



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 95197350.9

[45] 授权公告日 2004 年 5 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1150403C

[22] 申请日 1995. 12. 7 [21] 申请号 95197350. 9

[30] 优先权

[32] 1994. 12. 12 [33] US [31] 354,199

[86] 国际申请 PCT/US1995/015895 1995. 12. 7

[87] 国际公布 WO96/018903 英 1996. 6. 20

[85] 进入国家阶段日期 1997. 7. 16

[71] 专利权人 阿温蒂斯药物公司

地址 美国亚利桑那

[72] 发明人 M. 莱博

审查员 飞竹玲

[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 李 瑛

权利要求书 5 页 说明书 11 页 附图 3 页

[54] 发明名称 各试验化合物物种的具有预定频率
的组合文库

[57] 摘要

本发明公开了在固相支持物上产生非随机组合文库的技术, 其中一组预定的试验化合物物种中的每种存在于预定数目的固相支持物上, 优选地是存在于一种固相支持物上, 每一种固相支持物仅有单个的试验化合物物种。 每种预定的试验化合物物种有绝对把握制备, 因为所说的技术不使用任何固相支持物的随机分割。 更确切地说, 所述方法基于在各个合成步骤之前对连续的固相支持物基质逐步分割, 在所述各合成步骤中添加多于一种类型的亚单位。 固相支持物基质的非限制性例子包括聚丙烯膜、聚四氟丙烯膜和棉线。 本发明也公开了用所说的技术制备的组合文库。

1. 一种制备试验化合物的组合文库的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 选择两段或多段物理上反复可分割的固相支持物，多种类型的亚单位中只有一种类型连接到每一固相支持物上，其中所述的亚单位具有被保护基团保护的反应性基团，亚单位类型的数目与所选择的支持物的段数相等，并且每种类型的亚单位仅连接到一段支持物上；

(b) 除去保护基团，由此提供反应性基团；

(c) 将每一段支持物分割成多个物理上分开的片段，片段数与亚单位类型的数目相等；

(d) 将一种类型的亚单位连接到与每段支持物连接的每种类型的亚单位上以便形成许多不同种类的试验化合物，每个种类的试验化合物仅在一端支持物上形成，每种试验化合物包括多个亚单位，其中试验化合物的亚单位类型的数目与在步骤(a)中所选择的支持物的段数相等，在每一支持物上只形成一种类型的试验化合物，并且试验化合物种类的数目与支持物的段数相等。

2. 权利要求1的方法，进一步包括重复进行步骤(c)和(d)一次或多次的步骤。

3. 权利要求1的方法，其中所述的亚单位是氨基酸。

4. 权利要求1的方法，其中固相支持物选自膜、纸张和棉花。

5. 权利要求4的方法，其中所述的膜是官能化交联的聚四氟乙烯。

6. 权利要求4的方法，其中所述的棉花是条或线的形式。

7. 一种制备试验化合物的组合文库的方法，该方法包括至少两次下列步骤的连续重复：

(a) 选择由两种或多种类型的亚单位构成的组；

(b) 将带有接头的连续的固相支持物分割成多个物理上分开的支持物片段，所述的接头具有反应位点并具有一个或多个保护基团，支持物片段的数目与构成整体所需要的多个所选类型亚单位的数目相等；

(c) 将一种类型的亚单位连接到基本上所有的与相应的固相支持物

片段相连接的反应位点上；此后

(d) 从接头上除去保护基团以便提供反应位点，

由此提供至少两个与每段固相支持物相连接的亚单位，并且其中每段固相支持物带有与之相连接的所选亚单位的单一种类的试验化合物，而每一种类的试验化合物呈现在预定数目的固相载体片段上。

8. 权利要求 7 的方法，其中固相支持物的接头是一骨架，所述的骨架由多个正交保护的反应位点所组成。

9. 权利要求 7 的方法，进一步包括在最后一次重复之后，从固相支持物上释放连接的亚基的步骤。

10. 权利要求 7 的方法，其中固相支持物选自膜、纸张和棉花。

11. 权利要求 10 的方法，其中膜是官能化交联的聚四氟乙烯。

12. 权利要求 10 的方法，其中棉花是条或线的形式。

13. 权利要求 7 的方法，其中亚单位带有一个或多个保护基团，该保护基团可独立于接头的至少一个保护基团而释放。

14. 权利要求 7 的方法，其中在步骤 (b) 中支持物的段数与所选类型亚单位的数目相等，以便每一种类的试验化合物呈现在正好一段固相支持物上。

15. 一种制备试验化合物的组合文库的方法，该方法包括下列步骤：

(a) 将带有一个以上保护基团的接头与连续的固相支持物相连接；
和

(b) 从接头上除去一种类型的保护基团以便提供反应位点；

并且进一步包括至少两次下列步骤的连续重复：

(c) 选择由两种或多种类型的亚单位构成的组；

(d) 将连续的固相支持物分割成多个物理上分开的支持物片段，支持物片段的数目与构成整体所需要的多个所选类型亚单位的数目相等；

(e) 将一种类型的亚单位连接到基本上所有的与相应的固相支持物片段相连接的反应位点上；此后

(f) 从接头上除去保护基团以便提供反应位点，

由此提供至少两个与每段固相支持物相连接的亚单位，并且其中每段

固相支持物带有与之相连接的所选亚单位的单一种类的试验化合物，而每一种类的试验化合物呈现在预定数目的固相载体片段上。

16. 权利要求 15 的方法，其中固相支持物的接头是一骨架，所述的骨架由多个正交保护的反应位点所组成。

17. 权利要求 15 的方法，其中亚单位是双官能亚单位，而保护基团是亚单位的取代基。

18. 权利要求 17 的方法，其中双官能亚单位是氨基酸。

19. 权利要求 15 的方法，进一步包括在最后一次重复之后，从固相支持物上释放连接的亚基的步骤。

20. 权利要求 15 的方法，其中固相支持物选自膜、纸张和棉花。

21. 权利要求 20 的方法，其中膜是官能化交联的聚四氟乙烯。

22. 权利要求 20 的方法，其中棉花是条或线的形式。

23. 权利要求 15 的方法，其中亚单位带有一个或多个保护基团，该保护基团可独立于接头的至少一个保护基团而释放。

24. 权利要求 15 的方法，其中在步骤(d)中支持物的段数与所选类型亚单位的数目相等，以便每一种类的试验化合物呈现在正好一段固相支持物上。

25. 一种制备试验化合物的组合文库的方法，该方法包括至少两次下列步骤的连接重复：

(a) 选择由两个或多个带有一个或多个保护基团的亚单位构成的组；

(b) 将带有接头的连续的固相支持物分割成多个物理上分开的支持物片段，所述的接头具有反应位点，支持物片段的数目与构成整体所需要的多个所选类型亚单位的数目相等；

(c) 将一种类型的亚单位连接到基本上所有的与相应的固相支持物片段相连接的反应位点上；此后

(d) 从亚单位上除去保护基团以便提供反应位点，

由此提供至少两个与每段固相支持物相连接的亚单位，并且其中每段固相支持物带有与之相连接的所选亚单位的单一种类的试验化合物，而每一种类的试验化合物呈现在预定数目的固相载体片段上。

26. 权利要求 25 的方法，其中亚单位是双官能亚单位，而保护基团是亚单位的取代基。

27. 权利要求 26 的方法，其中双官能亚单位是氨基酸。

28. 权利要求 25 的方法，其中接头具有一个或多个保护基团，该接头的保护基团可独立于亚单位的保护基团而释放。

29. 权利要求 25 的方法，其中固相支持物选自膜、纸张和棉花。

30. 权利要求 29 的方法，其中膜是官能化交联的聚四氟乙烯。

31. 权利要求 25 的方法，其中在步骤 (b) 中支持物的段数与所选类型亚单位的数目相等，以便每一种类的试验化合物呈现在正好一段固相支持物上。

32. 一种制备试验化合物的组合文库的方法，该方法包括下列步骤：

(a) 将带有一个或多个保护基团的接头连接到连续的固相支持物上；

(b) 从接头上除去保护基团以便提供反应位点；

并且进一步包括下列步骤的至少两次连续重复：

(c) 选择由两个或多个带有一个或多个保护基团的亚单位构成的组；

(d) 将带有接头的连续的固相支持物分割成多个物理上分开的支持物片段，所述的接头具有反应位点，支持物片段的数目与构成整体所需要的多个所选类型亚单位的数目相等；

(e) 将一种类型的亚单位连接到基本上所有的与相应的固相支持物片段相连接的反应位点上；此后

(f) 从亚单位上除去保护基团以便提供反应位点，

由此提供至少两个与每段固相支持物相连接的亚单位，并且其中每段固相支持物带有与之相连接的所选亚单位的单一种类的试验化合物，而每一种类的试验化合物呈现在预定数目的固相载体片段上。

33. 权利要求 32 的方法，其中接头带有一个或多个可独立于亚单位上的保护基团而释放的保护基团。

34. 权利要求 32 的方法，其中固相支持物选自膜、纸张和棉花。

35. 权利要求 34 的方法，其中膜是官能化交联的聚四氟乙烯。

36. 权利要求 32 的方法，其中在步骤 (d) 中支持物的段数与所选类

型亚单位的数目相等，以便每一种类的试验化合物呈现在正好一段固相支持物上。

各试验化合物物种的具有预定频率的组合文库

1. 发明所属技术领域

本发明属于在固相支持物上合成的试验化合物物种的组合文库领域。组合文库是由随机选择的亚单位组成的多种化合物的集合体。所说的文库是有用的，因为可对它们进行筛选以鉴别兴趣受体的配体。更具体地说，本发明涉及当固相支持物是易于形成进一步可分的片段时的用于构建这样的文库的方法。

2. 发明背景

在用于产生新的药理学上的榜样(lead)的现代方法中，组合化学技术赢得了广泛的接受(Gallop, M.A等, 1994, 药物化学杂志, 37: 1233-1251; Gordon, E.M等, 1994, 药物化学杂志, 37:1385-1401.)。正在使用的一种组合方法基于以下策略：合成在固相支持物的每个粒子上包含一种不同结构的文库；使文库与可溶性受体相互作用；鉴别与大分子靶相互作用的‘小珠’；确定鉴别的小珠所具有的结构(Lam, K.S等, 1991, 自然, 354: 82-84)。另一种这样的方法是：从固相支持物上顺序释放限定等分量的化合物；尔后在溶液中测定活性；鉴别活性化合物从中释放的粒子；通过直接测序(Salmon, S.E等, 1993, 美国科学院学报, 90: 11708-11712)或通过阅读其密码(Kerr, J.M等, 1993, 美国化学学会杂志, 115: 2529-2531; Nikolaiev, V等, 1993, 肽研究, 6: 161-170; Ohlmeyer, M.H.J等, 1993, 美国科学院学报, 90: 10922-10926)阐明其结构。

可使用首先由Furka描述的(Furka等, 1988, 药物化学第五次国际专题研讨会, 1988, 布达佩斯; Furka等, 1988, 第14次国际生物化学大会, 1988, 布拉格; Furka等, 1991, 国际肽蛋白质研究杂志, 37: 487-493)产生等摩尔混合物肽的简单的原理合成可溶性随机组合文库。用于反复筛选的可溶性文库的构建也已有描述(Houghten, R.A al.1991, 自

然, 354: 84-86)。K. S. Lam 公开了使用不溶性随机组合文库的新的和意外有用的技术。Lam 在固相支持物上合成了随机组合文库, 这样每种支持物上有一种单一分子结构的试验化合物, 而且, 他还通过固相结合方案筛选了没有预先从固相支持物除去试验的化合物的文库(Lam, K. S 等, 1991, 自然, 354: 82-84)。

然而, 当合成了随机组合文库后, 仅仅在用于合成的粒子数目至少比合成的结构数目高一个数量级的情况下, 所有可能的结构的重现才有可能完成(Burgess, K. 等, 1994, 药物化学杂志, 37: 2985-2987)。

对于文库构建, 需要的是在限定数目的固相粒子上进行合成, 固相粒子的数目确切地与组成文库的化合物的数目相匹配。该数目通常是在每个预定数目的“随机化”位置上亚单位类型数的数目的结果。例如, 每个位置可由五类亚单位的一种占据的三个位置(三体)的文库中有 $5 \times 5 \times 5 = 125$ 个物种。对于这种理想的状态, 我们能消除通过分裂和混合方法产生的文库的统计不确定性。然后文库的分析可在不“丢失”活性化合物或检测同一结构若干次进行, 这种分析在小文库的情况下尤其有利(十个到一千种结构的范围), 其中经常只发现一种活性化合物(参见, 例如, (Stankova, M 等, 1994, 药物开发研究, 33: 146-156))。这样, 在合成组合文库的领域中需要按预定的次数合成具有每一潜在物种的文库(优选的是一次)的方法。

3. 发明概述

本发明包括在固相支持物(通过切割易于而可连续地形成分开的(separate)片段的基质)上制备组合文库的方法。组合文库的试验化合物由各种位置上的亚单位组成。组合文库的试验化合物物种(species of test compound)通过在试验化合物的每个位置由亚单位逐步添加合成。亚单位选自那个位置的一类亚单位。按照本发明, 在逐步添加之前, 把支持物基质分割成相等于那一步添加的亚单位类型数目的片段。这一步骤可重复进行, 直到支持物基质片段小得无法分割。

按照本发明的方法, 操作者可构建具有预定数目的物种和预定数目的片段(pieces)的固相支持物的组合文库。在文库中, 仅有一种试验的化合物连接到任何固相支持物的一个片段上。按照本发明构建的文库包含在预定数目片段的固相支持物上的各预定的试验化合物物种。在一个更为理想的

实施方案中，每一试验化合物物种存在于唯一的一个支持物上。

本发明不同于以前使用的合成组合文库的方法，因为本发明的方法使用了预定的分割方案来代替混合和再次随机分配的步骤。这样，这些文库称为“非随机”或“定向”文库。

可以设计分割方法以便产生的片段肉眼可辨，例如，具有不同的长度、宽度，或者在片段为平面的情况下，它们的侧面和末端会形成不同的形状。通过亚单位类型的逐步添加的配位，就可鉴别支持物的肉眼可辨的特征和亚单位的类型。

4. 附图简述

图1：定向文库合成的总的图解。具有三个位置的文库例子在每个步骤中由两种氨基酸随机化，产生八种三肽文库。

图2：在棉线上125种四肽混合物模型文库的合成图解。

图3：2888种五肽膜文库的合成图解。“n”=在特定位置上随机化的氨基酸的数目。

5. 发明详述

本文使用的试验化合物物种可以是单一限定的分子结构。另外，试验化合物物种可以是限定分子的混合物的基元物种(motif species)，其中多亚单位物种存在于这种试验化合物物种的一个或多个位置上。基元文库是其中试验化合物物种是基元物种的组合文库。当构建基元文库时，本文使用的术语“亚单位的类型”指亚单位的化学物种或者指亚单位物种的有限的混合。关于基元文库，试验化合物物种的位置(其中添加了混合的亚单位物种)称为“混合位置”。与随机组合文库的命名法相一致，基元文库或非基元文库的试验化合物物种位置(其中存在一种亚单位)称为“随机位置”，除了文库的所有物种在一个给定的位置有相同的亚单位物种之外，在这种情况下其中位置称为不变量或固定位置。基元文库在1994年5月20日提交的未决专利申请08/246,435中描述，本文一并参考。

为使得可以进行连接到支持物基质上的试验化合物物种的合成，提供了一种连接物(linking means)。连接物对亚单位的连接可有多于一个反应位点。在一个实施方案中，亚单位是具有可移动的保护基的双功能亚单位；氨基酸是熟悉的例子。在这种情况下试验化合物是聚合物。

在另一个实施方案中, 连接物包含多个正交封闭 (orthogonally blocked) 反应位点, 其被称为支架(scaffolds)。在这个实施方案中, 亚单位提供了支架的取代基。这样, 试验化合物物种是替代支架的物种。在支架的每一点添加的亚单位可以是双功能或单功能的, 连接到支架反应位点的取代基可由一种或多种亚单位组成。

按照本发明, 取代支架的文库的双功能和单功能亚单位以及聚合物文库的双功能亚单位可以通过许多化学键连接到增长的试验化合物上, 下列是一些非限制性的例子: 酰胺键、酯键、脲键、氨基甲酸乙酯键、碳-碳酰键、碳-氮键、碳-碳单键、烯炔键、硫醚键以及二硫键。支架中的试验化合物和非肽聚合物文库的产生化学在 1994 年 5 月 24 日提交的未决专利申请 08/249,830 中描述, 本文一并参考。

肽的固相合成通常在串珠状的聚合物上进行(Merrifield, R.B., 1963, 美国化学协会杂志, 85: 2149-2154), 然而, 可以使用固相支持物的替代形式。固相支持物包括膜(Daniels, S.B等, 1989, Tetrahedron Lett. 30: 4345-4348)、纸片(Frank, R., 1992, Tetrahedron, 48: 9217-9232; Frank, R.和R. Doring, 1988, Tetrahedron, 44: 6031-6040)或棉(Eichler, J. 和 R.A. Houghten, 1993, 生物化学, 32: 11035-11041; Lebl, M. 和 J. Eichler, 1989, 肽研究, 2: 232-235)。多个合成技术的回顾参见 Frank, R., 1993, Bioorg. Med. Chem. Lett. 3: 425-430; Jung, G. 和 A.G. Beck-Sickinger, 1992, Angew. Chem. T. Ed. Engl. 31: 367-383。先前用棉进行的试验(Eichler, J. 等, 1991, 肽研究, 4: 296-307)导致选择棉线作为一种合成“定向”或“非随机”文库的实验固相支持物。这种文库的简单原理在图 1 中说明。连续的支持物被分割成和使用在随机化第一步的亚单位类型的数目相同的部分, 片段分别和适当的残基反应。反应完成后, 支持物基质的每一片段分成和使用在随机化第二步的亚单位类型的数目相同的部分, 收集每一片段的适当片段用于偶联。

以这种方式, 合成可以继续到亚单位添加到试验化合物的所有位置或直到达到操作支持物的机械限制。棉线常规的机械限制是几毫米的直径, 这限定了棉线文库的实际容量在 10 个试验化合物和 50,000 个试验化合物之

间。这些比例的文库是实质上有价值的,尤其在非肽文库的情况下。这样,具有少达二、三、四和五种随机位置的文库(亚单位类型的数目在2或3和19或更多之间)在本发明的范围之内。

在另一个实施方案中,所述基质可以是功能化的膜。适合的支持物基质的非限制例子包括聚丙烯和聚四氟乙烯(特氟隆)。最小的操作区域是大约 1mm^2 ,由于膜仅仅 $10\mu\text{m}$ 厚,当使用这种方法的自动化方法时,很容易构建几百万化合物的文库。使用膜支持基质构建的文库大小仅仅由筛选文库的经济、效率和花费的考虑所限制,而不受其合成的任何技术限制。

本发明的第三个实施方案是“可重构的牙刷(toothbrush)”,该牙刷具有成束功能化的比棉机械性质更好的物质的线。不同刷子的线束可以解装配并重装配成不同的组合以进行亚单位的逐步添加。单束线可在两或三轮的添加步骤之后解装配并为进行下一步而重组。对于最后的随机化步骤,线可按照本发明上述方法切割成片段。

定向文库 构建方法的公开使得可以结合简单的编码方案,该方案在文库中使用支持物的重要结构特征的简单(即肉眼可辨的)鉴别,它基于支持物的物理特征,如颜色(Campian, E.等, 1993,第13次腺苷酰硫酸大会,Edmonton,加拿大)、大小和材料的形状(在线的情况下为长度)。

与文库不同,其物种以固定的排列构建(其中所说的每个物种的位置与其结构一致),在本发明优选的实施方案中,试验化合物物种的全部结构不是由肉眼可辨的特征确定的。相反,在筛选试验之后选择的试验化合物物种的结构通过结构分析确定。结构分析可以通过使用如Edman降解法或通过质谱法(在肽试验化合物的情况下)进行。分析的结构可以是试验化合物自身或结构可以是除试验化合物外连接到每个固相支持物上的编码分子。连接到固相支持物上的编码分子的结构首先是任意地和系统地连接到支持物上的试验化合物物种有关,以便于鉴别试验化合物,其次,这样选择便于测定。在组合文库中任意的编码分子的选择和使用在1994年5月24日提交的未决专利申请08/249,830中描述,本文一并参考。

6. 实施例

下列实施例作为本发明的某些实施方案的说明性实施例,无意于作为对本发明范围的限制。

我们制备了两个“非随机”肽文库模型。每个这样的文库的制备和筛选首先简要概述如下。这两个文库中每一个的材料和方法、筛选的合成的更详尽描述在 6.1-6.5 部分。

第一个文库在棉线上制备,仅包含 125 种肽混合物(参见图 2)。通过 β -丙氨酸(Eichler, J. 等, 1991, 肽研究, 4: 296-307)和甘氨酸修饰的棉线(125cm)连接到它之上。然后把线分割成五个部分,甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸分别偶联到每一片段上。在完全的偶联和 Fmoc 脱保护之后,把 L-氨基酸的混合物偶联到所有线上。其后是两个连续的步骤,每条线段切成 5 个片段,每一片段用一个选自上述五个氨基酸的组的氨基酸酰化。接着重组、脱保护、中和、洗涤和干燥产生的 125 个片段;这就导致了 125 种四肽基元物种的基元文库的产生(具有作为随机位置的位置 1, 2 和 4 和作为混合位置的位置 3 的每种粒子上的 19 种肽混合物)。

每片段切割成两半,然后把两半置于两个相配对的微滴定平板中,其中之一装备有滤膜。然后使滤膜平板在真空干燥器中接触氨气以从棉上释放肽。选择较早描述的气体氨解裂解(Bray, A.m. 等, 1994, J. Org. Chem. 59: 2197-2203; Bray, A.M. 等, 1993, Tetrahedron Lett. 34: 4411-4414)作为裂解方式,因为在断裂之后,肽保留在干燥的支持物粒子的表面。肽可溶解进试验的缓冲液中。

在用缓冲液抽取肽之后,把肽转移到另一个平板上,进行抗- β -内啡肽抗体结合测定。一个孔用于观察阳性反应,相应棉段的测序鉴别出序列 Tyr-Gly-Mix-Phe(Mix 是所有氨基酸的混合物),这片段序列相对应于已知的抗- β -内啡肽抗体的基元。进一步的分析表明: 1cm 的棉线可产生 400 nmol 的释放肽,可以制备 40ml 的 10 μ M 试验化合物溶液,足够进行多重测定。

第二个实施例是 2888 种肽的文库,该文库使用 16 $\times$ 16cm 功能化的聚四氟乙烯(“特氟隆”)膜合成。膜通过 N-保护的 β -丙氨酸酰化,然后构建 β -丙氨酸和甘氨酸的重复序列组成的接头。合成图解在图 3 中给出。文库的试验化合物物种具有下列结构: Xxx-Xxx-Pro/Gly-Gln/Phe-Phe/Leu(Xxx 是用于随机化的 19 种 L 氨基酸之一),这种结构包含具有链霉抗生物素蛋白的已知基元 His-Pro-Gln 的 Leu-His-Pro-Gln-Phe 序列的一个拷贝

(Xxx-His-Pro-Gln-Xxx 的 38 个拷贝)、和包含抗- β -内啡肽单克隆抗体的已知基元的 Tyr-Gly-Xxx-Phe 序列的 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu 的一个拷贝 (Barrett, R.W. 等, 1992, Anal. Biochem. 204: 357-364; Cwirla, S.E. 等, 1990, 美国科学院学报, 87: 6378-6382; Devlin, J.J. 等, 1990, 科学, 249: 404-40625; Lam, K.S. 等, 1993, Bioorg. Med. Chem. Lett. 3: 419-424; Lam, K.S. 等, 1991, 自然, 354: 82-84; McLafferty, M.A., 1993, 基因, 128: 2936; Pinilla, C., 1993, 基因, 128: 71-76)。然后文库使用固相结合方案用两个模型目标(链霉抗生素蛋白和抗 β -内啡肽)筛选。

用链霉抗生素蛋白筛选产生了 55 个阳性方形(squares)。肽的特异性通过添加已知的竞争性生物素测定。17 个方形包含在生物素存在时不和链霉抗生素蛋白进行反应的肽, 然而, 所有的 17 个方形在缺少生物素的情况下用大约相等的强度可再次阳性染色。对 3 个方形上的肽分别测序, 结果在表 1 中给出。所有方形的小片段立即切割下来并放置测序。这种多测序实验 (Lebl, M. 等, 1993, 见 C.H. Schneider 和 A.N. Eberle 的肽, 1992, Proc. 22. EPS Eds. ESCOM, Leiden) 揭示了对肽链的个别位置的需要。

用抗- β -内啡肽温育提供了 21 个染色的方形。使这些阳性相互作用的粒子脱色, 使用另外的检测方案与抗- β -内啡肽抗体重新温育。在第一次染色中, 抗体通过生物素标记, 然后结合的靶的检测通过和链霉抗生素蛋白-碱性磷酸酶复合物温育来达到。第二轮的检测通过和抗小鼠抗体-碱性磷酸酶复合物温育进行。按这种方法, 消除了第一种检测方案的非特异性相互作用, 因为第二轮的检测仅和选择性粒子进行; 检测非特异性相互作用(检测系统的特异性相互作用)的可能性显著降低。第二轮的温育仅检测出三个阳性方形。对它们进行测序, 测得的序列在表 1 中给出。发现了有基元 Tyr-Gly- - -Phe 的预期序列。

表 1. 在选择用于结合链霉抗生素蛋白和抗- β -内啡肽的阳性方形上的发现的序列

链霉抗生素蛋白	抗- β -内啡肽
Gly-His-Pro-Gln-Phe	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
Met-His-Pro-Gln-Phe	Tyr-Gly-Gly-Phe-Phe

Lys-His-Pro-Gln-Phe

Tyr-Gly-Pro-Phe-Leu

6.1. 材料和方法

仪器: 使用 1cm 的石英杯记录在 Hewlett Packard HP 8452A 二极管排列分光光度计上的 UV/VIS 吸收谱。通过 Edman 降解法测序在 ABI 4778 蛋白质测序仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 和 Porton PI 3010 仪器 (Porton Instruments, Tarzana, CA) 上进行。

材料: 使用没有进一步纯化的商业级溶剂。保护的氨基酸从 Bachem (Torrance, CA)、Advanced ChemTech (Louisville, KY) 或 Propeptide (Vert-le-Petit, 法国) 获得。单克隆的抗- β -内啡肽抗体 (克隆 3-E7) 从 Boehringer Mannheim 购买。缀合到碱性磷酸酶上的链霉抗生素蛋白从 Pierce (Rockford, IL) 获得, 山羊-抗-小鼠碱性磷酸酶复合物从 Bio-Rad (Richmond, CA) 获得。d-生物素从 Sigma (St. Louis, MO) 购买。

一般过程: 固相合成在聚丙烯注射器中人工进行 (Krchnak, V. 和 J. Vagner, 1990, 肽研究, 3: 182-193)。Fmoc 保护基用 50% 六氢吡啶/DMF 裂解 1×10 分钟。在 DMF 中的 DIC 用于 N α -Fmoc 氨基酸的激活。每个浓缩反应的完成通过溴酚蓝方法监测 (Krchnak, V. 等, 1988, Collect. Czech. Chem. Commun. 53: 2542-2548)。偶联方案包括在偶联和脱保护之间以及脱保护和偶联之间以 DMF 洗涤 (6-8 次)。最后的脱保护由混合物 K 完成 (King, D.S. 等, 1990, 国际肽蛋白质研究杂志, 36: 255-266)。

6.2. 在棉线上的定向文库的合成

棉线于在二氯甲烷 (DCM) 中的 25% 三氟醋酸 (TFA) 里处理 1 小时。用 DCM 洗涤 (3×), 用在 DCM 中的 5% 二异丙基乙胺 (diisopropylethylamine) 中和 (5 分钟), 再用 DMF 和 DCM 洗涤 (3×)。Fmoc- β -丙氨酸 (2mmol) 在加入 N-甲基咪唑的同时通过 DIC (2mmol) 和 HOBt (2mmol) 激活偶联过夜 (3.5mmol)。棉线用 DMF 洗涤, 取代通过裂解的 Fmoc 基-0.41mmol/g (683 nmol/cm) 的光度测定法测定。五段 (每段 25cm) 棉线置于聚丙烯注射器中, Fmoc 保护的氨基酸 (苯丙氨酸、酪氨酸 (But)、丙氨酸、亮氨酸、甘氨酸) 通过 DIC/HOBt 方案偶联。偶联完成后 (用溴酚蓝方法监测) 棉线用 DMF 洗涤并置于一个注射器中, 然后裂解 Fmoc 基。以 DMF 和在 DMF 中的 2% HOBt 溶液洗涤之后, 调整摩尔比率以用于不同反应 (以试点试验测定) 的 19 种 L (除了半胱氨酸之

外) Fmoc 氨基酸的混合物(Eichler, J. 和 R. A. Houghten, 1993, 生物化学, 32: 11035-11041; Geysen, H.M. 等, 1986, 分子免疫学, 23: 709-715; Pinilla, C. 等, 1992, 生物技术, 13: 901-905) 偶联到所有的棉段上。在此偶联完成之后, 洗涤棉段, 裂解 Fmoc 基, 洗涤的棉线以下列方法分割给五个注射器。从每条线上切割下 5cm 的棉线并置于不同的注射器中。按这种方法, 所有注射器中仅有一段从每条 25cm 的棉线上切割下来的 5cm 棉段, 没有一个注射器中有一个以上的棉段。进行了五种氨基酸衍生物(同上) 的偶联, 洗涤棉线, 除去 Fmoc 基, 再次细分棉线。在这种情况下, 1cm 的片段从所有 5cm 的片段上切割下来并置于五个注射器中。进行了相同的五种氨基酸的偶联, 裂解 Fmoc 基, 侧链保护基通过 TFA、DCM 和茴香醚(50: 45: 5) 的混合物裂解 2 小时。棉段用 DCM、MeOH 洗涤并干燥。一个样品片段的氨基酸定量分析表现出 400nmol/cm 的取代。

6.3. 在棉线上的定向文库的筛选

把棉段切割成两半, 并置于两个相配对的微滴定板(一个装备有滤膜底, 一个为常规平板-“结构评价平板”) 的配对位置上。滤膜平板放置到用气体氨重复真空和充满的干燥器中。在接触 20 小时的氨之后, 使干燥器真空, 然后除去氨。释放缓冲液 PBS/Tween 添加到每个孔中(100 μ l), 平板在室温下振荡过夜。溶液过滤到试验平板上。

为了抑制 ELISA, 使用了 96-孔的免疫平板(Dynatech)。每个孔最初用在碳酸氢盐缓冲液(pH 9.4) 中的 50 μ l 链霉抗生素蛋白(20 μ g/ml) (Pierce) 中包被过夜, 其后用 PBS 洗涤三次。孔使用 200 μ l 在 PBS 中的牛血清蛋白(BSA, 3mg/ml) 处理以防止非特异性连接, 然后孔用 PBS/Tween 洗涤三次, 加入 50 μ l 的生物素化的 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu(Salmon, S.E. 等, 1993, 美国科学院学报, 90: 11708-11712) (10ng/ml)。1 小时之后, 以 PBS/Tween 洗涤平板, 加入从棉段上释放的 50 μ l 溶液(或 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, 阳性对照), 然后加入 50 μ l 的抗- β -内啡肽(40ng/ml)。在室温下温育 1 小时之后, 以 PBS/Tween 洗涤平板, 加入 50 μ l 的山羊-抗小鼠 IgG 辣根过氧化物酶缀合物(Bio-Rad) 的 1:1000 稀释液。又一个小时后, 洗涤平板, 加入 100 μ l 的在 10ml 2,2-叠氮基双(3-乙基苯并噻唑磺酸) 底物中的 30 μ l 30%的 H₂O₂ 的溶液(溶液在柠檬酸缓冲液中, pH 4.2)。15 分钟后,

ELISA 平板在 405nm 下读数。仅一个孔表现出了明显的抑制。对来自“结构评价平板”上相配对孔中的棉段样品(0.3mm)测序,发现了 Tyr-Gly-Mix-Phe 序列。

6.4. 在功能化的交联特氟隆膜上的定向文库的合成

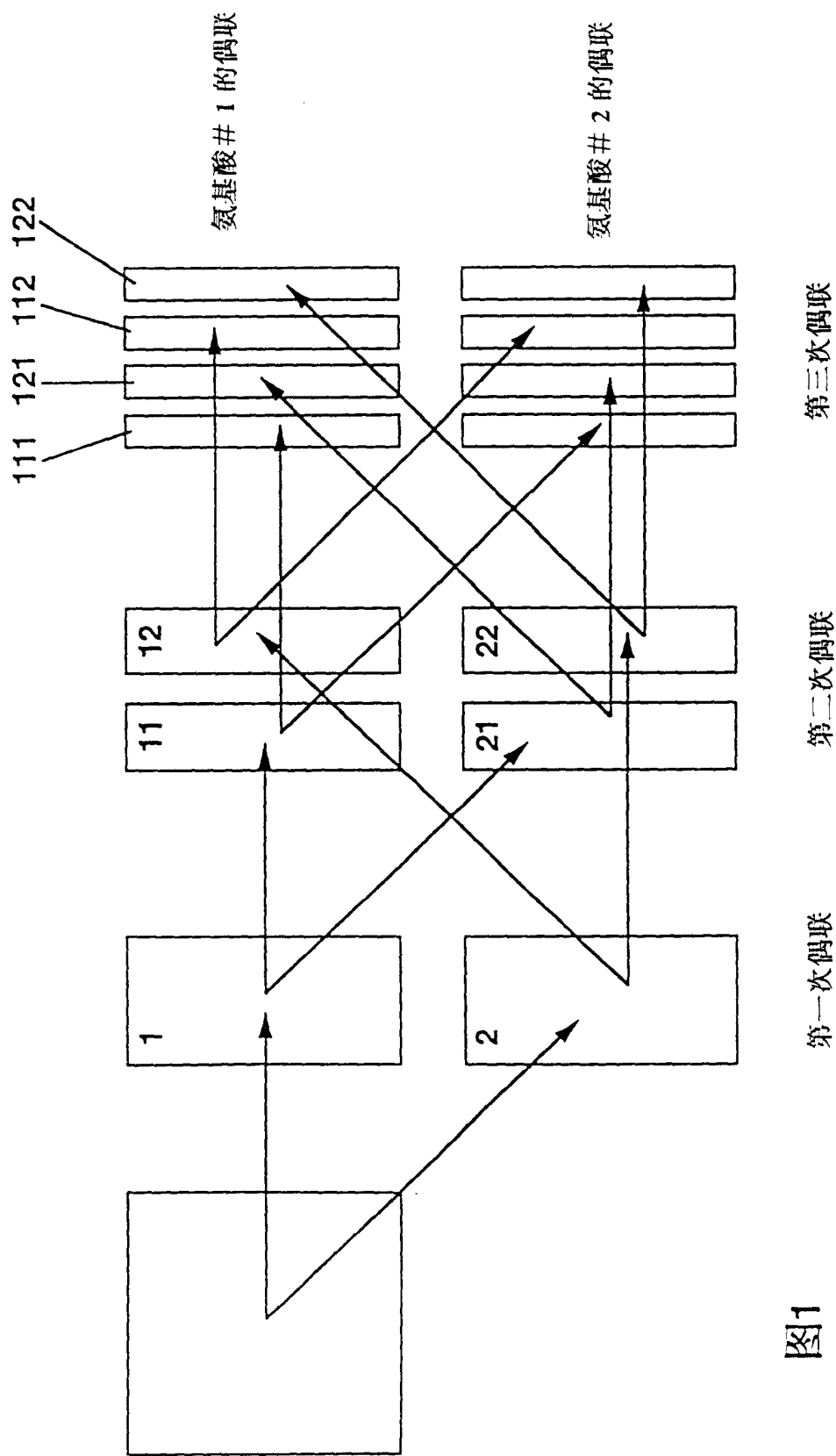
有大约 $35\text{nmol}/\text{cm}^2$ 取代的亲水的氨基功能化膜(UV 交联的氨基异丁烯酸氨、N, N-二甲基丙烯和亚甲基-双-丙烯酰胺, $16\times 16\text{cm}$, Perseptive Biosystem, Bedford, MA)置于 50ml 的 Falcon 试管中,使用 DIC/HOBt 方法在 DMF 中通过 Fmoc- β -丙氨酸酰化。与 Fmoc-甘氨酸、Fmoc- β -丙氨酸、Fmoc-甘氨酸先后偶联。在脱保护之后,把膜分割成两部分, Fmoc-苯丙氨酸和 Fmoc-亮氨酸分别和它们相偶联。在偶联完成(溴酚蓝监测)和脱保护之后,再次把棉段分割成两部分,为进行 Fmoc-谷氨酰胺和 Fmoc-苯丙氨酸偶联而重组。在下一次的偶联中,膜再次分割成两片段,为进行 Fmoc-脯氨酸和 Fmoc-甘氨酸的偶联而重组。从这些偶联物($8\times 4\text{cm}$)产生的棉段分割成 19 条(8×0.21),条带置于 19 个小聚丙烯试管中。十九种天然氨基酸(除了半胱氨酸之外)用于这个阶段的偶联。在偶联完成和 Fmoc 脱保护之后,条带再次切割成 19 片段($4\times 2.1\text{mm}$),分到 19 个容器中。同组的 19 种 Fmoc 氨基酸用于最后的偶联。重组所有的棉段,除去 Fmoc 基,通过混合物 K 裂解侧链保护基(King, D.S. 等, 1990, 国际肽蛋白质研究杂志, 36: 255-266)。用 TFA(2 $\times$)、DCM(5 $\times$)、MeOH(3 $\times$)、水(5 $\times$)洗涤膜片段。基于最后的 Fmoc 释放的吸收率测量的取代为 $43.3\text{nmol}/\text{cm}^2$ 。

6.5. 在交联的特氟隆膜上的定向文库的筛选

肽文库按照公开的方案筛选(Lam, K.S. 和 M. Lebl, 1992, 免疫方法, 1: 11-15)。肽方形首先以双蒸水洗涤。在彻底洗涤之后,再洗涤方形并用 0.05%明胶(w/v)封闭非特异性结合。在以 PBS/Tween(137mM NaCl, 2.7mM KCl, $4.3\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1.4\text{mM KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.2 和 0.1%Tween-20)和 2 $\times$ PBS/Tween/明胶(2 $\times$ PBS, 0.1%Tween-20(v/v)和(w/v))洗涤之后,再和在 2 $\times$ PBS/Tween/明胶中的 20nM 链霉抗生素蛋白-碱性磷酸酶一起温育。文库再用 PBS/Tween、2 $\times$ PBS/Tween/明胶和 TBS(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 25mM Tris base, pH 7.4)洗涤。加入标准底物 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐,然后再加入一次。接着,将文库和底物转移到培养皿上显色。收集 55 个显

色方形，用 PH 1.0 的 6M 盐酸胍硫酸素洗涤，用 DMF 脱色，用明胶包被，与 100nM 的 d-生物素和在 2×PBS/Tween/明胶中的 20nM 链霉抗生素蛋白-AD 竞争。与底物温育产生了 17 个无色的、竞争性的方形。在用底物处理之后再和 20nM 的链霉抗生素蛋白-AD 温育产生 17 个阳性反应的方形。

然后其余的文库以 6M 盐酸胍硫酸素、pH 1.0、DMF 和明胶包被循环。以 PBS/Tween 和 2×PBS/Tween/明胶洗涤之后，加入在 2×PBS/Tween/明胶中的 250ng/ml 生物素化的抗-β-内啡肽抗体。在彻底洗涤之后，加入链霉抗生素蛋白-碱性磷酸酶。然后如上所述进行文库洗涤、底物加入和显色。有 21 个方形显色，尔后循环制备它们用于特异性测定。使用 2×PBS/Tween/明胶作为缓冲液，加入 200ng/ml 的抗-β-内啡肽抗体，然后以 1.5nM 山羊-抗-小鼠-AP 彻底洗涤。然后方形以 PBS/Tween、2×PBS/Tween/明胶和 TBS 洗涤，加入底物。结果 3 个方形显出了表明结合的颜色。



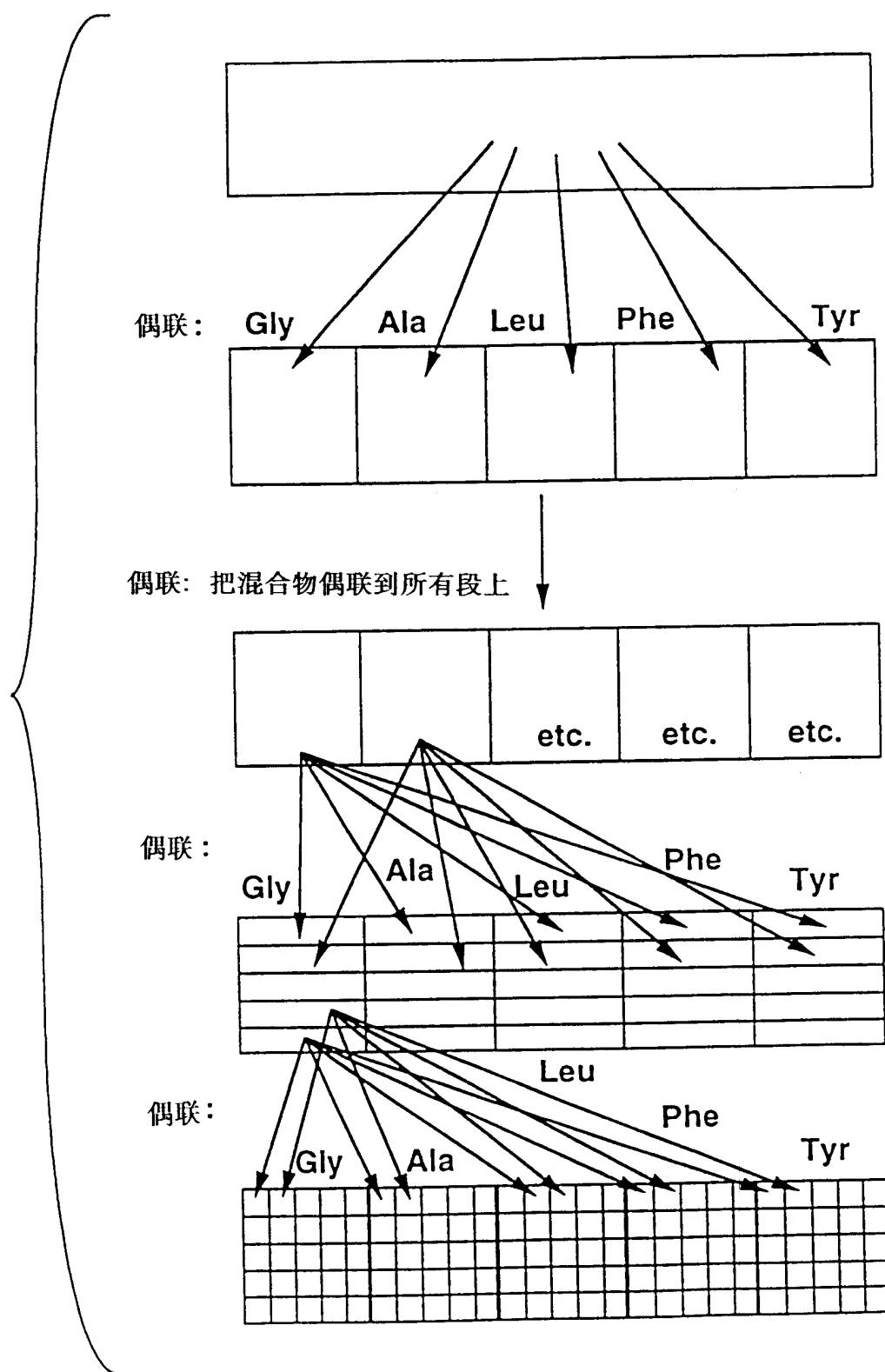


图 2

