[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780012601.2

[51] Int. Cl.
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 1/10 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 4 月 22 日

[11] 公开号 CN 101415727A

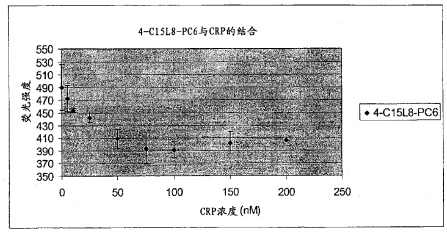
[22] 申请日 2007.4.10
[21] 申请号 200780012601.2
[30] 优先权
[32] 2006. 4. 7 [33] SE [31] 0600794 - 2
[86] 国际申请 PCT/SE2007/050227 2007.4.10
[87] 国际公布 WO2007/117215 英 2007.10.18
[85] 进入国家阶段日期 2008.10.7
[71] 申请人 莫德普罗股份公司
地址 瑞典乌普萨拉
[72] 发明人 L·巴尔策
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 罗菊华
权利要求书 2 页 说明书 31 页 序列表 13 页
附图 6 页

[54] 发明名称

C - 反应蛋白的结合剂

[57] 摘要

本发明涉及多肽二聚体，其中 2 个原聚体都具有根据 SEQ ID NO：1 的序列，并且其中至少 1 个磷酸胆碱衍生物与所述多肽连接。 所述多肽对 C - 反应蛋白(CRP)显示出特异的结合作用。 本发明进一步涉及所述多肽在用于检测 CRP 的浓度的测定中、以及在纯化 CRP 和含有 CRP 的组合物中的用途。



1. 具有根据 SEQ ID NO: 1 的序列的多肽，其中至少一个磷酸胆碱衍生物与所述的多肽连接。

2. 由 2 个二聚化的根据权利要求 1 所述的多肽构成的多肽，其中所述的 2 个原聚体具有相同或不同的氨基酸序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的多肽，其中所述磷酸胆碱衍生物与原聚体之一的、位于位置 8、17、22 或 34 上的赖氨酸连接。

4. 根据权利要求 1-3 的任意一项中所述的多肽，其还具有与所述多肽连接的报告基团，该报告基团优选地与原聚体之一的、位于位置 10、15、25 或 37 上的赖氨酸连接。

5. 根据权利要求 1-4 的任意一项中所述的多肽，其中所述的磷酸胆碱衍生物通过间隔物与所述多肽连接，所述间隔物包含长度为 1-12 个碳原子的碳链。

6. 根据权利要求 1-5 的任意一项中所述的多肽，其与 C-反应蛋白的结合亲和力小于 100 纳摩尔。

7. 根据权利要求 1-6 的任意一项中所述的多肽，其中所述原聚体具有相同的序列或不同的序列，并且所述的序列选自 SEQ ID NO: 3-18。

8. 用于生产根据权利要求 2-7 的任意一项中所述的多肽二聚体的方法，所述方法包括以下步骤:

-合成至少 2 个具有根据 SEQ ID NO: 1 的序列的多肽;

-在适于所述磷酸胆碱衍生物与所述赖氨酸发生连接的条件下使

磷酸胆碱衍生物与所述多肽之一的未封闭的赖氨酸接触;

-任选地,在适于所述报告基团与所述赖氨酸发生连接的条件下使报告基团与所述多肽之一的未封闭的赖氨酸接触;以及

-使所述多肽形成多肽二聚体。

9. 用于测定样品中 C-反应蛋白的浓度的方法,所述方法包括使所述样品与根据权利要求 1-7 的任意一项中所述的多肽相接触的步骤。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述样品得自患病的哺乳动物。

11. 根据权利要求 9-10 的任意一项中所述的方法,其中所述的多肽二聚体与固体支持物结合。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其包括以下步骤:

-使所述样品与根据权利要求 1-7 的任意一项中的第一多肽接触,所述第一多肽与固体支持物结合;

-使所述样品与根据权利要求 4-7 的任意一项中的第二多肽接触,所述第二多肽具有与其连接的报告基团;以及

-检测在所述第二多肽上的所述报告基团的存在或缺失情况。

13. 用于纯化 C-反应蛋白的方法,其包括使包含 C-反应蛋白的组合物与根据权利要求 1-7 的任意一项中所述的多肽接触。

14. 含有根据权利要求 1-7 的任意一项中所述的多肽的药物组合物。

15. 含有根据权利要求 1-7 的任意一项中所述的多肽的诊断用组合物。

C-反应蛋白的结合剂

发明领域

本发明涉及特异性结合某种蛋白质（在本发明中为C-反应蛋白）的分子及其用途的领域。

发明背景

对折叠多肽进行重新设计的目的在于增加我们对蛋白质结构的了解，并且还提供了具有剪切功能的新蛋白质的工程技术所需的平台。经设计的折叠多肽（其在配体的作用下发生了受到pH控制的、具有位点选择性的自功能化过程）构成了用于构建各种复杂的分子体系的极好的工具箱，其中所述各种复杂的分子体系例如有模型糖蛋白或复杂受体。

国际专利公开WO03/080653的目的是提供经折叠的、配体修饰的螺旋-环-螺旋的多肽支架结构，该多肽支架结构与识别和报告之类的重要的生物传感事件有关。选择人碳酸酐酶 II（HCAII）与其抑制剂（4-羧基苯磺酰胺）之间良好表征的相互作用来作为原理实证的证明。

C-反应蛋白是一种血浆蛋白，其在发炎期间以及在组织受损之后以增加的量在血流中循环。测定CRP的水平以用于评价（例如）发炎和心血管疾病风险增加的程度。此外，重要的是在心脏手术期间也要测量CRP的水平。

发明概述

本发明涉及经进一步修饰从而特异性地与 C-反应蛋白(CRP)结合的多肽支架结构。在下文中，这种经修饰的多肽支架结构被称为“CRP-特异性结合剂”、“CRP-结合剂”或简称为“结合剂”，除非另外指明，否则这些术语可交换使用。

在第一个方面中，本发明涉及CRP-特异性结合剂，其包含具有根据SEQ ID NO: 1序列的多肽，其中至少1个磷酸胆碱衍生物与所述多肽和多肽支架结构连接，所述多肽支架结构由四螺旋束构成，该四螺旋束由具有根据SEQ ID NO: 1序列的多肽的二聚体形成，其中所述CRP-特异性结合剂通过引入包含磷酸胆碱衍生物和可任选的报告基团的结合部分而被修饰，其中所述报告基团可以产生可检测的信号。所述二聚体的2个原聚体可以通过（例如）二硫键而彼此共价连接，但是也可以以非共价的形式彼此结合。此外，每个原聚体都可以被用作结合剂。

本发明还涉及用于产生根据所述第一实施方案的多肽的方法，该方法包括以下步骤:

-合成具有根据SEQ ID NO: 1序列的多肽;

-在适于磷酸胆碱衍生物与赖氨酸发生连接的条件下使磷酸胆碱衍生物与所述多肽的未封闭的赖氨酸接触;

-可任选地，在适于报告基团与赖氨酸发生连接的条件下使报告基团与所述多肽的未封闭的赖氨酸接触。

在另一个方面中，本发明涉及根据所述第一方面的结合剂在治疗和诊断应用中以及在生物技术应用中的用途，其中所述治疗和诊断应用例如为将所述结合剂掺入到药物或诊断用的组合物中以及用于检测样品（例如得自心脏手术中的或怀疑患有炎症的患者）中CRP的浓度的测定，其中所述的生物技术应用例如为蛋白质纯化或结合鉴定。

附图说明

图1为本发明所用的肽支架结构的文库的概况。

图2示出了本发明的CRP-结合剂与CRP的亲和性。

图3是使用本发明的CRP-结合剂进行CRP检测的示意图。

图4分别示出了天然丙酮酸激酶、与连接体结合的丙酮酸激酶以及与CRP-结合剂结合的丙酮酸激酶的活性。

图5为分别由本发明的激酶结合的CRP-结合剂和激酶结合的CRP-

特异性抗体所产生的信号强度的对比图。

图 6 为由检测得自人、马和狗的 CRP 所使用的、本发明的激酶结合的 CRP-结合剂所产生的信号强度的对比图。

发明详述

另人惊奇的是，本发明人示出了通过将磷酸胆碱连接在某一位置处可以急剧地增加 CRP 与多肽支架结构之间的结合亲和力。单独的磷酸胆碱与 CRP 的结合亲和力为～1 μM,支架多肽与 CRP 的结合亲和力为～100-1000 μM，然而用磷酸胆碱衍生物修饰的所述多肽与 CRP 的结合亲和力可为纳摩尔级。

未经修饰的支架结构与 CRP 的表面结合，而磷酸胆碱衍生物被引入到所述多肽支架结构上的结合位点内部的位置处或者与所述多肽支架结构上的结合位点非常接近的位置处。为了到达 CRP 上的结合位点，磷酸胆碱衍生物可以具 1-12 个碳原子（例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个碳原子）的间隔物。

本发明的结合剂的另一个令人惊奇的优点在于它们与得自不同哺乳动物的 CRP 都具有高的亲和力,这一点与 CRP-特异性抗体截然不同，CRP-特异性抗体通常与得自一种哺乳动物物种的 CRP 以高亲和力结合，而与得自其他物种的 CRP 则以较低的亲和力结合。

所述多肽支架结构还可以根据电荷的变化而改变，以便使该多肽支架结构与 CRP 的结合亲和力达到最佳。这可以优选地通过在所述多肽中将带电的氨基酸残基更换为不带电的氨基酸残基，或者通过使所述多肽中的氨基酸残基带有不同的电荷来实现，反之亦然。例如，Val 或 Ala（不带电荷）可以更换为 Glu（带 1 个负电荷）或 Arg（带 1 个正电荷）。

根据本发明的一个实施方案，所述多肽支架结构具有至少 2 个可以分别连接 CRP-结合部分和报告基团的赖氨酸残基。

基本的多肽支架结构原聚体具有根据 SEQ ID NO: 1 的序列。所述原聚体可以采用本领域技术人员已知的任何方法制备，所述方法例如

有重组技术或传统的自动化固相多肽合成技术。一个或多个位置处可以为赖氨酸。这些位置优选选自位置 8、10、15、17、22、25、34 和 37。然后，根据以下所述的方法使 CRP-结合部分和可任选的报告基团与赖氨酸连接。

所述报告基团可以为能够与赖氨酸残基连接并且能够产生可检测信号的任何基团。报告基团的优选实例为荧光探针，例如丹磺酰基、香豆素、荧光素、罗丹明和 Oregon Green 衍生物。所述报告基团还可以是酶（例如磷酸烯醇丙酮酸激酶）或可检测的颗粒（例如金质纳米颗粒）。可以根据供货商的说明书或采用其他传统方法使所述报告基团与赖氨酸残基连接。优选的是，在新合成的原聚体还在树脂上时，使所述报告基团与所述原聚体连接。

所述 CRP-结合部分为包含磷酸胆碱部分和间隔物的磷酸胆碱衍生物。所述间隔物的长度取决于配体与所述支架结构连接的位置以及配体与 CRP 结合的位置。所述间隔物通常为 1-12 个碳原子的脂肪族链，该脂肪族链可任选地被亲水性基团所取代，从而增强其溶解性。

通过使原聚体与磷酸胆碱衍生物的活性酯接触，使得磷酸胆碱衍生物与原聚体连接。所述活性酯具有以下所示的通式：

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

其中 $1 \leq n \leq 12$，并且 R^1 为 pKa 为约 6-8 的离去基团。其中 n 为 4、6 或 11 并且 R^1 为对硝基苯基的活性酯的合成在以下的试验部分中有所描述。

如试验部分所公开的那样将磷酸胆碱衍生物引入到多肽支架结构中。

本发明的 CRP-结合剂还可以可任选地通过连接体与固体支持物结合。许多固体支持物（例如片、板、珠子和膜）和连接体是市售可得的，并且技术人员可以根据本发明的 CRP-结合剂的使用环境而将它们结合起来。

结合测定方法

本发明的一个方面涉及使用本发明的结合剂进行的结合测定方法，更具体地说，本发明的一个方面涉及用于消除由生物样品中类风湿因子或人抗小鼠抗体(HAMA)造成的干扰的方法。

不同类型的夹心测定法（sandwich assays）被广泛使用。最普通的方法之一是夹心 ELISA 法，在该方法中，使用抗体来捕获抗原并使用另一种标记抗体来检测结合的抗原。这些抗体通常都是哺乳动物来源的。在所述的测定方法中，存在于样品（通常得自诸如血液或血清之类的体液中）中的抗哺乳动物 IgG 的抗体可以通过检测抗体与捕获抗体相结合而模拟抗原的行为，从而导致假阳性反应。这种假阳性反应可以在基于多克隆抗体和单克隆抗体的夹心测定中观察到。

越来越多的患者被给予小鼠单克隆抗体以进行诊断或治疗。施用单克隆抗体通常会诱导患者体内发生抗体反应 [12]；从而产生人抗鼠类动物抗体(HAMA)。已知，当 HAMA 存在于患者的血清中时，基于小鼠单克隆抗体的夹心型测定会产生假阳性结果。随着使用单克隆抗体进行治疗的患者的数量的增多，在临床化学试验中将产生越来越多的问题。

此外，在许多免疫测定中，类风湿因子(RF)是产生干扰的主要原因。RF 是与哺乳动物 IgG 的 Fc 部分发生反应的自身抗体。RF 可以是 IgA 种类、IgG 种类或 IgM 种类。在 60%至 80%的患有类风湿性关节炎(RA)的患者的血清中具有 RF 活性。在患有其他相关组织疾病和许多其他疾病的患者的血清中也发现了 RF。虽然 RF 与 IgG 的 Fc-部分发生反应，但是 RF 在与不同种类的 IgG 的反应性中显示出异质性。在涉及抗体的测定方法中，这种与其他种类的 IgG 的反应性可以产生假阳性反应。经典的用于 RF 的试验为凝集试验，该试验中，RF 与两种（如果是 IgM-RF 试验，则为更多种）不同的哺乳动物 IgG 分子发生反应，从而导致凝集。在夹心 ELISA 中，同样的反应也将产生假阳性反应，这是由于在抗原（该抗原为对所述测定方法进行设计以便将其检测出来的抗原）不存在的情况下检测抗体与捕获抗体发生了结合的原因。

由于抗-IgG 的抗体通常直接针对 IgG 分子的 Fc 部分，所以解决

上述问题的一个方法是在所述的测定中使用 Fab 片段。然而，对 IgG 进行酶切以产生 Fab 片段是耗时的，并且通常导致抗体滴度减少，并且不会降低由抗-Fab 的抗体所产生的干扰。此外，为了避免上文中提及的问题，已经采用引入小鼠 IgG 或小鼠血清或者引入层析法来除去起干扰作用的抗体。引入正常小鼠 IgG 或正常小鼠血清有时不会消除假阳性反应。通过层析法除去起干扰作用的抗体是耗时的，并且很少适用于常规分析。

因此，本发明的一个方面是将所述测定方法中的至少一种抗体变成根据本发明的、不会被 HAMA 或 RF 结合的结合剂。

在这方面的一个实施方案中，本发明涉及用于测定样品中 C-反应蛋白的浓度的方法，该方法包括:

-使所述样品与根据权利要求 1-6 中任意一项所述的第一多肽二聚体接触，其中所述第一多肽与固体支持物结合;

-使所述样品与根据权利要求 3-6 中任意一项所述的、其上连接有报告基团的第二多肽二聚体接触，以及

-检测所述第二多肽二聚体上所述报告基团的存在及缺乏情况。

实验部分

磷酸胆碱衍生物 PC6、PC11 和 PC4 的合成

如上文中说明的那样，与所述多肽支架结构连接的磷酸胆碱衍生物可以具有 1-12 碳原子的间隔物。在上述磷酸胆碱衍生物中，PC 表示磷酸胆碱，PC 后的数字表示间隔物的长度，即 PC6 表示具有 6 个碳原子的间隔物。

关于 PC6 的合成，我们首先选择一种如方案 1 所概述的简短的途径。在第一步骤中，通过在催化氢化条件下使用甲醛将相应氨基酸烷基化，从而以较高的产率制备出 6-二甲基氨基己酸。使用强酸性阳离子交换剂对所得叔胺进行简单纯化。[3] 然后，将羧酸官能团酯化，从而以基本定量的产率生成甲基酯，并且无需纯化步骤。通常，随后仅以适当的产率进行使用了溴化物的烷基化过程，其中所述溴化物是由二乙基磷酰氯和 2-溴乙醇容易地制得的。[4] 在经过 RP HPLC 纯化后，

用氢氧化锂使甲基酯裂解，并且以几乎定量的产率得到羧酸，并且无需纯化。活性酯的生成是按照 Kim 等人的方法使用氯甲酸对硝基苯酯、一种碱和 DMAP 来进行的。[5] 在经过 RP HPLC 纯化后，获得了所述的活性酯，产率仅为 28%。磷酸基团的最终脱保护过程是使用 TMSBr 在温和的条件下进行的，从而没有影响羧酸酯。[6] 另一方面，对于某些底物而言，该反应过程中生成副产物是该过程的已知的缺点。[7] 但是，除了单脱保护的磷酸酯和不具有磷酸基团的季胺之外，我们得到了所需的磷酸酯，产率为 25%。

关于 PC11 的制备，为了避免繁琐的纯化过程和溶解性问题，我们选择在固相上合成的途径(方案 2)，该途径包括若干步骤。因此，利用 DIC 方法使 Fmoc 保护的十一酸与 Wang 树脂相连，产率为 66%。[8] 在使用哌啶脱保护后，用甲酸和硼氢化钠完成二甲基化过程。[9] 对季胺的烷基化步骤是缓慢的反应过程，并需要 10 当量的溴化物并需要加热 4 天。[10] 在使粗产物从树脂上裂解下来之后，采用我们在制备 PC6 过程中使用的相同的方法将该粗产物转变为活性酯。磷酸基团的最终脱保护步骤与 PC6 中的过程相似，并且有副产物形成，但是得到了 27% 的所需产物。

方案 1

PC6-对硝基苯基酯的合成

磷酸 2-溴-乙基酯二乙基酯。将由 2-溴乙醇(1.42 mL, 20 mmol)和无水吡啶(3.23 mL, 40 mmol)在无水二氯甲烷（25mL）中形成的溶液冷却至 0℃。向其中滴加二乙基磷酰氯(3.36 mL, 23 mmol)，并在室温下将所得的反应混合物搅拌 24 小时。加入二乙酯(40 mL)和 1N HCl(40 mL)，将形成的有机层分离出来，并用 1N HCl 和饱和的 $NaHCO_3$ 进行连续的洗涤，然后在 $MgSO_4$ 上干燥。在溶剂蒸发后，采用柱层析(硅胶，乙酸乙酯:戊烷=1:1)纯化残余物，从而得到为浅黄色油状物的产物(4.85g, 18.6 mmol, 93%)。^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ = 1.34 (dt, 6H, 2 x CH_3, $^3J[H,H]$ = 7.2 Hz, $^4J(H,P)$ = 1.2 Hz); 3.52 (t, 2H, CH_2Br, ^3J = 6 Hz); 4.13 (dq, 4H, 2 x CH_2CH_3, $^3J(H,H)$ = 7.2 Hz,

$^{3}J(H,P)$ = 7.2 Hz); 4.28 (dt, 4H, 2 x OCH_2CH_2Br, $^{3}J(H,H)$ = 6.4 Hz, $^{3}J(H,P)$ = 8.4 Hz)。^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.5 MHz) δ = 16.0 (d, 2 x CH_3, ^{3}J = 6.8 Hz); 29.4 (d, CH_2Br, ^{2}J = 7.6 Hz); 64.0 (d, OCH_2, ^{2}J = 5.3 Hz); 66.5 (d, OCH_2, ^{2}J = 5.3 Hz)。

6-二甲基氨基己酸。在过量的甲醛(4 mL)和 10% Pd/C(0.5g)存在的条件下，在室温、H_2压力为 90psi 的条件下将由氨基酸(1.32 g，10 mmol)在水中形成的溶液在 Parr 装置中氢化 36 小时。将催化剂通过过滤除去，并用热水洗涤 2 次。将混合的水层通过 DOWEX 50WX2-100 离子交换柱。在将该交换柱用水洗涤之后，用 2%的含水 NH_4OH 对该柱进行洗脱，从而得到为无色晶体的纯净产物(1.39 g，8.7 mmol，87%)。

6-二甲基氨基己酸甲酯。在 30 分钟内，向由 6-二甲基氨基己酸(1.37 g，8.6 mmol)在无水甲醇(50 mL)中形成的冰冷却的溶液中滴加亚硫酰氯(9 mL)。将所得反应混合物温暖至室温，并搅拌过夜。在减压下使溶剂蒸发。反复加入甲醇，随后再进行蒸发，从而以几乎定量的产率得到为无色固体的、纯的甲基酯。^{1}H NMR (DMSO d_6, 400 MHz) δ = 1.27 (m, 2H, CH_2); 1.53 (m, 2H, CH_2); 1.63 (m, 2H, CH_2); 2.31 (t, 2H, ^{3}J = 7.6 Hz, CH_2); 2.67 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 2.96 (t, 2H, ^{3}J = 8 Hz, CH_2); 3.57 (s, 3H, $COOCH_3$)。^{13}C NMR (DMSO d_6, 100.5 MHz) δ = 23.1; 23.8; 25.3; 32.9; 41.7; 51.2; 56.0; 173.1。

三氟乙酸[2-二乙氧基-磷酰氧基]-乙基]-(5-甲氧基羰基-戊基)-二甲基铵。将甲基酯(1.73 g，10 mmol)溶解于无水乙腈(15 mL)中，并加入 K_2CO_3 (1.38 g，10 mmol)。将所得悬浮液在氮气下回流 36 小时。在所得混合物冷却至室温后，加入水，并通过加入 TFA 将 pH 调至 2。所得溶液采用 rp HPLC (Supelco Discovery C 18，21.2 mm x 15 cm，5μm，A: 5% IPA，95% H_2O，0.1% TFA; B: 90% IPA，10% H_2O，0.1% TFA; 在 14 分钟内 B 由 0%升至 15%，t_R = 11.8 min)进行纯化，并将所得物冻干，从而得到为浅黄色油状物的 TFA 的季胺盐(1.06g，3.0 mmol，30%)。LC-MS(Phenomenex Gemini，C18，5μm，150 x 3.0 mm，A: 0.1%的甲酸水溶液，B: 0.1 %的甲酸乙腈溶液，在 10 分钟内

B 由 10%升至 50%)，t_R = 6.4 min (LSD 信号)，对于[M+H]+，m/z = 354.2。^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ = 1.41-1.50 (m, 8H, 2 x OCH_2CH_3 和 CH_2)；1.77 (m, 2H, CH_2)；1.90 (m, 2H, CH_2)；2.44 (t, 2H, CH_2, ^3J = 7.2 Hz)；3.25 (s, 6H, $N(CH_3)_2$)；3.48 (m, 2H, CH_2)；3.72 (s, 3H, $COOCH_3$) 3.82 (m, 2H, CH_2)；4.26 (dq, 4H, 2 x CH_2CH_3, ^3J(H,H) = 6.8 Hz, $^3J(H_1P)$ = 8.0 Hz)；4.58 (brs, 2H, CH_2)。^{13}C NMR (CD_3OD, 100.5 MHz) δ = 16.4 (d, 2 x OCH_2CH_3, ^3J = 6.1 Hz)；23.3 (CH_2)；25.3 (CH_2)；26.7 (CH_2)；34.4 (CH_2)；52.0 (CH_3)；52.2 (CH_3)；62.1 (d, CH_2, ^2J = 5.3 Hz)；64.8 (CH_2)；66.1 (d, CH_2, ^2J = 6.1 Hz)；66.7 (CH_2)；175.5 (CO)。

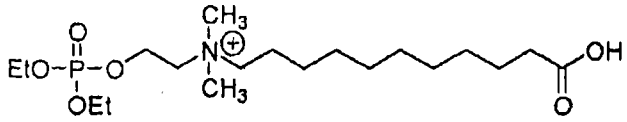
三氟乙酸(5-羧基-苯基)-[2-(二乙氧基-磷酰氧基)-乙基]-二甲基铵。将 TFA 的季胺盐(200 mg，0.56 mmol)溶解于叔丁醇/水(2:1，9 mL)的混合物中，并加入 $LiOH \cdot H_2O$(47 mg，1.12 mmol)。将所得反应混合物在室温下搅拌 3 小时，并在减压下除去有机溶剂。用 0.1N HCl 将所得含水溶液的 pH 调至 7，随后将该混合物冻干，并在未进行纯化的条件下进一步使用。LC-MS(Phenomenex Gemini，C 18，5μm，150 x 3.0 mm，A: 0.1%的甲酸水溶液，B: 0.1 %的甲酸乙腈溶液，在 10 分钟内 B 由 10%升至 40%)，t_R = 6.8 min (LSD signal)，对于[M+H]+，m/z = 340.2。^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ = 1.34-1.42 (m, 8H, 2 x OCH_2CH_3 和 CH_2)；1.67 (m, 2H, CH_2)；1.80 (m, 2H, CH_2)；2.20 (t, 2H, CH_2, ^3J = 7.6 Hz)；3.16 (s, 6H, $N(CH_3)_2$)；3.40 (m, 2H, CH_2)；3.72 (brs, 2H, CH_2)；4.18 (dq, 4H, 2 x CH_2CH_3, ^3J(H,H) = 7.0 Hz, ^3J(H,P) = 8.0 Hz)；4.50 (brs, 2H, CH_2)。^{13}C NMR (CD_3OD, 100.5 MHz) δ = 16.4 (d, 2 x OCH_2CH_3, ^3J = 6.8 Hz)；23.2 (CH_2)；26.5 (CH_2)；27.1 (CH_2)；37.9 (CH_2)；52.0 (CH_3)；62.1 (d, CH_2, ^2J = 4.6 Hz)；64.5 (CH_2)；66.1 (d, CH_2, ^2J = 6.1 Hz)，66.8 (CH_2)；181.3 (CO)。

三氟乙酸[2-(二乙氧基-磷酰氧基)-乙基]-二甲基-[5-(4-硝基-苯氧羰基)-戊基]-铵。向由羧酸(26 mg，0.076 mmol)在无水乙腈(3 mL)中形成的溶液中连续加入三乙胺(0.01 mL，0.084 mmol)、氯甲酸对硝

基苯酯(31 mg, 0.15 mmol)和DMAP(1 mg)。4小时后，通过加入0.1%的TFA水溶液使反应停止，随后采用rp HPLC (Supelco Discovery C 18, 21.2 mm x 15 cm, 5μm, A: 5% IPA, 95% H_2O, 0.1% TFA, B: 90% IPA, 10% H_2O, 0.1% TFA, 在12分钟内B由20%升至40%, t_R = 10.3 min)进行纯化，从而得到为无色油状物的对硝基苯酯(10 mg, 0.022 mmol, 28%)。LC-MS (Phenomenex Gemini, C18, 5μm, 150 x 3.0 mm, A: 0.1%的甲酸水溶液, B: 0.1 %的甲酸乙腈溶液, 在8分钟内B由10%升至90%) t_R = 4.3 min (UV信号), 对于[M+H]+, m/z = 461.5。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 1.34 (t, 6H, 2 x OCH_2CH_3, ^3J= 7.2 Hz); 1.48 (m, 2H, CH_2); 1.81 (m, 4H, 2 x CH_2); 2.63 (t, 2H, CH_2, ^3J = 7.2 Hz); 3.27 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 3.51 (m, 2H, CH_2); 3.92 (m, 2H, CH_2); 4.14 (dq, 4H, 2 x CH_2CH_3, ^3J(H,H) = 7.5 Hz, ^3J(H,P) = 7.5 Hz); 4.47 (m, 2H, CH_2); 7.27 (d, 2H, ^3J = 9 Hz, Phe-H); 8.25 (d, 2H, ^3J = 9 Hz, Phe-H)。^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.4 MHz) δ = 16.0 (d, 2 x OCH_2CH_3, ^3J = 6.6 Hz); 22.4 (CH_2); 23.8 (CH_2); 25.4 (CH_2); 33.6 (CH_2); 51.6; 60.8 (d, CH_2, ^2J = 4.8 Hz); 63.3 (?); 64.7 (d, CH_2, ^2J = 5.9 Hz); 65.7; 122.5 (2 x Phe-CH); 125.2 (2 x Phe-CH); 145.3 (Phe-C; 155.3 (Phe-C); 170.8 (CO)。

三氟乙酸二甲基-[5-(4-硝基-苯氧羰基)-戊基]-(2-膦酰氧基-乙基)-铵。将被保护的对硝基苯酯(20 mg, 0.043 mmol)溶于无水乙腈(3 mL)中，并加入三甲基溴硅烷(0.11 mL, 0.87 mmol)。将所得反应混合物在室温下搅拌24小时。在向其中加入0.1%的TFA水溶液(1 mL)后，所得溶液采用rp HPLC (Supelco Discovery C18, 21.2 mm x 15 cm, 5μm, A: 0.1%的TFA水溶液, B: 0.1%的TFA乙腈溶液,在14分钟内B由17%升至30%, t_R = 12.7 min)进行纯化，从而得到作为TFA盐的磷酸胆碱衍生物PC_6-对硝基苯酯(4.6 mg, 0.011 mmol, 25%)。LC-MS (Phenomenex Gemini, C 18, 5μm, 150 x 3.0 mm, A: 0.1%的甲酸水溶液, B: 0.1 %的甲酸乙腈溶液, 在10分钟内B由10%升至90%) t_R = 3.8 min (UV信号), 对于[M+H]+, m/z = 405.5。

方案 2



三氟乙酸(10-羧基-癸基)-[2-(二乙氧基-磷酰氧基)-乙基]-二甲基-铵

将 Fmoc-十一酸(635 mg, 1.5 mmol)溶于无水 DMF(2ml)中，并加入由二异丙基碳二亚胺(0.12 ml, 0.75 mmol)在无水二氯甲烷(10 ml)中形成的溶液。将所得的黄色混合物在 0℃下搅拌 20 分钟。在除去挥发性的二氯甲烷之后，将对称酐溶液加入 Wang 树脂(250 mg, 1.2 mmol/g, 0.3 mmol)中。加入 DMAP (18 mg, 0.15 mmol)，并将所得反应混合物搅拌过夜(W. C. Chan, P. D. White in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach (Eds.: W. C. Chan, P. D. White) Oxford University Press, Oxford 2000, pp. 55-56.)。将树脂用 DMF(5 x 2 min)和二氯甲烷(5 x 2 min) 洗涤，并用乙醚进行收缩。将该过程重复 1 次，并根据对 Fmoc-哌啶加合物进行的 UV 分光光度测定法，测定最终的取代水平为 0.8 mmol/g (66%)。(ibid., pp 62-63)

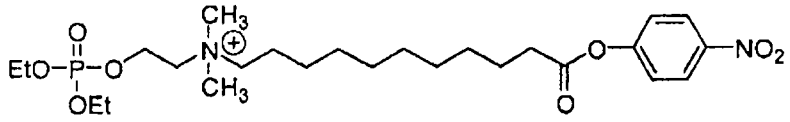
在用 20%的哌啶/DMF 进行 Fmoc 脱保护后，使树脂在 THF 中溶胀。向其中加入由 THF(2 ml)、甲醛(40%, 0.7 ml, 1 mmol)和乙酸(0.7 ml)形成的混合物，并将树脂温育 5 分钟。然后，加入氰基硼氢化钠(62 mg, 1 mmol)，并将树脂在室温下搅拌过夜。此后，将树脂用 THF、H_2O 和 MeOH 依次洗涤。

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

使树脂在 DMF 中溶胀，并加入磷酸二乙酯-(2-溴-乙酯)/磷酸 2-溴乙酯二乙酯(520 mg, 2 mmol)和 DIEA(0.03 ml, 0.2 mmol)，然后将所得反应混合物加热至 60℃，并持续 4 天。将所得树脂用 DMF 和 DCM 洗涤，并用 MeOH 进行收缩。

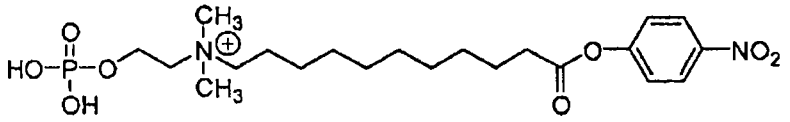
J. Cai, B. Wathey Tetrahedron Lett. 2001, 42, 1383-1385。

最后，通过将产物与 TFA/H_2O/TIS (95:2.5:2.5)的混合物一起搅拌 2h，从而将所述产物从树脂上裂解下来。在有机溶剂蒸发之后，使用了羧酸，并加入水，然后将产物冻干并且没有进行进一步的纯化。



三氟乙酸[2-(二乙氧基-磷酰氧基)-乙基]-二甲基-[10-(4-硝基-苯氧羰基)-癸基]-铵

向由羧酸 X 在无水乙腈(5 ml)中形成的溶液中连续加入三乙胺(0.03 ml, 0.2 mmol)、氯甲酸对硝基苯酯(80 mg, 0.39 mmol)和 DMAP(7 mg)。4 小时后，通过加入 0.1%的 TFA 水溶液使反应停止，随后采用 RP HPLC (Supelco Discovery C 18, 21.2 mm x 15 cm, 5μm, A: 浓度为 0.1% 的由 TFA 在 IPA/H_2O(5:95)中形成的溶液, B: 浓度为 0.1%的由 TFA 在 IPA/H_2O(90:10)中形成的溶液，在 20 分钟内 B 由 15%升至 45%, t_R = 16.5 min)对所得产物进行纯化，从而得到为无色油状物的对硝基苯酯 X(4 mg, 0.007 mmol, %)。LC-MS (Phenomenex Gemini, C18, 5μm, 150 x 3.0 mm, A: 0.1%的甲酸水溶液, B: 0.1 %的甲酸乙腈溶液，在 10 分钟内 B 由 10%升至 90%) t_R = 5.2 min (UV 信号); M = 531.5 (M^+)。



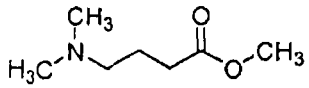
三氟乙酸二甲基-[10-(4-硝基-苯氧羰基)-癸基]-(2-膦酰氧基-乙基)-铵

将被保护的对硝基苯酯(4 mg, 0.007 mmol)溶于无水乙腈(3 ml)中，并且分别在 0 小时、12 小时和 24 小时后加入三甲基溴硅烷(0.11 ml, 0.07 mmol)。将所得反应混合物在室温下共搅拌 36 小时。在向其中加入 0.1%的 TFA 水溶液(1 ml)之后，通过 rp HPLC (Hichrom C8, 21.2 mm x 25 cm, 10μm, A:浓度为 0.1%的由 TFA 在 ACN/H_2O(10:90)中形成的溶液, B: 浓度为 0.1%的由 TFA 在 ACN/H_2O(90:10)中形成的溶液，

在 15 分钟内 B 由 40%升至 60%, t_R = 14.2 min)对所得溶液进行纯化，从而得到作为 TFA 盐的磷酸胆碱衍生物(1.1 mg, 0.002 mmol, 27%)。

LC-MS (Phenomenex Gemini, C 18, 5μm, 150 x 3.0 mm, A: 0.1%的甲酸水溶液, B: 0.1 %的甲酸乙腈溶液, 在 10 分钟内 B 由 10%升至 90%) t_R = 5.9 min (UV 信号), M = 475.4 (M^+)。

PC4

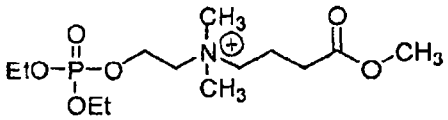


4-二甲基氨基丁酸甲酯

与制备 PC6 的过程相同

^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz) δ = 2.06 (m, 2H, CH_2); 2.56 (t, 2H, ^3J = 7.2 Hz, CH_2); 2.93 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 3.22 (m, 2H, CH_2); 3.75 (s, 3H, $COOCH_3$)。^{13}C NMR (CD_3OD, 100.5 MHz) δ = 20.9; 31.2; 43.5; 52.3; 58.1; 174.3。

LC-MS (Phenomenex Gemini, C18, 5μm, 150 x 3.0 mm, A: 0.1%的甲酸水溶液, B: 0.1 %的甲酸乙腈溶液, 在 10 分钟内 B 由 10%升至 50%) t_R = 1.3 min (ELSD 信号); M = 146.4 ($(M+H)^+$)。



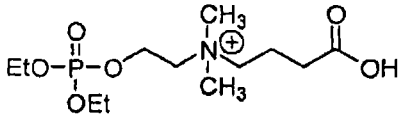
三氟乙酸[2-二乙氧基-磷酰氧基]-乙基]-(3-甲氧基羰基-丙基)-二甲基铵

将甲酯 X(516 mg, 3.5 mmol)溶于无水乙腈(8 ml)中，并加入 K_2CO_3(484 mg, 3.5 mmol)。将所得悬浮液在氮气下回流 24h。在将其冷却至室温后，加入水，并通过加入 TFA 将 pH 调至 2。所得溶液采用 rp HPLC (Supelco Discovery C 18, 21.2 mm x 15 cm, 5μm, A: 0.1%的 TFA, 5%的 IPA 水溶液, B: 0.1%的 TFA, 10%的 IPA 水溶液, 在 10 分钟内 B 由 0%升至 10%, t_R = 8.8 min)进行纯化，并将所得物冻干，从而得到为浅黄色油状物的 TFA 的季胺盐。

^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ = 1.36 (t, 6H, 2 x OCH_2CH_3, ^3J =

6.8Hz); 2.08 (m, 2H, CH_2); 2.47 (t, 2H, CH_2, ^3J = 7.2 Hz); 3.20 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 3.45 (m, 2H, CH_2); 3.70 (s, 3H, $COOCH_3$); 3.76 (t, 2H, CH_2, ^3J = 4.4 Hz); 4.18 (dq, 4H, OCH_2CH_3 $^3J(H,H)$ = 7.2 Hz, $^3J(H,H)$ = 7.2 Hz); 4.52 (bs, 2H, CH_2)。

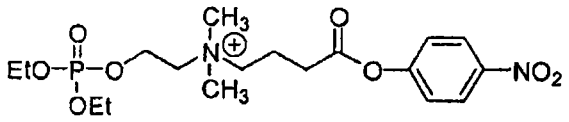
^{13}C NMR (CD_3OD, 100.5 MHz) δ = 16.4 (d, 2 x OCH_2CH_3, ^3J = 6.1 Hz); 19.0 (CH_2); 30.7 (CH_2); 52.3 (CH_3); 52.4(CH_3); 62.1 (d, CH_2, ^2J = 4.5 Hz); 64.4 (CH_2); 65.4 (CH_2); 66.1 (d, CH_2, ^2J = 6.0 Hz); 174.0 (CO)。



三氟乙酸(3-羧基-丙基)- [2-(二乙氧基-磷酰氧基)-乙基]-二甲基铵

与制备 PC6 的过程相同

LC-MS (Phenomenex Gemini, C18, 5μm, 150 x 3.0 mm, A: 0.1%的甲酸水溶液, B: 0.1 %的甲酸乙腈溶液, 在 10 分钟内 B 由 10%升至 50%) t_R = 1.8 min (ELSD 信号); M = 312.3 (M^+)。



三氟乙酸[2-(二乙氧基-磷酰氧基)-乙基]-二甲基-[3-(4-硝基-苯氧羰基)-丙基]-铵

向由羧酸在无水乙腈(5 ml)中形成的溶液中连续加入三乙胺、氯甲酸对硝基苯酯和 DMAP。4 小时后, 通过 0.1%的 TFA 水溶液使反应停止, 随后采用 RP HPLC (Supelco Discovery C18, 21.2 mm x 15 cm, 5μm, A: 0.1%的 TFA, 5%的 IPA 水溶液, B: 0.1%的 TFA, 10%的 IPA 水溶液, 在 13 分钟内 B 由 10%升至 30%, t_R = 11.8 min)进行纯化, 从而得到为无色油状物的对硝基苯酯。

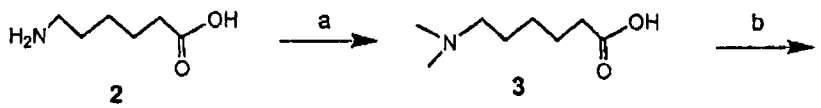
LC-MS (Phenomenex Gemini, C 18, 5μm, 150 x 3.0 mm, A: 0.1%的甲酸水溶液, B: 0.1 %的甲酸乙腈溶液, 在 10 分钟内 B 由 10%升至

90%) t_R = 3.1 min(UV 信号); M = 433.2 (M^+)。

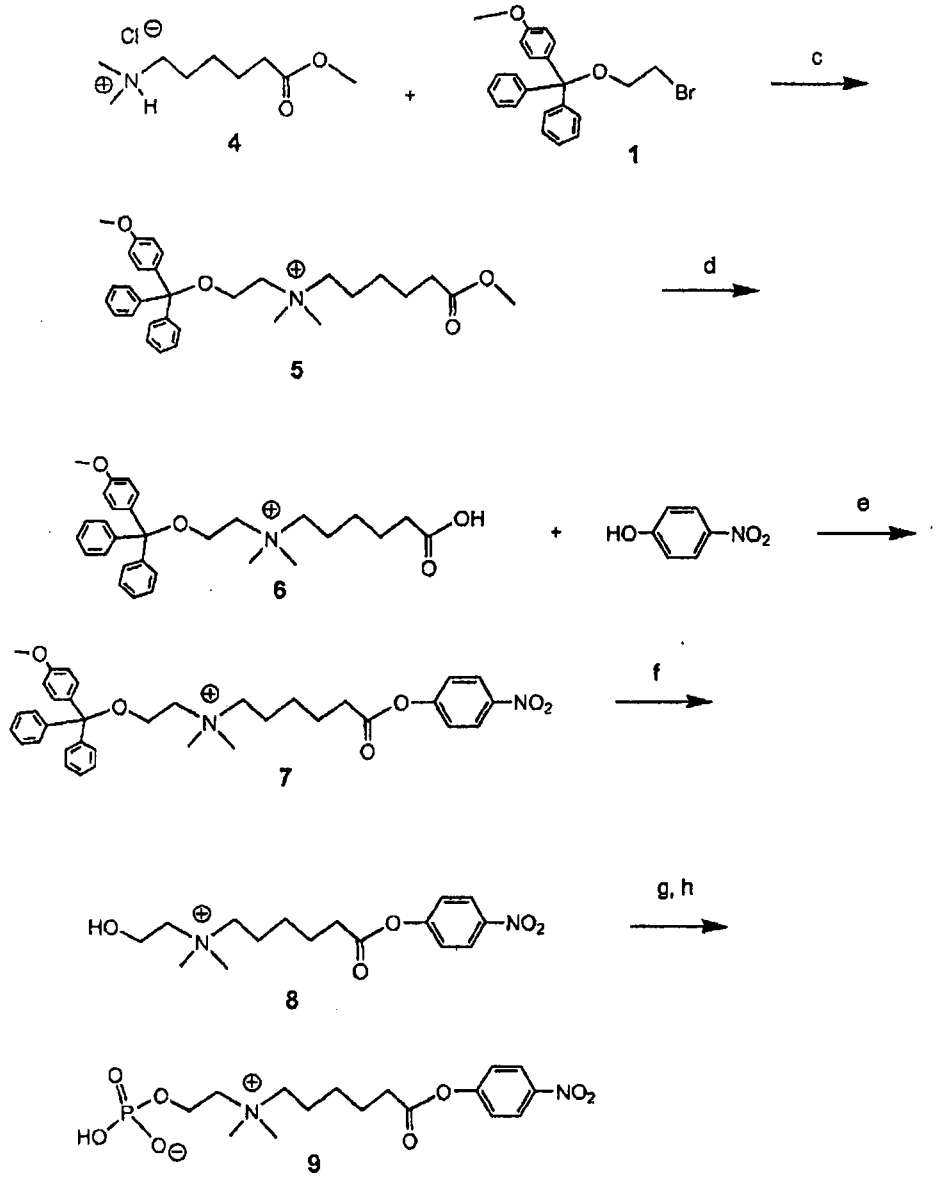
用于制备 PC6 的备选方案

前几年，开发出了用于制备磷酸胆碱配体 PC6 的备选策略。下文中将对此进行概述。将这种用于制备 PC6(化合物 9)的策略概括于方案 3 中。由于即使使磷酸官能团以被保护的形式来进行其他必需的转化步骤，其也被认为是麻烦的，所以将磷酸化过程选择作为最后的步骤。

通过 Eschweiler-Clarke 形式的反应过程(用甲醛和氢/钯/碳进行处理)，对市售可得的氨基己酸 2 进行 N,N-二甲基化[11、12]，并通过用甲醇的盐酸溶液进行处理来将所得产物(3, 86%)酯化，从而得到甲基酯 4(96 %)。通过使甲基酯 4 与被单甲氧基三苯甲基保护的溴乙醇 1 反应来实现季铵化过程，从而形成衍生物 5(73%)。未被保护的溴乙醇也能与甲基酯 4 反应，但是反应产率较低，并且产物更难以检测和纯化。单甲氧基三苯甲基保护基团赋予了重要的中间产物 5 以亲油性和 TLC 可检测性(UV 光可见并且可进行酸染色)。用氢氧化锂/水/叔丁醇对衍生物 5 进行皂化，得到了相应的酸 6，在未对酸 6(95%)进行分离的情况下，用溶解于吡啶中的对硝基苯酚和二异丙基碳二亚胺对其进行处理，得到了对硝基苯酯 7 (86%)。由于对硝基苯酯 7 易于发生自缩合，所以用甲酸对对硝基苯酯 7 进行简单的处理便得到了相应的醇 8，该醇 8 在下一步骤中被直接使用。将醇 8 粗品在 0℃下溶解于乙腈中，并使其首先与过量的氯氧化磷和三乙胺反应，然后再与水反应，从而在 HPLC 纯化后由对硝基苯酯 7 得到了所需的单磷酸酯 9，产率为 22%。化合物 9 显示出了所期望的 NMR 和 LC-MS 光谱，并且在 pH 为酸性的水溶液(0.1 % TFA)中稳定存在。但是，为了方便储存，将化合物 9 作为 DMSO 储备溶液存放于冰箱中。



2 3



方案 3，试剂，条件和产率：a: CH_2O, H_2, Pd/C (86%)；b: CH_3OH, HCl (96%)；c: Na_2CO_3, CH_3CN (73%)；d: LiOH, t-BuOH/H_2O (95%)；e: DIPCDI，吡啶(86%)；f: HCOOH/H_2O；g: $POCl_3$, TEA；h: H_2O (22%，由对硝基苯酯 7 得到)。

常规方法-在减压下进行浓缩[浴温<40℃]。使用 Varian Unity 500 MHz 分光计在 298° K 下记录 NMR 光谱。只报告所选的 NMR 数据。通过合适的 2-D 试验来确证分配。采用 Perkin-Elmer SCIEX API 150-EX 质谱仪以直接进样模式来进行针对稀释的甲醇或乙腈溶液的电喷雾质谱(ES-MS)测定。使用供应商提供的软件在 Apple MacIntosh Quadra 计算机上记录阳离子模式的光谱，并对其进行处理。

在 Silica Gel F254 (Merck, Darmstadt, Germany)板上进行 TLC，

并采用UV光和/或用5%的茚三酮丁醇溶液或5%的硫酸乙醇溶液进行染色来实施检测。除非另作说明，否则在Matrex silica gel 60 Å (35-70 μm, Amicon)上进行柱层析。使用Varian HPLC系统来实施制备性HPLC的过程，其中所述Varian HPLC系统由9012梯度泵、9065二极阵列检测器、以及运行Varian Star HPLC软件的PC计算机系统构成。用得自International Sorbent Technology有限公司(Mid Glamorgan, UK)的Isolute C-18 EC反相硅胶（40-70微米颗粒尺寸）填满开放式玻璃柱，并用特定的溶剂洗脱该Isolute C-18 EC反相硅胶。除非另作说明，否则其他试剂和溶剂均购买具有高商业品质的种类，并且在无需进一步纯化的条件下使用。

2-单甲氧基三苯甲氧基-1-溴乙醇(1)-该化合物的制备方法与相应的三苯甲基衍生物的制备方法类似[13]。简言之，在室温下将单甲氧基三苯甲基氯(3.09 g, 10 mmol)加入到由溴乙醇(1.0 g, 8.0 mmol)在无水吡啶(5 mL)中形成的溶液中。12 小时后，TLC(己烷:乙酸乙酯=9:1)显示存在2个UV吸收点，一个吸收点(主要的)的rf值为0.9，一个吸收点(次要的)的rf值为0.7。向所述溶液中加入水(0.1 mL)，并且在室温下将所得混合物搅拌15分钟后，该混合物被隔在乙酸乙酯和2M硫酸水溶液之间，然后用碳酸氢钠水溶液洗涤有机层，并浓缩该有机层。通过柱层析在硅胶(160 g)上纯化残余物（其中所述硅胶装于浓度比为95:5的戊烷-乙酸乙酯中），并用逐步梯度为95:5至90:10的戊烷-乙酸乙酯进行洗脱。收集主要的部分，从而得到作为浆状物的1(2.75 g，87 %)，其在静置过程中发生结晶。可供选用的其他方式是，省略层析过程，并使浆状物粗品直接从甲醇中结晶析出，从而得到纯的晶体，产率为40-50%。直接进样模式的ES-MS显示，在m/z 273处形成1个巨大的峰(其为单甲氧基三苯甲基阳离子)，但是在419/421处形成了2个非常小的峰(M+Na)。H-NMR数据 ($CDCl_3$): 3.44/3.48 (2个多重峰, 2+2 H, OCH_2CH_2Br), 3.83 (s, 3H, $ArOCH_3$), 6.88 (d, 2H, ArH), 7.24-7.52 (m, 12H, Ar- H)。

6-[N,N-二甲基氨基]-N-[2-(单甲氧基三苯甲氧基)-乙基]-己酸

甲酯(5)-

将由 6-氨基己酸(2, 13.2 g)在含水甲醛(37%, 40 mL)中形成的溶液与 Pd/C (1.0 g)混合，并将所得混合物在室温和 50 巴下、在 Parr 不锈钢装置中进行氢化，同时进行磁力搅拌。通过 TLC(乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸: 水= 6: 3: 3: 2, 茚三酮检测)方法进行的检验表明，起始物(rf 0.7)几乎完全转化为迁移较慢的产物(rf 0.5，褐色)。使反应混合物通过硅藻土床过滤，并将该过滤器床用水洗涤(20 mL)，然后用水(60 mL)进行稀释，并使所得溶液缓慢通过 Dowex-50 Wx2(100 目)的柱(其中 Dowex-50 Wx2 为 H^+形式, 0.7 meq/mL, 150 mL, 并用 milli-Q 水仔细地进行了预洗涤)。然后，用 milli-Q 水(200 + 100 mL)洗涤所述的柱子，接着用 2%的氨水(400 mL)洗脱所得产物。通过 TLC(乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸: 水= 6: 3: 3: 2, 茚三酮检测)方法对洗脱物进行监测。使合适的流分部分蒸发，然后冻干，从而得到半固体残余物(13.7 g, 86 %)。直接进样模式的 ES-MS 显示出，在 m/z 160.2 处形成了一强峰(M+H)，其与 N,N-二甲基化的产物(3)相应。

将一部分产物(3)粗品物质(3.97 g, 25 mmol)溶解于甲醇(75 mL)中，并且在冰中冷却并进行搅拌，同时在 30 分钟内滴加亚硫酰氯(10mL, 134mmol)，然后停止冷却，并将所得混合物置于室温下过夜。通过 TLC(乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸: 水= 10: 3: 3: 2, 茚三酮检测)方法进行的检验表明，上述混合物转化成移动稍快的化合物，并且该化合物的着色浅且颜色不同。其中还带有少量之前步骤中的移动较快的杂质。16 小时后，浓缩所得反应混合物，并将所得物与甲醇进行若干次共浓缩，从而得到一种在静置时发生部分结晶的残余物(5.05 g)。该残余物的直接进样模式的 ES-MS 显示出，在 m/z 174.0 处形成了一强峰(M+H)，其与 6-(N,N-二甲基氨基)-己酸甲酯(4)相应。

将一部分产物(4)粗品物质(1.12 g, 纯度约为 75 %, 4.0 mmol)、无水乙腈(25 mL)、2-(单甲氧基三苯氧基)-2-溴乙醇(1, 1.60 g, 4.0 mmol)和固态无水碳酸钠(800 mg)回流(浴温为 70℃)过夜，而后，TLC 表明仅发生了部分转化，因此加入更多的化合物 1(800 mg, 2.0 mmol)

和碳酸钠(500 mg)，并将回流再持续 24 小时。然后，TLC 表明大部分起始物质消失，并生成一种新的、迁移较快且发生茚三酮显色的 UV 吸收点。该混合物被隔在二氯甲烷和水之间（其中所需的物质存在于有机相中），然后将水相用少量的二氯甲烷洗涤，接着将所得的混合的有机层用少量的水洗涤，然后将所得物浓缩至小体积(10 mL)，该浓缩物被隔在甲基叔丁基醚和水之间(现在，所需的物质存在与水相中)。将有机相用少量水洗涤，并将混合的水层用少量的甲基叔丁基醚洗涤。然后马上对混合的水性溶液进行旋转蒸发，从而除去非水性溶剂(大约除去了 1/3 体积的溶剂)，使残余溶液通过 Bond-Elut C-18-EC 柱(35 g，填充甲醇，然后用水平衡)，然后用水洗涤，然后先用 20%、再用 50%、最后用 60%的甲醇水溶液进行洗脱。用 60%的甲醇洗脱液洗脱作为纯的条带的所需物质。收集合适的流分，然后加入几滴吡啶，并将所得溶液冻干，从而得到了为白色固体的化合物 5(1.53 g，73 %)。ES-MS 在 m/z 490 处显示出强的峰(M+)。H-NMR 数据(CDC13)：1.31 (m, 2H, H-4)，1.65 (m, 2H, H-3)，1.75 (m, 2H, H-5)，2.31 (t, 2H, H-2)，3.30 (s, 6H, (CH3)2N)，3.47 (m, 2H, H-6)，3.62 (m, 2H, OCH2CH2N)，3.68 (s, 3H, COOCH3)，3.82 (s, 3H, ArOCH3)，3.93 (m, 2H, OCH2CH2N)，6.89 (d, 2H, ArH)，7.24-7.41 (m, 12H, ArH)。

6-(N,N-二甲基氨基)-N-[2-(单甲氧基三苯氧基)-乙基]-己酸对硝基苯酯(7)-将化合物 5(420mg，0.86mmol)在 2:1 的丁醇-水(6.0 mL)中形成的溶液与氢氧化锂(72 mg)混合，并将所得溶液在室温下搅拌 3 小时，然后 TLC(乙酸乙酯:甲醇:乙酸:水=12:3:3:2)表明，所述混合物完全转化成 rf 稍低的化合物。在此阶段的 ES-MS 光谱显示出在 m/z 476.0 和 482.3 处形成峰(分别为 M+H 和 M+Li)。将所述混合物用水稀释(10 mL)，然后用 0.1M 的盐酸水溶液将 pH 调至 7.5，接着将所得溶液冻干，从而得到粗品 6 (510 mg，混有氯化锂)。将该粗品 6 物质(约 0.86 mmol)溶于无水吡啶(6.0 mL)中，然后加入对硝基苯酚(400 mg，2.86 mmol)和二异丙基碳二亚胺(270 microL，0.176 mmol)。在 RT 下搅拌 3 小时后，加入另一部分二异丙基碳二亚胺(200 微升)，并将

所得混合物在 r.t.下再搅拌 24 小时，而后 TLC(乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸: 水=15: 3: 3: 2)表明反应完全。使所述混合物蒸发，然后将所得物与二氯甲烷-甲苯共蒸发 3 次，从而除去吡啶。所得残余物被隔在 0.2M 的含水乙酸三乙基铵(pH 5.0)和甲基叔丁基醚之间(其中每种溶剂均为约 100 mL，并且需要剧烈地摇动以使各种物质均被溶解)，TLC(乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸: 水=10: 3: 3: 2，UV 和茚三酮检测)表明，所得产物只存在于水相中，而大部分的对硝基苯酚和其他 UV 吸收杂质存在于有机相中。将该有机相用少量的含水缓冲溶液洗涤，并将混合的水相用甲基叔丁基醚洗涤，然后用二氯甲烷萃取(现在，TLC 表明所述产物完全进入到有机相中)。将所述水层用少量的二氯甲烷洗涤，并将混合的有机层用少量的缓冲液洗涤，然后小心分离。在此阶段，TLC 表明形成了纯度极高的物质，并且 H-NMR 也证实了这一点。将所述物质以溶液形式保存在冰箱中，如果需要的话，可以对其进行浓缩，从而得到浆状的粗品 7(440 mg，86 %)。按照所述的方式，在冷冻温度下所述物质还可以保持数星期不变。所述物质的 ES-MS 显示出在 m/z 596.8 处形成了强的信号(M+)。

H-NMR 数据(CDC13): 1.41 (m, 2H, H-4), 1.75-1.85 (m, 4H, H-3, H- 5), 2.63 (t, 2H, H-2), 3.24 (s, 6H, (CH3)2N), 3.49 (m, 2H, H-6), 3.62 (m, 2H, OCH2CH2N), 3.81 (s, 3H, ArOCH3), 3.84 (m, 2H, OCH2CH2N), 6.89 (d, 2H, ArH), 7.24-7.41 (m, 12H, ArH), 8.28 (d, 2H, ArH)。

6-(N,N-二甲基氨基)-N-[(2-磷酰氧基)-乙基]-己酸对硝基苯酯(9)-将由化合物 7(55 mg，0.10 mmol)溶于甲酸(2 mL)中形成的溶液在 RT 下保持 60 分钟，然后将其浓缩，接着再与无水乙腈共浓缩 3 次。将所得残余物 8(通过 TLC(乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸: 水=6: 3: 3: 2，茚三酮和 UV 检测)和 ES-MS(m/z 325.2，M+)方法表明其纯度较高)溶于无水乙腈(0.5 mL)中，并将所得物加入到冷的(0℃)、由氯氧化磷(0.019 mL，0.2 mmol，刚刚蒸馏得到)和三乙胺(0.069 mL，0.5 mmol)在无水乙腈(0.5 mL)中形成的溶液中。在将所得物在 0℃下保持 1 小时后，加

入更多的氯氧化磷(0.05 mL)和三乙胺(0.05 mL)，再过1小时后，加入水(0.05 mL)，并将所得混合物在0℃下再搅拌1小时，而后TLC表明大部分的起始物质消失，并出现了迁移率极低(rf 0.05)的UV吸收点。将所得的反应混合物用0.2%的TFA水溶液(3.8 mL)稀释，再用甲基叔丁基醚(3.5 mL)洗涤，然后小心分离水相，并立刻在35℃下进行旋转蒸发(减少至约 2/3 的体积)，然后将所得溶液注入 Supelco Discovery C- 18柱(15 x 21.2 cm, 5 microM)上的400微升的部分中，其中流速为8.0 mL/min并且在40分钟内水在乙腈中的浓度梯度从82%减少至58%(其中0.1 % TFA的浓度被一直保持)。分别在18-20分钟和24-26分钟时观察到一个主要的和一个次要的UV吸收(300 nm)峰，这两个峰分别与所需的产物9和起始物质8相应。将含有产物9的流分集中起来并浓缩至小体积，然后冻干，从而得到为无定形物质的纯的产物9 (9 mg, 由化合物7得到，产率为22 %)。LC-MS光谱在m/z 405.2处显示出一个主要的信号(M+)。H-NMR数据(DMSO-d6): 1.38 (m, 2H, H-4), 1.67-1.78 (m, 4H, H-3, H-5), 2.69 (t, 2H, H-2), 3.01 (s, 6H, (CH3)2N), 3.35 (m, 2H, H-6), 3.60 (m, 2H, OCH2CH2N), 4.24 (m, 2H, OCH2CH2N), 7.44 (d, 2H, ArH), 8.31 (d, 2H, ArH)。H-NMR数据(D2O, HOD = 4.68): 1.35 (m, 2H, H-4), 1.66 (m, 2H, H-3或H-5), 1.72 (m, 2H, H-3或H-5), 2.59 (t, 2H, H-2), 3.02 (s, 6H, (CH3)2N), 3.28 (m, 2H, H-6), 3.52 (m, 2H, OCH2CH2N), 4.19 (m, 2H, OCH2CH2N), 7.22 (d, 2H, ArH), 8.19 (d, 2H, ArH)。

肽的合成

通过固相肽合成技术制备出16个含有42个残基的肽的文库(参见图1)。所述文库中的组分随着带电残基的个数以及配体掺入的位置的变化而变化。在各种情况下，合成过程相同，在此以 3-C15L8Cys24{TA4Cys(Acm)}的合成过程作为实例进行说明。

利用标准的 Fmoc 化学法，在 Pioneer 自动化肽合成仪(Applied Biosystems) 上合成多肽。以 0.2mmol/g 的取代水平在 Fmoc-PAL-PEG-PS 树脂上以 0.1mmol 的规模进行合成。使用以下氨基

酸衍生物(得自 Novabiochem AG): Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH 、 Fmoc- Asp(tBu)-OH 、 Fmoc-Cys(Acm)-OH 、Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH 、 Fmoc-Gly-OH 、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys(Aloc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、 Fmoc-Nle-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Pro-OH 和 Fmoc-Val-OH。Lys15 的侧链受到 Aloc 保护，而 Boc 保护用于 Lys8。将 4 倍过量的氨基酸衍生物用于各偶联步骤中。在与 DIEA(二异丙基乙胺，1M，溶于 DMF 中)连接的过程中，将 TBTU(O-(7-苯并三唑-1-基)-1，1，3,3-四甲基脲四氟硼酸酯，0.5M，溶于 DMF 中)用作偶联剂。除了 Gln、Cys、Pro 和 His (90 min)以及第一残基 Arg 和 Asn (2 小时)外，均采用 60min 的标准偶联时间。在传统的自动化固相肽合成结束后，用乙酸酐使游离的 N-末端乙酰化，然后将树脂用乙酸酐/二氯甲烷(3:1)的混合物处理 2 小时，接着用二氯甲烷(6X)洗涤该树脂，再用乙醚使树脂收缩。用溶于氯仿/乙酸/NMM(N-甲基吗啉)(18:2:1)中的 3 当量的四(三苯基)钯(0)处理 2.5 小时来除去 Aloc 保护基团。将树脂连续用 DIEA(浓度为 0.5%，溶于 DMF 中)、二乙基二硫代氨基甲酸钠(浓度为 0.5%，溶于 DMF 中)、DMF 和二氯甲烷洗涤，并用乙醚收缩。用溶于 DMF 中的 HBTU(3 当量)、HOBt(3 当量)和 DIEA(6 当量)处理 4 个小时来使得 7-甲氧基香豆素-3-羧酸(3 当量)与 Lys15 的侧链偶联。将树脂用 DMF 和二氯甲烷洗涤，并用乙醚收缩。在室温下，用 TFA、TIS(三异丙基硅烷)和水(这三种物质的比例为 95:2.5:2.5，每 100mg 的树脂加入 1ml 上述混合物)处理超过 2 个小时来将肽从树脂上切下。在减压下使 TFA 蒸发，并通过加入冷的二乙基醚使肽沉淀，然后进行离心、洗涤和冻干处理。通过 RP HPLC (Hichrom C8, 21.2 mm x 25 cm, 10 μm, A: 0.1%的 TFA，10% 的 ACN 水溶液，B: 0.1% 的 TFA，10% 的 ACN 水溶液，在 18 分钟内 B 由 38%升至 46%，t_R = 16.0 min)处理使粗产物得以纯化。

肽支架结构二聚体的制备

二硫键的形成(H. Tamamura, A. Otaka, J. Nakamura, K. Okubo,

T. Koide, K. Ikeda, T. Ibuka, N. Fuji Int J. Peptide Protein Res. 1995, 45, 312-319.):

将所述的 3-C15L8Cys(Acm)24 肽(2.4mg(0.51 μmol)溶于 TFA(200 μl)中，并加入三氟甲基磺酸银(silver triflate) (5 mg, 20 μmol)和苯甲醚(1 滴)。将所得的反应混合物在 4℃的冰箱中温育 24 小时。在加入乙醚之后，所述的肽发生沉淀，然后用冷的乙醚洗涤 3 次。向沉淀中加入 DMSO(0.25 ml)和 1N HCl(1 ml)。将反应混合物在室温下搅拌 22 小时。将所得的悬浮液离心，并丢弃沉淀。用稀释的 NaOH 中和所得的液体，并通过 RP-HPLC (分析条件: Varian C18, 150 x4.6 mm, 5μm, A: 0.1%的 TFA, 10%的 ACN 水溶液, B: 0.1%的 TFA, 10% 的 ACN 水溶液，在 30 分钟内 B 由 30%升至 60%, t_R = 23.4 min)方法进行分析。

PC6-对硝基苯酯与 TA_4+Cys(Acm)的反应

本部分为用于将磷酸胆碱衍生物引入肽上的方法的具体实施例，在这种情况下，所述肽为在 Cys 残基上具有保护基团 Acm 的 TA_4+。

向由 TA_4^+Cys(Acm)肽(500 μg, 0.1 μmole)在 100 μL 0.1 M 的磷酸缓冲液(pH8)中形成的溶液中加入 2.8 μL 溶有 0.1 M PC6-对硝基苯酯的 DMSO (0.3 μmole, 3 当量)。将所得的反应混合物在 40℃下温育。LC-MS(Phenomenex Gemini, C 18, 5 μm, 150 x 3.0 mm, A: 0.1%的甲酸水溶液, B: 0.1 %的甲酸乙腈溶液，在 10 分钟内 B 由 10%升至 90 %) t_R = 4.1 min (UV 信号)，对于 $[M+8H]^{8+}$, m/z = 670.5，对于 $[M+7H]^{7+}$, m/z =766.1，对于 $[M+6H]^{6+}$, m/z =893.3，对于 $[M+5H]^{5+}$, m/z =1071.9。

TA4+PC6Cys(Acm)肽在涂敷有 F108-2-吡啶基二硫化物的多孔聚苯乙烯上的固定

向由 TA_4+PC6Cys(Acm)肽(90 μg, 18 nmol)在 18 μL 0.1 M 的磷酸缓冲液(pH8)中形成的溶液中加入 1.8 μL 的 50%的 MeOH 水溶液(其中溶有 5mg/mL 碘) (8.6 μg, 34 nmol, 相对于巯基是 2 倍过量的)。将所得的反应混合物在 25℃下温育 20 分钟，然后用 PepClean C

18柱(得自Pierce)净化，接着将其直接加入到50 μL的悬浮液中，该悬浮液为含有10 mg F108-PDS涂敷的多孔颗粒的磷酸缓冲液。

激酶与肽的接合

向由TA_4^+PC6Cys(Acm)肽(90 μg，18 nmol)在18 μL 0.1 M的磷酸缓冲液(pH8)中形成的溶液中加入1.8 μL的50%的MeOH水溶液(其中溶有5mg/mL碘)(8.6 μg，34 nmol，相对于巯基是2倍过量的)。将所得的反应混合物在25℃下温育20分钟，然后用PepClean C 18柱(得自Pierce)净化，接着将其直接加入1.5 mL含有1.3 mg/ml的激酶-PDS的磷酸缓冲液中。

TA_4PC6CysH的形成

PC6-对硝基苯酯与TA_4Cys(Acm)的反应。向由TA_4Cys(Acm)肽(1 mg，0.2 μmol)在1 mL 0.1 M的磷酸缓冲液(pH8)中形成的溶液中加入10 μL 0.1M的PC6-对硝基苯酯DMSO溶液(0.8 μmol，5当量)。将所得的反应混合物在4℃下温育2天，然后用NAP-10柱(得自GE Healthcare)通过凝胶过滤进行纯化，从而得到1.5mL的TA_4PC6Cys(Acm)水溶液，并最终将其冻干。LC-MS(Phenomenex Gemini，C 18，5 μm，150 x 3.0 mm，A：0.1%的甲酸水溶液，B：0.1 %的甲酸乙腈溶液，在10分钟内B由10%升至90 %)t_R= 4.1 min (UV信号)，对于$[M+6H]^{6+}$，m/z =856.0，对于$[M+5H]^{5+}$，m/z =1026.8，对于$[M+4H]^{4+}$，m/z =1282.6。

半胱氨酸的脱保护。将TA_4PC6Cys(Acm)溶于1mL的TFA/苯甲醚(99:1)中，并加入6 mg的AgOTf (20 μmol，100当量)。将所得混合物在4℃下保持2小时后，用冷的醚使肽的银盐沉淀，然后通过离心进行分离，而后再用醚洗涤2次。向所得物中加入116 μL DTT(10 mg/ml)的乙酸(1 M)溶液，并用1M的乙酸将所得溶液的体积增大至1mL。在25℃下经过1夜之后，用NAP-15柱通过凝胶过滤纯化肽，从而得到1.5mL的TA4PC6CysH水溶液，并将其冻干。LC-MS(Phenomenex Gemini，C 18，5 μm，150 x 3.0 mm，A：0.1%的甲酸水溶液，B：0.1 %的甲酸乙腈溶液，在10分钟内B由10%升至90 %)t_R= 4.6 min (UV信号)，对于$[M+6H]^{6+}$，m/z = 843.5，对于$[M+5H]^{5+}$，m/z =1012.3，对

于[M+4H]$^{4+}$，m/z =1264.6。

TA_4+PC6CysH的形成

PC6-对硝基苯酯与TA_4+Cys(Acm)的反应。向由TA_4+Cys(Acm)肽(1 mg，0.2 μmol)在1 mL 0.1 M的磷酸缓冲液(pH8)中形成的溶液中加入10 μL 0.1M的PC6-对硝基苯酯的DMSO溶液(0.8 μmol，5当量)。将所得的反应混合物在4℃下温育过夜，然后用NAP-10柱(得自GE Healthcare)通过凝胶过滤进行纯化，从而得到1.5mL的TA_4+PC6Cys(Acm)水溶液，并最终将其冻干。LC-MS(Phenomenex Gemini，C 18，5 μm，150 x 3.0 mm，A：0.1%的甲酸水溶液，B：0.1 %的甲酸乙腈溶液，在10分钟内B由10%升至90 %)t_R = 4.0 min (UV信号)，对于[M+8H]$^{8+}$，m/z =670.3，对于[M+7H]$^{7+}$，m/z =766.1，对于[M+6H]$^{6+}$，m/z =893.4。

半胱氨酸的脱保护。将TA_4+PC6Cys(Acm)溶于1mL的TFA/苯甲醚(99:1)中，并加入6 mg的AgOTf (20 μmol，100当量)。将所得混合物在4℃下保持2小时后，用冷的醚使肽的银盐沉淀，然后通过离心进行分离，而后再用醚洗涤2次。向所得物中加入116 μL DTT(10 mg/ml)的乙酸(1 M)溶液，并用1M的乙酸将所得溶液的体积增大至1mL。在25℃下经过1夜之后，用NAP-15柱通过凝胶过滤纯化肽，从而得到1.5mL的TA_4+PC6CysH水溶液，并将其冻干。LC-MS(Phenomenex Gemini，C 18，5 μm，150 x 3.0 mm，A：0.1%的甲酸水溶液，B：0.1 %的甲酸乙腈溶液，在10分钟内B由10%升至90 %)t_R = 4.6 min (UV信号)，对于[M+8H]$^{8+}$，m/z = 661.5，对于[M+7H]$^{7+}$，m/z =755.9，对于[M+6H]$^{6+}$，m/z =881.6。

配体向所述肽文库的各种多肽支架结构中的引入

以下给出用于引入磷酸胆碱衍生物的一个更加概括的方法。本领域的技术人员将能够对所述方法进行修改，从而使其针对可能应用的具体条件达到最优化。

将所述文库中的各种肽溶于1mL的50mM磷酸缓冲液(pH8)中，直至肽的浓度为1mM，由此形成储备溶液。假设水的含量为25%，由肽的

分子量来计算用于形成所述储备溶液所需的肽的量。利用在 355nm 下值为 20300$M^{-1}cm^{-1}$的消光系数来确定各种储备溶液的浓度。将 100 μL 的各种储备溶液转移至微量滴定板的孔中，并加入 2 当量的溶于 DMSO 中的待检测的配体活性酯（初始浓度为 100mM），然后使混合物反应 1 小时。

亲和性测定

在微量滴定板的一组分开的孔中，将 C-反应蛋白(CRP)溶于包含 10mM 的 HEPES、150mM 的 NaCl 和 5mM 的 $CaCl_2$的混合物(pH7.4)中，直至浓度为 500nM。将用配体官能化的各种多肽和荧光团稀释，并加入到含有目的蛋白的各个孔中，从而得到最终浓度为 500nM 的肽。

作为阴性对照，在平行试验中，使用具有荧光团但不具有配体的多肽来实施相同的过程。将微量滴定板引入到基于荧光的滴定板读取器中，其中所述读取器被设定为激发波长为 355nm，发射波长为 420nm。将这样的肽作为“采样数”，所述肽在用配体官能化的形式下与不具有配体的形式下的荧光发射强度是不同的，并且选择该肽用于更详细的分析。

使用荧光计来对亲和性进行详细分析的方法在表 1 和图 2 中给出。所用多肽具有名为 3-C15L8 的序列。虽然 C-反应蛋白具有 5 个磷酸胆碱的结合位点的事实使得对荧光强度的数据分析复杂化，但清楚的是，在 5mM 的 $CaCl_2$存在的条件下，C-反应蛋白与官能化的多肽的亲和性与低 nM 解离常数一致，或者亲和性更高。

具有荧光团但不具有配体的多肽的相应试验表明，荧光强度作为 CRP 浓度的函数没有发生改变，表明多肽支架结构本身对 CRP 具有极低的亲和性。因此，多肽与磷酸胆碱衍生物的结合形成了 CRP 的结合剂，其中官能化的多肽组分与 CRP 之间的协同作用导致总体上极高的亲和性。

表 1:

肽	缓冲液	肽浓度 (nM)	CRP 浓度 (nM)	CRP 体积	肽体积	缓冲液体积	荧光强度			平均值	误差
4-C15L8-PC6	Bis Tris 20 mM, 5 mM CaCl2 pH7,2	100	0	0	10	490	456,78	486,4	527,63	490,27	35,58319
		100	5	0,5	10	489,5	449,62	477,97	489,83	472,4733	20,66086
		100	10	1	10	489	456,17	455,1	450,21	453,8267	3,177489
		100	25	2,5	10	487,5	446,88	433,51	446,39	442,26	7,581682
		100	50	5	10	485	423,14	393,56	409,77	408,8233	14,81271
		100	75	7,5	10	482,5	406,08	365,75	408,88	393,57	24,13347
		100	100	10	10	480	399,31	381,79		390,55	12,38851
		100	150	15	10	475	413,76	389,49		401,625	17,16148
		100	200	20	10	470	405,77			405,77	
4-C15L8	Bis Tris 20 mM, 5 mM CaCl2 pH7,2	100	0	0	10	490					
		100	5	0,5	10	489,5					
		100	10	1	10	489					
		100	25	2,5	10	487,5					
		100	50	5	10	485					
		100	75	7,5	10	482,5					
		100	100	10	10	480					
		100	150	15	10	475					
		100	200	20	10	470					
-	Bis Tris 20 mM, 5 mM CaCl2 pH7,2	0	0	0	0	500					
-	Bis Tris 20 mM, 5 mM CaCl2 pH7,2	0	1500	15	0	485					

固相 CRP 的检测

涉及本发明的结合剂（其与固相结合）的 CRP 检测的一个实施方案示意性地显示于图 3 中。在该检测中，CRP 的捕获是由与乳胶颗粒连接的 CRP-结合剂完成的，并且识别信号是由与丙酮酸激酶缀合的结合剂产生的。所述激酶在所加入的 PEP(磷酸烯醇丙酮酸)的帮助下将 ADP 磷酸化，从而形成 ATP。而 ATP 又与萤光素酶形成了复合体，该复合体能够使萤光素酶催化萤光素的氧化过程，从而形成氧化萤光素。该反应过程产生了光。光的强度成为样品中激酶的量的直接量度，而激酶的量又成为所结合的 CRP 的量的量度。

与乳酸颗粒结合的 CRP-结合剂的制备

将直径为 239nm 的单分散性聚苯乙烯乳胶颗粒悬浮于含有聚合物表面活性剂 Pluronic F108 的超纯(MilliQ)水中，其中所述的聚合物表面活性剂 Pluronic F108 具有与吡啶基二硫化物(PDS)接合的端基，从而允许其与含有巯基的配体连接。所述的表面活性剂分子通过它们的疏水性中心嵌段而吸附于所述颗粒上[14]。通过沉降流场分离(SdFFF)方法测定出，在经过过夜吸附后，被各个颗粒吸附的 Pluronic 分子的数目为 16500[15]。然后，将 PDS 基团用含有 Cys 的 CRP-结合剂代替。上文给出了用于固定结合剂(Ta4+)的方法。通过 SdFFF 方法进行的分析表明，各颗粒吸附了 2560 个结合剂分子。

对原样形式的、或在经过双官能的连接体分子(SPDP，Pierce Biotechnology，产品号 21857)处理后的、或在通过二硫键桥与结合剂连接(上文给出的示例性方法)之后的丙酮酸激酶(得自兔肌的 III 型丙酮酸激酶；Sigma-Aldrich，产品号 P9136-5KU)进行检测。按照以下方式来分别对三种形式的丙酮酸激酶将 ADP 磷酸化的能力进行检测：将在 50 mM 的甘氨酸-TRIS 缓冲液(pH 7.6)中含有 0.36mg 丙酮酸激酶的等分试样均加入到“发光试剂”中，即，含有 40 μL 的 0.5 mg/mL 的萤光素酶("热稳定的"，得自 BioThema AB，Stockholm)、10 μL 的 8.9 mg/mL 的 PEP(得自 Sigma-Aldrich)、以及 10 μL 的 15mM 的萤光素(得自 Sigma-Aldrich)的混合物。在时间 t=0 时，将 10 μL 的

ADP 等分试样(得自 Sigma-Aldrich, 2.6 mg/mL)加入到各样品混合物中，然后用 CCD 照相机在 300 秒内跟踪发光情况。结果如图 4 所示。三种形式的丙酮酸激酶在很大程度上具有相当的活性。与经修饰的丙酮酸激酶相比，出乎意料的是，购买的丙酮酸激酶产品的活性稍差一些，这可能是由于在处理过程中（无意地）除去了少量抑制剂的原因。

使用 CCD 照相机测定图 3 所示类型的反应混合物的光子通量，并且还测定了以 CRP 的特异性抗体 IgY 作为 CRP 的结合剂（而没有使用本发明的 CRP-结合剂）的反应混合物的光子通量。所述试剂的浓度和总量与图 4 中用于“发光试剂”的所述的情况相同。样品为不含 CRP 的血清，或是含有 12mg CRP/L 的血清。最大的光子通量是由其中位于颗粒表面上的 CRP-结合剂已经从浓缩血清样品中捕获了 CRP 的混合物提供的。在经过 3 个循环的洗涤和离心之后，允许混合样品吸附结合剂-激酶的缀合物；然后，将其与上述发光试剂混合，从而允许其产生光子通量。同样，允许含有抗体(抗-CRPIgY, 由 Prof. A. Larsson, Uppsala Academic Hospital 惠赠)的颗粒与得自浓度(12 mg/L)已知的血清中的 CRP 结合。如上所述，加入抗体-激酶缀合物，从而产生光子通量。将不含 CRP 的血清作为空白对照。除了刚刚描述的 4 种样品之外，还存在一种样品，该样品只由涂敷有表面活性剂的纳米颗粒构成，其中所述的纳米颗粒的尺寸与 4 种实际样品中带有结合剂或抗体的颗粒的尺寸相同。所得结果如图 5 所示。图 5 清楚地示出，基于结合剂的 CRP 的检测产生了强的信号，而由不含有 CRP 的血清产生的基于结合剂的信号形成了光强度为 0 的直的基线。基于抗体的检测在含有 CRP 的血清中产生了稍弱的信号，但是由不含 CRP 的血清所产生的信号来判断，证实与结合剂类似物相比，抗体具有更高的非特异性吸附。在本研究中，涂敷有表面活性剂的颗粒是完全的空白对照。

与图 5 所示类似的试验是在缀合有结合剂的乳胶颗粒(10 μL, 10 % w/v 聚苯乙烯颗粒，直径为 239 nm)上进行的。将所述颗粒加入到 100 μL 得自狗、马或人的血清中，其中狗和马的血清中 CRP 的含量是未知的，而人的血清中 CRP 的含为 12mg/L。在将混合物温育 10 分

钟后，将所述颗粒洗涤，然后离心，重复 3 次，然后与结合剂-激酶缀合物温育 15 分钟。在经过 3 次洗涤之后，加入图 4 所述的“发光试剂”，然后用得自 BioThema 的光度计扫描所述样品，其中所述光度计用于测量累积产生的光子，并计算作为激酶浓度的量度的 ATP 生成的速率，而所述的激酶的浓度又与样品中 CRP 的量成比例。所得结果示于图 6 和表 1 中。由上述分析，清楚表明本发明的结合剂不仅具有捕获得自人的 CRP 的能力，还具有捕获得自狗和马的 CRP 的能力。

表 2

样品	反应速率(pmol/min)
人 CRP	0.045 ± 0.007
狗 CRP	0.084 ± 0.009
马 CRP	0.026 ± 0.007

参考文献

[1] Hansen,H.J.,LaFontaine,G.,Newman,E.S.,Schwartz,M.K., Malkin,A.,Mojzisik,K.,Martin,E.W.,Goldenberg,D.M., (1989) Solving the problem of antibody interference in commercial "sandwich"-type immunoassays of carcinoembryonic antigen. Clin. Chem., 35, 146-151.
[2] Moseley,K.R.,Knapp,R.C.,Haisma,H.J., (1988) An assay for the detection of human anti-murine immunoglobulins in the presence of CA125 antigen. J. Immunol. Methods, 106, 1-6.
[3] R. P. Jain, R. M. Williams *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6505-6509.
[4] A. Kamitani, N. Chatani, S. Murai *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1435-1437; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1397-1399.
[5] S. Kim, J. I. Lee, Y. C. Kim *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 560-565.
[6] C. E. McKenna, M. T. Higa, N. H. Cheung, M.-C. McKenna *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 155-158. b) C. E. McKenna, J. Schmidhauser *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1979**, 739.
[7] P. A. Bartlett, L. A. McQuaid *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 7854-7860.
[8] W. C. Chan, P. D. White in *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach* (Eds.: W. C. Chan, P. D. White) Oxford University Press, Oxford **2000**, pp. 55-56.
[9] E. G. Brown, J. M. Nuss *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8457-8460.
[10] J. Cai, B. Wathey *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1383-1385.
[11] R.P. Jain, R.M. Williams: Asymmetric synthesis of (S)—(+)-carnitine and analogs , *Tetrahedron* **57** (2001) 6505-09.
[12] S. Rahal, L. Badache: The Eschweiler-Clarke methylation of amino acids, *Journal de la Societe Algerienne de Chimie* **4** (1994), 75-85
[13] PA Fowler, A. H. Haines, R.J.K. Taylor, E.J.T. Chrystal, M. B. Gravestock: Synthesis and biological activity of acyclic analogues of Nojirimycin, *JCS Perkin 1* (1994) 2229-35.
[14] Bohner, M., Ring, T.A., Rapoport, N. and Caldwell, K.D. "Fibrinogen uptake by PS latex particles coated with various amounts of a PEO/PPO/PEO triblock copolymer", J. Biomaterials Sci., Polymer ed., 13 (2002), 733-746.
[15] Andersson, M., Fromell, K., Gullberg, E., Artursson, P., and Caldwell, K.D. "Characterization of Surface Modified Nanoparticles for *in vivo* Biointeraction – A Sedimentation Field-Flow Fractionation Study", *Analytical Chemistry* (2005) 77, 5488-5493.

<110> Modpro AB

<120> C-反应蛋白的结合剂

<130> P07461SE00

<150> SE 0600794-2
<151> 2006-04-07

<160> 18

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 支架多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Glu or Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> Leu or Nle

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Lys, Ala or Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> Lys or Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (13)..(13)
<223> Ala or Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)..(15)
<223> Lys, Ala or Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (16)..(16)
<223> Leu or Nle

<220>
<221> VARIANT
<222> (17)..(17)
<223> Glu, Ala or Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> Glu, Val, Arg, Ala or Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (24)..(24)
<223> Ala or Cys

<220>
<221> VARIANT
<222> (25)..(25)
<223> Glu, Ala or Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (27)..(27)
<223> Leu or Nle

<220>
<221> VARIANT
<222> (33)..(33)
<223> Ala or Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (34)..(34)
<223> Ala, Arg or Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (37)..(37)
<223> Ala, Arg or Lys

<400> 1

Asn Xaa Ala Asp Xaa Glu Ala Xaa Ile Xaa His Leu Xaa Glu Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Glu Arg Gly Pro Xaa Asp Xaa Xaa Gln Xaa Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Xaa Xaa Phe Glu Xaa Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 2
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 现有支架

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa 可为任何天然氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> Xaa 可为任何天然氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(34)
<223> Xaa 可为任何天然氨基酸

<400> 2

Asn Ala Ala Asp Leu Glu Ala Xaa Ile Arg His Leu Ala Glu Lys Leu
1 5 10 15

Ala Ala Arg Gly Pro Xaa Asp Ala Ala Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Xaa Xaa Phe Glu Ala Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 3
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 1-D15L8

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 配体连接位点

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> 报告连接位点

<400> 3

Asn Glu Ala Asp Leu Glu Ala Lys Ile Arg His Leu Ala Glu Lys Leu
1 5 10 15

Glu Ala Arg Gly Pro Glu Asp Cys Glu Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Ala Phe Glu Ala Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 4
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2-D15L8

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 配体连接位点

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> 报告连接位点

<400> 4

Asn Glu Ala Asp Leu Glu Ala Lys Ile Arg His Leu Ala Glu Lys Leu
1 5 10 15

Ala Ala Arg Gly Pro Val Asp Cys Ala Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Ala Phe Glu Ala Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 5
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 3-D15L8

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Nle

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 配体连接位点

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> 报告连接位点

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42)..(42)
<223> AMIDATION

<400> 5

Asn Ala Ala Asp Xaa Glu Ala Lys Ile Arg His Leu Ala Glu Lys Xaa
1 5 10 15

Ala Ala Arg Gly Pro Val Asp Cys Ala Gln Xaa Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Arg Phe Glu Ala Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 6
<211> 42

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-D15L8

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Nle

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 配体连接位点

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> 报告连接位点

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42)..(42)
<223> AMIDATION

<400> 6

Asn Ala Ala Asp Xaa Glu Ala Lys Ile Arg His Leu Arg Glu Lys Xaa
1 5 10 15

Ala Ala Arg Gly Pro Arg Asp Cys Ala Gln Xaa Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Arg Phe Glu Arg Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 7
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 1-D10L17

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> 报告连接位点

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)

<223> 配体连接位点

<400> 7

Asn Ala Ala Asp Leu Glu Ala Ala Ile Lys His Leu Ala Glu Ala Leu
1 5 10 15

Lys Glu Arg Gly Pro Glu Asp Cys Glu Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Ala Phe Glu Ala Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 8
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2-D10L17

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> 报告连接位点

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> 配体连接位点

<400> 8

Asn Ala Ala Asp Leu Glu Ala Ala Ile Lys His Leu Ala Glu Ala Leu
1 5 10 15

Lys Ala Arg Gly Pro Val Asp Cys Ala Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Ala Phe Glu Ala Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 9
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 3-D10L17

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Nle

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> 报告连接位点

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Nle

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> 配体连接位点

<220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42)..(42)
<223> AMIDATION

<400> 9

Asn Ala Ala Asp Xaa Glu Ala Arg Ile Lys His Leu Ala Glu Arg Xaa
1 5 10 15

Lys Ala Arg Gly Pro Val Asp Cys Ala Gln Xaa Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Ala Phe Glu Ala Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 10
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-D10L17

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Nle

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> 报告连接位点

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Nle

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> 配体连接位点

<220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42)..(42)
<223> AMIDATION

<400> 10

Asn Ala Ala Asp Xaa Glu Ala Arg Ile Lys His Leu Arg Glu Arg Xaa
1 5 10 15

Lys Ala Arg Gly Pro Arg Asp Cys Ala Gln Xaa Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Ala Phe Glu Arg Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 11
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 1-D25L22

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> 配体连接位点

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> 报告连接位点

<400> 11

Asn Glu Ala Asp Leu Glu Ala Ala Ile Arg His Leu Ala Glu Ala Leu
1 5 10 15

Glu Ala Arg Gly Pro Lys Asp Cys Lys Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Ala Phe Glu Ala Phe Glu Arg Ala Gly
35 40

<210> 12
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2-D25L22

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> 配体连接位点

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)
<223> 报告连接位点

<400> 12

Asn Glu Ala Asp Leu Glu Ala Ala Ile Arg His Leu Ala Glu Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Arg Gly Pro Lys Asp Cys Lys Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Ala Phe Glu Ala Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 13
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 3-D25L22

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Nle

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> 配体连接位点

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> 报告连接位点

<220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42)..(42)
<223> AMIDATION

<400> 13

Asn Ala Ala Asp Xaa Glu Ala Ala Ile Arg His Leu Ala Glu Arg Xaa
1 5 10 15

Ala Ala Arg Gly Pro Lys Asp Cys Lys Gln Xaa Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Ala Phe Glu Ala Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 14
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-D25L22

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Nle

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> 配体连接位点

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> 报告连接位点

<220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42)..(42)
<223> AMIDATION

<400> 14

Asn Ala Ala Asp Xaa Glu Ala Arg Ile Arg His Leu Arg Glu Arg Xaa
1 5 10 15

Ala Ala Arg Gly Pro Lys Asp Cys Lys Gln Xaa Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Ala Phe Glu Arg Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 15
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 1-D37L34

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> 配体连接位点

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(37)
<223> 报告连接位点

<400> 15

Asn Glu Ala Asp Leu Glu Ala Ala Ile Arg His Leu Ala Glu Arg Leu
1 5 10 15

Glu Ala Arg Gly Pro Ala Asp Cys Ala Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Ala Lys Phe Glu Lys Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 16
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2-D37L34

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> 配体连接位点

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(37)
<223> 报告连接位点

<400> 16

Asn Ala Ala Asp Leu Glu Ala Ala Ile Arg His Leu Ala Glu Arg Leu
1 5 10 15

Ala Ala Arg Gly Pro Val Asp Cys Ala Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Ala Lys Phe Glu Lys Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 17
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 3-D37L34

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> Nle

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> 配体连接位点

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(37)
<223> 报告连接位点

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42)..(42)
<223> AMIDATION

<400> 17

Asn Ala Ala Asp Xaa Glu Ala Ala Ile Arg His Leu Ala Glu Arg Xaa
1 5 10 15

Ala Ala Arg Gly Pro Val Asp Cys Ala Gln Xaa Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Lys Phe Glu Lys Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

<210> 18
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-D37L34

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> Nle

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> 配体连接位点

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(37)
<223> 报告连接位点

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42)..(42)
<223> AMIDATION

<400> 18

Asn Ala Ala Asp Xaa Glu Ala Lys Ile Arg His Leu Arg Glu Arg Xaa
1 5 10 15

Ala Ala Arg Gly Pro Arg Asp Cys Ala Gln Xaa Ala Glu Gln Leu Ala
20 25 30

Arg Lys Phe Glu Lys Phe Ala Arg Ala Gly
35 40

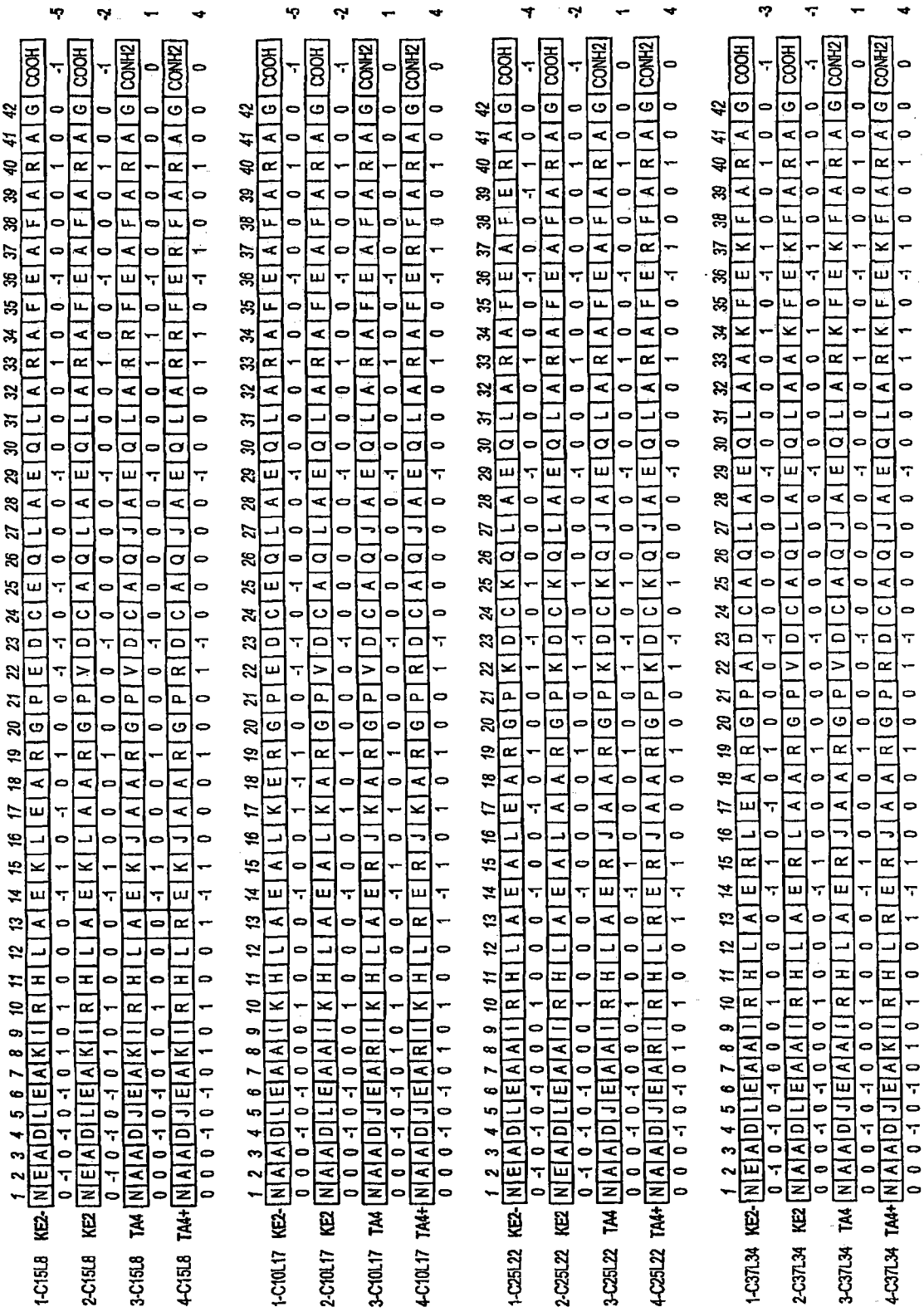


图1

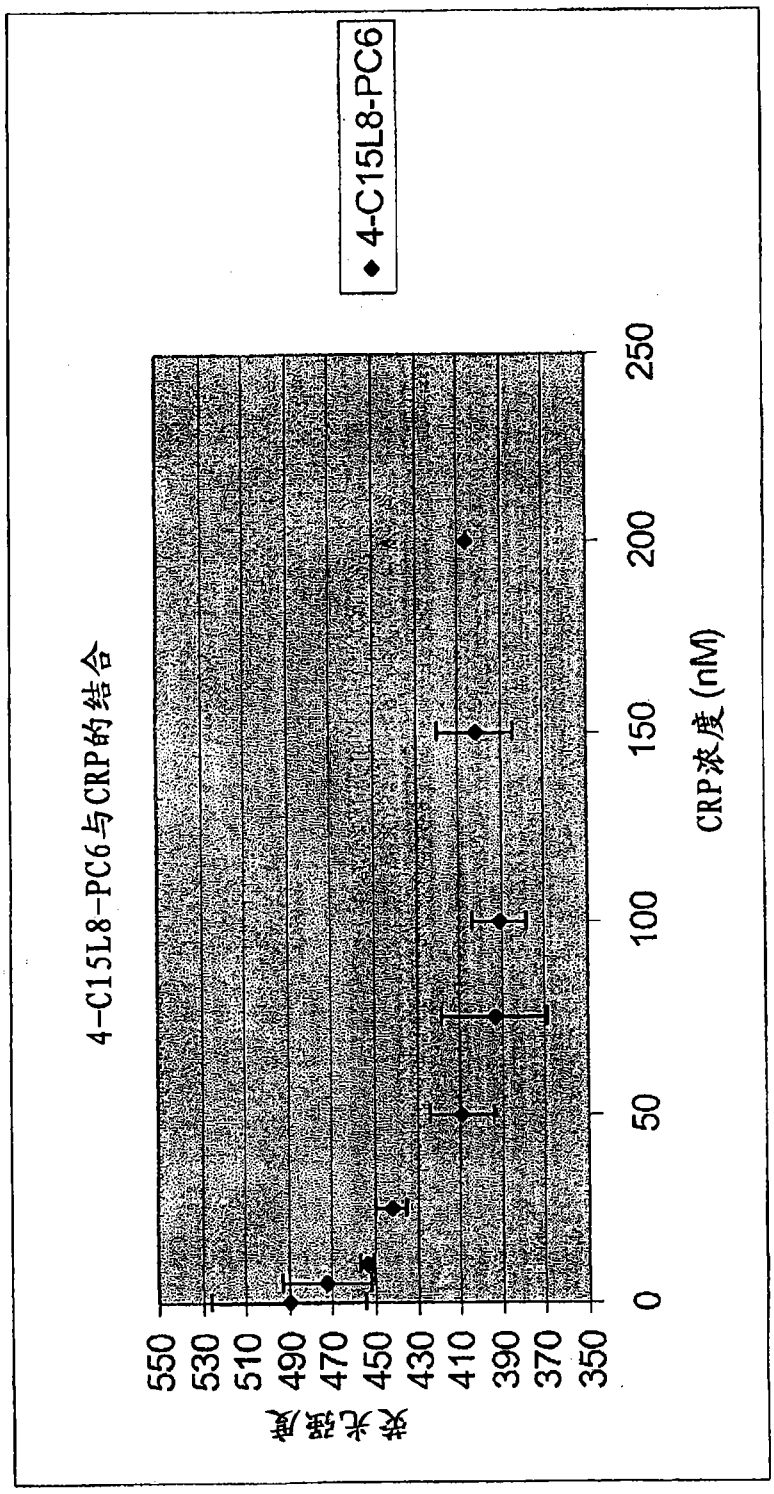

4-C15L8-PC6与CRP的结合
◆ 4-C15L8-PC6
荧光强度
550
530
510
490
470
450
430
410
390
370
350
0
50
100
150
200
250
CRP浓度(nM)

图 2

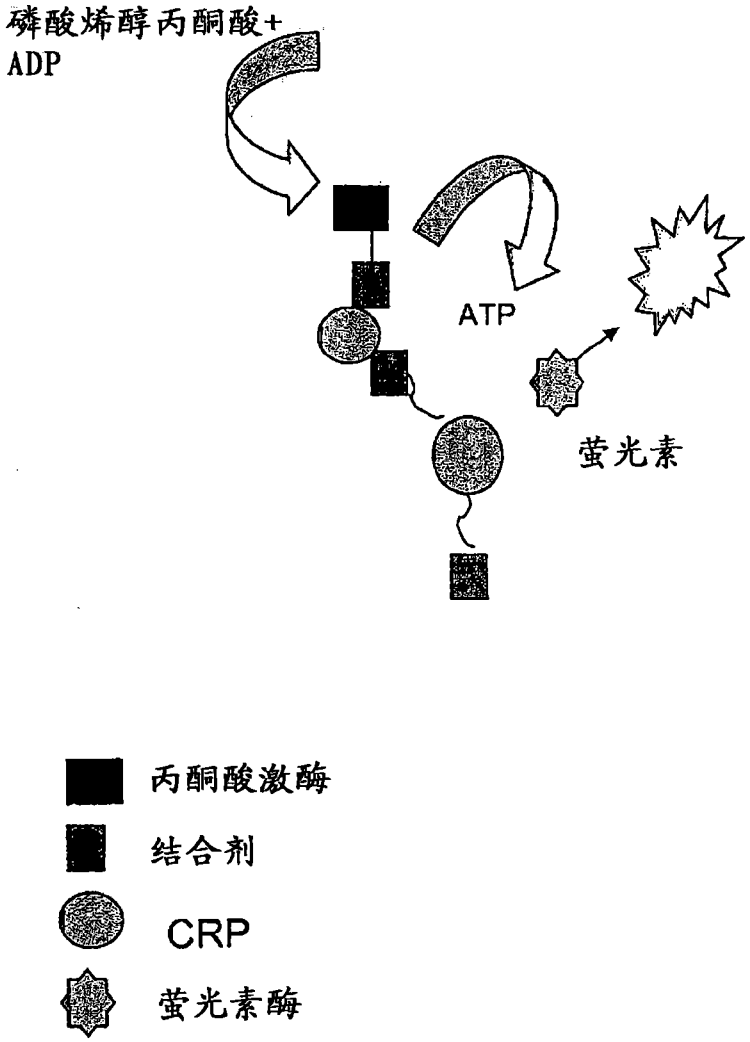


图3

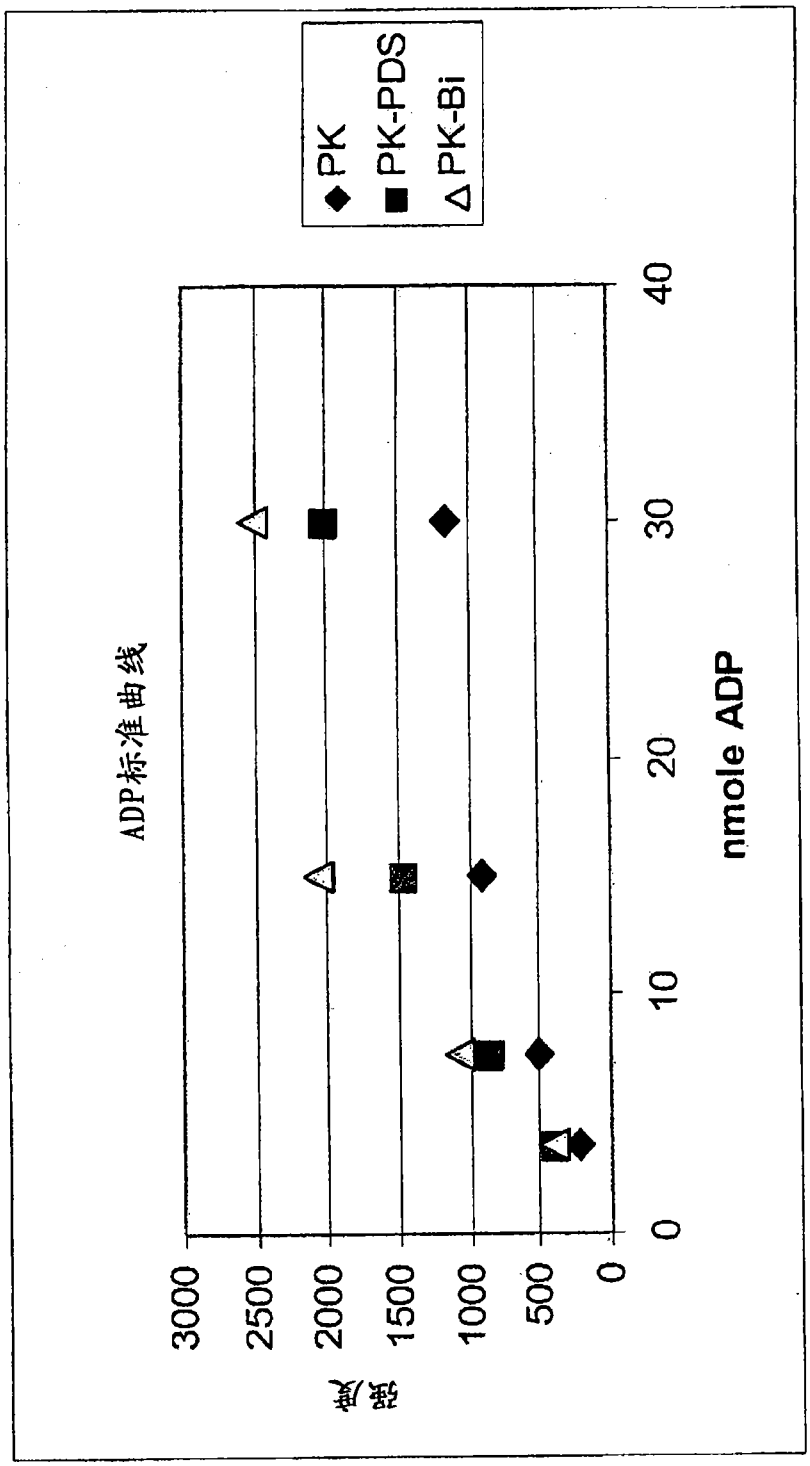

ADP标准曲线
PK
PK-PDS
PK-Bi
强度
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
nmole ADP

图 4

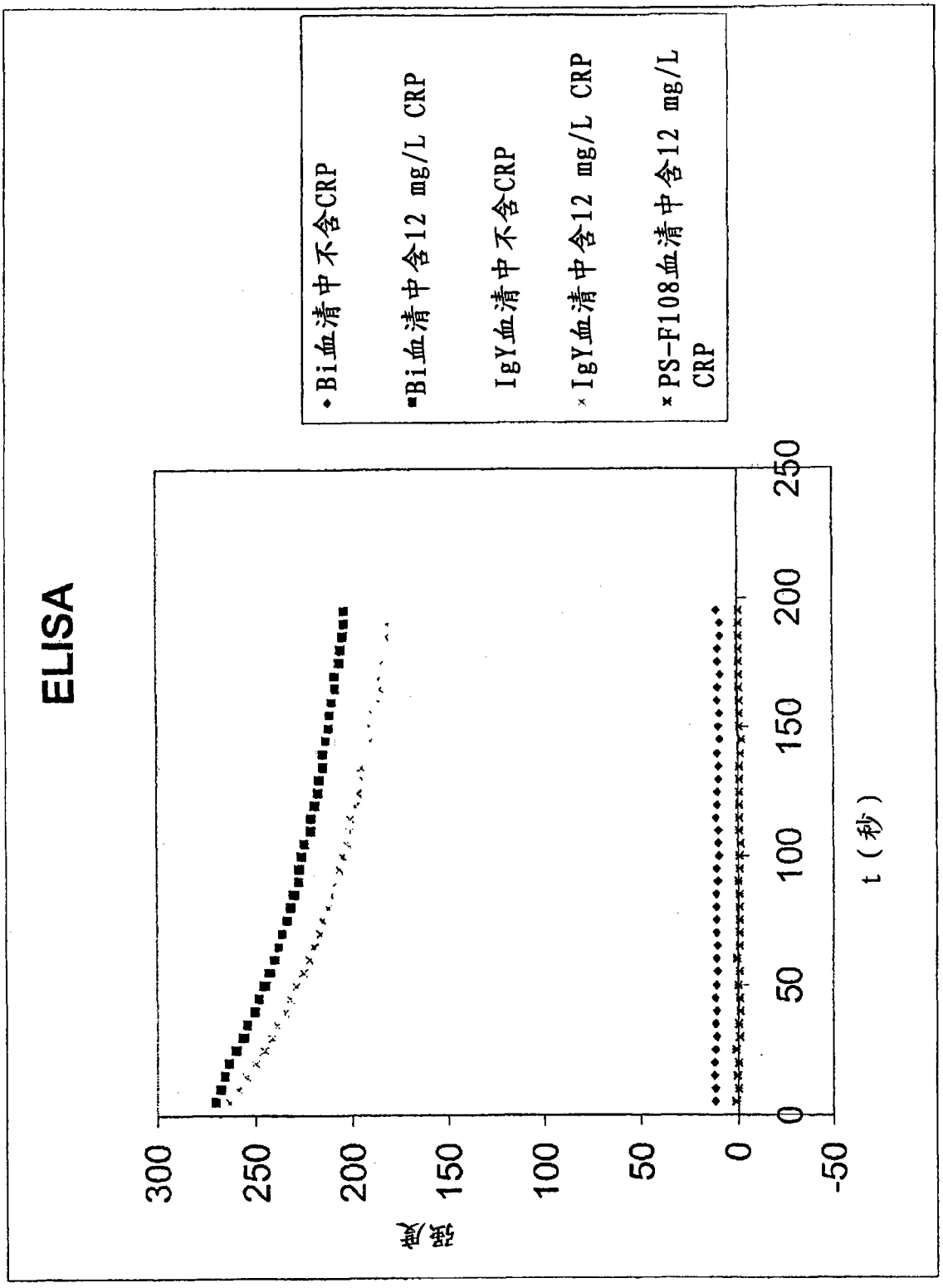

ELISA
强度
t（秒）
300
250
200
150
100
50
0
-50
0
50
100
150
200
250
•Bi血清中不含CRP
▪Bi血清中含12 mg/L CRP
IgY血清中不含CRP
×IgY血清中含12 mg/L CRP
×PS-F108血清中含12 mg/L CRP

图5

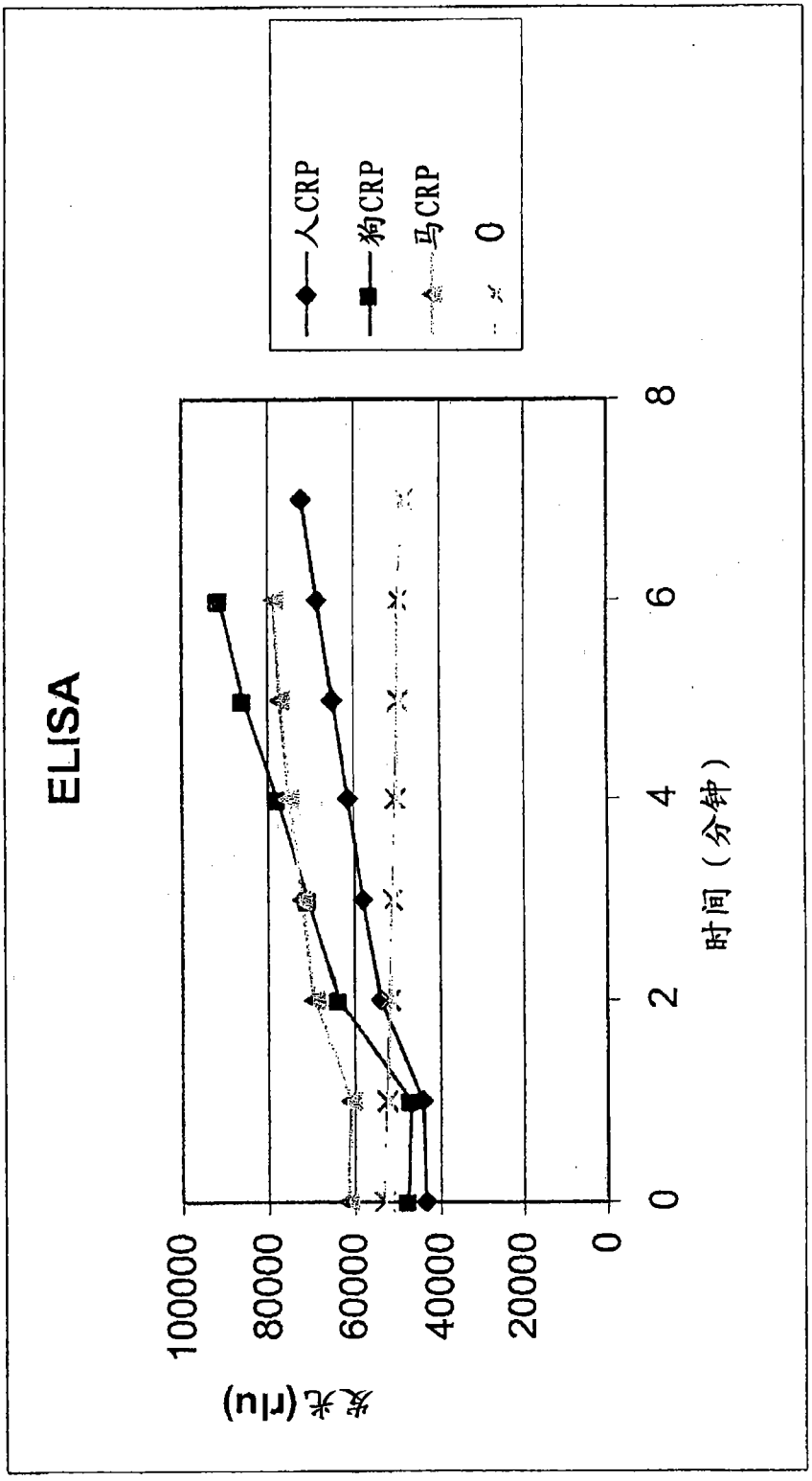

ELISA
发光(rlu)
100000
80000
60000
40000
20000
0
0
2
4
6
8
时间（分钟）
人CRP
狗CRP
马CRP
0

图6