[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C07K 1/04
G01N 33/68 C07K 14/705
A61K 49/00 A61K 51/08
C07C229/16

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 99812807.4

[43]公开日 2001年12月5日

[11]公开号 CN 1325405A

[22]申请日 1999.8.26 [21]申请号 99812807.4

[30]优先权

[32]1998.8.31 [33]US [31]09/144,964

[32]1999.3.5 [33]US [31]09/263,971

[86]国际申请 PCT/US99/19542 1999.8.26

[87]国际公布 WO00/12536 英 2000.3.9

[85]进入国家阶段日期 2001.4.28

[71]申请人 格莱风科学公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 G·G·科亨德菲尔 C·L·亨特尔

S·B·H·肯特

P·波蒂

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 王其灏

权利要求书6页 说明书86页 附图页数10页

[54]发明名称 膜多肽的脂基质协助的化学结合和合成

[57]摘要

本发明涉及脂基质协助的化学结合的方法和组合物,以及被整合 到脂基质中的膜多肽的合成。本发明是以通过未保护的肽片段的逐步 的化学选择性化学结合生产包埋在脂基质中的预折叠的膜多肽为例 说明的,其中,至少一个肽片段被包埋在脂基质中。可以采用能够结 合未保护的肽片段的任何化学选择性反应化合物。合适的脂基质包括 脂质体、微团、细胞膜膜片以及在光学上各向同性的立体脂相基质。按照所述方法合成的预折叠的合成和半合成膜多肽以及本发明的组 合物还可以使诸如生色团的一种或多种可检测部分以位点专一形式 整合,所述可检测部分可以在合成期间方便地引入。本发明的方法和 组合物具有多种用途。例如,可将其用于分析结合膜多肽的配体以及 含有受体的结构域,因此对于结构/功能研究、药物筛选/选择/设计、以及诊断来说是极其有利的,包括高流通量用途。本发明的方法和组 合物特别适用于以前无法获得的膜多肽 FRET 分析。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种膜多肽的化学选择性化学连接的方法，该方法包括让包括具有未保护的活性基团的第一种氨基酸的脂基质结合的膜多肽与包括具有能够与所述第一种氨基酸在化学选择性化学连接条件下进行化学选择性化学连接的未保护的活性基团的第二种氨基酸的连接标记接触，从而在所述第一种和第二种氨基酸之间形成共价键。

2. 如权利要求 1 的方法，其中，所述化学选择性化学连接选自下列一组：天然化学连接、成肟连接、成硫酯连接、成硫醚连接、成腙连接、成噻唑烷连接、和成恶唑烷连接。

3. 如权利要求 1 的方法，其中，所述脂基质包括能够形成亲胶相的脂类分子。

4. 如权利要求 3 的方法，其中，所述脂基质选自下列一组：平面双层膜、脂质体、微团、或立体脂相基质。

5. 如权利要求 1 的方法，其中，所述膜多肽是折叠的。

6. 如权利要求 1 的方法，其中，所述膜多肽是整合的膜多肽。

7. 如权利要求 6 的方法，其中，所述整合的膜多肽是跨膜多肽。

8. 如权利要求 7 的方法，其中，所述跨膜多肽是一种受体。

9. 如权利要求 1 的方法，其中，所述连接标记包括一种或多种氨基酸。

10. 如权利要求 9 的方法，其中，所述连接标记包括一种肽。

11. 如权利要求 10 的方法，其中，所述肽是水溶性肽。

12. 如权利要求 10 的方法，其中，所述肽是脂溶性肽。

13. 如权利要求 10 的方法，其中，所述肽包括一种多肽。

14. 如权利要求 13 的方法，其中，所述多肽是膜多肽。

15. 如权利要求 9 的方法，其中，所述肽包括非天然氨基酸。

16. 如权利要求 15 的方法，其中，所述非天然氨基酸包括生色团。

17. 如权利要求 16 的方法，其中，所述生色团是受体-供体共振能量传递对的一个受体部分。

18. 如权利要求 16 的方法，其中，所述生色团是受体-供体共振能量传递对的一个供体部分。

19. 一种标记脂膜包埋的折叠多肽的方法，该方法包括：

制备一种包括具有未保护的活性基团的氨基酸的脂膜包埋的折

叠膜多肽，通过用一种能选择性地在靠近所述氨基酸的裂解位点裂解所述多肽的裂解试剂裂解所述脂膜包埋的折叠多肽可以进行化学选择性化学连接；和

将包括具有能够进行化学选择性化学连接的未保护的活性基团的氨基酸的连接标记连接到所述脂膜包埋的折叠多肽上，连接是在能在所述氨基酸之间形成共价键的条件下形成的，以便标记所述脂膜包埋的多肽。

20. 如权利要求 19 的方法，其中，所述裂解位点选自下列一组：化学裂解位点和蛋白酶裂解位点。

21. 一种组合物，包括用权利要求 1-20 的中任一项的方法生产的标记过的膜多肽。

22. 一种含有以下成分的组合物：

（i）包括具有能进行化学选择性化学连接的未保护的活性基团的氨基酸的连接标记；和

（ii）一种包埋在脂基质中的膜多肽，其中，所述膜多肽包括具有能与所述连接标记的未保护的活性基团进行化学选择性化学连接的未保护的活性基团的氨基酸。

23. 一种含有以下成分的组合物：

（i）包括具有能进行化学选择性化学连接的未保护的活性基团的氨基酸的连接标记；和

（ii）一种包埋在脂基质中的折叠多肽，其中，所述多肽包括直接与一个氨基酸相邻的裂解位点，该氨基酸在用裂解试剂裂解之后能提供一个未保护的活性基团，并能够与所述连接标记的未保护的活性基团进行化学选择性化学连接。

24. 一种包括包埋在光学上各向同性的立体脂相基质中的折叠的膜多肽的组合物，其中，所述多肽包括一种检测标记，包括一种或多种氨基酸和生色团。

25. 一种检测与脂膜结合的多肽结合的配体的方法，所述方法包括

让脂膜结合的多肽与一种配体接触，其中，所述多肽包括一种检测标记，包括第一种生色团；和

通过一种试验筛选所述配体与所述多肽的结合，其特征在于通过

检测第一生色团和第二生色团之间的荧光共振能量传递，其中，所述第一和第二生色团包括共振能量传递系统的供体和受体。

26. 一种包括权利要求 20 的组合物的试剂盒。

27. 一种用螯合剂敏化的金属离子探针在树脂上对肽进行标记的方法，所述方法包括用能螯合金属离子的两性离子螯合剂部分标记标记连接在树脂上的肽的一个或多个氨基酸。

28. 如权利要求 27 的方法，其中，所述树脂是固相肽化学合成树脂。

29. 如权利要求 27 的方法，其中，所述肽是多肽。

30. 如权利要求 29 的方法，其中，所述多肽是膜多肽。

31. 如权利要求 27 的方法，其中，所述两性离子螯合剂部分标记通过一个化学部分缀合在所述一个或多个氨基酸上，与由所述一个或多个氨基酸提供的活性基团形成共价键。

32. 如权利要求 31 的方法，其中，所述两性离子螯合剂部分标记是螯合剂敏化的探针。

33. 如权利要求 32 的方法，其中，所述螯合剂敏化的探针是螯合剂敏化的镧系金属离子探针。

34. 如权利要求 32 的方法，其中，所述螯合剂敏化的探针选自下列一组：三乙四胺六乙酸、二乙三胺五乙酸、二乙三胺 N,N,N,N 四乙酸、1，4，7，10 四叠氮环十二烷 N,N',N'',N'''四乙酸和 1，4，8，11 四叠氮环十四烷 N,N',N'',N'''四乙酸。

35. 如权利要求 33 的方法，其中，所述镧系金属离子选自下列一组：铽、钐和铕。

36. 一种提高两性离子螯合剂的溶解度的方法，该方法包括让不溶性的两性离子螯合剂与一种增溶剂混合，从而产生所述两性离子螯合剂的可溶性盐形式。

37. 如权利要求 36 的方法，其中，所述不溶性的两性离子螯合剂在选自下列一组的溶剂中基本上不溶：二甲基甲酰胺、二甲基亚砜和甲醇。

38. 如权利要求 37 的方法，其中，所述不溶性的两性离子螯合剂具有在随后的偶联反应中针对活化作用的无活性的羧基，其中，所述增溶剂对所述活化作用是惰性的。

39. 如权利要求 36 的方法，其中，所述增溶剂选自下列一组：三氯乙酸和对甲苯磺酸。

40. 如权利要求 37 的方法，其中，所述两性离子螯合剂选自下列一组：三乙四胺六乙酸、二乙三胺五乙酸、二乙三胺 N, N, N, N 四乙酸、1，4，7，10 四叠氮环十二烷 N, N', N'', N'''四乙酸和 1，4，8，11 四叠氮环十四烷 N, N', N'', N'''四乙酸。

41. 一种含有两性离子螯合剂的可溶性盐形式的组合物。

42. 如权利要求 41 的组合物，其中，所述两性离子螯合剂选自下列一组：三乙四胺六乙酸、二乙三胺五乙酸、二乙三胺 N, N, N, N 四乙酸、1，4，7，10 四叠氮环十二烷 N, N', N'', N'''四乙酸和 1，4，8，11 四叠氮环十四烷 N, N', N'', N'''四乙酸。

43. 如权利要求 41 的组合物，其中，所述两性离子螯合剂的可溶性盐形式是所述两性离子螯合剂的三氟乙酸盐。

44. 如权利要求 43 的组合物，其中，所述两性离子螯合剂的 TFA 盐是粉末。

45. 如权利要求 45 的组合物，其中，所述粉末可溶于二甲基甲酰胺。

46. 如权利要求 41 的组合物，其中，所述两性离子螯合剂的可溶性盐形式是所述两性离子螯合剂的对甲苯磺酸盐。

47. 如权利要求 46 的组合物，其中，所述两性离子螯合剂的对甲苯磺酸盐是粉末。

48. 如权利要求 47 的组合物，其中，所述粉末可溶于二甲基甲酰胺。

49. 一种含有包埋在脂基质中的整合的膜多肽和至少一种包括一个未保护的活性基团的非天然氨基酸的组合物，所述活性基团能与具有相容未保护的活性基团的连接标记进行化学选择性化学连接。

50. 如权利要求 49 的组合物，其中，所述整合的膜多肽包括通过选自下列一组的非天然主链键共价连接在第二种氨基酸残基上的第一种氨基酸残基：肟、硫酯、硫醚、腙、噻唑烷和噁唑烷。

51. 如权利要求 49 的组合物，其中，所述膜多肽是整合的膜多肽。

52. 如权利要求 51 的组合物，其中，所述整合的膜多肽是跨膜多肽。

53. 如权利要求 52 的组合物，其中，所述跨膜多肽包括一个或多个受体的脂膜锚定域。

54. 如权利要求 52 的组合物，其中，所述跨膜多肽包括一个或多个离子通道的脂膜锚定域。

55. 如权利要求 49 的组合物，其中，所述膜多肽包括含有一种检测标记的非天然氨基酸。

56. 一种含有包埋在脂基质中的膜多肽的组合物，所述膜多肽具有 至少两个通过非天然主链键共价连接在一起的氨基酸残基。

57. 如权利要求 56 的组合物，其中，所述非天然主链键选自下列一组：肟、硫酯、硫醚、脲、噻唑烷和恶唑烷。

58. 一种含有包括无细胞杂质的离子通道的合成的整合膜多肽的组合物。

59. 一种用于加速膜多肽和连接标记化学连接的方法，该方法包括：在连接缓冲液中混合包括具有未保护的活性基团的第一种氨基酸的膜多肽和包括具有未保护的活性基团的第二种氨基酸的连接标记，所述第二种氨基酸的活性基团能够与第一种氨基酸进行化学选择性化学连接，所述连接缓冲液含有成微团脂基质、离液剂、缓冲剂、和化学连接催化剂，该催化剂能催化所述第一种氨基酸和第二种氨基酸的化学选择性化学连接，并在第一种和第二种氨基酸之间形成共价键。

60. 如权利要求 59 的方法，其中，所述化学选择性化学连接选自下列一组：天然化学连接、成肟连接、成硫酯连接、成硫醚连接、成脲连接、成噻唑烷连接、和成噁唑烷连接。

61. 如权利要求 59 的方法，其中，所述成微团脂基质是十二烷基磷酸胆碱。

62. 如权利要求 59 的方法，其中，所述离液剂选自下列一组：尿素和盐酸胍。

63. 如权利要求 60 的方法，其中，所述化学选择性化学连接是天然化学连接。

64. 如权利要求 63 的方法，其中，所述化学连接催化剂是苯硫酚。

65. 一种用于膜多肽和连接标记的化学选择性化学连接的连接缓冲液，该连接缓冲液含有能够形成脂基质的脂类试剂、离液剂、缓冲

剂、和能催化特定的化学选择性化学连接反应的化学连接催化剂。

66. 如权利要求 65 的连接缓冲液，其中，所述脂基质选自下列一组：平面脂双层膜、脂质体、微团和立体脂相。

67. 如权利要求 65 的连接缓冲液，其中，所述能够形成脂基质的脂类是十二烷基磷酸胆碱。

68. 如权利要求 65 的连接缓冲液，其中，所述离液剂选自下列一组：尿素和盐酸胍。

69. 如权利要求 65 的连接缓冲液，其中，所述化学连接催化剂是苯硫酚。

70. 一种含有权利要求 65 的成分的试剂盒。

71. 如权利要求 70 的试剂盒，其中，所述成分是在一个容器中预混合的。

72. 如权利要求 70 的试剂盒，其中，所述成分的一种或多种在所述试剂盒中是在独立的容器中提供的。

73. 如权利要求 70 的试剂盒，还包括一种多肽裂解试剂。

74. 如权利要求 70 的试剂盒，还包括一种连接标记，该标记包括具有能进行化学选择性化学连接的未保护的活性基团的氨基酸。

75. 如权利要求 70 的试剂盒，其中，还包括一种膜多肽，该多肽包括具有能进行化学选择性化学连接的未保护的活性基团的氨基酸。

说　明　书

膜多肽的脂基质协助的化学结合和合成

前言

技术领域

本发明涉及膜多肽、制备方法、以及采用这种膜多肽的试验。

背景

细胞膜是由能在水性区室之间形成阻隔层的脂类组成。它们主要是由各种膜蛋白结合的脂分子的连续的双层片构成。构成三种主要类型的膜的脂分子是磷脂、鞘脂和糖脂。这些脂类是两亲性的分子，就是说，它们具有一个亲水的（极性）头和疏水性（非极性）尾。在细胞的水性环境中，所述极性头基团朝向水，而其疏水的尾部基团相互作用形成一个双层，并根据脂类的组成和条件，以较低的程度与其他聚合结构连接。例如，膜脂可以形成多种不同的形状，包括球形（小泡）、棒状（管状）和片（板），这要取决于脂类和水的含量以及温度。这些形状代表了相互连接以便形成二维和三维点格基质结构的基本单位，所述结构可以分为片板相（例如，双层板、密封的球），六角相（例如，棒），或立体相（例如，球形、棒或通过水通道连接的片板）（Lindblom 等，生物化学和生物物理学学报（1989）988: 221-256）。磷脂的典型的细胞膜双层（片板相）的截面可以被视为具有一个大约 30 埃的疏水性核心区和两个各自大约 15 埃的界面区（White 等，当代结构生物学（1994）4: 79-86）。

蛋白能以不同方式与细胞膜结合。膜内在蛋白含有至少一种包埋在脂双层中的成分。包埋在所述脂双层中的膜内在蛋白的非极性片段垂直于所述膜的表面，它由所述多肽的疏水区、共价连接的脂肪酸键或其他类型的脂键组成。外周膜蛋白正常情况下通过与所述内在膜蛋白的非共价相互作用与所述脂双层结合。另外，某些外周膜蛋白完全存在于水相中，通过一个共价连接的脂肪酸或脂键与所述膜结合。诸如豆蔻酸的脂肪酸键与一种蛋白的氨基末端通过酰胺键实现的共翻译结合，会导致所述蛋白定位于细胞膜的朝向细胞质的一面。异戊二烯基和棕榈酸基是在翻译之后通过硫醚键与半胱氨酸残基连接的，同样会导致蛋白定位于所述膜上。对于诸如异源三体 G 蛋白的多种细胞

信号蛋白的功能来说，这种类型的共价结合是重要的（James 等，生物化学（1990）29（11）：2623-2634；Morello 等，生物化学细胞生物学（1996）74（4）：449-457；Mumby，S.M.现代细胞生物学观点（1997）9（2）：148-154；Resh，M.D.细胞信号（1996）8（6）：403-412；和 Boutin，J.A.细胞信号（1997）9（1）：15-35）。存在于可溶性蛋白的 C-末端的糖基磷脂酰肌醇锚会导致这种蛋白与细胞表面膜结合（Turner，A.J.，分析生物化学（1994）28：113-127）。

两种主要类型的膜内在蛋白是将α螺旋插入脂双层中的蛋白和在脂双层中通过β折叠桶链在脂双层中形成孔的蛋白（Montal 等，现代结构生物学观点（1996）6：499-510；Grigorieff 等，分子生物学杂志（1996）259：393-42；和 Weiss 等，分子生物学杂志（1992）227：493-509）。单一的跨膜蛋白，或一次通过的膜蛋白通常具有一个疏水区，该疏水区通过一个α螺旋构型将所述序列锚定在脂双层中。多次跨膜蛋白或由来回穿过膜蛋白的多肽键产生的多次通过的膜蛋白通常采用α螺旋和/或β折叠桶结构膜锚。

膜蛋白的例子包括膜结合受体，转运蛋白，酶，和免疫原。例如，细胞膜结合受体是具有特定治疗用途的膜蛋白的动态统称。业已认识了四种基本的超家族：酶联受体、纤连蛋白样受体、七次跨膜受体、和离子通道受体。膜联受体是一次通过膜蛋白，其基本结构包括一种通过α螺旋锚域穿过质片膜一次的多肽。所述酶联受体的胞外域结合激素/配体，而羧基末端域含有一个催化位点，它能通过激素/配体结合和受体聚合促进信号传导。

纤连蛋白样受体具有与酶联受体大致相同的总体结构，所不同的是，在其胞质域中没有特殊的催化位点。1 型纤连蛋白样受体含有两种修饰过的胞外域，它由 7 链β片层组成，这些片层垂直结合，形成一个配体结合穴。2 型纤连蛋白样受体具有略微不同的结构，它形成在激素样指上分布的 5 链β片层的重复。1 型和 2 型受体含有保守的富含脯氨酸的细胞质并列膜区域，该区域组成性地结合可溶性酪氨酸激酶，这种酶通过配体/激素结合和受体聚合激活。

所述 7 次跨膜受体（又被称作 G-蛋白结合受体、盘旋受体或 7 螺旋受体）是迄今为止所鉴定的膜受体的最大、并且最为多样的家族。这些受体介导传感和内分泌相关的信号传导途径，并且是具有 7 次通

过膜的α螺旋锚定区的多次通过膜蛋白。上述某些蛋白的跨膜区形成一个小的配体/激素结合穴，而较大的结合位点是通过伸长的氨基末端区形成的。7 次跨膜受体还包括一个或多个细胞内环，它能结合并激活 G-蛋白，该蛋白在细胞中起着第二信使的作用。

离子通道受体的代表是配体和电压控制的通道膜蛋白受体。配体控制的离子通道是由同源亚基的五聚体形成的。每一个亚基形成一个α螺旋，构成该通道的壁。配体/激素结合似乎发生在所述亚基之间。典型的电压控制的通道受体是同源四聚体，每一个亚基具有六次跨膜的α螺旋。

业已用不同的技术研究膜蛋白和/或将其用于治疗目的、诊断、和药物筛选试验等。不过，与非膜蛋白不同，研究膜蛋白的最大障碍是其疏水性多肽键的可溶性差，难于将未折叠的多肽键折叠成膜蛋白，以及难于在适合定量分析的环境下超量表达并分离它们（Huang 等，生物化学杂志（1981）256: 3802-3809; 和 Liao 等，生物化学杂志（1983）258: 9949-9955）。例如，展开和折叠全跨膜蛋白是困难的，因为这种蛋白在非折叠形式下在脂双层中是不溶性的，并且在其折叠的和非折叠的形式下在水相中溶解也是困难的，因为其具有高度的疏水特征（Haltia 等，生物化学和生物物理学学报（1995）1241: 295-322）。在试图合成、标记或在无细胞环境中对其进行其他化学操作时，膜蛋白的这一特征是特别成问题的。然而，业已通过固相化学法化学合成了膜蛋白的单一的跨膜片段，然后将其插入膜中，并自动组装成具有生物学活性的类天然的结合（Popot 等，生物化学（1990）29: 4031-4037; 和 Grove 等，酶学方法（1992）207: 510-525）。不过，迄今为止，固相合成一直局限于仅能合成少数短的跨膜肽片段，因为膜蛋白不服从标准的化学合成技术。

建立获得具有位点专一性化学修饰的膜蛋白的方法，对于膜蛋白的结构-功能关系分析以及药物的发现来说都是很关键的，目前被用来达到这一目的的最重要的技术是合成这种蛋白的小的跨膜肽片段（Grove 等，酶学方法（1992）207: 510-525; 和 MacKenzie 等，科学（1997）276: 131-133），对现有的或工程合成的半胱氨酸残基进行化学修饰（Oh 等，科学（1996）273: 810-812），和通过体外抑制诱变插入非天然氨基酸（Cload 等，化学和生物学（1996）3:

1033-1038; 和 Turcatti 等，生物化学杂志（1996）271: 19991-19998）。上述技术没有一种能够提供获得全合成的或半合成的含有化学修饰的氨基酸侧键的膜蛋白的总体方法，或者其产量足于适用于大多数生物物理技术。另外，所述技术不能进行膜结合跨膜多肽片段或结构域的模式合成和重新组装。

相关文献

Wilken 等（当代生物技术观点（1998）9（4）: 412-426）对蛋白的化学合成进行了综述。Dawson 等（科学（1994）266: 776-779）披露了通过天然化学连接化学合成水溶性多肽。Grove 等（酶学方法（1992）207: 510-525）披露了成小孔膜肽的 Boc-化学固相合成及其随后在脂膜中的结合和活性。MacKenzie 等科学（1997）276: 131-133）披露了血型糖蛋白 A 的跨膜域的重组合成和放射性标记，及其在脂膜中的结合和 NMR 结构。Oh 等，科学（1996）273: 810-812）披露了白喉毒素跨膜域的 NMR 结构，用硫代磺酸甲酯自旋标记物对现有的或工程改造的半胱氨酸残基进行化学修饰，以便产生一种氮氧化物侧链。Turcatti 等（生物化学杂志（1996）271: 19991-19998）披露了在爪蟾卵母细胞中进行体外抑制诱变，以便将荧光标记的氨基酸引入 7 次跨膜的神经激肽-2 受体，及其在卵母细胞膜上的结合和活性。Portman 等（物理化学杂志（1991）95: 8437-8440）披露了 α 糜蛋白酶和 bacteriodopsin 在立体相脂基质中的结合和活性。Giorgione 等（生物化学（1998）37（8）: 2384-2392）披露了蛋白酶 C 在立体脂相基质和脂质体中的结合和活性。

本发明概述

本发明涉及膜多肽的脂基质协助的化学连接和合成的方法和组合物，由该方法产生的组合物，以及采用该组合物的试验。所述方法包括让一种脂基质结合的膜多肽与含有一个或多个氨基酸的连接标记物接触，其中，所述所述多肽和标记含有具有未保护的活性基团的氨基酸，能够进行化学选择性化学连接。可将多种化学选择性化学方法用于连接，如天然化学连接，成肟连接，成硫酯连接，成硫醚连接，成腙连接，成噻唑烷连接，和成恶唑烷连接。本发明的组合物包括全合成的和半合成的脂基质包埋的膜多肽，这种多肽是通过本发明的脂基质协助的化学连接方法产生的。

本发明还包括一种形成脂基质包埋的膜多肽的方法，该多肽含有一个能进行化学选择性化学连接的连接位点，在用一种能够从直接靠近一个残基的部位裂解所述多肽的试剂处理时，能够进行化学选择连接。本发明的这一方面涉及让包埋在脂基质中的膜多肽与一种试剂接触，该试剂能在特定位点选择性地裂解所述多肽，以便产生一种具有能够进行化学选择性化学连接的未保护的 N-末端或 C-末端残基的脂基质包埋的膜多肽。所述裂解位点可以是所述多肽天然具有的或者可以对所述多肽进行工程操作以便含有一个或多个这样的位点。

本发明还包括一种检测能与包埋在脂基质中的折叠的膜多肽直接或间接相互作用的配体的方法。本发明的这一方面涉及让通过脂基质协助的化学连接产生的脂基质包埋的合成或半合成膜多肽与一种配体接触，其中，所述配体和/或膜多肽含有可检测的标记。所述配体可源于多种来源中的任一种，包括天然存在的配体和合成和半合成来源，如化合物文库。该方法特别适用于诊断试验，筛选新的化合物用于药物开发，以及采用配体与预折叠膜多肽结合的其他结构和功能试验。

还提供了一种适用于筛选试验的支持基质，其中，所述支持基质包括一种可检测地标记过的脂基质包埋的膜多肽，通过化学方式连接在它上面。本发明还提供了具有至少一种或多种本发明组合物的试剂盒。

本发明还提供了一种用螯合剂敏化的金属离子探针在树脂上对一种肽进行标记的方法。该方法包括用能够螯合金属离子的两性离子螯合剂标记对连接在一种树脂上的肽的一个或多个氨基酸进行标记。还包括一种提高两性离子螯合剂的溶解度的方法。该方法包括将一种不溶性的两性离子螯合剂与增溶剂混合，从而产生所述两性离子螯合剂的可溶的盐形式。本发明还提供了一种含有两性离子螯合剂的可溶性盐形式的组合物。

本发明的方法和组合物能够没有先例地接近膜多肽及以一个或多个可检测标记进行位点专一性标记。所述方法和组合物还具有多种其他用途。例如，可将其用于分析结合膜多肽的配体和含有一种受体的结合域，因此，对于结构/功能研究，药物筛选/选择/设计，和诊断等来说非常有用，包括高流通量用途。本发明的方法和组合物特别

适用于以前无法获得的膜多肽 FRET 分析。

附图的简要说明

图 1A-D 表示膜多肽与脂双层结合的各种方式。

图 2 表示脂基质包埋的膜多肽的各种化学连接方案。

图 3A-C 表示脂基质包埋的膜多肽的位点专一性蛋白酶裂解和天然化学连接的示意性说明。

图 4 表示典型的基质协助的激光解吸（MALDI）质谱输出，由它监测通过位点专一性裂解所产生的游离的未保护的 N-末端半胱氨酸残基，然后通过天然化学连接将选择的标记连接在该残基上。

图 5 表示用于脂基质包埋的膜多肽的共振能量转移（FRET）分析的供体-受体生色团成对标记方案。

图 6 表示离子通道的 FRET 分析。

图 7 表示离子通道的 FRET 亲近分析。

图 8 表示通过 NMR 进行的离子通道的结构-活性关系（SAR）分析。

图 9 表示两种材料的反相 HPLC 和采用电喷射质谱术进行的质量分析，一为在时间=0 小时时的 HIVvpu 离子通道前体 N-和 C-末端肽，另一种材料为在十二烷基磷酸胆碱（DPC）微团中开始连接之后时间=3 小时时的连接产物。

图 10 表示两种材料的凝胶渗透 HPLC 和采用 MALDI 质谱术进行的质量分析，一为 S.livdans 钾离子通道（KCSA）前体 N-和 C-末端肽，另一种材料为在 1-单油酰-racglycerol（C18: 1, {顺} 9）（MO）立体脂相（CLP）中开始连接之后以及连接一夜之后的连接产物。

定义

氨基酸：包括 20 种遗传学上编码的氨基酸，天然存在的稀有或不常见的氨基酸，以及任何非天然存在的和修饰过的氨基酸，在肽、多肽或蛋白中有时指氨基酸残基。

化学选择性化学连接：化学选择性反应包括（1）第一种未保护的氨基酸、肽或多肽与（2）第二种未保护的氨基酸、肽或多肽的共价连接。任何化学选择性反应化合物都可用于非保护肽片段的连接。

生色团：在光谱的紫外线（250-400nm）至可见光（400-700nm）范围内表现出吸光作用的化学部分。包括荧光团、染料和共振能量转移系统的供体和受体部分。它可以是诸如肽、多肽、糖或脂的生物分

子天然存在的（内在的）或添加的（外在的）。

裂解位点：能够被含有化合物或蛋白酶的试剂裂解的氨基酸序列，它有利于目标多肽的两个氨基酸之间的肽键的水解。

腙化学连接：化学选择性反应包括具有一个肼部分的第一种未保护的氨基酸、肽或多肽与具有一个醛或酮部分的第二种未保护的氨基酸、肽或多肽的连接，导致形成在连接位点含有一个腙部分的连接产物。由成腙化学连接所产生的肽或多肽产物的主链结构与天然存在的或通过重组表达产生的肽或多肽的主链结构没有区别。

连接标记：包括一个或多个氨基酸的化学部分。它可以是肽或多肽。

脂基质：一种分子基质，含有能够形成亲胶相的天然、合成脂分子或其组合（即在与水相互作用时形成有序的结构）。又被称作脂膜。脂分子具有大约 100-5000 的中等分子量，并含有一个脂族或芳族烃的主要部分。包括一种或多种极性脂，如磷脂、溶血磷脂、鞘脂和糖脂，它们能够形成片状双层和具有各种二维片层和/或六角相点格结构和/或三维立体相点格结构的其他脂类聚合体。

膜多肽：一种包括疏水部分的多肽，该部分能将所述多肽锚定在脂膜上。又被称作膜肽或膜蛋白。它可以包括一个或多个脂膜锚定域，如所述多肽的疏水性片段，一种共价连接的脂肪酸链或共价连接的脂链。可以是一次或多次通过的跨膜多肽。可以包括一个或多个外膜氨基酸残基，它主要是与水相相互作用，如包括一个胞外或胞内环的残基。

天然化学连接：化学选择性反应包括将第一种未保护的氨基酸、肽或多肽与第二种未保护的氨基酸、肽或多肽连接，导致形成具有主链结构的酰胺键，该主链结构与天然存在的或通过重组表达产生的肽或多肽的主链没有区别。

噁唑烷化学连接：化学选择性反应包括将具有一个醛或酮部分的第一种未保护的氨基酸、肽或多肽与具有 1-氨基，2-ol 部分的第二种未保护的氨基酸、肽或多肽连接，导致在连接位点形成恶唑烷部分。由成恶唑烷化学连接所产生的肽或多肽产物的主链结构与天然存在的或通过重组表达产生的肽或多肽的主链结构没有区别。

肟化学连接：化学选择性反应包括将具有氨基-羟基部分的第一

种未保护的氨基酸、肽或多肽与具有醛和酮部分的第二种未保护的氨基酸、肽或多肽连接，导致在连接位点形成一个肟部分。由肟化学连接所产生的肽或多肽产物的主链结构与天然存在的或通过重组表达产生的肽或多肽的主链没有区别。

肽：一种具有至少两个单体的聚合物，其中，所述单体是氨基酸，有时指氨基酸残基，它们是通过酰胺键连接在一起的。可以具有全天然的酰胺主链或非天然的主链或其混合。可以通过已知的合成方法制备，包括溶液合成，分步固相合成，分段缩合，和汇聚缩合。可以在细胞中或者在无细胞系统中由核糖体合成，或者通过蛋白水解较大的多肽片段形成。可以通过组合的化学和核糖体方法合成。

多肽：一种包括三个或三个以上单体的聚合物，其中，所述单体是氨基酸，有时指氨基酸残基，它们是通过酰胺键连接在一起的。还指肽或蛋白。可以包括天然的酰胺键或任何已知非天然的肽主链或其混合。其大小在 3-1000 个氨基酸残基范围内，优选 3-100 个氨基酸残基，更优选 10-60 个氨基酸残基，最优选 20-50 个氨基酸残基。所述多肽的片段或全部可以用已知的合成方法制备，包括溶液合成，分步固相合成，分段缩合，和汇聚缩合。所述多肽的片段或全部还可以在细胞中或在无细胞翻译系统中通过核糖体制备，或者通过蛋白水解较大的蛋白片段产生。可以通过组合的化学和核糖体方法合成。

噻唑烷化学连接：化学选择性反应包括将具有醛或酮部分的第一种未保护的氨基酸、肽或多肽与具有氨基，2-巯基部分的第二种未保护的氨基酸、肽或多肽连接，导致在连接部位形成噻唑烷部分。由噻唑烷化学连接产生的肽或多肽产物的主链结构与天然存在的或通过重组表达产生的肽或多肽的主链结构没有区别。

硫酯化学连接：化学选择性反应包括将第一种未保护的氨基酸、肽或多肽与第二种未保护的氨基酸、肽或多肽连接，导致在连接部位形成硫酯键。由硫酯键化学连接产生的肽或多肽产物的主链结构与天然存在的或通过重组表达产生的肽或多肽的主链结构没有区别。

硫醚化学连接：化学选择性反应包括将第一种未保护的氨基酸、肽或多肽与第二种未保护的氨基酸、肽或多肽连接，导致在连接部位形成硫醚键。由硫醚键化学连接产生的肽或多肽产物的主链结构与天然存在的或通过重组表达产生的肽或多肽的主链结构没有区别。

具体实施方案的说明

本发明涉及被结合到脂基质中的膜多肽或膜多肽域的脂基质协助的化学连接和合成的方法和组合物。本发明还涉及用本发明方法生产的组合物，以及采用该组合物的试验。

本发明的脂基质协助的化学连接和合成方法包括将一种连接标记化学选择性连接到包埋在脂基质中的膜多肽上。所述膜多肽和连接标记成分具有未保护的活性基团。该基团能选择性地反应，以便在连接部位（又被称为化学选择性连接部位）产生共价键。采用脂基质以便提供（1）保持膜多肽的预折叠状态的环境，和（2）定位化学选择性连接的活性基团。本发明的这一方面在方案 1 中说明。

方案 1

$$X_n-R^2+R^1-MP \rightarrow X_n-R^3-MP$$

“X_n”表示一个或多个氨基酸。“R^1”和“R^2”表示能够彼此进行化学选择性化学连接的未保护的活性基团。“MP”表示含有至少一个包埋在脂基质中的疏水性（非极性）部分的膜多肽。连接基团的短线“-”表示共价键。连接成分“X_n-R^2”和“R^1-MP”的未保护的活性基团之间的化学选择性相互作用产生了化学连接产物“X_n-R^3-MP”，其中“R^3”表示 X_n-R^2 和 R^1-MP 之间的化学选择性化学连接所产生的共价键。没有表示出反应的中间产物和副产物。生产了一种全合成的产物，其中，所有连接成分是通过化学合成而人工制备的，即无核糖体合成。生产半合成的产物，其中，至少一部分连接成分是通过生物合成系统制备的，即，在细胞或无细胞翻译系统中核糖体合成，而另一部分是通过化学合成制备的。

根据本发明的方法，可以采用多种化学方法。可用于连接未保护的肽片段的任何化学选择性反应化学方法是能够进行脂基质协助的化学选择化学连接的。这些化学方法包括，但不限于天然化学连接（Dawson 等，科学（1994）266: 776-779; Kent 等，WO96/34878），延伸的通用化学连接（Kent 等，WO98/28434），成肟化学连接（Rose 等，美国化学协会杂志（1994）116: 30-33），成硫酯连接（Schnolzer 等，科学（1992）256: 221-225），成硫醚连接（Englebretsen 等，Tet.Letts.（1995）36（48）: 8871-8874），成腙连接（Gaertner 等，Bioconj.Chem.（1994）5（4）: 333-338），成噻唑烷连接和成

噁唑烷连接（Zhang 等，美国科学院院报（1998）95（16）：9184-9189；Tam 等，WO95/00846）。

选择特定化学连接方法的反应条件，以便保持所需要的脂基质包埋的膜多肽和连接标记成分之间的相互作用。例如，可以改变 pH 和温度、连接标记的水溶性、脂与多肽和标记的比例、含水量和脂基质的组成，以便优化连接。添加或排除能增加脂基质和/或膜多肽的溶解度到不同程度的试剂还可用来控制所需连接反应的专一性和速度，即通过操纵脂基质和/或膜多肽的溶解度控制活性基团的暴露和呈递。通过与一种或多种内部和/或外部对照比较分析所希望的化学选择性反应产物可以方便地确定反应条件。

对于脂基质协助的天然化学连接来说，所说膜多肽和连接标记包括一种相容的天然化学连接成分配对，其中一种成分提供具有一个未保护的氨基的半胱氨酸，另一种成分提供具有一个未保护的α-硫酯基的氨基酸。所说基团能够发生化学反应，以便在连接部位产生天然肽键。

用于脂基质协助的成肟化学连接的膜多肽和连接标记包括一种相容成肟化学连接成分配对，其中一种成分提供一个具有醛或酮部分的未保护的氨基酸，另一种成分提供具有一个氨基-羟基部分的未保护氨基酸。这些基团能够进行化学反应，以便在连接部位产生具有肟部分的连接产物。

对于脂基质协助的成硫酯化学连接来说，所述膜多肽和连接标记包括一种相容的成硫酯化学连接成分配对，其中一种成分提供一个具有卤乙酰部分的未保护的氨基酸，另一种成分提供具有一个α-硫代羧酸部分未保护氨基酸。这些基团能够进行化学反应，以便在连接部位产生具有硫酯部分的连接产物。

为了进行脂基质协助的成硫醚化学连接，所述膜多肽和连接标记包括一种相容的成硫醚化学连接成分配对，其中一种成分提供一个具有卤代乙酰部分的未保护的氨基酸，另一种成分提供具有一个烷基巯基部分的未保护氨基酸。这些基团能够进行化学反应，以便在连接部位产生具有硫醚部分的连接产物。

为了进行脂基质协助的成腙化学连接，所述膜多肽和连接标记包括一种相容的成腙化学连接成分配对，其中一种成分提供一个具有醛

或酮部分的未保护的氨基酸，另一种成分提供具有肼部分的未保护氨基酸。这些基团能够进行化学反应，以便在连接部位产生具有腙部分的连接产物。

为了进行脂基质协助的成噻唑烷化学连接，所述膜多肽和连接标记包括一种相容的成噻唑烷化学连接成分配对，其中一种成分提供一个具有 1-氨基，2-巯基部分的未保护的氨基酸，另一种成分提供具有醛或酮部分的未保护氨基酸。这些基团能够进行化学反应，以便在连接部位产生具有噻唑烷部分的连接产物。

为了进行脂基质协助的成恶唑烷化学连接，所述膜多肽和连接标记包括一种相容的成恶唑烷化学连接成分配对，其中一种成分提供一个具有 1-氨基，2-羟基部分的未保护的氨基酸，另一种成分具有醛或酮部分的未保护氨基酸的另一种成分配对。这些基团能够进行化学反应，以便在连接部位产生具有恶唑烷部分的连接产物。

容易理解的是，为了适应化学选择性化学连接，以便产生在连接部位具有共价键的脂基质包埋的多肽产物的连接成分的任意组合都被视为本发明的部分，其前提是，至少一种反应连接成分包括一种包埋在脂基质中的膜多肽。具体地讲，所说膜多肽连接成分必须包括至少一个疏水区，由它将该多肽锚定在脂基质上。锚定区的一个例子是包括疏水性α螺旋和/或β-折叠桶跨膜成分的细胞膜锚。所述膜多肽还可以包括天然酰胺键或任何已知的非天然肽主链或其混合，以及与天然氨基酸序列的其他化学区别，如与将锚多肽保持在脂基质中相容的含有生色团或其他可检测部分的非天然氨基酸。其中包括具有天然或非天然氨基酸序列的一次通过和多次通过的跨膜多肽或其结构域，所述序列包埋在脂基质中并与脂基质的疏水性部分相互作用，并且可以包括一种或多种伸入由脂基质-水界面形成的水相环境中的膜外氨基酸。膜外氨基酸的例子包括构成连接两个膜锚的胞内或胞外环的组成部分的氨基酸，N-或 C-末端序列，有利于多肽插入脂膜中的必需序列，和/或某些感兴趣的其他接头或加帽序列。

所述膜多肽连接成分优选包括一种能插入并锚定在脂膜中的氨基酸序列。例如，所述膜多肽通常包括一种能够形成跨膜结构的氨基酸序列，如两亲性α-螺旋，其组构使得非极性残基与膜内部接触，而带电荷的或极性残基与水相接触。这种类型的膜多肽连接成分具有

足够的长度跨过脂双层，因此，其长度通常大于 10-20 个氨基酸。其大小可以达到天然存在的膜多肽的完整长度，并可以包括除所述完整长度多肽之外的一个或多个氨基酸，其前提是所述膜多肽能够结合到所述脂基质中。

结合所述膜多肽成分的脂基质包括能形成亲胶相的天然和合成脂类（即，在与水相互作用时形成有序的膜形结构，如液晶相）。其中包括极性脂类，如磷脂、溶血磷脂、鞘脂、和糖脂，它们能够形成膜状双层和其他脂类的聚合体。优选的脂基质能形成稳定的膜单层或双层及其聚合相。特别感兴趣的是能形成稳定的立体相的脂类（立体脂相或 CLP 基质）（Luzatti 等，自然（1968）218: 1031-1034，和 Lindblom 等，生物化学和生物物理学学报（1989）988: 221-256）。立体相是这样一种相，其中，脂类聚合体形成一种三维点格。所述脂类聚合体单元可以具有不同的形状，如球形、棒状或片层状。相反，层状液晶相具有一维周期性，其中，无限表达的片层单元有规则的堆积，而六角形液晶相具有二维周期性，由无限长度的棒状聚合体堆积成六角形点格。因此，立体相在光学上是各向相同的，而片层状和六角形相在光学上是各向异性的。

构成立体脂相的脂类包括多个脂双层，这些脂双层是由在特定比例的脂类：溶剂的特定脂类和极性溶剂之间形成的多个水通道突出产生的（Luzatti 等，同上；和 Lindblom 等，同上）。CLP 里面的脂扩散速度与在片层状脂相中的扩散速度相当，而在水区室中的扩散速度大约比在大量水中的扩散速度低 3 倍（Lindblom 等，同上）。另外，膜多肽在结合到立体相脂类中之后能表现出完全的活性（Portmann 等，物理化学杂志（1991）95: 8437-8440）。由于 CLPs 在光学上是各向同性的，可将其用于敏感的光谱测定试验。因此，控制膜多肽结合到脂基质中不仅能提供一种预折叠的膜多肽，用作化学选择性化学连接的模板，所述脂基质本身可被用于促进需要一种脂介导的折叠膜多肽的试验。

所述连接标记成分包括一个或多个氨基酸，并且优选是一种肽或多肽。所述连接标记的至少一个氨基酸具有一个活性 基团，该基团能够与由所述脂基质包埋的膜多肽提供的一种相容的活性基团反应并形成共价键。所述连接标记还可以包括一种膜多肽成分，例如，当

需要对多次通过的跨膜多肽进行模式连接和合成时就是如此。所述连接标记还可以包括天然的和/或非天然的肽主链结构或非天然的氨基酸残基或与天然肽序列的其他化学区别，如含有生色团或与连接标记和靶脂基质包埋的膜多肽的化学连接相容的其他可检测部分的非天然氨基酸。

本发明的脂基质、脂基质包埋的膜多肽、和/或连接标记还可以具有一种或多种化学标记。该化学标记可用于多种目的，如作为合成方法的一部分、纯化、锚定在一种支持基质上、和检测等。特别有意义的是由含有一种生色团的非天然氨基酸所提供的化学标记。其中，包括作为受体-供体共振能量传递对的受体和/或供体部分的生色团。特别感兴趣的是合成和纯化控制，以及可检测的标记，和用于将脂基质或脂基质包埋的膜多肽连接到支持基质上以便进行筛选和诊断试验等的选择性的化学部分。本文所披露的各种标记适用于这一目的。可以理解的是，在某些场合下，将一种特定的化学标记用于一种以上的目的是有利的，例如，同时作为连接到支持基质上的手段并作为一种可检测的标记。化学标记的例子包括金属结合标记(例如，his-标记），糖/底物结合标记（例如，纤维素和壳多糖结合域），抗体和抗体片段标记，同位素标记，诸如生物素的半抗原和各种含有生色团的非天然氨基酸。化学标记还可以包括可裂解的接头。

利用脂基质实施包埋在脂基质中的膜多肽的化学连接提供了前所未有的预折叠的膜多肽的位点专一性连接，可检测标记和模式合成。脂基质不仅提供了插入、折叠和化学连接位点呈递的合适环境，将膜多肽成分包埋在脂基质中还将脂基质本身用作新的成分，以便控制所述化学连接反应的专一性。例如，可以选择所述膜多肽上的连接位点，以便它被包埋在该基质的脂膜双层内。在这种情况下，疏水性连接标记的化学连接优选与亲水性连接标记比较。或者，连接位点可以在膜外，以便亲水性连接标记的连接是优选的。通过利用脂基质成分与连接位点定位的组合可以实现的另一种变化是构建一种脂膜系统，该系统被设计成将两个水相彼此分开，如具有封闭的膜小泡（脂质体），而选择一个连接位点暴露在所述膜的一侧。所述连接位点的暴露还可以进一步调整，以便通过添加或排除能将脂基质的溶解度提高到不同程度的试剂控制连接反应的速度和/或程度。另外，可以通

过调节诸如 pH 和温度、以及连接肽的水溶性、脂基质的含水量和组成的反应条件控制所述连接位点的暴露和活性程度。因此，根据连接位点相对包埋该连接位点的脂膜的位置和方向，可以控制所述连接标记的溶解度、所述脂基质的完整性和组成、以及该连接反应的专一性和速度。

本发明还包括一种在脂基质包埋的膜多肽上形成化学选择性连接位点的方法，在用一种能在选择性地裂解直接在靠近一个氨基酸处裂解所述多肽时能提供一种化学连接的活性基团。本发明的这一方面包括让包埋在脂基质中的膜多肽与一种能在特定位点上选择性地裂解该多肽的试剂接触，以便产生一种包括一个具有未保护的氨基的 N-末端残基或具有未保护的羧基的 C-末端残基的多肽。

本发明的这一方面在方案 2 中说明。

方案 2

裂解试剂+Y_n-R^1-MP → R^1-MP

“Y_n”表示包括一个诸如化学或蛋白酶裂解位点的裂解位点的氨基酸序列，该位点使得能够直接靠近提供 R^1 活性基团的氨基酸残基裂解，以便随后进行化学选择性化学连接。

所述裂解位点可以是多肽天然所具有的，或者对所述多肽进行工程改造以便含有一个或多个这样的位点。根据其预期的最终用途，如果需要的话，在所述连接标记上也可以存在一个或多个裂解位点。因此，天然存在的或工程产生的裂解位点可以通过位点专一性蛋白水解形成游离的未保护的 N-和/或 C- 末端残基。因此，以这种方式产生的连接成分含有一个具有未保护的活性基团的残基，能够实现本发明的脂基质的协助的化学连接方法。从方案 2 可以理解，一个或多个裂解位点可以任何组合形式与本发明的目标连接成分结合，其前提是，在裂解以后，裂解产物适于进行脂基质协助的化学选择性化学连接。

所述裂解位点可以是蛋白酶或化学裂解位点，选择一种裂解位点和/或在其合成期间整合到所述多肽上，以便在接触到互补的裂解试剂时，在该位点上对所述多肽进行选择性地裂解，以便产生具有游离的未保护的氨基酸残基的多肽，该残基具有化学选择性活性基团，该基团可以与由所述连接标记所提供的互补的活性基团连接。举例来说，当采用天然化学连接化学方法，并且将一个内肽酶裂解位点序列

整合在接头或加帽序列和 Cys-多肽之间时，该裂解位点使得能够除去所述接头或加帽序列，并产生所需要的未保护的 Cys-多肽。或者，所述裂解位点可以定位于靠近一个能与由正确定位的相邻残基提供的互补的活性基团自动连接的残基。

某些常见的蛋白酶裂解位点是：凝血酶（KeyValProArg/GlySer）；因子 Xa 蛋白酶（IleGluGlyArg）；肠激酶（AspAspAspAspLys）；rTEV（GluAsnLeuTyrPheGln/Gly），它是源于烟草蚀刻病毒的内肽酶；和 3C 人鼻病毒蛋白酶（Pharmacia 生物技术）（LeuGluValLeuPheGln/GlyPro）。

还了解各种化学裂解位点，包括，但不限于 intein 蛋白-剪接因子（Dalgaard 等，核酸研究（1997）25（6）：4626-4638）和溴化氰裂解位点。可以构建不能剪接的 intein，而是裂解每一个剪接结合点上的肽键（Xu 等，EMBO 杂志（1996）15（19）：5146-5153；和 Chong 等，生物学化学杂志（1996）271：22159-22168）。例如，源于酿酒酵母 VMA1 基因的 intein 序列可进行修饰，使它能够在存在诸如 1，4-二硫苏糖醇（DTT）、2-巯基乙醇或半胱氨酸的硫醇的条件下，在低温下，在其 N-末端进行自身裂解反应（Chon 等，基因（1997）192：271-281）。

溴化氰（CnBr）裂解多肽序列的内部甲硫氨酸（Met）残基。用溴化氰裂解能得到两个或更多的片段，含有原始多肽序列内部的 C-末端残基的片段具有激活的α-羧基功能，例如，溴化氰裂解内部 Met 残基，得到一个具有 C-末端高丝氨酸的内酯片段。对于某些肽来说，所述片段可以在折叠条件下重新结合，以便得到折叠的多肽样结构，它能促进所述片段之间的反应，以便得到合理产率的（通常为 40-60%）的全长的多肽链（现在含有高丝氨酸残基，其中，Met 残基被溴化氰所裂解）（Woods 等，生物学化学杂志（1996）271：32008-32015）。

一般，用于产生能够进行需要的化学连接化学方法的连接位点的裂解位点通常要选择独一无二，就是说它在靶多肽上仅出现一次。不过，当靶多肽上存在一个或多个能被同一种裂解试剂识别并裂解的裂解位点时，如果需要可以合成期间永久性地或暂时地阻止所述裂解试剂接触一个或多个这样的位点，和/或除去该位点。具体地讲，可以控制所述裂解位点的定位通过利用其在脂基质中的定位避免接触所

述裂解试剂，如上文结合化学选择性连接位点所述。可以在合成膜多肽期间通过取代、插入或缺失一个或多个所述裂解试剂识别序列的残基和/或整合一个或多个能达到相同结果的非天然氨基酸除去裂解位点。还可以通过能结合所述膜多肽的试剂封阻裂解位点，包括能结合所述多肽的配体，并消除所述裂解位点的全部或部分可接触性。不过，本领域技术人员可以理解的是，一个裂解位点被封阻或消除的方法要加以选择，以便在裂解所述膜多肽时能够通过化学选择性化学连接连接到感兴趣的目标连接成分上。

当所述膜多肽用包括促进或改善插入脂膜、插入所选择的特定膜、检测、和/或纯化的效率所必需的信息的加帽、信号或其他类型的前导序列进行修饰时，包括一个用来产生化学选择性连接位点的裂解位点是特别有利的。例如，在一种膜多肽包埋到脂基质中之后裂解该多肽能够选择正确折叠的多肽，以及除去启动正确的插入和折叠所必需的，但一旦疏水性锚定序列包埋到脂基质中之后就不再需要了的序列。所述裂解位点还可用于检测和/或纯化适当整合的并且折叠的多肽。如当选择一种膜多肽使其为了外膜接触而设计的裂解位点时，所述多肽在脂膜中具有合适的构型，并因此所述裂解位点的外膜接触有可能对裂解在水性条件下采用水溶性裂解试剂，如水溶性内蛋白酶时具有最大的敏感性。当包括作为融合多肽的一部分的纯化工具或标记时，还可以包括用于产生化学选择性连接位点的裂解位点，以便方便合成后的纯化。因此，为了产生化学选择性连接位点而设计的裂解位点的存在还可用于多种目的。

适用于方案 1-2 所示化学连接方法的膜多肽和连接标记成分对可以从头设计或源于任何已知的膜蛋白系统，包括源于病毒、真核生物、原核生物的系统和古生菌系统，包括嗜冷、嗜温和嗜热生物，特别是两种主要类型的膜蛋白，即将α螺旋插入脂双层中的蛋白和通过β折叠桶链形成孔的蛋白。其例子包括膜结合受体，转运蛋白（例如，离子和其他通道，如钾、钠、质子、氯通道，孔；活性转运物，如 TEXANS 药物转运物，小型-TEXANS 和 ABC 药物转运物和反向转运物，如 H+/葡萄糖反向转运物）；酶（例如白三烯 C4 合成酶）；和免疫原（例如肿瘤转移相关性抗原）。特别感兴趣的是酶联受体，纤连蛋白样受体，7 次跨膜的受体，和离子通道受体，包括酪氨酸和丝氨酸-苏氨酸

激酶，以及酶联受体的鸟苷酸环化酶家族。受体的酪氨酸激酶家族的例子包括表皮生长因子，生长素，血小板衍生的生长因子，神经生长因子。受体的丝氨酸激酶家族的例子包括生长因子β家族。鸟苷酸环化酶家族的例子包括能在心钠素因子的作用下产生环状 GMP（cGMP）的受体。7 次跨膜的受体的例子包括能结合儿茶酚胺、组胺、前列腺素等的膜蛋白，和视蛋白，加压素，趋化因子和 melanocortin 受体。离子通道受体的例子以配体和电压控制的通道膜蛋白受体为代表，并且包括乙酰胆碱活化的钠通道，甘氨酸和γ-氨基异丁酸活化的氯通道，以及 5-羟色胺和谷氨酰胺活化的钙通道，以及环状核苷酸控制的通道的家族（cAMP 和 cGMP）和调节钙储存的肌醇 1，4，5-三磷酸（IP3）和环状 ADP-核糖受体的家族。本领域技术人员可以理解的是，可以在各种基因组和蛋白相关的数据库中鉴定用于上述和其他膜多肽的核酸和/或氨基酸序列。可公开获得的数据库的例子包括 GenBank（Benson 等，核酸研究（1998）26（1）：1-7；美国国家生物技术信息中心，国家药品文库，国家卫生研究所，Bethesda，MD，美国），TIGR 数据库（基因组研究所，Rockville，MD，美国），蛋白数据库（Brookhaven 国家实验室，美国），以及 ExPASy 和瑞士-蛋白数据库（瑞士生物信息所，日内瓦，瑞士）。

在选择膜多肽和结合标记成分对及其相应的连接位点时，可以通过分析目标多肽结构的功能确定互补的化学选择性配对，使用一种或多种常规方法，如本领域已知的并且在本文中所披露的生物学、热动力学、计算和结构方法。所述信息可用于选择存在于所述天然结构上的一个或多个化学选择性连接位点和/或通过工程方法插入所述分子的合成形式中。具体地讲，可以使用标准技术获得结构和工程信息，包括与其他具有相似氨基酸序列和结构域的多肽进行同源性比较，优选其至少某些结构和工程信息已知的其他多肽。有关已知三维结构的膜多肽的例子参见 Preusch 等，自然结构生物学（1998）5：12-14。

所述选择方法要考虑连接位点的单一性、连接成分的稳定性、连接反应的专一性和完整性、以及脂基质包埋的膜多肽连接产物的稳定性和功能。具体地讲，连接成分对优选被设计成使得连接反应的选择性和连接产物在脂基质中的稳定性最大。其中包括含有一个或多个裂解位点的接头或加帽方案的设计，用于在所述基质中结合并产生连接

成分的一个化学选择性连接位点。例如，可将能揭示有关感兴趣的靶多肽的功能和/或结构信息的诱变、热动力学、计算、模拟和/或任何技术用于该方法。这些技术包括免疫学和层析分析，荧光共振能量转移（FRET）、圆二色性（CD）、核磁共振（NRM）、电子和 x-射线晶体学、电子显微学、Raman 激光光谱学等。这些方法常用于设计和鉴定膜多肽系统（例如，参见 Newman，R.，分子生物学方法（1996）56: 365-387; Moller 等，结构生物学杂志（1997）119（2）: 149-157; Fleming 等，分子生物学杂志（1997）272: 266-27; Haltia 等，生物化学（1994）33（32）: 9731-9740.5; Swords 等，生物化学杂志（1993）289（1）: 215-219; Wallin 等，蛋白质科学（1997）6（4）: 808-815; Goormaghtigh 等，哑细胞生物化学（1994）23: 405-450; Muller 等，生物物理学杂志（1996）70（4）: 1796-1802; Sami 等，生物化学和生物物理学学报（1992）1105（1）: 148-154; Wang 等，分子生物学杂志（1994）237（1）: 1-4; Watts 等，分子膜生物学（1995）12（3）: 233-246; Bloom，M.，生物物理学杂志（1996）69（5）: 1631-1632; 和 Gutierrez-Merino 等，生物化学协会交流（1994）22（3）: 784-788）。

在没有直接的结构信息时，可以通过本领域已知的各种技术鉴定并沿二维方向模拟所述化学选择性化学连接成分。例如，可以用二级结构预测算法在一级结构上鉴定两亲性α螺旋片段（跨过脂膜双层，因此大于大约 15-20 个残基）。根据一个超家族成员之间的序列相似性选择大于 15-20 个残基的片段，然后鉴定一个或多个连接位点以便与可能是或者不是原始的二维模型一部分的连接标记相容（例如，参见 Reithmeier，R.A.，当代结构生物学观点（1995）5（4）: 491-500; Du 等，蛋白质工程（1994）7（10）: 1221-1229）。优选的技术是同源模拟和数据库排比，采用一种或多种适用于膜多肽模拟和/或预测的计算机程序。例如，可将程序“TmPred”和“TopPredII”用于预测跨膜区及其方向，该程序基于存在于瑞士蛋白数据库中的跨膜蛋白数据库的统计分析（Gunnar von HeiJne，分子生物学杂志（1992）225: 487-494; Hoppe-Seyler，生物化学（1993）347: 166; 和 Claros 等，计算机应用生物科学（1994）10（6）: 685-686）。可以使用的其他程序包括: “DAS”（Cserzo 等，蛋白质工程（1997）

10（6）：673-676）；“PHDhtm”（Rost 等，蛋白质科学（1995）4：521-533）；和“SOSUI”（Mitaku 实验室，生物技术系，东京农业和技术大学）。

所述连接成分及其互补的配偶体还可以通过在原子水平上沿三维方向模拟进行选择，以便模拟连接产物和/或连接前反应成分。首先，建立待模拟的多肽和具有已知结构的多肽之间的序列排比。其次，根据该排比形成一个主链结构。通常它是具有最高同源性结构的主链，不过也可以使用杂合主链。第三，然后将侧链放入该模型上。可以使用诸如 Monte Carlo 方法、树状检索算法之类的各种技术用于模拟具有多种可能的构型的 rotomer 侧链。如果待模拟的多肽相对已知结构而言具有插入或缺失，重新模拟或从头模拟环。在结构上具有相似的锚定点的环的数据库检索通常被用于建立这些环，不过也可以采用从头模拟技术的能量。能量的最小化，有时与分子动力学组合通常被用于优化最终结构。然后评估该模型的质量，包括目测检查，以便确定该模型的结构特征与已知的该分子的功能特征不矛盾。

所述三维模型优选适于模拟膜多肽的计算机程序产生（Vriend，G.，“GPCRs 的分子模拟”，参见 7TM（1995）5 卷）。适用于该目的的计算机程序的例子包括：“What If”（Vriend，G.，分子图象杂志（1990）8：52-56；由 EMBL 提供，Meyerhofstrassel，69117 海德堡，德国）和“Swiss-Model”（Peitsch MC 和 Herzyk P（1996）“G-蛋白结合受体的分子模拟”，见 G 蛋白连接受体。商业开发的新机遇，6：6.29-6.37，N Mulford 和 LM Savage 著，IBC 生物药物文库系列；Peitsch 等，“大规模比较蛋白模拟”，参见 Proteome 研究：功能基因组的新前言，177-186 页，Wilkins MR，Williams KL，Apple RO，Hochstrasser DF 著，Springer，1997）。

影响脂基质协助的化学选择连接的因素，以及相容的连接位点的选择通常与已知的可溶蛋白相似（Woods 等，生物化学杂志（1996）271：32008-32015）。首先，二级结构在大多数α螺旋和β折叠桶上的连接位点上不是很重要的二级结构可用于连接。在大多数转弯处的连接位点也可以，不过相应于β回转的极限的连接位点不是十分理想。其次，连接位点优选位于折叠多肽的表面，与在需要在脂环境中稳定所述多肽的折叠形式所需要的包埋或位于折叠多肽内部的情况

相反。

因此，在选择化学选择性连接成分及其互补的配偶体时，还要考虑暴露和/或将带电荷的或高度极性的不带电荷的化合物转移到膜的油样烃内部所需要的热动力学代价。例如，采用一个连接位点，如为了通过位点专一性裂解脂基质包埋的膜多肽产生而设计的连接位点，不仅是为了连接的选择性而设计的，而且是为了使得前体和最终的连接产物在脂基质中足够稳定而设计的。在本发明的该方面，跨膜片段的大多数氨基酸侧链必须是非极性的（例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸）。因此，选择具有天然存在的连接位点残基的残基位置，或者通过工程方法对其进行定向的连接位点残基取代或插入，以便保持有利的疏水性相互作用，如存在于α螺旋膜锚之间的疏水性包装相互作用。另外，选择跨膜片段的多肽的极性很高的 CONH 基团（肽键），参加到氢键（H 键）中，以便降低将其转移到烃内部所需要的代价（例如，参见 Roseman，A.，分子生物学杂志（1988）201：621-625）。因此，在选择相容的连接位点时，通过维持α螺旋这种氢键结合是最容易实现的，为此，所有的肽键都是内部的氢键结合的。还可以通过维持孔蛋白型跨膜蛋白的β片层而实现，其前提是，β链形成诸如β折叠桶的封闭结构。由于已知的三维结构的所有膜多肽都符合这些原理，可以对所述化学选择性化学连接位点进行选择和/或设计，以便在需要折叠的跨膜多肽时能符合折叠原理。在某些情况下，可以用适当设置的带正电荷的赖氨酸残基来控制总体膜取向（Whitley 等，自然结构生物学（1994）1（12）：858-862）。

还可以通过连接位点扫描鉴定相容的连接成分配偶体及其化学选择性化学连接位点。该方法包括一种导入氨基酸残基的遗传学方法，能够通过位点专一性、嵌套和/或随机诱变进行特殊的连接化学方法，以便连接到细胞或无细胞系统中的 DNA 上，该 DNA 编码一种感兴趣的目标膜多肽或其结构域，然后表达突变了的 DNA，并筛选含有功能性的、连接相容的取代或插入的膜多肽。或者，可以通过化学方法合成突变的膜多肽，或者使用组合的遗传学和化学合成。无论采用重组 DNA 和/或化学合成，要进行连接位点扫描的多肽优选包括至少一个能插入脂膜的膜锚定片段，如跨膜片段或跨膜多肽域。然后合成

包括一个或多个功能性突变的膜多肽和连接标记，以便产生在方案1-2中说明的一种或多种化学选择性连接相容的配偶体。然后对连接成分进行合适的感兴趣的连接化学处理，并筛选在脂基质中正确插入和折叠的连接的膜多肽。

所述连接位点扫描方法不仅能快速并且高流通量的筛选大量的相容的连接成分，还可以快速筛选新型的和多种多样的重组的合成的、和半合成的由膜多肽和连接标记成分配偶体的新组合所形成的分子。例如，所述膜多肽和连接标记成分可以从代表化学结构多样性的混合物或文库中获得，如不同的氨基酸序列和不同的非天然侧链取代基。一个文库可以含有几种肽或多肽，这些肽或多肽在特定位置上含有不同的化学实体，和/或具有随机差别的实体。所述成分可以重组表达，源于噬菌体示范文库，源于化学合成，或其片段和组合。模式交换膜多肽和连接成分的文库还可以利用披露于 Kent 等的 WO99/11655 中的模式方法构建。在本发明的该实施方案中，脂基质包埋的膜多肽是通过两种或两种以上肽片段的交换化学选择性化学连接而产生的，所述片段含有一个或多个源于同一种类型或家族的不同亲本膜多肽的功能性蛋白组件，以便产生一种或多种脂基质包埋的杂合膜多肽。这样可以导入来自膜多肽的同一类型或家族的不同成员的结构域，以便产生具有高度多样性的文库，包括连接位点信息和结构-功能信息。可以理解的是，通过连接位点扫描进行的一种或多种连接成分配偶体的筛选和选择因而特别适于鉴定相容的的和多样性的在上面的方案 1-2 中所述反应成分的组合。

为了合成所述连接成分，可以采用本领域已知多种方法的任一种。其中包括化学和生物学方法或其组合。例如，可以在一种宿主细胞中表达编码连接成分的一部分或全部的核酸序列，并使用标准技术和/或本文所披露的技术回收。该方法在一种膜多肽仅违抗化学合成时特别有用。还可以用化学产生肽或多肽，以便完全或部分合成所需要的连接成分。

为了在细胞中合成，可以用标准技术制备多肽。可以采用能天然表达一种目标多肽的细胞。还可以用编码感兴趣的多肽的 DNA 转染和转化宿主细胞。例如，可以用基于聚合酶链式反应（PCR）的策略克隆编码感兴趣的目标膜多肽的全部或部分的目标 DNA 序列（例如，参

见“PCR 克隆方法：从分子克隆到遗传工程”，B.A.White 著，Humana 出版社，分子生物学方法，67 卷，1997）。PCR 可用于通过 cDNA 分析的视差和扣除方法进行克隆，实施并优化长距离的 PCR，克隆未知的相邻 DNA，并用 PCR 产生并筛选文库。PCR 还可用于将位点专一性和随机突变导入编码感兴趣的目标膜多肽和/或连接标记的 DNA。该方法特别适用于工程产生半胱氨酸连接位点。

为了一般的克隆目的，可以设计互补的和/或简并的相当于目标膜多肽的保守基序的寡核苷酸，用作 cDNA 和/或 PCR 反应的引物。引物设计的模板可以从多种来源中的任一种获得。例如，包括表达序列标记（ESTs）的序列可以从各种数据库获得，如 GenBank、TIGR、ExPASy 和瑞士蛋白数据库。同源性比较用便于获得的程序的多种算法中的任一种完成，这些程序采用搜索引擎根据各种算法在序列发现最佳的引物。可以使用多种商业序列分析包中的任一种，如 Lasergene，GeneWorks、DNASIS、Gene JOCKEYII、基因构建试剂盒，MacPlasmap、Plasmid ARTIST、Protein Predictor、DNA/RNA Builder、和 Quanta（例如，参见“序列资料分析指南”，Simon R.Swindell 著，Humana 出版社，1996）。所述信息可用于设计简并引物，嵌套/多重引物、位点专一性诱变、限制酶位点等。还可以根据同源性信息设计引物，并将计算机程序用于引物设计。其例子包括用于自动引物筛选的“Primer Premier4.0”（CloneTech 公司）。完整长度的克隆，通过对扩增片段进行放射性或非放射性标记和筛选文库而进行。

或者，由一种来源克隆的膜多肽 DNA 可用于获得来自另一种来源的相应的目标膜多肽 DNA 序列。具体地讲，可以用由已知能或预期能表达目标膜多肽的细胞制备的 DNA 和/或 RNA 构建的基因组和/或 cDNA 文库可用于转化缺乏所述推测的基因的真核或原核宿主细胞。将编码所述多肽的重组质粒转入缺陷型宿主细胞预计能得到相当于感兴趣的多肽的互补产物的细胞。在某些情况下，可以选择表达与目标多肽相关的特殊表型的宿主细胞，并因此可以通过这一特征进行选择。有关可以使用的克隆方法的综述可以参见 Sambrook 等，1989，分子克隆，实验室手册。冷泉港出版社，纽约；和 Ausubel 等，1989，当代分子生物学方法，Green Publishing Associates 和 Wiley Interscience，纽约。

为了在宿主细胞中表达目标膜多肽，将编码该多肽的核苷酸序列或上文所述的组装组件的功能性等同物插入合适的表达载体，即含有所插入的编码的序列转录或翻译所必需的因子的载体。可以用标准技术鉴定含有所述编码序列并能表达目标基因产物的宿主细胞。例如，其中包括，但不限于 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交；有或没有“标记”基因功能；根据宿主细胞中 mRNA 转录物的表达评估转录水平；通过免疫测定或其生物学活性测定检测基因产物。

一旦鉴定了能产生目标多肽的克隆，可以对该克隆进行扩增并用于生产大量的这种多肽，所产生的多肽可以用本领域众所周知的技术纯化，这些技术包括，但不限于免疫亲和纯化、层析方法，包括高效液相层析或阳离子交换层析、基于所述多肽对一种特殊配体的亲和性的亲和层析、使用抗体等的免疫亲和纯化。例如，当在宿主细胞中表达时，可以按照标准技术进行膜多肽的提取和纯化（Ohlendieck，K.，分子生物学方法（1996）59：313-322；Ohlendieck，K.，分子生物学方法（1996）59：293-304；Josic D 等，酶学方法（1996）271：113-134）。因此，在本发明的另一种实施方案中，提供了被修饰成含有被设计用于实现化学连接的一个或多个工程改造的连接位点残基的核酸编码重组膜多肽。

用于表达和回收膜多肽的某些常用的宿主细胞系统包括大肠杆菌、爪蟾卵母细胞、杆状病毒、痘苗病毒和酵母，以及许多高等真核生物，包括培养物中的以及完整的动物和植物体内的转基因细胞（例如，参见 G.W.Gould，“膜蛋白表达细胞，用户指南”，Portland 出版社，1994，Rocky S.Tuan 著；和“重组基因表达方法”，Humana 出版社，1996）。例如，酵母表达系统是众所周知的，并可用于按照标准方法表达和回收感兴趣的目标膜多肽（例如，参见 Nekrasova 等，欧洲生物化学杂志（1996）238：28-37；酶学方法中的基因表达技术 185：（1990）；酵母的分子生物学和遗传工程；CRC 出版公司（1992）；Herescovics 等，FASEB（1993）7：540-550；Larriba，G.，酵母（1993）9：441-463；Buckholz，R.G.，当代生物技术观点（1993）4：538-542；Asenjo 等，“用于蛋白质筛选和合成的专家系统，生物处理 II 中的纯化方法先锋”，358-379 页，美国化学协会（1992）；Mackett，M.，“在酵母中表达膜蛋白，膜蛋白表达系统：用户指南”，177-218

页，Portland 出版社，（1995））。

当采用化学合成时，所述肽或多肽可以是线性的、环状的或分支的，并且通常包括，但不限于 20 种遗传编码的 L-氨基酸。在无细胞系统中的体外抑制诱变也可用于将非天然氨基酸引入所述多肽（例如，参见 Cload 等，化学和生物学（1996）3: 1033-1038; 和 Turcatti 等，生物学化学杂志（1996）271: 19991-19998）。所述化学合成方法还可以采用新的或不常见的化学组成部分，包括 D-氨基酸、其他非天然氨基酸、肟、腙、醚、噻唑烷、恶唑烷、酯或烷基主链，以便取代正常的酰胺键、N-或 C-烷基取代基、侧链修饰、和诸如二硫键和侧链酰胺或酯键的限制因素。例如，参见 Wilkins 等，当代生物技术观点（1998）9（4）：412-426，该文献对肽或多肽的化学合成的各种化学方法进行了综述。

例如，Kent 等在 WO96/34878 中披露了具有天然肽主链结构的多肽的天然化学连接和合成。还可以参见 Dawson 等（科学（1994）266: 77-779）和 Tam 等，美国科学院院报（1995）92: 12485-12489）。非天然肽主链还可以通过已知方法形成（例如，参见 Schnolzer 等，科学（1992）256: 221-225; Rose 等，美国化学协会杂志（1994）116: 30-34; 和 Liu 等，美国科学院院报（1994）91: 6584-6588; Englebretsen 等，Tet. Retts.（1995）36（48）: 8871-8874; Gaertner 等，Bioconj. Chem.（1994）5（4）：333-338; Zhang 等，美国科学院院报（1998）95（16）：9184-9189）和 Tam 等，WO95/00846）。正如由 Kent 等在 WO98/28434 中所披露的，还可以使用延伸的一般化学连接和合成。

另外，Canne 等在 WO98/56807 中披露了通过用固体支持物化学连接三个或三个以上未保护的肽片段合成组装的多肽的快速方法，其中，所述肽片段上的所有活性官能团都不需要临时掩饰，并具有提高了的产率而且便于控制中间产物。简单地讲，该方法包括从 N-末端到 C-末端方向对肽片段进行固相顺序化学连接，让具有 C-末端 α-硫酯的第一种固相结合的未保护的肽片段与含有一个 N-末端半胱氨酸和 C-末端硫代酸的另一种未保护的肽片段起反应。该技术还可以进行从 C-到 N-末端方向的固相天然化学连接。大的多肽还可以通过在水溶液中在固体支持物上对肽片段进行化学连结合成，而不必保护所述肽片

段上的基团。可以通过商业渠道获得多种肽合成仪，以便进行批量和连续流程的作业，以及用于在同一轮反应中合成多种肽，并且便于自动化。

还可以选择连接成分使其含有有利于和/或便于纯化和/或检测的部分。例如，可将结合在亲和基质上的纯化工具或标记用于该目的。很多这样的成分是已知的，并可以通过合成化学修饰后和/或在合成期间引入（例如，参见蛋白质纯化方法，1996，Doonan，S.著 Humana 出版公司；Schriemer 等，分析化学(1998)70(8):1569-1575; Evangelista 等，J.Chromatogr.B.Biomed.Sci.Appl.（1997）699（1-2):383-401; Kaufmann,M.,J.Chromatogr.B.Biomed.Sci.Appl.（1997）699(1-2)：347-369; Nilsson 等，蛋白质表达纯化(1997)11(1)：1-16; Lanfermeijer 等，蛋白质表达纯化(1998)12(1)：29-37）。例如，可以在合成期间整合具有能赋予可被用于纯化的特殊特性的化学部分的一个或多个非天然氨基酸。还可以通过重组 DNA 技术整合纯化序列。在某些场合下，有可能需要包括一个化学或蛋白酶裂解位点，以便根据所述标记和预期的最终用途除去该标记。还可将非天然氨基酸或化学修饰过的氨基酸用于方便检测，如结合生色团、半抗原或通过荧光光谱学、免疫测定、和/或 MALDI 质谱学检测的生物素化的部分。

可以通过多种方法中的任一种证实所需要的膜多肽和连接标记成分合成产物的均一性和结构相同性，这些方法包括免疫测定、荧光光谱学、凝胶电泳、使用反向或离子交换柱的 HPLC、氨基酸分析、质谱学、晶体学、和 NMR 等。可以通过化学方法（Edman 化学方法）或级联质谱学方法测序确定氨基酸修饰、插入和/或缺失的位置。

所述脂基质成分还可以包括能够形成亲胶相的天然和/或合成脂类（例如，在与水起作用时为液晶相），特别感兴趣的是极性脂类，如能够形成片层状双层和其他脂类聚合体的磷脂、溶血磷脂、鞘脂、糖脂，其中包括能够形成亲胶性结晶相的脂类混合物。所述脂类的例子包括，但不限于不溶性非膨胀的两亲物、不溶性膨胀的两亲物、和各种能够形成亲胶性液晶相的可溶性两亲物。不溶性非膨胀两亲物的例子包括甘油三酯、甘油二酯、长链质子化脂肪酸、长链正构醇、长链正构胺、长链醛、植醇、视黄醇、维生素 A、维生素 K、维生素 E、

胆甾醇、链甾醇、谷甾醇、维生素 D、非离子化磷脂酸、极短链酸的甾醇酯、蜡，其中，蜡的酸或醇部分的长度小于 4 个碳原子（例如，油酸甲酯）、和 ceremides. 不溶性膨胀的两亲物的例子包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、心磷脂、缩醛磷脂、离子化磷脂酸、脑苷脂、磷脂酰丝氨酸、甘油一酯、酸性皂、α-羟基脂肪酸、甘油一醚、从细胞膜或细胞器官中提取的磷脂和糖脂的混合物（植物糖脂和硫苷脂、硫脑苷脂、神经鞘氨醇（碱性形式）。能够形成亲胶液晶相的可溶性两亲物的例子包括长链脂肪酸的钠盐和钾盐、许多普通的阴离子型、阳离子型、和非离子型洗涤剂、溶血卵磷脂、棕榈酰和油酰辅酶 A、以及辅酶 A 的其他长链硫脂、神经节苷脂和神经鞘氨醇（酸性形式）。

优选的脂基质形成稳定的膜单层或双层及其聚合相。特别感兴趣的是能形成稳定的立体相的脂，又被称作立体脂相或 CLP 基质（Lindblom 等，同上）。能够形成立体脂相的脂的例子包括，但不限于下列脂类：磷脂酰胆碱（PC）；二棕榈酰磷脂酰胆碱（DPPC）；1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱（POPC）；二油酰磷脂酰胆碱（DOPC）；二亚麻油酰磷脂酰胆碱（DliPC）；溶血磷脂酰胆碱（LPC）；1，棕榈酰-LPC（PaLPC）；1-油酰-LPC（OILPC）；1，一油精（MO）；磷脂酰乙醇胺（PE）；质脂烯乙醇胺（PalE）；质脂烯乙醇胺的甘油缩醛；双十二烷基磷脂酰乙醇胺（DDPE）；二反油酰磷脂酰乙醇胺（DEPE）；二油酰磷脂酰乙醇胺（DOPE）；二亚麻油酰磷脂酰乙醇胺（DliPE）；二油酰磷脂酰-N--一甲基乙醇胺（DOPE-Me）；二磷脂酰甘油（DPG）；磷脂酰甘油（PG）；磷脂酰丝氨酸（PS）；磷脂酰肌醇（PI）；单葡糖基二乙酰甘油（MgluDG）；单半乳糖基二乙酰甘油（MgalDG）；二葡糖基二乙酰甘油（DgluDG）；二半乳糖基-二乙酰甘油（DgalDG）；二乙酰单葡糖基二乙酰甘油（DOMGluDG）；二油酰二葡糖基二乙酰甘油(DODGluDG)；甘油二烷基 nonitol 四醚(GDNT)；和 70%连接于 nonitol 基上 GDNT 和 β-D-吡喃葡糖和 30%的连接于甘油基团（GL）之一上的甘油二烷基甘油四醚与 β-D-半乳吡喃糖基-β-D-半乳吡喃糖的混合物。

可以改变水合作用、温度和脂类组成，以便调节脂基质的液晶结构。例如，包括 MO 与 1-棕榈酰-2-油酰-3-磷脂酰丝氨酸（PaOIPS）

和 DEPE/丙甲菌素的混合物的立体相脂系统在完全水合的条件下，在特定的浓度比例和温度范围内能形成双连续的立体相。相反，具有至多 10%mol 的 PaOIPS 的 DOPE 在室温下存在于六角相中。因此，可将温度和脂膜的组成用于控制结晶相。对于许多脂系统来说，所述参数是已知的，或者可以通过本领域已知的多种方法加以确定，包括测定具有各种浓度特定脂类成分和水的混合物的顺序排列，并在一定温度范围内进行比较。更加特殊的技术还可用于对特定脂类/水系统的立体相进行微调，如测定相图、X-射线衍射、NMR 和偏振光纤维素等（Lindblom 等，同上）。

能够形成具有特定重量百分比（wt%）含水量和形成立体相的最低温度（℃）的脂类包括，但不限于下列脂/水系统：具有 10-40wt%含水量和最低温度为 20℃的 MO；具有 40-46wt%含水量和最低温度为 25℃的 PaLPC；具有 20-25wt%含水量和最低温度为 25℃的 OILPC；具有 0-4wt%含水量和最低温度为 75℃的 EggPC；具有 2-11wt%含水量和最低温度为 60℃的 DOPC；具有 4wt%含水量和最低温度为 55℃的 DliPC；EggPC+22-35wt%胆酸钠，具有 22-26wt%含水量和最低温度为 22℃；EggPC+75-80wt%二乙酰甘油，具有多余含水量和最低温度为 10℃；EggPC+85wt%DliPE，具有多余含水量和最低温度为 40℃；具有 67wt%含水量和最低温度为 25℃的 DOPE；具有 67wt%含水量和最低温度为 25℃的 DOPE-Me；DOPC+0-50wt%DOPE，含水量为具有 10wt%含水量，和最低温度为 70℃；POPC+85-90wt%DliPE，具有 29-41wt%含水量，和最低温度为 7℃；源于 P.regina 的 PE，含水量为 35-50wt%，和最低温度为 40℃；源于 B.megaterium 的 PE，含水量为 8-26wt%，和最低温度为 58℃；含水量为 10-16wt%或高于 33wt%，和最低温度为 75℃或 115℃DDPE；源于牛心脏的 DPG+29wt%dibucane，含水量为 41wt%，和最低温度为 7℃；源于人脑的硫苷钠，含水量为 40-70wt%，和最低温度为 20℃；源于 A.laidlawii 的 DOMGluDG，含水量为 7-15wt%，和最低温度为 0℃；DOMGluDG+ 51wt% 源于 A.laidlawii 的 DOMGluDG，含水量为 10wt%，和最低温度为 25℃；MgalDG+31wt%源于玉米叶绿体的 DgalDG，含水量为 10-20wt%，最低温度为 60℃；MgalDG34-50wt%+源于小麦叶绿体的 DgalDG，含水量为 3-15wt%，最低温度为 10℃；含水量为 7-13wt%，最低温度为 15℃的 GDNT，；含

水量为 0-11wt%，最低温度为 60℃的 GL；源于 A.laidlawii 的极性脂，含水量为 18wt%，和最低温度为 65℃；以及源于 S.solfactaricus 的极性脂，含水量为 20 或 40wt%，最低温度为 85℃（Lindblom 等，同上）。

所述脂类可以从各种来源获得，包括商业来源或以微团、脂质体小泡、CLP 基质形式生产和制备，或按照本领域已知的标准技术从细胞中纯化的连续的片膜（例如，参见 Small，D.M.（1986）“脂类从烯烃到磷脂的物理化学”，参见：脂类研究手册，4 卷，1-672 页，D.Haccham 著，Plenum 出版社，纽约；Winterhalter 等，脂类化学和物理学（1993）64（1-3）：35-43；McNamee，MG.生物技术（1989）7（5）：466-475；Albertsson 等，生物化学分析方法（1982）28：115-150；Graham，JM.分子生物学方法（1993）19：97-108；和 Kinne-Saffran 等，酶学方法（1989）172：3-17；Larsson，K.物理化学杂志（1989）93：7304-7314；Zumbuchl 等，生物化学和生物物理学学报（198X）640：252-262；Erikson 等，物理化学杂志（1985）91：846；Seddon 等，Prog.Colloid Polym.Sci.（1990）81：189；和 US5,554,650）。

选择结合膜多肽的脂基质，该基质具有对所述多肽的亲和性。具体地讲，选择已知在特定温度范围内稳定的膜多肽，用于结合到具有相当的温度特征的脂基质上。举例来说，当采用 CLP 基质时，选择形成立体相的温度范围，以便与膜多肽的结合和稳定性匹配。包括 MO/水系统的 CLP 适于大多数在室温下（大约 25℃）稳定的膜多肽。另一方面，热稳定性膜多肽可能更适于插入包括 DOPE/水系统的 CLP，它所具有的形成立体相的最低温度特征大约为 70℃。

一种膜多肽连接成分与感兴趣的脂基质的结合可以在体外和/或体内完成。当在细胞或含有脂膜的无细胞系统中通过核糖体表达时，所述膜和与它结合的多肽可以同时分离，如果需要的话做再次的提炼，或者将所述多肽从膜上分离，用于随后按照本领域标准的技术在预成型的脂基质中重新构建（例如，参见 Hubbel 等，“膜蛋白结构：实验方法”，S.White 著，牛津大学出版社，伦敦，1994；Kahn 等，生物化学（1992）31：6144-6151；Nowak 等，科学（1995）268：439-442；Turcatti 等，生物化学杂志（1996）271（33）：19991-19998；Okumura

等，生物化学和生物物理学学报，(2): 335-340; Mimms, Biochemistry (1981) 20: 833-839; 和 US4,515,736)。为了将特定的膜多肽引导至特定的脂基质上，还可以采用有利于目标多肽定位到感兴趣的特定的细胞膜上的天然或人工定向序列（例如，参见 Pelham 等，细胞 (1993) 75: 603-605; 和 Magee 等，(1994) 蛋白定向: 实践方法，D. Rickwood 和 B. D. Hames 著，牛津大学出版社，牛津。

当结合到预成型的脂基质中时，可以按照本领域的标准技术重构定向膜多肽，包括天然细胞膜、脂质体、微团、或 CLPs 的预成型的脂基质（例如，参见 Cladera 等，欧洲生物滑雪 (1997) 243 (3): 798-804; Takahashi 等，自然结构生物学 (1997) 4: 44-50; Das, TK, 物理化学杂志 (1996) 100: 20143-20147; Angrand 等，欧洲生物化学杂志 (1997) 250 (1): 168-176; Zardeneta 等，分析生物化学 (1994) 223 (1): 1-6; Landau 等，美国化学协会杂志 (1993) 115: 2102-2106; Bortman 等，物理化学杂志 (1991) 95: 8437-8440; Mariani 等，分子生物学杂志 (1988) 204: 165-189)。具体地讲，可以通过有控制的溶解和/或脂类提取技术在预成型的脂基质中重构目标膜多肽。例如，可将所述膜多肽加入合适的溶剂/洗涤剂系统中，并将提取物与预成型的脂基质混合，所述脂基质含有或者是缺乏能够将所述膜多肽溶解和插入脂基质中的量的溶剂/洗涤剂。可以调整一种或多种重构条件，以便优化所述方法，如温度、pH、水和/或有机溶剂含量，离子浓度、还原或氧化试剂（如果有的话）、以及洗涤剂与脂类的比例、洗涤剂与多肽的比例、和脂类与多肽的比例。一个例子是，用一系列数量的洗涤剂在合适的缓冲系统中混合脂基质和膜多肽，并监测在重构过程的每一步骤中膜多肽的结合，以便评估特定脂-膜多肽重构系统的最佳缓冲物/洗涤剂特征。适用于重构分析的脂类溶解试剂的例子包括 SDS（十二烷基硫酸钠）、Triton-X100、Ammonyx-lo（N,N-二甲基月桂基氧化胺）、胆酸钠、牛黄胆酸、蔗糖单月桂酸酯、十二烷基麦芽糖苷、CHAPS（3-（3-胆酰胺丙基）-二甲基氨基-1-磺酸丙酯）、CHAPSO（3-[（3-胆酰胺丙基）二甲基氨基]2-羟基-1-磺酸丙酯）、辛基葡糖苷、和辛基吡喃葡糖苷等（例如，参见 Rigaud 等，生物化学和生物物理学学报 (1995) 1231 (3): 223-246; Yang Q 等，分析生物化学 (1994) 218 (1): 210-221; Scotto 等，

生物化学（1987）26（3）：833-839）。如果必要，可以通过本领域已知的多种方法在重构之后去掉洗涤剂，以及该重构系统所特有和/或活性。

通过质粒提取进行的重构可以通过将分离的膜多肽添加到存在于诸如己烷和缓冲过的水溶液的合适的有机溶剂中的脂基质中而实现，以便从脂-有机溶剂可溶相中分离水溶相。采用上述溶剂/洗涤剂溶解方法，可以对一种或多种重构条件进行调整，以便优化该方法，如温度、pH、水和/或有机溶剂含量、离子浓度、还原或氧化剂（如果存在的话），以及洗涤剂与脂类的比例、洗涤剂与多肽的比例、和脂类与多肽的比例。所分离的含有提取的所述膜多肽的脂相随后可以通过标准技术用于形成脂单层、双层、脂质体、微团或 CLPs，所述方法如超声处理、铺层、挤压、离心等，这取决于要获得的脂基质。通过脂类提取在脂基质中构建膜多肽的任何合适的技术都可以使用（例如，参见 Montal 等，Q.Rev.Biophys.（1981）14：1-79；Ayala 等，生物化学和生物物理学学报（1985）810（2）：115-122；Montal 等，美国科学院院报（1990）87：6929；Puu 等，Biosen Bioelectron（1995）10（5）：463-476）。例如，可以选择适应特定脂-膜多肽的溶剂系统，以便优化提取，如上文结合脂类获得和制备所述。在采用将一种膜多肽结合到脂基质中的溶解方法时，可将有或没有洗涤剂和/或盐的选择溶剂的系列量用于监测并筛选最佳的脂提取系统，以便获得含有所述膜多肽的提取的脂相。

可以根据连接成分的配对及其预期的最终用途，在所述膜多肽结合之前、期间和/或之后将连接标记选择性地添加到所述脂基质中。当使用一种水溶性连接标记时，可将所述标记添加到已经与目标膜多肽结合的脂基质中。还可以在所述膜多肽成分结合之前和/或同时将一种可溶性连接标记添加到所述脂基质中，例如，在脂质体、微团或 CLP 的水区室的内部。当所述膜多肽自动插入预先成型的含有一个连接标记的脂基质中时，后一种情况特别有利。类似地，可以在所述膜多肽结合之前、期间和/或之后添加一种脂溶性连接标记。例如，当所述连接标记包括能够与一种膜多肽成分的脂包埋锚定域形成复合体的脂包埋的锚定域时，可能需要在连接之前让所述连接标记与所述膜多肽成分结合，以便获得具有自动组装的，尚未连接的结构域的复

合体或束。在连接之前使所述膜多肽和连接成分结合有助于单个的多肽片段或结构域在其与脂基质相互作用时插入和/或折叠，并能促进目标连接位点的正确定位。该方法还特别适用于这样的情况：目标连接位点是为了产生模式多次通过的跨膜多肽而设计的相容的连接成分配对，在连接胞和/或胞内环时，它能结合插入的结构域。另一个例子是，在细胞或无细胞系统的脂膜中表达并插入所述连接标记，然后重构含有所述连接标记的细胞膜和膜多肽。为了在结合所述膜多肽和/或连接标记之后保持所需要的脂基质系统，可以根据需要调整诸如温度、pH、水和/或有机溶剂含量、离子浓度、还原或氧化剂（如果存在的话）、以及洗涤剂与脂类的比例、洗涤剂与多肽的比例、和脂类与多肽的比例的调节。可以在特定的时间间隔取出等分试样，以便监测标准技术或本文所披露技术的结合和完整性。

当所述膜多肽和连接标记被重构在一起时，所述连接成分的一种或多种可以包括一个具有一个或多个裂解位点的接头或加帽序列，这些位点用于在裂解时产生化学活性连接位点部分，并由此被用于控制连接反应所需的活性基团的存在或缺乏。另外，可以利用试剂或缓冲条件控制所述活性基团的存在和活性。例如，pH 低于 6.5 的缓冲条件也可用于抑制天然化学连接。作为另一个例子，当所述连接成分被设计用于天然化学连接，并由此统一提供包括未保护的 N-末端半胱氨酸和 C-末端 α COSR 基团的互补的连接成分对时，如在裂解之后产生半胱氨酸连接位点，如果选择推迟或抑制连接反应的话可以选择性地添加一种诸如 β -巯基乙醇的硫醇还原剂。当然，在添加硫醇还原剂之前要考虑二硫键的存在或缺乏以及膜多肽在脂基质中的折叠。一般，如果二硫键是保持正确插入并折叠的膜多肽所必需的，并且二硫键对硫醇还原剂敏感的话，可以在即将连接之前添加连接标记，从而减少添加还原试剂以便推迟或抑制连接的必要性。

不过，本领域普通技术人员可以理解的是，将连接标记成分添加到所述脂基质系统中，可以根据特定的最终用途调整结合的方法和顺序，其前题是，所述脂基质包埋的膜多肽和连接标记成分对的完整性和相容性得到保持，并且能够随后进行连接，如在方案 1-2 中的任一项或几项中所述。

一旦膜多肽和/或连接标记成分结合到感兴趣的脂基质中，就可

以保存该基质或者进一步加工以便连接。为了进行连接，所述脂基质结合的膜多肽可以存在于溶液相中或连接在固体支持相基质上。其中包括液体溶液、凝胶、糊剂、亲和基质支持系统等。如果所述膜多肽或连接标记包括一个靠近化学选择性化学连接的目标残基的裂解位点时，可以在连接反应之前进行裂解。化学或蛋白酶裂解是这样进行的：让对所述裂解位点专一的裂解试剂与其混合，在适当条件下培养该混合物适当时间，以便实现裂解。很多位点专一性裂解试剂是众所周知的，并且可以生产或者从供应商那里购买。如果需要可以在连接之前中和或清除裂解试剂和反应副产物，以便避免对连接反应的任何干扰。在培养之后裂解的程度和脂基质结合的裂解产物的产生可以通过本领域已知的或本文所披露的多种技术中的任一种确定。当然，可以理解的是，针对化学连接的裂解反应的产物将含有能进行特殊类型化学连接的未保护的氨基酸残基，而无论该产物是连接标记和/或膜多肽。例如，为天然化学连接所设计的裂解产物优选含有未保护的N-末端半胱氨酸，或者在某些场合下，仅需要一种适当定位的未保护的氨基酸，以便与提供C-末端硫酯部分的膜多肽或连接标记进行天然化学连接。对于连接反应来说，选择保持理想的脂基质包埋的膜多肽和连接标记成分的相互作用的反应条件。可以进行常规调整，以便确定最佳条件，例如，通过改变单一的试剂、浓度、温度等。例如，可以调整反应条件以便优化连接，如温度、pH、水和/或有机溶剂含量、离子浓度、还原或氧化剂（如果存在的话）、以及洗涤剂与脂类的比例、洗涤剂与多肽的比例、和脂类与多肽的比例。以不同程度添加或排除能溶解脂基质和/或膜多肽的试剂，还可用于控制所需连接反应的专一性和速度。本领域普通技术人员可以理解的是，这些条件是根据所采用的特定化学连接方法选择的，因此，这些条件适用于所述化学方法。本领域普通技术人员能很方便地确定所述条件和条件范围。

多种方法中的任一种可用来监测所需要的脂基质-膜多肽和/或连接标记成分系统的形成和均匀性，以及监测所需连接产物的形成。这些技术包括检测插入膜多肽活性的测定、荧光光谱学、质谱学、亲和基质和配体结合实验、NMR、圆二色性（CD）、扫描密度测定、量热法、和各种层析技术，如电泳、亲和层析、使用反相或离子交换柱的HPLC等。

可以储存含有连接前或连接后的产物的脂基质以便随后利用，或直接用于测定。在保存时，对保存方法加以选择，以便保持脂基质及其结合成分的稳定性。其中包括以冷冻形式、冻干的粉末形式、结晶、凝胶、糊剂、液体、或任何其他合适的形式保存，包括保存在诸如薄膜或亲和基质的支持基质上保存。例如，来自天然细胞膜的脂基质级份除非是高度纯化的，如果要长期保存的话一般要进行冷冻。人工脂基质，如脂质体和 CLPs 在某种程度上在储存范围上有更大的选择性，特别是 CLPs，可以作为粘性凝胶在有利于该脂系统的立体相的条件下保存。在以诸如脂质体的密封小泡形式提供时，可以用标准技术添加带负电荷和/或正电荷的成分添加到所述组合物中减少聚合和融合作用。导入具有较高转变温度的脂类，如胆甾醇或含有磷脂的饱和脂肪酸也能减少密封小泡的泄露。诸如海藻糖的添加剂也可用作低温保护剂。当然，可以采用用于储存本领域已知的预成型的脂系统的任何合适方法，并且储存稳定性通常可以通过调节温度和含水量、减少与原材料或氧化剂的接触、如通过在惰性气体下保存、将该脂基质分散在中性缓冲系统中和/或清除残余溶剂而得到改善。

为了用于测定，本发明的化学连接方法和组合物可用于本发明的筛选实验。本发明的筛选实验的特征是将一种配体结合在用本发明的一种或多种方法和组合物生产的目标脂基质-包埋的膜多肽上。

在一种优选实施方案中，至少一种连接成分具有一个或多个可检测部分，又被称作可检测标记或探针如同位素、半抗原、或包括荧光团的生色团、重金属与芳族配体或螯合配体等的复合体。更优选的，通过在方案 1-2 中的任一种或多种中所述的化学选择性化学连接方法将至少一种第一个可检测标记结合到膜多肽上。如果需要，可以通过除方案 1-2 之外的多种技术中的任一种将一个或多个第二种可检测标记结合到所述膜多肽、脂基质、和/或所述多肽的配体上。如上文所述，可以用任何适用于该目的的技术在合成期间和/或之后将可检测部分结合到连接成分上，包括在连接到脂基质上之后，只要在方案 1-2 中的一种或多种中任一种所述的脂基质-结合膜多肽和/或连接成分系统的活性、选择性和稳定性基本上得到保持即可。同样如上文所述，可以在设计和筛选相容的连接成分对期间筛选能定向共价结合可检测标记的一个或多个残基。

化学合成是结合可检测标记的优选方法。在该实施方案中，用化学合成方法将至少一种可检测标记结合到在方案1-2中任一项或几项中所述的预连接成分上。这样，所得到的脂膜包埋的连接产物可以设计成在所选择的预定位置上含有一个或多个检测标记。特别感兴趣的是可以通过NMR检测的同位素标记。同样感兴趣的是将含有一种可检测标记的一个或多个氨基酸结合在感兴趣的目标连接成分的特定位点上。所说的非天然氨基酸是指所有非遗传编码的L-氨基酸和D-氨基酸：它被修饰成含有一种可检测标记，如光活性基团、以及生色团、包括荧光团和其他染料，或诸如生物素的半抗原。含有生色团的非天然氨基酸以及用于将其结合到肽或多肽序列上的化学合成技术是众所周知的，并且可将其用于本发明的目的。例如，在除掉其他保护基团并将标记过的肽从树脂上分离之前很方便将荧光团缀合到树脂结合肽的N-末端。荧光素、洋红、OregonGreen、罗丹明绿、RhodolGreen、四甲基罗丹明、罗丹明红、得克萨斯红、香豆素和NBD荧光团、dabcyl生色团和生物素都对氟化氢（HF）相当稳定，并且对大多数的其他酸稳定，因此适合通过固相合成结合（Peled等，生物化学（1994）33: 7211; Ben-Efraim等，生物化学（1994）33: 6966）。除了香豆素之外，这些荧光团也对用于对用Fmov化学方法合成的肽脱保护的试剂稳定（Strahilevitz等，生物化学（1994）33: 10951）。还可将ε- dabcyl-L-赖氨酸的t-Boc和α-Fmoc衍生物用于将dabcyl生色团结合在多肽序列的特定位点上。所述dabcyl生色团具有宽的可见光吸收，并可用作淬火基团。还可以用dabcyl琥珀酰亚胺酯将dabcyl基团结合在N-末端（Maggiora等，医学化学杂志（1992）35: 3727）。EDANS是用来在FRET实验中与dabcyl淬火基团配对的常用荧光团。该荧光团便于在肽的自动合成期间用5-（（2-（t-Boc）-γ谷氨酰基氨基乙基）氨基）萘-1-磺酸导入（Maggiora等，医学化学杂志（1992）35: 3727）。α-（t-Boc）-ε-丹酰-L-赖氨酸可用于在化学合成期间将丹酰荧光团结合到多肽上（Gauthier等，Arch Biochem.Biophys.（1993）306: 304）。采用EDANS，该荧光团的荧光与dabcyl的吸收重叠。肽的位点专一性生物素化可以用生物胞素的t-Boc-保护的衍生物完成（Geahlen等，分析生物化学（1992）202: 68），或使用其他已知的生物素化衍生物，如NHS生

物素等。消旋二苯酮苯丙氨酸类似物也可用于在 t-Boc 或 Fmoc 保护之后结合到肽上（Jiang 等，国际肽保护研究杂志（1995）45: 106）。非对映体的分辨可以在该产物的 HPLC 纯化期间完成；还可以通过本领域的标准技术分辨未保护的二苯酮。可以使用的非天然氨基酸的其他例子包括用于肟连接携带酮的氨基酸，叠氮/羟基色氨酸、生物素基-赖氨酸和 D-氨基酸。可以理解的是，用于自动肽合成的其他保护氨基酸可以按照本领域的标准技术进行常规合成。

可以用除了方案 1-2 所述方法以外的技术将其他可检测标记结合到膜多肽、脂基质、和/或所述多肽的配体上。在该实施方案中，所述可检测部分通常是在化学连接之后引入的。这一目的可以通过用一种活性物质进行化学修饰实现，该物质一旦与目标分子的活性基团结合即可形成共价键。例如，肽或多肽连接成分可以包括若干活性基团、或改变了其活性的基团，如硫醇、醛、氨基，适于通过化学修饰结合可检测标记（Lundblad 等，参见：蛋白修饰的化学试剂，CRC 出版社，Boca Raton，FL，（1984））。还可将定点诱变和/或化学合成用于将所述基团引入需要的位点和/或从需要的位点上缺失。可以用这种方法连接多种可检测标记中的任一种，包括生物素-亲和素或链霉亲和素系统的生物素化探针、抗体、抗体片段、糖结合域、包括荧光团和其他染料的生物团、卵磷脂、核酸杂交探针、药物、毒素等。可以通过采用半抗原化和生物素化试剂将低分子量半抗原、如荧光团、洋地黄毒苷、二硝基苯基（DNP）或生物素化学连接到膜多肽或连接标记成分上。所述半抗原化的多肽随后可以用荧光光谱法、和质谱法等直接检测，或者用能作为二级检测试剂选择性地结合在所述半抗原上的标记试剂间接检测。常用的二级检测试剂包括用荧光染料或其他检测标记标记过的抗体、抗体片段、亲和素和链霉亲和素。

根据反应基团，化学修饰可以是可逆的或者是不可逆的。在肽和多肽上所针对的常见活性基团是硫醇基，可以用卤代乙酰和马来酰亚胺标记试剂对其进行化学修饰，这种修饰会导致不可逆的修饰，并因此而产生更稳定的产物。例如，在生理 pH 范围内（pH6.5-8.0）巯基与 α-卤酮、酰胺、和酸的反应是已知的，并能够对肽和多肽上的半胱氨酸进行专一性修饰（Hermason 等，参见：生物缀合技术，学术出版社，San Diego，CA，98-100 页，1996）。检测标记的共价连接还

可以通过改变条件而启动，例如，光亲和标记是用适当波长的光线进行光照的结果。为了进行光亲和标记，标记物（通常是荧光或放射性的）含有一个在受到光照时产生化学活性的基团，并能与带标记分子上的合适的基团形成共价连接。适用于这一目的的一种重要类型的光活性基团是芳基叠氮化物，它在受到光照时能形成短期的但是高活性的氮烯。光活化或“笼状”氨基酸的快速光解也可用于标记肽，它在用紫外光进行光解之前是没有生物学活性的。可以用不同的笼状试剂修饰氨基酸，如邻硝基苄基化合物的衍生物，并用本领域标准技术进行检测（Kao 等，“光学显微术：显像方法和应用”，B.Herman，J.J.Lemasters 著，27-85 页，1993）。可以通过醚、硫醚、酯（包括磷酸酯）、胺或类似的键通过合成将所述硝基苄基结合到具有生物学活性的分子上的杂原子（通常为 O、S 或 N）上。笼状荧光团可用于荧光实验的光活化（PAF），它类似于在荧光漂白之后的荧光恢复（FRAP）。位于赖氨酸的 ε-氨基、酪氨酸的苯酚、谷氨酸的 γ-羧酸或半胱氨酸的巯基上的笼状化合物可用于笼状氨基酸在所述序列上的特异结合。在 α 胺上呈笼状的丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸也可用于制备在 N-末端呈笼状的肽或能够选择性地光解在聚合物或溶液中产生活性氨基酸的笼状中间产物（Patchornik 等，美国化学协会杂志（1970）92：6333）。还可以使用自旋标记技术，将具有不配对电子的基团作为电子自旋共振（ESR）报导物引入，如氮氧化物（-N-O），其中，氮形成空间位阻环的一部分（Oh 等，同上）。

检测标记系统的选择通常取决于试验及其预期的用途。具体地讲，本发明的化学连接方法和组合物可用于本发明的筛选试验，该试验的特征是将一种配体结合在含有连接标记的脂基质包埋的膜多肽上，所述连接标记通过共价键结合在膜多肽连接位点上。其中包括诊断试验、筛选用于药物开发的新型化合物、以及利用配体和预折叠的膜多肽结合的其他结构和功能试验。所述配体可源于天然存在的配体或源于合成来源，如组合文库。特别感兴趣的筛选方法包括通过荧光光谱法检测结合在通过本发明方法生产的脂基质包埋的膜多肽上的配体。

在一种优选实施方案中，筛选一种配体与包括一个或多个生色团

的脂基质包埋的膜多肽的结合是在以检测荧光共振能量转移（FRET）为特征的试验进行的。配体与脂基质包埋的膜多肽的结合可以通过本领域已知用于 FRET 分析的多种方法的任一种测定，包括通过监测荧光强度、发射能量和/或各向异性进行的稳态和时间分辨荧光，例如，通过从供体部分到 FRET 系统的受体部分的能量转移（例如，参见 Wu 等，分析生物化学（1994）218: 1-13）。FRET 试验不仅可以进行距离测定，而且还能分辨供体到受体的距离的范围。FRET 还可用于显示以单一构像状态，或在不同状态下，如当结合于配体上时具有一定范围供体到受体的存在的膜多肽。

为了进行 FRET 试验，将脂基质结合的膜多肽设计成含有至少一个供体-受体系统的生色团。所述供体分子总是用于检测的荧光（或发光）分子。所述受体分子可以是荧光的或非荧光的。因此，对于一种供体-受体系统来说，至少提供了两个生色团：第一个是由脂基质包埋的膜多肽提供的；第二个可以由膜多肽、脂基质提供，或者由所述多肽的配体提供。

还可以包括一个以上的供体-受体对。例如，所述膜多肽可以包括一个或多个供体和/或受体分子，并且优选至少一个含有生色团的供体分子。配体也可以包括一个或多个供体或受体分子。所述脂膜基质也可以包括一个或多个供体或受体分子，并且二级分子结合到由所述基质形成的脂类和/或溶剂进入通道上，该分子是感兴趣的目标多肽的配体，如当所述目标膜多肽包括 7 次跨膜受体系统的一部分或全部时为 G-蛋白。

在一种优选实施方案中，所述膜多肽包括一个或多个供体分子，并且所述膜多肽的配体包括一个或多个受体分子。所述配体可以是小的有机分子、肽、肽模拟物、限制肽和多肽等。它们可源于天然存在的配体或源于合成来源，如组合文库。当一种配体是肽或多肽时，可以用各种化学方法，如本文所披露的方法用生色团标记进行制备。特别感兴趣的是组件“交换”多肽配体，可将其构建成包括一个或多个生色团，它是通过组合来自第一种多肽和至少第二种多肽的一个或多个功能性组件而产生的。组件多肽的合成由 Kent 等披露于 WP99/11655 中。

特别感兴趣的配体能竞争结合通过方案 1-2 中的任一项或多项所

述的方法和/或组合物产生的脂基质包埋的膜多肽上的配体结合位点。这些配体可用于本发明的其他方法中，该方法包括让脂基质包埋的膜多肽与两种或两种以上能竞争结合所述膜多肽的配体结合位点的不同配体接触。为了检测，可以对所述不同竞争配体的一种或多种进行标记。例如，可以用第一种生色团标记所述膜多肽，并用供体-受体系统的第二种生色团标记一种竞争配体。另外，所述膜多肽或脂基质可以提供所述第二种生色团。通过 FRET 分析监测配体结合所述多肽的竞争作用，包括监测在结合配体时所述膜多肽的内在荧光变化，和/或在结合时荧光标记的配体的特性的变化，因此可以检测并鉴定配体结合。

当选择 FRET 的生色团供体-受体对时，第一个生色团在目标多肽的定位被设计成在距离第二个生色团的足够的距离范围内，以便形成供体-受体荧光共振能量传递系统。例如，能量从供体传递到受体包括偶极连接，其中，能量是在被称为 Forster 半径（R0）的特定距离上传递的，该半径被定义为能量传递效率为 50%的距离（即通过 FRET 时 50%激发的供体失活的距离）。该距离在本文中被称为 Forster 距离。该距离的范围大约为 10-100 埃，它相当于多种蛋白的直径并相当于膜的厚度。在距离测定中内在色氨酸或酪氨酸有时可用作生色团，不过在大多数情况下 Forster 距离被局限在高于 30 埃。不过，包括具有高摩尔吸收系数的每一种受体的受体簇的受体分子可以实现 Forster 距离的进一步延长。因此可以测定超过 100 埃的平均距离。由于 Forster 距离可以根据受体的吸收光谱和供体的发射光谱可靠地计算出来，FRET 能够测定分子距离。一旦知道了 Forster 距离，能量传递的程度可用于计算供体到受体的距离。

可用于生物分子和在配对时 Forster 距离已知的分子的供体-受体生色团包括，但不限于以下生色团：ANAI（2-蒽-乙酰咪唑）；BPE（B-藻红素）；CF（羧基荧光素琥珀酰亚胺酯）；CPM（7-二乙基氨基-3-（4'-马来酰亚胺苯基）-4-甲基香豆素）；CY5（羧甲基靛青-N-羟基琥珀酰亚胺酯，双 I-C13，1，1'-双十八基-3，3，3'-四甲基-靛碳青；二-O-C14，3，3'-双十四基氧杂靛青）；DABM（4-二甲基氨基苯基偶氮-苯基-4'-马来酰亚胺）；DACM（（7-（二甲基氨基）香豆素-4-基）-乙酰）；DANZ（单酰氮丙啶）；DDPM（N-（4-二甲基氨

基-3，5-二硝基苯基）马来酰亚胺）；DMMS（二甲基氨基-4马来酰亚胺芪）；DMSM（N-（2，5-二甲氧基芪-四-基）-马来酰亚胺）；DNP（2，4-二硝基苯基）；ε-A（1，N6-亚乙烯腺苷）；EIA（5-（碘乙酰胺）洋红）；EITC（洋红氨基硫脲）；F_2DNB（1，5-二氟-2，4'-二硝基苯）；F_2DPS（4，4'-二氟-3，3'-二硝基苯亚砜）；FITC（荧光素-5-异硫氰酸）；FM（荧光素-5-马来酰亚胺）；FMA（荧光素汞乙酸）；FNAI（荧光素N-乙酰咪唑）；FTS（荧光素氨基硫脲）；IAANS（2-（4'-碘乙酰胺）氨基）萘-6-磺酸）；IAEDANS（5-（二-（碘乙酰）氨基）乙基）氨基）-萘-1-磺酸）；IAF（5-碘乙酰胺荧光素）；IANBD（N-（（2-（碘乙酰氧基）乙基）-N-甲基）氨基-7-硝基苯-2-氧杂-1，3-二唑）；IPM（3（4-异硫氰酸苯基）7-二乙基-4-氨基-4-甲基香豆素）；ISA（4-（碘代乙酰胺）水杨酸）；LRH（利丝胺罗丹明）；LY（荧光黄）；mBBR（一溴 bimane）；MNA（（2-甲氧基-1-萘基）-甲基）；NAA（2-萘氧基乙酸）；NBD（7-硝基-2，1，3-苯并恶二唑-4-基）；NCP（N-环己基-N'-（1-芘基）碳二亚胺）；ODR（十八基罗丹明）；PM（N-（1-芘基）-马来酰亚胺）；SRH（硫代罗丹明）；TMR（四甲基罗丹明）；TNP（三硝基苯基）；TR（德克萨斯红）；BODIPY（（N1-B）-N1'-（二氟硼基）-3，5'-二甲基-2-2'-吡咯亚甲基-5-丙酸，N-琥珀酰亚胺酯）；和镧系-离子-螯合剂，如N-（对苯甲酸）二乙基三胺-N,N',N'-四乙酸的销（Eu）螯合剂的碘乙酰胺衍生物（DTTA）；Eu-DTPA-cs124和Tb-DTPA-cs124（二乙基三胺五乙酸的Eu螯合剂和Tb螯合剂，喹诺酮124）；Eu-TTHA-cs124（三乙基四胺六乙酸的Eu螯合剂，喹诺酮124）；Eu-DOTA（1，4，7，10四叠氮环dedecaneN,N,N'',N'''四乙酸）；EuDTPA-AMCA（二乙基三胺五乙酸的Eu螯合剂，7-氨基-4-甲基香豆素）；和Cy5和Cy5.5（菁染料cy5和cy5.5）。

由于当供体-受体分离接近其Forster距离时，能量传递测定对距离的变化最敏感，选择或工程产生包括供体-受体对系统的第一种生色团的膜多肽，以便所述第一和第二种生色团接近或处于Forster距离上。表1表示供体-受体对的某些典型Forster距离，为了进行比较，特定的距离是在H_2O和D_2O中测定的（Selvin等，美国科学院院报（1994）91：10024-10028；Li 等，美国化学协会杂志（1995）

117: 8132-8138; 和 Heyduk 等，分析生物化学（1997）248: 216-227）。

表 1

供体	受体	Forster 距离（埃）
荧光素	四甲基罗丹明	55
INEDANS	荧光素	46
EDANS	DABCYL	33
荧光素	荧光素	44
BODIPY FL	BODIPY FL	57
Tb-DTPA-cs124	TAMRA	60(H_2O)/65(D_2O)
Eu-TTHA--cs124	Cy5	68.6(H_2O)/73.5(D_2O)
Eu-DTPA-cs124	Cy5	56(H_2O)/70(D_2O)
Eu-DOTA	Cy5.5	62(H_2O)/76(D_2O)
Eu-DTPA-AMCA	Cy5	55(H_2O)/61.4(D_2O)

各种供体-受体对的 Forster 距离的广泛收集及其在包括肽、多肽、糖和脂类的生物分子的 FRET 分析中的特殊用途在本领域中是众所周知的（例如，参见 Wu 等，同上；Berlman 等，（1973）芳族化合物的传递参数，学术出版社，纽约；Van der Meer 等（1994）“共振能量传递理论和数据”，VCH 出版社；Fairclough 等，肌肉研究细胞转移杂志（1987）8: 97；des Remedios 等，酶学方法（1978）48: 347）。所述 Forster 距离被用作筛选特定供体-受体对的一般指南。

除了筛选处在近距离的（通常为 10-100 埃）并且接近或处在 Forster 距离上的供体或受体部分之外，还选择 FRET 生色团对，以便受体的吸收光谱与供体的荧光发射光谱重叠，并且供体和受体的过渡偶极方向大体上平行。另外，为了进行各向异性测定，其中，采用两种相同的生色团，其中的一种生色团是由膜多肽提供的，另一种是由配体提供的，所述生色团优选定位于使供体或受体部分的抖动最小的位置上。在一种优选实施方案站中，至少一个生色团定位于所述脂基质包埋的膜多肽和/或连接标记成分的固定部分上，如在α螺旋或β折叠部分，位于并且固定在两个半胱氨酸之间距离α螺旋或β折叠大约 2-3 埃的生色团特别适用于这一目的。减少生色团抖动的一个优

点是能通过降低光谱的背景干扰来提高 FRET 检测的灵敏性。

对于大多数用途来说，供体和受体染料是不同的，在这种情况下，可以通过供体荧光淬火（供体淬火）或荧光极化（各向异性）根据受体的敏化荧光的出现（受体增强）检测 FRET。当供体和受体相同时，FRET 通常通过各向异性检测。例如，供体淬火（荧光淬火）可用于检测能量传递。激发被设定为供体吸收的波长，并监测供体的发射。选择供体的发射波长，以便不会观察到来自受体荧光的影响。受体的存在会使供体荧光淬灭。有多种小的分子或离子起着荧光淬火剂的作用，就是说它们能减弱其发射强度。这些物质包括碘化物、氧气、氯化烃、胺、和二硫化物基团。荧光团与淬火剂的可接触性被广泛用于测定探针在大分子上的位置或蛋白与膜到淬灭剂的孔隙度。例如，可以通过供体淬火测定在存在溶解的水溶性淬火剂的条件下多肽和膜结合荧光团的强度。还可以添加诸如溴化脂肪酸的脂溶性淬火剂，以便评估膜的内部乙酰侧链区。

当受体具有荧光时，可以使用受体增强检测技术，并且当发生能量传递时其荧光强度加强（通过激发传递给供体）。这提供了观察来自荧光光谱的能量的另一种方法。在一种发射光谱中，人们在受体吸收波长下激发，并观察受体的强度增加。在激发光谱中，人们在受体发射波长下进行检测，并观察供体吸收波长下的强度的增强。

特别感兴趣的是用 FRET 进行各向异性（荧光极化分析），例如，此时两种相同的生色团连接在脂基质包埋的膜多肽和水溶性配体上。光线的极化特性和光线吸收对荧光团与入射光线的电载体的排列的依赖性提供了各向异性测定的物理基础。荧光探针通常在 1-100 纳秒（ns）内保持激发状态，这段时间被称为荧光寿命。由于多肽的旋转扩散也是在 1-100ns 内进行的，荧光寿命是用来研究大分子的结合和/或旋转行为的优选时间。诸如具有若干个 100 微秒寿命的其他探针包括，但不限于：$[Ru(bpy)_2dcbpy]^{2+}R$，其中，bpy 是双吡啶，dcbpy 是 4，4'二羧基 bpy；$[Os(bpy)_2(dcbpy)]^2$ 和 $(L)Re(CO)_3C=NR$，其中，L 是 1，10 菲咯啉或 bpy，R 是 n-Bu 或 t-Bu，而 Bu 是丁基。有关这些复合体的综述和参考文献可以参见 Terpetsching 等的文章（酶学方法（1997）278: 295）。因此，当用垂直偏振光照射含有合适的供体-受体生色团对的脂基质包埋的膜多肽的样品时，其

发射可以被极化。当能量传递在相同环境下发生在相同分子之间时，荧光强度或寿命不会改变。另一方面，各向异性由于在膜多肽和配体结合生色团之间的空间方向上的可能的差别而改变。

对各向异性测定的特殊兴趣在于通过提供两个连接位点，如沿α螺旋方向通过三个插入残基分开的两个残基限制生色团沿其连接臂转动的能力。这种设计能阻止连接的生色团绕连接臂自由转动，并因此避免来自各向异性试验的空间信息的损失。如果一种多肽结合一种配体，所述膜多肽结合的和配体生色团（及其相应的偶极）彼此之间具有确定的空间取向。更重要的是，如果生色团是固定连接的话，其相对取向只有很少的波动。由于各向异性检测试验的信号与干扰的比例直接受取向波动程度的影响，生色团的固定连接使得人们能够通过各向异性以较高的灵敏性检测 FRET。

在本发明的另一种实施方案中，提供了用螯合剂敏化的时间分辨金属离子探针，如香豆素敏化的时间分辨镧系探针标记多肽的方法和组合物。本发明的这一方面提供了用敏化的两性离子金属螯合剂复合体（MCC）对能够进行固相化学合成或固相化学合成和化学连接技术的组合的任何肽或多肽，包括可溶性膜肽和多肽进行位点专一性标记的方法和组合物，以便在 FRET 和高通过量筛选试验中检测时间分辨发光。该方法包括用能够螯合金属离子的两性离子螯合剂部分标记由连接在一种化学合成树脂上的肽或多肽链的一个或多个氨基酸。因此，在树脂化学合成的同时将一种螯合剂部分连接在肽或多肽链上。所述金属离子然后可以与树脂上的螯合剂部分复合，或者在肽或多肽链从树脂上裂解之后复合，这取决于其预期的最终用途。适用于该方法的螯合剂部分包括，但不限于选自下列一组的两性离子螯合剂：TTHA（三乙四胺六乙酸），DTPA（二乙三胺五乙酸），DTTA（二乙三胺 N,N,N,N 四乙酸），DOTA（1，4，7，10 四叠氮环十二烷 N,N',N'',N''' 四乙酸），TETA（1，4，8，11 四叠氮环十四烷 N,N',N'',N'''四乙酸）和其他任何用于结合金属的其他两性离子螯合剂配体。特别感兴趣的金属离子是镧系离子，更优选 Tb^{3+}，Sm^{3+}和 Eu^{3+}。

还提供了提高两性离子螯合剂溶解度的方法，包括选自下列一组的两性离子螯合剂：TTHA、DTPA、DTTA、DOTA、TETA 和任何用于结合金属的两性离子螯合剂配体。本发明的这一方面包括将一种不溶性

的两性离子螯合剂与能产生两性离子螯合剂的可溶性的盐形式的增溶剂结合。该方法可用于在常用的溶剂中具有不重复的溶解度的任何两性离子螯合剂，所述溶剂如二甲基甲酰胺（DMF），二甲基亚砜（DMSO）和甲醇等。在一种优选实施方案中，所述待增溶的两性离子螯合剂包括一个羧基，该基团通过特定的后续偶联反应而被激活，而所述增溶剂对激活作用没有反应。优选的增溶剂是三氟乙酸（TFA），例如，两性离子螯合剂 TTHA 与 TFA 的组合能产生 TTHA 的 TFA 盐，这种盐能以冻干的粉末形式制备并储存，并且极容易溶解在 DMF 中，DMF 常用于树脂上的化学合成。增溶剂的另一个例子是对甲苯磺酸（TSA）。与 TFA 相比，TSA 的有利特征是它不仅是强酸，而且还是非挥发性的和非亲核的。可以理解的是还可以根据最终用途采用增溶剂的组合。通过在肽或多肽的树脂标记中采用两性离子螯合剂的可溶性盐，可以通过增加可供反应利用的可溶性螯合剂的浓度明显改善反应的产率。还提供了一种含有可溶性盐形式的两性离子螯合剂的组合物。优选的可溶性盐形式的两性离子螯合剂是两性离子螯合剂的 TFA 盐。另一种可溶性盐形式的两性离子螯合剂是两性离子螯合剂的 TSA 盐。其中包括，但不限于选自下列一组的两性离子螯合剂的 TFA 和 TSA 盐：TTHA、DTPA、DTTA、DOTA、TETA 和任何用于结合金属的其他两性离子螯合剂配体。

用螯合剂敏化的时间分辨金属离子探针在树脂上对肽和多肽进行标记可以实现位点专一性标记，通过除去残余的反应成分和染料获得高的纯度，以及前所未有的产率。这避免了以前出现的问题，其中，在重组生产之后对肽或多肽进行标记，或者在通过化学合成组装所述链之后标记，例如，用染料或其他标记物标记折叠的肽或多肽通常会导致标记的非专一性的、非共价结合。相反，采用本发明的在树脂上进行螯合剂标记的方法更容易控制和鉴定用固相连接实现的标记物的定位位置。这是因为在树脂上所有潜在的负反应位点都得到保护，而这些位点在折叠肽或多肽的传统标记中是未保护的；本发明的脂基质协助的化学连接方法还可以提供这一优点，如当螯合剂复合体制剂被用于与化学选择性脲结合或类似的连接。固相合成和树脂标记方法之后要用有机溶剂进行多次洗涤，减少（基本上消除）所有残余的染料或非共价结合的其他标记物。就产率而言，在用镧系离子螯合剂复

合体完成后树脂标记之前，通常得到大约 10-50%的复合反应产率，包括敏化剂与染料的结合（例如，AMCA-X 或喹诺酮 cs124（7-氨基，4-甲基-2（1H）-喹啉）与 TTHA 或 DTPA（二乙三胺五乙酸）敏化复合体结合（报导的 TTHA 的产率为大约 10%-25%，而报导的 DTPA 的产率为 40%-50%）；例如，参见 Heyduk 等，分析生物化学（1997）248: 214; Li 等，美国化学协会（1995）116: 8132; 和 Mathis 等，临床化学（1995）41: 1391）。比较而言，本发明的树脂标记方法基本上是完全的（大于 95%）。在产率上的这种非同寻常的差别在一定程度上是由于（1）在能很好溶解试剂的凝胶材料中所进行的固相合成所固有的优点，和（2）通过预先将螯合剂转化成 TFA 盐在 DFF 中获得高浓度螯合剂（例如，TTHA）的能力。其他优点包括其容易制备。例如，树脂上的标记连接需要固相合成的若干步骤。所有的后续步骤，如连接、纯化和折叠与天然蛋白的相同。相反，折叠蛋白的标记需要有效充分的纯化工作，以便除去未反应的材料。

本发明的方法和组合物具有用于治疗用途的巨大潜力，因为可将其用于诊断试验以及用于药物发现，例如，用于含有感兴趣的膜多肽配体的化合物文库的高处理量筛选。本发明可广泛用于折叠膜多肽，包括一次通过和多次通过膜多肽的合成和结构/功能研究。其中包括来自分别合成的和折叠的外膜和跨膜域的膜多肽的检测标记和组装。另外，在靠近目标化学选择性连接位点残基处包括天然或功能的裂解位点的重组多肽可以裂解并用半合成方法连接到几乎任何需要的肽上。因此，本发明能以明显超过用现有技术所能达到的产率结合多种分子工具，如光谱学探针、非天然氨基酸和分子标记。

组合应用脂基质的物理和化学特性和化学选择性化学连接技术的多样性、专一性和产率提供了接近实际上所有包括一个或多个合适的化学选择性连接位点的膜多肽的途径，而无论所述位点是功能产生的和/或天然存在的。其中包括接近与外膜域连接的一次或多次跨膜域，如 N-末端和 C-末端序列，和/或伸出膜双层的内环。例如，可以用能形成蛋白裂解位点的片段、外源表位、外部跨膜片段、甚至是完整的蛋白系统缩短、切断、或延长外膜环，例如，以便有利于纯化、生物化学/生物物理学研究、或晶体生成。诸如α螺旋的跨膜片段还可以缺失、重复、交换、转运到外源环境，或者用合成的肽取代，以

便鉴定其与所述膜的整合和组装及其功能。作为后续的感兴趣的化学选择性连接化学方法的目标的残基的插入还可用作多种试验的基础，这些试验从跨膜区的二级、三级和四级结构的利用到报导分子锚定点的产生，所述分子通过在其连接位点上包括一个共价键连接标记结合到预先折叠的膜多肽上。由于本发明的方法和组合物能够进行化学合成，并能在膜多肽中形成很多小型的折叠域，特别是α螺旋域，多次跨膜的多肽的组件合成是可能的。

另外，本发明的方法和组合物可被用于通过 FRET 进行共振能量传递测定。其中包括接触能用作定性和定量工具检测并鉴定折叠的脂基质包埋的膜多肽和该多肽的配体之间的相互作用的工具的供体-受体生色团系统，如膜结合受体-配体系统。采用共振能量传递系统的原理和应用很多并且是众所周知的，因此便于通过本发明的方法和组合物加以利用。例如，脂基质协助的化学连接和合成可用于形成一种生色团供体/受体系统，该系统能通过 FRET 检测。由于能量传递的测定使其以荧光检测，该试验是高度敏感的，并且当标记的膜多肽是所述配体的受体时可用于检测配体结合。另外，无论该系统的复杂性或不均匀性如何都能获得有关膜多肽的原子结构性信息。由于共振能量传递的时间规模在纳秒至毫秒的量级上，因此可以分辨许多包括在其他技术中是时间平均的构像子的缓慢转化的方法。该方法可用于推断供体和受体生色团之间的空间关系，以便获得结构信息，包括配体诱导的构像改变。除了用传统光谱荧光仪获得数据之外，FRET 方法也可用于多种体外和体内试验，包括液相层析、电泳、显微术、和细胞流量测定等。因此，本发明可用于体外和体内试验。该方法还用作简单的诊断工具，以及用于膜结构和动力学的研究，或将其扩展到细胞表面或单细胞内部的分子相互作用。

脂基质协助的化学连接和膜多肽合成还可用于“D-目标”筛选。很多药物是针对整合的膜多肽的，如受体，特别是 G-蛋白结合受体，和离子通道。所述药物通常是手性小分子，常为由天然产物衍生的（通常为受体拮抗剂）或手性｛肽、多肽和糖｝分子。后一种生物分子配体可以具有对所述整合膜多肽的兴奋或拮抗作用，这要取决于特定系统的性质。例如，参见 Kent 等 WO93/25667。

所有天然存在的多肽都只能由 L-氨基酸和非手性氨基酸甘氨酸

组成（极为罕见的是，一种氨基酸可以通过翻译后的酶促作用发生手性转化变成相对的“D-”构型）。因此，天然多肽只能由L-构型的多肽链组成。所述手性多肽链折叠形成特定多肽分子所特有的三维结构。正是这种折叠的三维形式赋予了多肽的特性，如结合、酶促活性、转运功能等。

一种多肽的特定折叠形状是由该多肽链上的氨基酸序列和手性决定的。业已通过实验证实，相反手性的多肽链，即由D-氨基酸组成的多肽链[在所有的手性中心为颠倒的立体化学，包括苏氨酸和异亮氨酸的侧链Cβ原子]能折叠形成一种多肽分子，其形状为由折叠相应的L-折叠链所形成的多肽分子的镜像。另外，与相应的L-多肽相比，这种D-多肽具有颠倒的手性配体结合特征，即来自对映体的混合物，所述L-多肽能结合一种化合物的一种对映体，而D-多肽能结合同一种化合物的另一种对映体。

所述镜像特征的颠倒的结合特性可用于发现新的药物，即结合特定的多肽并影响其生物学功能的独特的手性小分子。因此，具有任意手性的并且仅由每一种分子的单一对映体组成的小分子的混合物，如从微生物、植物或其他天然来源分离的天然产物化合物的混合物可用于通过镜像筛选结合分子，即用脂基质协助的化学连接和合成生产的D-形式的膜多肽。通过该方法鉴定为结合分子的手性分子将仅能结合D-多肽，而不能结合相应的L-多肽。不过，如果被鉴定为D-多肽的结合分子的手性分子是作为相同的分子而再生的（合成的），但具有相反的手性，即在用于筛选的原始化合物混合物中不存在其他的对映体，那么新合成的对映体将不能结合用于筛选的D-多肽，而能结合相应的L-多肽。

这样，可以在手性（天然产物）分子文库中发现天然多肽药物目标的独特的手性结合分子。这些结合分子用相应的L-构型的天然多肽是不能发现的。

本发明方法的脂基质协助的膜多肽化学连接还可用于获得对整合膜蛋白的易化接触，所述膜多肽通过诸如脂肪酸、异戊二烯基或糖基磷脂酰肌醇锚的疏水性部分的共价锚定在脂双层上。尽管许多诸如此类的多肽本身是可溶性的，所述疏水性部分的连接有可能降低这些蛋白的溶解度，并使其难于在无细胞环境中起作用。因此，在脂相存

在的条件下进行化学连接有利于对酰化形式的所述蛋白的合成接触，而这种蛋白用其他方法是无法接触的。

诸如肉桂酸的脂肪酸链可以通过酰胺键以位点专一性形式结合在树脂上的肽的 N-末端。异戊二烯基和棕榈酸基可以通过硫醚键连接到树脂上的特定半胱氨酸残基上。然后可以在 HF 中将所述肽从树脂上切除，形成具有共价结合的脂肪酸或脂链的未保护的肽。

以下实施例说明了本发明的各个方面。这些实施例并不限定本发明的范围。

缩写

AGRP	Agouti 相关蛋白
AMCA-X	6-((7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酰)氨基)己酸
Boc	叔丁氧基羰基
CLP	立体脂相基质
DIEA	双异丙基乙胺
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
DMSO	二甲亚砜
DNP	二硝基苯
DOPC	二油酰磷脂酰胆碱
DPC	十二基磷酸胆碱
EDTA	乙二胺四乙酸四钠盐
ES/MS	电喷射质谱法
Fmoc	9-芴基甲氧基羰基
FRET	荧光共振能量传递
HBTU	O-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸
HEPES	4-(2-羟乙基)-1-磺酸哌嗪乙酯
HF	氟化氢
hIL-8	人白介素 8
HPLC	高效液相层析
IRK1	向内调整钾通道孔
KCSA	浅青紫链霉菌的钾离子通道孔
LUV	大型单层小泡
MALDI	基质协助的激光吸收（质谱法）

MBHA	甲基二苯甲基胺
MC4	黑素皮质素
MO	1-单油酰-rac-甘油（C18:1，{顺}-9）
OG	辛基吡喃葡糖苷
PAM	苯基（乙酰氨基）甲基，即$-OCH_2C_6H_4CH_2CONHCH_2C_6H_4-$（聚苯乙烯）
SDS-PAGE	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
TAMRA	羧基四甲基罗丹明
TCEP	三羧基乙基膦
TFA	三氟乙酸
TFE	三氟乙醇
TTHA	三乙四胺六乙酸

实施例

例 1

细菌视紫红质膜多肽的设计和合成

细菌视紫红质在盐杆菌的紫色膜中起着光线驱动的质子泵的作用，并具有特殊的 7 个螺旋结构基序。它是视网膜结合蛋白家族的一部分，该家族包括哺乳动物视觉受体-视紫红质。细菌视紫红质能够从完全变性的状态再折叠成有功能的天然蛋白，并且其原子结构是已知的。还可以设计细菌视紫红质的片段，它能独立地形成在结合到脂膜上时跨过α螺旋的膜双层（Hunt 等，生物物理杂志（1991）59: 400a）。

选择源于细菌视紫红质的第一跨膜α螺旋及其第一胞外环（相当于细菌视紫红质残基 5-42）的膜多肽用于天然化学连接。对所述膜多肽进行修饰，以便 N-末端的苏氨酸残基（相当于细菌视紫红质的 5 号苏氨酸）被半胱氨酸残基取代，以便作为天然化学连接的连接位点（Dawson 等，科学（1994）266: 776-779）。

用 N-末端因子 Xa 蛋白酶裂解位点和若干随机残基对所述半胱氨酸残基加帽，以便检验其通过蛋白酶裂解获得游离的 N-末端半胱氨酸残基的能力。为了方便肽的纯化和 MALDI 分析的检测，将一个亚氨基-生物素标记连接在 C-末端赖氨酸残基上（相当于细菌视紫红质的 41

号赖氨酸）。除非另有说明，所有氨基酸序列都是以从 N-末端到 C-末端方向陈列的。

细菌视紫红质膜多肽 1：天然细菌视紫红质α螺旋 1 和第一胞外环（序列 1）：TGRPEWIWLALGTALMGLGTLYFLVKGMGV SDPDAKK。细菌视紫红质膜多肽 2：半胱氨酸修饰过的细菌视紫红质α螺旋 1 和第一胞外环（序列 2）：CGRPEWIWLA LGTALMGLGTLYFLVKGMGVSDPDAKK。细菌视紫红质膜多肽 3：因子 Xa 蛋白酶裂解位点，半胱氨酸修饰的细菌视紫红质α螺旋 1 和第一胞外环（序列 3）：GKGYIEGRCGRPEWIWLALGTALMGLGTLYFLVKGMGVSDPDAKK。

细菌视紫红质膜多肽 3（序列 3）是利用 Boc 化学法的原位中和方法在 MBHA 树脂上合成的，使用建立的侧链保护方法，所不同的是 C-末端赖氨酸的ε氨基用 Fmoc 基团保护（Schnolzer 等，国际肽蛋白研究杂志（1992）40：180-193）。由机器进行的肽合成是在定制改进的应用生物系统 430A 肽合成仪上按照定型的方法完成的（Schnolzer 等，同上）。在肽合成之后通过在 DMF 中与 20%的哌啶一起温育，除去 C-末端赖氨酸的 Fmoc 保护基团，并通过添加二-亚氨基 N-羟基琥珀酰亚胺（Sigma，St.Louis）将 N-亚氨基生物素基团连接在游离氨基上。通过在 0℃下在有 10%v/v 对甲酚的条件下用 HF 处理 1 小时，同时对所述肽脱保护并从树脂上裂解。在二乙醚中沉淀所述粗制肽，溶解到 75%B（乙氰+0.1%TFA）并冻干。多肽 3（序列 3）通过反向 HPLC 纯化（45-75%B，以 10 毫升/分钟的速度进行 60 分钟以上），并通过电喷射 MS 鉴定（观察分子量为 5080±1kD，计算分子量为 5080kD（平均同位素组成））。用 214nmUV 检测在 Rainin 复式高压混合系统上进行梯度 HPLC，使用 Vydac C-4 半制备柱（10 微米的粒度，1 厘米×25 厘米）或 Vydac C-4 制备柱（10 微米的粒度，2.2 厘米×25 厘米）。用 Sciex API-1 四极离子喷射质谱仪获得电喷射质谱，用 ciphergen xyzTOF-MALDI 仪获得 MALDI 质谱。

例 2

连接标记的设计和合成

设计 C-末端硫酯修饰的连接标记肽 EAQL（序列 4）用于天然化学连接到脂基质结合的膜多肽（序列 2）上，该多肽是在 PAM 硫酯发生树脂上人工合成的，并按上述方法裂解和脱保护。在二乙醚中沉淀

粗制肽，溶解到 50%B 中并冻干．通过半制备反向 HPLC 纯化所述肽（25-45%B，以 10 毫升/分钟的速度进行 45 分钟），并通过电喷射 MS 鉴定（观察分子量为 647±1kD，计算分子量为 647kD（平均同位素组成））。

例 3

CLP 基质的制备和细菌视紫红质膜多肽的结合

按照标准方法通过在 Haraeus Biofuge13 台式离心机上离心脂基质成分制备与膜多肽 3（序列 3）混合的立体相基质．具体地讲，将 75 微克膜多肽 3（序列 3）溶解在 3 微升含有 2%OG 的 200mMTris 混合液（pH8）中．向该多肽溶液加入含有 14.2 毫克 MO 的 1.7 毫升 eppendorf 管中．然后添加 1.5 微升 200mM Tris 缓冲液（pH8），以便降低脂：水比例．在 25℃下以 12，000rpm 的速度离心该混合物 3 小时．根据光学上透明的凝胶样相的形成证实 CLP's 的形成．该相在室温下保持光学透明至少 2 个月．将在 514.5nm 波长下激发的非共振拉曼光谱用于证实添加膜多肽不会破坏 CLP 的膜双层结构，这一结果是通过在 CLP 中缺乏和存在膜多肽的条件下在 2885 和 2845cm^{-1}下 C-H 拉伸模式的强度比例没有改变证实的（Razumas 等，脂类的化学和物理学（1996）84：123-138）。

例 4

CLP 基质结合的细菌视紫红质膜多肽的亲和纯化和 MALDI-TOF 分析

通过添加 33 毫克 OG 将含有细菌视紫红质膜多肽 3（序列 3）的 CLPs（MO）溶解在 100 微升水中．为了防止在分析期间发生不希望的连接，在溶解期间添加 20%的 β-巯基乙醇．用 0.2M 的氢氧化钠将溶解相的 pH 调整到 9.5．将链霉亲和素包衣的磁性珠（Sigma，S2415）添加到溶解相中，并在室温下培养 1 小时．用 20mM Bis-Tris 丙烷缓冲液（pH9.5）洗涤所述磁性珠 5 次，在每一次洗涤之后通过磁力分离．将所述磁性珠重新悬浮在用 50%乙腈/0.1%TFA 制备的 α-氰基-4-羟基-肉桂酸的饱和溶液中．将所述磁性珠/基质悬浮液的 1 毫升样品直接滴加到样品载玻片上，并使其风干．用 Ciphergen 生物系统 Massphoresis 系统飞行时间质谱仪分析所述样品制剂．用肽标准物对所有的光谱进行内部校正，并表示出 25 次射击的平均值。

例 5

CLP 基质-结合的细菌视紫红质膜多肽的蛋白酶裂解

CLP 基质-结合的细菌视紫红质膜多肽 3（序列 3）的蛋白酶裂解是通过将 1.5 微升溶解在 50%甘油和 20mM HEPES、50mM NaCl、2mM $CaCl_2$（pH8.0）中的 1 毫克/毫升的因子 Xa（新英格兰生物实验室）溶液添加到 CLP 中进行的。用塑料移液管头充分混合该混合物，并以 12,000rpm 的速度离心 CLP 15 分钟，以便实现光学透明相的形成。在培养过夜之后的裂解程度和 CLP 结合裂解产物的形成是通过上文所述的 MALDI 质谱法测定的。

例 6

CLP 基质-结合的细菌视紫红质膜多肽的天然化学连接

按以下方法完成 CLP-结合的多肽的天然化学连接。将大约 10 微克连接标记肽 EAQL(序列 4)溶解在 1 微升的 200mM Tris 缓冲液(pH8)中，并添加到含有半胱氨酸末端跨膜多肽（序列 2）的 CLP 中，然后添加 0.5 微升苯硫酚和 3 毫克 MO，以便保持适应 CLP 形成的合适的脂：水比例。用小的移液管头充分混合该混合物。然后以 12，000rpm 的速度离心 CLP 15 分钟，以便形成光学透明相。在特定时间间隔取 CLP 样品，通过上文所述的 MALDI 质谱分析监测连接的进程。初级的化学连接反应产物如下。

细菌视紫红质膜多肽 5：化学连接标记的 Cys-修饰的细菌视紫红质 α 螺旋 1 和第一胞外环（序列 5）：EAQLCGRPEWIWLALGTALM GLGTLYFLVK GMGVSDPDAKK。

图 3 提供了蛋白酶裂解和利用天然化学连接形成标记过的 CLP 基质包埋的膜多肽的示意性说明。在结合到 CLP 脂双层中之后，通过因子 Xa 裂解去掉含有蛋白酶识别位点的 N-末端多肽（A）。然后将相当于细菌视紫红质的 N-末端的连接肽（Ile4 被 Leu4 取代，以便优化连接）连接到所述跨膜多肽上，以便获得完整的细菌视紫红质 N-末端（B）。通过获得通过 N-亚氨基生物素标记物吸附到磁性珠上的跨膜多肽的 MALDI 质谱测定裂解程度和在 CLP 内部的连接进程。

图 4 表示典型的 MALDI 质谱输出，由它监测通过蛋白酶裂解形成的游离未保护的 N-末端半胱氨酸，然后通过化学连接将选择的肽连接到该残基。质谱 A 表示在将 CLP 溶解在 OG/20%β-巯基乙醇中之后多肽 3(序列 3)在结合到 CLP 中之后的 MALDI 质谱。该质谱在 m/z=5080

处出现一个主峰，相当于未裂解的多肽 3（序列 3）的质量。较小的峰表示来自亲和珠的杂质，并且在没有蛋白的情况下也会出现（资料未发表）。质谱 B 表示同一种多肽在用因子 Xa 裂解过夜之后的质谱。m/z=5080 处的主峰的消失与 m/z=4220 处的主峰的出现相伴，这与通过因子 Xa 完全除去了半胱氨酸加帽序列 GKGYIEGR 和多肽 2（序列 2）的生成吻合。

质谱 C、D 和 E 监测在将多出 2 倍的连接肽 4（序列 4）和 5%苯硫酚添加到 Cys-末端膜多肽 2（序列 2）中之后分别培养 25 分钟和 75 分钟和过夜之后的连接产物的出现。m/z=4220 处的峰的逐渐消失与 m/z=4661 处的峰的加强相伴，它证实了 α 螺旋跨膜多肽 2（序列 2）和连接肽 4（序列 4）之间天然酰胺键形成的进程。根据 MALDI 质谱片段，Cys-加帽跨膜多肽向完全连接的跨膜多肽（序列 5）的转化完成了超过 90%。

例 6

结合在立体脂相中的膜多肽的反向 HPLC 纯化

按上述方法用膜多肽 1（序列 1）和膜多肽 4（序列 4）进行膜多肽化学连接，以便形成 CLP-结合的膜多肽 5（序列 5）。在连接完成之后，将完整的 CLP 溶解在 50 微升含有 50mM 甲酸的 50%异丙醇水溶液中。然后用等体积的 50mM 甲酸水溶液稀释该溶液。

用 45%（6: 3: 1/异丙醇/乙腈/水，含有 0.1%TFA）平衡 C18 反向 HPLC 柱。将 20 微升溶解的 CLP 注入所述柱，并用 45%含有 0.1%TFA 的异丙醇/乙腈/水进行等度洗脱。在等度洗脱 10 分钟之后，连接的膜多肽 5（序列 5）被洗脱，并通过 ES/MS 进行阳性鉴定。MO 在 16 和 20 分钟之间被等度洗脱。通过冻干分离膜多肽 5（序列 5）。

例 7

细菌视紫红质膜多肽在 CLP 基质中的定位

用含水缓冲液填充 CLP 内部的通道，脂: 洗涤剂比例为 300: 1，多余的洗涤剂被吸附到脂双层相内。另外，在没有洗涤剂的条件下也观察到了完全连接（资料未发表）。肽 1 是高度疏水性的肽，并且不能溶解在 6M 盐酸胍/200mM 磷酸（pH7.5）中。因此，不可能有大量的这种肽溶解在所述水通道中。另外，在将 1 毫克肽结合到相同规模的 CLP 上之后，以 12,000rpm 的速度长时间离心 CLP's 之后没有观察

到可见的疏水性肽的聚合。结合以前通过 CD FTIR 光谱法和蛋白水解保护实验进行的观察，即肽 1 能在脂质体体内独立折叠成α螺旋跨膜肽（Hunt 等，生物物理杂志（1991）400a），合理的解释是肽 1 的裂解和结合是在结合到膜双层上的肽上进行的。

以上实施例总体上表明，跨膜肽 3（序列 3）的裂解和跨膜肽 2（序列 2）和肽 4（序列 4）的连接确实是在结合到膜双层上以便形成脂基质的多肽上进行的，其中，跨膜肽 5（序列 5）被正确的和有功能的包埋。

例 8

CLP 基质上的细菌视紫红质膜多肽的生色团标记和 FRET 分析

构建生色团标记过的 CLP 基质包埋的细菌视紫红质膜多肽并通过 FRET 分析，首先用 TTHA 香豆素标记细菌视紫红质膜多肽 1（序列 1），并用 TEXAS RED 标记硫酯连接标记-肽 4（序列 4）。

使用已经建立的侧链保护方法用 Boc 化学法的原位中和分别在 PAM 硫酯发生树脂和羧基发生树脂上合成膜多肽 1（序列 1）和连接标记肽 4（序列 4）。所述跨膜细菌视紫红质与香豆素-镧系的复合体如下。

在实际标记步骤之前，制备 TTHA-TFA 盐试剂；在室温下将 100 毫克 TTHA 在 50 毫升纯 TFA 中溶解 4 小时。在 Rotavap 上干燥该溶液，溶解在 50%乙腈水溶液中，并冻干，以便得到极易溶解在 DMF 中的白色粉末。

在树脂上标记游离氨基：为了连接所述多肽的 N-末端，在 DMF 中平衡 N-末端 Boc 保护的肽树脂。通过用 TFA 处理（2×1 分钟）除去末端 Boc 基团，然后用 DMF、溶解在 DMF 中的 10%的 DIEA 和 DMF 洗涤。为了连接在赖氨酸残基上，在链组装期间将-Fmoc 保护的 Boc 赖氨酸结合到目标多肽链上。通过用溶解在 DMF 中的 20%的哌啶处理（2×5 分钟）或通过用超出 2 倍量的 DBU 处理硫酯发生树脂上的目标多肽 1 分钟除去 Fmoc 基团。然后用 DMF 洗涤所述多肽。

AMCA-X-螯合复合荧光探针：在 DMF 中平衡 N-末端 Boc 保护的肽树脂。通过用溶解在 DMF 中的 20%的哌啶处理 10 分钟除去膜多肽 1（序列 1）上的赖氨酸 36 的 Fmoc 保护基团。然后，将 10 毫克 AMCA-X（超出大约 2 倍）溶解在 150 微升 DMSO 中，并添加到 0.01mM 控干的肽树

脂上 1 小时。用 DMSO 和 DMF 洗脱未反应的 AMCA-X。在偶联反应之前和之后进行的茚三酮实验证实了高于 95%的反应效率。将 0.03mM TTHA-TFA 盐溶解在等摩尔量的用含有大约 20%DIEA 的 DMF 制备的 0.5M HBTU 溶液中，并偶联所述肽树脂过夜。用 DMF 和二氯甲烷洗涤所述树脂并干燥。用标准方法进行 HF-树脂裂解和肽纯化（Schnoelzer, 1992, 同上）。为了与镧系离子（Eu^{3+}, Tb^{3+}或 Sm^{3+}）配合，将所述肽溶解在含有 3 倍过量含水镧系氯化物的 50%乙腈中。通过 ES/MS 分析监测金属结合。复合多肽的吸收光谱在 329nm 处表现出最大吸收值。

德克萨斯红荧光探针：在 DMF 中平衡 N-末端 Boc 保护的多肽（序列 4）树脂，并通过用 TFA 处理两次，每次 1 分钟除去 Boc 基团。然后通过用 10%DIEA 处理 2×1 分钟中和 N-末端。将 25 毫克德克萨斯红（超量大约 2 倍）溶解在 150 微升 DMSO 中，并添加到 0.02mM 控干的肽树脂上 1 小时。用 DMSO 和 DMF 洗脱未反应的染料。在连接反应之前和之后进行的茚三酮实验证实了高于 95%的反应效率。按照标准方法进行 HF-树脂裂解和肽纯化（Schnoelzer, 1992, 同上）。

如在例 4 中所述，将两种肽（序列 1 和序列 4）加入 CLP 基质中，同时加入含有 3 倍过量的螯合金属（Eu^{3+}, Tb^{3+}或 Sm^{3+}）和 1%苯硫酚的含水缓冲液。在连接之后，将含有连接的膜多肽的脂基质转移到小的样品池中，并平衡，以便获得光学上各向同性的 CLP 基质凝胶。荧光能量传递实验是在 fluorolog3 光谱荧光仪上进行的，用脉冲 Xe 闪光灯在 330nm 下激发，并在 50 微秒的间隔之后在 500 和 750nm 之间检测。通过与细菌视紫红质晶体结构上的标记位点之间的已知距离进行比较分析 FRET 距离。

例 9

脂质体结合的细菌视紫红质膜多肽的化学连接

为了制备脂小泡，将卵磷脂溶解在 2: 1 的氯仿/甲醇中，在圆底烧瓶中蒸发以便形成干膜，并在冻干仪中在真空条件下进行干燥，通过涡旋搅拌 30 秒将树脂类悬浮在含水缓冲液（5mM HEPES, 0.2mM EDTA, pH7.2）中，以便形成多层脂质体小泡。在进行 10 轮冷冻/解冻之后由磷脂制备 LUV's，3 次挤压通过具有 0.4 微米孔的直径的聚碳酸酯膜，10 次通过具有 0.1 微米孔直径的膜。以 500×g 的速度离

心该溶液，使脂类聚合体沉淀，然后以 48,000×g 的速度使脂质体沉淀。

将细菌视紫红质膜多肽 3（序列 3）溶解在少量纯 TFE 中，并添加到卵磷脂脂质体小泡在含水缓冲液（5mMHEPES，0.2mMEDTA，pH7.2）中的悬浮液中，脂:蛋白的比例为 1000:1。通过监测色氨酸超过 300nm 的荧光发射观察膜多肽与脂质体脂膜的结合。以 48,000g 的速度沉淀蛋白脂质体，并在-80℃下以等分试样的形式冷冻。

为了化学连接所述脂包埋的多肽，将一个等分的蛋白脂质体悬浮在 5mM HEPES，0.2mM EDTA，pH7.2 中，并用 1/100th 摩尔当量的因子 Xa 蛋白酶处理，并按照例 3 和 5-6 所述连接，连接监测如例 4 所述。

例 10

微团结合的细菌视紫红质膜多肽的化学连接

将 300 微克膜多肽 2（序列 2）和 50 微克 C-末端 α-硫酯改性的连接多肽 4（序列 4）溶解在含有 10%Ammonyx-LO（N,N-二甲基氧化胺）和 1 微升苯硫酚的 100μl 100mM 磷酸缓冲液（pH7.5）中，在室温下 eppendorf 管中搅拌该溶液 24 小时。通过分析反向 HPLC 监测连接的进程。通过半制备反向 HPLC 分离连接的膜多肽，并采用电喷射质谱法通过质量分析证实连接产物的性质（膜多肽 5（序列 5））。

例 11

细胞膜结合的黑素皮质素受体 MC4 的化学连接

按以下方法实施对包埋在从细胞中分离的天然脂膜片中的重组产生的黑素皮质素受体 MC4 的膜多肽化学连接。按如下方法构建能超量表达含有工程制造的因子 Xa 的裂解位点（序列 6）的 MC4 受体的 HEK-293 细胞，其中，MC4 受体膜多肽 w/因子 Xa 裂解位点（序列 6）具有以下氨基酸序列:

MVNSTHRGMH TSLHLWNRSS YRLHSNASES
LGKGYIEGRC YEQLFVSPEV FVTLGVISLL
ENILVIVAIA KNKNLHSPMY FFICSLAVAD
MLVSVSNGSE TIIITLLNST DTDAQSFTVN
IDNVIDSVIC SSLLASICSL LSIAVDRYFT
IFYALQYHNI MTVKRVGIII SCIWAACTVS
GILFIIYSDS SAVIICLITM FFTMLALMAS

LYVHMFLMAR LHIKRIAVLP GTGAIRQGAN

MKGAITLTIL IGVFVVCWAP FFLHLIFYIS

CPQNPYCVCF MSHFNLYLIL IMCNSIIDPL

IYALRSQELR KTFKEIICCY PLGGLCDLSSRY

设计 MC4 膜多肽（序列 6）用于在因子 Xa 裂解之后化学连接到具有以下氨基酸序列的 C-末端 α-硫酯修饰的 MC4 受体连接标记（序列 7）上:

MVNSTHRG MHTSLHLW

NRSSYRLH SNASESLG

KGYSDGG

将所述连接标记选择性地修饰成含有其他改进，如插入非天然氨基酸，同位素标记的氨基酸，或连接在特定位点上的荧光探针。例如，通过按例 8 所述在 DMSO 中连接德克萨斯红修饰连接标记的 N-末端。

按以下方法构建能超量表达 MC4 受体（序列 6）的真核 HEK-293 细胞。将 MC4 受体基因的编码区亚克隆到噬菌体 M13 上，以便进行单链定点诱变（Sambrook，同上）。利用寡核苷酸定点诱变（Kunkel，1984; Zoller&Smith，1987），体外诱变试剂盒（Mut-Gene T4® （BioRad; Hercules，CA）产生因子 Xa 位点（含有突变受体基因的噬菌体 M13 载体，pGRFN-MC4-8a）。通过单链 DNA 测序证实因子 X 裂解位点的存在（测序酶 2.0 版（生命科学; 克里夫兰，OH））。将编码突变 MC4 受体的 DNA 亚克隆到真核表达载体 pcDNA3.1（Invitrogen，Carlsbad，CA）上，以便产生 MC4 受体表达结构，pGRFN-MC4-8b。按照标准方法将该结构转染到 HEK293 细胞（ATCC，Manassas， VA）中（LipfectAmine Reagent®（生命技术; Gaithersburg，MD）），以便获得细胞系 cGRFN-MC4-8a。

从表达 MC4 受体膜多肽（序列 6）的 cGRFN-MC4-8a 细胞中分离膜片。从 10 厘米培养平板上回收每个细胞含有大约 10^7 受体的细胞，用 PBS（PBS: 1.12M 氯化钠，2.6mM 氯化钾，8.1mM 磷酸氢二钠，pH7.4）洗涤 5 次，并在低渗缓冲液（1mM Tris-HCl，pH6.8，10mM EDTA）中培养。在注射器中通过 26 号的针头剪切 3 次破坏细胞。将破坏的细胞加样到梯度密度梯度上，并以 20,000 × g 的速度离心 10 分钟。用巴斯德移液管吸取含有膜片的梯度界面。以 48,000 × g 的速度沉淀

膜片 10 分钟，并洗涤 3 次，然后沉淀。除非另有说明，所有过程都是在 4℃下进行的。

为了用因子 Xa 裂解 MC4 膜多肽（序列 6）并天然化学连接到 MC4 受体连接标记（序列 7）上，将含有重组 MC4 受体（序列 6）的膜片悬浮在含有蛋白酶抑制剂的 50 微升的 100mM Tris/pH8 中，所述抑制剂不针对因子 Xa 蛋白酶，如抑蛋白酶肽，2 毫克/毫升，溶液中还含有 N-[N-（L-3-反式-carboxirane-2-羰基）-L-亮氨酰]-胍丁胺，10 微克/毫升，和胃酶抑制剂 A，2 毫克/毫升。加入 2 微升因子 Xa 溶液（1.0 毫克/毫升），并在室温下（大约 25℃），培养该悬浮液过夜。以 48，000×g 的速度使膜片沉淀，并用 100mM 磷酸缓冲液（pH7.5）洗涤 3 次。用因子 Xa 裂解 MC4（序列 6）得到了 MC4 受体膜多肽因子 Xa 裂解产物（序列 8）：

CYEQLFVSPE VFVTLGVISL LENILVIVAL
AKNKNLHSPM YFFICSLAVA DMLVSVSNGS
ETIIITLLNS TDTDAQSFTV NIDNVIDSVI
CSSLLASICS LLSIAVDRYF TIFYALQYHN
IMTVKRVGII ISCIWAACTV SGILFIIYSD
SSAVIICLIT MFFTMLALMA SLYVHMFLMA
RLHIKRIAVL PGTGAIRQGA NMKGAITLTI
LIGVFVVCWA PFFLHLIFYI SCPQNPYCVC
FMSHFNLYLI LIMCNSIIDP LIYALRSQEL
RKTFKEIICC YPLGGLCDLS SRY

按以下方法在膜片上实施裂解的 MC4（序列 8）与有或没有 AMCA-X/TTHA/Eu^{3+}的 MC4 连接标记（序列 7）的化学连接。将含有 C-末端硫酯的 MC4 连接标记（序列 7）的 2mM 溶液加入含有 1%苯硫酚的 1.5 摩尔盐酸胍/100mM 磷酸钠（pH7.5）中，并培养过夜。将含有 C-末端硫酯的荧光标记过的或天然的 MC4 连接标记（序列 7）添加到含有 1%苯硫酚的 1.5 摩尔盐酸胍/100mM 磷酸（pH7.5）中。按例 8 所述方法用 AMCA-X/TTHA/Eu^{3+}螯合物进行标记，作了以下改进。在培养过夜之后，用 PBS 洗涤含有修饰过的 MC4 受体的膜，并在-80℃下冷冻样品。具有以下氨基酸序列（序列 9）的连接产物相当于有或没有位点专一性荧光标记的半合成脂基质包埋的 MC4 受体：

MC4 受体膜多肽连接标记连接（序列 9）：

MVNSTHRGMH TSLHLWNRSS YRLHSNASES
LGKGYSDGGC YEQLFVSPEV FVTLGVISLL
ENILVIVAIA KNKNLHSPMY FFICSLAVAD
MLVSVSNGSE TIIITLLNST DTDAQSFTVN
IDNVIDSVIC SSLLASICSL LSIAVDRYFT
IFYALQYHNI MTVKRVGIII SCIWAACTVS
GILFIIYSDS SAVIICLITM FFTMLALMAS
LYVHMFLMAR LHIKRIAVLP GTGAIRQGAN
MKGAITLTIL IGVFVVCWAP FFLHLIFYIS
CPQNPYCVCF MSHFNLYLIL IMCNSIIDPL
IYALRSQELR KTFKEIICCY PLGGLCDLSS RY

将含有化学连接的 MC4 受体（序列 9）的膜片溶解在 10%SDS-PAGE 加样缓冲液中，并加样到 10%SDS-PAGE 凝胶上，通过 Western 印迹进行鉴定。或者，直接在凝胶上观察荧光探针标记的 MC4 受体。

例 12

生色团标记的黑素皮质素受体 MC4 的 FRET 分析

按以下方法实施 cs124/TTHA/Tb^{3+}或 AMCA-X/TTHA/Eu^{3+}螯合标记的 MC4 受体的 FRET 分析。按例 11 所述构建含有携带 cs124/TTHA/Tb^{3+}或 AMCA-X/TTHA/Eu^{3+}螯合物的受体的膜片，并悬浮在 200 微升样品池中的 PBS 中。按例 1 所述用 TAMRA（与 Tb^{3+}螯合剂配对）或德克萨斯红（与 Eu^{3+}螯合剂配对）标记 MC4 受体配体 AGRP。人 AGRP 序列（序列 10）如下：

MLTAAVLSCAL LLALPATRGAQ MGLAPMEGIRR
PDQALLPELPG LGLRAPLKKTT AEQAEEDLLQE
AQALAEVLDLQ DREPRSSRRCV RLHESCLGQQV
PCCDPCATCYC RFFNAFCYCRK LGTAMNPCSRT

从母液中将 TAMRA 标记过的或德克萨斯红标记过的 AGRP 滴定到所述样品池中，并在装有 Xe 闪光灯的 Fluorolog3 光谱荧光仪上获得荧光光谱。在 50 微秒之后在 400 和 700nm 之间检测发射 1 毫秒。

为了筛选配体结合的抑制剂，加入潜在的抑制剂，并监测荧光光谱形状的改变。或者，监测荧光发射的减弱，TAMRA 在 543nm 下监测，

或者德克萨斯红在 614nm 下监测。用所述抑制剂取代淬火天然配体可以在该波长下延长荧光寿命。

例 13

向内调整的钾通道孔 IRK1 的全合成及其与毒素配体相互作用的 FRET 分析

根据浅青紫链霉菌的同源的钾通道的三维结构设计通道孔 IRK1 的全化学合成和生色团标记的多肽（Dole 等，科学（1998）280: 69-77），并用于进行毒素结合（MacKinnon 等，科学（1998）280: 106）。构建所述多肽，使得 N-末端结构域需要所述外部螺旋，而所述 C-末端结构域形成内部和孔的螺旋。在 IRK1 的 120 号位置上工程产生一个甘氨酸残基，以便进行化学连接。用于分步合成的多肽和 IRK1 的连接产物如下面的序列所示:

IRK1 N-末端结构域多肽（序列 11）:

MTIFITAFLG SWFFFGLLWY AVAYIHKDLP EFHPSANHTG

IRK1 C-末端结构域多肽（序列 12）:

CVENINGLTS AFLFSLETQV TIGYGFRCVT

EQCATAIFLL IFQSILGVII NSFMCGAILA KISRPK

全合成/连接 IRK1 多肽（序列 13）:

MTIFITAFLG SWFFFGLLWY AVAYIHKDLP

EFHPSANHTG CVEAINSLTD AFLFSLETQV

TIGYGFRCVT EQCATAIFLL IFQSILGVII

NSFMCGAILA KISRPK

利用业已建立的侧链保护方法，用 Boc 化学法的原位中和在 PAM 硫酯发生树脂上合成 IRK1 的 N-末端（76-120）（序列 11）。按上述方法将 TTHA-香豆素标记连接在 N-末端多肽的 N-末端。在 0℃下通过在有 10%v/v 对甲酚的条件下用 HF 处理 1 小时，同时对所述肽脱保护并从树脂上裂解。沉淀所述粗制肽，并在冰镇的乙醚中洗涤 3 次，溶解在纯的 TFA 中。在 Rotavap 上除去 TFA，并将残余物溶解在纯的 TFE 中，形成透明的溶液。用 50%的含有 0.1%TFA 的乙腈水溶液稀释 TFE 溶液 10 倍并冻干。

为了进行纯化，将粗制多肽溶解到纯的 TFE 中，并用 2 当量的含有 100mM 乙酸（pH4）的 6M 的盐酸胍稀释。将所述材料加样到 1 英寸

ID C4 制备 HPLC 柱上，该柱用 45%的缓冲液 B（100%乙腈，含有 0.1%TFA）平衡。在用 45%的 C 缓冲液以 10 毫升/分钟的速度等度洗脱该柱 15 分钟之后，所述肽在 60 分钟内以 10 毫升/分钟的速度在 45%-75%的梯度中洗脱。收集分别为 5 毫升的级份，并通过 ES/MS 分析纯度。

利用业已建立的侧链保护方法，用 Boc 化学法的原位中和方法在酰胺发生 MBHA 树脂上合成 IRK1 的 C-末端（120-186）（序列 12）。在 0℃下通过在有 10%v/v 对甲酚的条件下用 HF 处理 1 小时，同时对所述肽脱保护并从树脂上裂解。沉淀所述粗制肽，并用冰镇的乙醚洗涤 3 次，溶解在纯的 TFA 中。在 Rotavap 上除去 TFA，并将残余溶解在纯的 TFE 中，形成透明的溶液。用 50%的含有 0.1%TFA 的乙腈水溶液稀释 TFE 溶液 10 倍并冻干。

为了进行纯化，将所述粗制多肽溶解到纯的 TFE 中，并用 2 当量的含有 100mM 乙酸（pH4）的 6M 的盐酸胍稀释。将所述材料加样到 1 英寸 ID C4 制备 HPLC 柱上，该柱用 65%的缓冲液 C（60%异丙醇，30%乙腈，10%水，含有 0.1%TFA）平衡。在用 65%的缓冲液 C 以 10 毫升/分钟的速度等度洗脱该柱 15 分钟之后，所述肽在 45 分钟内以 10 毫升/分钟的速度在洗脱到 65%-95%的缓冲液 C 的梯度中。用镧系离子螯合剂（例如，TbCl3）重建分别为 5 毫升的收集的级份，并通过 ES/MS 分析纯度。

为了在 CLP 基质形成脂类中进行脂基质协助的膜化学连接，将 50 微克 N-末端多肽（序列 11）和 60 微克 C-末端多肽（序列 12）溶解在 3 微升 DMSV 中，并添加到装在 Eppendorf 离心管中的 42.6 毫克 MO 和 1 微升苯硫酚中。将该混合物离心 2.5 小时，直到形成透明相。让该反应进行移液。MALDT 分析证实了连接产物（序列 13）的存在。

考虑到已知的通道/毒素相互作用位点通过化学合成构建被设计用来结合到合成 IRK1 钾通道的 Agitoxin 配体（序列 14）（Doyle 等，同上；Savarin 等，生物化学（1998）37: 5407-5416）。按照例 8 所述方法将德克萨斯红标记连接到 Agitoxin2（序列 14）的 C-末端赖氨酸（残基 39）上。毒素 IRK1 Agitoxin2 配体（序列 14）具有以下氨基酸序列:

GVPINVSCTG SPQCIKPCKD AGMRFGKCMN RKCHCTPK

通过反向 HPLC 纯化 IRK1 毒素肽，并在含有 8mM 胱氨酸/1mM 半胱氨酸的 2M 盐酸胍/100mMTris，pH8.6 中折叠，然后以 10 毫升/分钟的速度进行 45 分钟的制备反向 HPLC（25-45%B（异丙醇/乙腈 2:1））。

然后让冻干的 IRK1 毒素与含有镧系离子螯合剂标记过的 IRK1 膜多肽（序列 13）的 CLP 基质混合，并离心平衡。然后将透明的红色凝胶加样到 Spex-Fluorolog3 荧光剂上的固定样品架上，并通过获得该凝胶在 450 和 600nm 之间激发的 330nm 的激发荧光光谱确定能量传递的存在。然后将小分子拮抗剂的水溶液混入 CLP 中，并通过荧光的减弱观察所述毒素从通道中排出。

例 14

CLP-结合的浅青紫链霉菌通道的化学连接

根据已知的 KCSA 结构设计浅青紫链霉菌的钾离子通道孔的跨膜域的肽（KCSA）（Doyle 等，科学（1998）280: 69-77）。设计用于连接的 N-末端跨膜域（序列 15），用于形成外部螺旋，而设计的 C-末端跨膜域（序列 16）形成内部和孔螺旋。这种连接设计产生了一种天然存在的 KCSA 的截短形式，以便从胞外部分分离该跨膜域的功能部分。另外，在肽合成期间将半胱氨酸结合到天然存在的 KCSA 的 Ala54 位置上（160 个残基），以便引入一个能够进行天然化学连接的化学选择基团，从而在该连接位点上产生一个天然肽主链。N-末端、C-末端和最终的连接产物的序列如下。

KCSA 钾通道 N-末端片段（序列 15）：

ALHWRAAGAA TVLLVIVLLA GSYLAVLAER G

KCSA 钾通道 C-末端片段（序列 16）：

CPGAQLITYP RALWWSVETA TTVGYGDLYP

VTLWGRLVAV VVMVAGITSF GLVTAALAT

KCSA 钾通道连接产物（序列 17）：

ALHWRAAGAA TVLLVIVLLA GSYLAVLAER

GCPGAQLITY PRALWWSVET ATTVGYGDLY

PVTLWGRLVA VVVMVAGITS FGLVTAALAT

用 Boc 化学法的原位中和方法和业已建立的侧链保护方法在 PAM 硫酯发生树脂上合成 KCSA 的 N-末端（残基 23-53）（序列 15）。通

过在0℃下在有10%v/v对甲酚的条件下用HF处理1小时，同时对所述肽脱保护并从树脂上裂解。沉淀所述粗制肽，并用冰镇的乙醚洗涤3次，溶解在纯的TFA中。在Rotavap上除去TFA，并将残余溶解在纯的TFE中，形成透明的溶液。用50%的含有0.1%TFA的乙腈水溶液稀释TFE溶液10倍并冻干。为了进行纯化，将粗制肽（序列15）溶解到纯的TFE中，并用2当量的含有100mM乙酸（pH4）的6M的盐酸胍稀释。将所述材料加样到1英寸ID C4制备HPLC柱上，该柱用45%的缓冲液C（60%异丙醇，30%乙腈，10%水，含有0.1%TFA）平衡。在用45%的缓冲液C以10毫升/分钟的速度等度洗脱该柱15分钟之后，所述肽在60分钟内以10毫升/分钟的速度洗脱到45%-75%缓冲液C的梯度中。收集分别为5毫升的级份，并通过ES/MS分析纯度。

用Boc化学法的原位中和方法和业已建立的侧链保护方法在酰胺发生MBHA树脂上合成KCSA的C-末端（残基54-118）（序列16）。通过在0℃下在有10%v/v对甲酚的条件下用HF处理1小时，同时对所述肽脱保护并从树脂上裂解。沉淀所述粗制肽，并用冰镇的乙醚洗涤3次，溶解在纯的TFA中。在Rotavap上除去TFA，并将残余溶解在纯的TFE中，形成透明的溶液。用50%的含有0.1%TFA的乙腈水溶液稀释TFE溶液10倍并冻干。为了进行纯化，将粗制肽（序列16）溶解到纯的TFE中，并用2当量的含有100mM乙酸（pH4）的6M的盐酸胍稀释。将所述材料加样到1英寸ID C4制备HPLC柱上，该柱用65%的缓冲液C平衡。在用65%的缓冲液C以10毫升/分钟的速度等度洗脱该柱15分钟之后，所述肽在45分钟内以10毫升/分钟的速度洗脱到65%-95%缓冲液C的梯度中。收集分别为5毫升的级份，并通过ES/MS分析纯度。

为了结合到CLP基质上，将50毫克MO溶解在2毫升（2: 1氯仿/甲醇）中。将2毫克DOPC加入该溶液中。将70微克N-末端肽（序列15）和90微克C-末端（序列16）溶解在150微升TFE中，并在玻璃瓶中加热到60℃保持30分钟。然后合并以上两种溶液。通过用氩气吹去溶剂使合并的溶液干燥，并在真空条件下放置过夜，以便得到乳状膜。将35微升磷酸钠（100mM，pH7.5）和0.5微升苯硫酚加入该干燥膜中。将该混合物离心2.5小时，直到形成透明相。让该反应进行过夜。次日，将100微升含有20%β-巯基乙醇的TFE加入该相

中。对该相进行简单地涡旋搅拌，并在台式离心机上离心 10 分钟。然后加入溶解在 0.1%TFA 水溶液中的 150 微升缓冲液 C（6: 3: 1 异丙醇/乙腈/水，含有 0.1%TFA）。将残余的沉淀溶解在纯的 TFA 中。对该溶液进行过滤，并加入一勺 TCEP，以便还原该样品。最后，将溶解的反应混合物注入装有用缓冲液 C 平衡的二乙烯基苯的 GPC（凝胶渗透层析）柱上。收集洗脱峰，并通过 MALDI 质谱法分析其级份（参见图 10）。

例 15

微团结合的 HIVvpu 离子通道的化学连接

HIV vpu 离子通道的全化学合成是用天然化学连接按以下方法进行的。在硫酯发生树脂上合成 N-末端肽（vpu 残基 1-39）（序列 18）：MEPIQLAIVALVVAIIIAIVVWSIVIIYRKILRQRKID，并在标准树脂-OCH2PAM 上合成 C-末端肽（vpu 残基 40-81）（序列 19）：CLIDRLIERAEDSGNESEGEISALVEMGVEMGHHAPWDIDDL。通过非天然半胱氨酸残基的天然化学连接将所述肽结合在一起，所述非天然半胱氨酸残基是在肽合成期间以适当方式引入的，并位于所述蛋白的中央。用含有 25mM 磷酸缓冲液（pH7.5）成微团连接缓冲液制备 N-末端肽的 2mM 溶液，所述磷酸缓冲液含有 8M 尿素、250mM DPC 和 1 微升苯硫酚。向该溶液中加入多出 1.2 倍摩尔数的 C-末端肽，在室温下在 Eppendorf 管中搅拌该溶液 3 小时。通过分析反向 HPLC 监测该连接的进程。该反应在 3 小时之后结束，原始反应成分的产率大于 95%。用半制备反向 HPLC 分离连接的膜多肽，并通过用电喷射质谱法进行质谱分析证实连接产物的性质，该产物具有相当以下预期序列的质谱（序列 20）：

MEPIQLAIVA LVVAIIIAIV VWSIVIIYRK
ILRQRKIDCL IDRLIERAED SGNESEGEIS
ALVEMGVEMG HHAPWDIDDL

参见图 9.

例 16

微团结合的流感 M2 离子通道的化学连接

按照例 15 所述方法用下面的用于微团介导连接的 M2 肽制备流感 M2 离子通道的全化学合成。在硫酯发生树脂上合成的 N-末端肽具有

序列（序列 21）：

MSLLTEVETP IRNEWGSRCN DSSDPLVVAA SIIGILHLIL WILDRLFFK

它相当于 M2 残基 1-49. 在标准树脂-OCH2 PAM 上合成的 C-末端肽具有以下序列（序列 22）：

CIYRFFEHGL KRGPSTEGVP ESMREEYRKE QQSAVDADDS HFVSIELE

它相当于 M2 残基 50-97. 在采用 HIV vpu 离子通道时，该反应在 3 小时之后结束，在该反应中有超过 95%的原始肽被连接，得到连接产物（M2 残基 1-97）. 半制备反向 HPLC 和采用电喷射质谱法进行的质谱分析证实了该连接产物的质量相当于以下预期序列（序列 23）：

MSLLTEVETP IRNEWGSRCN DSSDPLVVAA
SIIGILHLIL WILDRLFFKC IYRFFEHGLK
RGPSTEGVPE SMREEYRKEQ QSAVDADDSH
FVSIELE

对结合到 DPC 微团上的 M2 连接产物进行的分析超离心证实，M2 寡聚成了四聚体.

例 17

人 IL-8 趋化因子的全化学合成和树脂标记以及在溶液中二聚体化的 FRET 分析

人 IL-8（h IL-8）是 α（CXC）趋化因子家族的成员，并且业已对其二聚体化特性做过充分研究（Rajaratham 等（1997）酶学方法 287: 89-105）. 用 FRET 对在树脂上合成并标记 hIL-8，以便在溶液中鉴定二聚体化特征，并用于通过其膜多肽受体 CXCR1 和 CXCR2 进行实验. FRET 对 TTHA-cs124-Tb^{3+}标记（供体）和 TAMRA（受体）是被选择用于该目的的合适的标记系统的一个例子.

用已经公开的该蛋白的氨基酸序列设计人 IL-8 树脂全化学合成和荧光标记所需的肽. 为了合成和标记设计，将额外的赖氨酸残基添加到 C-末端，以便荧光探针结合在树脂上，并选择该序列中间的一个半胱氨酸连接位点，得到具有 33 和 40 个氨基酸的两种多肽.

hIL-8（1-33）N-末端肽（序列 24）：

SAKELRCQCI KTYSKPFHPK FIKELRVIES GPH

hIL-8（34-73）C-末端肽（序列 25）：

CANTEIIVKL SDGRELCLDP KENWVQRVVE KFLKRAENSK

合成的全长 hIL-8（1-73）（序列 26）：

SAKELRCQCI KTYSKPFHPK FIKELRVIES

GPHCANTEII VKLSDGRELC LDPKENWVQR

VVEKFLKRAE NSK

合成 hIL-8（1-33）N-末端硫酯肽，按上述方法脱保护和裂解，例如，参见例 13. 为了进行纯化，首先将粗制肽溶解在 6 摩尔盐酸胍/0.1M 乙酸钠，pH4.0 中，然后加样到用 10%缓冲液 B（100%的乙腈，含有 0.1 %的 TFA）平衡的 C4 反向制备柱上. 通过用 10%的缓冲液 B 以 13 毫升/分钟的速度等度洗脱 15 分钟将胍洗脱. 在 60 分钟内用 30%-50%的梯度洗脱所述肽. 分别收集 6 毫升的级份，通过 ES/MS 分析纯度，然后冻干.

在 MBHA 树脂上合成受体标记的 C-末端肽 hIL-8(34-73-TAMRA)，并按例 8 所述方法用 5-（和 6-）-羧基四甲基罗丹明，5 酰亚胺酯标记. 然后以类似 N-末端肽的方式对所述多肽进行脱保护、裂解和纯化. 按以下方法制备供体标记的 C-末端肽 hIL-8-TTHA-cs124. 通过 20%的哌啶（2x5 分钟）除去赖氨酸 73 上的 Fmoc 侧链，然后用 DMF 充分洗涤. 将 10 当量的 TTHA 的 TFA 盐溶解在 0.5M HBTU（TTHA 与 HBTU 的摩尔比为 1: 1），用 3.5 摩尔当量的 DIEA 中和，然后添加到树脂上. 让其连接 3 小时，直到茚三酮看上去透明. 为了将 cs124 连接到 TTHA 树脂上，将每 TTHA 1 当量的 HBTU 添加到具有 4 当量 DIEA 的树脂上，并让其活化 1 分钟. 为了活化树脂，将 10 摩尔当量的 cs124 溶解在 DMF 中，添加并连接 3 小时. 用 DMF 洗脱多余的 cs124，并按上述方法在 HF 中裂解树脂. 按上述方法纯化标记过的 C-末端肽 hIl-8（34-73-TTHA-cs124）.

纯化的 N-末端肽与每一种标记过的纯化的 C-末端肽的化学连接是在溶液（6M 盐酸胍/0.1M 磷酸钠，pH7.0，1mM 肽）中进行的，用 0.1%的苯硫酚作催化剂. 反应在 16 小时后结束. 在 pH8.6 下用 β-巯基乙醇（20%）处理两种连接产物 20 分钟，以便除去组氨酸残基上的所有残余的 DNP 保护基团. 该溶液的 pH 降低到 4.0，加入 TCEP，以便还原所有的二硫键，并将反应混合物加样到 C4 反向半制备的 10%的缓冲液 B 平衡的柱上. 用 60 分钟时间用 30%-50%的梯度洗脱连接产

物。收集 1.5 毫升的级份，通过 ES/MS 分析纯度，然后冻干。

通过首先将冻干的连接产物溶解在 6M 盐酸胍/0.1M Tris，pH8.0 中，然后用 0.1 M Tris，pH8.0 稀释到 2M 折叠 TAMRA 标记 h1L-8 多肽。最终的肽浓度为 1 毫克/毫升。添加 8mM 半胱氨酸和 1mM 胱氨酸的氧化还原缓冲液，以便协助二硫键的改组。16 小时之后，结束折叠反应。通过上述 RP-HPLC 纯化该折叠产物。通过 ES/MS 鉴定含有所需产物的级份。4amu 的丧失证实了两个二硫键的存在和随后 4 个质子的丧失。将折叠的产物冻干，并在-20℃下保存待用。以类似方式折叠 TTHA-cs124 标记的 h1L-8 多肽。

将折叠的 h1L-8（34-73-TTHA-cs124）溶解在 20mM Bis Tris 丙烷，pH6.5 中，并用 3 当量的 TbC13 重建。用 342nm 的激发波长收集该蛋白的发射光谱，并在 488、543 和 583nm 处表现出强的金属发射波段，这是 Tb^{3+}发射所特有的。将折叠的 h1L-8（1-73-TAMRA）同样溶解在 20mM Bis Tris 丙烷，pH6.5 中，在 553nm 激发时具有集中在 577nm 的典型的罗丹明发射。

可以按照以下公式由测定的荧光寿命确定蛋白复合体中供体和受体之间的距离（生物学光谱法，I.D.Campbell 和 R.A.Dwbk（1984）著，Benjamin/Cummings 出版公司，114-115 页）。两个探针之间的能量传递效率（E）是通过比较供体的寿命（τ_D）和在受体存在下该供体的寿命（τ_{DA}）确定的，使用公式 $E=1-(\tau_{DA}/\tau_D)$。然后将该效率与 Forster 距离（R_0）结合，确定两个标记之间的平均距离（R），使用方程 $R=R_0\{(1-E)/E\}1/6$.

将等浓度的（30 微摩尔）供体、h1L-8（1-73-TTHA-cs124-Tb^{3+}）和受体、H1L-8（1-73-TAMRA）混合在一起，并测定 488nm 处的寿命。在该浓度下，在溶液中所述蛋白的大部分会二聚体化，因为二聚体化常数为大约 10 微摩尔。衰减曲线表现出双指数（biexponential）衰减。该衰减的主要成分具有 0.22ms 的较短寿命，相当于供体和受体之间的复合体的寿命（τ_{DA}）。供体发射的这种荧光寿命的衰减是由于从供体到受体的荧光共振能量传递 FRET.该衰减的次要成分具有大约 1ms 的寿命，并相当于单聚体供体蛋白，或供体蛋白与它本身的复合体。还测定到在 570nm 处的发射随时间的消失，并表现出 0.24ms 寿命的单相衰减。在该波长下，仅观察到由 FRET 产生的受体发射的

衰减。该寿命类似于在 488nm 下测定的寿命。最后，在 342nm 激发之后随着时间的推移监测到供体本身（30 微摩尔）在 488nm 下荧光发射的衰减。该衰减曲线表现出单指数衰减，计算的寿命为 0.94ms（τ_D）。

使用上述的测定寿命和公式，观察到了 75%的能量传递效率（E）和大约 50 埃的距离（R）。这是根据以前确定的该复合体的 NMR 结构的合理的距离估计。在该结构上两个 C-末端之间的距离为 40 埃。如果考虑到其他的赖氨酸侧链，50 埃的估计值似乎合理。以上结果证实，该蛋白在溶液中折叠并形成二聚体。以上结果还进一步证实了采用树脂标记提供专一性、纯度和产率的优点，以便进行高度灵敏的 FRET 分析。

例 18

emrE 转运物的微团介导的化学连接

将微团介导的化学连接应用于 emrE 转运蛋白（序列 27）的全化学合成:

MNPYIYLGGA ILAEVIGTTL MKFSEGFTRL
WPSVGTIICY CASFWLLAQT LAYIPTGIAY
AIWSGVGIVL ISLLSWGFFG QRLDLPAIIG
MMLICAGVLI INLLSRSTPH

硫酯发生树脂上合成 N-末端 emrE 肽片段 1（序列 28）：MNPYIYLGGAILAEVIGTTLMKFSEGFTRLWPSVGTIICY 和中间 emrE 肽片段 2(序列 29)： C（Acm）ASFWLLAQTLAYAIWSGVGIVLISLLSWGFFGQRLDLPAIIGMMLI，并在标准树脂 MBHA 树脂上合成 C-末端 emrE 肽片段 3（序列 30）：CAGVLIINLLSRSTPH. 将 emrE 肽片段 2 硫酯和 emrE 肽片段 3 各 3.5 毫克同时溶解在 50 微升 TFE 和 350 微升水中，加入 10 毫克 DPC 粉末。在液氮中冷冻该透明溶液，并冻干 5 小时，得到 DPC 与肽交联的微团基质。将 400 微升含有 8 摩尔尿素和 4 微升苯硫酚的 200mM 磷酸缓冲液（pH7.5）加入该脂基质中，得到所述肽片段的透明溶液。在连接两天之后，将该连接混合物加入含有 20%β-巯基乙醇的 2 毫升 TFE、2 毫升水的溶液中，并培养 20 分钟。用由 20%的乙酸水溶液制备的 15 毫克/毫升 TCEP 的溶液将该溶液酸化，并加样到半制备反向 HPLC 柱上。通过电喷射质谱法可鉴定含有需要的第一种连接产物（emrE 片段

2+3 的连接产物）级份，并冻干过夜。

为了消除 N-末端“Acm”（乙酰胺甲基）基团，将所得到的冻干的/连接的 emrE 肽片段（emrE 片段 2+3 的连接产物，大约 2 毫克）溶解在 50 微升 TFE 和 350 微升 0.5M 乙酸中。然后通过用 1.5 倍摩尔过量(相对总的半胱氨酸浓度而言)的乙酸汞溶液处理 1 小时除去 Acm 基团。然后在β-巯基乙醇中将该溶液调整到 20%，加样到分析反向 HPLC 柱上，并用分级梯度纯化。通过电喷射质谱法可鉴定含有需要的第一种连接产物的级份，并冻干过夜。

将等量的所得到的脱保护的连接的 emrE 肽片段（emrE 片段 2+3 的连接产物）和最终的 emrE 片段 1 硫酯同时溶解在 50 微升 TFE 和 350 微升水中，加入 5 毫克 DPC 粉末。在液氮中冷冻该透明溶液，并冻干若干小时，得到与肽交联的 DPC 的微团基质。将 200 微升含有 8 摩尔尿素和 2 微升苯硫酚的 250mM 磷酸缓冲液（pH7.5）加入该脂基质中，得到所述肽片段的透明溶液。在连接一天之后，将该连接混合物加入含有 1.4 毫升 TFE、0.毫升β-巯基乙醇、0.7 毫升哌啶和 1.4 毫升水的溶液中，并培养 20 分钟，以便除去所有剩余的保护基团。用由 20%的乙酸水溶液制备的 15 毫克/毫升 TCEP 的溶液将该溶液酸化，并加样到半制备反向 HPLC 柱上，并用线性梯度纯化。通过电喷射质谱法可鉴定含有需要的连接产物(序列 27)的级份，并冻干过夜。

本说明书中所提到的所有文献和专利申请被以相同程度收作本文参考文献，就如同每一份文献或专利申请被专门和单独指明被收作参考文献一样。

现在已经对本发明作了充分说明，对于对本领域技术人员来说，显而易见的是在不脱离所附权利要求的实质和范围的前提下可以对本发明进行多种改变和改进。

01·04·26

序列表

<110> Kochendoerfer, Gerd G.
Hunter, Christie L.
Kent, Stephen B.H.
Botti, Paolo
Gryphon Sciences

<120> 膜多肽的脂基质协助的化学结合和合成

<130> grfn-028/02WO

<140>
<141>

<150> 09/144,964
<151> 1998-08-31

<150> 09/263,971
<151> 1999-03-05

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 1
Thr Gly Arg Pro Glu Trp Ile Trp Leu Ala Leu Gly Thr Ala Leu Met
1 5 10 15

Gly Leu Gly Thr Leu Tyr Phe Leu Val Lys Gly Met Gly Val Ser Asp
20 25 30

Pro Asp Ala Lys Lys
35

<210> 2
<211> 37
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 2
Cys Gly Arg Pro Glu Trp Ile Trp Leu Ala Leu Gly Thr Ala Leu Met
1 5 10 15

Gly Leu Gly Thr Leu Tyr Phe Leu Val Lys Gly Met Gly Val Ser Asp
20 25 30

Pro Asp Ala Lys Lys
35

<210> 3
<211> 45
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

<400> 3
Gly Lys Gly Tyr Ile Glu Gly Arg Cys Gly Arg Pro Glu Trp Ile Trp
1 5 10 15

Leu Ala Leu Gly Thr Ala Leu Met Gly Leu Gly Thr Leu Tyr Phe Leu
20 25 30

Val Lys Gly Met Gly Val Ser Asp Pro Asp Ala Lys Lys
35 40 45

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 4
Glu Ala Gln Leu
1

<210> 5
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

<400> 5
Glu Ala Gln Leu Cys Gly Arg Pro Glu Trp Ile Trp Leu Ala Leu Gly
1 5 10 15

Thr Ala Leu Met Gly Leu Gly Thr Leu Tyr Phe Leu Val Lys Gly Met
20 25 30

Gly Val Ser Asp Pro Asp Ala Lys Lys
35 40

<210> 6
<211> 332
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

<400> 6
Met Val Asn Ser Thr His Arg Gly Met His Thr Ser Leu His Leu Trp
1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Arg Leu His Ser Asn Ala Ser Glu Ser Leu Gly
20 25 30

Lys Gly Tyr Ile Glu Gly Arg Cys Tyr Glu Gln Leu Phe Val Ser Pro
35 40 45

Glu Val Phe Val Thr Leu Gly Val Ile Ser Leu Leu Glu Asn Ile Leu
50 55 60

Val Ile Val Ala Ile Ala Lys Asn Lys Asn Leu His Ser Pro Met Tyr
65 70 75 80

Phe Phe Ile Cys Ser Leu Ala Val Ala Asp Met Leu Val Ser Val Ser
85 90 95

Asn Gly Ser Glu Thr Ile Ile Ile Thr Leu Leu Asn Ser Thr Asp Thr
100 105 110

```
Asp Ala Gln Ser Phe Thr Val Asn Ile Asp Asn Val Ile Asp Ser Val
        115                 120                 125

Ile Cys Ser Ser Leu Leu Ala Ser Ile Cys Ser Leu Leu Ser Ile Ala
    130                 135                 140

Val Asp Arg Thr Phe Thr Ile Phe Tyr Ala Leu Gln Tyr His Asn Ile
145                 150                 155                 160

Met Thr Val Lys Arg Val Gly Ile Ile Ile Ser Cys Ile Trp Ala Ala
                165                 170                 175

Cys Thr Val Ser Gly Ile Leu Phe Ile Ile Tyr Ser Asp Ser Ser Ala
            180                 185                 190

Val Ile Ile Cys Leu Ile Thr Met Phe Phe Thr Met Leu Ala Leu Met
        195                 200                 205

Ala Ser Leu Tyr Val His Met Phe Leu Met Ala Arg Leu His Ile Lys
    210                 215                 220

Arg Ile Ala Val Leu Pro Gly Thr Gly Ala Ile Arg Gln Gly Ala Asn
225                 230                 235                 240

Met Lys Gly Ala Ile Thr Leu Thr Ile Leu Ile Gly Val Phe Val Val
                245                 250                 255

Cys Trp Ala Pro Phe Phe Leu His Leu Ile Phe Tyr Ile Ser Cys Pro
            260                 265                 270

Gln Asn Pro Tyr Cys Val Cys Phe Met Ser His Phe Asn Leu Tyr Leu
        275                 280                 285

Ile Leu Ile Met Cys Asn Ser Ile Ile Asp Pro Leu Ile Tyr Ala Leu
    290                 295                 300

Arg Ser Gln Glu Leu Arg Lys Thr Phe Lys Glu Ile Ile Cys Cys Tyr
305                 310                 315                 320

Pro Leu Gly Gly Leu Cys Asp Leu Ser Ser Arg Tyr
                325                 330
```

<210> 7
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

<400> 7
Met Val Asn Ser Thr His Arg Gly Met His Thr Ser Leu His Leu Trp
1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Arg Leu His Ser Asn Ala Ser Glu Ser Leu Gly
20 25 30

Lys Gly Tyr Ser Asp Gly Gly
35

<210> 8
<211> 293
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

<400> 8
Cys Tyr Glu Gln Leu Phe Val Ser Pro Glu Val Phe Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Val Ile Ser Leu Leu Glu Asn Ile Leu Val Ile Val Ala Ile Ala Lys
20 25 30

Asn Ile Asp Asn Val Ile Asp Ser Val Ile Cys Ser Ser Leu Leu Ala
35 40 45

Val Ala Asp Met Leu Val Ser Val Ser Asn Gly Ser Glu Thr Ile Ile
50 55 60

Ile Thr Leu Leu Asn Ser Thr Asp Thr Asp Ala Gln Ser Phe Thr Val
65 70 75 80

Asn Ile Asp Asn Val Ile Asp Ser Val Ile Cys Ser Ser Leu Leu Ala
85 90 95

Ser Ile Cys Ser Leu Leu Ser Ile Ala Val Asp Arg Tyr Phe Thr Ile
100 105 110

Phe Tyr Ala Leu Gln Tyr His Asn Ile Met Thr Val Lys Arg Val Gly
115 120 125

Ile Ile Ile Ser Cys Ile Trp Ala Ala Cys Thr Val Ser Gly Ile Leu
130 135 140

Phe Ile Ile Tyr Ser Asp Ser Ser Ala Val Ile Ile Cys Leu Ile Thr
145 150 155 160

Met Phe Phe Thr Met Leu Ala Leu Met Ala Ser Leu Tyr Val His Met
165 170 175

Phe Leu Met Ala Arg Leu His Ile Lys Arg Ile Ala Val Leu Pro Gly
180 185 190

Thr Gly Ala Ile Arg Gln Gly Ala Asn Met Lys Gly Ala Ile Thr Leu
195 200 205

Thr Ile Leu Ile Gly Val Phe Val Val Cys Trp Ala Pro Phe Phe Leu
210 215 220

His Leu Ile Phe Tyr Ile Ser Cys Pro Gln Asn Pro Tyr Cys Val Cys
225 230 235 240

Phe Met Ser His Phe Asn Leu Tyr Leu Ile Leu Ile Met Cys Asn Ser
245 250 255

Ile Ile Asp Pro Leu Ile Tyr Ala Leu Arg Ser Gln Glu Leu Arg Lys
260 265 270

Thr Phe Lys Glu Ile Ile Cys Cys Tyr Pro Leu Gly Gly Leu Cys Asp
275 280 285

Leu Ser Ser Arg Tyr
290

<210> 9
<211> 332
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

<400> 9
Met Val Asn Ser Thr His Arg Gly Met His Thr Ser Leu His Leu Trp
1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Arg Leu His Ser Asn Ala Ser Glu Ser Leu Gly
20 25 30

Lys Gly Tyr Ser Asp Gly Gly Cys Tyr Glu Gln Leu Phe Val Ser Pro
35 40 45

Glu Val Phe Val Thr Leu Gly Val Ile Ser Leu Leu Glu Asn Ile Leu
50 55 60

Val Ile Val Ala Ile Ala Lys Asn Lys Asn Leu His Ser Pro Met Tyr
65 70 75 80

Phe Phe Ile Cys Ser Leu Ala Val Ala Asp Met Leu Val Ser Val Ser
85 90 95

Asn Gly Ser Glu Thr Ile Ile Ile Thr Leu Leu Asn Ser Thr Asp Thr
100 105 110

Asp Ala Gln Ser Phe Thr Val Asn Ile Asp Asn Val Ile Asp Ser Val
115 120 125

Ile Cys Ser Ser Leu Leu Ala Ser Ile Cys Ser Leu Leu Ser Ile Ala
130 135 140

Val Asp Arg Tyr Phe Thr Ile Phe Tyr Ala Leu Gln Tyr His Asn Ile
145 150 155 160

Met Thr Val Lys Arg Val Gly Ile Ile Ile Ser Cys Ile Trp Ala Ala
165 170 175

Cys Thr Val Ser Gly Ile Leu Phe Ile Ile Tyr Ser Asp Ser Ser Ala
180 185 190

Val Ile Ile Cys Leu Ile Thr Met Phe Phe Thr Met Leu Ala Leu Met
195 200 205

Ala Ser Leu Tyr Val His Met Phe Leu Met Ala Arg Leu His Ile Lys
210 215 220

Arg Ile Ala Val Leu Pro Gly Thr Gly Ala Ile Arg Gln Gly Ala Asn
225 230 235 240

Met Lys Gly Ala Ile Thr Leu Thr Ile Leu Ile Gly Val Phe Val Val
245 250 255

Cys Trp Ala Pro Phe Phe Leu His Leu Ile Phe Tyr Ile Ser Cys Pro
260 265 270

Gln Asn Pro Tyr Cys Val Cys Phe Met Ser His Phe Asn Leu Tyr Leu
275 280 285

Ile Leu Ile Met Cys Asn Ser Ile Ile Asp Pro Leu Ile Tyr Ala Leu
290 295 300

Arg Ser Gln Glu Leu Arg Lys Thr Phe Lys Glu Ile Ile Cys Cys Tyr
305 310 315 320

Pro Leu Gly Gly Leu Cys Asp Leu Ser Ser Arg Tyr
325 330

<210> 10
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 10
Met Leu Thr Ala Ala Val Leu Ser Cys Ala Leu Leu Leu Ala Leu Pro
1 5 10 15

Ala Thr Arg Gly Ala Gln Met Gly Leu Ala Pro Met Glu Gly Ile Arg
20 25 30

Arg Pro Asp Gln Ala Leu Leu Pro Glu Leu Pro Gly Leu Gly Leu Arg
35 40 45

Ala Pro Leu Lys Lys Thr Thr Ala Glu Gln Ala Glu Glu Asp Leu Leu
50 55 60

Gln Glu Ala Gln Ala Leu Ala Glu Val Leu Asp Leu Gln Asp Arg Glu
65 70 75 80

Pro Arg Ser Ser Arg Arg Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly
85 90 95

Gln Gln Val Pro Cys Cys Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Phe
100 105 110

Phe Asn Ala Phe Cys Tyr Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Met Asn Pro
115 120 125

Cys Ser Arg Thr
130

<210> 11
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 11
Met Thr Ile Phe Ile Thr Ala Phe Leu Gly Ser Trp Phe Phe Phe Gly
1 5 10 15

Leu Leu Trp Tyr Ala Val Ala Tyr Ile His Lys Asp Leu Pro Glu Phe
20 25 30

His Pro Ser Ala Asn His Thr Gly
35 40

<210> 12
<211> 66
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 12
Cys Val Glu Asn Ile Asn Gly Leu Thr Ser Ala Phe Leu Phe Ser Leu
1 5 10 15

Glu Thr Gln Val Thr Ile Gly Tyr Gly Phe Arg Cys Val Thr Glu Gln
20 25 30

Cys Ala Thr Ala Ile Phe Leu Leu Ile Phe Gln Ser Ile Leu Gly Val
35 40 45

Ile Ile Asn Ser Phe Met Cys Gly Ala Ile Leu Ala Lys Ile Ser Arg
50 55 60

Pro Lys
65

<210> 13
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 13
Met Thr Ile Phe Ile Thr Ala Phe Leu Gly Ser Trp Phe Phe Phe Gly
1 5 10 15

Leu Leu Trp Tyr Ala Val Ala Tyr Ile His Lys Asp Leu Pro Glu Phe
20 25 30

His Pro Ser Ala Asn His Thr Gly Cys Val Glu Ala Ile Asn Ser Leu
35 40 45

Thr Asp Ala Phe Leu Phe Ser Leu Glu Thr Gln Val Thr Ile Gly Tyr
50 55 60

Gly Phe Arg Cys Val Thr Glu Gln Cys Ala Thr Ala Ile Phe Leu Leu
65 70 75 80

Ile Phe Gln Ser Ile Leu Gly Val Ile Ile Asn Ser Phe Met Cys Gly
85 90 95

Ala Ile Leu Ala Lys Ile Ser Arg Pro Lys
100 105

<210> 14
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 14
Gly Val Pro Ile Asn Val Ser Cys Thr Gly Ser Pro Gln Cys Ile Lys
1 5 10 15

Pro Cys Lys Asp Ala Gly Met Arg Phe Gly Lys Cys Met Asn Arg Lys
20 25 30

Cys His Cys Thr Pro Lys
35

<210> 15
<211> 31

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

<400> 15
Ala Leu His Trp Arg Ala Ala Gly Ala Ala Thr Val Leu Leu Val Ile
1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Gly Ser Tyr Leu Ala Val Leu Ala Glu Arg Gly
20 25 30

<210> 16
<211> 59
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

<400> 16
Cys Pro Gly Ala Gln Leu Ile Thr Tyr Pro Arg Ala Leu Trp Trp Ser
1 5 10 15

Val Glu Thr Ala Thr Thr Val Gly Tyr Gly Asp Leu Tyr Pro Val Thr
20 25 30

Leu Trp Gly Arg Leu Val Ala Val Val Val Met Val Ala Gly Ile Thr
35 40 45

Ser Phe Gly Leu Val Thr Ala Ala Leu Ala Thr
50 55

<210> 17
<211> 90
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

<400> 17
Ala Leu His Trp Arg Ala Ala Gly Ala Ala Thr Val Leu Leu Val Ile
1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Gly Ser Tyr Leu Ala Val Leu Ala Glu Arg Gly Cys
20 25 30

Pro Gly Ala Gln Leu Ile Thr Tyr Pro Arg Ala Leu Trp Trp Ser Val
35 40 45

Glu Thr Ala Thr Thr Val Gly Tyr Gly Asp Leu Tyr Pro Val Thr Leu
50 55 60

Trp Gly Arg Leu Val Ala Val Val Val Met Val Ala Gly Ile Thr Ser
65 70 75 80

Phe Gly Leu Val Thr Ala Ala Leu Ala Thr
85 90

<210> 18
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 18
Met Glu Pro Ile Gln Leu Ala Ile Val Ala Leu Val Val Ala Ile Ile
1 5 10 15

Ile Ala Ile Val Val Trp Ser Ile Val Ile Ile Tyr Arg Lys Ile Leu
20 25 30

Arg Gln Arg Lys Ile Asp
35

<210> 19
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 19
Cys Leu Ile Asp Arg Leu Ile Glu Arg Ala Glu Asp Ser Gly Asn Glu
1 5 10 15

Ser Glu Gly Glu Ile Ser Ala Leu Val Glu Met Gly Val Glu Met Gly

20 25 30

His His Ala Pro Trp Asp Ile Asp Asp Leu
35 40

<210> 20
<211> 80
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

<400> 20
Met Glu Pro Ile Gln Leu Ala Ile Val Ala Leu Val Val Ala Ile Ile
1 5 10 15

Ile Ala Ile Val Val Trp Ser Ile Val Ile Ile Tyr Arg Lys Ile Leu
20 25 30

Arg Gln Arg Lys Ile Asp Cys Leu Ile Asp Arg Leu Ile Glu Arg Ala
35 40 45

Glu Asp Ser Gly Asn Glu Ser Glu Gly Glu Ile Ser Ala Leu Val Glu
50 55 60

Met Gly Val Glu Met Gly His His Ala Pro Trp Asp Ile Asp Asp Leu
65 70 75 80

<210> 21
<211> 49
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

<400> 21
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly
1 5 10 15

Ser Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Pro Leu Val Val Ala Ala Ser Ile
20 25 30

Ile Gly Ile Leu His Leu Ile Leu Trp Ile Leu Asp Arg Leu Phe Phe
35 40 45

Lys

<210> 22
<211> 48
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 22
Cys Ile Tyr Arg Phe Phe Glu His Gly Leu Lys Arg Gly Pro Ser Thr
1 5 10 15

Glu Gly Val Pro Glu Ser Met Arg Glu Glu Tyr Arg Lys Glu Gln Gln
20 25 30

Ser Ala Val Asp Ala Asp Asp Ser His Phe Val Ser Ile Glu Leu Glu
35 40 45

<210> 23
<211> 97
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 23
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly
1 5 10 15

Ser Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Pro Leu Val Val Ala Ala Ser Ile
20 25 30

Ile Gly Ile Leu His Leu Ile Leu Trp Ile Leu Asp Arg Leu Phe Phe
35 40 45

Lys Cys Ile Tyr Arg Phe Phe Glu His Gly Leu Lys Arg Gly Pro Ser
50 55 60

Thr Glu Gly Val Pro Glu Ser Met Arg Glu Glu Tyr Arg Lys Glu Gln
65 70 75 80

Gln Ser Ala Val Asp Ala Asp Asp Ser His Phe Val Ser Ile Glu Leu
85 90 95

Glu

<210> 24
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 24
Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro
1 5 10 15

Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro
20 25 30

His

<210> 25
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 25
Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe
20 25 30

Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser Lys

35 40

<210> 26
<211> 73
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

<400> 26
Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro
1 5 10 15

Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro
20 25 30

His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu
35 40 45

Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys
50 55 60

Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser Lys
65 70

<210> 27
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

<400> 27
Met Asn Pro Tyr Ile Tyr Leu Gly Gly Ala Ile Leu Ala Glu Val Ile
1 5 10 15

Gly Thr Thr Leu Met Lys Phe Ser Glu Gly Phe Thr Arg Leu Trp Pro
20 25 30

Ser Val Gly Thr Ile Ile Cys Tyr Cys Ala Ser Phe Trp Leu Leu Ala
35 40 45

Gln Thr Leu Ala Tyr Ile Pro Thr Gly Ile Ala Tyr Ala Ile Trp Ser
50 55 60

```
Gly Val Gly Ile Val Leu Ile Ser Leu Leu Ser Trp Gly Phe Phe Gly
 65                  70                  75                  80

Gln Arg Leu Asp Leu Pro Ala Ile Ile Gly Met Met Leu Ile Cys Ala
                 85                  90                  95

Gly Val Leu Ile Ile Asn Leu Leu Ser Arg Ser Thr Pro His
            100                 105                 110
```

<210> 28
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 28

```
Met Asn Pro Tyr Ile Tyr Leu Gly Gly Ala Ile Leu Ala Glu Val Ile
  1               5                  10                  15

Gly Thr Thr Leu Met Lys Phe Ser Glu Gly Phe Thr Arg Leu Trp Pro
            20                  25                  30

Ser Val Gly Thr Ile Ile Cys Tyr
         35                  40
```

<210> 29
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 29

```
Ala Ser Phe Trp Leu Leu Ala Gln Thr Leu Ala Tyr Ala Ile Trp Ser
  1               5                  10                  15

Gly Val Gly Ile Val Leu Ile Ser Leu Leu Ser Trp Gly Phe Phe Gly
            20                  25                  30

Gln Arg Leu Asp Leu Pro Ala Ile Ile Gly Met Met Leu Ile
         35                  40                  45
```

<210> 30
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的

<400> 30
Cys Ala Gly Val Leu Ile Ile Asn Leu Leu Ser Arg Ser Thr Pro His
1 5 10 15

说 明 书 附 图

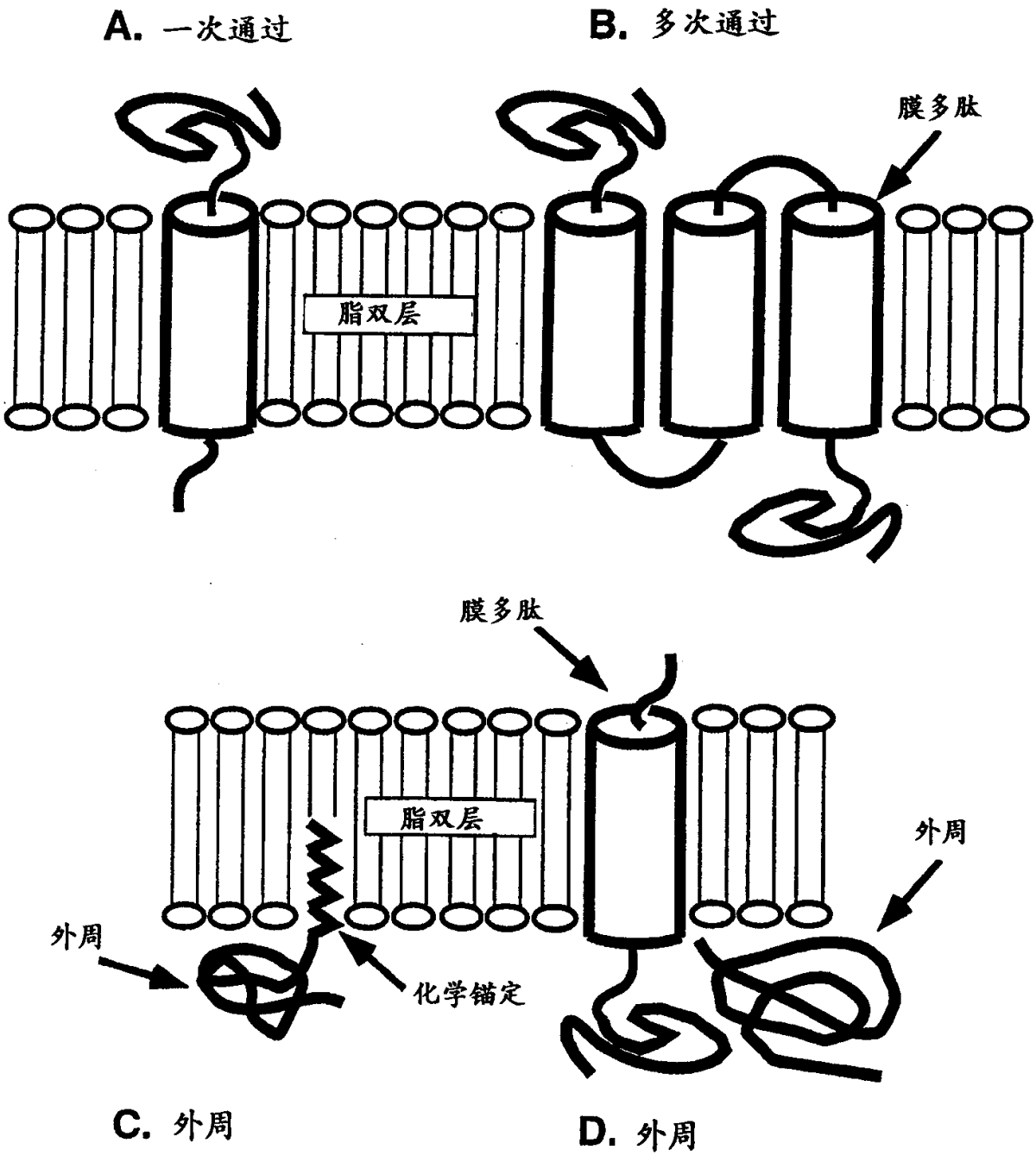


图 1

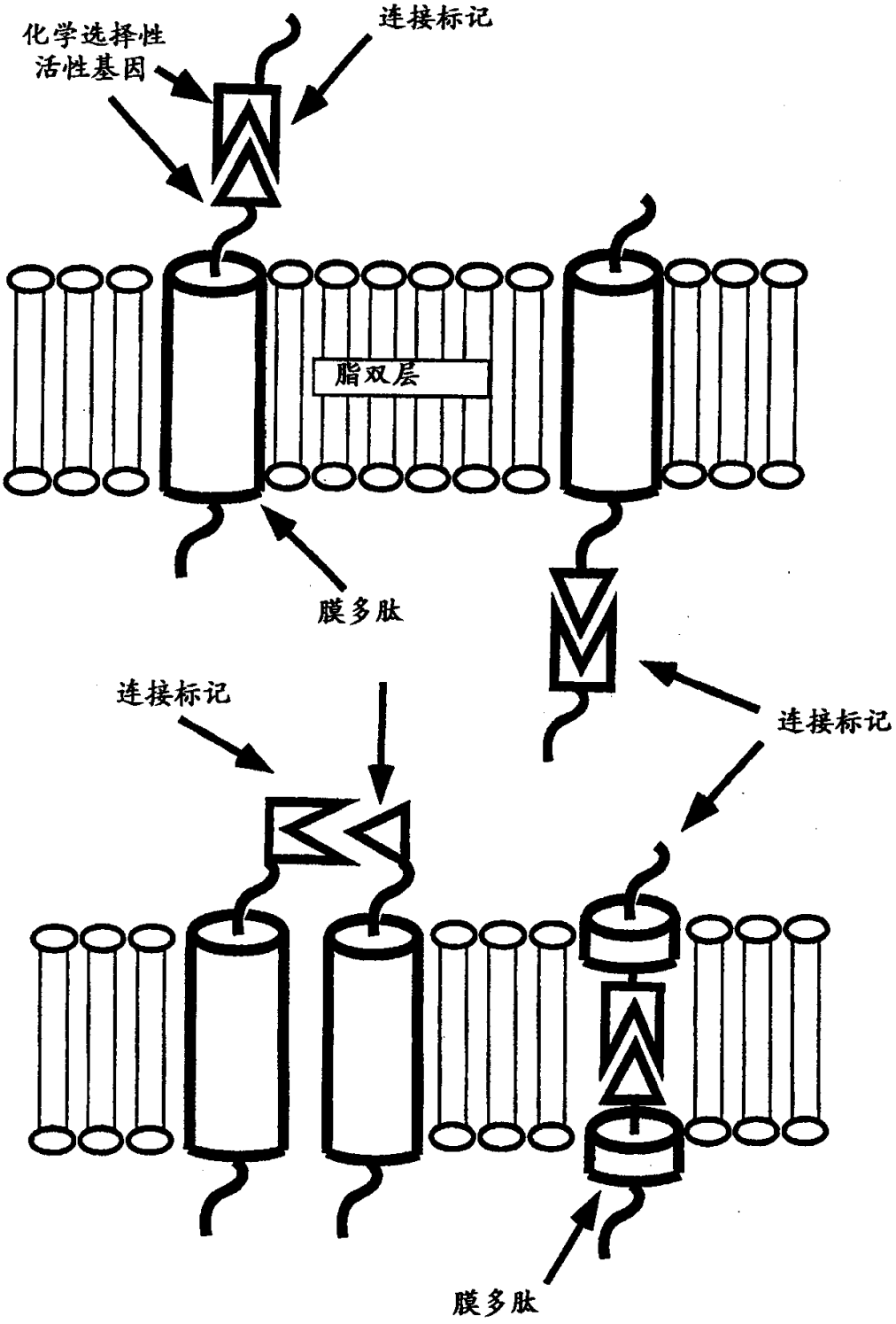


图 2

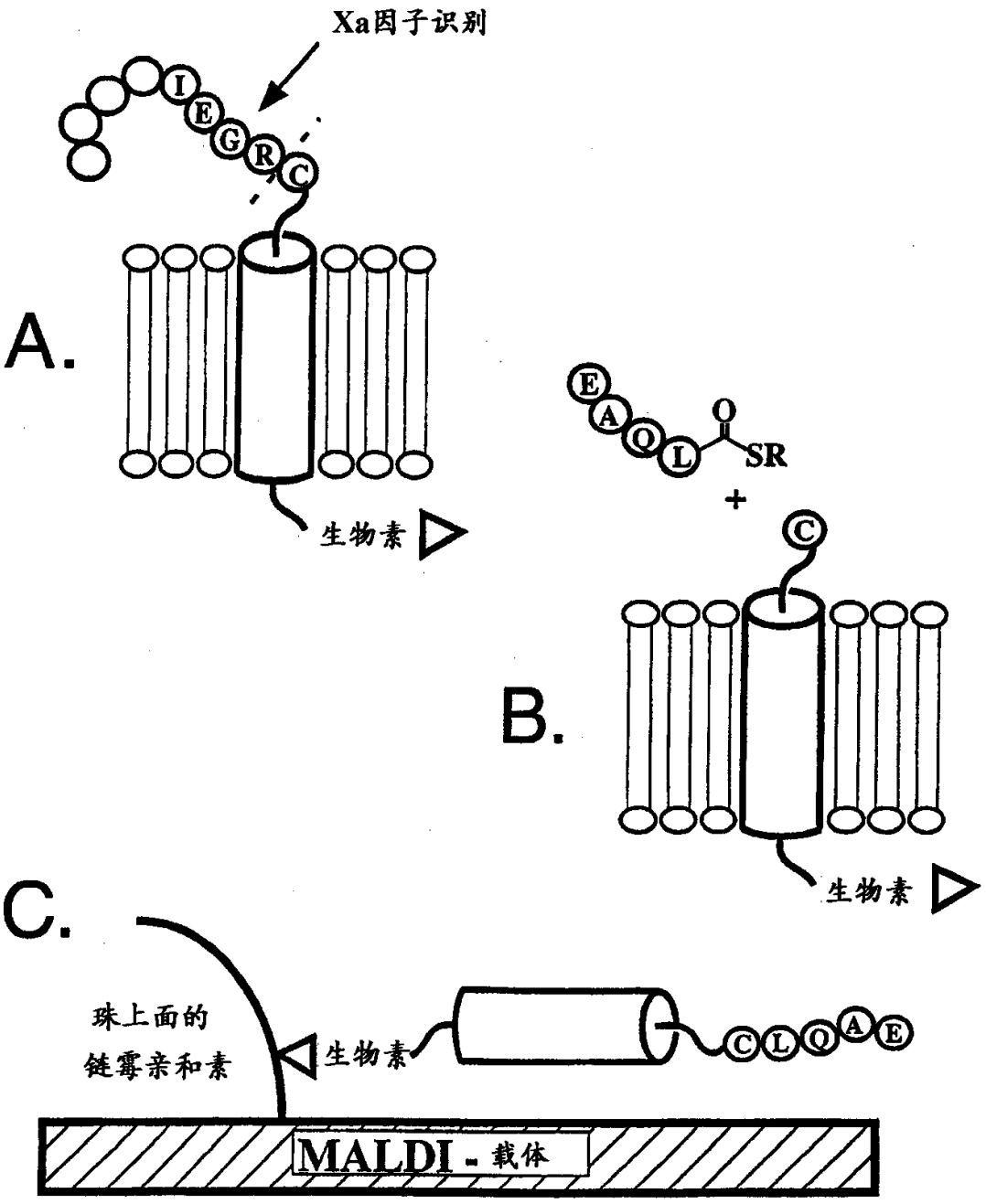

Xa因子识别
I E G R C
A.
生物素
E A Q L O SR
+
C
B.
生物素
C.
珠上面的
链霉亲和素
生物素
C L Q A E
MALDI - 载体

图 3

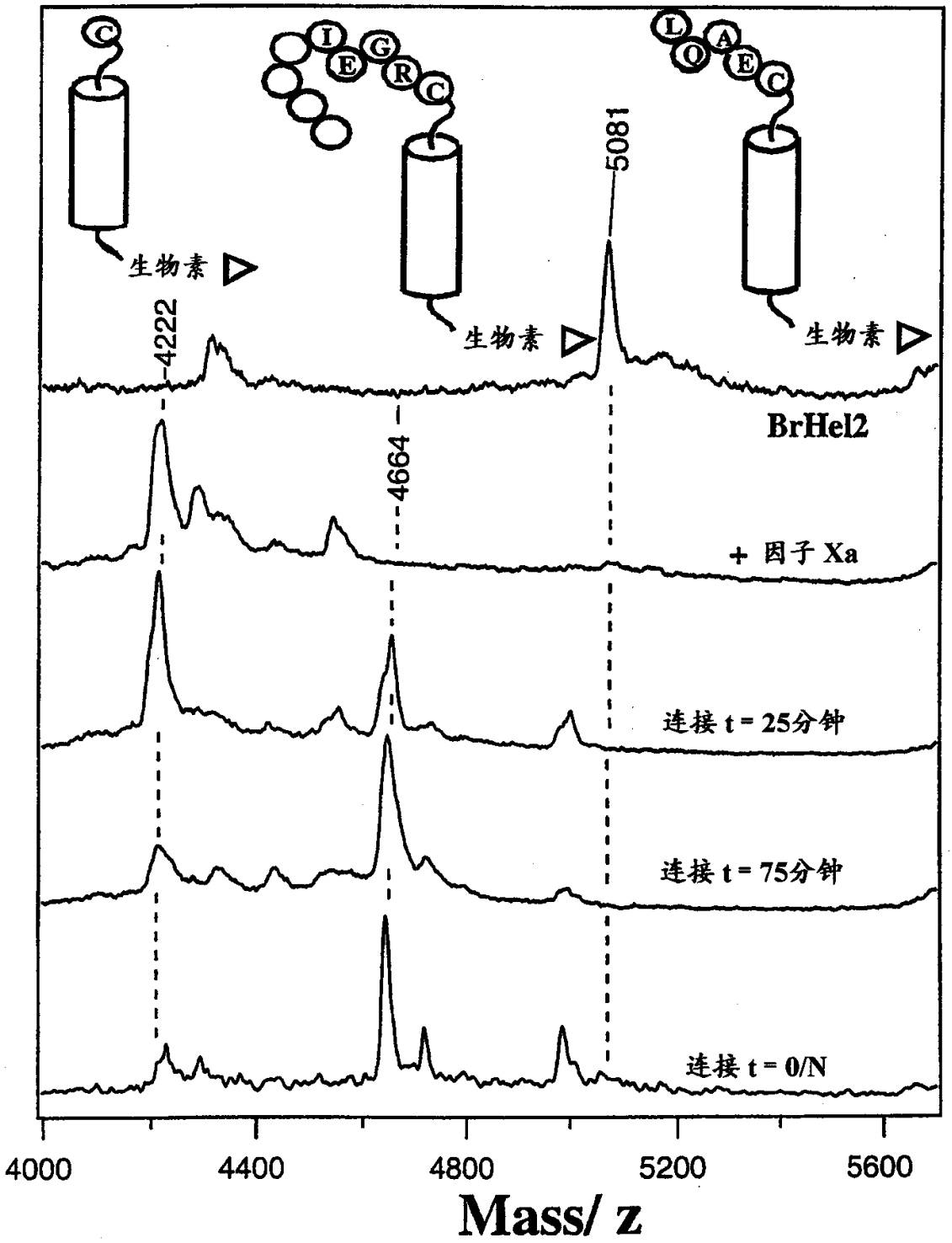

C
I E G R C
L Q A E C
生物素
生物素
生物素
4222
4664
5081
BrHel2
+ 因子 Xa
连接 t = 25分钟
连接 t = 75分钟
连接 t = 0/N
4000
4400
4800
5200
5600
Mass/ z

图 4

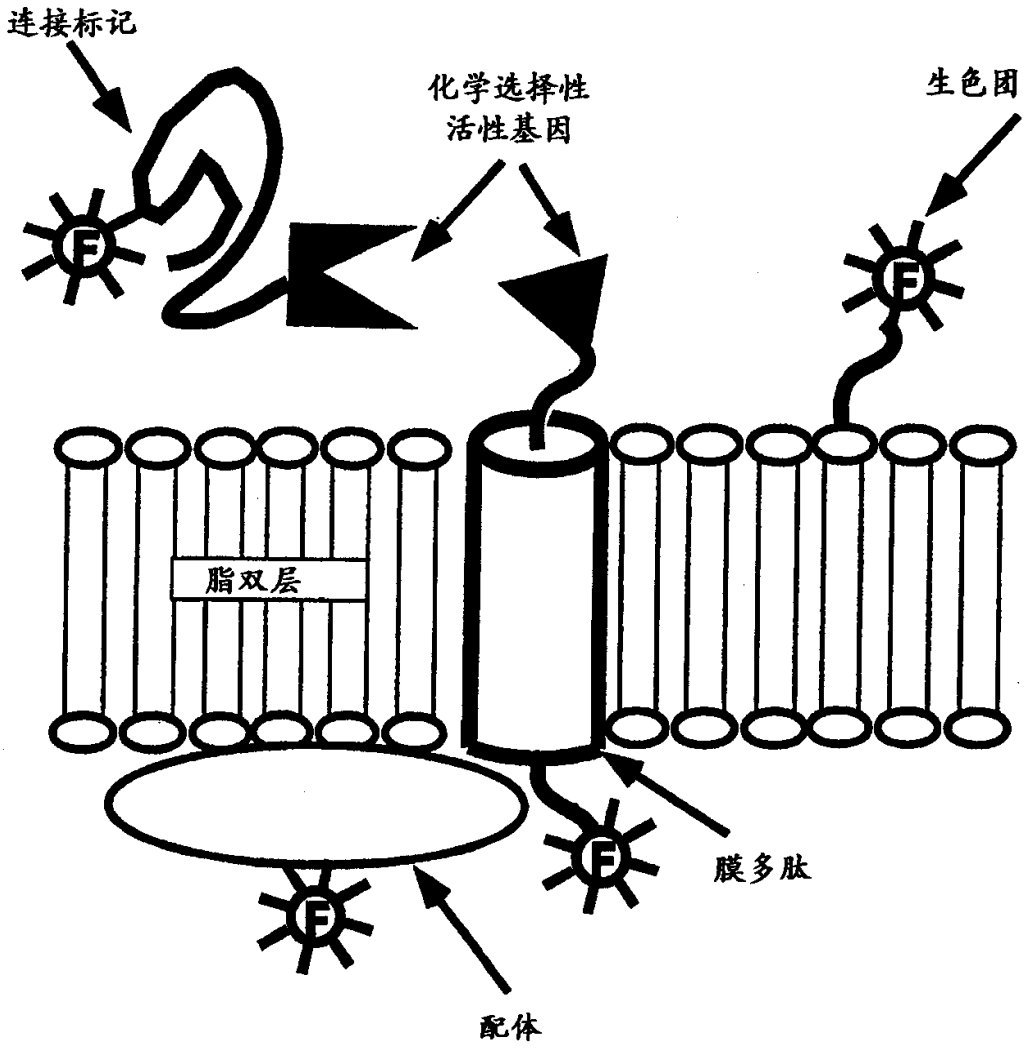


图 5

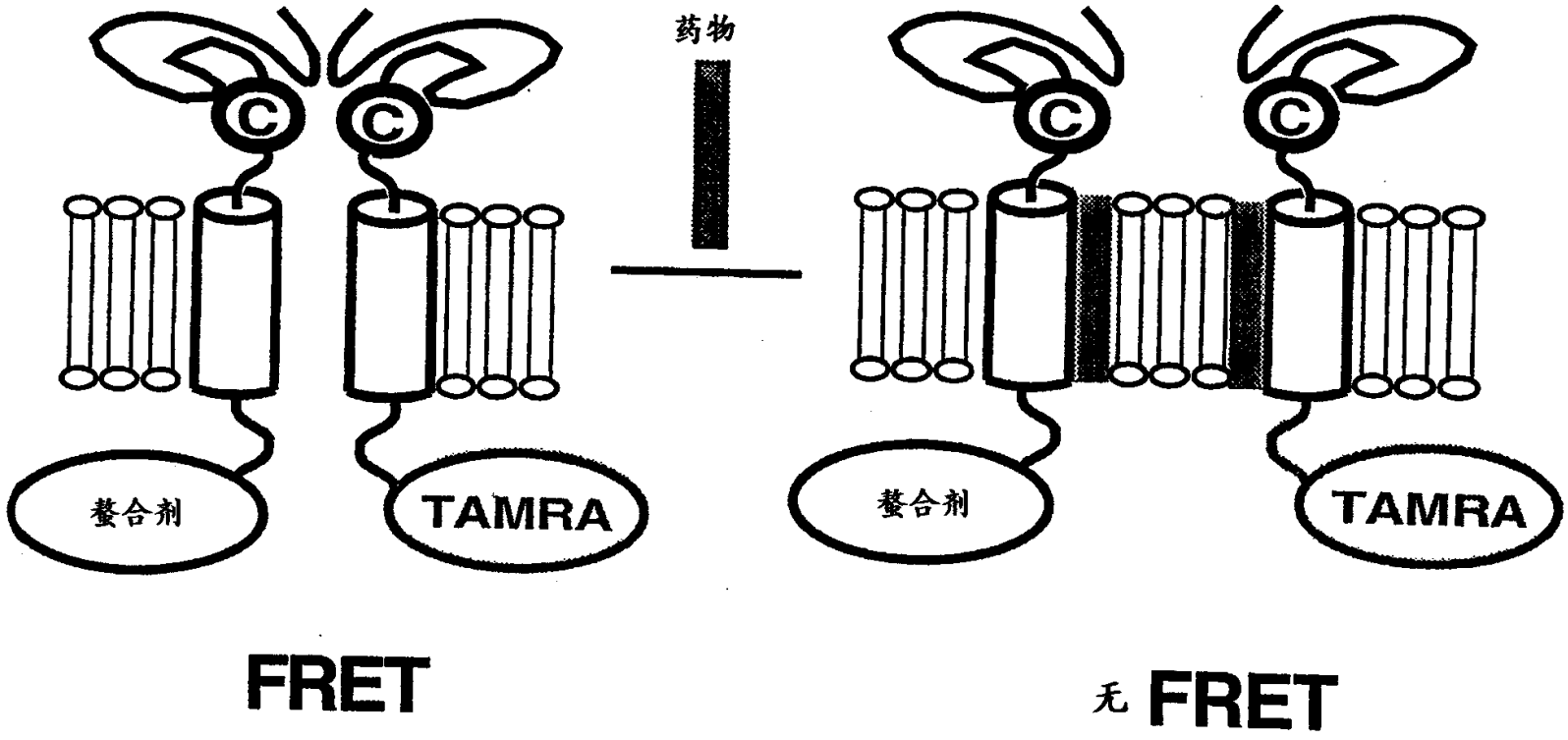


图 6

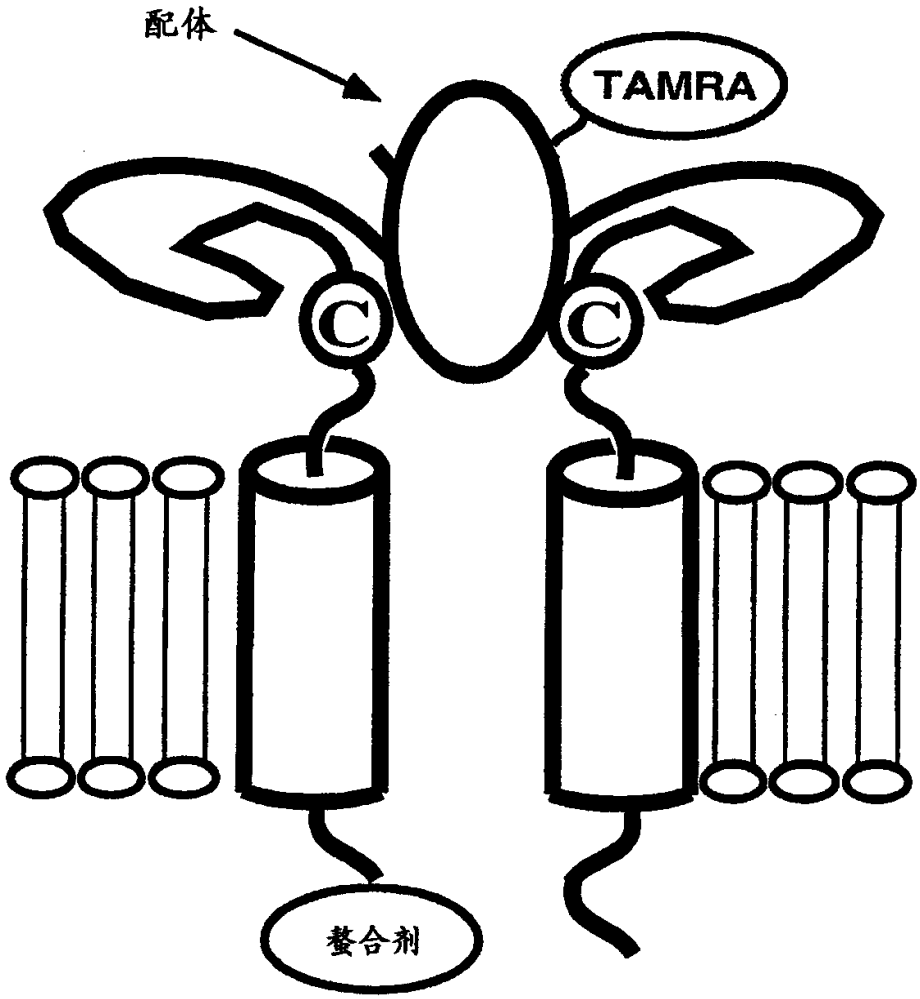


图 7

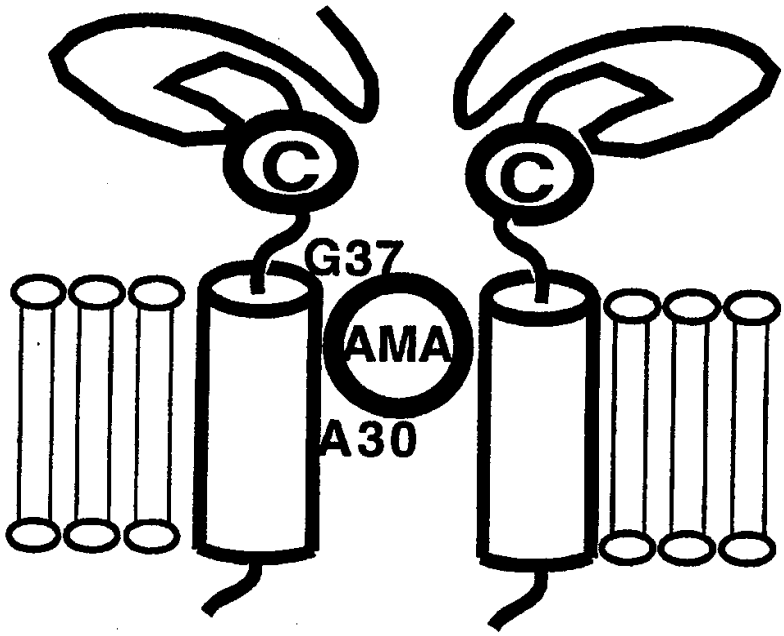


图 8

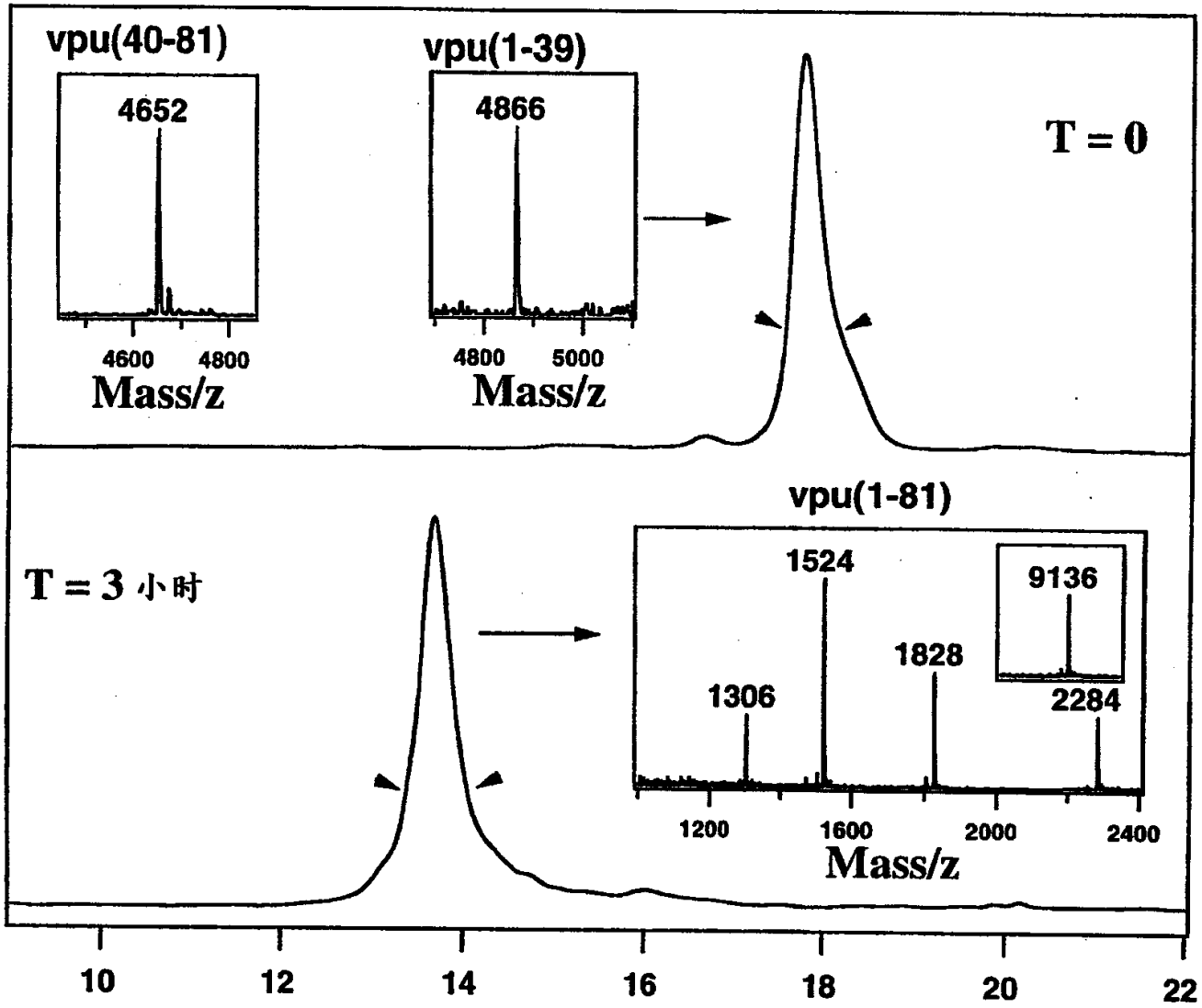

vpu(40-81)
4652
4600
4800
Mass/z
vpu(1-39)
4866
4800
5000
Mass/z
T = 0
T = 3 小时
vpu(1-81)
1524
9136
1828
1306
2284
1200
1600
2000
2400
Mass/z
10
12
14
16
18
20
22
驻留时间

图 9

01-04-28

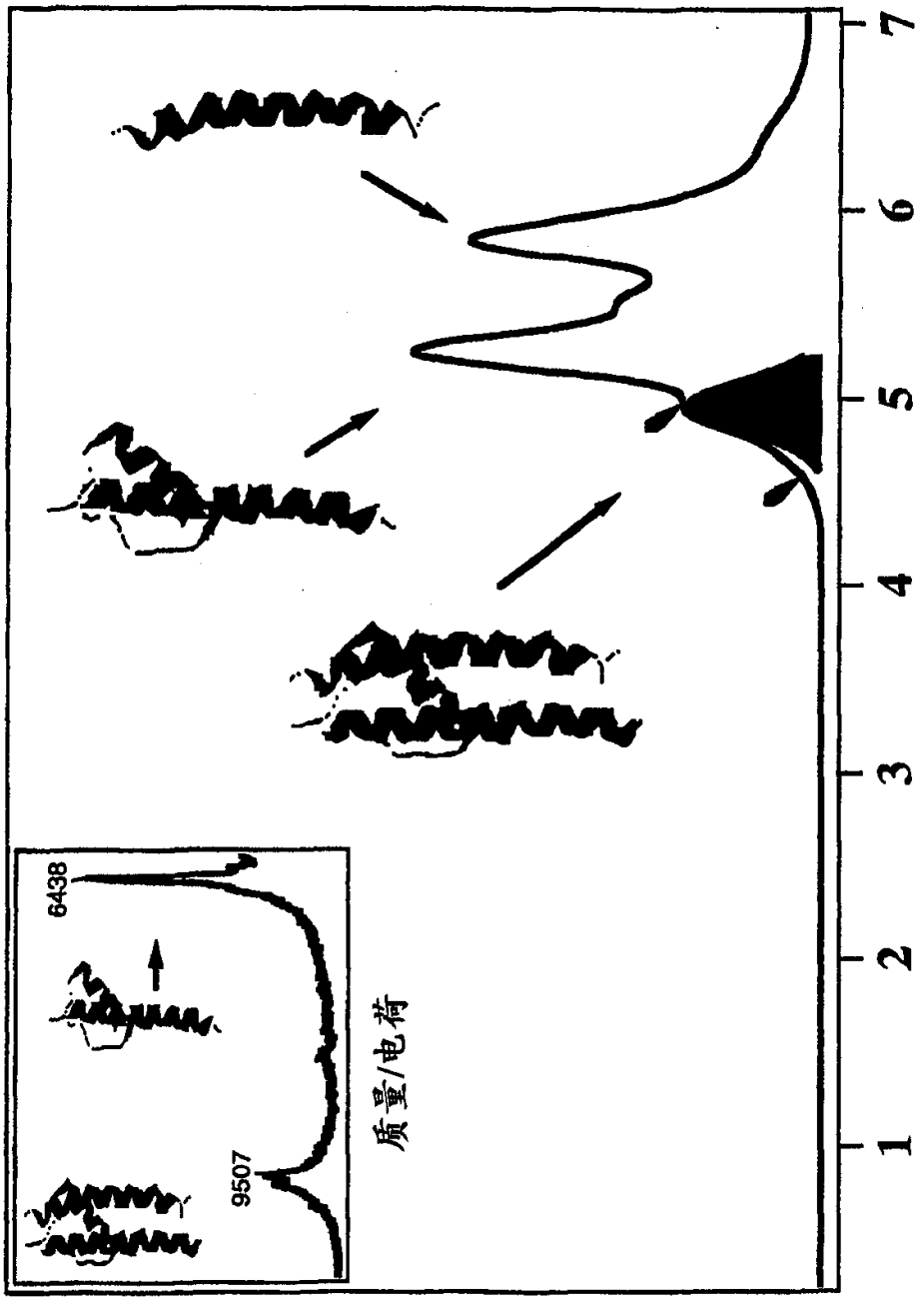


图 10