



(10) 授权公告号 CN 113424064 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 04

(21) 申请号 202080013006.6

(22) 申请日 2020.02.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113424064 A

(43) 申请公布日 2021.09.21

(30) 优先权数据
62/803,365 2019.02.08 US
62/866,526 2019.06.25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.06

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/017333 2020.02.07

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/163795 EN 2020.08.13

(73) 专利权人 露点治疗公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 B·A·比特尔
P·J·达恩德里克尔 S·P·哈雷
M·A·穆科 E·E·博泽克

M·米塔施 D·M·密特拉

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
专利代理师 王永伟

(51) Int.Cl.
G01N 33/68 (2006.01)

(56) 对比文件
Salman F. Banani.Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies.《cell》.2016,第166卷(第3期),摘要、第652页.

Salman F. Banani.Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies.《cell》.2016,第166卷(第3期),摘要、第652页.

Eric J. Lanni.Mass spectrometry imaging and profiling of single cells.《JOURNAL OF PROTEOMICS》.2012,第75卷(第16期),摘要.

审查员 姜紫耀

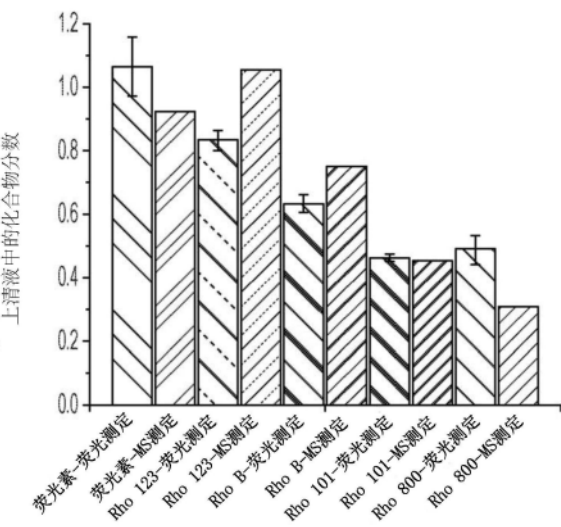
权利要求书5页 说明书49页 附图9页

(54) 发明名称

表征化合物的凝聚物缔合特征的方法及其用途

(57) 摘要

提供了评估(如表征或确定)化合物(如测试化合物)的凝聚物缔合特征的方法及其应用。例如,提供了确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法、确定测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征的方法和确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法。此外,提供了设计和/或鉴定和/或制备具有期望的相对凝聚物分配特征的化合物或其部分的方法。



1. 确定小分子测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,所述方法包括:
 - (a) 将所述小分子测试化合物与包含所述目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物组合;
 - (b) 将所述目标凝聚物与所述凝聚物外溶液分离;
 - (c) 基于所述凝聚物外溶液中的所述测试化合物的量,通过质谱法,确定所述目标凝聚物中的所述小分子测试化合物的量,从而确定所述小分子测试化合物在所述目标凝聚物中的分配特征。
2. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括在步骤(a)之前导致所述目标凝聚物形成。
3. 确定小分子测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,所述方法包括:
 - (a) 在所述小分子测试化合物存在的情况下导致所述目标凝聚物形成,以获得包含所述目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物;和
 - (b) 将所述目标凝聚物与所述凝聚物外溶液分离;和
 - (c) 基于所述凝聚物外溶液中的所述测试化合物的量,通过质谱法,确定所述目标凝聚物中的所述小分子测试化合物的量,从而确定所述测试化合物在所述目标凝聚物中的分配特征。
4. 根据权利要求3所述的方法,进一步包括在步骤(a)之前将所述小分子测试化合物与包含前体分子的前体组合物组合。
5. 根据权利要求3所述的方法,进一步包括在步骤(a)之前将所述小分子测试化合物添加到包含前体分子的前体组合物中。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中在确定所述凝聚物外溶液中的所述小分子测试化合物的量之前、同时或之后,确定所述目标凝聚物中的所述小分子测试化合物的量。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,进一步包括确定所述目标凝聚物中的所述小分子测试化合物的量与所述凝聚物外溶液中的所述小分子测试化合物的量的比率。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,进一步包括将所述目标凝聚物与所述凝聚物外溶液分离。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,进一步包括在确定所述目标凝聚物中的所述小分子测试化合物的量之前鉴定所述目标凝聚物。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述目标凝聚物的失调与疾病相关。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,进一步包括表征所述目标凝聚物,所述表征通过鉴定其中包含的一种或多种大分子进行。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述鉴定包括确定所述目标凝聚物中的所述一种或多种大分子的量。
13. 根据权利要求12所述的方法,进一步包括确定所述目标凝聚物中的所述小分子测试化合物的量与所述目标凝聚物中的所述一种或多种大分子的量的比率。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述目标凝聚物包括蛋白质,所述蛋白质包含固有无序的序列。
15. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法,进一步包括标记所述目标凝聚物,以使所述目标凝聚物可视化。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述目标凝聚物用放射性标记、比色标记或荧光标记进行标记。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述组合物包含细胞。
18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述细胞是微生物或动物细胞。
19. 根据权利要求17或18所述的方法,其中所述细胞包含被确定失调的凝聚物。
20. 根据权利要求17-19中任一项所述的方法,其中所述细胞具有神经变性疾病或增殖性疾病的一个或多个特征。
21. 根据权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述目标凝聚物是细胞凝聚物。
22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述细胞凝聚物是裂解体、P-颗粒、组蛋白基因座体、多泡体、神经元RA颗粒、核叶芽、核孔、核斑、核应力体、核仁、Oct1/PTF/转录(OPT)域、旁斑、核仁周室、PML核体、PML致癌域、多梳体、加工体、Sam68核体、应力颗粒或剪接斑。
23. 根据权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述目标凝聚物在细胞中。
24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述细胞是微生物或动物细胞。
25. 根据权利要求23或24所述的方法,其中所述细胞具有神经变性疾病或增殖性疾病的一个或多个特征。
26. 根据权利要求1-25中任一项所述的方法,其中所述凝聚物外溶液是细胞内液。
27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述细胞内液是胞质溶胶或核溶胶。
28. 根据权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述目标凝聚物不在细胞中。
29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述目标凝聚物是细胞外凝聚物。
30. 根据权利要求1-20、28或29中任一项所述的方法,其中所述凝聚物外溶液是细胞外液。
31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述细胞外液是间质液。
32. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述方法是无细胞测定法。
33. 根据权利要求1-32中任一项所述的方法,其中所述组合物包含以下中的一种或多种:大分子、盐和缓冲剂。
34. 根据权利要求1-33中任一项所述的方法,其中所述组合物包含两种或更多种目标凝聚物。
35. 根据权利要求1-34中任一项所述的方法,其中所述方法包括对于一种或多种另外的凝聚物重复所述方法的步骤。
36. 根据权利要求1-35中任一项所述的方法,其中所述小分子测试化合物包含测试化合物标记。
37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述测试化合物标记是放射性标记、比色标记或荧光标记。
38. 根据权利要求36或37所述的方法,其中所述测试化合物标记是荧光标记。
39. 根据权利要求36-38中任一项所述的方法,其中所述测试化合物的量通过检测所述测试化合物标记来确定。
40. 确定多种小分子测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,所述方法包括用所述多种小分子测试化合物进行根据权利要求1-39中任一项所述的方法。
41. 根据权利要求40所述的方法,进一步包括比较所述多种小分子测试化合物的子集或全部在所述目标凝聚物中的分配特征。
42. 根据权利要求41所述的方法,进一步包括鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的

分配特征的小分子测试化合物。

43. 根据权利要求42所述的方法,其进一步包括鉴定所鉴定的小分子测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征之外还共同具有的特征。

44. 根据权利要求43所述的方法,进一步包括确定包含所鉴定的特征的一种或多种另外的小分子测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

45. 根据权利要求43或44所述的方法,进一步包括确定不包含所鉴定的特征的一种或多种另外的小分子测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

46. 确定小分子测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,所述方法包括:

- (a) 将所述小分子测试化合物与包含所述目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物组合;
 - (b) 获得参考对照;
 - (c) 利用质谱技术测量所述凝聚物外溶液中的所述小分子测试化合物或其部分的MS信号;
 - (d) 利用质谱技术测量所述参考对照中的所述小分子测试化合物或其部分的MS信号;
- 和

(e) 比较来自所述凝聚物外溶液的所述小分子测试化合物的MS信号和来自所述参考对照的所述测试化合物的MS信号,

从而确定所述小分子测试化合物在所述目标凝聚物中的分配特征。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中与所述组合物组合的所述小分子测试化合物的量为100nM或更小,并且所述组合物中包括所述目标凝聚物中的前体分子的量为约5 μ M。

48. 确定小分子测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征的方法,所述方法包括:

(i) 通过用所述小分子测试化合物进行根据权利要求1-39、46或47中任一项所述的方法来确定所述小分子测试化合物的分配特征;

(ii) 通过用参考化合物进行根据权利要求1-39、46或47中任一项所述的方法来确定参考化合物的分配特征;和

(iii) 计算在(i)和(ii)中确定的分配特征的比率,

从而确定所述小分子测试化合物在所述目标凝聚物中的相对分配特征。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述小分子测试化合物包括测试化合物标记。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述参考化合物是所述测试化合物标记。

51. 确定多种小分子测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征的方法,所述方法包括:

- (1) 进行根据权利要求48-50中任一项所述的方法;和
- (2) 用所述多种小分子测试化合物重复步骤(i)和(iii)。

52. 根据权利要求51所述的方法,进一步包括比较所述多种小分子测试化合物的子集或全部在所述目标凝聚物中的相对分配特征。

53. 根据权利要求52所述的方法,进一步包括鉴定在所述目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的小分子测试化合物。

54. 根据权利要求53所述的方法,进一步包括鉴定所鉴定的小分子测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征之外还共同具有的特征。

55. 根据权利要求54所述的方法,进一步包括确定包含所鉴定的特征的一种或多种另

外的小分子的测试化合物在所述目标凝聚物中的相对分配特征。

56. 根据权利要求54或55所述的方法, 进一步包括确定不包含所鉴定的特征的一种或多种另外的小分子测试化合物在所述目标凝聚物中的相对分配特征。

57. 确定小分子测试化合物的凝聚物偏好概况的方法, 所述方法包括:

(a) 利用根据权利要求1-39、46或47中任一项所述的方法确定所述小分子测试化合物在第一目标凝聚物中的分配特征;

(b) 利用根据权利要求1-39、46或47中任一项所述的方法确定所述小分子测试化合物在第二目标凝聚物中的分配特征; 和

(c) 计算在所述第一目标凝聚物和所述第二目标凝聚物中确定的所述小分子测试化合物的分配特征的比率,

从而确定所述小分子测试化合物的凝聚物偏好概况。

58. 根据权利要求57所述的方法, 其中所述第一目标凝聚物和所述第二目标凝聚物在相同的组合物中。

59. 根据权利要求57所述的方法, 其中所述第一目标凝聚物和所述第二目标凝聚物在不同的组合物中。

60. 根据权利要求57-59中任一项所述的方法, 其中在确定所述小分子测试化合物在所述第二目标凝聚物中的分配特征之前、同时或之后, 确定所述小分子测试化合物在所述第一目标凝聚物中的分配特征。

61. 确定小分子测试化合物的凝聚物偏好概况的方法, 所述方法包括:

(a) 利用根据权利要求48-50中任一项所述的方法确定所述小分子测试化合物在第一目标凝聚物中的相对分配特征;

(b) 利用根据权利要求48-50中任一项所述的方法确定所述小分子测试化合物在第二目标凝聚物中的相对分配特征; 和

(c) 计算在所述第一目标凝聚物和所述第二目标凝聚物中确定的所述小分子测试化合物的分配特征的比率,

从而确定所述小分子测试化合物的凝聚物偏好概况。

62. 根据权利要求61所述的方法, 其中所述第一目标凝聚物和所述第二目标凝聚物在相同的组合物中。

63. 根据权利要求61所述的方法, 其中所述第一目标凝聚物和所述第二目标凝聚物在不同的组合物中。

64. 根据权利要求61-63中任一项所述的方法, 其中在确定所述小分子测试化合物在所述第二目标凝聚物中的相对分配特征之前、同时或之后, 确定所述小分子测试化合物在所述第一目标凝聚物中的相对分配特征。

65. 根据权利要求57-64中任一项所述的方法, 进一步包括标记所述第一目标凝聚物和所述第二目标凝聚物, 以使所述第一凝聚物目标凝聚物和所述第二目标凝聚物可视化。

66. 根据权利要求65所述的方法, 其中所述第一目标凝聚物和所述第二目标凝聚物用不同的标记进行标记。

67. 根据权利要求57-66中任一项所述的方法, 其中所述方法包括对于一种或多种另外的目标凝聚物重复所述方法的步骤。

68. 确定多种小分子测试化合物的凝聚物偏好概况的方法, 所述方法包括用所述多种小分子测试化合物进行根据权利要求57-67中任一项所述的方法。

69. 根据权利要求68所述的方法, 进一步包括比较所述多种小分子测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况。

70. 根据权利要求69所述的方法, 进一步包括鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的小分子测试化合物。

71. 根据权利要求70所述的方法, 其进一步包括鉴定所鉴定的小分子测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况之外还共同具有的特征。

72. 根据权利要求71所述的方法, 进一步包括确定包含所鉴定的特征的一种或多种另外的小分子测试化合物的相对分配特征。

73. 根据权利要求71或72所述的方法, 进一步包括确定不包含所鉴定的特征的一种或多种另外的小分子测试化合物的相对分配特征。

表征化合物的凝聚物缔合特征的方法及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年2月8日提交的美国临时专利申请第62/803,365号和2019年6月25日提交的美国临时专利申请第62/866,526号的优先权权益,其公开内容均在此通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及生物凝聚物(condensates)领域。

背景技术

[0004] 除了膜结合的细胞器如线粒体、溶酶体和内质网外,细胞还包含不同的亚隔室,该亚隔室不包括在其和其紧邻周围溶液之间的膜。这些无膜分子组件中的很多已被证明是通过称为液-液相分离或凝聚的过程形成的。在此过程中,包含生物大分子的溶液分离成不同的相,富有那些大分子其中一些的凝聚物和那些大分子相对缺乏的周围相。多种细胞凝聚物已被识出。另外,相分离的凝聚物可以在细胞外形成,如在溶液中或在细胞外(Alberti et al., J Mol Biol, 430(23), 2018, 4806-4820; Muiznieks et al., J Mol Biol, 430(23), 2018, 4741-4753)。然而,关于控制化合物分配到凝聚物中或化合物从凝聚物中排除的机制或化合物在各种凝聚物之间的分配差异,知之甚少或一无所知。

[0005] 已知各种凝聚物对于调节细胞过程很重要。例如,凝聚物可以将浓度升高的分子聚集在一起以加速凝聚物内的反应,或者可以在凝聚物中隔离分子,降低其在周围介质中的浓度。异常的凝聚功能也涉及各种人类疾病,如神经变性疾病和增殖性疾病(Naumann et al., Nat Commun, 9(1), 2018, 335; Wegmann et al., EMBO J, 37(7), 2018, e98049; Aguzzi et al., Trends Cell Biol, 26(7), 2016, 547-558)。然而,除了对控制化合物的凝聚物分配的机制缺乏了解之外,关于如何鉴定与凝聚物相互作用的测试化合物、如何设计化合物以改善与凝聚物的相互作用以及如何能够将这种信息用于改善疾病的治疗,也是知之甚少或一无所知。

[0006] 本文引用的所有参考文献,包括专利申请和出版物,均整体通过引用并入。

发明内容

[0007] 在一些方面,本文提供了确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a)将测试化合物与包含目标凝聚物和凝聚物外溶液(凝聚物以外的溶液, extra-condensate solution)的组合物组合;(b)确定目标凝聚物中的测试化合物量,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括在步骤(a)之前导致目标凝聚物形成。

[0008] 在一些方面,本文提供了确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a)将测试化合物添加到包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物中;(b)确定目标凝聚物中的测试化合物量,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。在一些

实施方式中,该方法进一步包括在步骤(a)之前导致目标凝聚物形成。

[0009] 在一些方面,本文提供了确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a)在测试化合物的存在下导致目标凝聚物形成以获得包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物;(b)确定目标凝聚物中的测试化合物量,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0010] 在一些方面,本文提供了确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a)将测试化合物添加到包含前体分子的组合物中;(b)导致目标凝聚物形成以获得包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物;(c)确定目标凝聚物中的测试化合物量,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括在步骤(a)之前将测试化合物与包含前体分子的前体组合物组合。在一些实施方式中,该方法进一步包括在步骤(a)之前将测试化合物添加到包含前体分子的前体组合物中。

[0011] 在一些实施方式中,该方法进一步包括确定凝聚物外溶液中的测试化合物量。在一些实施方式中,在确定凝聚物外溶液中的测试化合物量之前、同时或之后,确定目标凝聚物中的测试化合物量。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定目标凝聚物中的测试化合物量与凝聚物外溶液中的测试化合物量的比率。在一些实施方式中,该方法进一步包括将目标凝聚物与凝聚物外溶液分离。在一些实施方式中,该方法进一步包括在确定目标凝聚物中的测试化合物量之前鉴定目标凝聚物。

[0012] 在一些实施方式中,目标凝聚物的失调与疾病相关。在一些实施方式中,该方法进一步包括表征目标凝聚物——通过鉴定其中包含的一种或多种大分子。在一些实施方式中,鉴定包括确定目标凝聚物中所述一种或多种大分子的量。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定目标凝聚物中测试化合物的量与目标凝聚物中所述一种或多种大分子的量的比率。在一些实施方式中,目标凝聚物包含蛋白质,该蛋白质包含固有无序的序列。在一些实施方式中,该方法进一步包括标记目标凝聚物以使目标凝聚物可视化。在一些实施方式中,将目标凝聚物用放射性标记、比色标记、化学反应性标记或荧光标记进行标记。

[0013] 在一些实施方式中,组合物包含细胞。在一些实施方式中,细胞是微生物或动物细胞。在一些实施方式中,细胞包含被确定为失调的凝聚物。在一些实施方式中,细胞具有神经变性疾病或增殖性疾病的一个或多个特征。

[0014] 在一些实施方式中,目标凝聚物是细胞凝聚物。在一些实施方式中,细胞凝聚物是裂解体、P-颗粒、组蛋白基因座体、多泡体、神经元RNA颗粒、核叶芽(nuclear gem)、核孔、核斑、核应力体、核仁、Oct1/PTF/转录(OPT)域、旁斑、核仁周室、PML核体、PML致癌域、多梳体、加工体、信号传导簇、Sam68核体、应力颗粒或剪接斑。在一些实施方式中,目标凝聚物在细胞中。在一些实施方式中,细胞是微生物或动物细胞。在一些实施方式中,细胞具有神经变性疾病或增殖性疾病的一个或多个特征。在一些实施方式中,凝聚物外溶液是细胞内液。在一些实施方式中,细胞内液是胞质溶胶或核溶胶。

[0015] 在一些实施方式中,目标凝聚物不在细胞中。在一些实施方式中,目标凝聚物是细胞外凝聚物。在一些实施方式中,凝聚物外溶液是细胞外液。在一些实施方式中,细胞外液是间质液。

[0016] 在一些实施方式中,该方法是无细胞测定方法。在一些实施方式中,组合物不包含细胞。在一些实施方式中,组合物包含以下中的一种或多种:大分子、盐和缓冲剂。

[0017] 在一些实施方式中,组合物包含两种或更多种目标凝聚物。在一些实施方式中,该方法进一步包括对于一种或多种另外的凝聚物重复该方法的步骤。

[0018] 在一些实施方式中,测试化合物是小分子、多肽或核酸。在一些实施方式中,测试化合物包含测试化合物标记。在一些实施方式中,测试化合物标记是放射性标记、比色标记、化学反应性标记或荧光标记。在一些实施方式中,测试化合物标记是荧光标记。在一些实施方式中,测试化合物的量通过检测测试化合物标记来确定。在一些实施方式中,测试化合物的量通过质谱法、液相色谱法、定量荧光显微术和光谱法、核磁共振波谱法、拉曼光谱法和/或紫外-可见分光光度法确定。

[0019] 在一些方面,本文提供了确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括用多种测试化合物实施本文所述确定分配特征的方法。在一些实施方式中,该方法进一步包括比较目标凝聚物中的所述多种测试化合物的子集(subset)或全部的分配特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物。在一些实施方式中,该方法进一步包括鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征之外还共同具有的特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定不包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0020] 在一些方面,本文提供了确定测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征的方法,该方法包括:(i)通过用测试化合物实施本文所述确定分配特征的方法来确定测试化合物的分配特征;(ii)通过用参考化合物实施本文所述确定分配特征的方法来确定参考化合物的分配特征;(iii)计算在(i)和(ii)中确定的分配特征的比率,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征。在一些实施方式中,测试化合物包含测试化合物标记。在一些实施方式中,参考化合物是测试化合物标记。

[0021] 在一些方面,本文提供了确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征的方法,该方法包括:(1)实施确定测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征的方法;(2)用多种测试化合物重复步骤(i)和(iii)。在一些实施方式中,该方法进一步包括比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物。在一些实施方式中,该方法进一步包括鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征之外还共同具有的特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定不包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征。

[0022] 在一些方面,本文提供了确定测试化合物的凝聚物偏好概况(profile)的方法,该方法包括:(a)根据本文公开的方法确定测试化合物在第一目标凝聚物中的分配特征;(b)根据本文公开的方法确定测试化合物在第二目标凝聚物中的分配特征;和(c)计算在第一目标凝聚物和第二目标凝聚物中确定的测试化合物的分配特征的比率,从而确定测试化合物的凝聚物偏好概况。在一些实施方式中,第一目标凝聚物和第二目标凝聚物在相同的组合物中。在一些实施方式中,第一目标凝聚物和第二目标凝聚物在不同的组合物中。在一些

实施方式中,在确定测试化合物在第二目标凝聚物中的分配特征之前、同时或之后,确定测试化合物在第一目标凝聚物中的分配特征。

[0023] 在一些方面,本文提供了确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括:(a) 根据本文公开的方法确定测试化合物在第一目标凝聚物中的相对分配特征;(b) 根据本文公开的方法确定测试化合物在第二目标凝聚物中的相对分配特征;和(c) 计算在第一目标凝聚物和第二目标凝聚物中确定的测试化合物的分配特征的比率,从而确定测试化合物的凝聚物偏好概况。在一些实施方式中,第一目标凝聚物和第二目标凝聚物在相同的组合物中。在一些实施方式中,第一目标凝聚物和第二目标凝聚物在不同的组合物中。在一些实施方式中,在确定测试化合物在第二目标凝聚物中的相对分配特征之前、同时或之后,确定测试化合物在第一目标凝聚物中的相对分配特征。

[0024] 在一些方面,本文提供了确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括:(a) 将测试化合物添加到包含第一目标凝聚物和第二目标凝聚物的组合物中;(b) 确定第一目标凝聚物中的测试化合物量;(c) 确定第二目标凝聚物中的测试化合物量;和(d) 计算在第一目标凝聚物和第二目标凝聚物中确定的测试化合物量的比率,从而确定测试化合物的凝聚物偏好概况。在一些实施方式中,该方法进一步包括在步骤(a)之前导致第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物形成。

[0025] 在一些方面,本文提供了确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括:(a) 将测试化合物添加到包含前体分子的组合物中;(b) 导致在组合物中第一目标凝聚物和第二目标凝聚物形成;(c) 确定第一目标凝聚物中的测试化合物量;(d) 确定第二目标凝聚物中的测试化合物量;(e) 计算在第一目标凝聚物和第二目标凝聚物中确定的测试化合物的量的比率,从而确定测试化合物的凝聚物偏好概况。在一些实施方式中,在确定第二目标凝聚物中的测试化合物量之前、同时或之后,确定第一目标凝聚物中的测试化合物量。

[0026] 在一些实施方式中,该方法进一步包括从组合物分离第一目标凝聚物和第二目标凝聚物。在一些实施方式中,该方法进一步包括,在确定第一凝聚物和/或第二凝聚物中的测试化合物量之前,鉴定第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物。

[0027] 在一些实施方式中,第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物的失调与疾病相关。在一些实施方式中,该方法进一步包括表征第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物——通过鉴定其中包含的一种或多种大分子。在一些实施方式中,该方法进一步包括标记第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物,以使第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物可视化。在一些实施方式中,该方法进一步包括标记第一目标凝聚物和第二目标凝聚物,以使第一目标凝聚物和第二目标凝聚物可视化。在一些实施方式中,第一目标凝聚物和第二目标凝聚物被标记有不同的标记。在一些实施方式中,第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物用放射性标记、比色标记、化学反应性标记或荧光标记进行标记。

[0028] 在一些实施方式中,组合物包含细胞。在一些实施方式中,细胞是微生物或动物细胞。在一些实施方式中,细胞包含被确定失调的凝聚物。在一些实施方式中,细胞具有神经变性疾病或增殖性疾病的一个或多个特征。

[0029] 在一些实施方式中,第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物是细胞凝聚物。在一些实施方式中,第一目标凝聚物是裂解体、P-颗粒、组蛋白基因座体、多泡体、神经元RNA颗粒、核叶芽、核孔、核斑、核应力体、核仁、Oct1/PTF/转录(OPT)域、旁斑、核仁周室、PML核体、PML

致癌域、多梳体、加工体、信号传导簇、病毒凝聚物、Sam68核体、应力颗粒或剪接斑。在一些实施方式中,第二目标凝聚物是裂解体、P-颗粒、组蛋白基因座体、多泡体、神经元RNA颗粒、核叶芽、核孔、核斑、核应力体、核仁、Oct1/PTF/转录(OPT)域、旁斑、核仁周室、PML核体、PML致癌域、多梳体、加工体、信号传导簇、病毒凝聚物、Sam68核体、应力颗粒或剪接斑。在一些实施方式中,第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物在细胞中。

[0030] 在一些实施方式中,第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物是细胞外凝聚物。

[0031] 在一些实施方式中,组合物不包含细胞。在一些实施方式中,组合物包含以下中的一种或多种:大分子、盐和缓冲剂。

[0032] 在一些实施方式中,组合物包含一种或多种另外的目标凝聚物。在一些实施方式中,该方法进一步包括对于一种或多种另外的目标凝聚物重复该方法的步骤。

[0033] 在一些方面,本文提供了确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括使用多种测试化合物实施本文所述的确 定凝聚物偏好概况的方法。在一些实施方式中,该方法进一步包括比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况。在一些实施方式中,该方法进一步包括鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物。在一些实施方式中,该方法进一步包括鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况之外还共同具有的特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物的相对分配特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定不包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物的相对分配特征。

[0034] 在一些方面,本文提供了鉴定与化合物分配到凝聚物之内或之外相关的化合物特征的方法,该方法包括:(a)根据本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标化合物中的分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征之外还共同具有的特征。

[0035] 在一些方面,本文提供了鉴定与化合物分配到凝聚物中相关的化合物特征的方法,该方法包括:(a)根据本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标化合物中的分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征之外还共同具有的特征。

[0036] 在一些方面,本文提供了鉴定与化合物分配到凝聚物之内或之外相关的化合物特征的方法,该方法包括:(a)根据本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征之外还共同具有的特征。

[0037] 在一些方面,本文提供了鉴定与化合物分配到凝聚物中相关的化合物特征的方法,该方法包括:(a)根据本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征之外还共同具有的特征。

[0038] 在一些方面,本文提供了鉴定与化合物分配到凝聚物之内或之外相关的化合物特征的方法,该方法包括:(a)根据本文所述的方法确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况;(c)鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外还共同具有的特征。

[0039] 在一些方面,本文提供了鉴定与化合物分配到凝聚物中相关的化合物特征的方法,该方法包括:(a)根据本文所述的方法确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况;(c)鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外还共同具有的特征。

[0040] 在一些方面,本文提供了设计具有期望的在目标凝聚物之内或之外的分配特征的化合物的方法,该方法包括:(a)根据本文所述方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征外还共同具有的特征;和(e) (i)设计包含所鉴定的特征的化合物;或(ii)设计不包含所鉴定的特征的化合物,从而设计具有期望的在目标凝聚物之内或之外的分配特征的化合物。在一些实施方式中,设计化合物包括附接包含所鉴定的特征的部分,从而赋予化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,设计化合物包括去除包含所鉴定的特征的部分,从而赋予化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,设计化合物包括将第一部分改变为包含所鉴定的特征的第二部分,从而赋予化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,化合物全部或部分地利用包括基于建模、计算机和/或计算的技术——例如基于生物信息学、化学信息学和/或人工智能(AI)的技术——的方法来设计。

[0041] 在一些方面,本文提供了设计对目标凝聚物具有期望的分配特征的化合物的方法,该方法包括:(a)根据本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征外还共同具有的特征;和(e)设计包含所鉴定的特征的化合物。在一些实施方式中,设计化合物包括附接包含所鉴定的特征的部分,从而赋予化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,设计化合物包括将第一部分改变为包含所鉴定的特征的第二部分,从而赋予化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,化合物全部或部分地利用包括基于建模、计算机和/或计算的技术——例如基于生物信息学、化学信息学和/或人工智能(AI)的技术——的方法来设计。

[0042] 在一些方面,本文提供了设计具有期望的在目标凝聚物之内或之外的相对分配特征的化合物的方法,该方法包括:(a)根据本文公开的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征外还共同具有的特征;和(e) (i)设计包含所鉴定的特征的化合物;或(ii)设计不包含所鉴定的特征的化合物,

从而设计具有期望的在目标凝聚物之内或之外的相对分配特征的化合物。在一些实施方式中,设计化合物包括附接包含所鉴定的特征的部分,从而赋予化合物以期望的相对分配特征。在一些实施方式中,设计化合物包括去除包含所鉴定的特征的部分,从而赋予化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,设计化合物包括将第一部分改变为包含所鉴定的特征的第二部分,从而赋予化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,化合物全部或部分地利用包括基于建模、计算机和/或计算的技术——例如基于生物信息学、化学信息学和/或人工智能(AI)的技术——的方法来设计。

[0043] 在一些方面,本文提供了设计具有期望的相对分配特征的化合物的方法,该方法包括:(a)根据本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征外还共同具有的特征;和(e)设计包含所鉴定的特征的化合物。在一些实施方式中,设计化合物包括附接包含所鉴定的特征的部分,从而赋予化合物以期望的相对分配特征。在一些实施方式中,设计化合物包括将第一部分改变为包含所鉴定的特征的第二部分,从而赋予化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,化合物全部或部分地利用包括基于建模、计算机和/或计算的技术——例如基于生物信息学、化学信息学和/或人工智能(AI)的技术——的方法来设计。

[0044] 在一些方面,本文提供了设计具有期望的凝聚物偏好概况的化合物的方法,该方法包括:(a)根据本文公开的方法确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况;(c)鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外还共同具有的特征;和(e) (i)设计包含所鉴定的特征的化合物;或(ii)设计不包含所鉴定的特征的化合物,从而设计具有期望的凝聚物偏好概况的化合物。在一些实施方式中,该方法进一步包括制备该化合物。在一些实施方式中,设计化合物包括附接包含所鉴定的特征的部分,从而赋予化合物以期望的凝聚物偏好概况。在一些实施方式中,设计化合物包括去除包含所鉴定的特征的部分,从而赋予化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,设计化合物包括将第一部分改变为包含所鉴定的特征的第二部分,从而赋予化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,化合物全部或部分地利用包括基于建模、计算机和/或计算的技术——例如基于生物信息学、化学信息学和/或人工智能(AI)的技术——的方法来设计。

[0045] 在一些方面,本文提供了设计具有期望的凝聚物偏好概况的化合物的方法,该方法包括:(a)根据本文所述的方法确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况;(c)鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外还共同具有的特征,如化学部分或基序;和(e)设计包含所鉴定的特征的化合物。在一些实施方式中,设计化合物包括附接包含所鉴定的特征的部分,从而赋予化合物以期望的凝聚物偏好概况。在一些实施方式中,设计化合物包括将第一部分改变为包含所鉴定的特征的第二部分,从而赋予化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,提供了通过本文所述的方法设计的多种化合物。在一些实施方式中,化合物全部或部分地利用包括基于

建模、计算机和/或计算的技术——例如基于生物信息学、化学信息学和/或人工智能(AI)的技术——的方法来设计。在一些实施方式中,该方法进一步包括制备该化合物。

[0046] 在一些方面,本文提供了从一组候选化合物筛选具有期望的分配特征的测试化合物的方法,该方法包括:(a) 确定该组候选化合物中每一个的分配特征;(b) 鉴定具有期望的分配特征的测试化合物。在一些实施方式中,该组候选化合物中的每一个的分配特征在体外被确定。在一些实施方式中,测试化合物具有适合用于治疗个体的疾病的分配特征。

[0047] 在一些方面,本文提供了鉴定可用于治疗有需要的个体中的疾病的测试化合物的方法,该方法包括:(a) 鉴定与该疾病相关的目标凝聚物;(b) 确定候选化合物在目标凝聚物中的分配特征,和(c) 鉴定具有适合用于治疗疾病的分配特征的测试化合物。

[0048] 在一些方面,本文提供了确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a) 将测试化合物与包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物组合;(b) 获得参考对照;(c) 利用质谱技术测量凝聚物外溶液中的测试化合物或其部分的MS信号;(d) 利用质谱技术测量参考对照中的测试化合物或其部分的MS信号;和(e) 比较来自凝聚物外溶液的测试化合物的MS信号和来自参考对照的测试化合物的MS信号,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。在一些实施方式中,与组合物组合的测试化合物的量为100nM或更少,并且组合物中——包括目标凝聚物中——的前体分子的量为约5 μ M。

[0049] 在一些方面,本文提供了包含多种化合物的文库,其中所述多种化合物中的每种化合物包含相同的部分,该相同的部分包含具有期望的分配特征的特征。

[0050] 在一些方面,本文提供了设计具有期望的分配特征的测试化合物的方法,该方法包括修饰测试化合物的前体——通过将部分(a moiety)附接至该化合物,其中该部分包含具有期望的分配特征的特征。

[0051] 本领域技术人员还将理解,在不脱离本公开的范围的情况下,可以对本文描述的实施方式的形式和细节进行改动。此外,虽然已经参考各种实施方式对各种优点、方面和目的进行了描述,但本公开的范围不应因提到这些优点、方面和目的而受限。

附图说明

[0052] 图1显示了在凝聚物中的染料分配的示例性荧光图像。染料#10不富集在凝聚物中,而其他染料富集在凝聚物中。

[0053] 图2A和2B描绘了示例性凝聚物内部和外部的区域,该区域被选择以测量染料存在(图2A)和不存在(图2B)情况下的强度。

[0054] 图3显示了针对在来自两个不同实验日的FUS-SNAP凝聚物中的各染料确定的平均内部强度与外部强度(I-in:I-out)的比率。误差棒显示这两个独立实验的标准偏差。

[0055] 图4显示了针对在来自两个不同实验日的PGL-3凝聚物中的各染料确定的平均内部强度与外部强度(I-in:I-out)的比率。误差棒显示这两个独立实验的标准偏差。

[0056] 图5显示了在FUS-SNAP凝聚物中的各染料的平均I-in:I-out比率与在PGL-3凝聚物中的各染料的平均I-in:I-out比率的比率(FUS-SNAP:PGL-3比率)。

[0057] 图6显示了在存在或不存在罗丹明800的情况下利用FUS-GFP通道、罗丹明800通道和其他图像的合并得到的GFP标签标记的FUS凝聚物的荧光图像。

[0058] 图7显示了利用基于荧光的测定和基于质谱的测定两者得到的示例性化合物的上

清液(凝聚物之外)中化合物分数(fraction)的直方图。

[0059] 图8显示了在各种化合物浓度下评价的示例性化合物的上清液中化合物分数的直方图。

[0060] 图9A和9B显示了在具有单一目标化合物的系统和具有包括目标化合物在内的化合物混合物的系统中测量的凝聚物外目标化合物分数的直方图。荧光素是图9A中的目标化合物。罗丹明B是图9B中的目标化合物。

[0061] 图10显示了在若干多路复用系统中关于某些化合物的上清液中化合物分数的直方图。

具体实施方式

[0062] 在一些方面,本发明包括评估(如表征或确定)化合物(如测试化合物)的凝聚物缔合特征(condensate-associated characteristics)的方法及其应用。

[0063] 本申请的公开部分基于发明人对评估(如确定或表征)化合物的凝聚物缔合特征的方法的独特见解,并且这种方法可用于例如鉴定、表征以及开发能够与凝聚物进行期望的相互作用(包括缺乏某种相互作用)的化合物或其部分。在一些实施方式中,与凝聚物的期望的相互作用导致与化合物相关的期望的生物活性。在一些方面,本申请的公开内容部分基于发明人关于定量技术(如质谱法)用于确定化合物的凝聚物缔合特征(如测试化合物的目标凝聚物分配特征)的发现和开发。这种方法允许例如以在简单和复杂系统中均适用的高通量方式准确和可靠地确定测试化合物的目标凝聚物分配特征。此外,例如,这些方法是无假设的(即,不需要已知的、带标记的化合物或凝聚物或其组分),与高度的化合物多路复用(multiplexing)兼容,不需要化合物富集,不需要化合物从凝聚物的提取,可用于同型和异型系统,并且可以较少量的化合物和/或凝聚物前体大分子进行,这代表更加生物学相关性的模型并减少了起始材料和试剂的使用。这些方法允许鉴定测试化合物或其部分,其可用于指导进一步鉴定和/或设计具有期望的分配特征的一种或多种化合物,因此提供鉴定具有提高的效力、治疗指数和/或安全性的目标化合物的方法。测试化合物或其部分的鉴定还能够实现利用这种知识推进某些药物开发应用,例如开发具有期望的分配特征的化合物的特许(privileged)文库,以及用于药物发现和筛选的基于建模和/或计算的技术。

[0064] 如本文所述,评估化合物的凝聚物缔合特征的方法可应用于很多方法及其形式,包括确定测试化合物的分配特征的方法、确定测试化合物的相对分配特征的方法、确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法、鉴定与凝聚物缔合相关的化合物特征的方法、设计具有期望的凝聚物缔合的化合物的方法以及鉴定可用于治疗个体疾病的化合物的方法。本文描述的方法的形式包括,例如,用于以下的测定:评估单一测试化合物或其部分与单一目标凝聚物的相互作用、评估单一测试化合物或其部分与多个目标凝聚物的相互作用、和评估多种测试化合物或其子集与单个目标凝聚物的相互作用。如本文所述,发明人的独特见解能够实现例如可用于治疗个体疾病的化合物如药学上可接受的化合物的鉴定、开发和优化。

[0065] 因此,在一些方面,本发明包括确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a)将测试化合物添加到包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物中;(b)确定目标凝聚物中的测试化合物量,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0066] 在其他方面,本发明包括确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a) 将测试化合物添加到包含前体分子的组合物中;(b) 导致目标凝聚物形成以获得包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物;(c) 确定目标凝聚物中的测试化合物量,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0067] 在其他方面,本发明包括确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括使用多种测试化合物进行本文所述的任何一种或多种方法。

[0068] 在一些实施方式中,本发明包括鉴定与化合物分配到凝聚物中相关的化合物特征的方法,该方法包括:(a) 通过实施确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,来确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征;(b) 比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的分配特征;(c) 鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物;和(d) 鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征之外还共同具有的特征。在一些实施方式中,本发明包括设计对目标凝聚物具有期望的分配特征的化合物的方法,该方法包括:(a) 通过实施确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,来确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征;(b) 比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的分配特征;(c) 鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物;(d) 鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征外还共同具有的特征;和(e) 设计包含所鉴定的特征的化合物。

[0069] 在其他方面,本发明包括确定测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征的方法,该方法包括:(i) 通过用测试化合物实施本文所述的任何一种或多种方法,来确定测试化合物的分配特征;(ii) 通过用参考化合物实施本文所述的任何一种或多种方法,来确定参考化合物的分配特征;(iii) 计算在(i)和(ii)中确定的分配特征的比率,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括用多种测试化合物重复步骤(i)和(iii)。在一些实施方式中,本发明包括鉴定与化合物分配到目标凝聚物中相关的化合物特征的方法,该方法包括:(a) 通过实施确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征的方法,来确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征;(b) 比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征;(c) 鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物;和(d) 鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征之外还共同具有的特征。在一些实施方式中,本发明包括设计具有期望的相对分配特征的化合物的方法,该方法包括:(a) 通过实施确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征的方法,来确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征;(b) 比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征;(c) 鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物;(d) 鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征外还共同具有的特征;和(e) 设计包含所鉴定的特征的化合物。

[0070] 在其他方面,本发明包括确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括:(a) 将测试化合物添加到包含第一目标凝聚物和第二目标凝聚物的组合物中;(b) 确定第一目标凝聚物中的测试化合物量;(c) 确定第二目标凝聚物中的测试化合物量;和(d) 计算在第一目标凝聚物和第二目标凝聚物中确定的测试化合物量的比率,从而确定测试化合物的凝聚物偏好概况。

[0071] 在其他方面,本发明包括确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括:(a) 将测试化合物添加到包含前体分子的组合物中;(b) 导致在组合物中第一目标凝聚物和第二目标凝聚物形成;(c) 确定第一目标凝聚物中的测试化合物量;(d) 确定第二目标凝聚物中的测试化合物量;和(e) 计算在第一目标凝聚物和第二目标凝聚物中确定的测试化合物量的比率,从而确定测试化合物的凝聚物偏好概况。

[0072] 在其他方面,本发明包括确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括使用多种测试化合物实施本文所述的用于确定测试化合物的凝聚物偏好概况的任何一种或多种方法。在一些实施方式中,本发明包括鉴定与化合物分配到凝聚物中相关的化合物特征的方法,该方法包括:(a) 通过实施确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,来确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况;(b) 比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况;(c) 鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物;和(d) 鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外还共同具有的特征。在一些实施方式中,本发明包括设计具有期望的凝聚物偏好概况的化合物的方法,该方法包括:(a) 通过实施确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,来确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况;(b) 比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况;(c) 鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物;(d) 鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外还共同具有的特征;和(e) 设计包含所鉴定的特征的化合物。

[0073] 定义

[0074] 出于解读本说明书的目的,以下定义将适用,并且只要合适时,以单数形式使用的术语也将包括复数,反之亦然。在以下阐述的任何定义与通过引用并入本文的任何文件冲突的情况下,以阐述的定义为准。

[0075] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换地用于指代氨基酸残基的聚合物,并且不限于最小长度。这种氨基酸残基聚合物可包含天然或非天然氨基酸残基,包括但不限于肽、寡肽、氨基酸残基二聚体、三聚体和多聚体。该定义包括全长蛋白质及其片段。该术语还包括多肽的翻译后修饰,例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化等。

[0076] 术语“包括”、“具有”、“包含”和“含有”和其他类似形式及其语法等同形式,如本文所用,旨在含义上是等效的并且是开放式的,即在这些词中任一者后跟随一个或多个项目并不意为是详尽列举该一个或多个项目,或仅限于所列举的一个或多个项目。例如,“包含”组分A、B和C的物品可以由(即,仅包含)组分A、B和C组成,或者可以不仅包含组分A、B和C,还包含一种或多种其他组分。因此,意图和理解“包括”及其类似形式及其语法等同形式包括对“主要由……组成”或“由……组成”的实施方式的公开。

[0077] 在提供数值范围的情况下,应理解,该范围的上限和下限之间达下限十分之一单位(除非上下文另有明确规定)的每个中间值和在该范围内的任何其他规定值或中间值都被包含在本公开中,受所述范围内的任何明确排除限值的限制。在所述范围包括一个或两个限值的情况下,不包括这些被包括的限值中的一者或两者的范围也被包含在本公开中。

[0078] 本文对“约”某数值或参数的提及包括(并描述)涉及该数值或参数本身的变异。例如,提及“约X”的描述包括对“X”的描述。

[0079] 如本文(包括在所附根据权利要求)所用,单数形式“一个”、“或”和“该/所述”包括复数所指对象,除非上下文另有明确规定。

[0080] 此处使用的章节标题仅用于组织目的,不应被解释为限制所描述的主题。

[0081] 评估化合物的凝聚相关特征的方法

[0082] 在本申请的一些方面,提供了评估化合物如测试化合物的凝聚物缔合特征的方法及其应用。在一些实施方式中,本文所述的“凝聚物”是指通过一种或多种蛋白质和/或其他大分子的相分离(包括相分离的所有阶段)形成的非膜包封的隔室。

[0083] 以下更详细地描述了用于评估化合物的凝聚物缔合特征的技术及其对多种方法和形式的应用。本领域技术人员将认识到,基于所提供的描述,在本申请公开的范围和精神内多种实施方式是可能的。

[0084] 在一些方面,本文提供了确定测试化合物的分配特征的方法,包括确定目标凝聚物中的测试化合物量。在一些实施方式中,确定目标凝聚物中的测试化合物量从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0085] 在一些方面,本文提供了确定测试化合物的相对分配特征的方法,包括确定目标凝聚物中的测试化合物量,确定目标凝聚物中参考化合物的量,以及计算目标凝聚物中测试化合物和参考化合物的量的比率。

[0086] 此外,在一些方面,本文提供了确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,包括确定第一目标凝聚物中的测试化合物量,确定第二目标凝聚物中的测试化合物量,以及计算第一和第二目标凝聚物中的测试化合物量的比率。在一些实施方式中,确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法包括确定测试化合物在第一目标凝聚物中的分配特征或相对分配特征,确定测试化合物在第二目标凝聚物中的分配特征或相对分配特征,和计算测试化合物在第一和第二目标凝聚物中的分配特征或相对分配特征的比率。

[0087] 在一些实施方式中,该方法进一步包括对于多种测试化合物重复该方法的步骤。例如,在一些实施方式中,该方法包括对于至少约2、3、4、5、10、15、20、25、40、50、75、100、250、500、1,000、10,000、100,000或更多种化合物重复该方法的步骤。

[0088] 在一些实施方式中,该方法进一步包括将测试化合物与包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物组合。在一些实施方式中,该方法进一步包括将测试化合物添加到包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物中。在一些实施方式中,该方法进一步包括导致目标凝聚物形成。在一些实施方式中,该方法进一步包括将测试化合物与包含凝聚物前体分子的前体组合物组合,然后导致目标凝聚物形成。在一些实施方式中,该方法进一步包括将测试化合物添加到包含凝聚物前体分子的组合物中,然后导致目标凝聚物形成。

[0089] 在一些实施方式中,该方法进一步包括将测试化合物与包含细胞的组合物组合。在一些实施方式中,该方法进一步包括将测试化合物与包含细胞的组合物组合,然后导致目标凝聚物形成。在一些实施方式中,该方法进一步包括导致包含细胞的组合物中目标凝聚物形成,然后将测试化合物与组合物组合。在一些实施方式中,该方法进一步包括使化合物进入细胞。

[0090] 在一些实施方式中,该方法进一步包括将测试化合物添加到包含细胞的组合物中。在一些实施方式中,该方法进一步包括将测试化合物添加到包含细胞的组合物中,然后导致目标凝聚物形成。在一些实施方式中,该方法进一步包括导致包含细胞的组合物中目

标凝聚物形成,然后将测试化合物添加到到组合物中。在一些实施方式中,该方法进一步包括使化合物进入细胞。

[0091] 在一些实施方式中,该方法进一步包括将目标凝聚物与凝聚物外溶液分离,例如,出于定量凝聚物或凝聚物外溶液中的目标化合物的目的。在无细胞溶液中,凝聚物一般密度大于凝聚物外溶液,并且会沉淀。因此,在一些实施方式中,将目标凝聚物与凝聚物外溶液分离包括将上清液与沉淀物分离。在一些实施方式中,该方法包括将组合物离心。在一些实施方式中,该方法包括允许凝聚物沉淀。

[0092] 确定化合物的凝聚物缔合特征的技术

[0093] 在一些方面,本文提供了确定化合物的凝聚物缔合特征的方法,包括确定由于目标凝聚物的存在、形成和/或调节而从凝聚物外溶液消耗(枯竭,depleted)的测试化合物的量(包括确定消耗的不存在)。在一些实施方式中,确定化合物的凝聚物缔合特征的方法包括使用基于质谱的技术(例如,以确定测试化合物量)。在一些实施方式中,确定化合物的凝聚物缔合特征的方法包括使用液相色谱法(例如,HPLC)、显微术、定量图像分析、定量荧光显微术和光谱学、核磁共振波谱、拉曼光谱和/或紫外-可见分光光度法中的任何一种或多种(例如,以确定测试化合物的量)。在一些实施方式中,这种方法可用于确定测试化合物在包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物中的分配特征、相对分配特征和/或凝聚物偏好概况。

[0094] 在一些实施方式中,该方法包括确定由于目标凝聚物的存在和/或形成而从系统消耗的测试化合物量。在一些实施方式中,该方法包括确定在凝聚物外溶液中且不与目标凝聚物的前体分子缔合的测试化合物的量。在一些实施方式中,该方法包括确定与目标凝聚物缔合(如在目标凝聚物中)的测试化合物的量。在一些实施方式中,该方法包括确定与目标凝聚物的前体分子缔合的测试化合物的量。在一些实施方式中,由于目标凝聚物的存在和/或形成而从系统消耗的测试化合物的量被用于确定凝聚物缔合特征,例如测试化合物的目标凝聚物分配特征。

[0095] 在一些实施方式中,该方法包括比较来自凝聚物外溶液的测试化合物或其部分的MS信号与来自参考对照的测试化合物或其部分的MS信号,如通过来自凝聚物外溶液的测试化合物或其部分的MS信号与来自参考对照的测试化合物或其部分的MS信号的比率。在一些实施方式中,来自凝聚物外溶液的测试化合物的MS信号与来自参考对照的测试化合物的MS信号的比率代表消耗值。在一些实施方式中,消耗值代表由于目标凝聚物的存在和/或形成而从系统消耗的测试化合物量。在一些实施方式中,该方法进一步包括利用质谱技术获得如测量凝聚物外溶液中的测试化合物或其部分的MS离子信号。在一些实施方式中,该方法进一步包括利用质谱技术获得如测量参考对照中的测试化合物或其部分的MS离子信号。在一些实施方式中,该方法进一步包括将测试化合物与包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物组合。在一些实施方式中,该方法进一步包括在测试化合物的存在下导致目标凝聚物形成以获得包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物。在一些实施方式中,该方法进一步包括分离包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物中的目标凝聚物,如通过使在组合物中的目标凝聚物成粒(沉淀,pelleting)。在一些实施方式中,该方法进一步包括获得(如生成)参考对照。

[0096] 在一些实施方式中,添加到包含目标凝聚物和凝聚物外溶液或其前体的组合物中

的测试化合物量基于：使得测试化合物总量从凝聚物外溶液的相对较少消耗能够被确定的量（如通过比较凝聚物外（溶液）中的化合物量的测量结果和参考对照中的化合物量的测量结果而确定）。在一些实施方式中，添加到包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物中的测试化合物量基于：组合物中的目标凝聚物和/或其一种或多种前体分子的量。在一些实施方式中，添加到包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物中的测试化合物量基于：目标凝聚物的化合物容量。在一些实施方式中，测试化合物量为约1 μ M或更少，如约900nM或更少、800nM或更少、700nM或更少、600nM或更少、500nM或更少、450nM或更少、400nM或更少、350nM或更少、300nM或更少、250nM或更少、200nM或更少、150nM或更少、125nM或更少、100nM或更少、90nM或更少、80nM或更少、70nM或更少、60nM或更少、50nM或更少、40nM或更少、30nM或更少、20nM或更少、10nM或更少、9nM或更少、8nM或更少、7nM或更少、6nM或更少、5nM或更少、4nM或更少、3nM或更少、2nM或更少、或1nM或更少中的任一者。在一些实施方式中，测试化合物的下限基于的是用于测量测试化合物量的分析方法。在一些实施方式中，组合物中前体分子的量为约1 μ M与10 μ M之间，并且测试化合物为约1 μ M或更少，如900nM或更少、800nM或更少、700nM或更少、600nM或更少、500nM或更少、450nM或更少、400nM或更少、350nM或更少、300nM或更少、250nM或更少、200nM或更少、150nM或更少、125nM或更少、100nM或更少、90nM或更少、80nM或更少、70nM或更少、60nM或更少、50nM或更少、40nM或更少、30nM或更少、20nM或更少、10nM或更少、9nM或更少、8nM或更少、7nM或更少、6nM或更少、5nM或更少、4nM或更少、3nM或更少、2nM或更少、或1nM或更少中的任一者。

[0097] 在一些实施方式中，该方法包括使用参考对照和/或制备参考对照的方法。本文所述的参考对照提供参考测量，其可用于确定由于目标凝聚物的存在和/或形成而从系统消耗的测试化合物量。在一些实施方式中，其中组合物包含：(a) 一定量的目标凝聚物，(b) 凝聚物外溶液，(c) 在凝聚物外溶液中的某个量（如浓度）的目标凝聚物的前体大分子，和(d) 在组合物中的某个量（如浓度）的测试化合物，其包括(i) 与目标凝聚物缔合（在目标凝聚物中）的某个量的测试化合物，和(ii) 在凝聚物外溶液中的某个量（如浓度）的测试化合物，参考对照包括在所述凝聚物外溶液中的量（如浓度）的目标凝聚物的前体大分子以及在所述组合物中的量（如浓度）的测试化合物。在一些实施方式中，该方法包括测量来自包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物，凝聚物外溶液中的目标凝聚物的前体大分子或其部分的量，如浓度。

[0098] 在一些实施方式中，参考对照包括某个量的目标凝聚物的前体大分子，该量基于在组合物已经经历目标凝聚物成粒之后存在于凝聚物外溶液中的前体大分子的量。在一些实施方式中，参考对照的前体大分子浓度与在组合物已经经历目标凝聚物的成粒之后凝聚物外溶液中的前体大分子浓度相同。在一些实施方式中，参考对照包含的测试化合物浓度与包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物组合的测试化合物浓度相同。在一些实施方式中，参考对照基本上不含目标凝聚物。在一些实施方式中，该方法进一步包括确定参考对照中的测试化合物量。在一些实施方式中，确定参考对照中的测试化合物量包括利用基于质谱的技术测量参考对照中的测试化合物或其部分的量。

[0099] 多种基于质谱的技术适于本文所述的方法。在一些实施方式中，基于质谱的技术包括测量一种或多种化合物如一种或多种测试化合物的一种或多种离子种类的MS信号。在一些实施方式中，MS信号是测试化合物的一种或多种离子种类的，如测试化合物的离子的

一种或多种电荷态。在一些实施方式中,MS信号源自质荷比(m/z)测量。在一些实施方式中,MS信号是电离强度。在一些实施方式中,MS信号是峰高。在一些实施方式中,MS信号是峰面积,如与MS离子信号对应的信号的积分。在一些实施方式中,MS信号是峰体积,如与MS离子信号对应的信号的积分。在一些实施方式中,MS信号是测试化合物的离子的测量信号的累积测量。在一些实施方式中,基于质谱的技术包括液相色谱/质谱(LC/MS)技术、液相色谱/串联质谱(LC/MS)技术和/或直接样品引入技术(例如,直接喷雾)。在一些实施方式中,基于质谱的技术包括气相色谱/质谱(GC/MS)。在一些实施方式中,基于质谱的技术包括选自数据相关采集、数据独立采集、选择反应监测(SRM)和多反应监测(MRM)的采集技术。

[0100] 本申请考虑的液相色谱技术包括与质谱技术相容的用于分离前体大分子和/或测试化合物的方法。在一些实施方式中,液相色谱技术包括高效液相色谱(HPLC)技术。在一些实施方式中,液相色谱技术包括高流量液相色谱技术。在一些实施方式中,液相色谱技术包括低流量液相色谱技术,如微米流液相色谱技术或纳米流液相色谱技术。在一些实施方式中,液相色谱技术包括与质谱仪联接的在线液相色谱技术。在一些实施方式中,毛细管电泳(CE)技术或电喷雾或MALDI技术可用于将样品引入质谱仪。在一些实施方式中,可使用直接样品引入技术将样品引入质谱仪。在一些实施方式中,质谱技术包括电离技术。本申请考虑的电离技术包括能够使前体大分子和/或测试化合物带电的技术。在一些实施方式中,电离技术是电喷雾电离。在一些实施方式中,电离技术是纳米电喷雾电离。在一些实施方式中,电离技术是大气压化学电离。在一些实施方式中,电离技术是大气压光电离。在一些实施方式中,电离技术是基质辅助激光解吸电离(MALDI)。在一些实施方式中,质谱技术包括电喷雾电离、纳米电喷雾电离或基质辅助激光解吸电离(MALDI)技术。

[0101] 本申请所考虑的可与在线液相色谱技术联接的质谱仪包括高分辨率质谱仪和低分辨率质谱仪。因此,在一些实施方式中,质谱仪是飞行时间(TOL)质谱仪。在一些实施方式中,质谱仪是四极飞行时间(Q-TOL)质谱仪。在一些实施方式中,质谱仪是四极离子阱飞行时间(QIT-TOL)质谱仪。在一些实施方式中,质谱仪是离子阱。在一些实施方式中,质谱仪是单一四极式。在一些实施方式中,质谱仪是三重四极式(QQQ)。在一些实施方式中,质谱仪是轨道阱式(orbitrap)。在一些实施方式中,质谱仪是四极轨道阱式。在一些实施方式中,质谱仪是Fourier转换离子回旋共振(LT)质谱仪。在一些实施方式中,质谱仪是四极Fourier转换离子回旋共振(Q-LT)质谱仪。在一些实施方式中,质谱技术包括正离子模式。在一些实施方式中,质谱技术包括负离子模式。在一些实施方式中,质谱技术包括飞行时间(TOF)质谱技术。在一些实施方式中,质谱技术包括四极飞行时间(Q-TOF)质谱技术。在一些实施方式中,质谱技术包括离子迁移质谱技术。在一些实施方式中,低分辨率质谱技术(如离子阱)或单一或三重四极方式是合适的。

[0102] 在一些实施方式中,基于质谱的技术包括处理所获得的前体大分子和/或测试化合物的MS信号。在一些实施方式中,基于质谱的技术包括峰检测。在一些实施方式中,基于质谱的技术包括确定电离强度。在一些实施方式中,基于质谱的技术包括确定峰高。在一些实施方式中,基于质谱的技术包括确定峰面积。在一些实施方式中,基于质谱的技术包括确定峰体积。

[0103] 在一些实施方式中,基于质谱的技术包括鉴定测试化合物。

[0104] 因此,例如,在一些实施方式中,提供了确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特

征的方法,该方法包括比较来自凝聚物外溶液的测试化合物的离子的MS信号和来自参考对照的测试化合物的离子的MS信号,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。在一些实施方式中,确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法包括:(a) 利用质谱技术获得,如测量,凝聚物外溶液中的测试化合物或其部分的MS信号;(b) 利用质谱技术获得,如测量,参考对照中的测试化合物或其部分的MS离子信号;和(c) 比较来自凝聚物外溶液的测试化合物的离子的MS信号和来自参考对照的测试化合物的离子的MS信号,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0105] 在一些实施方式中,本文提供了确定小分子测试化合物(如1,000Da或更少和/或满足Lipinski五倍率法则的治疗性小分子)的凝聚物缔合特征的方法,包括确定由于目标凝聚物的存在、形成和/或调节而从凝聚物外溶液中消耗的小分子测试化合物的量(包括确定消耗的不存在)。在一些实施方式中,提供了确定小分子测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括比较来自凝聚物外溶液的小分子测试化合物的离子的MS信号和来自参考对照的小分子测试化合物的离子的MS信号,从而确定小分子测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。在一些实施方式中,确定小分子测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法包括:(a) 利用质谱技术获得,如测量,凝聚物外溶液中的小分子测试化合物或其部分的MS信号;(b) 利用质谱技术获得,如测量,参考对照中的小分子测试化合物或其部分的MS离子信号;和(c) 比较来自凝聚物外溶液的小分子测试化合物的离子的MS信号和来自参考对照的小分子测试化合物的离子的MS信号,从而确定小分子测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0106] 在一些实施方式中,本文提供了确定治疗性化合物(如以下的任一者或任何组合:外源化合物、小分子、多肽、寡核苷酸、核酸、抗体或其片段、合成产生的化合物——包括细胞培养产生的化合物、或不是凝聚物前体大分子的化合物)的凝聚物缔合特征的方法,包括确定由于目标凝聚物的存在、形成和/或调节而从凝聚物外溶液消耗的治疗性化合物量(包括确定消耗的不存在)。在一些实施方式中,提供了确定治疗性化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括比较来自凝聚物外溶液的治疗性化合物的离子的MS信号和来自参考对照的治疗性化合物的离子的MS信号,从而确定治疗性化合物在目标凝聚物中的分配特征。在一些实施方式中,确定治疗性化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法包括:(a) 利用质谱技术获得,如测量,凝聚物外溶液中的治疗性化合物或其部分的MS信号;(b) 利用质谱技术获得,如测量,参考对照中的治疗性化合物或其部分的MS离子信号;和(c) 比较来自凝聚物外溶液的治疗性化合物的离子的MS信号和来自参考对照的治疗性化合物的离子的MS信号,从而确定治疗性化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0107] 在一些实施方式中,确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a) 将测试化合物与包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物组合;(b) 获得,如准备,参考对照;(c) 利用质谱技术测量凝聚物外溶液中的测试化合物或其部分的MS信号;(d) 利用质谱技术测量参考对照中的测试化合物或其部分的MS信号;(e) 比较来自凝聚物外溶液的测试化合物的MS信号和来自参考对照的测试化合物的MS信号,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0108] 在一些实施方式中,确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a) 将测试化合物与包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物组合;(b) 获得,如准

备,参考对照;(c)利用质谱技术测量凝聚物外溶液中的测试化合物或其部分的MS信号;(d)利用质谱技术测量参考对照中的测试化合物或其部分的MS信号;和(e)比较来自凝聚物外溶液的测试化合物的MS信号和来自参考对照的测试化合物的MS信号,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0109] 在一些实施方式中,确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a)将测试化合物与包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物组合;(b)培育测试化合物和组合物;(c)利用离心技术使组合物中的目标凝聚物成粒;(d)获得,如准备,参考对照;和(e)利用质谱技术测量凝聚物外溶液中的测试化合物或其部分的MS信号;(f)利用质谱技术测量参考对照中的测试化合物或其部分的MS信号;(g)比较来自凝聚物外溶液的测试化合物的MS信号和来自参考对照的测试化合物的MS信号,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0110] 在一些实施方式中,确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a)将测试化合物与包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物组合;(b)培育测试化合物和组合物;(c)利用离心技术使组合物中的目标凝聚物成粒;和(d)获得,如准备,参考对照;(e)利用质谱技术测量凝聚物外溶液中的测试化合物或其部分的MS信号;(f)利用质谱技术测量参考对照中的测试化合物或其部分的MS信号;(g)比较来自凝聚物外溶液的测试化合物的MS信号和来自参考对照的测试化合物的MS信号,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0111] 在本文所述的任何方法或方法步骤的一些实施方式中,该方法适于确定多种测试化合物中的每一种在包含目标凝聚物的单一组合物中的凝聚物缔合特征。例如,在一些实施方式中,提供了包括以下的方法:(a)将多种测试化合物与包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物组合;和(b)比较来自凝聚物外溶液的所述多种测试化合物中的第一测试化合物的离子的MS信号和来自参考对照的所述第一测试化合物的离子的MS信号。在一些实施方式中,将来自凝聚物外溶液外的所述多种测试化合物的各测试化合物的离子的MS信号与来自参考对照的各相应测试化合物的离子的相应MS信号进行比较。在一些实施方式中,参考对照包含多种化合物。在一些实施方式中,所述多种测试化合物中的化合物数量仅受用于测量各化合物量的分析方法的能力的限制。在一些实施方式中,所述多种测试化合物包含至少5种,例如10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900或1,000种化合物。在一些实施方式中,该方法进一步包括利用质谱技术获得,如测量,凝聚物外溶液中的各测试化合物或其部分的MS信号。在一些实施方式中,该方法进一步包括利用质谱技术获得,如测量,参考对照中的各测试化合物或其部分的MS信号。在一些实施方式中,在单个质谱分析中获得凝聚物外溶液或参考对照中的各测试化合物的MS信号。

[0112] 测试化合物和分析

[0113] 在一些实施方式中,测试化合物是小分子、多肽、肽模拟物、脂质或核酸。在一些实施方式中,测试化合物是经批准的化合物,例如美国食品和药物管理局(United States Food and Drug Administration)批准用于医学治疗的化合物。在一些实施方式中,测试化合物是新化合物。在一些实施方式中,测试化合物是带电的。在一些实施方式中,测试化合物是疏水的。在一些实施方式中,测试化合物是亲水的。在一些实施方式中,测试化合物是

小分子。在一些实施方式中,小分子是生物碱、糖苷、吩嗪、苯酚、聚酮化合物、萜烯或四吡咯。在一些实施方式中,测试化合物是抗体。在一些实施方式中,目标凝聚物是细胞外凝聚物并且测试化合物是抗体。在一些实施方式中,测试化合物是核酸。在一些实施方式中,测试化合物是RNA,如siRNA、miRNA、mRNA或lnRNA。在一些实施方式中,测试化合物是siRNA、miRNA或mRNA。在一些实施方式中,测试化合物是非天然存在的化合物。在一些实施方式中,测试化合物是蛋白质。

[0114] 在一些实施方式中,本文的方法包括添加两种或更多种测试化合物。在一些实施方式中,所述两种或更多种化合物各自选自小分子、多肽、脂质或核酸中的任一种。在一些实施方式中,所述两种或更多种测试化合物被依次或同时添加。

[0115] 在一些实施方式中,测试化合物包含标记。在一些实施方式中,标记是放射性标记、比色标记、发光标记、化学反应性标记(如点击化学中使用的组分部分)或荧光标记。在一些实施方式中,测试化合物是包含标记的小分子。在一些实施方式中,测试化合物是包含荧光团的小分子。在一些实施方式中,测试化合物是包含标记的多肽。在一些实施方式中,测试化合物是包含荧光团的多肽。在一些实施方式中,测试化合物是包含标记的核酸。在一些实施方式中,测试化合物是包含荧光团的核酸。测试化合物标记可以共价或非共价地缀合至测试化合物。

[0116] 确定测试化合物的量的方法是已知的。在一些实施方式中,确定测试化合物的量包括可量化地检测测试化合物。在一些实施方式中,确定测试化合物的量包括可量化地检测测试化合物标记。在一些实施方式中,确定测试化合物的量包括检测测试化合物的活性和计算导致活性量被检测到所需的测试化合物量。在一些实施方式中,测试化合物的量通过质谱法、液相色谱法和/或紫外-可见分光光度法确定。在一些实施方式中,测试化合物的量通过荧光显微术确定。标准曲线可用于帮助确定测试化合物的量。可选地或另外地,可将测试化合物的量与参考化合物进行比较。在一些实施方式中,参考化合物是测试化合物标记。

[0117] 设想本文描述的包括确定凝聚物中的化合物如测试化合物或参考化合物的量的方法包括直接和间接的用于确定凝聚物中的化合物量的技术。在一些实施方式中,直接确定凝聚物中的化合物量。在一些实施方式中,间接确定凝聚物中的化合物量。在一些实施方式中,凝聚物中的化合物量通过确定与凝聚物不缔合的化合物量(如凝聚物外溶液中的化合物量)来确定。在一些实施方式中,凝聚物中的化合物量通过确定报告化合物的量来确定。在一些实施方式中,报告化合物与凝聚物缔合。在一些实施方式中,报告化合物不与凝聚物缔合。

[0118] 可以将目标凝聚物中的测试化合物量与其他溶液中的测试化合物量或加入到组合物的量进行比较。因此,在一些实施方式中,该方法进一步包括将目标凝聚物中的测试化合物量与添加到组合物的量;和/或凝聚物外溶液中的量;和/或细胞中的测试化合物量;和/或第二目标凝聚物中的测试化合物量进行比较。

[0119] 在一些实施方式中,该方法进一步包括将目标凝聚物中的测试化合物量与添加到组合物中的量进行比较。在一些实施方式中,比较包括计算目标凝聚物中的测试化合物量与添加到组合物中的测试化合物量的比率或百分比。

[0120] 在一些实施方式中,该方法进一步包括将目标凝聚物中的测试化合物量与凝聚物

外溶液中的测试化合物量进行比较。在一些实施方式中,比较包括计算目标凝聚物中的测试化合物量与凝聚物外溶液中的测试化合物量的比率或百分比。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定凝聚物外溶液中的测试化合物量。在一些实施方式中,在确定凝聚物外溶液中的测试化合物量之前、同时或之后,确定目标凝聚物中的测试化合物量。

[0121] 在一些实施方式中,该方法进一步包括将目标凝聚物中的测试化合物量与细胞中的测试化合物量进行比较。在一些实施方式中,比较包括计算目标凝聚物中的测试化合物量与细胞中的测试化合物量的比率或百分比。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定细胞中的测试化合物量。

[0122] 在一些实施方式中,该方法进一步包括将目标凝聚物中的测试化合物量与第二目标凝聚物中的测试化合物量进行比较。在一些实施方式中,比较包括计算目标凝聚物中的测试化合物量与第二目标凝聚物中的测试化合物量的比率或百分比。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定第二目标凝聚物中的测试化合物量。在一些实施方式中,在确定第二目标凝聚物中的测试化合物量之前、同时或之后,确定第一目标凝聚物中的测试化合物量。

[0123] 在一些实施方式中,该方法进一步包括将目标凝聚物中的测试化合物量与目标凝聚物中一种或多种大分子的量进行比较。在一些实施方式中,比较包括计算目标凝聚物中的测试化合物量与目标凝聚物中的一种或多种大分子的量的比率或百分比。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定目标凝聚物中一种或多种大分子的量。在一些实施方式中,在确定目标凝聚物中的一种或多种大分子的量之前、同时或之后,确定目标凝聚物中的测试化合物量。

[0124] 形成凝聚物的方法是已知的并且可以因凝聚物而异。例如,可以通过以下形成凝聚物:通过改变组合物的温度,如将组合物暴露于较低或较高的温度;通过改变组合物的盐含量,如稀释组合物中的盐或向组合物中添加盐;通过增加前体大分子的浓度,如在组合物中添加核酸,例如RNA;在组合物中添加或改变缓冲剂;改变组合物的离子强度;改变pH,如将pH改变到距离等电点少于1个单位;或添加拥挤剂,如PEG或葡聚糖。形成凝聚物的一些示例性方法也被公开于Alberti et al., J Mol Biol, 430 (23), 2018, 4806-4820, 其通过引用并入本文。

[0125] 组合物

[0126] 在一些实施方式中,组合物包含细胞。在一些实施方式中,目标凝聚物在细胞中。在一些实施方式中,凝聚物外溶液是细胞内液,例如细胞溶胶或核仁溶胶。

[0127] 在一些实施方式中,组合物包含细胞。在一些实施方式中,目标凝聚物不在细胞中。在一些实施方式中,目标凝聚物是细胞外凝聚物,如细胞外基质中的凝聚物。在一些实施方式中,细胞外液是间质液或血浆。

[0128] 在一些实施方式中,细胞是微生物或动物细胞。在一些实施方式中,细胞是人细胞。在一些实施方式中,细胞是神经元。在一些实施方式中,细胞是癌细胞。在一些实施方式中,细胞是或源自诱导多能干细胞(iPS细胞)、HeLa细胞或HEK293细胞。在一些实施方式中,细胞包含被确定失调的凝聚物。在一些实施方式中,细胞包含疾病相关的突变。在一些实施方式中,细胞具有神经变性疾病或增殖性疾病的一个或多个特征。在一些实施方式中,细胞已经过砷酸盐/酯(和/或另一种已知调节凝聚物的化合物)、温度变化或pH变化处理。在一

些实施方式中,细胞表达被荧光蛋白标记的蛋白质。在一些实施方式中,蛋白质是已知在目标凝聚物中浓集的蛋白质。在一些实施方式中,细胞表达第一蛋白质和第二蛋白质,其中第一蛋白质用第一标记进行标记,其中第一蛋白质已知浓集在第一目标凝聚物中,其中第二蛋白质用第二标记进行标记,其中第二蛋白质已知浓集在第二目标凝聚物中,并且其中第一标记和第二标记是可区分的。在一些实施方式中,细胞表达第一蛋白质和第二蛋白质,其中第一蛋白质用第一荧光蛋白标记,其中第一蛋白质已知浓集在第一目标凝聚物中,其中第二蛋白质用第二荧光蛋白标记,其中第二蛋白质已知浓集在第二目标凝聚物中,并且其中第一荧光蛋白和第二荧光蛋白是可区分的。

[0129] 在一些实施方式中,组合物不包含细胞。在一些实施方式中,组合物是无细胞的。在一些实施方式中,组合物包含前体分子,其是可以被并入凝聚物中和/或已经被并入凝聚物中的非相分离的组分。在无细胞系统中,凝聚物可仅由几个组分形成。例如,组合物可包含能够形成凝聚物的蛋白质或蛋白质片段,如蛋白质或肽的一部分。在一些实施方式中,组合物包含蛋白质或蛋白质片段,该蛋白质或蛋白质片段包含低复杂性结构域或固有无序的序列。在一些实施方式中,组合物包含核酸寡聚物或聚合物,如RNA。在一些实施方式中,组合物包含小分子。在一些实施方式中,组合物包含缓冲剂。在一些实施方式中,组合物还可包含一种或多种盐和/或一种或多种大分子拥挤剂(例如,聚乙二醇或葡聚糖)。

[0130] 在一些实施方式中,组合物包含细胞,该细胞包含前体分子。在一些实施方式中,组合物包含细胞,并且该方法包括在细胞中形成目标凝聚物。在一些实施方式中,该方法包括改变细胞的温度,如将组合物暴露于较低或较高的温度;改变细胞的盐含量;添加或更改细胞周围的缓冲剂;改变细胞的pH;或向细胞添加拥挤剂,如PEG或葡聚糖。在一些实施方式中,组合物包含细胞,并且细胞包含导致目标凝聚物形成和/或修改(修饰,modifies)目标凝聚物的突变。在一些实施方式中,突变修改以下一项或多项:目标凝聚物的尺寸、目标凝聚物的形状、目标凝聚物的一种或多种组分的浓度、以及目标凝聚物内组分的异质分布。在一些实施方式中,组合物包含细胞,并且细胞包含导致凝聚物形成的突变。

[0131] 在一些实施方式中,组合物包含多种凝聚物。在一些实施方式中,组合物至少包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25种凝聚物中的任一者。在一些实施方式中,组合物包含两种或更多种目标凝聚物。在一些实施方式中,组合物至少包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25种目标凝聚物中的任一者。在一些实施方式中,该方法包括针对一种或多种另外的目标凝聚物重复该方法的步骤,如至少针对2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、或25种目标凝聚物中的任一者。在一些实施方式中,组合物至少包含相同凝聚物类型的2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25种凝聚物中的任一者,例如具有相同组成和/或分配性质的凝聚物。在一些实施方式中,组合物至少包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25种不同凝聚物类型中的任一者,例如,不具有相同组成和/或分配性质的凝聚物。

[0132] 凝聚物

[0133] 很多凝聚物是本领域公知的。已知凝聚物的实例包括裂解体、P-颗粒、组蛋白基因座体、多泡体、神经元RNA颗粒、核叶芽、核孔、核斑、核应力体、核仁、Oct1/PTF/转录(OPT)域、旁斑、核仁周室、PML核体、PML致癌域、多梳体、加工体、信号传导簇、病毒凝聚物、Sam68核体、应力颗粒或剪接斑。很多凝聚物可以用显微术鉴定。在一些实施方式中,该方法进一步包括鉴定目标凝聚物。

[0134] 本文所述方法中使用的凝聚物可以是天然存在的或非天然存在的。例如,在一些实施方式中,凝聚物是天然存在的。在一些实施方式中,凝聚物是非天然存在的。在一些实施方式中,凝聚物是人造的。在一些实施方式中,凝聚物是合成的。在一些实施方式中,凝聚物是半合成的。在一些实施方式中,凝聚物是经修饰的。在一些实施方式中,凝聚物是修饰凝聚物,其中修饰的凝聚物的母体凝聚物通过添加、去除和/或取代一种或多种凝聚物组分而被修饰。

[0135] 在一些实施方式中,其中本文描述的方法评估两种或更多种凝聚物,所述两种或更多种凝聚物中的第一凝聚物和第二凝聚物可以是凝聚物的任何组合。在一些实施方式中,第一凝聚物是修饰凝聚物。在一些实施方式中,第一凝聚物是修饰凝聚物,并且第二凝聚物是第一凝聚物的母体凝聚物。在一些实施方式中,第一凝聚物是在第一系统如第一组合物中的目标凝聚物,并且第二凝聚物是在第二系统如第二组合物中的目标凝聚物。在一些实施方式中,第一凝聚物是正常的凝聚物,并且第二凝聚物是失调的凝聚物。

[0136] 在一些实施方式中,提供了确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括:(a)将测试化合物与包含第一目标凝聚物的第一组合物组合;(b)将测试化合物与包含第二目标凝聚物的第二组合物组合;(c)确定第一目标凝聚物中的测试化合物量;和(d)确定第二目标凝聚物中的测试化合物量,从而确定测试化合物的凝聚物偏好概况。

[0137] 在一些实施方式中,提供了确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括:(a)将测试化合物添加到包含第一目标凝聚物的第一组合物中;(b)将测试化合物添加到包含第二目标凝聚物的第二组合物中;(c)确定第一目标凝聚物中的测试化合物量;和(d)确定第二目标凝聚物中的测试化合物量,从而确定测试化合物的凝聚物偏好概况。

[0138] 使用标记可以有助于凝聚物的鉴定。例如,可以将染料或已标记化合物添加到凝聚物中。在一些实施方式中,染料或已标记化合物可优先进入目标凝聚物。在一些实施方式中,标记是放射性标记、比色标记、化学反应性标记或荧光标记。在一些实施方式中,组合物包含第一目标凝聚物和第二目标凝聚物,并且第一目标凝聚物和第二目标凝聚物各自用不同的标记进行标记,如第一目标凝聚物用RFP标记并且第二目标凝聚物用GFP标记。

[0139] 一些凝聚物可包含特定的大分子。因此,在一些实施方式中,该方法进一步包括表征目标凝聚物中的大分子。在一些实施方式中,大分子是蛋白质或蛋白质片段。在一些实施方式中,蛋白质或蛋白质片段包含低复杂性结构域或固有无序的序列。在一些实施方式中,大分子是转录因子或RNA结合蛋白。在一些实施方式中,大分子是tau、FUS、亨廷顿(huntingtin)蛋白、hnRNP A1、TDP43、PGL-3、或其片段或聚集体。在一些实施方式中,大分子是核酸,如RNA或DNA。在一些实施方式中,大分子是RNA。

[0140] 在一些实施方式中,目标凝聚物是细胞凝聚物。大量细胞凝聚物已被描述,并且更多大量细胞凝聚物已知形成,但尚未被描述。在一些实施方式中,细胞凝聚物是裂解体、P-颗粒、组蛋白基因座体、多泡体、神经元RNA颗粒、核叶芽、核孔、核斑、核应力体、核仁、Oct1/PTF/转录(OPT)域、旁斑、核仁周室、PML核体、PML致癌域、多梳体、加工体、信号传导簇、病毒凝聚物、Sam68核体、应力颗粒或剪接斑。在一些实施方式中,在确定目标凝聚物中的目标化合物的量时,目标凝聚物在细胞中。

[0141] 在一些实施方式中,目标凝聚物是细胞外凝聚物。细胞外凝聚物可以在细胞外的生物溶液如细胞外基质或血浆中形成,以促进反应或隔离分子(Muiznieks et al., J Mol

Biol, 430 (23), 2018, 4741-4753)。

[0142] 各种凝聚物的失调可与疾病相关。例如,基于细胞和无细胞凝聚物实验,肉瘤(FUS)融合蛋白中的疾病相关突变已被证明导致异常的相分离行为,其直接促进运动神经元疾病、肌萎缩侧索硬化症(ALS)的发展(Naumann et al., Nat Commun, 9(1), 2018, 335)。因此,在一些实施方式中,目标凝聚物的失调与疾病相关。在一些实施方式中,失调包括以下一项或多项的改变:目标凝聚物的尺寸;目标凝聚物的形状;目标凝聚物的一种或多种组分的浓度;凝聚物中组分的异质分布,例如,组分位于凝聚物的核而不是壳中。在一些实施方式中,将所述改变与类似的非失调目标凝聚物进行比较。

[0143] 确定与测试化合物的分配相关的化合物特征的方法

[0144] 在一些实施方式中,本发明包括鉴定与化合物或其部分在凝聚物中的分配相关(如与凝聚物的表面和/或核缔合)的化合物特征的方法。

[0145] 在一些实施方式中,该方法包括通过实施本文公开的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。在一些实施方式中,该方法包括鉴定或确定化合物或其部分的、全部或部分地促成化合物或其部分关于凝聚物分配的属性。

[0146] 在一些实施方式中,鉴定在目标凝聚物中具有期望的(如相似的)分配特征的化合物或其部分的分配相关化合物特征包括:鉴定具有期望的(如相似的)分配特征的测试化合物的共同部分或基序。在一些实施方式中,化合物或其部分的化合物特征基于电荷和疏水性中的一种或多种。

[0147] 在一些实施方式中,化合物的分配特征基于:确定化合物在凝聚物中的量,如相对量,或与一种或多种凝聚物的相比较的量,如凝聚物偏好概况。例如,在一些实施方式中,该方法包括:(a)通过实施本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征;和(b)鉴定在凝聚物中具有期望的分配特征如类似的分配特征的测试化合物或其部分。在一些实施方式中,该方法包括:(a)通过实施本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征之外还共同具有的特征。

[0148] 在一些实施方式中,该方法包括:(a)通过实施本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征;和(b)鉴定在凝聚物中具有期望的相对分配特征如类似的相对分配特征的测试化合物或其部分。在一些实施方式中,该方法包括:(a)通过实施本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征之外还共同具有的特征。

[0149] 在一些实施方式中,该方法包括:(a)通过实施本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的凝聚物偏好概况;和(b)鉴定在凝聚物中具有期望的凝聚物偏好概况如类似的凝聚物偏好概况的测试化合物或其部分。在一些实施方式中,该方法包括(a)通过实施本文所述的方法确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况;(c)鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外

还共同具有的特征。

[0150] 在本文所述方法的一些实施方式中,鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征、相对分配特征或凝聚物偏好概况的测试化合物包括:鉴定与目标凝聚物的任何部分缔合的两种或更多种测试化合物。在本文所述方法的一些实施方式中,鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征、相对分配特征或凝聚物偏好概况的测试化合物包括:鉴定不与目标凝聚物的任何部分缔合的两种或更多种测试化合物。

[0151] 在一些实施方式中,本文公开的方法进一步包括制备利用本文所述的方法鉴定和/或设计的化合物。

[0152] 设计具有期望的分配特征的化合物的方法

[0153] 在一些实施方式中,本发明包括设计具有期望的关于目标凝聚物的分配特征的化合物的方法。在一些实施方式中,本发明包括设计对目标凝聚物具有期望的分配特征的化合物的方法。

[0154] 在一些实施方式中,该方法包括鉴定或确定包含期望的关于目标凝聚物的分配特征的化合物或其部分。在一些实施方式中,该方法包括鉴定或确定化合物或其部分的、全部或部分地促成期望的关于目标凝聚物的分配特征属性。在一些实施方式中,该方法包括鉴定或确定包含期望的目标凝聚物分配特征的化合物或其部分。在一些实施方式中,该方法包括鉴定或确定化合物或其部分的、全部或部分地促成期望的目标凝聚物分配特征属性。在一些实施方式中,该方法包括修饰所鉴定的化合物或其部分,以优化期望的分配特征。

[0155] 在一些实施方式中,设计具有期望的分配特征的化合物的方法包括:(a)通过实施本文所述的方法确定多种测试化合物中的每一种在目标凝聚物中的分配特征;和(b)鉴定在目标凝聚物中具有期望的(如相似的)分配特征的、所述多种测试化合物中的一种或多种或其部分。在一些实施方式中,该方法包括比较多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的分配特征。在一些实施方式中,该方法包括选择和/或设计具有期望的分配特征的、多种测试化合物中的化合物或其部分。

[0156] 在一些实施方式中,鉴定与期望的关于目标凝聚物的分配特征相关的化合物特征的方法包括:(a)通过实施本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的一个子集或全部的分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征之外还共同具有的特征。

[0157] 在一些实施方式中,鉴定与化合物分配到凝聚物中相关的化合物特征的方法包括:(a)通过实施本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部的分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征之外还共同具有的特征。

[0158] 在一些实施方式中,鉴定在目标凝聚物中具有相同或期望的(如相似的)分配特征的测试化合物或其部分包括:鉴定具有期望的(如相似的)分配特征的测试化合物的共同部分或基序。在一些实施方式中,化合物或其部分的化合物特征基于电荷和疏水性中的一种或多种。

[0159] 在一些实施方式中,所鉴定的测试化合物或其部分可用作鉴定和/或设计具有期望的分配特征的一种或多种化合物的基础。在一些实施方式中,所述一种或多种化合物代表特许文库。在一些实施方式中,特许文库包含一种或多种化合物的集合(set),所述一种或多种化合物包含构成所鉴定的化合物或其部分(portion)的部分(moiety),该集合是特许文库的一部分或全部。在一些实施方式中,特许文库的各化合物具有彼此相似的分配特征,如至少约20%内的分配特征。在一些实施方式中,特许文库的各化合物满足或超过阈值分配特征。在一些实施方式中,特许文库包含至少约10种化合物,如至少约25种化合物、50种化合物、150种化合物、200种化合物、250种化合物、300种化合物、350种化合物、400种化合物、450种化合物、500种化合物、1,000种化合物、1,500种化合物、2,000种化合物、2,500种化合物、3,000种化合物、3,500种化合物、4,000种化合物、4,500种化合物、5,000种化合物、10,000种化合物、20,000种化合物、30,000种化合物、40,000种化合物或50,000种化合物。在一些实施方式中,特许文库的集合中的各化合物都适于给予个体。在一些实施方式中,特许文库的各化合物具有小于1,000Da的分子量,例如500Da或更小。在一些实施方式中,特许文库的各化合物满足Lipinski五倍率法则。在一些实施方式中,特许文库包含存在于单一组合物中的化合物。在一些实施方式中,特许文库可用于鉴定可用于靶向目标凝聚物的一种或多种化合物,其中所述一种或多种化合物被利用一种或多种传统药物筛选方法从特许文库中鉴定出来。

[0160] 在一些实施方式中,设计化合物包括向化合物添加(例如附接,例如共价附接)包含所鉴定的特征的部分,从而赋予化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,设计化合物包括去除包含所鉴定的特征的部分,从而赋予化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,化合物全部或部分地利用包括基于建模、计算机和/或计算的技术——例如基于生物信息学、化学信息学和/或人工智能(AI)的技术——的方法来设计。

[0161] 在一些实施方式中,该方法包括基于附接部分来设计测试化合物或其部分,该部分包含通过凝聚物缔合特征鉴定的特征,如化学结构或基序,从而赋予测试化合物以期望的分配特征。在一些实施方式中,所鉴定的特征全部或部分地调节测试化合物的凝聚物缔合特征,如分配特征,如增加或降低测试化合物在测试凝聚物中的分配程度。在一些实施方式中,设计测试化合物的方法包括,在任意数量的位置和/或立体化学取向上,将包含通过凝聚物缔合特征所鉴定的特征的部分附接至测试化合物的前体。在一些实施方式中,设计测试化合物的方法包括去除包含通过凝聚物缔合特征所鉴定的特征的部分。在一些实施方式中,设计测试化合物的方法包括,对于测试化合物的前体,在任意数量的位置和/或立体化学取向上,将部分改变为包含通过凝聚物缔合特征所鉴定的特征的另一个部分。在一些实施方式中,设计测试化合物的方法包括,对于测试化合物的前体,附接、去除和/或改变包含通过凝聚物缔合特征所鉴定的特征的多于一个部分。在一些实施方式中,测试化合物包含便于调节(例如附接、去除、改变)部分的特征,如化合物标记(例如,点击化学中使用的组分部分)。

[0162] 在一些实施方式中,所鉴定的测试化合物或其部分(一个或多个)可用作鉴定和/或设计具有期望的生物活性的一种或多种化合物的基础。在一些实施方式中,所述一种或多种化合物代表特许文库。在一些实施方式中,本文所述的方法包括,基于附接、去除或改变包含通过凝聚物缔合特征所鉴定的诸如化学结构或基序的特征的部分,从而赋予测试化

合物以期望的生物活性,来设计测试化合物或其部分。在一些实施方式中,前体化合物的期望的生物活性通过调节前体化合物的凝聚物缔合特征来提高。在一些实施方式中,前体化合物的不期望的生物活性通过调节前体化合物的凝聚物缔合特征而降低。

[0163] 在一些实施方式中,凝聚物缔合特征数据如分配特征数据,和/或所鉴定的测试化合物或其部分,可用于建立一个或多个规则集(rule sets)。在一些实施方式中,所述一个或多个规则集可以用作利用包括基于建模、计算机和/或计算的技术的方法鉴定或设计一种或多种化合物(例如,基于生物信息学、化学信息学和/或人工智能(AI)鉴定具有期望的分配特征的化合物)的基础。还提供了用于确定和/或应用所述一个或多个规则集的计算机软件。

[0164] 在一些实施方式中,化合物的分配特征基于:确定化合物在凝聚物中的量,如相对量,或与一种或多种凝聚物相比较的量,例如凝聚物偏好概况。例如,在一些实施方式中,设计具有期望的相对分配特征的化合物的方法包括:通过实施本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征。在一些实施方式中,设计具有期望的相对分配特征的化合物的方法包括:(a)通过实施本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征外还共同具有的特征;和(e)设计包含所鉴定的特征的化合物。在一些实施方式中,设计具有期望的相对分配特征的化合物的方法包括:(a)通过实施本文所述的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征外还共同具有的特征;和(e)设计不包含所鉴定的特征的化合物。

[0165] 在一些实施方式中,设计具有期望的凝聚物偏好概况的化合物的方法包括通过实施本文公开的方法确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况。在一些实施方式中,设计具有期望的凝聚物偏好概况的化合物的方法包括:(a)通过实施本文公开的方法确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况;(c)鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外还共同具有的特征;和(e)设计包含所鉴定的特征的化合物。在一些实施方式中,设计具有期望的凝聚物偏好概况的化合物的方法包括:(a)通过实施本文公开的方法确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况;(c)鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外还共同具有的特征;和(e)设计不包含所鉴定的特征的化合物。

[0166] 在一些实施方式中,本文公开的方法进一步包括制备利用本文所述的方法鉴定和/或设计的化合物。

[0167] 筛选测试化合物的方法

[0168] 在一些实施方式中,本发明包括从一组候选化合物筛选具有期望的分配特征的测试化合物的方法,该方法包括:(a)确定该组候选化合物中每一个的分配特征;和(b)鉴定具

有期望的分配特征的测试化合物。

[0169] 在一些实施方式中,期望的分配特征基于:与目标凝聚物缔合的分配特征。在一些实施方式中,期望的分配特征基于:与多种目标凝聚物缔合的分配特征。在一些实施方式中,该方法包括鉴定或确定目标凝聚物。在一些实施方式中,目标凝聚物与疾病相关。在一些实施方式中,与疾病相关的目标凝聚物是本领域已知的。在一些实施方式中,该方法包括获得目标凝聚物,如与疾病相关的目标凝聚物。

[0170] 在一些实施方式中,根据本文所述的方法确定一组候选化合物(如多于一种候选化合物)在目标凝聚物中的分配特征。在一些实施方式中,该组候选化合物至少约是2、5、10、15、50、75、100、150、200、300、400或500种候选化合物中的任一者。在一些实施方式中,候选化合物在目标凝聚物中的分配特征在体外确定。在一些实施方式中,候选化合物在目标凝聚物中的分配特征在细胞系统中确定。在一些实施方式中,候选化合物在目标凝聚物中的分配特征在非细胞系统如包含目标凝聚物或其组分的组合物中确定。

[0171] 在一些实施方式中,鉴定具有期望的分配特征的测试化合物或其部分包括鉴定与目标凝聚物的任何部分缔合(如与目标凝聚物的外部、表面和/或核心缔合)的测试化合物或其部分。在一些实施方式中,期望的分配特征是适合用于治疗个体疾病的分配特征。

[0172] 在一些实施方式中,本发明包括鉴定可用于治疗有需要的个体的疾病的测试化合物的方法。在一些实施方式中,该方法包括:(a) 鉴定与疾病相关的目标凝聚物;和(b) 确定候选化合物在目标凝聚物中的分配特征;和(c) 鉴定具有适合用于治疗疾病的分配特征的测试化合物或其部分。

[0173] 在一些实施方式中,该方法包括鉴定或确定与疾病相关的目标凝聚物。在一些实施方式中,与疾病相关的目标凝聚物是本领域已知的。在一些实施方式中,该方法包括获得与疾病相关的目标凝聚物。在一些实施方式中,该方法包括鉴定或确定与疾病相关的一种或多种目标凝聚物。

[0174] 在一些实施方式中,筛选测试化合物的方法包括:(a) 在存在第二化合物的情况下确定测试化合物的分配特征;和(b) 在不存在第二化合物的情况下确定测试化合物的分配特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括比较在存在第二化合物的情况下测试化合物的分配特征和在不存在第二化合物的情况下测试化合物的分配特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定在存在或不存在第二化合物的情况下测试化合物的分配特征的改变。

[0175] 在一些实施方式中,筛选测试化合物的方法包括:(a) 在存在测试化合物的情况下确定第二化合物的分配特征;和(b) 在不存在测试化合物的情况下确定第二化合物的分配特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括比较在存在测试化合物的情况下第二化合物的分配特征和在不存在第二化合物的情况下测试化合物的分配特征。在一些实施方式中,该方法进一步包括确定测试化合物改变第二化合物的分配特征的能力。

[0176] 在一些实施方式中,根据本文所述的方法确定候选化合物(如一种或多种候选化合物)在目标凝聚物中的分配特征。在一些实施方式中,该方法包括确定多种候选化合物的目标凝聚物分配特征。在一些实施方式中,所述多种候选化合物至少是约2、5、10、15、50、75、100、150、200、300、400或500种候选化合物中的任一者。在一些实施方式中,候选化合物在目标凝聚物中的分配特征在体外确定。在一些实施方式中,候选化合物在目标凝聚物中

的分配特征在细胞系统中确定。在一些实施方式中,候选化合物在目标凝聚物中的分配特征在非细胞系统如包含目标凝聚物或其组分的组合物中确定。

[0177] 在一些实施方式中,鉴定具有适合用于治疗疾病的分配特征的测试化合物或其部分包括:鉴定与目标凝聚物的任何部分缔合(如与目标凝聚物的外部、表面和/或核心缔合)的测试化合物或其部分。

[0178] 在一些实施方式中,本文公开的方法包括鉴定、确定、设计和/或筛选化合物,例如来自一组候选化合物的化合物,还包括基于化合物的其他参数来评估化合物。在一些实施方式中,鉴定化合物基于:评估(如表征或确定)化合物的凝聚物缔合特征和一个或多个其他参数,如分子量和药物效用。

[0179] 在一些实施方式中,本文公开的方法进一步包括制备利用本文所述的方法鉴定、设计和/或筛选的化合物。

[0180] 示例性实施方式

[0181] 所提供的实施方式包括:

[0182] 实施方式1.确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a)将测试化合物添加到包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物中;和(b)确定目标凝聚物中的测试化合物量,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0183] 实施方式2.实施方式1的方法,进一步包括在步骤(a)之前导致目标凝聚物形成。

[0184] 实施方式3.确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a)将测试化合物添加到包含前体分子的组合物中;(b)导致目标凝聚物形成以获得包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物;和(c)确定目标凝聚物中的测试化合物量,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0185] 实施方式4.实施方式1-3中任一项的方法,进一步包括确定凝聚物外溶液中的测试化合物量。

[0186] 实施方式5.实施方式4的方法,其中在确定凝聚物外溶液中的测试化合物量之前、同时或之后确定目标凝聚物中的测试化合物量。

[0187] 实施方式6.实施方式4或5的方法,进一步包括确定目标凝聚物中的测试化合物量与凝聚物外溶液中的测试化合物量的比率。

[0188] 实施方式7.实施方式1-6中任一项的方法,进一步包括将目标凝聚物与凝聚物外溶液分离。

[0189] 实施方式8.实施方式1-7中任一项的方法,进一步包括在确定目标凝聚物中的测试化合物量之前鉴定目标凝聚物。

[0190] 实施方式9.实施方式1-8中任一项的方法,其中目标凝聚物的失调与疾病相关。

[0191] 实施方式10.实施方式1-9中任一项的方法,进一步包括表征目标凝聚物,表征通过鉴定其中包含的一种或多种大分子进行。

[0192] 实施方式11.实施方式1-10中任一项的方法,其中所述目标凝聚物包含蛋白质,该蛋白质包含固有无序的序列。

[0193] 实施方式12.实施方式1-11中任一项的方法,进一步包括标记所述目标凝聚物以使所述目标凝聚物可视化。

[0194] 实施方式13.实施方式12的方法,其中目标凝聚物用放射性标记、比色标记或荧光

标记进行标记。

[0195] 实施方式14.实施方式1-13中任一项的方法,其中所述组合物包含细胞。

[0196] 实施方式15.实施方式14的方法,其中所述细胞是微生物或动物细胞。

[0197] 实施方式16.实施方式14或15的方法,其中所述细胞包含被确定失调的凝聚物。

[0198] 实施方式17.实施方式14-16中任一项的方法,其中所述细胞具有神经变性疾病或增殖性疾病的一个或多个特征。

[0199] 实施方式18.实施方式1-17中任一项的方法,其中所述目标凝聚物是细胞凝聚物。

[0200] 实施方式19.实施方式18的方法,其中所述细胞凝聚物是裂解体、P-颗粒、组蛋白基因座体、多泡体、神经元RA颗粒、核叶芽、核孔、核斑、核应力体、核仁、Oct1/PTF/转录(OPT)域、旁斑、核仁周室、PML核体、PML致癌域、多梳体、加工体、Sam68核体、应力颗粒或剪接斑。

[0201] 实施方式20.实施方式1-19中任一项的方法,其中所述目标凝聚物在细胞中。

[0202] 实施方式21.实施方式1-20中任一项的方法,其中所述凝聚物外溶液是细胞内液。

[0203] 实施方式22.实施方式21所述的方法,其中所述细胞内液是胞质溶胶或核溶胶。

[0204] 实施方式23.实施方式1-17中任一项的方法,其中所述目标凝聚物是细胞外凝聚物。

[0205] 实施方式24.实施方式23中任一项的方法,其中所述凝聚物外溶液是细胞外液。

[0206] 实施方式25.实施方式24的方法,其中细胞外液是间质液。

[0207] 实施方式26.实施方式1-13中任一项的方法,其中所述组合物不包含细胞。

[0208] 实施方式27.实施方式1-26中任一项的方法,其中所述组合物包含以下中的一种或多种:大分子、盐和缓冲剂。

[0209] 实施方式28.实施方式1-27中任一项的方法,其中所述组合物包含两种或更多种目标凝聚物。

[0210] 实施方式29.实施方式1-28中任一项的方法,其中该方法包括针对一种或多种另外的凝聚物重复该方法的步骤。

[0211] 实施方式30.实施方式1-29中任一项的方法,其中所述测试化合物是小分子、多肽或核酸。

[0212] 实施方式31.实施方式1-30中任一项的方法,其中所述测试化合物包括测试化合物标记。

[0213] 实施方式32.实施方式31的方法,其中测试化合物标记是放射性标记、比色标记或荧光标记。

[0214] 实施方式33.实施方式31或32的方法,其中测试化合物标记是荧光标记。

[0215] 实施方式34.实施方式31-33中任一项的方法,其中通过检测测试化合物标记来确定测试化合物的量。

[0216] 实施方式35.实施方式1-34中任一项的方法,其中测试化合物的量通过质谱法、液相色谱法和/或紫外-可见分光光度法确定。

[0217] 实施方式36.确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括用多种测试化合物进行实施方式1-35中任一项的方法。

[0218] 实施方式37.实施方式36的方法,进一步包括比较所述多种测试化合物的子集或

全部在目标凝聚物中的分配特征。

[0219] 实施方式38.实施方式37的方法,进一步包括鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物。

[0220] 实施方式39.实施方式38的方法,进一步包括鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征之外还共同具有的特征。

[0221] 实施方式40.实施方式39的方法,进一步包括确定包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0222] 实施方式41.确定测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征的方法,该方法包括:(i)通过用测试化合物进行实施方式1-35中任一项的方法,来确定测试化合物的分配特征;(ii)通过用参考化合物进行实施方式1-35中任一项的方法,来确定参考化合物的分配特征;和(iii)计算在(i)和(ii)中确定的分配特征的比率,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征。

[0223] 实施方式42.实施方式41的方法,其中测试化合物包括测试化合物标记。

[0224] 实施方式43.实施方式42的方法,其中参考化合物是测试化合物标记。

[0225] 实施方式44.确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征的方法,该方法包括:(1)进行实施方式41-43中任一项的方法;和(2)用多种测试化合物重复步骤(i)和(iii)。

[0226] 实施方式45.实施方式44的方法,进一步包括比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征。

[0227] 实施方式46.实施方式45的方法,进一步包括鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物。

[0228] 实施方式47.实施方式46的方法,进一步包括鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征之外还共同具有的特征。

[0229] 实施方式48.实施方式47的方法,进一步包括确定包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征。

[0230] 实施方式49.确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括:(a)将测试化合物添加到包含第一目标凝聚物和第二目标凝聚物的组合物中;(b)确定第一目标凝聚物中的测试化合物量;(c)确定第二目标凝聚物中的测试化合物量;和(d)计算在第一目标凝聚物和第二目标凝聚物中确定的测试化合物量的比率,从而确定测试化合物的凝聚物偏好概况。

[0231] 实施方式50.实施方式49的方法,进一步包括在步骤(a)之前导致第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物的形成。

[0232] 实施方式51.确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括:(a)将测试化合物添加到包含前体分子的组合物中;(b)导致组合物中第一目标凝聚物和第二目标凝聚物形成;(c)确定第一目标凝聚物中的测试化合物量;(d)确定第二目标凝聚物中的测试化合物量;和(e)计算在第一目标凝聚物和第二目标凝聚物中确定的测试化合物量的比率,从而确定测试化合物的凝聚物偏好概况。

[0233] 实施方式52.实施方式49-51中任一项的方法,其中在确定第二目标凝聚物中的测试化合物量之前、同时或之后确定第一目标凝聚物中的测试化合物量。

[0234] 实施方式53.实施方式49-52中任一项的方法,进一步包括从组合物分离第一目标凝聚物和第二目标凝聚物。

[0235] 实施方式54.实施方式49-53中任一项的方法,进一步包括在确定第一凝聚物和/或第二凝聚物中的测试化合物量之前鉴定第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物。

[0236] 实施方式55.实施方式49-54中任一项的方法,其中第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物的失调与疾病有关。

[0237] 实施方式56.实施方式49-55中任一项的方法,进一步包括表征第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物,表征通过鉴定其中包含的一种或多种大分子进行。

[0238] 实施方式57.实施方式49-56中任一项的方法,进一步包括标记第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物,以使第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物可视化。

[0239] 实施方式58.实施方式57所述的方法,其中所述第一目标凝聚物和所述第二目标凝聚物用不同的标记进行标记。

[0240] 实施方式59.实施方式57或58的方法,其中第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物用放射性标记、比色标记或荧光标记进行标记。

[0241] 实施方式60.实施方式49-56中任一项的方法,其中所述组合物包含细胞。

[0242] 实施方式61.实施方式60的方法,其中所述细胞是微生物或动物细胞。

[0243] 实施方式62.实施方式60或61的方法,其中所述细胞包含被确定失调的凝聚物。

[0244] 实施方式63.实施方式60-62中任一项的方法,其中所述细胞具有神经变性疾病或增殖性疾病的一个或多个特征。

[0245] 实施方式64.实施方式49-56中任一项的方法,其中所述第一目标凝聚物和/或所述第二目标凝聚物是细胞凝聚物。

[0246] 实施方式65.如实施方式64所述的方法,其中所述第一目标凝聚物是裂解体、P-颗粒、组蛋白基因座体、多泡体、神经元RNA颗粒、核叶芽、核孔、核斑、核应力体、核仁、Oct1/PTF/转录(OPT)域、旁斑、核仁周室、PML核体、PML致癌域、多梳体、加工体、Sam68核体、应力颗粒或剪接斑。

[0247] 实施方式66.实施方式64或65的方法,其中所述第二目标凝聚物是裂解体、P-颗粒、组蛋白基因座体、多泡体、神经元RNA颗粒、核叶芽、核孔、核斑、核应力体、核仁、Oct1/PTF/转录(OPT)域、旁斑、核仁周室、PML核体、PML致癌域、多梳体、加工体、Sam68核体、应力颗粒或剪接斑。

[0248] 实施方式67.实施方式49-66中任一项的方法,其中第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物在细胞中。

[0249] 实施方式68.实施方式49-63中任一项的方法,其中第一目标凝聚物和/或第二目标凝聚物是细胞外凝聚物。

[0250] 实施方式69.实施方式49-59中任一项的方法,其中所述组合物不包含细胞。

[0251] 实施方式70.实施方式49-69中任一项的方法,其中所述组合物包含以下中的一种或多种:大分子、盐和缓冲剂。

[0252] 实施方式71.实施方式49-70中任一项的方法,其中所述组合物包含一种或多种另外的目标凝聚物。

[0253] 实施方式72.实施方式49-71中任一项的方法,其中该方法包括对于一种或多种另

外的目标凝聚物重复该方法的步骤。

[0254] 实施方式73. 确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况的方法, 该方法包括用多种测试化合物进行实施方式49-72中任一项的方法。

[0255] 实施方式74. 实施方式73的方法, 进一步包括比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况。

[0256] 实施方式75. 实施方式74的方法, 进一步包括鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好的测试化合物。

[0257] 实施方式76. 实施方式75的方法, 进一步包括鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外还共同具有的特征。

[0258] 实施方式77. 实施方式76的方法, 进一步包括确定包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物的相对分配特征。

[0259] 实施方式78. 鉴定与化合物分配到凝聚物中相关的化合物特征的方法, 该方法包括: (a) 通过进行实施方式36的方法, 确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征; (b) 比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标化合物中的分配特征; (c) 鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物; 和 (d) 鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征之外还共同具有的特征。

[0260] 实施方式79. 鉴定与化合物分配到凝聚物中相关的化合物特征的方法, 该方法包括: (a) 通过进行实施方式44的方法, 确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征; (b) 比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征; (c) 鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物; 和 (d) 鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征之外还共同具有的特征。

[0261] 实施方式80. 鉴定与化合物分配到凝聚物中相关的化合物特征的方法, 该方法包括: (a) 通过进行实施方式73的方法, 确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况; (b) 比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况; (c) 鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物; 和 (d) 鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外还共同具有的特征。

[0262] 实施方式81. 设计对目标凝聚物具有期望的分配特征的化合物的方法, 该方法包括: (a) 通过进行实施方式36的方法, 确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征; (b) 比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的分配特征; (c) 鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物; (d) 鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征外还共同具有的特征; 和 (e) 设计包含所鉴定的特征的化合物。

[0263] 实施方式82. 设计具有期望的相对分配特征的化合物的方法, 该方法包括: (a) 通过进行实施方式44的方法, 确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征; (b) 比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征; (c) 鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物; (d) 鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征外还共同具有的特征; 和 (e) 设计包含所鉴定的特征的化合物。

[0264] 实施方式83. 设计具有期望的凝聚物偏好概况的化合物的方法, 该方法包括: (a)

通过进行实施方式73的方法,确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况;(c)鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外还共同具有的特征;和(e)设计包含所鉴定的特征的化合物。

[0265] 实施方式84.实施方式81-83中任一项的方法,进一步包括制备所述化合物。

[0266] 实施方式85.从一组候选化合物筛选具有期望的分配特征的测试化合物的方法,该方法包括:(a)确定该组候选化合物中每一个的分配特征;和(b)鉴定具有期望的分配特征的测试化合物。

[0267] 实施方式86.实施方式85的方法,其中该组候选化合物中的每一个的分配特征在体外确定。

[0268] 实施方式87.实施方式85或86的方法,其中所述测试化合物具有适合用于治疗个体疾病的分配特征。

[0269] 实施方式88.鉴定可用于治疗有需要的个体的疾病的测试化合物的方法,该方法包括:(a)鉴定与该疾病相关的目标凝聚物;(b)确定候选化合物在目标凝聚物中的分配特征,和(c)鉴定具有适合用于治疗疾病的分配特征的测试化合物。

[0270] 进一步的示例性实施方式

[0271] 所提供的实施方式中还包括:

[0272] E1.确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a)将测试化合物与包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物组合;(b)确定目标凝聚物中的测试化合物量,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0273] E2.实施方式E1的方法,进一步包括在步骤(a)之前导致目标凝聚物形成。

[0274] E3.确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a)在测试化合物的存在下导致目标凝聚物形成,以获得包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物;和(b)确定目标凝聚物中的测试化合物量,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0275] E4.实施方式E3的方法,进一步包括在步骤(a)之前将测试化合物与包含前体分子的前体组合物组合。

[0276] E5.实施方式E3的方法,进一步包括在步骤(a)之前将测试化合物添加到包含前体分子的前体组合物中。

[0277] E6.实施方式E1-E5中任一项的方法,进一步包括确定凝聚物外溶液中的测试化合物量。

[0278] E7.实施方式E6的方法,其中在确定凝聚物外溶液中的测试化合物量之前、同时或之后,确定目标凝聚物中的测试化合物量。

[0279] E8.实施方式E6或E7的方法,进一步包括确定目标凝聚物中的测试化合物量与凝聚物外溶液中的测试化合物量的比率。

[0280] E9.实施方式E1-E8中任一项的方法,进一步包括将目标凝聚物与凝聚物外溶液分离。

[0281] E10.实施方式E1-E9中任一项的方法,进一步包括在确定目标凝聚物中的测试化合物量之前鉴定目标凝聚物。

- [0282] E11.实施方式E1-E10中任一项的方法,其中目标凝聚物的失调与疾病相关。
- [0283] E12.实施方式E1-E11中任一个的方法,进一步包括表征目标凝聚物,表征通过鉴定其中包含的一种或多种大分子进行。
- [0284] E13.实施方式E12的方法,其中所述鉴定包括确定目标凝聚物中的一种或多种大分子的量。
- [0285] E14.实施方式E13的方法,进一步包括确定目标凝聚物中的测试化合物的量与目标凝聚物中一种或多种大分子的量的比率。
- [0286] E15.实施方式E1-E14中任一项的方法,其中所述目标凝聚物包含蛋白质,所述蛋白质包含固有无序的序列。
- [0287] E16.实施方式E1-E15中任一项的方法,进一步包括标记目标凝聚物以使目标凝聚物可视化。
- [0288] E17.实施方式E16的方法,其中目标凝聚物用放射性标记、比色标记或荧光标记进行标记。
- [0289] E18.实施方式E1-E17中任一项的方法,其中所述组合物包含细胞。
- [0290] E19.实施方式E18的方法,其中所述细胞是微生物或动物细胞。
- [0291] E20.实施方式E18或E19的方法,其中所述细胞包含被确定失调的凝聚物。
- [0292] E21.实施方式E18-E20中任一项的方法,其中所述细胞具有神经变性疾病或增殖性疾病的一个或多个特征。
- [0293] E22.根据实施方式E1-E21中任一项所述的方法,其中所述目标凝聚物是细胞凝聚物。
- [0294] E23.实施方式E22的方法,其中所述细胞凝聚物是裂解体、P-颗粒、组蛋白基因座体、多泡体、神经元RA颗粒、核叶芽、核孔、核斑、核应力体、核仁、Oct1/PTF/转录(OPT)域、旁斑、核仁周室、PML核体、PML致癌域、多梳体、加工体、Sam68核体、应力颗粒或剪接斑。
- [0295] E24.根据实施方式E1-E23中任一项的方法,其中所述目标凝聚物在细胞中。
- [0296] E25.实施方式E24的方法,其中所述细胞是微生物或动物细胞。
- [0297] E26.实施方式E24或E25的方法,其中所述细胞具有神经变性疾病或增殖性疾病的一个或多个特征。
- [0298] E27.实施方式E1-E26中任一项的方法,其中所述凝聚物外溶液是细胞内液。
- [0299] E28.实施方式E27的方法,其中所述细胞内液是胞质溶胶或核质溶胶。
- [0300] E29.实施方式E1-E21中任一项的方法,其中所述目标凝聚物不在细胞中。
- [0301] E30.实施方式E29的方法,其中所述目标凝聚物是细胞外凝聚物。
- [0302] E31.实施方式E1-E22或E29-E30中任一项的方法,其中凝聚物外溶液是细胞外液。
- [0303] E32.实施方式E31的方法,其中细胞外液是间质液。
- [0304] E33.实施方式E1-E17中任一项的方法,其中所述方法是无细胞测定法。
- [0305] E34.实施方式E1-E33中任一项的方法,其中所述组合物包含以下中的一种或多种:大分子、盐和缓冲剂。
- [0306] E35.实施方式E1-E34中任一项的方法,其中所述组合物包含两种或更多种目标凝聚物。
- [0307] E36.实施方式E1-E35中任一项的方法,其中该方法包括对于一种或多种另外的凝

聚物重复该方法的步骤。

[0308] E37.实施方式E1-E36中任一项的方法,其中所述测试化合物是小分子、多肽或核酸。

[0309] E38.实施方式E1-E37中任一项的方法,其中所述测试化合物包括测试化合物标记。

[0310] E39.实施方式E38的方法,其中测试化合物标记是放射性标记、比色标记或荧光标记。

[0311] E40.实施方式E38或E39的方法,其中测试化合物标记是荧光标记。

[0312] E41.实施方式E38-E40中任一项的方法,其中测试化合物量通过检测测试化合物标记来确定。

[0313] E42.实施方式E1-E41中任一项的方法,其中测试化合物量通过质谱法、液相色谱法和/或紫外-可见分光光度法确定。

[0314] E43.确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括用多种测试化合物进行实施方式E1-E42中任一项的方法。

[0315] E44.实施方式E43的方法,进一步包括比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的分配特征。

[0316] E45.实施方式E44的方法,进一步包括鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物。

[0317] E46.实施方式E45的方法,进一步包括鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征之外还共同具有的特征。

[0318] E47.实施方式E46的方法,进一步包括确定包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0319] E48.实施方式E46或E47的方法,进一步包括确定不包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0320] E49.确定测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征的方法,该方法包括:(i)通过用测试化合物进行实施方式E1-E42中任一项的方法,来确定测试化合物的分配特征;(ii)通过用参考化合物进行实施方式E1-E42中任一项的方法来确定参考化合物的分配特征;和(iii)计算在(i)和(ii)中确定的分配特征的比率,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征。

[0321] E50.实施方式E49的方法,其中测试化合物包括测试化合物标记。

[0322] E51.实施方式E50的方法,其中参考化合物是测试化合物标记。

[0323] E52.确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征的方法,该方法包括:(1)进行实施方式E49-E51中任一项的方法;和(2)用多种测试化合物重复步骤(i)和(iii)。

[0324] E53.实施方式E52的方法,进一步包括比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征。

[0325] E54.实施方式E53的方法,进一步包括鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物。

[0326] E55.实施方式E54的方法,进一步包括鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征之外还共同具有的特征。

[0327] E56.实施方式E55的方法,进一步包括确定包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征。

[0328] E57.实施方式E55或E56的方法,进一步包括确定不包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征。

[0329] E58.确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括:(a)利用实施方式E1-E42中任一项的方法确定测试化合物在第一目标凝聚物中的分配特征;(b)利用实施方式E1-E42中任一项的方法确定测试化合物在第二目标凝聚物中的分配特征;和(c)计算在第一目标凝聚物和第二目标凝聚物中确定的测试化合物的分配特征的比率,从而确定测试化合物的凝聚物偏好概况。

[0330] E59.实施方式E58的方法,其中第一目标凝聚物和第二目标凝聚物在相同的组合物中。

[0331] E60.实施方式E58的方法,其中第一目标凝聚物和第二目标凝聚物在不同的组合物中。

[0332] E61.实施方式E58-E60中任一项的方法,其中在确定测试化合物在第二目标凝聚物中的分配特征之前、同时或之后,确定测试化合物在第一目标凝聚物中的分配特征。

[0333] E62.确定测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括:(a)利用实施方式E49-E51中任一项的方法确定测试化合物在第一目标凝聚物中的相对分配特征;(b)利用实施方式E49-E51中任一项的方法确定测试化合物在第二目标凝聚物中的相对分配特征;和(c)计算在第一目标凝聚物和第二目标凝聚物中确定的测试化合物的分配特征的比率,从而确定测试化合物的凝聚物偏好概况。

[0334] E63.实施方式E62的方法,其中第一目标凝聚物和第二目标凝聚物在相同的组合物中。

[0335] E64.实施方式E62的方法,其中第一目标凝聚物和第二目标凝聚物在不同的组合物中。

[0336] E65.实施方式E62-E64中任一项的方法,其中在确定测试化合物在第二目标凝聚物中的相对分配特征之前、同时或之后,确定测试化合物在第一目标凝聚物中的相对分配特征。

[0337] E66.实施方式E58-E65中任一个的方法,进一步包括标记第一目标凝聚物和第二目标凝聚物,以使第一目标凝聚物和第二目标凝聚物可视化。

[0338] E67.实施方式E66的方法,其中第一目标凝聚物和第二目标凝聚物用不同的标记进行标记。

[0339] E68.实施方式E58-E67中任一项的方法,其中该方法包括对于一种或多种另外的目标凝聚物重复该方法的步骤。

[0340] E69.确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况的方法,该方法包括用多种测试化合物进行实施方式E58-E68中任一项的方法。

[0341] E70.实施方式E69的方法,进一步包括比较所述多种测试化合物的子集或所有的凝聚物偏好概况。

[0342] E71.实施方式E70的方法,进一步包括鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物。

[0343] E72.实施方式E71的方法,进一步包括鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况之外还共同具有的特征。

[0344] E73.实施方式E72的方法,进一步包括确定包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物的相对分配特征。

[0345] E74.实施方式E72或E73的方法,进一步包括确定不包含所鉴定的特征的一种或多种另外的测试化合物的相对分配特征。

[0346] E75.鉴定与化合物分配入到凝聚物之内或之外相关的化合物特征的方法,该方法包括:(a)通过进行实施方式E43的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标化合物中的分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征之外还共同具有的特征。

[0347] E76.鉴定与化合物分配到凝聚物之内或之外相关的化合物特征的方法,该方法包括:(a)通过进行实施方式E52的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征之外还共同具有的特征。

[0348] E77.鉴定与化合物分配到凝聚物之内或之外相关的化合物特征的方法,该方法包括:(a)通过进行实施方式E69的方法确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况;(c)鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物;和(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外还共同具有的特征。

[0349] E78.设计具有期望的在目标凝聚物之内或之外的分配特征的化合物的方法,该方法包括:(a)通过进行实施方式E43的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的分配特征的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的分配特征外还共同具有的特征;和(e) (i)设计包含所鉴定的特征的化合物;或(ii)设计不包含所鉴定的特征的化合物,从而设计具有期望的在目标凝聚物之内或之外的分配特征的化合物。

[0350] E79.设计具有期望的在目标凝聚物之内或之外的相对分配特征的化合物的方法,该方法包括:(a)通过进行实施方式E52的方法确定多种测试化合物在目标凝聚物中的相对分配特征;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部在目标凝聚物中的相对分配特征;(c)鉴定在目标凝聚物中具有相同或相似的相对分配特征的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的相对分配特征外还共同具有的特征;和(e) (i)设计包含所鉴定的特征的化合物;或(ii)设计不包含所鉴定的特征的化合物,从而设计具有期望的在目标凝聚物之内或之外的相对分配特征的化合物。

[0351] E80.设计具有期望的凝聚物偏好概况的化合物的方法,该方法包括:(a)通过进行实施方式E69的方法确定多种测试化合物的凝聚物偏好概况;(b)比较所述多种测试化合物的子集或全部的凝聚物偏好概况;(c)鉴定具有相同或相似的凝聚物偏好概况的测试化合物;(d)鉴定所鉴定的测试化合物的子集或全部除了相同或相似的凝聚物偏好概况外还共

同具有的特征;和(e) (i) 设计包含所鉴定的特征的化合物;或(ii) 设计不包含所鉴定的特征的化合物,从而设计具有期望的凝聚物偏好概况的化合物。

[0352] E81.实施方式E78-E80中任一项的方法,进一步包括制备所述化合物。

[0353] E82.从一组候选化合物筛选具有期望的分配特征的测试化合物的方法,该方法包括:(a) 确定该组候选化合物中每一个的分配特征;和(b) 鉴定具有期望的分配特征的测试化合物。

[0354] E83.实施方式E82的方法,其中该组候选化合物中每一个的分配特征在体外确定。

[0355] E84.实施方式E82或E83的方法,其中所述测试化合物具有适合用于治疗个体疾病的分配特征。

[0356] E85.鉴定可用于治疗有需要的个体的疾病的测试化合物的方法,该方法包括:(a) 鉴定与该疾病相关的目标凝聚物;和(b) 确定候选化合物在目标凝聚物中的分配特征,和(c) 鉴定具有适合用于治疗该疾病的分配特征的测试化合物。

[0357] E86.确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征的方法,该方法包括:(a) 将测试化合物与包含目标凝聚物和凝聚物外溶液的组合物组合;(b) 获得参考对照;(c) 利用质谱技术测量凝聚物外溶液中的测试化合物或其部分的MS信号;(d) 利用质谱技术测量参考对照中的测试化合物或其部分的MS信号;和(e) 比较来自凝聚物外溶液的测试化合物的MS信号和来自参考对照的测试化合物的MS信号,从而确定测试化合物在目标凝聚物中的分配特征。

[0358] E87.E86的方法,其中与组合物组合的测试化合物的量为100nM或更少,并且组合物中——包括目标凝聚物中——的前体分子的量为约5 μ M。

[0359] E88.包含多种化合物的文库,其中所述多种化合物中的各化合物包含相同的部分,该部分包含具有期望的分配特征的特征。

[0360] E89.设计具有期望的分配特征的测试化合物的方法,该方法包括通过将部分连接至化合物来修饰测试化合物的前体,其中该部分包括具有期望的分配特征的特征。

[0361] 本领域技术人员将认识到,在本申请公开的范围和精神内多种实施方式是可能的。通本公开过以下实施例进一步示例,其不应被解释为将本公开在范围或精神上限制于其中描述的具体程序。

[0362] 实施例

[0363] 实施例1

[0364] 基于溶液的凝聚物中一种或多种化合物的表征

[0365] 凝聚物形成在溶液中。例如,将包含高浓度的盐和高浓度的一种或多种能够形成凝聚物的蛋白质的溶液稀释到模拟生理盐条件的缓冲剂中。

[0366] 可选地,将包含一种或多种能够形成凝聚物的蛋白质的溶液稀释到缓冲剂中并加入拥挤剂。在一个具体实施方式中,将能够形成凝聚物的蛋白质与在含有25mM Tris-HCl (pH 7.4)、150mM KCl、2.5%甘油和0.5mM DTT的缓冲剂中的10%葡聚糖组合。

[0367] 在凝聚物形成之前或之后,将测试化合物添加到溶液中。在凝聚物形成后添加时,将溶液培育以分配测试化合物。

[0368] 凝聚物的密度一般大于周围溶液,因此允许凝聚物沉淀。在一些情况下,将凝聚物成像。例如,利用已知浓集在凝聚物中的染料或标记蛋白质使凝聚物可视化。

[0369] 在一些情况下,从凝聚物中除去上清液。在一些情况下,分析上清液以确定化合物存在量。

[0370] 分析凝聚物以确定化合物存在量。在一些情况下,计算凝聚物中的化合物与上清液中的化合物的比率。

[0371] 实施例2

[0372] 基于溶液的FUS和PGL-3凝聚物中的染料化合物的表征

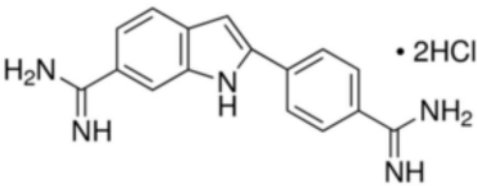
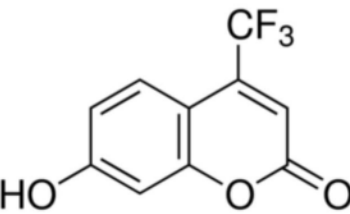
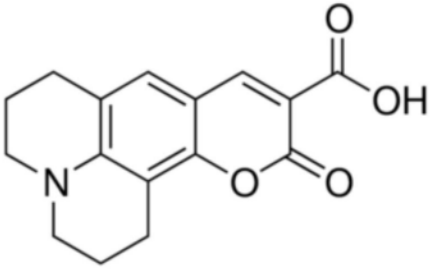
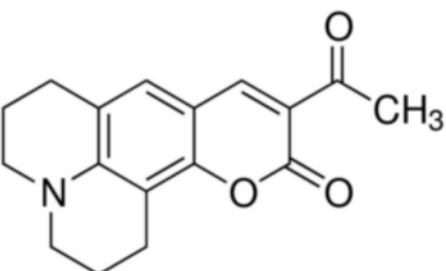
[0373] 利用示例性方法测定多种示例性测试化合物,以确定分配特征、相对分配特征和凝聚物偏好概况。对于本例,使用的示例性测试化合物是染料;然而,测试化合物不限于染料。整个程序在两个独立的实验中在不同日且以不同的顺序进行两次。

[0374] 样品制备

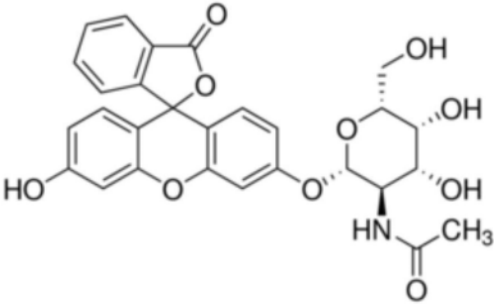
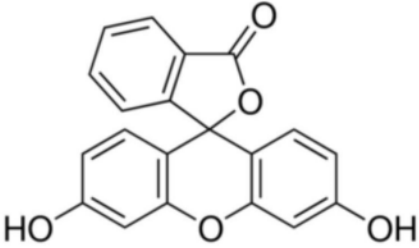
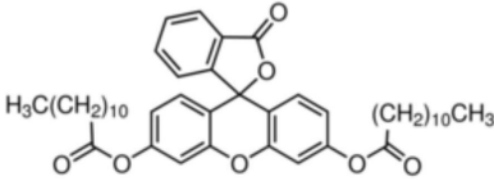
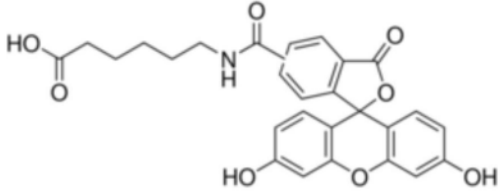
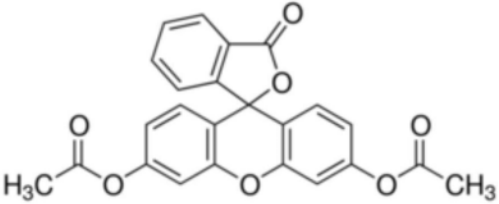
[0375] 所有染料原液均以在100%DMSO中的1mM溶液形式储存。所用染料显示在表1中。将染料溶解在稀释缓冲剂(DB:14.7mM Tris,pH 7.25,1mM DTT)中,以产生在1.1765%DMSO中的11.765 μ M染料。将17 μ l染料分布在384孔非结合板(Greiner)中。

[0376] 表1.测定的染料

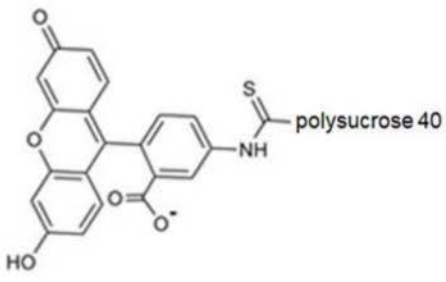
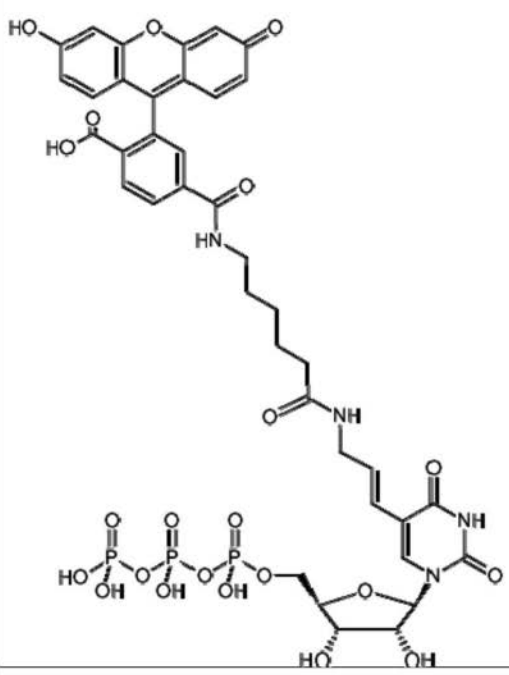
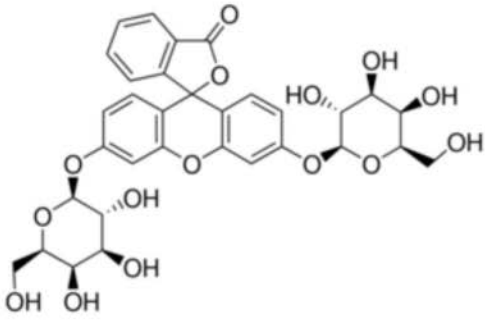
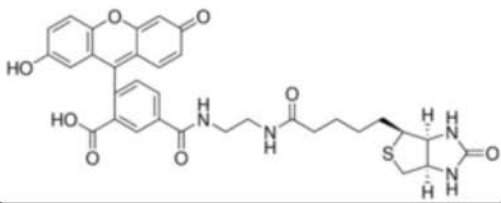
[0377]

染料#	名称	结构	通道
1	DAPI		405
2	7-羟基-4-(三氟甲基) 香豆素		405
3	香豆素 343		405
4	香豆素 334		488
5	荧光素单-(N-乙酰基 -β-D-氨基半乳糖苷)		488

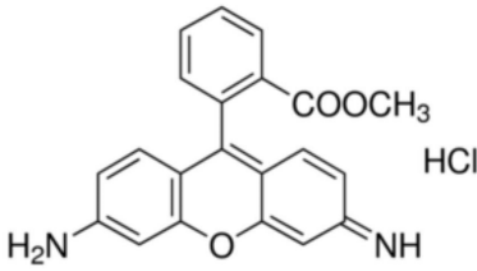
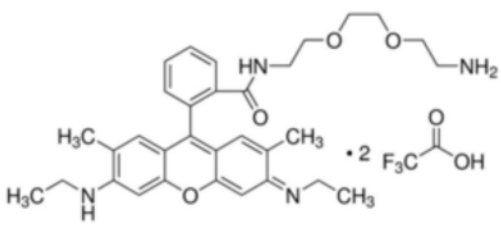
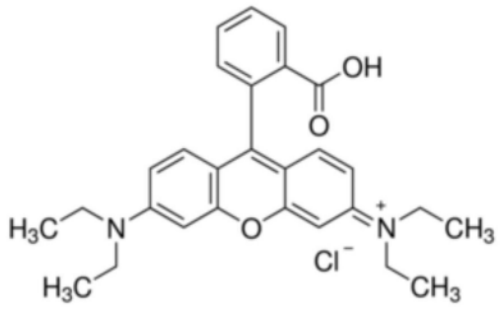
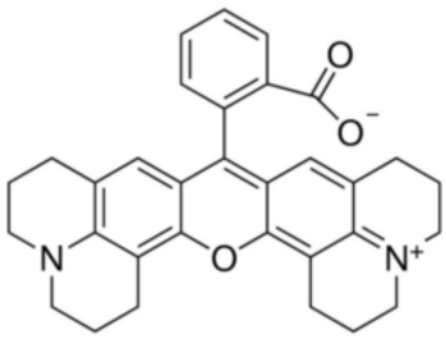
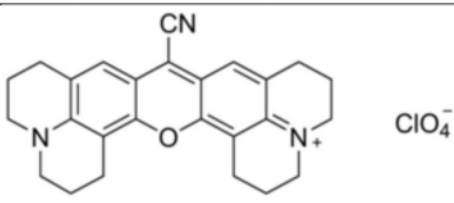
[0378]

			
6	荧光素		488
7	二月桂酸荧光素		488
8	6-[荧光素-5(6)-羧酰胺基]己酸		488
9	二乙酸荧光素		488
10	聚蔗糖 40-荧光素异硫氰酸酯缀合物		488

[0379]

			
11	荧光素-12-UTP		488
12	荧光素二(β-D-吡喃半乳糖苷)		488
13	生物素-4-荧光素		488

[0380]

14	罗丹明 123		488
15	N-(8-氨基-3,6-二氧杂辛基)罗丹明 6G-酰胺双(三氟乙酸酯)		488
16	罗丹明 B		561
17	罗丹明 101 内盐		561
18	罗丹明 800		640
[0381]			

[0382] 将带SNAP标签的FUS蛋白或无标签的PGL-3蛋白在室温下解冻至少10分钟,并将缓冲剂更换为分配缓冲剂(PB:50mM Tris pH 7.25、500mM KCl、5%甘油、和1mM DTT)。然后将

蛋白质在PB中稀释至33.3 μ M。将3 μ l蛋白质溶液加入384孔板以开始相分离,产生20 μ l的5 μ M蛋白质和10 μ M染料——在75mM KCl、0.75%甘油、20mM Tris、1mM DTT和1%DMSO中,或对于无染料对照反应而言,产生20 μ l的5 μ M蛋白质——在75mM KCl、0.75%甘油、20mM Tris、1mM DTT中。

[0383] 成像

[0384] 利用旋转圆盘共聚焦显微镜获取样品的图像。利用60x油高NA物镜捕获凝聚物液滴。激光功率设置为20%,并且曝光时间根据各染料的特定荧光发射强度进行调整。曝光时间范围为1-1000ms。使用适当的过滤器设置,匹配相应染料的激发和发射光谱。用于各染料的通道显示在表1中。每孔拍摄三个图像。示例性图像显示在图1中。对于所有应用的成像条件,记录在无染料情况下的蛋白质液滴的背景信号。

[0385] 图像和数据分析

[0386] 利用图像分析软件Fiji,手动测量每个图像的一个示例性目标凝聚物内部(内部强度,I-in)和示例性目标凝聚物旁边区域中(外部强度,I-out)的荧光强度。描绘所测量的区域的实例示于图2A中。在每个实验中针对每种染料总共测量三个I-in和三个I-out值并取平均值。在一天的实验中测量的FUS-SNAP凝聚物的I-in和I-out值分别显示在表2和表3中。在一天的实验中测量的PGL-3凝聚物的I-in和I-out值分别显示在表4和表5中。基于在相同显微镜条件下拍摄的背景图像(无染料对照),将所有值进行背景校正。示例性背景图像显示在图2B中,并且测量的I-in或I-out背景测量值显示在表3-5中。

[0387] 表2.FUS-SNAP凝聚物内部的染料测量。

染料#	有染料下的内部强度				无染料下的内部强度			内部强度（有染料-无染料）	
	1	2	3	平均值	1	2	平均值		
[0388]	1	638.5	599.9	628.8	622.4	120.6	119.3	120.0	<u>502.4</u>
	2	278.2	278.1	286.5	280.9	120.6	119.3	120.0	<u>160.9</u>
	3	3451.6	3462.2	3804.4	3572.7	120.6	119.3	120.0	<u>3452.8</u>
	4	10755.9	10738.6	11058.9	10851.1	503.3	491.9	497.6	<u>10353.6</u>
	5	2046.8	2005.1	1638.1	1896.7	503.3	491.9	497.6	<u>1399.1</u>
	6	6328.8	6300.8	6201.7	6277.1	131.8	138.6	135.2	<u>6141.9</u>
[0389]	7	548.7	492.0	481.3	507.3	503.3	491.9	497.6	<u>9.7</u>
	8	5285.1	5631.6	5148.0	5354.9	131.8	138.6	135.2	<u>5219.7</u>
	9	5836.4	6036.1	6229.9	6034.1	4134.6	4290.7	4212.6	<u>1821.5</u>
	10	6139.7	6105.5	5024.6	5756.6	131.8	138.6	135.2	<u>5621.4</u>
	11	13042.4	13375.9	12572.2	12996.8	131.8	138.6	135.2	<u>12861.6</u>
	12	456.2	508.6	469.3	478.0	503.3	491.9	497.6	<u>-19.5</u>
	13	4600.2	4189.8	5218.3	4669.4	131.8	138.6	135.2	<u>4534.2</u>
	14	3123.1	2956.9	2831.2	2970.4	131.8	138.6	135.2	<u>2835.2</u>
	15	3084.2	3756.7	3599.3	3480.0	4134.6	4290.7	4212.6	<u>-732.6</u>
	16	2154.5	2074.7	1895.0	2041.4	99.7	99.6	99.6	<u>1941.7</u>
	17	4695.6	5663.6	4511.0	4956.7	99.7	99.6	99.6	<u>4857.1</u>
	18	15394.5	13908.5	15851.1	15051.4	129.9	133.8	131.9	<u>14919.5</u>

[0390] 表3.FUS-SNAP凝聚物外部的染料测量。

染料#	有染料下的外部强度				无染料下的外部强度			外部强度（有染料-无染料）
	1	2	3	平均值	1	2	平均值	
1	233.9	233.3	218.7	228.6	120.1	120.1	120.1	<u>108.6</u>
2	235.7	228.5	232.0	232.0	120.1	120.1	120.1	<u>112.0</u>
3	1486.5	1529.0	1479.6	1498.4	120.1	120.1	120.1	<u>1378.3</u>
4	4894.0	5118.6	5078.2	5030.3	140.3	139.8	140.0	<u>4890.2</u>
5	1319.4	1306.9	1191.0	1272.5	140.3	139.8	140.0	<u>1132.4</u>
6	3771.1	3840.2	3742.7	3784.7	104.3	103.8	104.0	<u>3680.6</u>
7	141.6	135.4	138.4	138.5	140.3	139.8	140.0	<u>-1.6</u>
8	3064.0	3267.0	3205.5	3178.8	104.3	103.8	104.0	<u>3074.8</u>
9	1487.5	1414.8	1552.6	1485.0	519.0	581.2	550.1	<u>934.8</u>
10	5878.5	5846.2	4791.0	5505.3	104.3	103.8	104.0	<u>5401.2</u>
11	2423.6	3035.6	2255.1	2571.4	104.3	103.8	104.0	<u>2467.4</u>
12	150.1	142.8	152.9	148.6	140.3	139.8	140.0	<u>8.5</u>
13	2286.6	2244.6	2195.6	2242.3	104.3	103.8	104.0	<u>2138.2</u>
14	2174.8	2322.7	2335.1	2277.6	104.3	103.8	104.0	<u>2173.5</u>
15	559.0	527.6	532.7	539.8	519.0	581.2	550.1	<u>-10.3</u>
16	546.8	508.3	565.6	540.2	100.0	99.9	99.9	<u>440.3</u>
17	808.3	1011.5	887.5	902.4	100.0	99.9	99.9	<u>802.5</u>
18	2064.2	1988.2	2224.3	2092.2	133.8	130.8	132.3	<u>1959.9</u>

[0392] 表4.PGL-3凝聚物内部的染料测量

染料#	有染料下的内部强度				无染料下的内部强度			内部强度（有染料-无染料）
	1	2	3	平均值	1	2	平均值	
1	211.3	211.0	215.7	212.6	121.1	120.4	120.8	<u>91.9</u>
2	273.9	267.0	268.3	269.8	121.1	120.4	120.8	<u>149.0</u>
3	2228.4	2006.3	2059.4	2098.0	121.1	120.4	120.8	<u>1977.3</u>
4	212.2	205.0	197.2	204.8	121.1	120.4	120.8	<u>84.0</u>
5	1912.6	1794.0	1797.0	1834.5	615.1	579.4	597.2	<u>1237.3</u>
6	4585.4	4501.5	4119.2	4402.0	146.6	146.4	146.5	<u>4255.5</u>
7	784.6	785.3	792.4	787.4	615.1	579.4	597.2	<u>190.2</u>
8	3527.5	3608.1	3480.3	3538.6	146.6	146.4	146.5	<u>3392.1</u>
9	824.1	801.2	860.4	828.6	615.1	579.4	597.2	<u>231.3</u>
10	5747.5	6281.4	4996.0	5674.9	146.6	146.4	146.5	<u>5528.4</u>
11	2451.3	2688.1	2362.8	2500.7	146.6	146.4	146.5	<u>2354.2</u>
12	689.4	656.9	723.9	690.1	615.1	579.4	597.2	<u>92.8</u>
13	2939.4	3141.8	3035.4	3038.9	146.6	146.4	146.5	<u>2892.4</u>
14	2874.7	2858.2	2900.3	2877.7	146.6	146.4	146.5	<u>2731.2</u>
15	6831.9	6829.0	5802.8	6487.9	4477.7	6041.9	5259.8	<u>1228.1</u>
16	5570.5	6179.8	5579.3	5776.5	101.5	101.6	101.5	<u>5675.0</u>
17	12579.6	14061.0	12561.8	13067.5	101.5	101.6	101.5	<u>12966.0</u>
18	714.9	700.1	777.4	730.8	125.2	127.2	126.2	<u>604.6</u>

[0395] 表5.PGL-3凝聚物外部的染料测量。

[0396]

染料#	有染料下的外部强度				无染料下的外部强度			外部强度(有染料-无染料)
	1	2	3	平均值	1	2	平均值	
1	173.1	168.4	164.9	168.8	120.1	120.8	120.4	48.4
2	263.1	258.0	266.0	262.4	120.1	120.8	120.4	141.9
3	1472.5	1407.6	1461.1	1447.1	120.1	120.8	120.4	1326.6
4	178.0	179.6	179.5	179.0	120.1	120.8	120.4	58.6
5	1439.0	1386.2	1353.5	1392.9	165.2	160.6	162.9	1230.0
6	4395.6	4190.8	3912.1	4166.2	105.7	105.0	105.3	4060.8
7	215.9	212.1	214.8	214.2	165.2	160.6	162.9	51.3
8	3491.4	3551.4	3447.6	3496.8	105.7	105.0	105.3	3391.4
9	269.6	264.9	273.2	269.2	165.2	160.6	162.9	106.3
10	5900.4	6581.6	5199.5	5893.8	105.7	105.0	105.3	5788.5
11	2174.3	2443.9	2108.6	2242.3	105.7	105.0	105.3	2137.0
12	208.4	203.2	207.7	206.4	165.2	160.6	162.9	43.5
13	2781.8	2905.7	2825.1	2837.5	105.7	105.0	105.3	2732.2
14	2628.3	2616.4	2545.0	2596.6	105.7	105.0	105.3	2491.2
15	1289.1	1266.2	1236.3	1263.8	671.5	744.9	708.2	555.7
16	3907.8	4226.6	4131.5	4088.7	101.3	101.6	101.5	3987.2
17	7184.0	7157.1	7012.6	7117.9	101.3	101.6	101.5	7016.4
18	301.3	294.6	332.2	309.4	128.7	132.7	130.7	178.7

[0397] 通过I-in除以I-out,计算目标凝聚物内和目标凝聚物外测量的平均强度的比率,尽管也可以采用I-out除以I-in。然后对由两个不同实验日确定的I-in:I-out比率取平均。表6显示了各日和平均I-in:I-out比率。FUS-SNAP凝聚物的平均I-in:I-out比率显示在图3中,并且PGL-3凝聚物的平均I-in:I-out比率显示在图4中。两个实验之间的标准偏差由图3和图4中的误差棒表示。

[0398] 还计算了FUS-SNAP I-in:I-out与PGL-3I-in:I-out的比率,并显示在表6和图5中。

[0399] 表6。计算的染料强度比率

染料 #	内部:外部强度比率								FUS-SNAP:PGL-3 比率
	FUS-SNAP 凝聚物				PGL-3 凝聚物				
	第 1 天	第 2 天	平均 值	标准 偏差	第 1 天	第 2 天	平均值	标准偏 差	
1	4.6	3.3	4.0	0.9	1.9	3.3	2.6	1.0	1.5
2	1.4	1.2	1.3	0.2	1.0	1.1	1.1	0.0	1.2
3	2.5	2.8	2.7	0.2	1.5	1.1	1.3	0.3	2.0
4	2.1	3.0	2.6	0.6	1.4	1.3	1.3	0.1	1.9
5	1.2	1.4	1.3	0.1	1.0	1.1	1.1	0.1	1.3
6	1.7	1.4	1.5	0.2	1.0	1.0	1.0	0.0	1.5
7	-6.2	N/A	N/A	N/A	3.7	-4.1	N/A	N/A	N/A
8	1.7	1.6	1.6	0.1	1.0	1.0	1.0	0.0	1.6
9	1.9	1.5	1.7	0.3	2.2	-0.4	N/A	N/A	N/A
10	1.0	1.1	1.1	0.0	1.0	0.9	0.9	0.0	1.1
11	5.2	4.8	5.0	0.3	1.1	1.0	1.1	0.1	4.7
12	-2.3	N/A	N/A	N/A	2.1	1.9	N/A	N/A	N/A
13	2.1	2.1	2.1	0.0	1.1	1.1	1.1	0.0	2.0
14	1.3	1.4	1.3	0.0	1.1	1.1	1.1	0.0	1.2
15	70.8	N/A	N/A	N/A	N/A	3.3	N/A	N/A	N/A
16	4.4	3.8	4.1	0.4	1.4	1.3	1.4	0.1	3.0
17	6.1	5.9	6.0	0.1	1.8	1.9	1.9	0.0	3.2
18	7.6	11.0	9.3	2.4	3.4	2.4	2.9	0.7	3.2

[0401] 测试的所有化合物呈现相对于PGL-3形成的凝聚物更优选地分配到FUS-SNAP凝聚物中。化合物#1 (DAPI)、#11 (荧光素-12-UTP)、#16 (罗丹明B)、#17 (罗丹明101内盐) 和#18 (罗丹明800) 对于FUS-SNAP凝聚物的I-in:I-out比率为4或更高。与PGU-3相比,化合物#11、#16、#17和#18优先分配在FUS-SNAP凝聚物中,比率为3或更高。

[0402] 实施例3

[0403] 分配的化合物和FUS在FUS凝聚物中的共定位

[0404] 为了验证在实施例2中分配到凝聚物中的化合物被分配到包含FUS的凝聚物中,进一步评估了平均I-in:I-out比率为9.3的染料#18 (罗丹明800)。

[0405] 样品制备

[0406] 如实施例2中关于FUS-SNAP所述利用染料18制备FUS-GFP凝聚物。

[0407] 成像

[0408] 利用旋转圆盘共聚焦显微镜获取样品的图像。利用60x油高NA物镜捕获凝聚物液滴。激光功率设置为20%,并且曝光时间根据各染料的特定荧光发射强度进行调整。曝光时间范围为1-1000ms。使用适当的过滤器设置,匹配染料和GFP的激发和发射光谱。获取含有FUS-GFP且不含染料的凝聚物的对照图像。

[0409] 结果

[0410] 所得图像示于图6。在存在或不存在染料的情况下在凝聚物中检测到GFP标记的FUS。在凝聚物中检测到染料18,并且FUS蛋白和染料共定位于凝聚物中。对于无染料对照,当用罗丹明800通道获取图像时,在凝聚物中未检测到荧光。

[0411] 实施例4

[0412] 利用质谱测定确定一组化合物的分配特征

[0413] 建立基于质谱的方法来测量示例性测试化合物的分配特征。将来自基于质谱的方法的测量结果与利用实施例2中公开的基于荧光的测定所获得的测量结果进行比较。

[0414] 方法

[0415] 制备蛋白质缓冲剂(50mM Tris pH 7.25、500mM KCl、1mM DTT和5%甘油)。蛋白质缓冲剂的高盐浓度防止其中包含的大分子(例如蛋白质)发生相分离。在蛋白质缓冲剂中制备20 μ l等份的70 μ M FUS-SNAP蛋白原液。将FUS-SNAP蛋白原液等份在使用前冷冻和储存。制备稀释缓冲剂(14.7mM Tris pH 7.25和1mM DTT)。

[0416] 将70 μ M FUS-SNAP蛋白原液等份在室温下解冻约10分钟。蛋白质原液等份呈现澄清,无可见沉淀物。使用离心过滤器(Millipore, UFC30VV00)过滤解冻的蛋白质原液。简而言之,将蛋白质原液等份加入离心场,并在室温下以20,000rcf离心1分钟。收集流出物(flow-through)。测量流出物的蛋白质浓度,并通过稀释过滤的流出物和稀释缓冲剂制备33.3 μ M FUS-SNAP溶液。

[0417] 在PCR管或PCR条(8孔;AXYGEN™8-Strip PCR Tubes, 0.2mL)中用以下制备40 μ l测试反应体:(i)34 μ L稀释缓冲剂,具有给定浓度的测试化合物,并且具有DMSO以获得1%的最终DMSO浓度,以及(ii)6 μ L的33.3 μ M FUS-SNAP过滤蛋白溶液。40 μ L反应体的最终浓度为5 μ M FUS-SNAP、75mM KCl、20mM Tris、0.75%甘油、1mM DTT、1%DMSO;以及对于含有测试化合物的反应体而言,期望的测试化合物浓度。

[0418] 如关于测试反应体所述制备40 μ l参考反应体,但在此阶段不添加测试化合物。

[0419] 将测试反应体和参考反应体在室温下培育15分钟。预计在测试反应体中,FUS-SNAP蛋白(凝聚相)的凝聚高密度液滴(mM蛋白质浓度)存在于FUS-SNAP稀释相的较低浓度溶液(μ M蛋白质浓度)的环境中。测试化合物可分配或可不分配到凝聚相中,导致外部(稀释相中的测试化合物)浓度降低和内部(液滴中的测试化合物)浓度增加。估计高密度液滴的体积至少比反应总体积小1000倍,例如,20nL凝聚相在20 μ L反应体中。

[0420] 在15分钟的培育期之后,处理测试反应体和参考反应体,以将凝聚物(高密度液滴)与上清液(稀释相)分离。简而言之,将测试反应体和参考反应体在20°C的冷却离心机中以10,000rcf离心10分钟。当使用PCR条时,使用的转子是Eppendorf F-45-48-5-PCR。从各管中取出35 μ L的上清液并转移到新管中,注意不要扰动含有凝聚物的团粒。

[0421] 对于参考反应体,将已知量的测试化合物加入含有上清液(其含有不与凝聚物缔合的蛋白质)的管中,使得最终化合物浓度与测试反应体中的初始化合物浓度相同。也可以通过测量测试反应体的上清液中的蛋白质量和根据获得的信息复制上清液,来形成参考反应体。添加到来自参考反应体的上清液中的已知化合物量用于校准测试反应体的质谱信号。

[0422] 此外,从测试反应体提取化合物以直接测量所形成的凝聚物中的化合物量。将包含一定量测试化合物的上清液与包含凝聚的蛋白质的团粒分离。简而言之,用剪刀移除各PCR管的盖,并将各PCR管倒置在1.5mL Eppendorf管中。然后将管在标准台式离心机上以2,000rcf离心5秒。当使用PCR条时,可将PCR条倒置插入Eppendorf Microplate 96/V-PP (Cat#951040188),并在4,500rcf下离心1分钟。随后,利用ACN:MeOH(1:1)的溶液从各团粒

中分离化合物。样品可根据需要进行超声处理。

[0423] 通过质谱法分析得自测试反应体和参考反应体的样品。相关上清液测试反应体和参考反应体之间相应MS信号的积分之间的比率反映了由于分配到形成的凝聚物中而导致的测试化合物的消耗。

[0424] 还利用实施例2中公开的基于荧光的测定法来确定测试化合物的分配特征。

[0425] 结果

[0426] 利用基于荧光的测定和基于质谱的测定,评估罗丹明101 (Rho 101)、罗丹明800 (Rho 800)、罗丹明B (Rho B)、罗丹明123 (Rho 123) 和荧光素,如上所述。如图7所示,这两种测试方法产生的分配特征测量结果对于测试的所有化合物都非常一致。利用该测量结果,计算各化合物的与凝聚物缔合的化合物浓度与不与凝聚物缔合的化合物浓度的比率。采用相对于外部相1/1000的凝聚物体积分数。结果在表7中提供。

[0427] 表8. 内部化合物浓度与外部化合物浓度的比率

[0428]	化合物	基于MS的测定	基于荧光的测定
	Rho 101	>8,000	1,500
	Rho 800	>2,000	1,000
	Rho B	666	666
	荧光素	1-100	1
	Rho 123	1-100	1

[0429] 此外,处理粒状凝聚物样品以提取和量化其中的测试化合物。结果表明,凝聚物中的测试化合物量和上清液中的测试化合物量之和与加入到测试反应体中的测试化合物总量一致(数据未提供)。

[0430] 如本文证明,基于质谱的测定是定量地确定化合物的分配特征的稳健且灵敏的测定。该技术可用作高通量筛选。这种基于质谱的测定实现了某些另外的优点。例如,基于质谱的测定不限于荧光化合物,是一种无假设的技术(即在测定之前无需知道测试化合物的身份),不受可能在液滴内部发生的荧光猝灭的限制,并且如实施例5所证,可以很容易地多路复用。

[0431] 实施例5

[0432] 本实施例评价在测试反应体中使用不同浓度的测试化合物对上清液中的测试化合物的测量的影响。

[0433] 测试反应体和参考对照如实施例4中所述制备。在0.01 μ M、0.1 μ M、1 μ M和10 μ M的单独测试反应体中评价荧光素(其被鉴定为不分配到FUS凝聚物中)和罗丹明101(其被鉴定为分配到FUS凝聚物中)。

[0434] 结果

[0435] 如图8所示,在任何测试浓度下,荧光素都不分配到FUS凝聚物中,并且荧光素的分配特征与浓度无关。观察到罗丹明101在较低的化合物浓度下分配到FUS-凝聚物中(参见图8;0.01 μ M和0.1 μ M)。数据代表平均值 $\pm$ SD,N=3技术重复。如图8所示,降低的化合物浓度的分配特征检测效率提高。在分配到凝聚物中的化合物量可能很小时,使用较少量的添加到测试反应体中的测试化合物可以允许检测上清液化合物浓度相对于参考对照的微小变化。

[0436] 实施例6

[0437] 多路复用质谱消耗测定

[0438] 本实施例证明了实施例4中公开的基于质谱的测定对于研究包含多种测试化合物的体系的应用。

[0439] 方法

[0440] FUS-SNAP蛋白反应体和参考反应体如实施例4中所述制备。对于测试反应体,一组四种化合物,包括荧光素和罗丹明B,用于创建具有浓度为0.01 μ M、0.1 μ M和1 μ M的单一化合物的测试反应体,以及具有全部四种化合物的混合物的测试反应体。所有样品一式三份制备。利用实施例4中描述的基于质谱的测定法分析所有样品。

[0441] 结果

[0442] 如图9A所示,单一化合物测试反应体的FUS-SNAP凝聚物外部荧光素测量分数与四种化合物的混合物存在时的FUS-SNAP凝聚物外部荧光素测量分数一致。如图9B所示,单一化合物测试反应体的FUS-SNAP凝聚物外部罗丹明B(Rho B)测量分数与四种化合物的混合物存在时的FUS-SNAP凝聚物外部罗丹明B测量分数一致。这表明基于质谱的技术可用于多路复用测定,其例如能够实现较高的通量和/或研究较复杂的体系。

[0443] 实施例7

[0444] 利用基于质谱的测定的多路复用

[0445] 本实施例进一步证明了实施例4中公开的基于质谱的测定对于研究包含多种测试化合物的体系的应用。

[0446] 方法

[0447] FUS-SNAP蛋白反应体和参考反应体如实施例4中所述制备。对于测试反应体,对荧光素和罗丹明101单独测定,并且还测定了三组成集合体的化合物。第一个集合体(pool1)有10种化合物(并且包括荧光素),第二个集合体有15种化合物(并且包括荧光素和罗丹明101),第三个集合体有20种化合物(并且包括荧光素和罗丹明101)。所有样品一式三份制备和测定。所有样品利用实施例4中描述的基于质谱的测定法来分析。

[0448] 结果

[0449] 如图10所示,所述测定,其例如测量由于凝聚物存在而导致的上清液中测试化合物的消耗,能够独立于化合物集合体尺寸测量个体化合物的分配特征。这些结果表明,化合物可以以大集合体尺寸混合,并且仍然允许实现与单独评估的单一化合物分配特征测量相当的测量。因此,本文描述的基于质谱的测定能够实现高通量筛选。

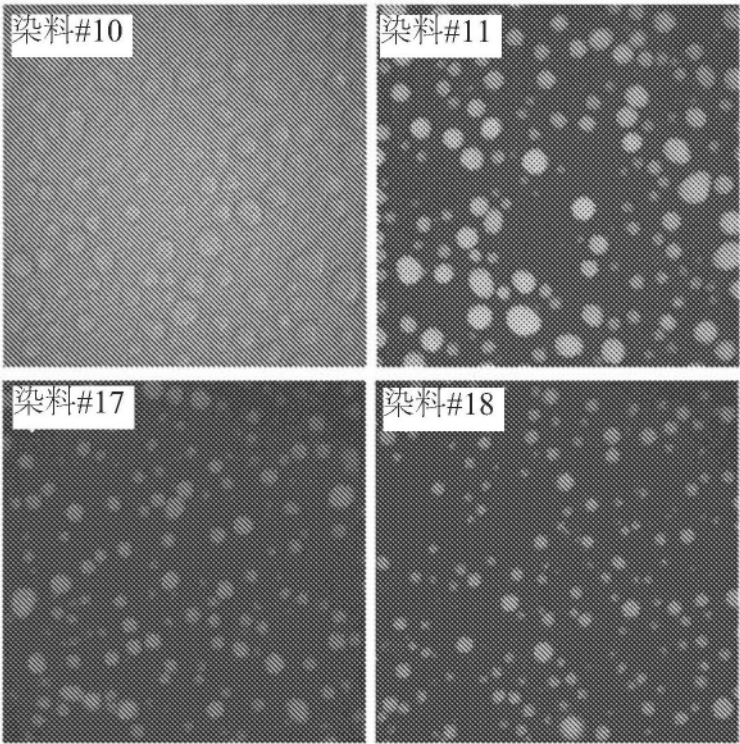


图1

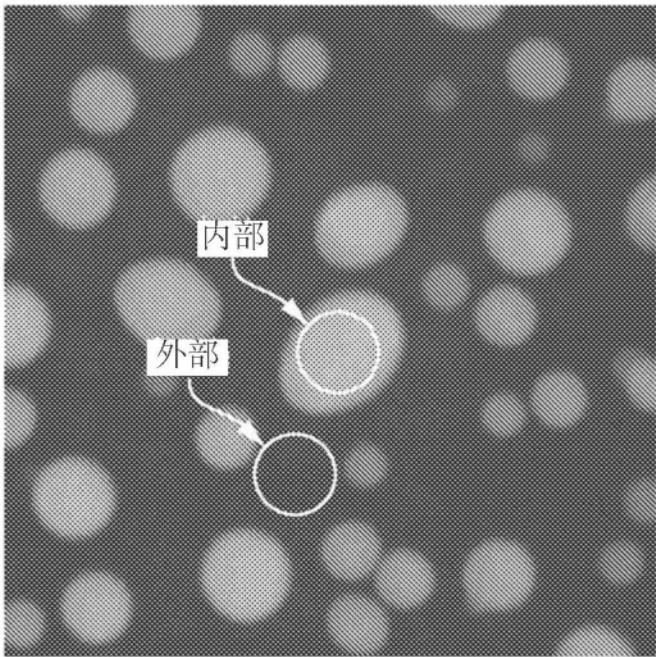


图2A

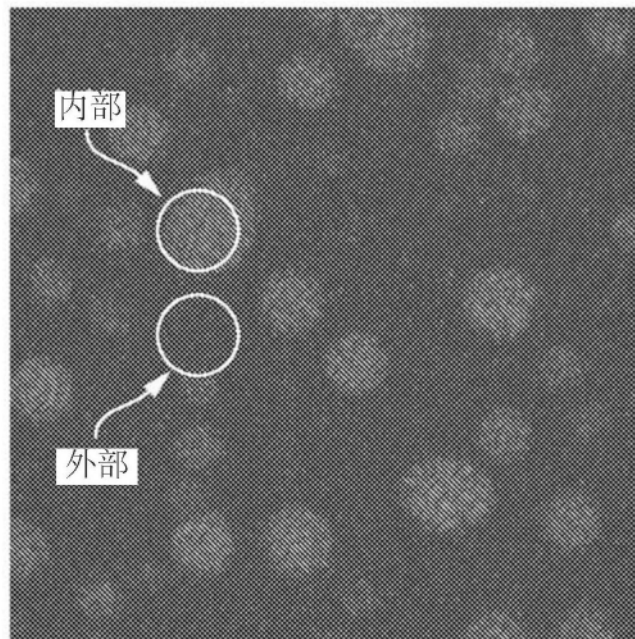


图2B

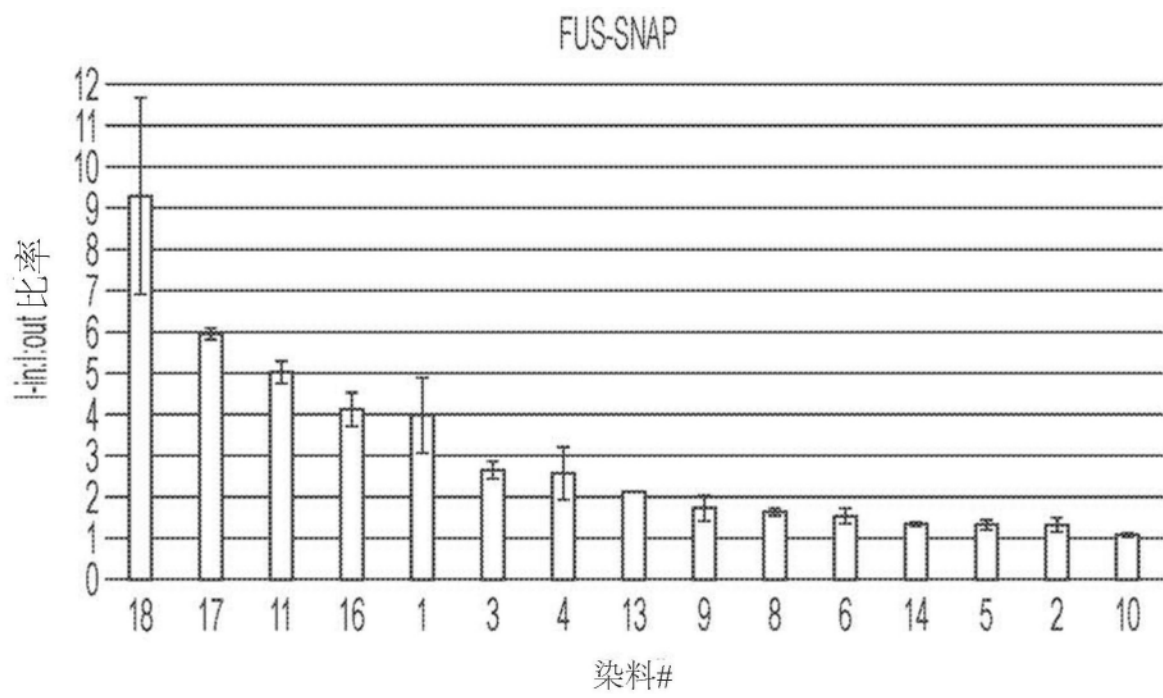


图3

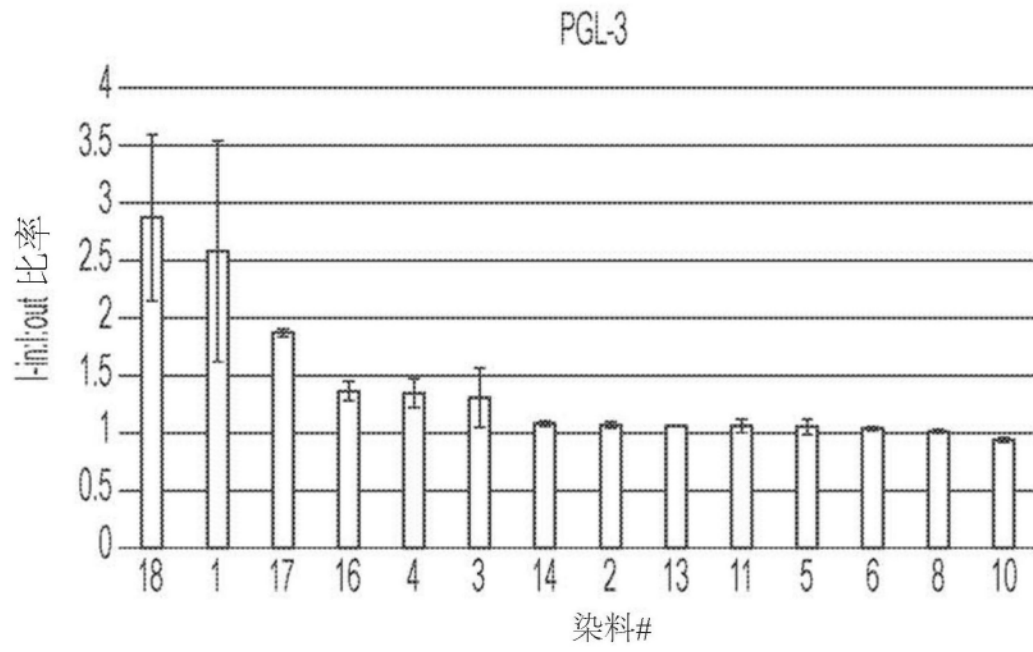


图4

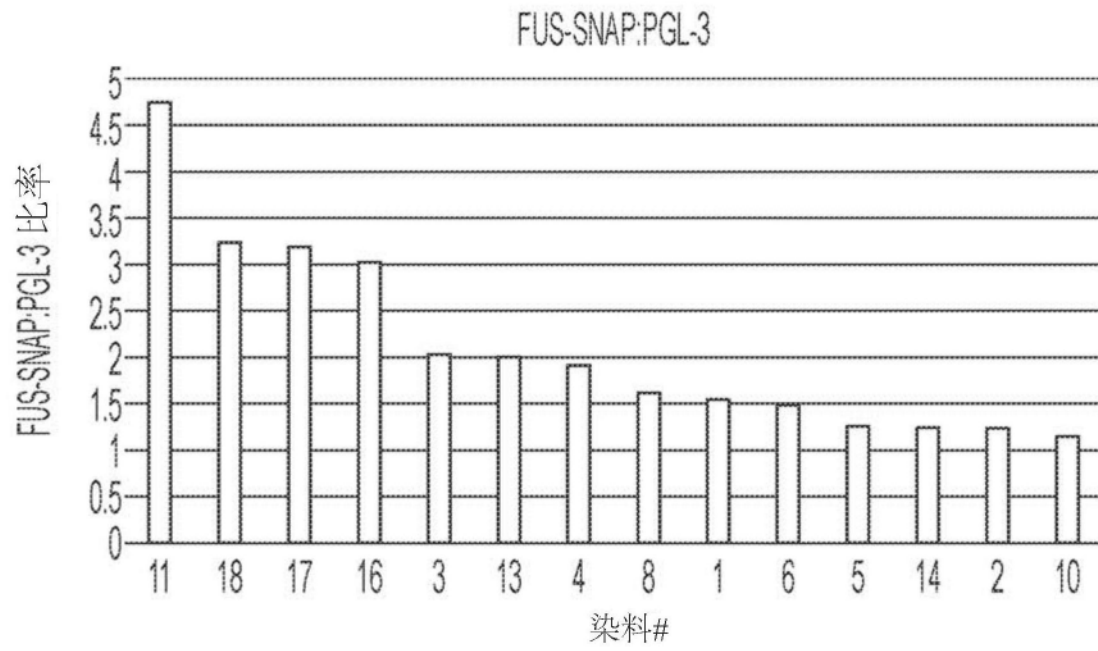


图5

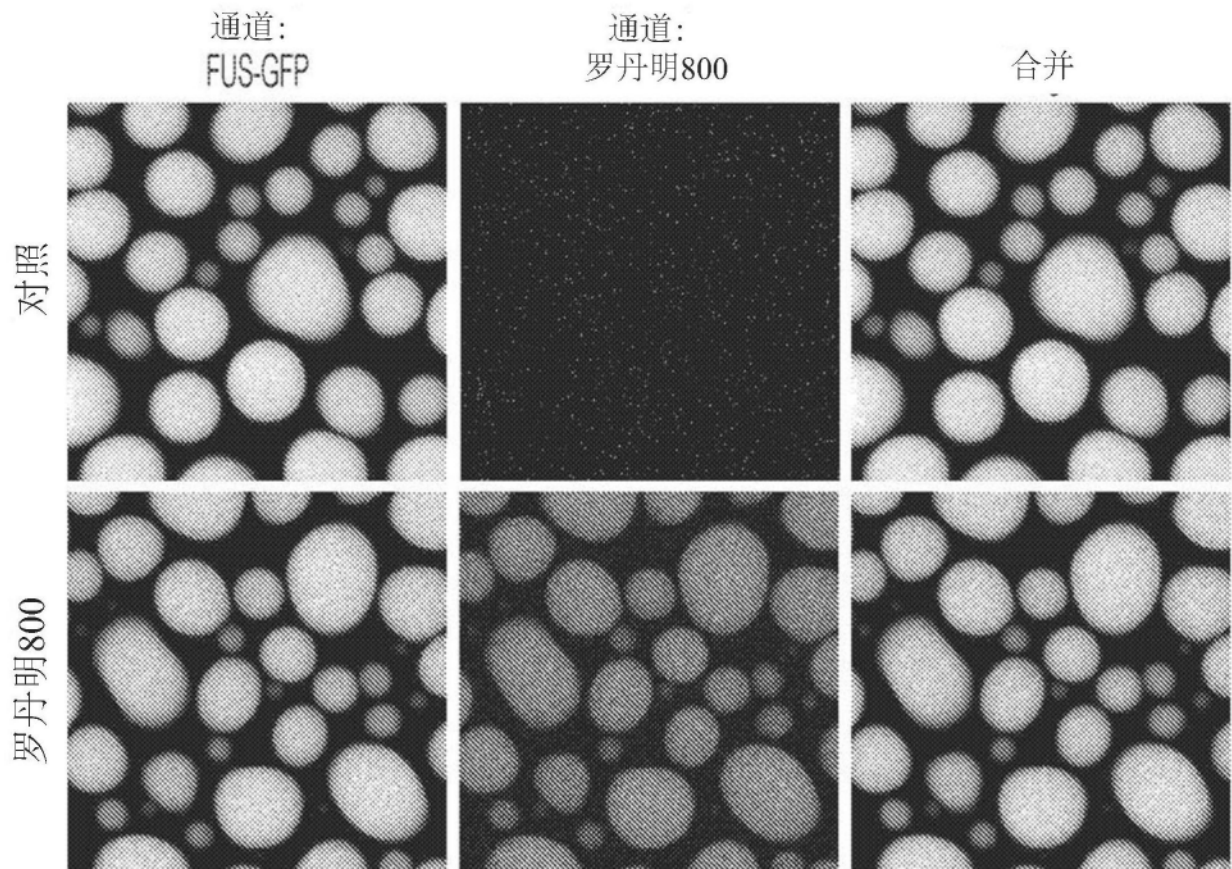


图6

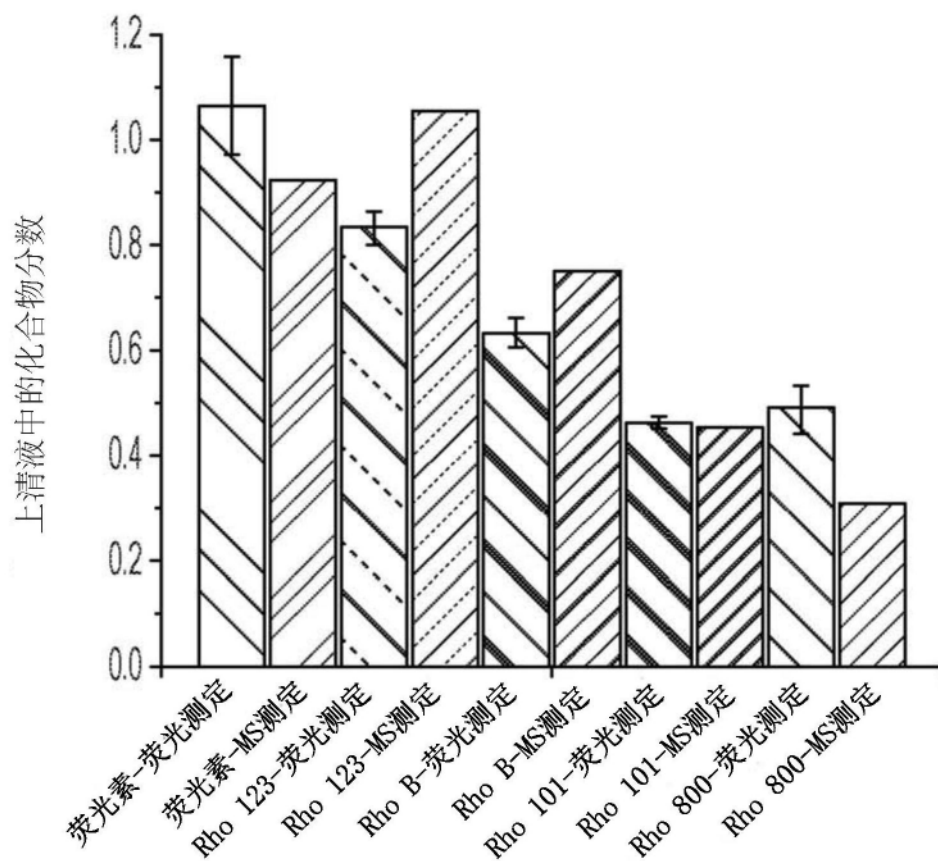


图7

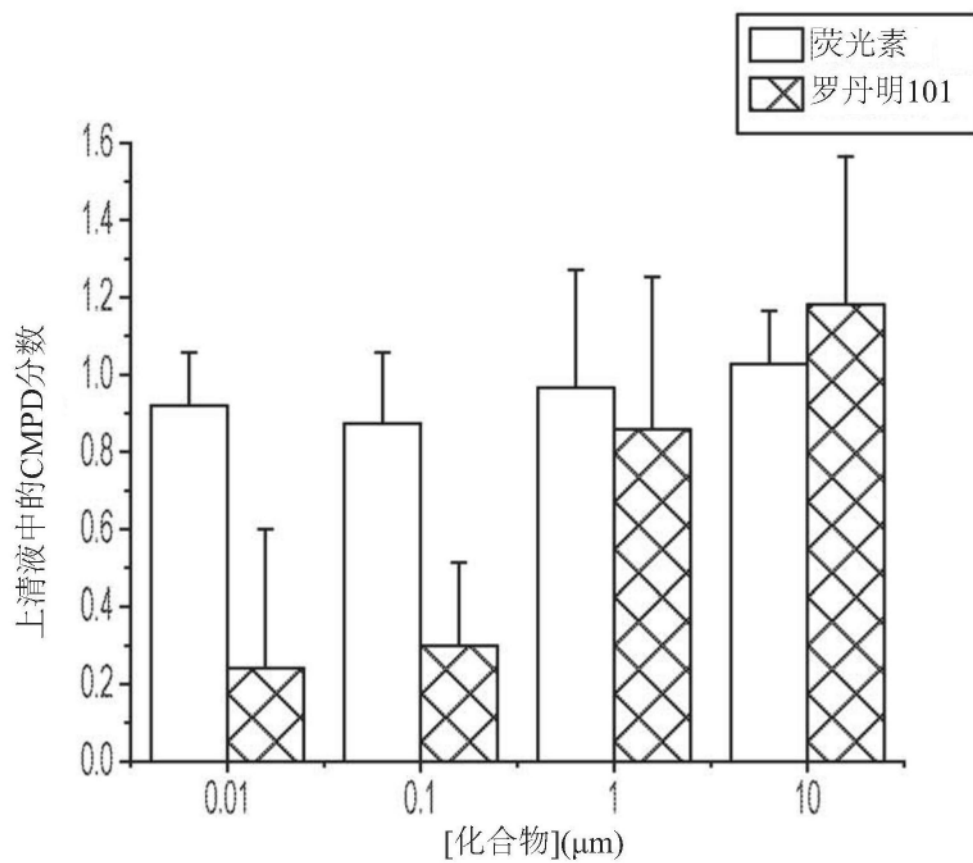


图8

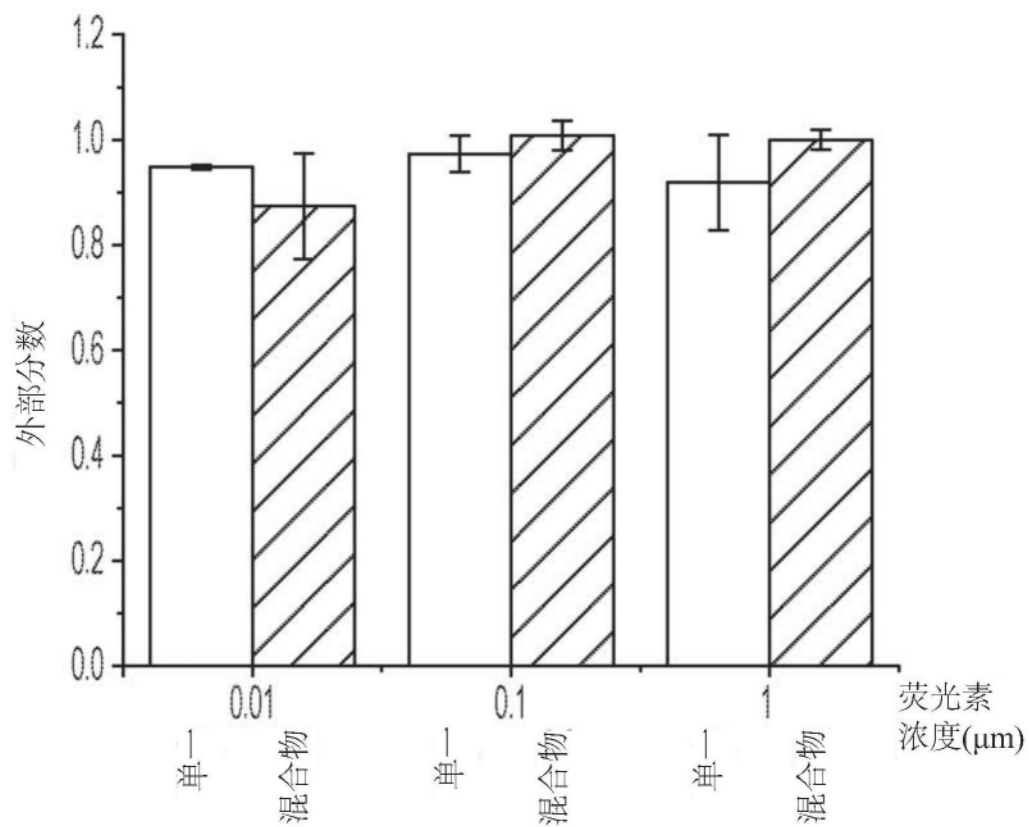


图9A

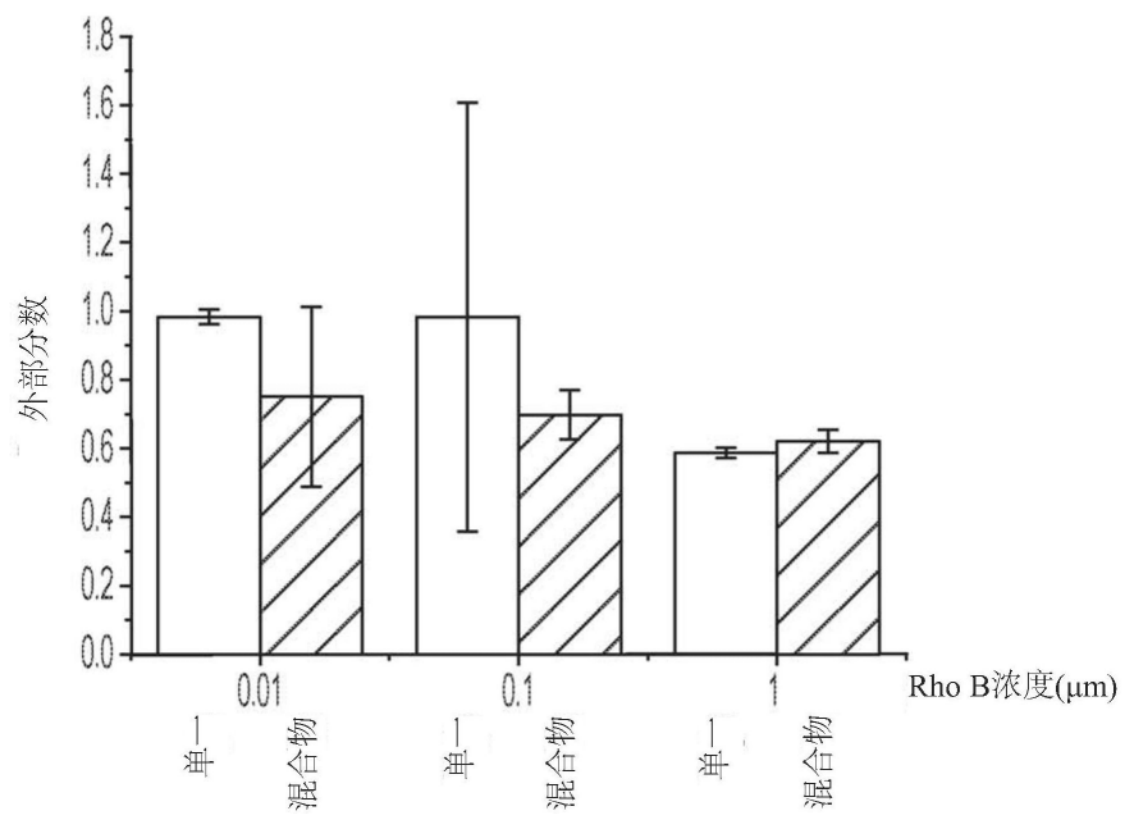


图9B

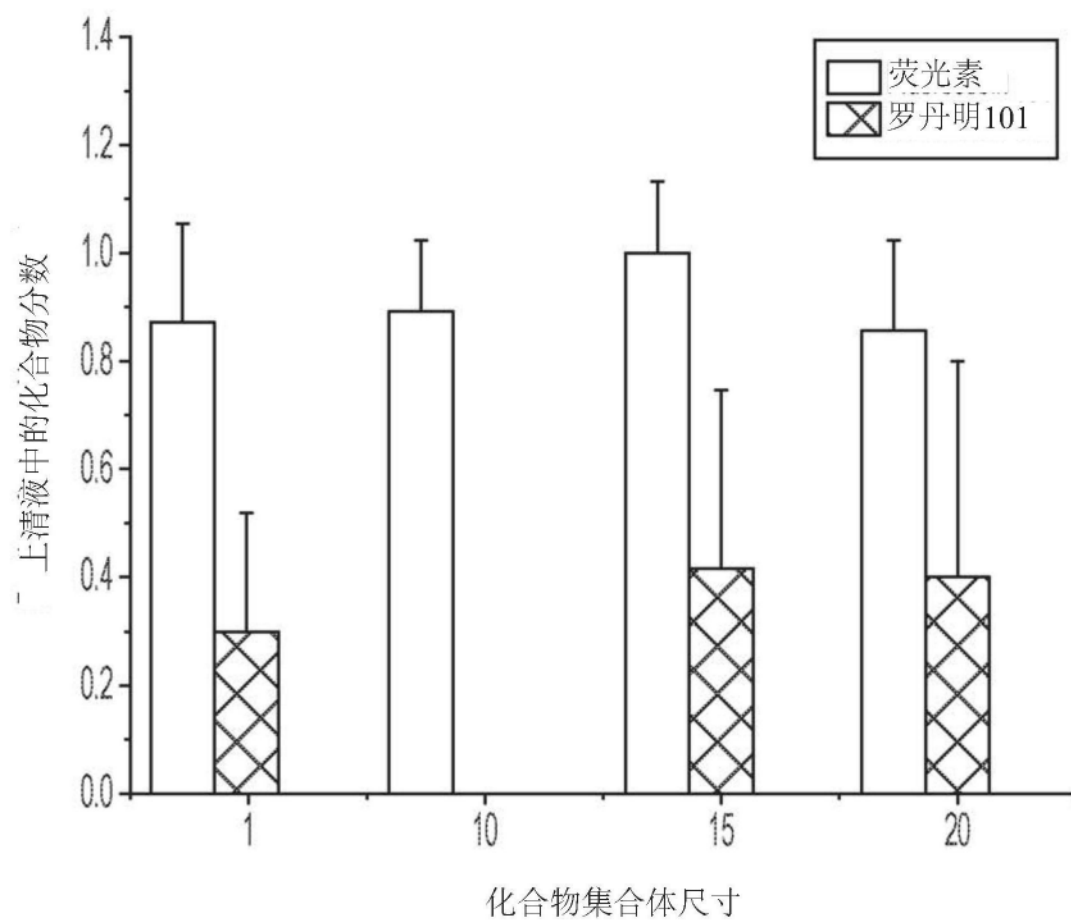


图10