心分離し、そして上清を吸引した。最終的な洗液の上清をとり出した後に、R I P A 緩衝液 ( 2 5 μ L ) を各々に加え、そして簡単に混合した。次いで、2 × 層状タンパク質ゲル試料緩衝液 ( シグマ社製品番号 S3401 ) ( 2 5 μ L ) を各々に加え、混合し、そして得られた試料を 5 分間沸騰させてアガロース樹脂からタンパク質を遊離させた。

10

【 0 0 9 9 】

試料を簡単に遠心分離してアガロース樹脂をペレットし、そして各上清の 1 0 μ L について S D S / P A G E 変性ゲル電気泳動を行ない、そしてウェスタン免疫プロット法によって分析した。ウェスタンプロット法は、アルカリ性ホスファターゼと接合した抗 F L A G M 2 モノクローナル抗体をプローブとし、続いて標準的な N B T / B C I P 比色検出を

20

【 0 1 0 0 】

結果 :

レッド・プロテイン A アガロースペレットは周囲光で非常に可視であり、一方で非 - 着色プロテイン A アガロースペレットは見るのが困難であった。レッド・プロテイン A アガロースの高い視感度は、全ての操作を容易にし、そして吸引間、ペレットの偶発的な除去によって間違いが生じる傾向が少ない。レッド・プロテイン A アガロース A 免疫沈降物は、非 - 着色プロテイン A アガロース免疫沈降物の場合と同程度に、N - F L A G - B A P タンパク質についてのイムノプロット上のシグナル強度を示し、非特異的なバックグラウンドの検出可能な増大は全くなかった。従って、本発明は、標準的な方法と等価な性能を供する一方で、親和性ベースの分子プルダウン法、免疫沈降法を著しく容易にするものである。

30

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
8 August 2002 (08.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/061406 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 21/64, 21/76, 33/53, 33/543, C12N 11/18
- (21) International Application Number: PCT/US02/03109
- (22) International Filing Date: 31 January 2002 (31.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/265,952 1 February 2001 (01.02.2001) US  
60/267,460 8 February 2001 (08.02.2001) US
- (71) Applicant: SIGMA-ALDRICH CO. [US/US], 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (US).
- (72) Inventors: WATSON, Edward, B., III; c/o Sigma-Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (US). HEUERMAN, Kenneth, E.; c/o Sigma-Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (US). DAPRON, John, G.; c/o Sigma-Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (US).
- (74) Agents: CHICKOS, Sarah, J. et al.; Senniger, Powers, Leavitt & Roedel, One Metropolitan Square, 16th Floor, St. Louis, MO 63102 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BI, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/061406 A1

(54) Title: IMPROVED AFFINITY MATRICES WITH ENHANCED VISIBILITY FOR MOLECULAR PULL-DOWN AND IMMUNOPRECIPITATION APPLICATIONS

(57) Abstract: An affinity matrix for use in affinity based molecular pull down and immunoprecipitation procedures. The affinity matrix comprises a polymeric support, a dye attached to a fraction of the polymeric support to enable optical detection of the polymeric support, and an affinity ligand other than the dye attached to a fraction of the polymeric support for the capture of a molecule. Also provided is a method for the isolation of a biomolecule from an aqueous solution. The method comprises combining the aqueous solution with an affinity matrix comprising a polymeric support and separating the affinity matrix from the aqueous solution. A dye is attached to a fraction of the polymeric support which enables optical detection and monitoring of the affinity matrix and, accordingly, reduces the likelihood of the loss of affinity matrix during the separation step. In addition, an affinity ligand other than the dye is also attached to a fraction of the polymeric support for the capture of the biomolecule.

**IMPROVED AFFINITY MATRICES WITH ENHANCED  
VISIBILITY FOR MOLECULAR PULL-DOWN AND  
IMMUNOPRECIPITATION APPLICATIONS**

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

5 Affinity based molecular pull-down (immunoaffinity capture) and immunoprecipitation experiments are powerful and widely used methods to study the expression, modification and interaction of proteins in a wide variety of biological systems. Affinity based molecular pull-down and immunoprecipitation experiments have resulted in the rapid purification of epitope-tagged recombinant  
10 proteins, the discovery and characterization of reversible post-translational protein modifications, and a variety of other observations, which have increased the understanding of biological processes at the molecular level.

The underlying strategy behind the affinity based molecular pull-down technique is to use the affinity of biomolecules as a method to select target  
15 molecules from a solution. An affinity ligand, such as an antibody, is affixed to a particulate matrix, such as agarose, and the resulting conjugate is used to locate and bind its target, such as a particular antigen, from a biological or biochemical preparation.

Immunoprecipitation is a type of affinity based molecular pull down  
20 experiment. Affinity based molecular pull down experiments purify complexes using any affinity ligand that is directly conjugated to a polymeric support having a specific affinity for particular biomolecular targets. However, the general procedures of an affinity based molecular pull down experiment can be illustrated by the procedures involved in an immunoprecipitation experiment. The basic  
25 procedure of immunoprecipitation involves three stages. The first stage is preparation of the antigen solution. The second stage is preclearing the lysate of nonspecific background, and the third stage is forming and purifying the immune complexes. Once purified, any of a number of methods can be employed to analyze the antigens. The variety of procedures that can be used in affinity based  
30 molecular pull down and immunoprecipitation techniques specifically are described in detail in Harlow, E. and Lane, D. (eds.), "Antibodies: a Laboratory Manual", Chapter 7, Cold Spring Harbor Press, NY (1988), the entirety of which is herein incorporated by reference.

Immunoprecipitation is usually performed on a lysate prepared from cells or  
35 tissue, although any aqueous solution can be used as a solution for performing an

WO 02/061406

PCT/US02/03109

2

immunoprecipitation. Usually the lysate is prepared from the treatment of cells or tissue with some type of mild detergent. The mild detergent is effective in removing membranes, interfering with many weak intermolecular interactions and releasing most antigens from the cell, without disrupting the conformation or biochemical activity of the antigens of interest. Interferences from nonspecific binding proteins are minimized by pretreating the antigen solution with an antibody that does not bind the antigen of interest to remove the nonspecific binding proteins.

The immune complexes are formed by the addition of specific antibodies to the lysate. Antibodies have high affinity for their respective antigens so the antibody-antigen complexes form rapidly. The complexes are then purified by adding an affinity bead suspension, such as a protein A or protein G bead suspension, to the solution containing the antibody-antigen complexes. The purification occurs because protein A and protein G have a high affinity for the Fc portion of the antibody. After the complex is bound to the bead through the protein A/G-antibody interaction, the beads are collected by centrifugation and the unbound proteins are removed by washing the beads. The beads can be washed by rinsing with a solution such as lysis buffer and removing the lysate and wash buffer by aspiration. Complete removal of the wash buffer is important to lower the background and improve the effectiveness of the immunoassay. After completion of the formation and purification of the immune complexes, the resulting immunoprecipitated proteins can be further analyzed. Frequently, this next step is the separation of proteins by SDS-PAGE.

A major disadvantage of affinity based molecular pull down and immunoprecipitation procedures as commonly practiced is that the affinity matrix is difficult to visualize in the tubes used in the complex formation and purification steps. This difficulty in visualization leads to inefficient manipulations and results in loss of material and quantitative variability of results. For example, agarose or polyacrylamide beads generally are non-colored, i.e., translucent or white, and are difficult to visualize in the tubes, which makes procedural manipulations tedious. Due to this poor visibility, the beads can be lost during the aspiration of the lysate supernatant in the process of removal of the unbound proteins. Additionally, there can be accidental removal of the agarose or polyacrylamide beads from the tubes during the washing and aspiration steps due to the poor visibility of the beads. The difficulties and inaccuracies caused by the poor visibility of the beads are major limitations of the affinity based molecular pull down and

immunoprecipitation experiments. Thus, a substantial need remains for an adaptation that would improve the visibility of the affinity matrix without altering its functioning in the molecular pull down or immunoprecipitation procedure. Such an adaptation would make the handling of the affinity matrix much easier for the individual conducting the molecular pull down or immunoprecipitation procedure. Improved handling would result in improved efficiency in manipulations and reduce the loss of material and quantitative variability of results. In short, such an adaptation would improve the efficiency and reliability of affinity based molecular pull down and immunoprecipitation procedures.

The affinity of certain dyes for proteins has been known and utilized for some time in various applications. Dyes have long been utilized as affinity ligands for the purification of proteins in affinity chromatography. Affinity chromatography is a procedure which separates a substance from a mixture by virtue of the biospecific recognition and affinity (involving noncovalent interactions) of that substance for a ligand immobilized to a support. The dyes that have been employed to purify proteins were originally developed for use in the textile industry. These dyes include triazine dyes that are based on the chemistry of cyanuric chloride (1,3,5-trichlorotriazine). Triazine dyes have been used as ligands for affinity chromatography because they offer advantages in both preparation and use over more conventional immobilized coenzyme and various other biological group-specific media. These advantages include a protein binding capacity that can be significantly higher than that of natural biospecific media, low cost, general availability and ease of preparation. See, for example, Christopher R. Lowe and James C. Pearson, *Affinity Chromatography on Immobilized Dyes*, Methods In Enzymology, Vol. 104, 97-113 (1984).

U.S. Patent 5,597,485 discloses a process for separating proteins using a polymeric composition that includes a polymer formed from at least one monomer containing a polymerizable moiety chemically bonded to a synthetic anionic organic dye. The dye has an affinity for the protein to be separated. The process for separating proteins includes retaining the protein on the dye fraction and then recovering the protein from the polymer. The process is applicable to affinity chromatography but is not limited to chromatographic columns. The process includes contacting the polymer with the solution containing the protein to be separated and separating the colored particles from the solution by means of filtration, centrifugation, or similar means. The process, however, deliberately

utilizes dyes possessing a specific affinity for the protein to be separated, and the protein is isolated and purified by binding specifically to this dye.

U.S. Patent 4,546,161 discloses a process of producing affinity chromatography media by reacting mono or di-chloro triazine dyes with a solid support matrix possessing free hydroxy or amino groups. The solid support matrix is a polymer or copolymer of agarose, dextrose, dextran or acrylamide. The dyes are reacted in the presence of an alkali metal hydroxide and an alkali metal salt. The dyes are linked to the solid support matrix via the triazine ring, providing high and specific protein-binding capacity. The media are designed specifically for use in affinity chromatography for the efficient and highly specific isolation and purification of proteins using triazine dyes selected to specifically bind the proteins of interest.

Similarly, U.S. Patent 4,880,915 discloses a process for purifying a specific protein, human TNF, comprising applying a solution containing human TNF to a column packed with a dye-bonded crosslinked agarose gel, eluting the column to release the bound human TNF, and recovering a column fraction of purified human TNF. The crosslinked agarose gel comprises a crosslinked agarose gel support to which a dye ligand is covalently bonded. The dye ligand is either Cibacron Blue F3GA, Procion Red HE3B or Green A and the human TNF is retained by specifically interacting with the dye ligand. Dyes have also been employed for their ability to enhance the visibility of a substance in the specific application of nucleic acid precipitation. WO 97/12994 discloses a method for precipitating soluble nucleic acid from a solution by adding a polymeric carrier molecule that is coupled to an indicator molecule. The technique of nucleic acid precipitation is often prone to unpredictable failure due to loss of precipitated nucleic acid pellets during the removal of supernatant phases, due to the lack of visibility of the nucleic acid pellets. The nucleic acids are precipitated by adding a sufficient amount of salt and alcohol to the aqueous solution to cause the nucleic acids to precipitate out of solution. Alcohol and salt are common ingredients for the technique of nucleic acid precipitation, and ethanol is the alcohol most commonly used in the procedure.

The modified carrier molecule disclosed in WO 97/12994 has the same solubility and precipitation properties as the unmodified molecule and co-precipitates with the nucleic acid, but is readily visualized and enables the user to observe the location of nucleic acid in the treated sample. The solubility and precipitation properties of both the unmodified and modified molecule are specific

to the precipitation and centrifugation techniques generally employed in nucleic acid precipitation. Specifically, nucleic acids are soluble in more aqueous solutions and aggregate when the dielectric constant of the aqueous solutions is lowered, such as by adding alcohol to the aqueous solution. The aggregation causes the nucleic acids to collectively possess sufficient mass to precipitate out of the aqueous solution. The precipitate has to be separated from the aqueous solution by subjecting the solution to high speed centrifugation of around 5000 g for a period of time of around five minutes. Thus, the modified carrier molecule would not be employable in alternative experiments, and there is no suggestion in WO 97/12994 that the modified carrier molecule would be applicable to alternative techniques. Rather, the method and carrier molecule are limited specifically to nucleic acid precipitation techniques.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

Among the objects of the invention is the provision of an affinity matrix, having relatively low non-specific protein binding capability that can be more readily monitored during an affinity based molecular pull down experiments to avoid the inadvertent loss of affinity matrix during the separation and thereby improve quantitative recovery of affinity complexes.

Briefly, therefore, the present invention is directed to an affinity matrix for the isolation of a molecule from an aqueous solution. The affinity matrix comprises a polymeric support, a dye attached to a fraction of the polymeric support to enable optical detection of the polymeric support, and an affinity ligand other than the dye attached to a fraction of the polymeric support for the capture of a molecule.

The present invention is further directed to a method for the isolation of a biomolecule from an aqueous solution. The method comprises combining the aqueous solution with an affinity matrix comprising a polymeric support and separating the affinity matrix from the aqueous solution. A dye is attached to a fraction of the polymeric support which enables optical detection and monitoring of the affinity matrix and, accordingly, reduces the likelihood of the loss of affinity matrix during the separation step. In addition, an affinity ligand other than the dye is also attached to a fraction of the polymeric support for the capture of the biomolecule.

Other objects will be in part apparent and in part pointed out hereinafter.

**DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

As used herein "colored polymer" or "colored polymeric support" refers to polymeric materials to which dyes have been attached. These dyes are preferably dyes which are inherently low protein binding dyes or are which have been modified to be low protein binding. "Non-colored polymer" or "non-colored polymeric support" refers to polymeric supports, such as cross-linked agarose, to which dyes have not been attached. "Colored polymer" or "colored polymeric support" refers to a polymeric support to which a dye has been attached. A "colored affinity matrix" is an affinity matrix which contains a colored polymeric support.

In one embodiment, the affinity matrix of the present invention comprises a particulate polymeric material to which dye and an affinity ligand for a biomolecule or other molecule of interest are attached. In general, the affinity matrix may comprise (i) particulate polymeric material to which dye but not affinity ligand is attached, (ii) particulate polymeric material to which affinity ligand but not dye is attached, or (iii) particulate material to which both dye and affinity ligand are attached, provided a dye is attached to a fraction of the particulate material and affinity ligand is attached to a fraction of the particulate material. Thus, for example, the affinity matrix may comprise (i) a mixture of particulate materials wherein some of the particles in the mixture contain dye and other particles contain affinity ligand but none of the particles contain both dye and affinity ligand, (ii) a mixture of particulate materials wherein some of the particles in the mixture contain both dye and affinity ligand and other particles contain dye or affinity ligand but not both, or (iii) a substantially homogenous particulate material wherein substantially all of the particles contain both dye and affinity ligand (in this embodiment, the fraction of the affinity matrix particulate material to which dye is attached is 1 and the fraction of the affinity matrix particulate material to which affinity ligand is attached is also 1).

Preferably, the dye and affinity ligands are attached to separate fractions of the particulate polymeric material. For example, the dye may be attached from about 1% to about 50% by weight of the particulate polymeric material comprising the affinity matrix and the affinity ligand is attached to the balance of the particulate polymeric material defining the affinity matrix, i.e., about 50% to about 99% by weight of the particulate polymeric material comprising the affinity matrix. More preferably, the dye is bound to about 1% to about 15% by weight of the particulate polymeric material comprising the affinity matrix and the affinity ligand

is attached to the remainder of the balance of the particulate polymeric material comprising the affinity matrix, i.e. about 85% to about 99% by weight of the particulate polymeric material comprising the affinity matrix. Still more preferably, the dye is bound to about 2% to about 10% by weight of the particulate polymeric material comprising the affinity matrix and the affinity ligand is attached to the remainder of the balance of the particulate polymeric material comprising the affinity matrix, i.e. about 90% to about 98% by weight of the particulate polymeric material comprising the affinity matrix. In general, the relative proportions of the two fractions depends upon the color intensity (determined optically or visually) of the dye and its capacity when bound to the particulate material for non-specific protein binding; for example, dyes which provide the particulate material to which they are bound with a greater capacity for non-specific protein binding are preferably used in lower proportion than are dyes which provide the particulate material to which they are bound with lesser capacity for non-specific protein binding.

The dyes employed in the invention are preferably dyes that have a relatively low protein binding capability when attached to a polymeric support. In general, these dyes are covalently coupled to a polymeric support; accordingly, the dyes preferably either possess a reactive group or are capable of being modified to provide a reactive group to enable covalent coupling to a polymeric support. Examples of reactive groups include, but are not limited to mono- and dichloro triazines, vinyl sulfone groups, monochloro difluoro pyrimidinium,  $\beta$ -sulphatoethylsulfone, and isothiocyanate. Azo, anthroquinone and phthalocyanine are the three main types of chromophores that predominate in the ranges of reactive dyes. The dyes employed in the invention can provide the polymeric support with any color, provided that when the dye is attached to the polymer an affinity matrix comprising polymeric support to which the dye has been attached is optically detectable and preferably readily visible to the naked eye in ambient light.

Suitable dyes also include those dyes that go beyond the scope of colorimetric dyes that are visible by the naked eye such as fluorescent dyes that require excitation by an appropriate wavelength of light for visualization. The fluorescent dyes provide for a much higher sensitivity to detection, which may be important when working with very small amounts of affinity matrix. An example would be a fluorescent affinity matrix used in a molecular pull-down experiment in preparation for mass spectrometry (MALDI) analysis. The affinity matrix sample

may be applied directly to the MALDI target slide at a few microliters per application. The presence of the affinity matrix sample on the MALDI target could be determined visually by fluorescence upon exposure to a suitable wavelength of light.

5           Fluorescent molecules emit photons from excited electronic states and are characterized by absorption/excitation and emission spectra. The fluorescent dyes may be short-lived or long-lived in fluorescent emission and are further characterized by Stokes shift, and quantum yield. Fluorescein isothiocyanate represents a commonly used reactive fluorescent marker that is short-lived in  
10           emission, possesses a relatively narrow Stokes shift, and has a relatively high quantum yield. Rhodamine is another commonly used fluorescent dye, which emits at a longer wavelength than fluorescein. Lanthanide metal chelates represent a class of fluorescent compounds which possess a relatively large Stokes shift and are long-lived in fluorescent emission. This important class of  
15           fluorescent molecules generally require another strongly absorbing molecule to transfer the light energy to induce the strong fluorescence. Examples of lanthanide metals are terbium and europium which are commonly chelated by a polydentate chelate. Other examples of fluorescent compounds include naphthalenes, pyrenes, coumarin derivatives, pyridyloxazole derivatives, and  
20           ruthenium complexes.

          In general, the dye attached to the polymeric support may be one (or more) which intrinsically has (have) a low protein binding capability or it may be one (or more) which has (have) been modified to have a low protein binding capability when attached to a polymeric support, or combinations thereof. Preferably, the  
25           affinity matrix comprises a dye which intrinsically has a low protein binding capability. In either event, the dye(s) selected preferably do not significantly increase non-specific protein binding by the affinity matrix; otherwise, the benefits of enhanced optical detection and monitoring of the affinity matrix is more than offset by non-specific protein binding during the molecular pull down or  
30           immunoprecipitation procedure. For example, the capacity of the affinity matrix, on a weight basis, for non-specific binding of protein present in a lysate of a naturally-occurring mammalian cell under physiological salt and pH conditions is less than 100 times the capacity of a reference matrix under the same conditions wherein the reference matrix is substantially identical to the affinity matrix except  
35           that the no dye is bound to any of the particulate material of the reference matrix. Preferably, the capacity of the affinity matrix, on a weight basis, for non-specific

binding of protein present in a lysate of a naturally-occurring mammalian cell under physiological salt and pH conditions is less than 50 times the capacity of the reference matrix under the same conditions. More preferably, the capacity of the affinity matrix, on a weight basis, for non-specific binding of protein present in a lysate of a naturally-occurring mammalian cell under physiological salt and pH conditions is less than 10 times the capacity of the reference matrix under the same conditions. Still more preferably, the capacity of the affinity matrix, on a weight basis, for non-specific binding of protein present in a lysate of a naturally-occurring mammalian cell under physiological salt and pH conditions is less than 5 times the capacity of a reference matrix under the same conditions.

Low protein binding dyes preferably are selected from dyes possessing azo chromophores, anthroquinone chromophores, and phthalocyanine chromophores. More preferably, representative dyes intrinsically possessing low protein binding capability when attached to a polymeric support may be selected from the Remazol family of dyes, dyes possessing a vinyl sulfone, the Procion family of dyes, dyes possessing a mono or dichloro triazine, and the Drimarene family of dyes, dyes possessing a monochloro difluoro pyrimidinium ring. Examples of suitable low protein binding dyes, include, but are not limited to 5-[[4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-yl)amino]-4-hydroxy-3-(phenylazo)-2,7-Naphthalenedisulfonic acid, disodium salt (Procion Red MX-5B); Procion Blue MX-R; Remazol Violet R-4B; Procion Red MX-BRA; 5-(acetilamino)-4-hydroxy-3-[[2-hydroxy-4-[[2-(sulfooxy)ethyl]sulfonyl]phenyl]azo]-2,7-Naphthalenedisulfonic acid, copper complex (Remazol Brilliant Violet 5R); Procion Red MX-GBA; Blue MX-4RD (Navy Blue 21); Blue MX-2G (Cobalt Blue 22); Dharma Fire Red 10; 6-(acetilamino)-4-hydroxy-3-[[3-[[2-(sulfooxy)ethyl]sulfonyl]phenyl]azo]-2-Naphthalenesulfonic acid, disodium salt (Remazol Brilliant Orange 3R, Reactive Orange 16); Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21); Procion Turquoise H-A; Remazol Brilliant Scarlet R-3G; Remazol Brilliant Orange R-FN; and Reactive Blue 21. Preferred low protein binding dyes for use in the invention include, but are not limited to, 6-(acetilamino)-4-hydroxy-3-[[3-[[2-(sulfooxy)ethyl]sulfonyl]phenyl]azo]-2-Naphthalenesulfonic acid, disodium salt (Remazol Brilliant Orange 3R, Reactive Orange 16), Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21), Procion Turquoise H-A, Remazol Brilliant Scarlet R-3G, Remazol Brilliant Orange R-FN, Remazol Violet R-4B, 5-(acetilamino)-4-hydroxy-3-[[2-hydroxy-4-[[2-(sulfooxy)ethyl]sulfonyl]phenyl]azo]-2,7-Naphthalenedisulfonic acid, copper complex (Remazol Brilliant Violet 5R), and Reactive Blue 21. More preferred low

- protein binding dyes include, but are not limited to 6-(acetylamino)-4-hydroxy-3-[[3-[[2-(sulfooxy)ethyl]sulfonyl]phenyl]azo]-2-Naphthalenesulfonic acid, disodium salt (Remazol Brilliant Orange 3R, Reactive Orange 16), Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21), Remazol Brilliant Scarlet R-3G, Remazol Brilliant Orange R-FN, and Reactive Blue 21. Still more preferred low protein binding dyes include, but are not limited to Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21) and 6-(acetylamino)-4-hydroxy-3-[[3-[[2-(sulfooxy)ethyl]sulfonyl]phenyl]azo]-2-Naphthalenesulfonic acid, disodium salt (Remazol Brilliant Orange 3R, Reactive Orange 16).
- Low protein binding may also be achieved by modifying a dye so that it has a low protein binding capability. These dyes may also be selected generally from dyes possessing Azo chromophores, anthraquinone chromophores, and phthalocyanine chromophores. Dyes may also be used that are not in the visible spectrum, such as fluorescent dyes and dyes that are visible in the UV spectrum or the IR spectrum. Preferably, the dyes may be selected from the Remazol family of dyes, dyes possessing a vinyl sulfone reactive group, the Procion family of dyes, dyes possessing a mono or dichloro triazine group, and the Drimarene family of dyes, dyes possessing a monochloro difluoro pyrimidinium ring. Examples of protein binding dyes include, but are not limited to Reactive Brown 10, and Reactive Red 120. The modifications that can make a dye low protein binding can include gelatin absorption and crosslinking. The gelatin absorption and cross-linking physically blocks the sites at which the protein binding dye binds protein. Therefore, less proteins are bound by the dye because the sites at which they bind to the protein are blocked by the gelatin. The gelatin acts to block the actual protein binding sites of the protein binding dye that is attached to the polymeric support and the cross-linking acts to lock the blocking gelatin onto the polymeric support. The gelatin absorption and cross-linking can be accomplished by saturating the colored polymeric support in a gelatin in water preparation and then cross-linking with an appropriate reagent, such as 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride. This procedure was employed to attach gelatin to a beaded agarose matrix with covalently attached Reactive Red 120. Appropriate modifications to this procedure and the selection of different procedures altogether could be made by one of ordinary skill in the art, who is familiar with modifications to block protein binding and the procedures with which they are accomplished.

The amount of dye that can be attached to the polymeric support can vary considerably, depending on the objectives of the particular affinity based molecular pull down or immunoprecipitation experiment. Upper limits of the amount of dye that can be attached to the polymeric support are those amounts that would alter or compromise the functioning of the polymeric support. Lower limits are set by the amount of dye that enable the polymeric support to be optically or visibly detected, for example, by visibility in ambient light. Other pertinent considerations in choosing the amount of dye to attach to the polymeric support include the capacity of the colored polymeric support to be further modified with affinity ligands. Evaluating these variables and choosing an appropriate amount of dye to attach to the polymeric support to meet the objectives of a particular molecular pull down or immunoprecipitation experiment is well within the skill of an ordinary practitioner in the art.

Generally, however, the amount of dye that can be attached to the polymeric support is between about 0.5 micromole of dye/cm<sup>3</sup> of polymeric support to about 20 micromoles of dye/cm<sup>3</sup> of polymeric support. Preferably, the amount of dye that is attached to the polymeric support is between about 1 micromole of dye/cm<sup>3</sup> of polymeric support to about 6 micromoles of dye/cm<sup>3</sup> of polymeric support. More preferably, the amount of dye that is attached to the polymeric support is between about 2 micromoles of dye/cm<sup>3</sup> of polymeric support to about 4 micromoles of dye/cm<sup>3</sup> of polymeric support.

The polymeric support is generally any polymer capable of being used as an affinity matrix in affinity based molecular pull down or immunoprecipitation experiments which includes an attachment site to enable the attachment of a dye. The polymer preferably exhibits low non-specific protein binding and high binding capacity for both the dye and any affinity ligands or protein binding ligands with which it may be modified. The polymers can be natural or synthetic. The natural or synthetic polymers may be cross-linked. Such polymers include but are not limited to natural agarose, cross-linked agarose, dextran, cross-linked dextran, xylan alginate, chitosan, beaded cellulose, polyacrylamide, polyacrylate, polystyrene, polymethacrylate, polycaprolactones, polyoxyethylenes, polyvinyl resins, agarose-polyacrylamide copolymers, and dextran-polyacrylamide copolymers. Combinations of these and other polymers are also included within the scope of the invention, provided that the combined polymers possess the desired characteristics of low non-specific protein binding and high binding capacity for both dyes and affinity ligands. Preferred polymers include those

frequently employed in affinity based molecular pull down and immunoprecipitation experiments. Thus, natural agarose, cross-linked agarose, polyacrylamide, and cross-linked dextran are the preferred polymers for use in the invention. Cross-linked agarose is the more preferred polymer for use in the invention. The polymeric support can take any form appropriate for the affinity based molecular pull down or immunoprecipitation application for which they are intended. The polymeric support can be soluble or insoluble in aqueous solutions. Preferably, the polymeric support is insoluble in aqueous solutions. For most affinity based molecular pull down or immunoprecipitation applications the polymeric supports will be in the form of particles or beads. Thus, it is preferred that the polymeric support be in the form of particles or beads.

In general, the affinity matrix will comprise a particulate polymeric support in which the particles have an average size of less than about 1,000 micrometers. Typically, the particles in the particulate polymeric support will have an average size of less than about 700 microns, more typically less than 600 microns. For example, for some applications the particles of the particulate polymeric support will have an average size less than about 400 microns and in other applications the particles will have an average size less than about 200 microns.

The particles of natural and cross-linked agarose typically range from about 20 to about 300 micrometers in diameter. Preferably, the particles of natural and cross-linked agarose range from about 30 to about 250 micrometers in diameter. More preferably, the particles of natural and cross-linked agarose range from about 40 to about 165 micrometers in diameter. The particles of polyacrylamide typically range from about 20 to about 200 micrometers in diameter. Preferably, the particles of polyacrylamide range from about 30 to about 150 micrometers in diameter. More preferably, the particles of polyacrylamide range from about 40 to about 105 micrometers in diameter. The particles of dextran and cross-linked dextran typically range from about 15 to about 600 micrometers in diameter. Preferably, the particles of dextran and cross-linked dextran range from about 20 to about 400 micrometers in diameter. More preferably, the particles of dextran and cross-linked dextran range from about 50 to about 300 micrometers in diameter.

Thus, an example of a suitable colored polymeric support for use in the invention would be natural agarose particles ranging from about 30 to about 250 micrometers in diameter possessing between about 0.5 to about 20 micromoles of dye per  $\text{cm}^3$  of natural agarose. Another example of a suitable colored polymeric

support for use in the invention would be polyacrylamide particles ranging from about 30 to about 150 micrometers in diameter and possessing between about 0.5 to about 20 micromoles of dye per  $\text{cm}^3$  of polyacrylamide. A further example of a suitable colored polymeric support for use in the invention would be cross-linked dextran particles ranging from about 20 to about 400 micrometers in diameter and possessing between about 0.5 to about 20 micromoles of dye per  $\text{cm}^3$  of cross-linked dextran.

5 A preferred colored polymeric support for use in the invention is cross-linked agarose particles ranging from about 20 to about 300 micrometers in diameter possessing between about 1 to about 6 micromoles of dye per  $\text{cm}^3$  of cross-linked agarose. Another preferred colored polymeric support for use in the invention is cross-linked agarose particles ranging from about 20 to about 300 micrometers in diameter possessing between about 2 to about 4 micromoles of dye per  $\text{cm}^3$  of cross-linked agarose.

15 A more preferred colored polymeric support for use in the invention is cross-linked agarose particles ranging from about 30 to about 250 micrometers in diameter possessing between about 1 to about 6 micromoles of dye per  $\text{cm}^3$  of cross-linked agarose. Another more preferred colored polymeric support for use in the invention is cross-linked agarose particles ranging from about 30 to about 250 micrometers in diameter possessing between about 2 to about 4 micromoles of dye per  $\text{cm}^3$  of cross-linked agarose.

20 An even further preferred colored polymeric support for use in the invention is cross-linked agarose particles ranging from about 40 to about 165 micrometers in diameter possessing between about 1 to about 6 micromoles of dye per  $\text{cm}^3$  of cross-linked agarose. Another even further preferred colored polymeric support for use in the invention is cross-linked agarose particles ranging from about 40 to about 165 micrometers in diameter possessing between about 2 to about 4 micromoles of dye per  $\text{cm}^3$  of cross-linked agarose. The dye may be covalently attached to the polymeric support by any suitable means available to those skilled in the art. The attachment preferably occurs via reactive groups on the dye and attachment sites on the polymeric support. Attachment sites on the polymeric support include, but are not limited to hydroxyl groups, amine groups, and carboxyl groups. It is possible to create additional attachment sites by converting some or all of the naturally occurring attachment sites on the polymer to different attachment sites. For example, hydroxyl groups found on a given polymeric support can be converted to functional groups such as amines, sulfhydryl groups

WO 02/061406

PCT/US02/03109

14

or carboxylic acids. Likewise, it is also possible to create additional reactive groups on the dye by converting some or all of the naturally occurring reactive groups on the dye to different reactive groups. The dye could be modified to contain an amine group, for example.

5 The dye may be covalently coupled, for example, by the substitution of chlorine atom(s) in the triazine ring of certain of the dyes with the hydroxyl groups on certain of the polymer matrices. The dyes may also be attached via the vinyl sulfone groups of certain of the dyes and hydroxyl groups of some of the polymers. Preferably, the dye is directly covalently attached to the polymeric support. However, it is also possible, although not preferred, for the dye to be indirectly covalently attached to the polymeric support. Such an indirect attachment could involve the use of a spacer or different molecule to attach the dye to the polymeric support. Typical spacers include hydrocarbon spacers such as hexyl spacers.

15 In one embodiment, dyes are attached to an agarose resin by any means known in the art. For example, the agarose may be centrifuged, washed repeatedly, and suspended in sodium bicarbonate. The dye may then be dissolved in sodium chloride and the salt/dye solution is added to the resin carbonate slurry. The combined salt/dye solution and resin/carbonate slurry may then be incubated (e.g., at temperatures between 25 °C and 80 °C) for a period of time ranging from one hour to several hours and then centrifuged or filtered to remove the supernatant. The colored agarose pellet is washed repeatedly with water until unbound dye is removed. The resin is resuspended in a suitable storage buffer.

25 Dyes can also be attached to the agarose utilizing a similar procedure employing alkaline conditions at temperatures between 25 °C and 80 °C for a period of time ranging from one hour to several hours. The alkaline conditions can be provided by utilizing NaOH in the procedure. After coupling, the polymer is washed repeatedly with water to remove unbound dye. This procedure has been employed to attach certain Procion and Remazol dyes to agarose (Hasnaoui, M., et al., J. Chromatogr. A, 766, 49-60, 1997). It is understood that when different dyes and other polymers are coupled, appropriate variations and adjustments in the attachment procedures may need to be made which will be obvious to those of skill in the art.

35 After the dye is attached, the colored polymeric support preferably possesses similar solubility and centrifugation characteristics and similar density

as possessed by the same polymer to which no dye is bound. For example, if the polymer is insoluble in aqueous solution, the colored polymeric support is also preferably insoluble in aqueous solution. Preferably, the colored polymer can be easily collected from aqueous solutions by centrifugation of less than 700 x g.

5 Another embodiment of the invention is directed to a method for the isolation of a biomolecule from an aqueous sample solution using the affinity matrix of the invention, the affinity matrix being characterized in that it has improved visibility and possesses low non-specific protein binding characteristics. The affinity matrix used in the method of isolating a biomolecule of interest may  
10 comprise a colored polymeric support modified with affinity ligands or it may comprise a mixture of a colored polymeric support and a non-colored affinity matrix.

A colored polymeric support can be modified with the affinity ligands appropriate for the particular affinity based molecular pull down application or  
15 immunoprecipitation application. Examples of frequently used affinity ligands include antibodies, metal chelates, glutathione, streptavidin, monomeric streptavidin, molecules with the binding properties of streptavidin such as modified forms of streptavidin, avidin, monomeric avidin, molecules with the binding properties of avidin such as modified forms of avidin, streptactin, monomeric  
20 streptactin, molecules with the binding properties of streptactin such as modified forms of streptactin, extravidin, monomeric extravidin, molecules with the binding properties of extravidin such as modified forms of extravidin, neutravidin, monomeric neutravidin, molecules with the binding properties of neutravidin such as modified forms of neutravidin, protein A, a molecule with the binding properties of protein A such as fragments, combinations, recombinant forms or other  
25 variants of protein A, protein L, a molecule with the binding properties of protein L such as fragments, combinations, recombinant forms or other variants of protein L, protein G, a molecule with the binding properties of protein G such as fragments, combinations, recombinant forms, or other variants of protein G,  
30 protein A/G, a molecule with the binding properties of protein A/G such as fragments, combinations, recombinant forms, or other variants of protein A/G, protein L/A, a molecule with the binding properties of protein L/A such as fragments, combinations, recombinant forms or other variants of protein L/A, calmodulin, a molecule with the binding properties of calmodulin, biotin, and a  
35 molecule with the binding properties of biotin.

As modified with an affinity ligand, the affinity matrix is suitable for use with all types of affinity based molecular pull down or immunoprecipitation procedures because the affinity matrix has similar centrifugation and solubility characteristics as does a comparable non-colored affinity matrix and does not function differently in isolating, purifying, and analyzing biomolecules of interest. The methods by which the colored polymeric support can be modified with affinity ligands are well known to those skilled in the art.

No particular adjustments to the standard affinity based molecular pull down methods are necessary because the affinity matrix of the invention has similar centrifugation and solubility characteristics to an equivalent non-colored affinity matrix and does not function any differently in isolating and purifying biomolecules of interest. The procedures for affinity based molecular pull down experiments (affinity capture) will vary, however, depending on the nature of the affinity ligand affixed to the matrix and its target biomolecule. A person of ordinary skill in the art is well acquainted with the various procedures for affinity based molecular pull down experiments. Affinity based molecular pull down procedures have the following basic steps. The affinity matrix possessing attached affinity ligands is incubated with an aqueous solution containing the biomolecule of interest. The nature of the affinity interaction, including the strength and duration of the interaction, can vary widely, depending on the objectives the particular experiment or procedure. Thus, the affinity interaction between the affinity ligand and the biomolecule of interest can be transient or of sufficient duration that a specific complex forms between the affinity ligand and the biomolecule of interest. In those experiments and procedures in which a complex forms, the affinity matrix to which the complex is attached is separated from the aqueous solution by centrifugation. Unbound proteins are then removed by aspirating the supernatant and washing the complex. The particles can be washed by rinsing with a solution such as lysis buffer and removing the lysate and wash buffer by aspiration. Filtration may also be employed to separate the complex from the aqueous solution. The biomolecule of interest can then be removed from the complex or can be analyzed for activity while still part of the complex that is attached to the affinity matrix. If removed from the complex, the biomolecule could be subjected to physical, chemical, or functional analysis. For example, the molecular weight of the biomolecule could then be determined by SDS/PAGE or an enzymatic assay could be conducted on the unbound biomolecule.

Immunoprecipitation is one type of affinity based molecular pull down procedure. The basic procedure of immunoprecipitation involves preparation of the antigen solution and forming and purifying the antibody-antigen complexes. The antibody-antigen complexes are formed by the addition of specific antibodies to the lysate. The affinity of antibodies for their respective antigens will cause the antibody-antigen complexes to form rapidly. An affinity bead suspension, such as a protein A or protein G bead suspension, is then added to the aqueous solution containing the antibody-antigen complexes to purify the complexes. The high affinity possessed by protein A and protein G for the Fc portion of the antibody facilitates the purification of the complexes. After the complex is bound to the particles of the polymeric support through the protein A/G-antibody interaction, the particles are separated from the aqueous solution by centrifugation. Unbound proteins are then removed by aspirating the supernatant and washing the complex. The washes are removed by aspiration. Filtration may also be employed to separate the particles of the affinity matrix from the aqueous solution. The biomolecule of interest can then be removed from the complex or can be analyzed for activity while still part of the complex that is attached to the polymeric support. Harlow, supra, incorporated herein by reference, describes the suitable conditions for immunoprecipitation experiments. No particular adjustments to the standard immunoprecipitation methods are necessary because the colored affinity matrix has similar centrifugation and solubility characteristics as a non-colored affinity matrix of the same polymer and does not function any differently in isolating and purifying biomolecules of interest. However, in contrast to non-colored affinity matrices, the colored affinity matrix will be visible during the various manipulations of the immunoprecipitation procedure.

Since there are no modifications to the procedures of affinity based molecular pull down and immunoprecipitation due to the presence of the colored affinity matrix, the following general steps are followed in both procedures. The first step of the affinity based molecular pull down method of purifying and isolating a biomolecule of interest involves combining an aqueous solution containing the biomolecule of interest with a colored affinity matrix having improved visibility and low non-specific protein binding characteristics. The combining can be accomplished by adding the colored affinity matrix to the aqueous solution containing the biomolecule. Preferably, the combining is accomplished by adding the aqueous solution containing the biomolecule to the colored affinity matrix.

The aqueous solution containing the biomolecule of interest is typically a lysate, lysate fractions, or buffered solution containing proteins or other biomolecules or modified biomolecules in a purified or unpurified form, although other aqueous solutions containing biomolecules can be used. Biomolecules can be naturally occurring, of synthetic origin or naturally occurring or synthetic

5 be naturally occurring, of synthetic origin or naturally occurring or synthetic biomolecules that have been modified in some way. Examples of naturally occurring biomolecules of interest include, but are not limited to, peptides, polypeptides, individual proteins, glycoproteins, enzymes, nucleotides, polynucleotides, nucleic acid polymers such as DNA or RNA, carbohydrates,

10 lipids, or complexes containing proteins. Examples of synthetic biomolecules include, but are not limited to, synthetic peptides, synthetic polypeptides, synthetic individual proteins, synthetic glycoproteins, synthetic nucleotides, synthetic polynucleotides, synthetic nucleic acid polymers such as DNA or RNA, synthetic enzymes, synthetic carbohydrates, synthetic lipids, or synthetic complexes

15 containing proteins. Examples of modified biomolecules include, but are not limited to, naturally occurring or synthetic biomolecules that have been modified by procedures such as enzymatic cleavage or provided with synthetic tags such as biotinylation or amino acid epitope tags. The solution may also contain mixtures of these biomolecules.

20 The second step of the method involves separating the colored affinity matrix from the aqueous solution. The colored affinity matrix is typically separated from the aqueous solution by centrifugation and aspiration of the supernatant. However, filtration or another suitable method could be employed to separate the matrix from the aqueous solution, depending on the particular

25 experiment. Centrifugation is typically conducted at 8,000 x g for 30 seconds or less. However, there can be considerable variation in suitable centrifugation procedures for immunoprecipitation and affinity based molecule pull down experiments. Thus, a slower speed centrifugation could be employed for a longer period of time. Similarly, a higher speed centrifugation could be employed for a

30 shorter period of time, depending on the type of immunoprecipitation and affinity based molecular pull down experiment and the preference of the operator.

The unbound biomolecules can be removed from the colored affinity matrix by washing the colored affinity matrix. The washes are removed by aspiration. Due to its optical detectability, the colored affinity matrix can be optically

35 monitored during the process of washing and aspirating. Preferably, the optical monitoring is done by operator visualization in ambient light. However, the optical

WO 02/061406

PCT/US02/03109

19

monitoring could also be done by machine or device and could even be automated. Thus, the operator is able to visually confirm the location of the colored affinity matrix during the washing process and is less likely to accidentally remove the particles of the colored affinity matrix by aspiration. This ability to optically monitor the matrix will increase the reliability and reduce the quantitative variability of the method.

Depending on the objectives of the experiment, a successful experiment may have the biomolecule of interest bound to the colored affinity matrix through affinity interactions. An additional step of the method of purifying and isolating a biomolecule of interest would be to release or treat the bound biomolecules to allow subsequent physical, chemical, or functional analysis. Examples of physical analysis include molecular weight determination by SDS/PAGE. Biochemical analysis could include identifying post-translational modifications, and functional analysis could include an enzymatic assay, for example.

The colored affinity matrix used in the affinity based molecular pull down method of purifying and isolating a biomolecule of interest may comprise the colored polymeric support of the invention modified with affinity ligands or it may comprise a mixture of a colored polymeric support of the invention and a non-colored affinity matrix. This mixture is prepared by combining the colored polymeric support with a non-colored affinity matrix.

The density, solubility and centrifugation properties of the colored polymeric support and the non-colored affinity matrix should be such that the colored affinity matrix exhibits improved optical detectability relative to conventional non-colored affinity matrices. Preferably, the colored polymeric support of the invention has substantially similar centrifugation and solubility properties and the same approximate density as the non-colored affinity matrix with which it is being combined. When they have similar properties and density, the colored polymeric support will tend to distribute substantially uniformly in the non-colored affinity matrix to provide a uniform color, which in one embodiment may be visualized in ambient light by an operator or by optically by an optical detection device. By uniform distribution is meant that the colored polymeric support is evenly distributed within the non-colored affinity matrix after mixing so that the appearance of the colored affinity matrix has an even and uniform color with no concentration of color in any particular area of the matrix. This distribution of the colored polymeric support within the non-colored affinity matrix remains uniform after centrifugation. Furthermore, the colored polymeric support does not alter or

compromise the functioning of the non-colored affinity matrix in isolating and purifying molecules of interest.

In general, it is preferred that the colored polymeric support and the non-colored polymeric support be prepared from the same type and size of polymer.

5 Provided they are sufficiently similar in terms of centrifugation characteristics, solubility and density, the colored and non-colored polymeric supports may comprise different polymer types or sizes of particles. Similarly, the colored polymeric support and the non-colored polymeric support may each comprise one or more types or sizes of polymeric supports.

10 The affinity matrix may comprise any of a wide variety of affinity ligands on the surface of any of a wide variety of polymeric supports. For example, the affinity ligand may be any member of a binding pair of molecules (each being a member of a specific binding pair) which are naturally derived or synthetically produced. One of the pair of molecules, has an area on its surface, or a cavity  
15 which specifically binds to, and is therefore defined as complementary with a particular spatial and polar organization of the other molecule, so that the pair have the property of binding specifically to each other. Examples of types of specific binding pairs are antigen-antibody, biotin-avidin, hormone-hormone receptor, receptor-ligand, enzyme-substrate, and IgG-protein A.

20 In one embodiment of the present invention, the polymeric support comprises agarose and bound to the surface of the agarose is protein A ("protein A agarose") or a derivative or analog thereof having comparable binding properties to protein A agarose, protein G ("protein G agarose") or a derivative or analog thereof having comparable binding properties to protein G agarose, protein  
25 L ("protein L agarose") or a derivative or analog thereof having comparable binding properties to protein L agarose, and combinations thereof such as protein A/G agarose or agarose modified with a molecule with the binding properties of protein A/G, and protein L/A agarose or agarose modified with a molecule with the binding properties of protein L/A.

30 In another embodiment, bound to the polymeric support is an antibody which is specific to a peptide tag of a fusion protein, or to an epitope within a protein which may be shared among a number of proteins. Examples of the antibodies that can be attached to matrices include, but are not limited to antibodies having specificity for at least a portion of the DYKDDDDK amino acid  
35 sequence (e.g., anti-FLAG™ antibodies commercially available from Sigma-Aldrich), anti-polyhistidine, anti-glutathione-S-transferase, anti-myc-tag, anti-Avi-

tag, anti-HA, anti-Green fluorescent protein, anti-beta galactosidase, anti-thioredoxin, anti-maltose binding protein, anti-cellulose binding domain, anti-VSV glycoprotein, and anti-luciferase.

In another embodiment, the affinity ligand bound to the polymeric support is other than a member of an antibody pair. For example, such affinity ligands include streptavidin, monomeric streptavidin, a molecule with the binding properties of streptavidin, avidin, monomeric avidin, a molecule with the binding properties of avidin, streptactin, monomeric streptactin, a molecule with the binding properties of streptactin, extravidin, monomeric extravidin, a molecule with the binding properties of extravidin, neutravidin, monomeric neutravidin, and a molecule with the binding properties of neutravidin, calmodulin, a molecule with the binding properties of calmodulin, biotin, a molecule with the binding properties of biotin, glutathione, and metal chelates.

The colored polymeric support can be combined with the non-colored affinity matrix by any suitable method. The colored polymeric support can be combined with the non-colored affinity matrix, for example, by pipetting each matrix as slurries. Thus, if it was desired to make a colored affinity matrix containing 10% of the colored polymeric support, an amount equivalent to 9 parts non-colored affinity matrix could be pipetted into a tube as a 50% slurry and then an amount equivalent to 1 part colored polymeric support could be pipetted into the same tube as a 50% slurry. The slurries could then be mixed to provide a uniform suspension. The parts could be measured either by volume or by weight.

The slurries could also be filtered, weighed and then manually mixed to provide a colored affinity matrix. Thus, if it was desired to make a colored affinity matrix containing 10% of the colored polymeric support the following method could be employed. A slurry of non-colored affinity matrix and a slurry of colored polymeric support each could be filtered separately using filter paper. An amount of the colored polymeric support equivalent to 1 part by weight could be weighed and combined with an amount equivalent to 9 parts by weight of the non-colored affinity matrix obtained in the same manner. The combined colored polymeric support and non-colored affinity matrix could then be resuspended in a suitable buffer and the resulting slurry manually mixed to provide a colored affinity matrix. The selection and conducting of an appropriate method is well within the skill of a practitioner of ordinary skill in the art.

The amount of colored polymeric support in the colored affinity matrix can vary considerably and is selected according to the following three basic criteria.

WO 02/061406

PCT/US02/03109

22

The colored affinity matrix is optically detectable, and exhibits comparable non-specific protein binding to that of the non-colored affinity matrix. Furthermore, the colored affinity matrix exhibits comparable specific biomolecule binding to that of a non-colored affinity matrix. Optically detectable means that the affinity matrix should be able to be detected optically either by machine or through visualization by an operator or observer. The colored affinity matrix should be able to be optically detected during the various manipulations of the procedure. Comparable non-specific protein binding means that the colored affinity matrix would not exhibit significantly more non-specific protein binding than the non-colored affinity matrix. Significantly more non-specific protein binding would be an amount that would interfere with subsequent analysis of the biomolecule target. This amount can vary depending on the specific application of the operator. Comparable specific biomolecule binding means that the colored affinity matrix will have a similar affinity and binding capacity for the biomolecule of interest in the immunoassay or molecular pull down procedure to that of a non-colored affinity matrix and binds a similar amount of this biomolecule as would a non-colored affinity matrix.

Thus, the amount of colored polymeric support in the colored affinity matrix utilized in the particular molecular pull down or immunoprecipitation experiment can range from between about 1% by volume to about 95% by volume. Preferably, the amount of colored polymeric support in the colored affinity matrix ranges from between about 2% by volume to about 50% by volume. More preferably, the amount of colored polymeric support in the colored affinity matrix ranges from between about 2% by volume to about 10% by volume. However, many variables are involved in determining the appropriate amount of colored polymeric support to be added to the non-colored affinity matrix which will be familiar to one of ordinary skill in the art. One such variable is the type of dye utilized in the colored polymeric support and the intensity of its color in ambient light. Thus a yellow dye such as Remazol Yellow GL would not have as intense a color as Remazol Brilliant Red BB, and a larger percentage of Remazol Yellow GL colored polymer may be required to achieve adequate visibility in ambient light. Another variable includes the type of molecular pull down technique; the functioning of certain affinity ligands could be more sensitive to the presence of dye molecules in the polymeric support and a smaller percentage of colored polymeric support would be able to be utilized without affecting the colored affinity

WO 02/061406

PCT/US02/03109

23

matrix's affinity for the biomolecule of interest and binding of the biomolecule of interest.

The colored affinity matrix of the invention is also useful as a means of identifying a particular molecular pull down or immunoprecipitation experiment; two different molecular pull down or immunoprecipitation experiments can be distinguished by the color of the affinity matrix being employed in the experiment. Thus, the colored affinity matrix can also assist the operator of multiple experiments. Moreover, the use of a colored affinity matrix of the type herein described in an affinity based molecular pull down or immunoprecipitation experiment provides the ability to visualize and monitor the location of the affinity matrix during the procedure. This ability to visualize and monitor the location of the affinity matrix during the procedure will make the various manipulations involved in the affinity based molecular pull down or immunoprecipitation experiments much easier for the operator and will help to reduce operator error. This improvement to existing affinity based molecular pull down and immunoprecipitation techniques can greatly enhance the reliability of these powerful techniques. The following Examples are intended to illustrate but not to limit the invention.

#### EXAMPLE 1

20 Comparing The Compatibility Of Different Colored And Non-Colored Matrices

Different colored and non-colored matrices were compared by mixing, followed by centrifugation and visual observation of the resulting matrix pellet.

25 Sepharose CL-4B agarose (non-colored) and Reactive Red 120 agarose (Sigma Product #R9129; red) were swollen and washed by standard methods to equilibrate and stored as 50% gel slurries in Tris buffered saline (TBS) containing 20% ethanol. The Reactive Red 120 agarose was added into the non-colored agarose at 0 %, 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, mixed in standard 1.5 ml microcentrifuge tubes, and centrifuged for 30 seconds in a standard microcentrifuge at 8,000 x g.

30 The resulting pellets were carefully observed visually in ambient light for uniformity of color distribution in the matrix pellets and for over-all color intensity. All pellets showed uniform color, which was evenly distributed throughout the matrix pellet, indicating that the density and centrifugation properties of the Reactive Red 120 agarose were comparable to those of the non-colored agarose.

The visual intensity of the pellets containing Reactive Red agarose varied from dark red for the 100% Reactive Red 120 agarose to light red/pink for the 5% mixture and were more visible than non-colored agarose alone. The 10% Reactive Red 120 agarose mixture was readily visible and had the desired visibility with minimal dilution of the non-colored agarose matrix (which mimics a real affinity capture agarose conjugate).

This experiment demonstrated that colored agarose mixed with non-colored agarose had the desired centrifugation properties, leading to an easily visualized, uniformly colored pellets of polymeric support after centrifugation.

10

#### EXAMPLE 2

##### Blocking With Proteins And Cross-linking

We tested whether saturating the matrix beads with a known protein preparation and cross-linking that protein onto the agarose beads would shield the protein binding sites of the dye and, hence, lower the amount of non-specific lysate protein that could bind to the colored agarose matrix.

2.4 ml (1.2 ml packed gel) of Reactive Red 120 Agarose affinity resin 50% suspension (Sigma product #R0503) was dispensed into each of six tubes and centrifuged in a table top centrifuge at 2500 x g for 5 minutes at room temperature. The supernatants were carefully aspirated. The resin pellets were washed by adding 9 ml water to each tube, mixing and centrifuging as above. The wash supernatants were aspirated. The pellets were washed two more times by the same procedure. Various test protein solutions were added to the pellets as indicated below:

Tube A - 4 ml albumin solution at 5 mg/ml in water  
Tube B - 4 ml albumin solution at 20 mg/ml in 4 M NaCl  
Tube C - 4 ml gelatin at 20 mg/ml in water  
Tube D - 4 ml casein hydrolysate at 20 mg/ml in water  
Tube E - 4 ml gelatin hydrolysate at 40 mg/ml in water  
Tube F - 4 ml protein mixture (1 ml albumin solution at 5 mg/ml, 1 ml gelatin at 20mg/ml, 1 ml casein hydrolysate at 20 mg/ml, 1 ml gelatin hydrolysate at 40 mg/ml)

Tubes were mixed and incubated at 4 °C with gentle rotational mixing for 1 hour. The tubes were then centrifuged as above to collect the resin pellets. The supernatants were removed by aspiration and the pellets were washed 3 times as

WO 02/061406

PCT/US02/03109

25

above with 9 ml water per wash. After aspiration of the final wash supernatants, the pellets were each brought up to a 50% suspension (total volume per tube of 2.4 ml) by adding 1.2 ml water to each. After mixing, 0.2 ml was removed from each for subsequent analysis.

- 5 Cross-linking in 0.1 M EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride; Sigma product #E1769) was then carried out to lock the absorbed, blocking proteins onto the resins. The pH of each resin tube was adjusted to about pH 5.4 to 5.7 with small drops of 0.1 M HCl. To each tube of suspended resin (2.2 ml per tube), 89.8  $\mu$ l of an 0.47 mg/ $\mu$ l fresh stock solution of
- 10 EDAC in water was added. The tubes were mixed and incubated at room temperature with gentle rotational mixing. The pH of was readjusted to about 5.0 to 5.7 every 30 minutes for the first two hours of the reaction. The reaction was then allowed to continue overnight (about 16 to 18 hours). To stop the reactions, the tubes were centrifuged at room temperature for 5 minutes at 2500 x g. After
- 15 aspirating the supernatants, the pellets were washed three times as above with 8 ml water per wash. After aspiration of the final wash supernatants, the pellets were suspended as a 50% slurry by adding 1 ml Tris buffered saline containing 20% ethanol to each and the slurries were put to 4EC for storage. 100  $\mu$ l of each 50% resin suspension (50  $\mu$ l packed gel) was tested directly for the amount of
- 20 non-specific background protein binding with mammalian tissue culture cell lysates as described in the following mock immunoprecipitation protocol:

Mock Immunoprecipitation Protocol

1. Make agarose bead mixtures in 1.5 ml microfuge tubes to give 50  $\mu$ l packed gel per tube of 10% stained agarose mixture with non-colored agarose:
- 25 Add 10  $\mu$ l of stained agarose 50% slurry into 90  $\mu$ l non-colored agarose 50% slurry, vortex and set on ice.
2. Wash/equilibrate agarose beads in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS): Add 750  $\mu$ l RIPA buffer to each tube, vortex and centrifuge in microcentrifuge for 30 seconds at
- 30 8,000 x g. Aspirate supernatants carefully (or remove with a micropipet) and set tubes with bead pellets on ice. Repeat wash as above. Set final pellets on ice.
3. Thaw cell lysates (1 ml RIPA lysate of a freshly confluent tissue culture cell line from a 100 mm tissue culture plate) and set on ice. Remove denatured DNA aggregate with a pipet, if present. Transfer each lysate to a
- 35 microfuge tube and centrifuge in microcentrifuge in cold room (4 °C) at 8,000 x g

WO 02/061406

PCT/US02/03109

26

for 10 minutes to pellet cell debris and insoluble denatured protein. Remove and combine clear supernatants to a tube on ice.

4. Mix combined lysate and added 1 ml to each washed agarose bead tube on ice. Vortex briefly and put to incubate in cold room, mixing slowly on rotating wheel, for 1 hour.
5. Centrifuge in microcentrifuge for 30 seconds at 8,000 x g. Set on ice. Aspirate supernatants carefully (or remove with a micropipet) and set tubes with bead pellets on ice.
6. Wash bead pellets by adding 750  $\mu$ l RIPA buffer to each tube.
10. Vortex briefly and put to incubate in cold room, mixing slowly on rotating wheel for 5 minutes. Centrifuge in microcentrifuge in cold room (4 °C) for 30 seconds at 8,000 x g. Aspirate supernatants carefully (or remove with a micropipet) and set tubes with bead pellets on ice.
7. Repeat washes two more times as in step 6.
15. 8. Add 25  $\mu$ l RIPA buffer to each tube, vortex briefly, then add 25  $\mu$ l of 2X Laemmli protein gel sample buffer. Vortex briefly. Freeze samples for storage, if not used immediately.
9. Boil samples 5 minutes and centrifuge 30 seconds at 8,000 x g in microfuge to pellet agarose. Run 10  $\mu$ l of each supernatant and molecular weight standards onto a denaturing SDS/PAGE gel.
20. 10. Stain with colloidal blue and/or silver stain to visualize protein bands. Photo or scan image for documentation and/or quantitation.

Results:

25. Tube A resin (albumin blocked) - Albumin was bound and cross-linked to the Reactive Red 120 agarose resin; non-specific lysate protein binding reduced by 70-80%.
- Tube B resin (albumin in 4 M NaCl blocked) - Albumin did not bind to the Reactive Red 120 agarose resin; non-specific lysate protein binding was not reduced.
30. Tube C resin (gelatin blocked) - Gelatin bound well and was well cross-linked to the Reactive Red 120 agarose resin; non-specific lysate protein binding reduced by 90-98%.
35. Tube D resin (casein hydrolysate blocked) - Casein hydrolysate did not bind to the Reactive Red 120 agarose resin; non-specific lysate protein binding was not reduced.

WO 02/061406

PCT/US02/03109

27

Tube E resin (gelatin hydrolysate blocked) - Gelatin hydrolysate did not bind to the Reactive Red 120 agarose resin; non-specific lysate protein binding was not reduced.

5 Tube F resin (albumin, gelatin, casein hydrolysate, gelatin hydrolysate mixture blocked) - The mixture was partially bound and cross-linked to the Reactive Red 120 agarose resin; non-specific lysate protein binding reduced by 80-90%.

10 The conditions used for Tube C resin (gelatin blocked) gave optimal performance for lower non-specific lysate protein binding using this approach and could reasonably be assumed to perform adequately in immunoprecipitation and other molecular pull-down applications.

### EXAMPLE 3

#### Non-Specific Protein Binding of Agarose Resin Conjugates With Various Dyes

15 Several dyes were selected from references in the scientific literature that screened dyes, potentially useful for producing affinity chromatography resins, for protein binding ability. A number of the dyes were found to be inadequate for that application, due to their poor ability to bind protein. We made agarose resin conjugates with some of these dyes and tested them for non-specific protein binding.

20 Procion Red MX-B5 (Aldrich Product #404365) and Remazol Brilliant Orange 3R (Aldrich Product #306509) were among dyes that had been reported to bind lysate proteins poorly (Scopes, R.K., J. Chromatogr., 376, 131-140, 1986) and to bind IgG protein poorly (Hasnaoui, M., et al., J. Chromatogr. A, 766, 49-60, 1997). Staining of agarose with these dyes was carried out by the dye immobilization procedure in Hasnaoui, M., et al., J. Chromatogr. A, 766, 49-60, 25 1997.

For each immobilization reaction, 2 ml of a 50% slurry of Sepharose CL-4B agarose (1 ml packed gel) was centrifuged in a table top centrifuge 5 minutes at 2500 x g at room temperature, and the supernatant was removed by aspiration. 30 The agarose resin pellets were each washed three times with 10 ml water. For each wash, the tubes were mixed after adding the water, centrifuged as above for 2.5 minutes and the supernatants were carefully removed by aspiration.

WO 02/061406

PCT/US02/03109

28

The washed agarose resin pellets were equilibrated by washing three times in 10 ml immobilization solution (200 mM NaOH containing 2% NaCl). For each wash, the tubes were mixed after adding the immobilization solution, centrifuged as above for 2.5 minutes and the supernatants were carefully removed by aspiration.

21 mg of Procion Red MX-B5 or Remazol Brilliant Orange 3R dye in 2 ml of immobilization solution was added to the equilibrated agarose pellet, mixed and incubated in a 60°C water bath with constant mixing by gently rotation for 1 hour.

The reaction was stopped and unbound dye was removed by sequential washing with 10 ml water per wash as above until the wash supernatants were completely clear and colorless. After the final wash supernatant was removed, the colored agarose pellets were suspended in 1 ml Tris buffered saline containing 20% ethanol to give a 50% slurry and stored at 4 °C until use.

100 µl of each 50% resin suspension (50 µl packed gel) was tested directly, or mixed at 10% with non-colored agarose, for the amount of non-specific background protein binding with mammalian tissue culture cell lysates as described in the mock immunoprecipitation protocol of Example 2.

#### Results:

100% Procion Red MX-5B agarose showed binding of non-specific background protein was reduced by 70-80% compared to control Reactive Red 120 agarose and was comparable to Reactive Red 120 agarose blocked with gelatin and cross-linked with EDAC (see Example 2). 100% Remazol Brilliant Orange 3R agarose showed binding of non-specific background protein was reduced by >95% compared to control Reactive Red 120 agarose. When used as a 10% mixture in agarose, the Remazol Brilliant Orange 3R agarose was still quite visible, but showed no significant difference in binding of non-specific background protein and was comparable to non-colored agarose alone (100% Sepharose CL-4B).

The procedure above demonstrated that we could make a visible agarose resin with the desired visibility, centrifugation, and very low protein binding ability properties necessary for this invention.

**EXAMPLE 4****Coupling Reactive Dyes To Agarose Using Carbonate**

Another method of coupling dyes to agarose involves carrying out the coupling reaction in a carbonate. For each coupling reaction, 3.5 ml of a 50% slurry of Sepharose CL-4B agarose (1.75 ml packed gel) was dispensed to a tube and was centrifuged in a table top centrifuge 5 minutes at 2500 x g at room temperature. Each supernatant was removed by aspiration. The agarose resin pellets were each washed three times with 10 ml water as described in Example 2, and the final wash supernatants were removed by aspiration. The agarose resin pellets were each suspended in 0.5 packed gel volumes (0.85 ml) of 0.4 M sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).

Procion Red MX-B5 (Aldrich Product #404365) and Remazol Brilliant Orange 3R (Aldrich Product #306509) were each weighed out at 20 mg/ml packed gel (35 mg each) and each was dissolved in 0.5 packed gel volume (0.85 ml) of 0.68 M NaCl. For each coupling reaction, each dye/salt solution (0.85 ml) was added to a tube containing the agarose/carbonate slurry (0.85 ml) from above. Each coupling reaction tube was incubated at 60 °C in a water bath with gentle shaking for thorough and continuous mixing.

Each reaction was stopped, and unbound dye was removed, by centrifugation, aspiration, and sequential washing of the agarose pellets with 10 ml water per wash as above, until the wash supernatants were completely clear and colorless. After the final wash supernatant was removed, the colored agarose pellets were suspended in 1 ml Tris buffered saline containing 20% ethanol to give a 50% slurry and stored at 4 °C until use.

100 µl of each 50% resin suspension (50 µl packed gel) was tested directly, or mixed at 10% with non-colored agarose, for the amount of non-specific background protein binding with mammalian tissue culture cell lysates as described in the mock immunoprecipitation protocol of Example 2.

**Results:**

The results were very similar to those in Example 3. 100% Procion Red MX-5B agarose showed binding of non-specific background protein was reduced by 70-80% compared to control Reactive Red 120 agarose and was comparable to Reactive Red 120 agarose blocked with gelatin and cross-linked with EDAC (see Example 2). 100% Remazol Brilliant Orange 3R agarose showed binding of

non-specific background protein was reduced by >95% compared to control Reactive Red 120 agarose. When used as a 10% mixture in agarose, the Remazol Brilliant Orange 3R agarose was still quite visible, but showed no detectable binding of non-specific background protein and was comparable to non-colored agarose alone (100% Sepharose CL-4B).

5 This method allowed the preparation of a visible agarose resin with the desired visibility, centrifugation, and very low protein binding ability properties necessary for this invention without requiring alkali solutions.

#### EXAMPLE 5

10 Use Of Colored Affinity Matrix In An Immunoprecipitation Procedure

Remazol Brilliant Red BB was coupled to agarose (Sepharose CL-4B) using the method described in Example 4. The resulting colored resin, Brilliant Red BB agarose, was tested for the amount of non-specific background protein binding with mammalian tissue culture cell lysates as described in the mock immunoprecipitation protocol of Example 2. 100% Remazol Brilliant Red BB agarose showed binding of non-specific background protein was reduced by >95% compared to control Reactive Red 120 agarose. When used as a 10% mixture in agarose, the Remazol Brilliant Red BB agarose was still quite visible, but showed no significant binding of non-specific background protein and was comparable to non-colored agarose alone (100% Sepharose CL-4B).

20 The performance of the Remazol Brilliant Red BB agarose as a visualization aid in an affinity based molecular pull down application was assessed in the following immunoprecipitation experiment. The experiment compared 10% Remazol Brilliant Red BB agarose in standard non-colored Protein A agarose (Red Protein A agarose) with 100% standard non-colored Protein A agarose (Sigma Product #P3391; Non-colored Protein A agarose) for immunoprecipitation of a recombinant fusion protein spiked into a lysate of mammalian cells.

30 COS7 tissue culture cells were grown to confluence in 100 mm tissue culture plates, washed two times briefly with 10 ml ice cold phosphate buffered saline. After the second wash solution was aspirated from the plates, 1 ml of ice cold RIPA lysis buffer was added to each plate and the cells were lysed and harvested with a cell scraper. The lysate was removed from each plate and pooled on ice. 1 ml samples were dispensed to tubes, quick frozen, and put to -70 °C for storage.

100  $\mu$ l aliquots of a 50% slurry of Red Protein A agarose or Non-colored Protein A agarose were dispensed to 1.5 ml microcentrifuge tubes and washed four times with 750  $\mu$ l RIPA lysis buffer per wash. After the final wash supernatant was removed, the tubes with the washed agarose resin pellets were

5 set on ice.

Frozen lysates were thawed and set on ice immediately before the experiment. Denatured DNA (in the form of a slimy aggregate) was manually removed from each 1 ml lysate sample with a pipet. 100  $\mu$ l of mammalian protease inhibitor cocktail (Sigma Product #P8340) was added to each and

10 samples were mixed briefly by vortexing. Cell debris and denatured protein precipitate was removed by centrifugation in a microcentrifuge at 8,000 x g for 10 minutes at 4  $^{\circ}$ C. The clear supernatants were carefully removed and transferred to clean tubes for immunoprecipitation.

For half the tubes of cleared lysates, 1.2  $\mu$ l of 5.4  $\mu$ g/ $\mu$ l N-terminal FLAG-BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) purified recombinant fusion protein (Sigma Product #P7582) was added to each, mixed gently and set on ice. 3.85  $\mu$ l of anti-BAP mouse monoclonal antibody BAP-77 (2.6 mg/ml; Sigma Product #B6804) was added to each tube of cleared lysate and mixed gently. The tubes were put

15 to mix by rotation at 4  $^{\circ}$ C for one hour in order to allow antibody-antigen complexes to form. The tubes were centrifuged for 5 seconds and the entire contents of each were transferred with a pipet to a separate tube of washed agarose resin pellet on ice and briefly mixed. These tubes were put to mix by

20 rotation at 4  $^{\circ}$ C for one hour to allow antibody-antigen complexes to bind the Protein A agarose.

After the incubation the agarose resins were collected by centrifugation in a microcentrifuge for 30 seconds at 8000 x g at 4  $^{\circ}$ C and the supernatants were removed by aspiration. Each pellet was washed four times with 750  $\mu$ l ice cold RIPA buffer per wash. For each wash, the pellets were mixed by rotation at 4  $^{\circ}$ C

25 for 5 minutes, centrifuged as before and the supernatants were aspirated. After the final wash supernatants were removed, 25  $\mu$ l of RIPA buffer was added to each and mixed briefly. Then 25  $\mu$ l of 2X Laemmli protein gel sample buffer (Sigma Product #S3401) was added to each, mixed and the resulting samples

30 were boiled for 5 minutes to release the protein from the agarose resins.

The samples were centrifuged briefly to pellet the agarose resins and 10  $\mu$ l of each supernatant was subjected to SDS/PAGE denaturing gel electrophoresis

35 and analyzed by western immunoblotting. The western blot was probed with anti-

FLAG M2 monoclonal antibody conjugated with alkaline phosphatase followed by standard NBT/BCIP colorimetric detection.

Results:

- 5 The Red Protein A agarose pellets were highly visible in ambient light, while the Non-colored Protein A agarose pellets were difficult to see. The high visibility of the Red Protein A agarose made all manipulations easier and less prone to error caused by accidental removal of the pellets during aspirations. The Red Protein A agarose immunoprecipitates gave the same signal intensity on the immunoblots for the N-FLAG-BAP protein as the Non-colored Protein A agarose
- 10 immunoprecipitates with no detectable increase in non-specific background. Thus, the invention significantly facilitated an affinity based molecular pull down application, immunoprecipitation, while providing equivalent performance of the standard procedure.

**CLAIMS**

## WHAT IS CLAIMED IS:

1. An affinity matrix for the isolation of a molecule from a aqueous solution, the affinity matrix comprising a polymeric support, a dye attached to a fraction of the polymeric support to enable optical detection of the polymeric support, and an affinity ligand other than the dye attached to a fraction of the polymeric support for the capture of a molecule.
- 5 2. The affinity matrix of claim 1 wherein the affinity matrix comprises a particulate polymeric support.
3. The affinity matrix of claim 1 wherein the affinity matrix comprises a particulate polymeric material and the dye and affinity ligands are attached to different fractions of the particulate material.
4. The affinity matrix of claim 3 wherein the dye is attached to about 1% to about 50% by weight of the particulate polymeric material and the affinity ligand is attached to about 50% to about 99% by weight of the particulate polymeric material.
5. The affinity matrix of claim 3 wherein the dye is attached to about 1% to about 15% by weight of the particulate polymeric material and the affinity ligand is attached to about 85% to about 99% by weight of the particulate polymeric material.
6. The affinity matrix of claim 3 wherein the dye is attached to about 2% to about 10% by weight of the particulate polymeric material and the affinity ligand is attached to about 90% to about 98% by weight of the particulate polymeric material.
7. The affinity matrix of claim 3 wherein the capacity of the affinity matrix to non-specifically bind protein present in the lysate of a naturally-occurring mammalian cell under physiological salt and pH conditions is less than 100 times the capacity of a reference matrix under the same conditions wherein the

WO 02/061406

PCT/US02/03109

34

- 5 reference matrix is substantially identical to the affinity matrix except that the no dye is bound to any of the particulate material of the reference matrix.
8. The affinity matrix of claim 7 wherein the particles have an average size of less than about 1,000 micrometers.
9. The affinity matrix of claim 7 wherein the particles have an average size of less than about 600 micrometers.
10. The affinity matrix of claim 7 wherein the particles have an average size of less than about 400 micrometers.
11. The affinity matrix of claim 7 wherein the particles have an average size of less than about 200 micrometers.
12. The affinity matrix of claim 7 wherein the dye comprises a dye possessing an azo chromophore, a dye possessing an anthroquinone chromophore, or a dye possessing a phthalocyanine chromophore.
13. The affinity matrix of claim 7 wherein the dye comprises a dye possessing a vinyl sulfone, a dye possessing a mono or dichloro triazine, or a dye possessing a monochloro difluoro pyrimidinium.
14. The affinity matrix of claim 7 wherein the dye is selected from a group consisting of 5-[(4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-yl)amino]-4-hydroxy-3-(phenylazo)-2,7-Naphthalenedisulfonic acid, disodium salt (Procion Red MX-5B), Procion Blue MX-R, Remazol Violet R-4B, Procion Red MX-BRA, 5-(acetylamino)-  
5 4-hydroxy-3-[[2-hydroxy-4-[[2-(sulfooxy)ethyl]sulfonyl]phenyl]azo]-2,7-Naphthalenedisulfonic acid, copper complex (Remazol Brilliant Violet 5R), Procion Red MX-GBA, Blue MX-4RD (Navy Blue 21), Blue MX-2G (Cobalt Blue 22), Dharma Fire Red 10, 6-(acetylamino)-4-hydroxy-3-[[3-[[2-  
10 (sulfooxy)ethyl]sulfonyl]phenyl]azo]-2-Naphthalenesulfonic acid, disodium salt (Remazol Brilliant Orange 3R, Reactive Orange 16), Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21), Procion Turquoise H-A, Remazol Brilliant Scarlet R-3G, Remazol Brilliant Orange R-FN, and Reactive Blue 21.

15. The affinity matrix of claim 3 wherein the capacity of the affinity matrix to non-specifically bind protein present in the lysate of a naturally-occurring mammalian cell under physiological salt and pH conditions is less than 50 times the capacity of a reference matrix under the same conditions wherein the reference matrix is substantially identical to the affinity matrix except that the no dye is bound to any of the particulate material of the reference matrix.

16. The affinity matrix of claim 15 wherein the particulate material has an average size of less than about 1,000 micrometers.

17. The affinity matrix of claim 15 wherein the particulate material has an average size of less than about 600 micrometers.

18. The affinity matrix of claim 15 wherein the particulate material has an average size of less than about 400 micrometers.

19. The affinity matrix of claim 15 wherein the particulate material has an average size of less than about 200 micrometers.

20. The affinity matrix of claim 15 wherein the dye comprises a dye possessing an azo chromophore, a dye possessing an anthroquinone chromophore, or a dye possessing a phthalocyanine chromophore.

21. The affinity matrix of claim 15 wherein the dye comprises a dye possessing a vinyl sulfone, a dye possessing a mono or dichloro triazine, or a dye possessing a monochloro difluoro pyrimidinium.

22. The affinity matrix of claim 15 wherein the dye is selected from a group consisting of 6-(acetylamino)-4-hydroxy-3-[[3-[[2-(sulfoxy)ethyl]sulfonyl]phenyl]azo]-2-Naphthalenesulfonic acid, disodium salt (Remazol Brilliant Orange 3R, Reactive Orange 16), Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21), Procion Turquoise H-A, Remazol Brilliant Scarlet R-3G, Remazol Brilliant Orange R-FN, Remazol Violet R-4B, 5-(acetylamino)-4-hydroxy-3-[[2-hydroxy-4-[[2-(sulfoxy)ethyl]sulfonyl]phenyl]azo]-2,7-Naphthalenedisulfonic acid, copper complex (Remazol Brilliant Violet 5R), and Reactive Blue 21.

23. The affinity matrix of claim 3 wherein the capacity of the affinity matrix to non-specifically bind protein present in the lysate of a naturally-occurring mammalian cell under physiological salt and pH conditions is less than 10 times the capacity of a reference matrix under the same conditions wherein the reference matrix is substantially identical to the affinity matrix except that the no dye is bound to any of the particulate material of the reference matrix.

24. The affinity matrix of claim 23 wherein the particulate material has an average size of less than about 1,000 micrometers.

WO 02/061406

PCT/US02/03109

37

25. The affinity matrix of claim 23 wherein the particulate material has an average size of less than about 600 micrometers.
26. The affinity matrix of claim 23 wherein the particulate material has an average size of less than about 400 micrometers.
27. The affinity matrix of claim 23 wherein the particulate material has an average size of less than about 200 micrometers.
28. The affinity matrix of claim 23 wherein the dye comprises a dye possessing an azo chromophore, a dye possessing an anthroquinone chromophore, or a dye possessing a phthalocyanine chromophore.
29. The affinity matrix of claim 23 wherein the dye comprises a dye possessing a vinyl sulfone, a dye possessing a mono or dichloro triazine, or a dye possessing a monochloro difluoro pyrimidinium.
30. The affinity matrix of claim 23 wherein the dye is selected from a group consisting of 6-(acetylamino)-4-hydroxy-3-[[3-[[2-(sulfoxy)ethyl]sulfonyl]phenyl]azo]-2-Naphthalenesulfonic acid, disodium salt (Remazol Brilliant Orange 3R, Reactive Orange 16), Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21), Remazol Brilliant Scarlet R-3G, Remazol Brilliant Orange R-FN, and Reactive Blue 21.

31. The affinity matrix of claim 3 wherein the capacity of the affinity matrix to non-specifically bind protein present in the lysate of a naturally-occurring mammalian cell under physiological salt and pH conditions is less than 3 times the capacity of a reference matrix under the same conditions wherein the reference matrix is substantially identical to the affinity matrix except that the no dye is bound to any of the particulate material of the reference matrix.

32. The affinity matrix of claim 31 wherein the particulate material has an average size of less than about 1,000 micrometers.

33. The affinity matrix of claim 31 wherein the particulate material has an average size of less than about 600 micrometers.

34. The affinity matrix of claim 31 wherein the particulate material has an average size of less than about 400 micrometers.

35. The affinity matrix of claim 31 wherein the particulate material has an average size of less than about 200 micrometers.

36. The affinity matrix of claim 31 wherein the dye comprises a dye possessing an azo chromophore, a dye possessing an anthroquinone chromophore, or a dye possessing a phthalocyanine chromophore.

WO 02/061406

PCT/US02/03109

39

37. The affinity matrix of claim 31 wherein the dye comprises a dye possessing a vinyl sulfone, a dye possessing a mono or dichloro triazine, or a dye possessing a monochloro difluoro pyrimidinium.

38. The affinity matrix of claim 31 wherein the dye comprises 6-(acetylamino)-4-hydroxy-3-[[3-[[2-(sulfooxy)ethyl]sulfonyl]phenyl]azo]-2-Naphthalenesulfonic acid, disodium salt (Remazol Brilliant Orange 3R, Reactive Orange 16) or Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21).

39. The affinity matrix of claim 31 wherein the dye comprises Remazol Brilliant Red BB (Reactive Red 21).

40. The affinity matrix of claim 3 wherein the particulate material has an average size of less than about 1,000 micrometers.

41. The affinity matrix of claim 3 wherein the particulate material has an average size of less than about 600 micrometers.

42. The affinity matrix of claim 3 wherein the particulate material has an average size of less than about 400 micrometers.

43. The affinity matrix of claim 3 wherein the particulate material has an average size of less than about 200 micrometers.

WO 02/061406

US02/03109

40

44. The affinity matrix of claim 1 wherein the affinity matrix is modified by gelatin absorption and cross-linking.

45. The affinity matrix of claim 44 wherein the dye comprises a dye possessing an azo chromophore, an anthroquinone chromophore, or a phthalocyanine chromophore.

46. The affinity matrix of claim 44 wherein the dye comprises a dye possessing a vinyl sulfone, a dye possessing a mono or dichloro triazine, or a dye possessing a monochloro difluoro pyrimidinium.

47. The affinity matrix of claim 44 wherein the dye comprises Reactive Red 120 or Reactive Brown 10.

48. The affinity matrix of claim 44 wherein the dye comprises fluorescein, a coumarin derivative, a pyridyloxazole derivative, or a lanthanide metal chelate.

49. The affinity matrix of claim 44 wherein the dye comprises naphthalene, pyrene, rhodamine, fluorescein isothiocyanate, a terbium complex, a europium complex, or a ruthenium complex.

WO 02/061406

PCT/US02/03109

41

50. The affinity matrix of claim 1 wherein the polymeric support comprises natural agarose, cross-linked agarose, cross-linked dextran, or polyacrylamide

51. The affinity matrix of claim 2 wherein the particulate polymeric support comprises natural agarose particles, cross-linked agarose particles, cross-linked dextran particles, or polyacrylamide particles.

52. The affinity matrix of claim 50 wherein the cross-linked agarose comprises particles about 20 to about 300 micrometers in diameter.

53. The affinity matrix of claim 50 wherein the cross-linked agarose comprises particles about 30 to about 250 micrometers in diameter.

54. The affinity matrix of claim 50 wherein the cross-linked agarose comprises particles about 40 to about 165 micrometers in diameter.

55. The affinity matrix of claim 50 wherein the natural agarose comprises particles about 30 to about 250 micrometers in diameter.

56. The affinity matrix of claim 50 wherein the cross-linked dextran comprises particles about 20 to about 400 micrometers in diameter.

57. The affinity matrix of claim 50 wherein the polyacrylamide comprises particles about 30 to about 150 micrometers in diameter.

58. The affinity matrix of claim 1 wherein the dye is directly covalently attached to the polymer.

59. The affinity matrix of claim 1 wherein the amount of dye that is attached to the polymeric support comprises between about 0.5 micromoles of dye/cm<sup>3</sup> of polymeric support to about 20 micromoles of dye/cm<sup>3</sup> of polymeric support.

60. The affinity matrix of claim 1 wherein the amount of dye that is attached to the polymeric support comprises between about 1 micromole of dye/cm<sup>3</sup> of polymeric support to about 6 micromoles of dye/cm<sup>3</sup> of polymeric support.

61. The affinity matrix of claim 1 wherein the amount of dye that is attached to the polymeric support comprises between about 2 micromoles of dye/cm<sup>3</sup> of polymeric support to about 4 micromoles of dye/cm<sup>3</sup> of polymeric support.

62. The affinity matrix of claim 1 wherein the polymer comprises cross-linked agarose particles ranging from about 30 to about 250 micrometers in diameter, said cross-linked agarose particles possessing between about 1 micromole of said dye/cm<sup>3</sup> of cross-linked agarose to about 6 micromoles of said dye /cm<sup>3</sup> of cross-linked agarose.

63. The affinity matrix of claim 1 wherein the polymer comprises cross-linked agarose particles ranging from about 40 to about 165 micrometers in diameter, said cross-linked agarose particles possessing between about 2 micromole of said dye/cm<sup>3</sup> of cross-linked agarose to about 4 micromoles of said dye /cm<sup>3</sup> of cross-linked agarose.

64. The affinity matrix of claim 1 wherein the affinity ligands are selected from the group consisting of streptavidin, monomeric streptavidin, a molecule with the binding properties of streptavidin, avidin, monomeric avidin, a molecule with the binding properties of avidin, streptactin, monomeric streptactin, a molecule with the binding properties of streptactin, extravidin, monomeric extravidin, a molecule with the binding properties of extravidin, neutravidin, monomeric neutravidin, a molecule with the binding properties of neutravidin, protein A, a molecule with the binding properties of protein A, protein L, a molecule with the binding properties of protein L, protein G, a molecule with the binding properties of protein G, protein A/G, a molecule with the binding properties of protein A/G, protein L/A, a molecule with the binding properties of protein L/A, calmodulin, a molecule with the binding properties of calmodulin, biotin, a molecule with the binding properties of biotin, metal chelates, glutathione, and antibodies.

65. The affinity matrix of claim 1 wherein the affinity matrix is collectable from the solution by centrifugation of less than 700 x g.

66. The affinity matrix of claim 1 comprising a mixture of a non-colored affinity matrix and a colored polymeric support, the colored polymeric support comprising a polymer and a dye attached to the polymer.

67. The affinity matrix of claim 66 wherein the colored polymeric support comprises between about 1% by volume to about 95% by volume of the affinity matrix.

68. The affinity matrix of claim 66 wherein the colored polymeric support comprises between about 2% by volume to about 50% by volume of the affinity matrix.

69. The affinity matrix of claim 66 wherein the colored polymeric support comprises between about 2% by volume to about 10% by volume of the affinity matrix.

70. The affinity matrix of claim 66 wherein the non-colored affinity matrix comprises an antibody binding matrix.

71. The affinity matrix of claim 70 wherein the antibody binding matrix is selected from the group consisting of protein A agarose, agarose modified with a molecule with the binding properties of protein A, protein G agarose, agarose modified with a molecule with the binding properties of protein G, protein L  
5 agarose, agarose modified with a molecule with the binding properties of protein

L, protein A/G agarose, agarose modified with a molecule with the binding properties of protein A/G, protein L/A agarose, and agarose modified with a molecule with the binding properties of protein L/A.

72. The affinity matrix of claim 66 wherein the non-colored affinity matrix comprises a matrix with attached antibodies.

73. The affinity matrix of claim 72 wherein the matrix with attached antibodies comprises a matrix with antibodies to particular proteins.

74. The affinity matrix of claim 72 wherein the matrix with attached antibodies comprises a matrix with antibodies to specific peptide tags on fusion proteins.

75. The affinity matrix of claim 72 wherein the matrix with attached antibodies comprises a matrix with antibodies to epitopes within proteins.

76. The affinity matrix of claim 72 wherein the antibodies are selected from the group consisting of antibodies having specificity for at least a portion of the amino acid sequence DYKDDDDK anti-FLAG™ ("DYKDDDDK"), anti-polyhistidine, anti-glutathione-S-transferase, anti-myc-tag, anti-Avi-tag, anti-HA,  
5 anti-Green fluorescent protein, anti-beta galactosidase, anti-thioredoxin, anti-maltose binding protein, anti-cellulose binding domain, anti-VSV glycoprotein, and anti-luciferase.

77. The affinity matrix of claim 66 wherein the non-colored affinity matrix comprises a matrix with attached affinity ligands.

78. The affinity matrix of claim 77 wherein the affinity ligands are selected from the group consisting of streptavidin, monomeric streptavidin, a molecule with the binding properties of streptavidin, avidin, monomeric avidin, a molecule with the binding properties of avidin, streptactin, monomeric streptactin,  
5 a molecule with the binding properties of streptactin, extravidin, monomeric extravidin, a molecule with the binding properties of extravidin, neutravidin, monomeric neutravidin, a molecule with the binding properties of neutravidin, protein A, a molecule with the binding properties of protein A, protein L, a molecule with the binding properties of protein L, protein G, a molecule with the  
10 binding properties of protein G, protein A/G, a molecule with the binding properties of protein A/G, protein L/A, a molecule with the binding properties of protein L/A, calmodulin, a molecule with the binding properties of calmodulin, biotin, a molecule with the binding properties of biotin, metal chelates, and glutathione.

79. A method for the isolation of a biomolecule from a sample aqueous solution, the method comprising

combining the aqueous solution with an affinity matrix comprising a polymeric support, a dye attached to a fraction of the polymeric support to enable  
5 optical detection of the affinity matrix, and an affinity ligand other than the dye

attached to a fraction of the polymeric support for the capture of the biomolecule,  
and

separating the affinity matrix from the sample aqueous solution.

80. The method of claim 79 wherein the affinity matrix is optically monitored during the separation step to avoid the loss of affinity matrix.

81. The method of claim 79 wherein the separation step is carried out manually and the affinity matrix is visually monitored during the separation to avoid the loss of affinity matrix.

82. The method of claim 79 wherein the affinity ligand is selected from the group consisting of streptavidin, monomeric streptavidin, a molecule with the binding properties of streptavidin, avidin, monomeric avidin, a molecule with the binding properties of avidin, streptactin, monomeric streptactin, a molecule with  
5 the binding properties of streptactin, extravidin, monomeric extravidin, a molecule with the binding properties of extravidin, neutravidin, monomeric neutravidin, a molecule with the binding properties of neutravidin, protein A, a molecule with the binding properties of protein A, protein L, a molecule with the binding properties of protein L, protein G, a molecule with the binding properties of protein G, protein  
10 A/G, a molecule with the binding properties of protein A/G, protein L/A, a molecule with the binding properties of protein L/A, calmodulin, a molecule with the binding properties of calmodulin, biotin, and a molecule with the binding properties of biotin, metal chelates, glutathione, and antibodies.

83. The method of claim 79 wherein the aqueous sample solution containing the biomolecule is added to the affinity matrix.
84. The method of claim 79 wherein the method is an immunoprecipitation.
85. The method of claim 79 wherein the biomolecule comprises a naturally occurring biomolecule, a synthetic biomolecule, a modified naturally occurring biomolecule, or a modified synthetic biomolecule.
86. The method of claim 85 wherein the biomolecule is selected from the group consisting of (i) peptides, polypeptides, individual proteins, glycoproteins, enzymes, nucleotides, polynucleotides, nucleic acid polymers, carbohydrates, lipids, and (ii) complexes containing a biomolecule of group (i).
87. The method of claim 85 wherein the biomolecule comprises a protein.
88. The method of claim 79 wherein the aqueous sample solution is selected from the group consisting of a lysate, lysate fractions, a buffered solution containing unpurified biomolecules, and a buffered solution containing purified biomolecules.

89. The method of claim 79 wherein the aqueous sample solution comprises a lysate.

90. The method of claim 79 wherein the process additionally comprises the step of washing the affinity matrix with an aqueous wash solution after it has been separated from the sample solution, separating the affinity matrix from the aqueous wash solution, and optically monitoring the affinity matrix as it is  
5 separated from the aqueous wash solution.

91. The method of claim 90 wherein the aqueous wash solution comprises a lysis buffer.

92. The method of claim 79 further comprising releasing the biomolecules which are bound to the affinity matrix.

93. The method of claim 90 further comprising releasing the biomolecules which are bound to the affinity matrix.

94. The method of claim 92 further comprising subjecting the biomolecules to a method of analysis.

95. The method of claim 93 further comprising subjecting the biomolecules to a method of analysis.

96. The method of claim 95 wherein the method of analysis comprises SDS-PAGE.

97. The method of claim 95 wherein the method of analysis comprises an enzymatic assay.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/03109
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : G01N 21/64, 21/76, 33/53, 33/543; C12N 11/18 US CL : 250/458.1, 459.1, 461.1, 483.1, 486.1; 422/57, 58, 60, 82.05, 82.07, 82.11; 424/450; 435/7.1, 7.2, 7.92, 7.94, 174, 175, 440; 436/164, 182, 501, 518, 525, 532, 546, 800, 805, 819, 829;		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Confirmation Sheet		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Derwent, STN		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, STN		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,597,485 A (MAZZA et al) 28 January 1997 (28.01.1997), whole document.	1-97
A	US 5,914,241 A (VALKIRS) 22 June 1999 (22.06.1999), whole document.	1-97
A	US 5,643,721 A (SPRING et al) 01 July 1997 (01.07.1997), whole document.	1-97
A	US 5,622,872 A (RIBI) 22 April 1997 (22.04.1997), whole document.	1-97
A	WO 97/12994 A1 (NOVAGEN, INC.) 10 April 1997 (10.04.1997), whole document.	1-97
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<b>* Special categories of cited documents:</b> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance    *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *E* earlier application or patent published on or after the international filing date    *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each contribution being obvious to a person skilled in the art *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed    *A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 May 2002 (09.05.2002)		Date of mailing of the international search report 14 JUN 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Katrice Padmanabhan Telephone No. 703-308-0196

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/US02/03109
<p><b>Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 1:</b> 250/458.1, 459.1, 461.1, 483.1, 486.1; 422/57, 58, 60, 82.05, 82.07, 82.11; 424/450; 435/7.1, 7.2, 7.92, 7.94, 174, 175, 440; 436/164, 182, 501, 518, 528, 532, 546, 800, 805, 819, 829;</p>	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/548	G 0 1 N 33/53	U
	G 0 1 N 33/548	A
	G 0 1 N 27/26	3 0 1 B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 エドワード・ビー・ワトソン・ザ・サード  
 アメリカ合衆国 6 3 1 0 3 ミズーリ州セント・ルイス、スプリング・ストリート 3 0 5 0 番、シグマ - アルドリッチ・カンパニー内
- (72) 発明者 ケネス・イー・ヒューアーマン  
 アメリカ合衆国 6 3 1 0 3 ミズーリ州セント・ルイス、スプリング・ストリート 3 0 5 0 番、シグマ - アルドリッチ・カンパニー内
- (72) 発明者 ジョン・ジー・ダブロン  
 アメリカ合衆国 6 3 1 0 3 ミズーリ州セント・ルイス、スプリング・ストリート 3 0 5 0 番、シグマ - アルドリッチ・カンパニー内

F ターム(参考) 2G054 AA06 AB04 BB04 BB08 CA23 EA06  
 4G066 AC06B AC06C AC27C AD01D AD07D BA09 BA20 CA20 CA54 DA07  
 FA37

专利名称(译)	改进的亲合力矩阵用于分子下拉和免疫沉淀应用的可见性增强		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004532387A</a>	公开(公告)日	2004-10-21
申请号	JP2002561926	申请日	2002-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	西格玛-奥吉奇公司		
申请(专利权)人(译)	西格玛 - Aldrich公司		
[标]发明人	エドワードビーワトソンザサード ケネスイーヒューアーマン ジョンジーダブロン		
发明人	エドワードビーワトソンザサード ケネスイーヒューアーマン ジョンジーダブロン		
IPC分类号	G01N33/543 B01D15/00 B01J20/24 B01J20/28 B01J20/286 B01J20/32 C07K1/22 C12Q1/68 G01N21/78 G01N27/447 G01N33/53 G01N33/548		
CPC分类号	B01D15/00 B01D15/3804 B01D15/3809 B01D15/3823 B01J20/28004 B01J20/286 B01J20/32 B01J20/321 B01J20/3212 B01J20/3242 B01J20/3274 B01J20/3282 C07K1/22 C12Q1/6837 G01N33/543 G01N33/54313 G01N33/582		
FI分类号	G01N33/543.541.Z G01N33/543.525.C B01J20/24.C B01J20/28.Z G01N21/78.Z G01N33/53.D G01N33/53.U G01N33/548.A G01N27/26.301.B		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AB04 2G054/BB04 2G054/BB08 2G054/CA23 2G054/EA06 4G066/AC06B 4G066/AC06C 4G066/AC27C 4G066/AD01D 4G066/AD07D 4G066/BA09 4G066/BA20 4G066/CA20 4G066/CA54 4G066/DA07 4G066/FA37		
代理人(译)	品川EiSatoshi		
优先权	60/265952 2001-02-01 US 60/267460 2001-02-08 US		
其他公开文献	JP4291572B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

用于基于亲和力的分子下拉和免疫沉淀方法的亲和基质。亲和基质包含聚合物载体，附着于聚合物载体的一部分的染料，以能够光学检测聚合物载体，染料与聚合物载体的一部分结合以捕获分子其他亲和配体。还提供了一种从水溶液中分离生物分子的方法。该方法包括将水溶液与包含聚合物载体的亲和基质混合，并将亲和基质与水溶液分离。染料与聚合物载体的一部分结合，这允许光学检测和监测亲和基质，从而降低在分离过程中失去亲和基质的可能性。此外，除染料之外的亲和配体也与聚合物载体的部分结合以捕获生物分子。

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau

(43) International Publication Date  
8 August 2002 (08.08.2002)

(51) International Patent Classification: G01N 21/64  
217B, 217C, 217D, C12Q 1/68

(21) International Application Number: IN/01/002403/09

(22) International Filing Date: 31 January 2002 (31.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60265952 1 February 2001 (01.02.2001) US  
60267460 8 February 2001 (08.02.2001) US

(71) Applicant: SIGMA-ALDRICH CO. (US); 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (US)

(72) Inventors: WATSON, Edward, R. III, c/o Sigma-Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (US); BEIERMANN, Kenneth, E., c/o Sigma-Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (US); DAPFON, John, C., c/o Sigma-Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (US)

(74) Agent: CHEBECOS, Sarah, B. et al., Springer, Powers, Lewis & Roskel, One Metairie Square, Fifth Floor, St. Louis, MO 63102 (US)



(10) International Publication Number  
WO 02/061406 A1

(54) Title: IMPROVED AFFINITY MATRICES WITH ENHANCED VISIBILITY FOR MOLECULAR PULL-DOWN AND IMMUNOPRECIPITATION APPLICATIONS

(57) Abstract: An affinity matrix for use in affinity based molecular pull down and immune precipitation procedures. The affinity matrix comprises a polymeric support, a dye attached to a fraction of the polymeric support to enable optical detection of the polymeric support, and an affinity ligand other than the dye attached to a fraction of the polymeric support for the capture of a molecule. Also provided is a method for the isolation of a biomolecule from an aqueous solution. The method comprises incubating the aqueous solution with an affinity matrix comprising a polymeric support and separating the affinity matrix from the aqueous solution. A dye is attached to a fraction of the polymeric support to enable optical detection and quantification of the affinity matrix and

(54) Title: IMPROVED AFFINITY MATRICES WITH ENHANCED VISIBILITY FOR MOLECULAR PULL-DOWN AND IMMUNOPRECIPITATION APPLICATIONS

(57) Abstract: An affinity matrix for use in affinity based molecular pull down and immune precipitation procedures. The affinity matrix comprises a polymeric support, a dye attached to a fraction of the polymeric support to enable optical detection of the polymeric support, and an affinity ligand other than the dye attached to a fraction of the polymeric support for the capture of a molecule. Also provided is a method for the isolation of a biomolecule from an aqueous solution. The method comprises incubating the aqueous solution with an affinity matrix comprising a polymeric support and separating the affinity matrix from the aqueous solution. A dye is attached to a fraction of the polymeric support to enable optical detection and quantification of the affinity matrix and

Published:  
with international search report  
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For machine-readable copies and other abbreviations, refer to the "Briefing Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.