(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5232769号
(P5232769)
(45)発行日　平成25年7月10日(2013.7.10)　(24)登録日　平成25年3月29日(2013.3.29)

(51)Int.Cl.　　F I
C07K 14/00 (2006.01)　　C07K 14/00 ZNA
G01N 33/53 (2006.01)　　G01N 33/53 X

請求項の数 14　(全 29 頁)

(21)出願番号　特願2009-504167(P2009-504167)
(86)(22)出願日　平成19年4月10日(2007.4.10)
(65)公表番号　特表2009-533339(P2009-533339A)
(43)公表日　平成21年9月17日(2009.9.17)
(86)国際出願番号　PCT/SE2007/050227
(87)国際公開番号　WO2007/117215
(87)国際公開日　平成19年10月18日(2007.10.18)
審査請求日　平成22年4月9日(2010.4.9)
(31)優先権主張番号　0600794-2
(32)優先日　平成18年4月7日(2006.4.7)
(33)優先権主張国　スウェーデン(SE)

(73)特許権者　508300127
モドプロ　アーベー
ＭＯＤＰＲＯ　ＡＢ
スウェーデン国、エス－７５３　１０　ウップサラ、キィルコガルドスガータン　５アー
(74)代理人　100064012
弁理士　浜田　治雄
(72)発明者　バルツェル，ラース
スウェーデン国、エス－７５３　１０　ウップサラ、キィルコガルドスガータン　５アー

審査官　佐久　敬

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｃ－反応性タンパク質についての結合剤

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１に記載の配列を有するポリペプチドであって、ここで少なくとも１つのホスホコリン誘導体が該ポリペプチドに結合されたポリペプチド。
【請求項２】
請求項１に記載の２つの二量体化ポリペプチドからなり、ここで２つのプロトマーは、同じであるかまたは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチド。
【請求項３】
ホスホコリン誘導体が、プロトマーのうちの１つの８位、１７位、２２位、または３４位においてリジンに結合された請求項１または２に記載のポリペプチド。
【請求項４】
前記ポリペプチドに結合されたレポーター基をさらに有する請求項１～３のいずれかに記載のポリペプチド。
【請求項５】
レポーター基が、プロトマーのうちの１つの１０位、１５位、２５位、または３７位においてリジンに結合された請求項４に記載のポリペプチド。
【請求項６】
ホスホコリン誘導体が、１～１２個の炭素原子の長さを備える炭素鎖を含むスペーサーを介してポリペプチドに結合された請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチド。
【請求項７】

Ｃ－反応性結合タンパク質について、１００ナノモル未満の結合親和性を有する請求項１～６のいずれかに記載のポリペプチド。
【請求項８】
前記プロトマーが同じ配列または異なる配列を有し、そして該配列が配列番号３～１８から選択される、請求項１～７のいずれかに記載のポリペプチド。
【請求項９】
サンプル中のＣ－反応性タンパク質の濃度をアッセイするための方法であって、該方法は、サンプルを、請求項１～８のいずれかに記載のポリペプチドと接触させる工程を包含する方法。
【請求項１０】
サンプルが哺乳動物患者に由来する請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記ポリペプチド二量体が、固体支持体に結合される請求項９～１０のいずれかに記載の方法。
【請求項１２】
請求項１１に記載の方法であって、以下の工程
－　サンプルを、請求項１～８のいずれかに記載の第１のポリペプチドと接触させる工程であって、該第１のポリペプチドは固体支持体に結合される工程；
－　サンプルを、請求項４～８のいずれかに記載の、これに結合されたレポーター基を有する、第２のポリペプチドと接触させる工程；および
－　該第２のポリペプチド上のレポーター基の存在または不在を検出する工程、
を包含する方法。
【請求項１３】
Ｃ－反応性タンパク質を含む組成物を、請求項１～８のいずれかに記載のポリペプチドと接触させる工程を包含するＣ－反応性タンパク質の精製のための方法。
【請求項１４】
請求項１～８のいずれかに記載のポリペプチドを含む診断用組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、あるタンパク質、本発明の場合においてＣ－反応性タンパク質に特異的に結合する分子およびその使用の分野に関する。
【背景技術】
【０００２】
折り畳まれたポリペプチドのデノボ設計は、タンパク質構造の我々の理解を高めることを目的とし、そしてまた、状況に応じた機能を備える新規なタンパク質のエンジニアリングのための基盤を提供する。リガンドとの、ｐＨ制御された、部位選択的な、自己官能化を受ける、設計され、折り畳まれたポリペプチドは、種々の複雑な分子システム、例えば、モデル糖タンパク質または複雑な受容体の構築のための優れたツールボックスを構成する。
【０００３】
国際公開第０３／０８０６５３号パンフレットの目的は、認識およびレポートの重要なバイオセンシング事象をつなぐ、折り畳まれ、リガンド修飾された、ヘリックス－ループ－ヘリックスポリペプチド足場を提供することであった。酵素のヒト炭酸脱水素酵素ＩＩ、ＨＣＡＩＩと、その阻害剤の４－カルボキシベンゼンスルホンアミドとの間の十分に特徴付けされた相互作用が、主な実証の証明のために選択された。
【０００４】
Ｃ－反応性タンパク質は、炎症の間、および組織障害後に、増加された量において血流中を循環する血漿タンパク質である。ＣＲＰ－レベルは、炎症および心血管疾患の増加された危険性の評価のために測定される。心臓手術の間にＣＲＰ－レベルを測定することも

また興味深い。
【発明の概要】
【０００５】
本発明は、Ｃ－反応性タンパク質（ＣＲＰ）に特異的に結合するようにさらに修飾されたポリペプチド足場に関する。このような修飾ポリペプチド足場は、以後、「ＣＲＰ－特異的結合剤」、「ＣＲＰ－結合剤」、または単純に「結合剤」として言及され、この用語は、そうでないと示されない限り、交換可能に使用される。
【０００６】
第１の局面において、本発明は、配列番号１に記載の配列を有するポリペプチドを含むＣＲＰ－特異的結合剤に関し、ここで少なくとも１つのホスホコリン誘導体が、当該ポリペプチド、および配列番号１に記載の配列を有するポリペプチドの二量体から形成される４－ヘリックス束からなるポリペプチド足場に付着され、この結合剤は、ホスホコリン誘導体を含む結合部分、および必要に応じて、検出可能なシグナルを与え得るレポーター基の取り込みにより修飾される。二量体の２つのプロトマーは、互いに、例えば、ジスルフィド結合を介して、供給結合的に付着されてもよく、また互いに非共有結合的に結合されてもよい。個々のプロトマーはまた、結合剤として使用され得る。
【０００７】
本発明はまた、第１の実施態様に従うポリペプチドを生成するための方法に関し、当該方法は、以下の工程
－　配列番号１に記載の配列を有するポリペプチドを合成する工程；
－　リジンへの、ホスホコリン誘導体の付着に適切な条件下で、ホスホコリン誘導体を、当該ポリペプチドの未ブロックのリジンと接触させる工程；
－　必要に応じて、リジンへの、レポーター基の付着に適切な条件下で、レポーター基を、当該ポリペプチドの未ブロックのリジン基と接触させる工程、を包含する。
【０００８】
さらなる局面において、本発明は、治療的および診断的な適用（例えば、薬学的または診断的な組成物中へのこのような結合剤の取り込み、例えば、心臓手術を受ける、または炎症を有することが疑われる、患者からのサンプル中のＣＲＰの濃度を決定するためのアッセイ）における、および生物工学的な適用（例えば、タンパク質の精製または結合アッセイ）における、第１の局面に従う結合剤の使用に関する。
【発明を実施するための最良の形態】
【０００９】
ＣＲＰとポリペプチド足場との間の結合親和性が、ある位置におけるホスホコリン誘導体の付着により劇的に増強され得ることが、本発明者らにより、驚くべきことに示された。ホスホコリン単独は、約１μＭの結合親和性を有し、および足場ポリペプチドは約１００～１０００μＭの結合親和性を有するのに対し、ホスホコリン誘導体で修飾されたポリペプチドは、ナノモル範囲において、ＣＲＰについての結合親和性を有する。
【００１０】
未修飾の足場は、ＣＲＰの表面に結合し、そしてホスホコリン誘導体は、ペプチド足場上の結合部位内の位置において、またはこれに近接して導入されるべきである。この結合部位をＣＲＰ上に到達するために、ホスホコリン誘導体は１～１２個の炭素原子、すなわち、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２個の炭素原子のスペーサーを含み得る。
【００１１】
本発明の結合剤のさらなる驚くべき利点は、ある哺乳動物種由来のＣＲＰに対して高い親和性を伴うが、他の種由来のＣＲＰに対してはより低い親和性を伴って通常結合する、ＣＲＰ－特異的抗体とは対照的に、それらが、異なる哺乳動物由来のＣＲＰに対して、高い親和性を伴って結合することである。
【００１２】
ポリペプチド足場はまた、ＣＲＰに対する結合親和性を最適化するために変化すること

を考慮して、変化され得る。このことは、好ましくは、ポリペプチド中の、荷電されたアミノ酸残基を、未荷電の残基、もしくは異なる荷電を備える残基に交換することによりなされ、または逆の場合も同じである。例えば、ＶａｌまたはＡｌａ（未荷電）は、Ｇｌｕ（荷電－１）またはＡｒｇ（荷電＋１）に交換され得る。

【００１３】

本発明の実施態様によれば、ポリペプチド足場は少なくとも２つのリジン残基を有し、これに、ＣＲＰ－結合部分およびレポーター基が、それぞれ、付着され得る。

【００１４】

塩基性ポリペプチド足場プロトマーは、配列番号１に記載の配列を有する。このプロトマーは、組換え技術または従来の自動化固相ペプチド合成によるような、当業者に公知の任意の方法により生成され得る。１つ以上の部位がリジンを保有するべきである。これらの位置は、好ましくは、８、１０、１５、１７、２２、２５、３４、および３７位から選択される。次いで、ＣＲＰ結合部分および必要に応じたレポーター基は、以下に考察される方法に従ってリジンに付着される。

【００１５】

レポーター基は、リジン残基に付着され得る任意の基であり得、そして検出可能なシグナルを与える。レポーター基の好ましい例は、ダンシル、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、およびオレゴングリーン（Ｏｒｅｇｏｎ　Ｇｒｅｅｎ）誘導体のような蛍光プローブである。レポーター基はまた、ホスホエノールピルビン酸キナーゼのような酵素、または金ナノ粒子のような検出可能な粒子であり得る。レポーター基は、供給者の指示に従って、または他の従来の方法により、リジン残基に付着される。好ましくは、新規に合成されるプロトマーがなお樹脂上にあるままで、レポーター基はプロトマーに付着される。

【００１６】

ＣＲＰ－結合部分は、ホスホコリン部分およびスペーサーを含むホスホコリン誘導体である。スペーサーの長さは、リガンドが足場に付着される場所およびリガンドがＣＲＰに結合する場所に依存する。スペーサーは通常、１～１２個の炭素原子の脂肪族鎖であり、必要に応じて、溶解度を増すために、親水性基で置換される。

【００１７】

ホスホコリン誘導体は、プロトマーを、ホスホコリン誘導体の活性なエステルと接触させることにより、プロトマーに付着される。活性なエステルは、以下の一般式を有し、

$$OP(OH)_2O(CH_2)_2N^+(CH_3)_2(CH_2)_nCOOR^1 \quad (I)$$

ここで$1 \leqq n \leqq 12$であり、R^1は、約６～８のpK_aを伴う脱離基である。活性なエステルの合成（ここで、ｎは４、６、または１１であり、およびR^1はｐ－ニトロ－フェニルである）は、以下の実施例の節において記載される。

【００１８】

ホスホコリン誘導体は、実施例の節において開示されるようにポリペプチド足場に導入される。

【００１９】

本発明のＣＲＰ－結合剤はまた、固体支持体に、必要に応じてリンカーを介して、結合され得る。チップ、プレート、ビーズ、およびメンブレンのような、多くの結合支持体、およびリンカーが市販されており、そして本発明のＣＲＰ－結合剤が使用されるべき状況に依存して当業者により組み合され得る。

【００２０】

結合アッセイ

本発明の１つの局面は、本発明の結合剤を使用する結合アッセイに、ならびにより詳細には、生物学的サンプル中のリウマチ様因子およびヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）から生じる干渉を排除するための方法に関する。

【００２１】

異なるタイプのサンドイッチアッセイが広範に使用される。最も一般的なものの１つは

、サンドイッチＥＬＩＳＡであり、ここでは抗体が抗原を捕獲するために使用され、そして別の標識化抗体が結合された抗原を検出するために使用される。これらの抗体の両方は、通常、哺乳動物起源である。このようなアッセイにおいて、抗哺乳動物ＩｇＧ抗体がサンプル中に存在し、これはしばしば、血液または血清のような体液に由来し、捕獲抗体に検出抗体を連結することにより抗原の挙動を模倣し得、従って偽陽性反応を引き起こし得る。このような偽陽性反応は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方に基づくサンドイッチアッセイにおいて観察される。

【００２２】

益々の数の患者が、診断および治療のためにマウスモノクローナル抗体を与えられる。モノクローナル抗体の投与はしばしば、患者において抗体応答を誘導し[1 2]；ヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）が生成される。マウスモノクローナル抗体に基づくサンドイッチ型アッセイは、ＨＡＭＡが患者の血清に存在する場合、偽陽性反応を与えることが知られる。このことは、モノクローナル抗体で処置される患者の数が増加するので、臨床化学実験室において益々高まる問題である。

【００２３】

リウマチ様因子（ＲＦ）はまた、多くの免疫アッセイにおける干渉の主要な供給源である。ＲＦは、哺乳動物ＩｇＧのＦｃ部分と反応する自己抗体である。ＲＦは、ＩｇＡ、ＩｇＧ、またはＩｇＭクラスであり得る。関節リウマチ（ＲＡ）を伴う６０％～８０％の間の患者が、それらの血清中にＲＦ活性を有する。ＲＦはまた、他の結合組織の疾患を伴う患者由来の血清において、および多くの他の疾患において見出されている。ＲＦはＩｇＧのＦｃ部分と反応するが、それらは異なる種のＩｇＧに対するそれらの反応性において、多様性を示す。他の種のＩｇＧに対するこの反応性は、抗体を含むアッセイにおいて偽反応を生じ得る。ＲＦについての伝統的な試験は、凝集試験であり、これにおいて、ＲＦは２つの（またはこれがＩｇＭ－ＲＦである場合、２つより多くの）異なる哺乳動物ＩｇＧ分子と反応し、従って凝集を引き起こす。同じ反応は、サンドイッチＥＬＩＳＡにおいて、偽陽性反応を与え、検出するためにアッセイが設計された抗原の不在下での、捕獲抗体に対する検出抗体の結合に起因する。

【００２４】

抗ＩｇＧ抗体は通常、ＩｇＧ分子のＦｃ部分に対して指向されるので、上述の問題に対する１つのアプローチは、アッセイにおけるＦａｂフラグメントの使用である。しかし、純粋なＦａｂフラグメントを生成するためのＩｇＧの消化は、多大な時間を要し、ならびに、通常、抗体力価の喪失を生じ、そして抗Ｆａｂ抗体により引き起こされる干渉を減少しない。さらに、干渉する抗体を取り除くためのマウスＩｇＧもしくはマウス血清の添加、またはクロマトグラフィーが、上記の問題を回避するために使用されてきた。正常なマウスＩｇＧまたは正常なマウス血清の添加は、時折、偽陽性反応を排除できない。クロマトグラフィーによる干渉する抗体の除去は多大な時間を要し、そして日常的な分析にあまり適切でない。

【００２５】

それゆえ、本発明の１つの局面はアッセイにおける少なくとも１つの抗体を、ＨＡＭＡまたはＲＦにより結合されない本発明の結合剤に交換することである。

【００２６】

この局面の１つの実施態様において、本発明は、サンプル中のＣ－反応性タンパク質の濃度をアッセイするための方法に関し、以下の工程

－　サンプルを、請求項１～６のいずれかに記載の第１のポリペプチド二量体と接触させる工程であって、該第１のポリペプチドは固体支持体に結合される工程；

－　サンプルを、請求項３～６のいずれかに記載の、これに付着されるレポーター基を有する、第２のポリペプチド二量体と接触させる工程；および

－　該第２のポリペプチド二量体上のレポーター基の存在または不在を検出する工程、を包含する。

【実施例】

【００２７】
ホスホコリン誘導体ＰＣ６、ＰＣ１１、およびＰＣ４の合成
ポリペプチド足場に付着されるべきホスホコリン誘導体は、上述で説明されるように、１～１２個の炭素原子のスペーサーを有し得る。これらはホスホコリンについて、ＰＣと表わされ、スペーサーの長さを与える番号が続き、すなわちＰＣ６は、６個の炭素原子のスペーサーを有する。
【００２８】
ＰＣ６の合成のために、本発明者らは、通常、スキーム１において概説されるような単純なおよび短い経路を選択する。第１の工程において、６－ジメチルアミノヘキサン酸を、良好な収率における触媒的水素化条件の下、ホルムアルデヒドでの対応するアミノ酸のアルキル化により調製した。得られる第３級アミンを、強力な酸性カチオン交換体で単純に精製した[3]。次いで、カルボン酸基をエステル化して、本質的に定量的収率においてメチルエステルを形成し、精製工程は必要とされなかった。続いて、臭化物（これは、ジエチルクロロホスフェートおよび２－ブロモエタノールから容易に調製された[4]）でのアルキル化を進行して、通常、ごく中程度の収率を伴った。ＲＰ　ＨＰＬＣ精製後、メチルエステルを、水酸化リチウムで切断し、そしてカルボン酸を、殆ど定量的収率において得、そして精製は必要とされなかった。活性なエステルの生成を、ｐ－ニトロフェニルクロロホメート、塩基、およびＤＭＡＰを利用する、Ｋｉｍらの手順[5]に従って行った。活性なエステルを、ＲＰ　ＨＰＬＣ精製後に、わずか２８％の収率において得た。リン酸基の最終的な脱保護を、カルボン酸エステルを影響しない穏やかな条件下、ＴＭＳＢｒで行った[6]。他方、この反応の間のいくつかの基質についての副生成物の形成は、この手順の公知の不利点である[7]。しかし、本発明者らは、モノ－脱保護化リン酸およびリン酸基を伴わない第４級アミン以外は、２５％の収率において所望のリン酸を得た。
【００２９】
ＰＣ１１の調製のために、本発明者らは、面倒な精製手順および溶解度の問題を回避するために、固相上でいくつかの工程を包含する合成経路を選択した（スキーム２）。それゆえ、ＤＩＣ法を利用して、Ｆｍｏｃ－保護化ウンデカン酸をＷａｎｇ樹脂に６６％の収率において結合した[8]。ピペリジンでの脱保護後、ジメチル化を、ギ酸および水素化ホウ素ナトリウムで達成した[9]。第４級化アミンに対するアルキル化工程は、遅い反応であり、そして１０当量のホウ素および４日間の加熱を必要とした[10]。樹脂からの切断後、本発明者らがＰＣ６について使用した同じ方法により、粗生成物を活性なエステルに転換した。リン酸基の最終的な脱保護工程は、ＰＣ６に類似して進行し、二次生成物の形成を伴ったが、２７％の所望の生成物が得られた。
【００３０】
スキーム１
ＰＣ６－ｐニトロフェニルエステル合成
リン酸２－ブロモ－エチルエステルジエチルエステル。乾燥ジクロロメタン（２５ｍＬ）中の２－ブロモエタノール（１．４２ｍＬ、２０ｍｍｏｌ）および乾燥ピリジン（３．２３ｍＬ、４０ｍｍｏｌ）の溶液を、０℃に冷却した。ジエチルクロロホスファート（３．３６ｍＬ、２３ｍｍｏｌ）を滴下して添加し、そして反応混合物を室温にて２４時間攪拌した。ジエチルエーテル（４０ｍＬ）および１Ｎ　ＨＣｌ（４０ｍＬ）を添加し、そして有機層を分離し、続いて１Ｎ　ＨＣｌおよび飽和化ＮａＨＣＯ３で洗浄し、そしてＭｇＳＯ４上で乾燥した。溶媒の蒸発後、残渣をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、酢酸エチル／ペンタン　１：１）により精製して、生成物（４．８５ｇ、１８．６ｍｍｏｌ、９３％）を、淡黄色がかった油として得た。
【００３１】

【数１】

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ = 1.34 (dt, 6H, 2 x CH_3, ^{3}J(H,H) = 7.2 Hz, ^{4}J(H,P) = 1.2 Hz); 3.52 (t, 2H, CH_2Br, ^{3}J = 6 Hz); 4.13 (dq, 4H, 2 x CH_2CH_3, ^{3}J(H,H) = 7.2 Hz, ^{3}J(H,P) = 7.2 Hz); 4.28 (dt, 4H, 2 x OCH_2CH_2Br, ^{3}J(H,H) = 6.4 Hz, ^{3}J(H,P) = 8.4 Hz). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.5 MHz) δ = 16.0 (d, 2 x CH_3, ^{3}J = 6.8 Hz); 29.4 (d, CH_2Br, ^{2}J = 7.6 Hz); 64.0 (d, OCH_2, ^{2}J = 5.3 Hz); 66.5 (d, OCH_2, ^{2}J = 5.3 Hz).

【００３２】

６－ジメチルアミノヘキサン酸。水中のアミノ酸（１．３２ｇ、１０ｍｍｏｌ）の溶液を、過剰のホルムアルデヒド（４ｍＬ）および１０％　Ｐｄ／Ｃ（０．５ｇ）の存在下、９０ｐｓｉのＨ２で、室温にて、３６時間、Ｐａｒｒ装置において、水素化した。触媒を濾過により除去し、そして熱水で２回洗浄した。合わせた水層を、ＤＯＷＥＸ　５０ＷＸ２－１００イオン交換カラムを介して通過させた。水での洗浄後、カラムを２％の水性ＮＨ４ＯＨで溶出して、純粋な生成物（１．３９ｇ、８．７ｍｍｏｌ、８７％）を、無色の結晶として得た。

【００３３】

６－ジメチルアミノヘキサン酸メチルエステル。乾燥メタノール（５０ｍＬ）中の６－ジメチルアミノヘキサン酸（１．３７ｇ、８．６ｍｍｏｌ）の氷冷溶液に、塩化チオニル（９ｍＬ）を、３０分間にわたって、滴下して添加した。反応混合物を室温に加温し、そして一晩攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発した。メタノールの反復添加、およびその後の蒸発は、メチルエステルを、無色の固体として、純粋な形態において、殆ど定量的収率において得た。

【００３４】

【数２】

^{1}H NMR (DMSO d_6, 400 MHz) δ = 1.27 (m, 2H, CH_2); 1.53 (m, 2H, CH_2); 1.63 (m, 2H, CH_2); 2.31 (t, 2H, ^{3}J = 7.6 Hz, CH_2); 2.67 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 2.96 (t, 2H, ^{3}J = 8 Hz, CH_2); 3.57 (s, 3H, $COOCH_3$). ^{13}C NMR (DMSO d_6, 100.5 MHz) δ = 23.1; 23.8; 25.3; 32.9; 41.7; 51.2; 56.0; 173.1.

【００３５】

［２－ジエトキシ－ホスホリルオキシ］－エチル－（５－メトキシカルボニル－ペンチル）－ジメチルアンモニウムトリフルオロ酢酸。メチルエステル（１．７３ｇ、１０ｍｍｏｌ）を、乾燥アセトリトリル（１５ｍＬ）中に溶解し、そしてK_2CO_3（１．３８ｇ、１０ｍｍｏｌ）を添加した。この懸濁液を、窒素ガス下で３６時間、還流した。室温への冷却後、水を添加し、そしてＴＦＡを添加することにより、ｐＨを２に調節した。溶液を、ｒｐ　ＨＰＬＣ（Ｓｕｐｅｌｃｏ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｃ１８、２１．２ｍｍ×１５ｃｍ、５μｍ、Ａ：５％　ＩＰＡ、９５％　H_2O、０．１％　ＴＦＡ、Ｂ：９０％ＩＰＡ、１０％　H_2O、０．１％ＴＦＡ、０～１５％　Ｂ　１４分間にわたる、t_R＝１１．８分）により精製し、そして凍結乾燥して、第４級アミンのＴＦＡ塩を、淡黄色の油（１．０６ｇ、３．０ｍｍｏｌ、３０％）として得た。ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～５０％　Ｂ、１０分間にわたる）、t_R＝６．４分（ＬＳＤシグナル）、ｍ／ｚ＝［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$に対して３５４．２。

【００３６】

【数３】

^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ = 1.41-1.50 (m, 8H, 2 x OCH_2CH_3 and CH_2); 1.77 (m, 2H, CH_2); 1.90 (m, 2H, CH_2); 2.44 (t, 2H, CH_2, ^3J = 7.2 Hz); 3.25 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 3.48 (m, 2H, CH_2); 3.72 (s, 3H, $COOCH_3$) 3.82 (m, 2H, CH_2); 4.26 (dq, 4H, 2 x CH_2CH_3, ^3J(H,H) = 6.8 Hz, ^3J(H,P) = 8.0 Hz); 4.58 (brs, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (CD_3OD, 100.5 MHz) δ = 16.4 (d, 2 x OCH_2CH_3, ^3J = 6.1 Hz); 23.3 (CH_2); 25.3 (CH_2); 26.7 (CH_2); 34.4 (CH_2); 52.0 (CH_3); 52.2 (CH_3); 62.1 (d, CH_2, ^2J = 5.3 Hz); 64.8 (CH_2); 66.1 (d, CH_2, ^2J = 6.1 Hz); 66.7 (CH_2); 175.5 (CO).

【００３７】

（５－カルボキシ－ペンチル）－［２－（ジエトキシ－ホスホリルオキシ）－エチル］－ジメチルアンモニウムトリフルオロ酢酸。第４級アミン（２００ｍｇ、０．５６ｍｍｏｌ）のＴＦＡ塩を、ｔ－ブタノール／水（２：１，９ｍＬ）およびＬｉＯＨ・Ｈ$_2$Ｏ（４７ｍｇ、１．１２ｍｍｏｌ）の混合液中に溶解した。反応混合物を３時間、室温にて攪拌し、そして有機溶媒を減圧下で除去した。０．１Ｎ　ＨＣｌで水溶液のｐＨを７に調節し、そして混合物を続いて凍結乾燥して、精製を伴わずにさらに使用した。ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～４０％　Ｂ、１０分間にわたる）、ｔ$_R$＝６．８分（ＬＳＤシグナル）、ｍ／ｚ＝［Ｍ＋Ｈ］$^+$について、３４０．２；

【００３８】

【数４】

^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ = 1.34-1.42 (m, 8H, 2 x OCH_2CH_3 and CH_2); 1.67 (m, 2H, CH_2); 1.80 (m, 2H, CH_2); 2.20 (t, 2H, CH_2, ^3J = 7.6 Hz); 3.16 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 3.40 (m, 2H, CH_2); 3.72 (brs, 2H, CH_2); 4.18 (dq, 4H, 2 x CH_2CH_3, ^3J(H,H) = 7.0 Hz, ^3J(H,P) = 8.0 Hz); 4.50 (brs, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (CD_3OD, 100.5 MHz) δ = 16.4 (d, 2 x OCH_2CH_3, ^3J = 6.8 Hz); 23.2 (CH_2); 26.5 (CH_2); 27.1 (CH_2); 37.9 (CH_2); 52.0 (CH_3); 62.1 (d, CH_2, ^{2}J = 4.6 Hz); 64.5 (CH_2); 66.1 (d, CH_2, ^{2}J = 6.1 Hz), 66.8 (CH_2); 181.3 (CO).

【００３９】

［２－（ジメトキシ－ホスホリルオキシ）－エチル］－ジメチル－［５－（４－ニトロ－フェノキシカルボニル）－ペンチル］－アンモニウムトリフルオロアセタート。乾燥アセトニトリル（３ｍＬ）中のカルボン酸（２６ｍｇ、０．０７６ｍｍｏｌ）の溶液に、トリエチルアミン（０．０１ｍＬ、０．０８４ｍｍｏｌ）、ｐ－ニトロフェニルクロロホルマート（３１ｍｇ、０．１５ｍｍｏｌ）、およびＤＭＡＰ（１ｍｇ）を続けて添加した。反応を、水中の０．１％ＴＦＡの添加により４時間後に停止し、その後ｒｐ　ＨＰＬＣ（Ｓｕｐｅｌｃｏ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｃ１８、２１．２ｍｍ×１５ｃｍ、５μｍ、Ａ：５％ＩＰＡ、９５％Ｈ$_2$Ｏ、０．１％ＴＦＡ、Ｂ：９０％　ＩＰＡ、１０％　Ｈ$_2$Ｏ、０．１％ＴＦＡ、２０～４０％　Ｂ　１２分間にわたる、ｔ$_R$＝１０．３分）により精製して、ｐ－ニトロフェニルエステルを無色の油として得た（１０ｍｇ、０．０２２ｍｍｏｌ、２８％）。ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～９０％　Ｂ　８分間にわたる）ｔ$_R$＝４．３分（ＵＶシグナル）、ｍ／ｚ＝［Ｍ＋Ｈ］$^+$について、４６１．５。

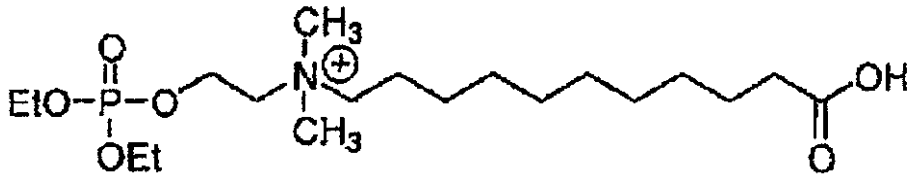
【００４０】
【数５】

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 1.34 (t, 6H, 2 x OCH_2CH_3, ^{3}J = 7.2 Hz); 1.48 (m, 2H, CH_2); 1.81 (m, 4H, 2 x CH_2); 2.63 (t, 2H, CH_2, ^{3}J = 7.2 Hz); 3.27 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 3.51 (m, 2H, CH_2); 3.92 (m, 2H, CH_2); 4.14 (dq, 4H, 2 x CH_2CH_3, ^{3}J(H,H) = 7.5 Hz, ^{3}J(H,P) = 7.5 Hz); 4.47 (m, 2H, CH_2); 7.27 (d, 2H, ^{3}J = 9 Hz, Phe-H); 8.25 (d, 2H, ^{3}J = 9 Hz, Phe-H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.4 MHz) δ = 16.0 (d, 2 x OCH_2CH_3, ^{3}J = 6.6 Hz); 22.4 (CH_2); 23.8 (CH_2); 25.4 (CH_2); 33.6 (CH_2); 51.6; 60.8 (d, CH_2, ^{2}J = 4.8 Hz); 63.3 (?); 64.7 (d, CH_2, ^{2}J = 5.9 Hz); 65.7; 122.5 (2 x Phe-CH); 125.2 (2 x Phe-CH); 145.3 (Phe-C); 155.3 (Phe-C); 170.8 (CO).

【００４１】
ジメチル－［５－（４－ニトロ－フェノキシカルボニル）－ペンチル］－（２－ホスホノオキシ－エチル）－アンモニウムトリフルオロアセタート。保護されたｐ－ニトロフェニルエステル（２０ｍｇ、０．０４３ｍｍｏｌ）を、乾燥アセトニトリル（３ｍＬ）中に溶解し、そしてトリメチルシリルブロミド（０．１１ｍＬ、０．８７ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温にて２４時間攪拌した。水中（１ｍＬ）の０．１％ＴＦＡを添加した後、溶液をｒｐ ＨＰＬＣ（Ｓｕｐｅｌｃｏ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｃ１８、２１．２ｍｍ×１５ｃｍ、５μｍ、Ａ：水中の０．１％ＴＦＡ、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ＴＦＡ、１７～３０％ Ｂ １４分間にわたる、t_R＝１２．７分）により精製して、ホスホコリン誘導体のＰＣ６－ｐニトロフェニルエステル（４．６ｍｇ、０．０１１ｍｍｏｌ、２５％）をＴＦＡ塩として得た。ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～９０％ Ｂ １０分間にわたる）、t_R＝３．８分（ＵＶシグナル）、ｍ／ｚ＝［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$について、４０５．５。

【００４２】
スキーム２

【００４３】
【化１】



【００４４】
（１０－カルボキシ－デシル）－［２－（ジエトキシ－ホスホリルオキシ）－エチル］－ジメチル－アンモニウムトリフルオロアセタート
Ｆｍｏｃ－ウンデカン酸（６３５ｍｇ、１．５ｍｍｏｌ）を乾燥ＤＭＦ（２ｍｌ）中に溶解し、そして乾燥ジクロロメタン（１０ｍｌ）中のジイソプロピルカルボジイミド（０．１２ｍｌ、０．７５ｍｍｏｌ）の溶液を添加した。得られる黄色の混合物を、０℃にて２０分間攪拌した。揮発性ジクロロメタンの除去後、対称無水物の溶液をＷａｎｇ樹脂（２５０ｍｇ、１．２ｍｍｏｌ／ｇ、０．３ｍｍｏｌ）に添加した。ＤＭＡＰ（１８ｍｇ、０．１５ｍｍｏｌ）を添加し、そして反応混合物を一晩攪拌した（Ｗ．Ｃ．Ｃｈａｎ，Ｐ．Ｄ．Ｗｈｉｔｅ Ｆｍｏｃ固相ペプチド合成、実践的なアプローチにおいて（Ｗ．Ｃ．Ｃｈａｎ，Ｐ．Ｄ．Ｗｈｉｔｅ編）Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、

Ｏｘｆｏｒｄ ２０００、５５～５６頁）。樹脂をＤＭＦ（５×２分間）、ジクロロメタン（５×２分間）で洗浄し、そしてジエチルエーテルで収縮した。手順を１回反復し、そして０．８ｍｍｏｌ／ｇ（６６％）の最終置換レベルを、Ｆｍｏｃ－ピペリジン付加物のＵＶ分光光度法に基づいて決定した（同書、６２～６３頁）。

【００４５】

２０％ピペリジン／ＤＭＦでのＦｍｏｃの脱保護後、樹脂をＴＨＦ中で膨張した。ＴＨＦ（２ｍｌ）、ホルムアルデヒド（４０％、０．７ｍｌ、１ｍｍｏｌ）、および酢酸（０．７ｍｌ）の混合物を添加し、そして樹脂を５分間インキュベートした。次いで、シアノ水素化ホウ素ナトリウム（６２ｍｇ、１ｍｍｏｌ）を添加し、そして樹脂を室温にて一晩撹拌した。その後、樹脂をＴＨＦ、H_2O、およびＭｅＯＨで続けて洗浄した。

【００４６】

Ｅ．Ｇ．Ｂｒｏｗｎ、Ｊ．Ｍ．Ｎｕｓｓ Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．１９９７年、３８、８４５７－８４６０。

【００４７】

樹脂を、ＤＭＦ中で膨張させ、そしてリン酸ジエチルエステル－（２－ブロモ－エチルエステル）／リン酸２－ブロモ－エチルエステルジエチルエステル（５２０ｍｇ、２ｍｍｏｌ）およびＤＩＥＡ（０．０３ｍｌ、０．２ｍｍｏｌ）を添加し、そして反応混合物を６０℃にて４ｄの間加熱した。樹脂をＤＭＦ、ＤＣＭで洗浄し、そしてＭｅＯＨで収縮した。

【００４８】

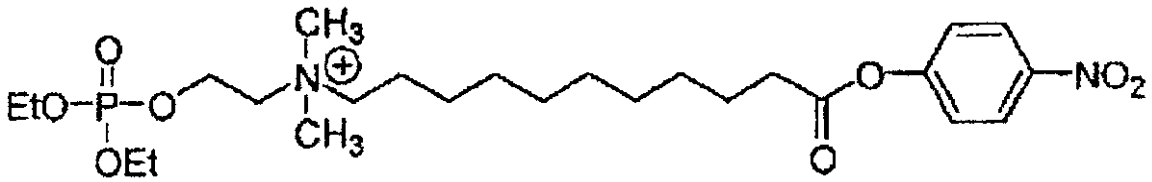
Ｊ．Ｃａｉ，Ｂ、Ｗａｔｈｅｙ Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．２００１、４２、１３８３－１３８５。

【００４９】

生成物を最終的に、ＴＦＡ／H_2O／ＴＩＳ（９５：２．５：２．５）の混合物で、２時間、これを撹拌することにより樹脂から切断した。カルボン酸を、有機溶媒の蒸発後に使用し、水を添加し、そしてさらなる精製を伴わずに凍結乾燥した。

【００５０】

【化２】



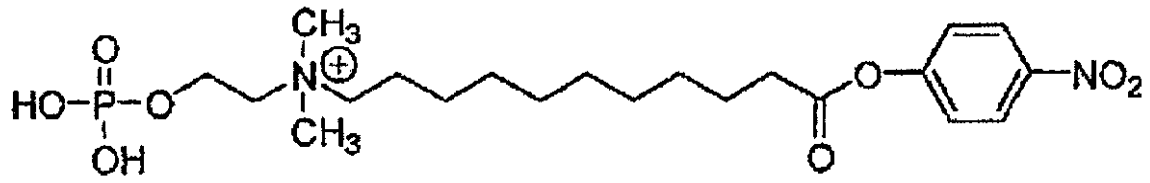
【００５１】

［２－（ジエトキシ－ホスホリルオキシ）－エチル］－ジメチル－［１０－（４－ニトロ－フェノキシカルボニル）－デシル］－アンモニウムトリフルオロアセタート

乾燥アセトニトリル（５ｍｌ）中のカルボン酸Ｘの溶液に、トリエチルアミン（０．０３ｍｌ、０．２ｍｍｏｌ）、ｐ－ニトロフェニルクロロホルマート（８０ｍｇ、０．３９ｍｍｏｌ）、およびＤＭＡＰ（７ｍｇ）を続けて添加した。４時間後、水中の０．１％ＴＦＡの添加により反応を停止し、そして続いてＲＰ ＨＰＬＣ（Ｓｕｐｅｌｃｏ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｃ１８、２１．２ｍｍ×１５ｃｍ、５μｍ、Ａ：ＩＰＡ／H_2O ５：９５中の０．１％ＴＦＡ、Ｂ：ＩＰＡ／H_2O ９０：１０中の０．１％ＴＦＡ、１５～４５％ Ｂ ２０分間にわたる、t_R＝１６．５分）により精製して、ｐ－ニトロフェニルエステルＸを無色の油として得た（４ｍｇ、０．００７ｍｍｏｌ、％）。ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～９０％ Ｂ １０分間にわたる）、t_R＝５．２分（ＵＶシグナル）、Ｍ＝５３１．５（M^+）。

【００５２】

【化３】



【００５３】

ジメチル－［１０－（４－ニトロ－フェノキシカルボニル）－デシル］－（２－ホスホノオキシ－エチル）－アンモニウムトリフルオロアセタート

保護化ｐ－ニトロフェニルエステル（４ｍｇ、０．００７ｍｍｏｌ）を、乾燥アセトニトリル（３ｍｌ）中に溶解し、そしてトリメチルシリルブロミド（０．１１ｍｌ、０．０７ｍｍｏｌ）を、０、１２、および２４時間後に、それぞれ添加した。反応混合物を室温にて、合計３６時間攪拌した。水中（１ｍｌ）の０．１％　ＴＦＡの添加後、溶液をｒｐＨＰＬＣ（Ｈｉｃｈｒｏｍ　Ｃ８、２１．２ｍｍ×２５ｃｍ、１０μｍ、Ａ：ＡＣＮ／H_2O　１０：９０中の０．１％ＴＦＡ、Ｂ：ＡＣＮ／H_2O　９０：１０中の０．１％ＴＦＡ、４０～６０％　Ｂ　１５分間にわたる、t_R＝１４．２分）により精製して、ホスホコリン誘導体（１．１ｍｇ、０．００２ｍｍｏｌ、２７％）をＴＦＡ塩として得た。

【００５４】

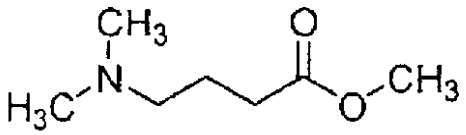
ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～９０％Ｂ　１０分間にわたる）、t_R＝５．９分（ＵＶシグナル）、Ｍ＝４７５．４［M^+］。

【００５５】

ＰＣ４

【００５６】

【化４】



【００５７】

４－ジメチルアミノ酪酸メチルエステル

ＰＣ６についてと同じ手順

【００５８】

【数６】

^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz) δ = 2.06 (m, 2H, CH_2); 2.56 (t, 2H, ^3J = 7.2 Hz, CH_2); 2.93 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 3.22 (m, 2H, CH_2); 3.75 (s, 3H, $COOCH_3$).

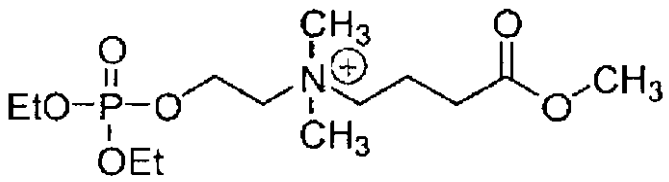
^{13}C NMR (CD_3OD, 100.5 MHz) δ = 20.9; 31.2; 43.5; 52.3; 58.1; 174.3

【００５９】

ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～５０％Ｂ　１０分間にわたる）、t_R＝１．３分（ＥＬＳＤシグナル）、Ｍ＝１４６．４（［Ｍ＋Ｈ］$^+$）。

【００６０】

【化５】



【００６１】

［２－ジエトキシ－ホスホリルオキシ）－エチル］－（３－メトキシカルボニル－プロピル）－ジメチルアンモニウムトリフルオロアセート

メチルエステルＸ（５１６ｍｇ、３．５ｍｍｏｌ）を、乾燥アセトニトリル（８ｍｌ）中に溶解し、そしてK_2CO_3（４８４ｍｇ、３．５ｍｍｏｌ）を添加した。この懸濁液を窒素ガス下で２４時間、還流した。室温への冷却後、水を添加し、そしてｐＨをＴＦＡの添加により２に調節した。溶液をｒｐ　ＨＰＬＣ（Ｓｕｐｅｌｃｏ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｃ１８、２１．２ｍｍ×１５ｃｍ、５μｍ、Ａ：H_2O中の０．１％　ＴＦＡ、５％　ＩＰＡ、Ｂ：ＩＰＡ中の０．１％ＴＦＡ、１０％　H_2O、０～１０％　Ｂ　１０分間にわたる、t_R＝８．８分）により精製し、そして凍結乾燥して、第４級アミンのＴＦＡ塩を、淡黄色の油として得た。

【００６２】

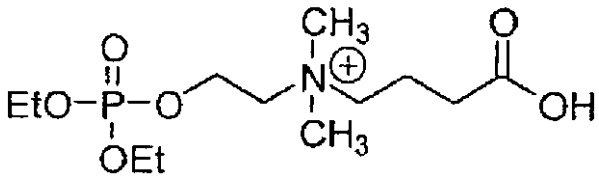
【数７】

^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ = 1.36 (t, 6H, 2 x OCH_2CH_3, ^3J = 6.8Hz); 2.08 (m, 2H, CH_2); 2.47 (t, 2H, CH_2, ^3J = 7.2 Hz); 3.20 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 3.45 (m, 2H, CH_2); 3.70 (s, 3H, $COOCH_3$); 3.76 (t, 2H, CH_2, ^3J = 4.4 Hz); 4.18 (dq, 4H, OCH_2CH_3 ^3J(H,H) = 7.2 Hz, ^3J(H,H) = 7.2 Hz); 4.52 (bs, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (CD_3OD, 100.5 MHz) δ = 16.4 (d, 2 x OCH_2CH_3, ^3J = 6.1 Hz); 19.0 (CH_2); 30.7 (CH_2); 52.3 (CH_3); 52.4(CH_3); 62.1 (d, CH_2, ^2J = 4.5 Hz); 64.4 (CH_2); 65.4 (CH_2); 66.1 (d, CH_2, ^2J = 6.0 Hz); 174.0 (CO).

【００６３】

【化６】



【００６４】

（３－カルボキシ－プロピル）－［２－（ジエトキシ－ホスホリルオキシ）－エチル］－ジメチルアンモニウムトリフルオロアセート

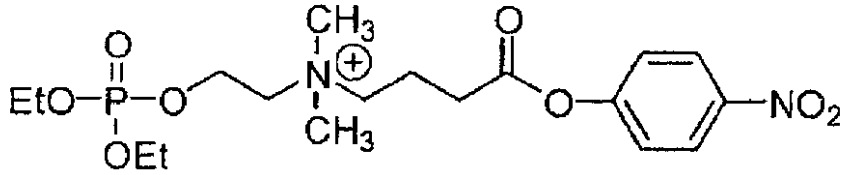
ＰＣ６についてと同じ手順。

【００６５】

ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～５０％　Ｂ　１０分間にわたる）、t_R＝１．８分（ＥＬＳＤシグナル）、Ｍ＝３１２．３［M^+］。

【００６６】

【化７】



【００６７】

［２－（ジメトキシ－ホスホリルオキシ）－エチル］－ジメチル－［３－（４－ニトロ－フェノキシカルボニル）－プロピル］－アンモニウムトリフルオロアセタート

乾燥アセトニトリル（５ｍｌ）中のカルボン酸の溶液に、トリエチルアミン、ｐ－ニトロフェニルクロロホルマート、およびＤＭＡＰを連続的に添加した。反応を、水中の０．１％ＴＦＡの添加により４時間後に停止し、続いてＲＰ　ＨＰＬＣ（Ｓｕｐｅｌｃｏ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｃ１８、２１．２ｍｍ×１５ｃｍ、５μｍ、Ａ：H_2O中の０．１％　ＴＦＡ、５％　ＩＰＡ、Ｂ：ＩＰＡ中の、０．１％ＴＦＡ、１０％　H_2O、１０～３０％　Ｂ　１３分間にわたる、t_R＝１１．８分）により精製して、ｐ－ニトロフェニルエステルを、無色の油として得た。

【００６８】

ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、ｌ５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～９０％　Ｂ　１０分間にわたる）、t_R＝３．１分（ＵＶシグナル）；Ｍ＝４３３．２（M^+）。

【００６９】

ＰＣ６の調製のための代替のスキーム

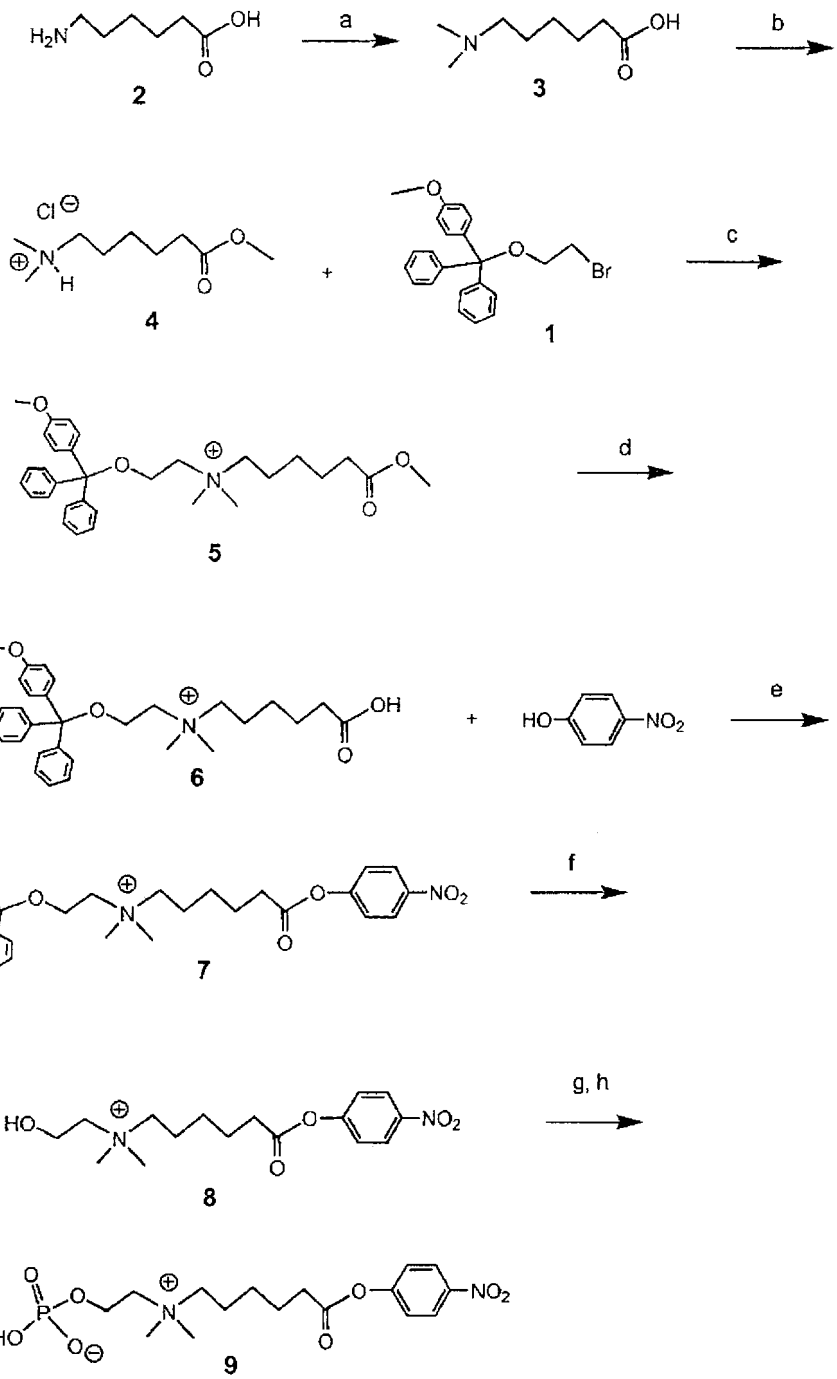
優先年の間に、ホスホコリンリガンドＰＣ６を調製するための代替のストラテジーが開発された。これは以下に概説される。ＰＣ６（化合物９）の調製のためのこのストラテジーは、スキーム３において概説される。リン酸化は、この基が、保護化形態にあっても、他の必要な転換工程を通じて保有するには問題があると考慮されたので、最終工程として選択された。

【００７０】

市販のアミノヘキサン酸２を、Ｅｓｃｈｗｅｉｌｅｒ－Ｃｌａｒｋｅ－型手順（ホルムアルデヒドおよび水素／パラジウム／炭素での処理）によりＮ，Ｎ－ジメチル化[11][12]し、そして得られる生成物（３、８６％）をメタノール塩酸での処理によりエステル化して、メチルエステル４（９６％）を得た。第４級化は、４と、モノメトキシトリチル保護化ブロモエタノール１とを反応することにより達成し、誘導体５を形成した（７３％）。未保護のブロモエタノールはまた、４と反応し得たが、反応収率はより低く、そして生成物を検出および精製することはより困難であった。モノメトキシトリチル保護は、重要中間体５に対して、親油性およびＴＬＣ検出能（ＵＶ可視および酸染色可能）を付与した。水酸化リチウム／水／ｔ－ブタノールでの５の鹸化は、対応する酸６（９５％）を与え、これはピリジン中のｐ－ニトロフェノールおよびジイソプロピルカルボジイミドでの単離を伴わないで処理されて、ｐ－ニトロフェニルエステル７を与えた（８６％）。ギ酸での７の短い処理は、対応するアルコール８を与え、これは、その自己縮合に対する感受性のために次の工程において直接的に使用された。アセトニトリル中、０℃での、先ず過剰なオキシ塩化リンおよびトリエチルアミンとの、次いで水との、粗８の反応は、ＨＰＬＣ精製後に、７から、２２％の収率において所望のモノリン酸９を与えた。化合物９は、予測されるＮＭＲおよびＬＣ－ＭＳスペクトルを与え、そして酸性ｐＨ（０．１％　ＴＦＡ）にて、水溶液中で安定であった。しかし、簡便な保存のために、材料を、冷凍庫において、ＤＭＳＯストック溶液として維持した。

【００７１】

【化８】



【００７２】

スキーム３、試薬、条件、および収率：ａ：CH_2O、H_2、Ｐｄ／Ｃ（８６％）；ｂ：CH_3OH、ＨＣｌ（９６％）；ｃ：Na_2CO_3、CH_3CN（７３％）；ｄ：ＬｉＯＨ、ｔ－ＢｕＯＨ／H_2O（９５％）；ｅ：ＤＩＰＣＤＩ、ピリジン（８６％）；ｆ：ＨＣＯＯＨ／H_2O；ｇ：$POCl_3$，ＴＥＡ；ｈ：H_2O（７からの２２％）。

【００７３】

一般的な手順　－　濃縮を、減圧下で行った（浴温４０℃未満）。ＮＭＲスペクトルを、２９８°Ｋにて、Ｖａｒｉａｎ　Ｕｎｉｔｙ　５００　ＭＨｚ分光器を用いて、記録した。選択されたＮＭＲデータのみが報告された。配置を、適切な２－Ｄ実験により確認した。希釈エタノールまたはアセトニトリル溶液についてのエレクトロスプレイ質量分析（ＥＳ－ＭＳ）を、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ　ＳＣＩＥＸ　ＡＰＩ　１５０－ＥＸ質量分光器を使用して、直接導入態様において行った。陽イオン態様スペクトルを記録し、そし

てＡｐｐｌｅ ＭａｃＩｎｔｏｓｈ Ｑｕａｄｒａコンピューター上で製造業者のソフトウェアを使用してプロセスした。

【００７４】

ＴＬＣを、Ｓｉｌｉｃａ Ｇｅｌ Ｆ２５４（Ｍｅｒｃｋ、Ｄａｒｍｓｔａｄｔ、Ｇｅｒｍａｎｙ）プレートにおいて行い、ＵＶ光線による、および／またはブタノール中の５％ニンヒドリンもしくはエタノール中の５％硫酸のいずれかでの染色による検出を伴った。カラムクロマトグラフィーを、そうでないと言及しない限り、Ｍａｔｒｅｘシリカゲル６０Å（オングストローム）（３５～７０μｍ、Ａｍｉｃｏｎ）上で行った。分取ＨＰＬＣを、９０１２勾配ポンプ、９０６５ダイオードアレイ検出器、およびＶａｒｉａｎ Ｓｔａｒ ＨＰＬＣソフトウェアを動作するＰＣコンピューター系からなるＶａｒｉａｎ ＨＰＬＣ系を使用して行った。Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｓｏｒｂｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｌｔｄ （Ｍｉｄ Ｇｌａｍｏｒｇａｎ、ＵＫ）からのＩｓｏｌｕｔｅ Ｃ－１８ ＥＣ 逆相シリカ（４０～７０ミクロン粒径）を、特定の溶媒で、充填し、そして開口ガラスカラム中に抽出した。他の試薬および溶媒を、高い業務用品質で購入し、そしてそうでないと言及しない限り、さらなる精製を伴わずに使用した。

【００７５】

２－モノメトキシトリチルオキシ－１－ブロモエタノール（１） － この化合物を、対応するトリチル誘導体[13]と同じように調製した。簡潔には、モノメトキシトリチルクロリド（３．０９ｇ、１０ｍｍｏｌ）を、乾燥ピリジン（５ｍＬ）中のブロモエタノール（１．０ｇ、８．０ｍｍｏｌ）の溶液に、室温にて添加した。１２時間後、ＴＬＣ（ヘキサン－酢酸エチル、９：１）は、２つのＵＶ吸収点の存在を示し、１つ（大きい方）は、ｒｆ ０．９を伴い、１つ（小さい方）はｒｆ ０．７を伴った。水（０．１ｍＬ）を添加し、そして室温にて１５分の撹拌後、混合物を、酢酸エチルと２Ｍ 硫酸水溶液との間に分配し、有機層を重炭酸ナトリウム水溶液で洗浄し、そして濃縮した。ペンタン－酢酸エチル９５：５中に充填し、そしてペンタン－酢酸エチル９５：５－９０：１０の段階的勾配で溶出した、シリカゲル（１６０ｇ）上でのカラムクロマトグラフィーにより、残渣を精製した。主要なバンドの回収物は、１をシロップとして与え（２．７５ｇ、８７％）、これは静置の際に結晶化した。あるいは、クロマトグラフィーを省略し得、そしてメタノールから直接的に結晶化された粗シロップは、純粋な結晶を、４０－５０％の収率において与えた。直接導入ＥＳ－ＭＳは、ｍ／ｚ ２７３（モノメトキシトリチル陽イオン）にて大きなピークを示したが、わずかに２つの非常に小さなピークを４１９／４２１（Ｍ＋Ｎａ）にて示した。Ｈ－ＮＭＲデータ（$CDCl_3$）：

【００７６】

【数８】

3.44/3.48 (2 multipets, 2+2 H, OCH2CH2Br), 3.83 (s, 3H, ArOCH3), 6.88 (d, 2H, ArH), 7.24-7.52 (m, 12H, Ar-H).

【００７７】

６－（Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ）－Ｎ－［２－（モノメトキシトリチルオキシ）－エチル］－ヘキサン酸メチルエステル（５） －

水性ホルムアルデヒド（３７％、４０ｍＬ）中の６－アミノヘキサン酸（２、１３．２ｇ）の溶液を、Ｐｄ／Ｃ（１．０ｇ）と混合し、混合物を、磁性撹拌を備えるＰａｒｒステンレススチール装置において、一晩、室温および５０バールにて水素化した。ＴＬＣ（酢酸エチル－メタノール－酢酸－水、６：３：３：２、ニンヒドリン検出）による確認は、開始材料（ｒｆ ０．７）からよりゆっくりと移動する生成物（ｒｆ ０．５、茶味を帯びた色）へのほとんど完全な変換を明らかにした。反応混合物を、Ｃｅｌｉｔｅの層を介して濾過し、フィルター層を水（２０ｍＬ）で洗浄し、希釈し（６０ｍＬ）、そして溶液をＤｏｗｅｘ－５０ Ｗ×２－１００メッシュのカラム（Ｈ＋ホルム、０．７ｍｅｑ／

ｍＬ、１５０ｍＬ、ミリ－Ｑ水で注意深く予洗した）を介して、ゆっくりと通過させた。次いで、カラムをミリ－Ｑ水で洗浄し（２００＋１００ｍＬ）、次いで生成物を２％アンモニア水溶液（４００ｍＬ）で溶出した。溶出物を、ＴＬＣ（酢酸エチル－メタノール－酢酸－水、６：３：３：２、ニンヒドリン検出）によりモニターした。適切な画分を部分的に蒸発し、次いで凍結乾燥して、半固体の残渣の状態にした（１３．７ｇ、８６％）。直接導入ＥＳ－ＭＳは、ｍ／ｚ　１６０．２（Ｍ＋Ｈ）での強力なピークを明らかにし、Ｎ，Ｎ－ジメチル化生成物に対応した（３）。

【００７８】

メタノール（７５ｍＬ）中のこの粗材料（３．９７ｇ、２５ｍｍｏｌ）の画分を、氷中で冷却し、そして塩化チオニル（１０ｍＬ、１３４ｍｍｏｌ）を、３０分間、滴下して添加しながら、攪拌し、その後、冷却を止め、そして混合物を室温にて一晩、そのままにした。ＴＬＣ（酢酸エチル－メタノール－酢酸－水、１０：３：３：２、ニンヒドリン検出）による確認は、わずかにより早く移動する化合物への変換を明らかにし、より弱い染色および異なる色合いを伴った。また以前の工程から持ち越された、少量のより早く移動する不純物があった。１６時間後、反応混合物を濃縮し、そしてメタノールと、数回、共濃縮して残渣（５．０５ｇ）を得、これは静置の際に部分的に結晶化した。この材料の直接導入ＥＳ－ＭＳは、ｍ／ｚ　１７４．０（Ｍ＋Ｈ）での強力なピークを明らかにし、６－（Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ）－ヘキサン酸メチルエステル（４）に対応した。

【００７９】

この粗材料（１．１２ｇ、純度約７５％、４．０ｍｍｏｌ）の画分、乾燥アセトニトリル（２５ｍＬ）、２－（モノメトキシトリチルオキシ）－２－ブロモエタノール（（１、１．６０ｇ、４．０ｍｍｏｌ）、および固体無水炭酸ナトリウム（８００ｍｇ）を、一晩、還流（浴温７０℃）し、その後ＴＬＣは、部分的な変換のみを示し、従ってより多くの１（８００ｍｇ、２．０ｍｍｏｌ）および炭酸ナトリウム（５００ｍｇ）を添加し、そして還流をさらに２４時間継続した。次いで、ＴＬＣは、開始材料の大部分が消失したこと、そして新しい、より早く移動するニンヒドリン染色およびＵＶ－吸収のスポットがあったことを示した。混合物を、ジクロロメタンと水との間に分配し（所望の材料は、有機相中にあった）、水相を少量のジクロロメタンで洗浄し、そして合わせた有機層を、少量の水で洗浄し、次いで小容量（１０ｍＬ）に濃縮し、これを、メチル－ｔ－ブチルエーテルと水との間に分配した（所望の金属はここで水相中にあった）。有機相を少量の水で洗浄し、そして合わせた水層を少量のメチル－ｔ－ブチルエーテルで洗浄した。合わせた水溶液を短時間、回転蒸発して、非水性溶媒を除去し（約１／３の容量が除去された）、そして残余の溶液を、Ｂｏｎｄ－Ｅｌｕｔ　Ｃ－１８－ＥＣカラム（３５ｇ、メタノール中に充填され、次いで水で平衡化される）を介して通過させ、水での洗浄後、水中の、最初に２０％、５０、次いで最終的に６０％のメタノールで洗浄した。所望の材料は、６０％メタノール溶出で、純粋なバンドとして溶出された。適切な画分を回収し、数滴のピリジンを添加し、そして溶液を凍結乾燥して、化合物５を白色の固体として残した（１．５３ｇ、７３％）ＥＳ－ＭＳは、強力な４９０ピーク［Ｍ＋］を示した。Ｈ－ＮＭＲデータ（ＣＤＣｌ３）：

【００８０】

【数９】

1.31 (m, 2H, H-4), 1.65 (m, 2H, H-3), 1.75 (m, 2H, H-5), 2.31 (t, 2H, H-2), 3.30 (s, 6H, (CH3)2N), 3.47 (m, 2H, H-6), 3.62 (m, 2H, OCH2CH2N), 3.68 (s, 3H, COOCH3), 3.82 (s, 3H, ArOCH3), 3.93 (m, 2H, OCH2CH2N), 6.89 (d, 2H, ArH), 7.24-7.41 (m, 12H, ArH).

【００８１】

６－（Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ）－Ｎ－［２－（モノメトキシトリチルオキシ）－エチル］ヘキサン酸　ｐ－ニトロフェニルエステル（７）　－　２：１ブタノール－水（６．

０ｍＬ）中の化合物５（４２０ｍｇ、０．８６ｍｍｏｌ）の溶液を、水酸化リチウム（７２ｍｇ）と混合し、そして溶液を、室温にて３時間、攪拌し、その後ＴＬＣ（酢酸エチル－メタノール－酢酸－水、１２：３：３：２）は、僅かにより低いｒｆ．を伴う化合物への完全な変換を示した。この段階でのＥＳ－ＭＳスペクトルは、ｍ／ｚ　４７６．０および４８２．３ピーク（それぞれ、Ｍ＋ＨおよびＭ＋Ｌｉ）を示した。混合物を水（１０ｍＬ）で希釈し、ｐＨを、０．１Ｍ　塩酸により７．５に調節し、次いで溶液を凍結乾燥して、粗６（５１０ｍｇ、塩化リチウムが混入された）を得た。この材料（約０．８６ｍｍｏｌ）を乾燥ピリジン（６．０ｍＬ）中に溶解し、次いでｐ－ニトロフェノール（４００ｍｇ、２．８６ｍｍｏｌ）、およびジイソプロピルカルボジイミド（２７０マイクロＬ、０．１７６ｍｍｏｌ）を添加した。室温での３時間の攪拌後、ジイソプロピルカルボジイミドのさらなる分量（２００マイクロＬ）を添加し、そして混合物をさらに２４時間、室温にて攪拌し、その後、ＴＬＣ（酢酸エチル－メタノール－酢酸－水、１５：３：３：２）は、完全な反応を示した。混合物を蒸発し、そしてジクロロメタン－トルエンとともに共蒸発×３して、ピリジンを除去した。残渣を、０．２Ｍ酢酸トリエチルアンモニウム水溶液（ｐＨ５．０）とメチル　ｔ－ブチルエーテルとの間で分配した（約１００ｍＬの各溶媒、および激しい振盪が、すべてを溶解するために必要であった）。ＴＬＣ（酢酸エチル－メタノール－酢酸－水、１０：３：３：２、ＵＶおよびニンヒドリン検出）は、生成物が、水相中にもっぱらあるのに対し、大部分のｐ－ニトロフェノール、およびまたＵＶ吸収不純物は、有機相中にあったことを示した。有機層を、少量の水性緩衝液で洗浄し、そして合わせた有機層を、メチル　ｔ－ブチルエーテルで洗浄し、次いでジクロロメタンで抽出した（ＴＬＣは、ここで有機層への生成物の完全な移行を示した）。水層を少量のジクロロメタンで洗浄し、そして合わせた有機層を小量の緩衝液で洗浄し、そして注意深く分離した。この時に、ＴＬＣは、非常に純粋な材料の存在を明らかにし、そしてＨ－ＮＭＲはまたこのことを確認した。材料を、溶液中で、冷凍庫において維持したが、必要であれば濃縮され、シロップ状の、粗７（４４０ｍｇ、８６％）を得ることができた。この形態において、材料はまた、数週間、冷凍温度にて、未変化のままであった。材料のＥＳ－ＭＳは、ｍ／ｚ　５９６．８（Ｍ＋）にて強力なシグナルを示した。ＨＮＭＲデータ（ＣＤＣｌ３）：

【００８２】

【数１０】

1.41 (m, 2H, H-4), 1.75-1.85 (m, 4H, H-3, H-5), 2.63 (t, 2H, H-2), 3.24 (s, 6H, (CH3)2N), 3.49 (m, 2H, H-6), 3.62 (m, 2H, OCH2CH2N), 3.81 (s, 3H, ArOCH3), 3.84 (m, 2H, OCH2CH2N), 6.89 (d, 2H, ArH), 7.24-7.41 (m, 12H, ArH), 8.28 (d, 2H, ArH).

【００８３】

６－（Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ）－Ｎ－［２－（ホスホリルオキシ）－エチル］ヘキサン酸　ｐ－ニトロフェニルエステル（９）　－　化合物７（５５ｍｇ、０．１０ｍｍｏｌ）の溶液を、ギ酸（２ｍＬ）中に溶解し、そして室温にて６０分間維持し、次いでこれを濃縮し、そして乾燥アセトニトリルで共濃縮×３した。残余の化合物８は、ＴＬＣ（酢酸エチル－メタノール－酢酸‐水、６：３：３：２、ニンヒドリンおよびＵＶ検出）およびＥＳ－ＭＳ（ｍ／ｚ　３２５．２、Ｍ＋）により理想的な純度を示し、乾燥アセトニトリル（０．５ｍＬ）中に溶解し、そして乾燥アセトニトリル（０．５ｍＬ）中のオキシ塩化リン（０．０１９ｍＬ、０．２ｍｍｏｌ、新鮮に希釈した）およびトリエチルアミン（０．０６９ｍＬ、０．５ｍｍｏｌ）の冷却（０℃）溶液に添加した。０℃にて１時間後、追加のオキシ塩化リン（０．０５ｍＬ）およびトリエチルアミン（０．０５ｍＬ）を添加し、さらに１時間後、水（０．０５ｍＬ）を添加し、そして混合物をさらに０℃にて１時間、攪拌し、その後ＴＬＣは、大部分の開始材料の消失、および非常に低い（ｒｆ　０．０５）移動度を伴う、ＵＶ吸収スポットの出現を示した。反応混合物を、０．２％　ＴＦＡ

水溶液（３．８ｍＬ）で希釈し、メチル－ｔ－ブチルエーテル（３．５ｍＬ）で洗浄し、そして水相を注意深く分離し、短時間、３５℃にて回転蒸発し（約２／３の容量に減少）、そして得られる溶液を、４００マイクロＬ分量において、８．０ｍＬ／分の流動、および４０分間にわたるアセトニトリル中の８２％～５８％水の勾配を使用して（０．１％ＴＦＡ濃度を全体を通して維持した）、Ｓｕｐｅｌｃｏ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｃ－１８カラム（１５×２１．２ｃｍ、５マイクロＭ）上に注入した。１つの大きなおよび１つの小さなＵＶ吸収（３００ｎｍ）ピークが、１８～２０分、および２４～２６分にて、それぞれ見られ、所望の化合物９および開始材料８に、それぞれ対応した。９を含有する画分をプールし、小容量に濃縮し、そして凍結乾燥して、純粋な９を非晶質な材料として得た（９ｍｇ、７からの２２％）、ＬＣ－ＭＳスペクトルは、優先的なｍ／ｚ ４０５．２シグナル（Ｍ＋）を示した。Ｈ－ＮＭＲデータ（ＤＭＳＯ－ｄ６）：

【００８４】

【数１１】

1.38 (m, 2H, H-4),
1.67-1.78 (m, 4H, H-3, H-5), 2.69 (t, 2H, H-2), 3.01 (s, 6H, (CH3)2N), 3.35 (m, 2H, H-6), 3.60 (m, 2H, OCH2C*H2*N), 4.24 (m, 2H, OC*H2*CH2N), 7.44 (d, 2H, ArH), 8.31 (d, 2H, ArH). H-NMR data (D2O, HOD = 4.68): 1.35 (m, 2H, H-4), 1.66 (m, 2H, H-3 or H-5), 1.72 (m, 2H, H-3 or H-5), 2.59 (t, 2H, H-2), 3.02 (s, 6H, (CH3)2N), 3.28 (m, 2H, H-6), 3.52 (m, 2H, OCH2C*H2*N), 4.19 (m, 2H, OC*H2*CH2N), 7.22 (d, 2H, ArH), 8.19 (d, 2H, ArH).

【００８５】

ペプチド合成

１６個の４２残基ペプチドのライブラリー（図１）を、固相ペプチド合成により調製した。ライブラリーの成分は、荷電される残基の数およびリガンドの取り込みの部分に関して変化した。合成手順は、各場合において同じであり、そして３－Ｃ１５Ｌ８Ｃｙｓ２４（ＴＡ４Ｃｙｓ（Ａｃｍ））の手順により本明細書中で例示される。

【００８６】

ポリペプチドを、標準的なＦｍｏｃ化学を使用して、Ｐｉｏｎｅｅｒ自動化ペプチド合成器（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）において合成した。合成は、Ｆｍｏｃ－ＰＡＬ－ＰＥＧ－ＰＳ樹脂上で、０．２ｍｍｏｌ／ｇの置換レベルを伴って、０．１ｍｍｏｌスケールにおいて行った。以下のアミノ酸誘導体（Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ ＡＧ）を使用した：Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｃｙｓ（Ａｃｍ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｎｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ。Ｌｙｓ１５の側鎖はＡｌｏｃ保護され、一方Ｂｏｃ保護が、Ｌｙｓ８について使用された。４倍過剰のアミノ酸誘導体を各カップリング工程について使用した。ＴＢＴＵ（Ｏ－（７－ベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウムテトラフルオロボラート、ＤＭＦ中の０．５Ｍ）を、ＤＩＥＡ（ジイソプロピルエチルアミン、ＤＭＦ中の１Ｍ）と組み合わせたカップリング試薬として使用した。Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｐｒｏ、およびＨｉｓ（９０分間）、ならびに最初の残基、Ａｒｇ、およびＡｓｎ（２ｈ）以外は、６０分間の標準的なカップリング時間を使用した。従来の自動化固相ペプチド合成を完了した後、遊離Ｎ－末端を、酢酸無水物／ジクロロメタン（３：１）の混合物で２時間処理して、酢酸無水物でアセチル化し、そして樹脂を、ジクロロメタンで洗浄し（×６）、そしてジエチルエーテルで収縮した。Ａｌｏｃ

保護基を、２．５時間、クロロホルム／酢酸／ＮＭＭ（Ｎ－メチルモルホリン（１８：２：１）中の３当量のテトラキス（トリフェニル）パラジウム（０）で除去した。樹脂を、ＤＩＥＡ（ＤＭＦ中の０．５％）、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（ＤＭＦ中の０．５％）。ＤＭＦ、ジクロロメタンで続けて洗浄し、そしてジエチルエーテルで収縮した。７－メトキシクマリン－３－カルボン酸（３当量）を、４時間、ＤＭＦ中のＨＢＴＵ（３当量）、ＨＯＢｔ（３当量）、およびＤＩＥＡ（６当量）で、Ｌｙｓ１５の側鎖に結合した。樹脂を、ＤＭＦ、ジクロロメタンで洗浄し、そしてジエチルエーテルで収縮した。ペプチドを、２時間にわたって、室温にて、ＴＦＡ、ＴＩＳ（トリイソプロピルシラン）、および水（９５：２．５：２．５、１００ｍｇの樹脂あたり１ｍｌ）で樹脂から切り出した。ＴＦＡを減圧下で蒸発し、そしてペプチドを冷却ジエチルエーテルの添加により沈殿し、遠心分離し、洗浄し、そして凍結乾燥した。粗生成物を、ＲＰ　ＨＰＬＣ（Ｈｉｃｈｒｏｍ　Ｃ８、２１．２ｍｍ×２５ｃｍ、１０μｍ、Ａ：H_2O中の０．１％ＴＦＡ、１０％ＡＣＮ、Ｂ：ＡＣＮ中の０．１％ＴＦＡ、１０％H_2O、３８～４６％　Ｂ　１８分間にわたる、t_R＝１６．０分）によって精製した。

【００８７】

ペプチド足場二量体の調製

ジスルフィド結合形成（Ｈ．Ｔａｍａｍｕｒａ、Ａ．Ｏｔａｋａ、Ｊ．Ｎａｋａｍｕｒａ、Ｋ．Ｏｋｕｂｏ、Ｔ．Ｋｏｉｄｅ、Ｋ．Ｉｋｅｄａ、Ｔ．Ｉｂｕｋａ、Ｎ．Ｆｕｊｉ　Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｒｅｓ．１９９５、４５、３１２－３１９）：

ペプチド（２．４ｍｇ（０．５１μｍｏｌ）の３－Ｃ１５Ｌ８Ｃｙｓ（Ａｃｍ）２４）を、ＴＦＡ（２００μｌ）中に溶解し、そして銀トリフラート（５ｍｇ、２０μｍｏｌ）およびアニソール（１滴）を添加した。反応混合物を、冷蔵庫中、４℃にて２４時間、インキュベートした。ジエチルエーテルの添加後、ペプチドは沈殿し、そして冷却ジエチルエーテルで３回洗浄した。沈殿物にＤＭＳＯ（０．２５ｍｌ）および１Ｎ　ＨＣｌ（１ｍｌ）を添加した。反応混合物を室温にて２２時間攪拌した。懸濁液を遠心分離し、そして沈殿物を廃棄した。液体を希釈ＮａＯＨで中和化し、そしてＲＰ－ＨＰＬＣ（分析等級：Ｖａｒｉａｎ　Ｃ１８、１５０×４．６ｍｍ、５μｍ、Ａ：H_2O中の０．１％ＴＦＡ、１０％ＡＣＮ、Ｂ：ＡＣＮ中の０．１％ＴＦＡ、１０％　H_2O、３０～６０％　Ｂ　３０分間にわたる、t_R＝２３．４分）によって解析した。

【００８８】

TA_4＋Ｃｙｓ（Ａｃｍ）とPC_6－ｐニトロフェニルエステルとの反応

これは、ホスホコリン誘導体をペプチドに取り込むためのプロトコルの具体例であり、この場合において、TA_4＋は、Ｃｙｓ－残基上に保護基Ａｃｍを備える。１００μＬの０．１Ｍリン酸緩衝液　ｐＨ８中のTA_4^+Ｃｙｓ（Ａｃｍ）ペプチド（５００μｇ、０．１μモル）の溶液に、ＤＭＳＯ中の２．８μＬの０．１Ｍ　ＰＣ６－ｐニトロフェニルエステル（０．３μモル、３当量）を添加した。反応混合物を、４℃にてインキュベートした。ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～９０％　Ｂ、１０分間にわたる）、t_R＝４．１分（ＵＶシグナル）、ｍ／ｚ＝［Ｍ＋８Ｈ］$^{8+}$について６７０．５、［Ｍ＋７Ｈ］$^{7+}$について７６６．１、［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$について８９３．３、［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$について１０７１．９。

【００８９】

Ｆ１０８－２ピリジルジスルフィドでコート化された多孔性ポリスチレン上へのTA_4＋ＰＣ６Ｃｙｓ（Ａｃｍ）ペプチドの固定化

１８μＬの０．１Ｍリン酸緩衝液ｐＨ８中のTA_4＋ＰＣ６Ｃｙｓ（Ａｃｍ）ペプチド（９０μｇ、１８ｎｍｏｌ）の溶液に、水中の５０％ＭｅＯＨ中の１．８μＬの５ｍｇ／ｍＬヨウ素（８．６μｇ、３４ｎｍｏｌ、チオール基に比較して２倍過剰）を添加した。反応混合物を、２５℃にて２０分間インキュベートし、ＰｅｐＣｌｅａｎ　Ｃ１８カラム（Ｐｉｅｒｃｅ）で洗浄し、そしてリン酸緩衝液中の１０ｍｇのＦ１０８－ＰＤＳコート

化多孔性粒子を含有する５０μＬ懸濁液に直接的に添加した。

【００９０】

キナーゼ－ペプチド結合

１８μＬの０．１Ｍリン酸緩衝液ｐＨ８中のＴＡ$_4$＋ＰＣ６Ｃｙｓ（Ａｃｍ）ペプチド（９０μｇ、１８ｎｍｏｌ）の溶液に、水中の５０％ＭｅＯＨ中の１．８μＬの５ｍｇ／ｍＬヨウ素（８．６μｇ、３４ｎｍｏｌ、チオール基に比較して２倍過剰）を添加した。反応混合物を、２５℃にて２０分間インキュベートし、ＰｅｐＣｌｅａｎ　Ｃ１８カラム（Ｐｉｅｒｃｅ）で洗浄し、そしてリン酸緩衝液中の１．５ｍＬの１．３ｍｇ／ｍｌのキナーゼ－ＰＤＳに直接的に添加した。

【００９１】

ＴＡ$_4$ＰＣ６ＣｙｓＨの形成

ＴＡ$_4$Ｃｙｓ（Ａｃｍ）とＰＣ$_6$－ｐニトロフェニルエステルとの反応。１ｍＬの０．１Ｍリン酸緩衝液ｐＨ８中のＴＡ$_4$Ｃｙｓ（Ａｃｍ）ペプチド（１ｍｇ、０．２μｍｏｌ）の溶液に、１０μＬのＤＭＳＯ中の０．１ＭＰＣ６－ｐニトロフェニルエステル（０．８μｍｏｌ、５当量）を添加した。反応混合物を４℃にて２日間インキュベートし、ＮＡＰ－１０カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用するゲル濾過により精製して、水中の１．５ｍＬのＴＡ$_4$ＰＣ６Ｃｙｓ（Ａｃｍ）を得、そして最後に凍結乾燥した。ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～９０％　Ｂ、１０分間にわたる）、t_R＝４．１分（ＵＶシグナル）ｍ／ｚ＝［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$について８５６．０、［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$について１０２６．８、［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$について１２８２．６。

【００９２】

システイン脱保護。ＴＡ$_4$ＰＣ６Ｃｙｓ（Ａｃｍ）を、１ｍＬのＴＦＡ／アニソール（９９：１）中に溶解し、そして６ｍｇのＡｇＯＴｆを添加した（２０μｍｏｌ、１００当量）。４℃にて２時間後、ペプチド銀塩を、冷却エーテルで沈殿し、遠心分離により単離し、そしてエーテルで２回洗浄した。１Ｍ　酢酸中の１１６μＬの１０ｍｇ／ｍｌ　ＤＴＴを添加し、そして溶液の容量を、１Ｍ　酢酸で１ｍＬに拡張した。２５℃にて一晩後、ペプチドを、ＮＡＰ－１５カラムを使用するゲル濾過により精製して、水中の１．５ｍＬのＴＡ４ＰＣ６ＣｙｓＨを得、そして凍結乾燥した。ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～９０％　Ｂ、１０分間にわたる）、t_R＝４．６分（ＵＶシグナル）ｍ／ｚ＝［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$に対して８４３．５、［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$に対して１０１２．３、［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$に対して１２６４．６。

【００９３】

ＴＡ$_4$＋ＰＣ６ＣｙｓＨの形成

ＴＡ$_4$＋Ｃｙｓ（Ａｃｍ）とＰＣ$_6$－ｐニトロフェニルエステルとの反応。１ｍＬの０．１Ｍリン酸緩衝液ｐＨ８中のＴＡ$_4$＋Ｃｙｓ（Ａｃｍ）ペプチド（１ｍｇ、０．２μｍｏｌ）の溶液に、ＤＭＳＯ中の１０μＬの０．１Ｍ　ＰＣ６－ｐニトロフェニルエステル（０．８μｍｏｌ、５当量）を添加した。反応混合物を４℃にて一晩インキュベートし、ＮＡＰ－１０カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用するゲル濾過により精製して、水中の１．５ｍＬのＴＡ$_4$＋ＰＣ６Ｃｙｓ（Ａｃｍ）を有し、そして最後に凍結乾燥した。ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～９０％　Ｂ、１０分間にわたる）、t_R＝４．０分（ＵＶシグナル）、ｍ／ｚ＝［Ｍ＋８Ｈ］$^{8+}$について６７０．３、［Ｍ＋７Ｈ］$^{7+}$について７６６．１、［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$について８９３．４。

【００９４】

システイン脱保護。ＴＡ$_4$＋ＰＣ６Ｃｙｓ（Ａｃｍ）を、１ｍＬのＴＦＡ／アニソール（９９：１）中に溶解し、そして６ｍｇのＡｇＯＴｆを添加した（２０μｍｏｌ、１００

当量）。４℃にて２時間後、ペプチド銀塩を、冷却エーテルで沈殿し、遠心分離により単離し、そしてエーテルで２回洗浄した。１Ｍ　酢酸中の１１６μＬの１０ｍｇ／ｍｌ　ＤＴＴを添加し、そして溶液の容量を、１Ｍ　酢酸で１ｍＬに拡張した。２５℃にて一晩後、ペプチドを、ＮＡＰ－１５カラムを使用するゲル濾過により精製して、水中の１．５ｍＬのＴＡ$_4$＋ＰＣ$_6$ＣｙｓＨを得、そして凍結乾燥した。ＬＣ－ＭＳ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｇｅｍｉｎｉ、Ｃ１８、５μｍ、１５０×３．０ｍｍ、Ａ：水中の０．１％ギ酸、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、１０～９０％　Ｂ、１０分間にわたる）、t_R＝４．６分（ＵＶシグナル）、ｍ／ｚ＝［Ｍ＋８Ｈ］$^{8+}$について６６１．５、［Ｍ＋７Ｈ］$^{7+}$について７５５．９、［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$について８８１．６。

【００９５】

ペプチドライブラリーの各ポリペプチド足場へのリガンドの取り込み

ホスホコリン誘導体の取り込みのためのより一般的なプロトコルが以下に与えられる。当業者は、このプロトコルを、適用され得る特定の状態についてこれを最適化するために、適合し得る。

【００９６】

ライブラリーからの各ペプチドを、１ｍＬ　５０ｍＭ　リン酸緩衝液、ｐＨ８中に、１ｍＭの濃度に溶解して、ストック溶液を形成する。ストック溶液を形成するために必要な量は、その分子量から、２５％の含水量を推量することにより算定する。各ストック溶液の濃度は、３５５ｎｍでの２０３０００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して決定する。１００μＬの各ストック溶液を、マイクロタイタープレートのウェルに移し、そして試験されるリガンド（１００ｍＭの初期濃度でＤＭＳＯ中に溶解される）の２当量の活性なエステルを添加し、そして１時間反応させたままにする。

【００９７】

親和性測定

マイクロタイタープレートのウェルの別個のセットにおいて、Ｃ－反応性タンパク質（ＣＲＰ）を、ｐＨ７．４にて、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、および５ｍＭ　$CaCl_2$中に５００ｎＭの濃度に溶解した。リガンドおよび蛍光因子で官能化されたポリペプチドのそれぞれを、希釈し、そして標的タンパク質を含有する各ウェルに添加して、５００ｎＭのペプチドの最終濃度を得た。

【００９８】

ネガティブコントロールとして、並行実験において、蛍光因子を伴うが、リガンドを伴わないペプチドを使用して、同じ手順を適用した。マイクロタイタープレートを、３５５ｎｍでの励起および４２０ｎｍでの発光に設定された、蛍光ベースのプレート読み取り器に導入した。蛍光発光が、リガンドで官能化されたポリペプチドと、リガンドを伴わないポリペプチドとの間で異なるペプチドは、「当たり」と見なされ、より注意深い解析に選択された。

【００９９】

蛍光光度計を使用する親和性の注意深い解析についての実験プロトコルは、表１および図２において与えられる。使用したポリペプチドは、３－Ｃ１５Ｌ８と命名される配列を有する。蛍光データの解析は、Ｃ－反応性タンパク質がホスホコリンについての５つの結合部位を有することにより複雑化されるが、５ｍＭ　$CaCl_2$の存在下での官能化ポリペプチドについての親和性は、低いｎＭの、またはより良好な解離定数に適合することが明らかである。

【０１００】

蛍光因子を保有するが、リガンドを保有しないポリペプチドでの対応する実験は、ＣＲＰの濃度の関数としての蛍光における変化を何ら示さず、ポリペプチド足場自体は、ＣＲＰについて非常に低い親和性を有することを示す。従って、ポリペプチドとホスホコリン誘導体との組み合わせは、ＣＲＰについての結合剤を形成し、ここでは官能化ポリペプチドの成分とＣＲＰとの間の共同的な相互作用が、非常に高い総合的な親和性を生じる。

【０１０１】

【表１】

ペプチド	緩衝液	濃縮ペプチド (nM)	濃縮CRP (nM)	CRP容量	ペプチド容量	緩衝液容量	強度			平均	誤差
4-C15L8-PC6	ビストリス 20 mM, 5 mM CaCl2 pH7,2	100	0	0	10	490	456,78	486,4	527,63	490,27	35,58319
		100	5	0,5	10	489,5	449,62	477,97	489,83	472,4733	20,66086
		100	10	1	10	489	456,17	455,1	450,21	453,8267	3,177489
		100	25	2,5	10	487,5	446,88	433,51	446,39	442,26	7,581682
		100	50	5	10	485	423,14	393,56	409,77	408,8233	14,81271
		100	75	7,5	10	482,5	406,08	365,75	408,88	393,57	24,13347
		100	100	10	10	480	399,31	381,79		390,55	12,38851
		100	150	15	10	475	413,76	389,49		401,625	17,16148
		100	200	20	10	470	405,77			405,77	
4-C15L8	ビストリス 20 mM, 5 mM CaCl2 pH7,2	100	0	0	10	490					
		100	5	0,5	10	489,5					
		100	10	1	10	489					
		100	25	2,5	10	487,5					
		100	50	5	10	485					
		100	75	7,5	10	482,5					
		100	100	10	10	480					
		100	150	15	10	475					
		100	200	20	10	470					
-	ビストリス 20 mM, 5 mM CaCl2 pH7,2	0	0	0	0	500					
-	ビストリス 20 mM, 5 mM CaCl2 pH7,2	0	1500	15	0	485					

【０１０２】

固相ＣＲＰ検出アッセイ

固相に結合される本発明の結合剤を有するＣＲＰ検出アッセイの１つの実施態様は、図３において模式的に示される。

【０１０３】

このアッセイにおいて、ＣＲＰの捕獲は、ラテックス粒子に付着されるＣＲＰ－結合剤により達成され、そして認識シグナルは、酵素ピルビン酸キナーゼに結合される結合剤により作製される。キナーゼは、添加されるＰＥＰ（ホスホエノールピルビン酸塩）の補助を伴って、ＡＤＰをリン酸化して、ＡＴＰを形成する。次いで、ＡＴＰは、酵素ルシフェラーゼと複合体を形成し、これはルシフェリンの、オキシルシフェリンへの酸化を触媒することを可能にする。この反応は光を生じる。光の強度は、サンプル中のキナーゼの量の直接的な尺度になり、これは言い換えると、ＣＲＰ結合の尺度である。

【０１０４】

ラテックス粒子に結合されるＣＲＰ－結合剤の調製

２３９ｎｍの直径を備える単分散ポリスチレンラテックス粒子を、高分子界面活性剤Ｐｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ１０８（チオールを含有するリガンドの連結を許容するためにピリジルジスルフィド（ＰＤＳ）結合化末端基を含有する）を含有する超純粋（ＭｉｌｌｉＱ）水中に懸濁した。界面活性剤分子は、それらの疎水性中心ブロックを介して、粒子を吸着する[14]。各粒子により、一晩の吸着を介して、取り込まれるＰｌｕｒｏｎｉｃ分子の数は、沈降場流動分画、ＳｄＦＦＦにより、１６５００であると決定した[15]。次いで、ＰＤＳ基を、それぞれＣｙｓ含有ＣＲＰ結合剤により置き換えた。結合剤（Ｔａ４＋）を固定化するためのプロトコルは上述に与えられる。ＳｄＦＦＦによる解析は、各粒子が２５６０の結合剤を取り込んだことを示した。

【０１０５】

酵素ピルビン酸キナーゼ（ウサギ筋肉由来のＩＩＩ型；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ製品番号　Ｐ９１３６－５ＫＵ）を、入手されるように、または二官能性リンカー分子、ＳＰＤＰ（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、製品番号２１８５７）での処理後、またはジスルフィド結合架橋を介する結合剤への付着後（例示的なプロトコルは上述に与えられる）のいずれかで、アッセイした。酵素の３つの形態を、以下の様式において、ＡＤＰをリン酸化するそれらのそれぞれの能力についてアッセイした：ｐＨ７．６の５０ｍＭ　グリシン－ＴＲＩＳ緩衝液中に０．３６ｍｇキナーゼを含有するアリコートを、それぞれ、「発光試薬」、すなわち、０．５ｍｇ／ｍＬでの４０μＬルシフェラーゼ（「Ｔｈｅｒｍｏｓｔａｂｌｅ」、ＢｉｏＴｈｅｍａ　ＡＢ、Ｓｔｏｃｋｈｏｌｍから）、８．９ｍｇ／ｍＬでの１０μＬ　ＰＥＰ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、１０□Ｌ　１５ｍＭ　ルシフェリン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）の混合物に添加した。ｔ＝０時に、１０μＬ　ＡＤＰ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，２．６ｍｇ／ｍＬ）のアリコートを各サンプル混合物に添加し、そして発光を、ＣＣＤカメラで３００秒間、追った。結果を図４において示す。３つの形態は、おおむね比較可能な活性であった。市販の製品は、予期されないことに、その修飾された形態よりもいくらか少ない活性であり、おそらくプロセシングの間のいくつかの微量のインヒビターの（意図されない）除去により引き起こされる。

【０１０６】

図３において例示されるタイプの反応混合物からの、そして比較のために、本発明のＣＲＰ－結合剤の代わりにＣＲＰ－結合剤としてＣＲＰ－特異的ＩｇＹ抗体を有する反応混合物からの光子束を、ＣＣＤカメラにより測定した。試薬の濃度および総量は、図４における「発光試薬」について記載されるのと同じであった。サンプルは、ＣＲＰ－非含有血清または１２ｍｇ　ＣＲＰ／Ｌを含有する血清のいずれかであった。最も高い光子束は、混合物（ここでは、粒子表面上のＣＲＰ－結合剤が、濃縮された血清サンプル由来のＣＲＰを捕獲した）によって提供される光子束であった。３サイクルの洗浄および遠心分離後、複合サンプルに、結合剤－キナーゼ結合体を取り込ませ；次いで、これを上述の発光試薬と混合して、その光子束を生成させた。同様に、抗体（ＩｇＹ抗－ＣＲＰ、Ａ．Ｌａｒｓｓｏｎ、Ｕｐｐｓａｌａ　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｈｏｓｐｉｔａｌからの贈物）を含有する粒子に、公知の濃度（１２ｍｇ／Ｌ）の血清由来のＣＲＰを結合させた。抗体－キナーゼ結合体を添加して、記載されるように、光子束を生成した。ＣＲＰ非含有血清を、ブランクとして使用した。このような４つのサンプルに加えて、４つの実際のサンプル中の結

合剤および抗体を保有する粒子と同じ大きさの、界面活性剤コート化ナノ粒子のみからなるサンプルがあった。結果は図５において示される。図は明らかに、ＣＲＰの結合剤ベースの検出が強力なシグナルを与えるのに対し、ＣＲＰ－非含有血清からの結合剤ベースのシグナルは、ゼロ光強度の真っ直ぐなベースラインを与えることを示した。抗体ベースの検出は、ＣＲＰ－含有血清においていくらかより弱いシグナルを与えるが、ＣＲＰ－非含有血清から得られるシグナルから判断すると、結合剤－類似体よりも高い非特異的吸着を実証した。

【０１０７】

界面活性剤コート化粒子は、本研究において明白なブランクであった。

【０１０８】

図５の実験に類似する実験を、結合剤－結合性ラテックス粒子（１０μＬ、２３９ｎｍ直径を備える１０％　ｗ／ｖポリスチレン粒子）上で行った。粒子を、イヌ、ウマ、ヒト被験体由来の１００μＬの血清に添加し、ここで前者の２つは、未知の濃度のＣＲＰを有し、後者は１２ｍｇ／Ｌを含んだ。１０分間のインキュベーション後、粒子を遠心分離を伴って３回洗浄し、次いで結合剤－キナーゼ結合体とともに、１５分間インキュベートした。３倍洗浄手順、および図４の下に記載される「発光試薬」の添加後、累積的光子生成を測定し、そしてキナーゼ濃度の尺度として、言い換えるとサンプル中のＣＲＰの量に比例して、ＡＴＰ生成の速度をコンピューター計算する、ＢｉｏＴｈｅｍａからの照度計により、サンプルを走査した。結果を、図６および表１において示す。この分析から、結合剤は、ヒト由来のＣＲＰのみでなく、イヌおよびウマ由来のＣＲＰも同様に、捕獲する能力を有することが明らかである。

【０１０９】

【表２】

サンプル	反応速度（ｐｍｏｌ／分）
ヒトCRP	０．０４５±０．００７
イヌCRP	０．０８４±０．００９
ウマCRP	０．０２６±０．００７

【参考文献】

【０１１０】

[1]Ｈａｎｓｅｎ，Ｈ．Ｊ．、ＬａＦｏｎｔａｉｎｅ，Ｇ．、Ｎｅｗｍａｎ，Ｅ．Ｓ．、Ｓｃｈｗａｒｔｚ，Ｍ．Ｋ．、Ｍａｌｋｉｎ，Ａ．、Ｍｏｊｚｉｓｉｋ，Ｋ．、Ｍａｒｔｉｎ，Ｅ．Ｗ．、Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇ，Ｄ．Ｍ．、（１９８９）癌胎児性抗原の市販の「サンドイッチ」型免疫アッセイの抗体干渉の問題を解決する。Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．、３５、１４６－１５１。

【０１１１】

[2]Ｍｏｓｅｌｅｙ，Ｋ．Ｒ．、Ｋｎａｐｐ，Ｒ．Ｃ．、Ｈａｉｓｍａ，Ｈ．Ｊ．、（１９８８）ＣＡ１２５抗原の存在下でのヒト抗マウス免疫グロブリンの検出のためのアッセイ。Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、１０６、１－６。

【０１１２】

[3]Ｒ．Ｐ．Ｊａｉｎ、Ｒ．Ｍ．Ｗｉｌｌｉａｍｓ　Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　２００１、５７、６５０５－６５０９。

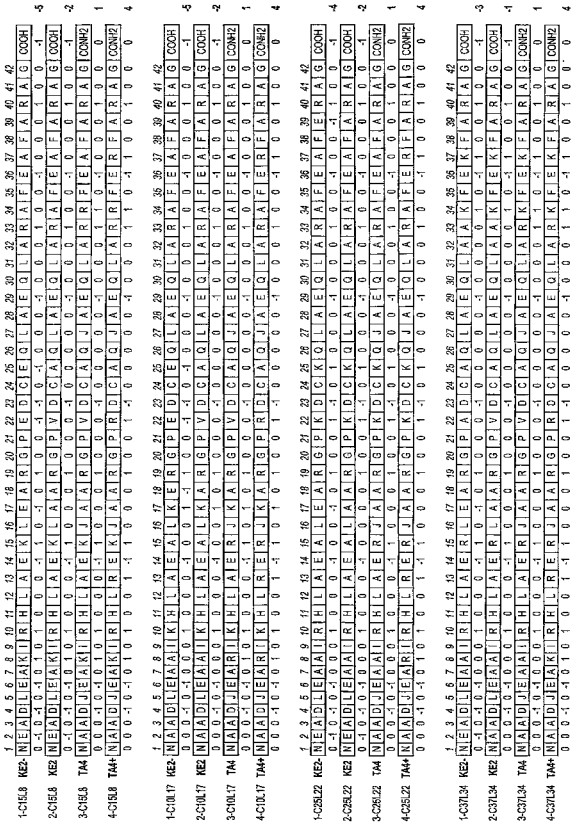
【０１１３】

[4]Ａ．Ｋａｍｉｔａｎｉ、Ｎ．Ｃｈａｔａｎｉ、Ｓ．Ｍｕｒａｉ　Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．２００３、１１５、１４３５－１４３７；Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．編　２００３、４２、１３９７－１３９９。

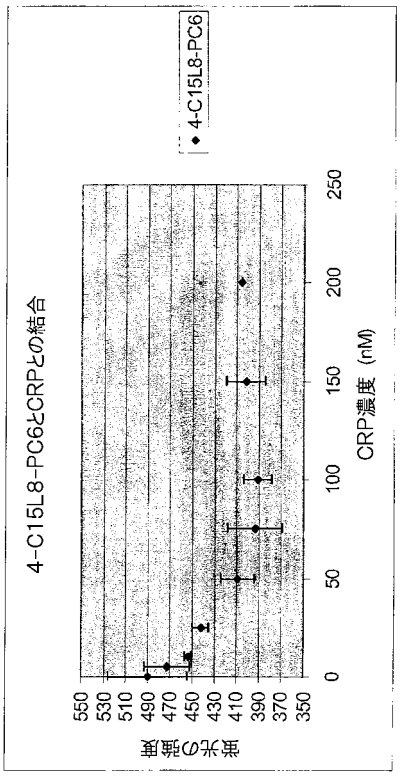
【０１１４】
[5]Ｓ．Ｋｉｍ、Ｊ．Ｉ．Ｌｅｅ、Ｙ．Ｃ．Ｋｉｍ Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．１９８５、５０、５６０－５６５。
【０１１５】
[6]Ｃ．Ｅ．ＭｃＫｅｎｎａ、Ｍ．Ｔ．Ｈｉｇａ、Ｎ．Ｈ．Ｃｈｅｕｎｇ、Ｍ．－Ｃ．ＭｃＫｅｎｎａ Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．１９７７、１８、１５５－１５８．ｂ）Ｃ．Ｅ．ＭｃＫｅｎｎａ、Ｊ．Ｓｃｈｍｉｄｈａｕｓｅｒ Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍ．１９７９、７３９。
【０１１６】
[7]Ｐ．Ａ．Ｂａｒｔｌｅｔｔ、Ｌ．Ａ．ＭｃＱｕａｉｄ Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、１９８４、１０６、７８５４－７８６０。
【０１１７】
[8]Ｗ．Ｃ．Ｃｈａｎ、Ｐ．Ｄ．Ｗｈｉｔｅ、Ｆｍｏｃ固相ペプチド合成、実践的なアプローチにおいて（Ｗ．Ｃ．Ｃｈａｎ，Ｐ．Ｄ．Ｗｈｉｔｅ編）Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｏｘｆｏｒｄ ２０００、５５－５６頁。
【０１１８】
[9]Ｅ．Ｇ．Ｂｒｏｗｎ、Ｊ．Ｍ．Ｎｕｓｓ Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．１９９７、３８、８４５７－８４６０。
【０１１９】
[10]Ｊ．Ｃａｉ、Ｂ．Ｗａｔｈｅｙ Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．２００１、４２、１３８３－１３８５。
【０１２０】
[11]Ｒ．Ｐ．Ｊａｉｎ、Ｒ．Ｍ．Ｗｉｌｌｉａｍｓ：（Ｓ）－（＋）－カルニチンおよび類似体の非対称性合成、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ５７（２００１）６５０５－０９。
【０１２１】
[12]Ｓ．Ｒａｈａｌ、Ｌ．Ｂａｄａｃｈｅ；アミノ酸のＥｓｃｈｗｅｉｌｅｒ－Ｃｌａｒｋｅメチル化、Ｊｏｕｒｎａｌ ｄｅ ｌａ Ｓｏｃｉｅｔｅ Ａｌｇｅｒｉｅｎｎｅ ｄｅ Ｃｈｉｍｉｅ ４（１９９４）、７５－８５
[13]ＰＡ Ｆｏｗｌｅｒ、Ａ．Ｈ．Ｈａｉｎｅｓ、Ｒ．Ｊ．Ｋ．Ｔａｙｌｏｒ、Ｅ．Ｊ．Ｔ．Ｃｈｒｙｓｔａｌ、Ｍ．Ｂ．Ｇｒａｖｅｓｔｏｃｋ：ノジリマイシンの非環状類似体の合成および生物学的活性、ＪＣＳ Ｐｅｒｋｉｎ １（１９９４）２２２９－３５。
【０１２２】
[14]Ｂｏｈｎｅｒ，Ｍ．、Ｒｉｎｇ，Ｔ．Ａ．，Ｒａｐｏｐｏｒｔ，Ｎ．、およびＣａｌｄｗｅｌｌ，Ｋ．Ｄ．「種々の量のＰＥＯ／ＰＰＯ／ＰＥＯトリブロック共重合体でコート化されたＰＳラテックス粒子によるフィブリノゲンの取り込み」、Ｊ．Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ Ｓｃｉ．、Ｐｏｌｙｍｅｒ編、１３（２００２）、７３３－７４６。
【０１２３】
[15]Ａｎｄｅｒｓｓｏｎ，Ｍ．、Ｆｒｏｍｅｌｌ，Ｋ．、Ｇｕｌｌｂｅｒｇ，Ｅ．、Ａｒｔｕｒｓｓｏｎ、Ｐ．、およびＣａｌｄｗｅｌｌ，Ｋ．Ｄ．「インビボ生体相互作用における表面修飾化ナノ粒子の特徴付け－沈降場流動分画研究」、Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（２００５）７７、５４８８－５４９３。
【図面の簡単な説明】
【０１２４】
【図１】本発明において使用されるペプチド足場のライブラリーの概観を示す。
【図２】ＣＲＰに対する本発明のＣＲＰ－結合剤の親和性を示す。
【図３】本発明のＣＲＰ－結合剤を使用するＣＲＰ検出アッセイの模式図を示す。
【図４】それぞれ、ネイティブなピルビン酸キナーゼ、リンカーに結合されるピルビン酸キナーゼ、およびＣＲＰ－結合剤に結合されるピルビン酸キナーゼの活性を示す。
【図５】それぞれ、本発明のキナーゼ結合性ＣＲＰ－結合剤、およびキナーゼ結合性ＣＲＰ－抗体により生成されたシグナルの比較である。

【図６】ヒト、ウマ、およびイヌ由来のＣＲＰの検出のために使用された、本発明のキナーゼ結合性ＣＲＰ－結合剤により生成されたシグナルの比較である。

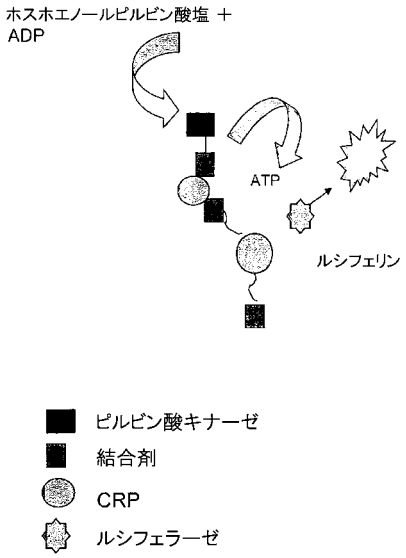
【図１】



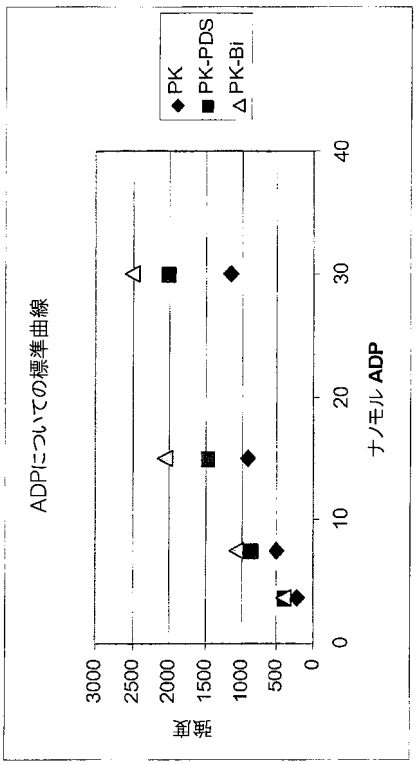
【図２】



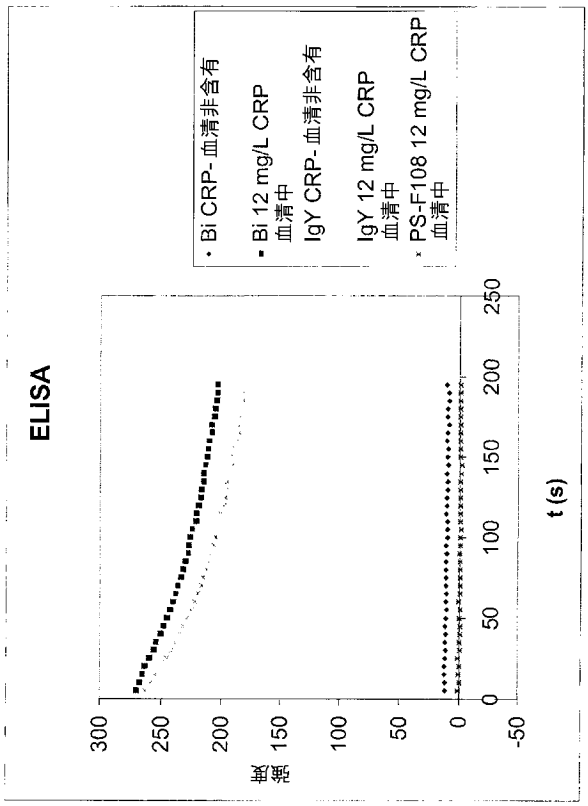
【図３】


ホスホエノールピルビン酸塩 ＋
ADP
ATP
ルシフェリン
ピルビン酸キナーゼ
結合剤
CRP
ルシフェラーゼ

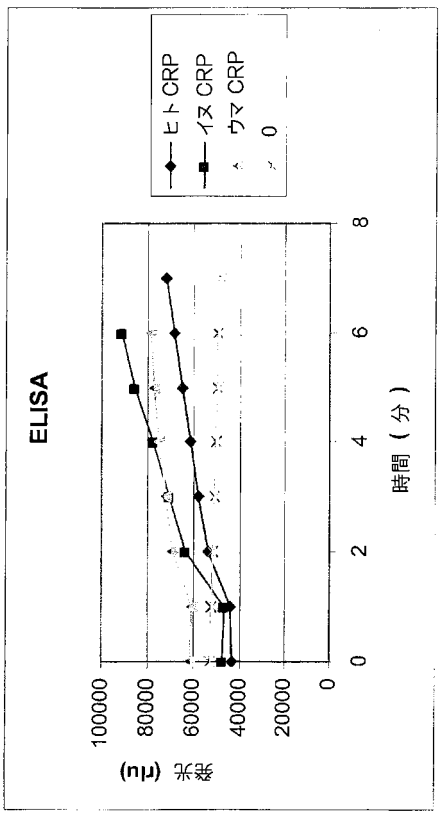
【図４】


ADPについての標準曲線
PK
PK-PDS
PK-Bi
強度
ナノモル ADP

【図５】


ELISA
Bi CRP- 血清非含有
Bi 12 mg/L CRP 血清中
IgY CRP- 血清非含有
IgY 12 mg/L CRP 血清中
PS-F108 12 mg/L CRP 血清中
強度
t (s)

【図６】


ELISA
ヒト CRP
イヌ CRP
ウマ CRP
0
発光 (rlu)
時間（分）

【配列表】
0005232769000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第２００３／０８０６５３（WO，Ａ１）
米国特許出願公開第２００３／０１７１２５１（ＵＳ，Ａ１）
特開２０００－２４９７０３（ＪＰ，Ａ）
特開平０９－００５３２５（ＪＰ，Ａ）
DEEGAN O. et al., Quantitative detection of C-reactive protein using phosphocholine-labelled enzyme or microspheres., Analytical Biochemistry, ２００３年, Vol.312, p.175-181
STULTS N. et al., Preparation of phosphorylcholine derivatives of bovine serum albumin and their application to the affinity chromatography of C-reactive protein., Analytical Biochemistry, １９８７年, Vol.161, p.567-573

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ　１／００－１９／００
Ｇ０１Ｎ　３３／５３
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｑ　１／００－３／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩ）
ＣＡＰＬＵＳ／ＢＩＯＳＩＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ（ＳＴＮ）