



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101896272 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 31

(21) 申请号 200880115836. 9

5-7 页, 附图 1-2.

(22) 申请日 2008. 11. 13

W0 2007/096642 A1, 2007. 08. 30, 说明书第

1, 6-9 页, 附图 1-4.

(30) 优先权数据

0722287. 0 2007. 11. 13 GB

Dirk T. S. Rijkers et al.. Synthesis
of peptide p-nitroanilides mimicking

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2010. 05. 13

fibrinogen- and hirudin-binding to
thrombin. 《International journal of Peptide
& Protein Research》. 1996, 第 48 卷 182-193.

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/GB2008/003833 2008. 11. 13

审查员 李晶晶

(87) PCT 申请的公布数据

W02009/063208 EN 2009. 05. 22

(73) 专利权人 莫洛迪克有限公司

地址 英国贝德福德郡

(72) 发明人 詹姆斯·亚历山大·斯库藤

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

(51) Int. Cl.

B01L 3/00 (2006. 01)

G01N 33/50 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2007/096637 A1, 2007. 08. 30, 说明书第

权利要求书2页 说明书10页

序列表3页 附图9页

(54) 发明名称

蛋白酶检测

(57) 摘要

含有发色氨基酸的多肽。发色氨基酸在其 N 和 C 端两侧具有至少一个氨基酸。发色氨基酸的氨基具有至少为 5 的 pKa。发色氨基酸能够与共轭醛反应。多肽含有靶蛋白酶的靶序列, 该靶蛋白酶能够切开含有发色氨基酸的氨基的肽键。

1. 在样品中检测蛋白酶的方法,包括下列步骤:

(i) 将样品暴露于含有发色氨基酸的多肽,其中发色氨基酸在其N和C端两侧连有至少一个氨基酸,发色氨基酸的胺基具有低于5的pKa,发色氨基酸能够与共轭醛反应,并且其中多肽包含靶蛋白酶的靶序列,该靶蛋白酶能够切开包含发色氨基酸的氨基的肽键;

以及允许蛋白酶切开多肽并产生片段,在该片段的N-末端显示发色氨基酸;

(ii) 将共轭醛与含有发色氨基酸的片段反应,产生有色加成物;以及

(iii) 检测有色加成物,有色加成物的存在表明样品中存在蛋白酶,其中发色氨基酸与天然氨基酸等排性匹配。

2. 权利要求1的方法,其中发色氨基酸:

含有直接键合到发色氨基酸的氨基的氮原子上的芳香环部分,其中任选地芳族环部分是苯基或萘基部分。

3. 权利要求1的方法,其中靶序列包含发色氨基酸。

4. 权利要求1的方法,其中共轭醛是取代的苯甲醛,肉桂醛,反,反-苯基戊二烯醛,DMAC或DMAB。

5. 权利要求1的方法,其中多肽在多肽的C或N末端处或附近固定化在固相支持物上,并且多肽任选共价结合到固相支持物上。

6. 权利要求1的方法,在多肽的C或N末端处或附近还含有第一个和第二个结合部分。

7. 权利要求1的方法,其中多肽的长度在3到100个氨基酸之间。

8. 权利要求1的方法,其中多肽的长度在3到40个氨基酸之间。

9. 用于在样品中检测蛋白酶的产品,包含:

(i) 含有发色氨基酸的多肽,其中发色氨基酸在其N和C端两侧连有至少一个氨基酸,发色氨基酸的胺基具有低于5的pKa,发色氨基酸能够与共轭醛反应,并且其中多肽包含靶蛋白酶的靶序列,该靶蛋白酶能够切开包含发色氨基酸的氨基的肽键;以及

(ii) 其上能固定化多肽的固相支持物;以及

(iii) 共轭醛,其中发色氨基酸与天然氨基酸等排性匹配。

10. 权利要求9的产品,其中发色氨基酸:

含有直接键合到发色氨基酸的氨基的氮原子上的芳香环部分,其中任选地芳族环部分是苯基或萘基部分。

11. 权利要求9的产品,其中靶序列包含发色氨基酸。

12. 权利要求9的方法,其中共轭醛是取代的苯甲醛,肉桂醛,反,反-苯基戊二烯醛,DMAC或DMAB。

13. 权利要求9的产品,其中多肽在多肽的C或N末端处或附近固定化在固相支持物上,并且其中多肽任选共价结合到固相支持物上。

14. 权利要求9的产品,在多肽的C或N末端处或附近还含有第一个和第二个结合部分。

15. 权利要求9的产品,其中多肽的长度在3到100个氨基酸之间。

16. 权利要求9的产品,其中多肽的长度在3到40个氨基酸之间。

17. 权利要求9的产品,其中固相支持物包含第一个和第二个铰链连接的片层,多肽固定化在第一个片层上,共轭醛位于第二个片层上,使得将片层折叠到一起时能将材料从第

一个片层转移到第二个片层上。

18. 权利要求 17 的产品,还包含能插入到固定化在第一个片层上的多肽与位于第二个片层上的共轭醛之间的膜,所述膜阻止了尺寸大于阈值尺寸的物质从第一个片层到达第二个片层,多肽能被蛋白酶切开以释放含有发色氨基酸的片段,所述片段小于阈值尺寸。

19. 权利要求 9 的产品,其中固相支持物包含色谱介质。

20. 权利要求 19 的产品,其中色谱介质还包含片段结合分子,所述片段结合分子能够结合含有在被蛋白酶切开后能从多肽释放的发色氨基酸的多肽的片段,多肽能固定化在色谱介质上的标记区域处,片段结合分子固定化在色谱介质的可视化区域处。

21. 权利要求 19 的产品,其中多肽能被切开成第一个和第二个片段,第一个片段含有发色氨基酸,其中产品还包含:能与第二个片段结合的可检测标记物;以及固定化在色谱介质中或其上的第一种和第二种捕获分子,第一种捕获分子能够结合第一个片段,第二种捕获分子能够结合第二个片段或可检测标记物。

22. 权利要求 21 的产品,其中标记物包含能够结合第二个片段的结合成分。

23. 权利要求 19 的产品,其中色谱介质包括:

- a) 测试条;或
- b) 多孔材料柱。

24. 权利要求 9-23 任一项的产品在检测样品中的蛋白酶中的应用。

蛋白酶检测

[0001] 本发明涉及含有发色氨基酸的多肽,掺入了这种多肽的产物,以及制造这种多肽的方法。本发明还涉及检测蛋白酶的方法。

[0002] 在本技术领域已知有大量反应试剂或化合物可用于测量蛋白水解作用。其中包括合成修饰的多肽底物,它们在被蛋白水解作用切开时,释放出指示剂基团或不稳定分子,例如已经在其 C- 末端被对硝基苯胺或萘胺修饰的合成多肽。例如,EP-A-0864864 公开了使用 Dnp-Pro- β -环己基-Ala-Gly-Cys(Mu)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH₂ 检测蛋白酶, Dnp-Pro- β -环己基-Ala-Gly-Cys(Mu)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH₂ 是一种基于荧光的肽而不是发色的肽。Plapinger 等, J. Org. Chem 1965, 30, 1781 报道了被胰蛋白酶切开后发色的物质,它们是精氨酸的衍生物。

[0003] 在对硝基苯胺从这样的肽底物的 C- 末端切下并释放到溶液中后,可以测量到 UV 吸收值的增加。在肽底物含有萘胺的情况下,释放的发色部分可以被附加的报告分子捕获,产生可见的颜色变化。合成的胰蛋白酶底物 N α -苯甲酰基-DL-精氨酸- β -萘胺(BANA)常用于蛋白水解活性的分析测定,以例如帮助诊断牙周疾病。

[0004] 本技术领域已知的发色蛋白酶底物,例如 BANA,它们的相应发色部分位于多肽的 C- 末端(除了硫代酯肽(Thiopeptolides)之外,参见下文)。这种发色蛋白酶底物的问题在于,发色部分位于多肽的 C- 末端,由于缺乏侧翼氨基酸,多肽的格式受到限制,从而限制了蛋白酶特异性。本技术领域已知的发色肽还具有不良的水溶性,并且较长多肽的合成成为合成过程增加了复杂性。这导致多肽配制困难,并增加了在商业化规模上多肽扩大生产的成本。

[0005] 此外, C- 末端发色团不能以直接方式连接到固相表面上,这限制了使用这些多肽在诊断中可视化蛋白水解作用的方法的可能应用。

[0006] 硫代酯肽(Thiopeptolides),正如在 Weingarten 等, Biochem, 1985, 24, 6730-6734 中描述的,具有位于肽序列内部的发色部分,但是不使用酰胺键。基于硫代酯肽的肽底物的问题在于,由于它们在蛋白水解切割位点处不含通常的酰胺键,它们不能提供最大的底物识别或转换(turnover)。

[0007] 本发明试图缓解上述的一个或多个问题。

[0008] 根据本发明的一个方面,提供了含有发色氨基酸的多肽,发色氨基酸在其 N 和 C 端两侧带有至少一个氨基酸。

[0009] 优选情况下,发色氨基酸的胺基具有低于 5 的 pKa,发色氨基酸能够与共轭醛反应。

[0010] 有利情况下,多肽包含靶蛋白酶的靶序列,该靶蛋白酶能够切开包含发色氨基酸的氨基的肽键。

[0011] 根据本发明,还提供了含有发色氨基酸的多肽,其中发色氨基酸在其 N 和 C 端两侧带有至少一个氨基酸,发色氨基酸的胺基具有低于 5 的 pKa,发色氨基酸能够与共轭醛反应,并且其中多肽包含靶蛋白酶的靶序列,该靶蛋白酶能够切开包含发色氨基酸的氨基的肽键。

- [0012] 方便的是,发色氨基酸含有直接键合到发色氨基酸的氨基的氮原子上的芳族环部分。
- [0013] 优选情况下,发色氨基酸与天然氨基酸等排性 (isosterically) 匹配。
- [0014] 方便的是,靶序列含有发色氨基酸。
- [0015] 优选情况下,当靶序列被切开时,发色氨基酸能够与共轭醛反应,给出可检测信号。
- [0016] 有利情况下,共轭醛是取代的苯甲醛或肉桂醛或反,反 - 苯基戊二烯醛。
- [0017] 优选情况下,共轭醛是 DMAC 或 DMAB。
- [0018] 方便的是,芳族部分是苯基或萘基部分。
- [0019] 有利情况下,多肽是线性多肽。
- [0020] 优选情况下,多肽在多肽的 C 或 N 末端处或附近固定化在固相表面上。
- [0021] 有利情况下,多肽共价结合到固相表面上。
- [0022] 方便的是,多肽在多肽的 C 或 N 末端处或附近还含有第一个和第二个结合部分。
- [0023] 优选情况下,多肽的长度在 2 到 100 个氨基酸之间,更优选在 3 到 40 个氨基酸之间。
- [0024] 根据本发明的另一个方面,提供了在样品中检测蛋白酶的方法,包括下列步骤:
- [0025] (i) 将样品暴露于前述权利要求任一项的多肽中,允许蛋白酶切开多肽并产生片段,在该片段的 N- 末端展现发色氨基酸;
- [0026] (ii) 将共轭醛与含有发色氨基酸的片段反应,产生有色加成物;以及
- [0027] (iii) 检测有色加成物,有色加成物的存在表明样品中存在蛋白酶。
- [0028] 方便的是,步骤 (i) 包括用蛋白酶切开多肽的含有发色氨基酸的氨基的肽键。
- [0029] 根据本发明的另一个方面,提供了本发明的制造方法,包括下列步骤:
- [0030] i. 合成含有一个发色氨基酸的氨基酸二聚体;以及
- [0031] ii. 在多肽合成过程中将二聚体掺入到多肽的剩余部分中。
- [0032] 方便的是,步骤 (ii) 包含将二聚体与新生寡肽相连。
- [0033] 根据本发明的另一个方面,提供了用于在样品中检测蛋白酶的产品,包含:
- [0034] 本发明的多肽;以及
- [0035] 其上可以固定化多肽的固相支持物。
- [0036] 优选情况下,产品还包含共轭醛。
- [0037] 有利情况下,固相支持物包含第一个和第二个铰链连接的片层,多肽固定化在第一个片层上,共轭醛位于第二个片层上,使得将片层折叠到一起时可以将材料从第一个片层转移到第二个片层上。
- [0038] 方便的是,产品还包含可插入到固定化在第一个片层上的多肽与位于第二个片层上的共轭醛之间的膜,膜阻止了尺寸大于阈值尺寸的物质通过膜从第一个片层到达第二个片层,多肽可以被蛋白酶切开以释放含有发色氨基酸的片段,片段小于阈值尺寸。
- [0039] 或者,固相支持物包含色谱介质。
- [0040] 有利情况下,色谱介质还包含片段结合分子,能够结合含有在被蛋白酶切开后可以从多肽释放的发色氨基酸的多肽片段,多肽可以固定化在色谱介质上的标记区域处,片段结合分子固定化在色谱介质上的可视化区域处。

[0041] 方便的是,多肽可以被切开成第一个和第二个片段,第一个片段含有发色氨基酸,其中产品还包含:可以与第二个片段结合的可检测标记物;以及固定化在色谱介质中或其上的第一种和第二种捕获分子,第一种捕获分子能够结合第一个片段,第二种捕获分子能够结合第二个片段或可检测标记物。

[0042] 优选情况下,标记物包含能够结合第二个片段的结合成分。

[0043] 有利情况下,色谱介质包括测试条。

[0044] 或者,色谱介质包括多孔材料柱。

[0045] 根据本发明的另一个方面,提供了合成的多肽,含有大量原料氨基酸和至少一个与天然氨基酸等排性匹配的发色氨基酸。

[0046] 根据本发明的另一个方面,提供了本发明的合成多肽在检测样品中的蛋白酶中的应用。

[0047] 将发色部分包埋在肽序列中,降低了疏水性对合成和使用的影响。因为本发明的发色团位于肽序列中,因此肽的C和N末端是游离的,可用于本技术领域的人员熟知的标准偶联化学。

[0048] 本说明书中的“发色氨基酸”是指能够改变颜色的氨基酸分子(含有氨基和羧基)。更具体来说,当它在肽底物中位于蛋白酶切割位点的P1'位置,经蛋白水解作用释放并随后通过共价化学与第二种分子发生反应时,它可以形成可以在400到900nm之间检测的有色加成物。

[0049] 本说明书中的“靶蛋白酶”被定义为识别并切开发色多肽上的靶区域的蛋白酶,其中靶区域在切割位点的P1'位置上包含发色氨基酸。

[0050] “天然氨基酸”是指任何一种下述氨基酸:丙氨酸,精氨酸,天冬酰胺,天冬氨酸,半胱氨酸,谷氨酰胺,谷氨酸,甘氨酸,组氨酸,异亮氨酸,亮氨酸,赖氨酸,甲硫氨酸,苯丙氨酸,脯氨酸,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸,色氨酸和缬氨酸。

[0051] 本说明书中的“侧翼”氨基酸是连接到至少一个其他氨基酸上的氨基酸,其中该连接通过一个氨基酸的氨基末端与另一个氨基酸的羧基之间的肽键进行。

[0052] 本说明书中的“等排性”匹配与天然氨基酸和相应的发色氨基酸相关。它意味着匹配的取代的发色氨基酸与它所代替的天然氨基酸具有相似的空间占有率。如果对含有天然氨基酸的肽序列特异的蛋白酶也能够切开其中天然氨基酸被发色氨基酸取代的多肽,那么发色氨基酸可以被视为与天然氨基酸等排性匹配。

[0053] 图1显示了本发明的多肽与蛋白酶的反应。为了简化,序列Ala-[pABA]-Gly被用作与胰弹性蛋白酶起反应的例子,其中pABA代替了丙氨酸。

[0054] 图2显示了用于本发明的实施方案的发色氨基酸的选择。

[0055] 图3显示了根据本发明的一个实施方案,用于检测蛋白酶的产品透视图。

[0056] 图4显示了根据本发明的另一个实施方案,用于检测蛋白酶的产品横截面图。

[0057] 图5显示了根据本发明的另一个实施方案,用于检测蛋白酶的产品顶视图。

[0058] 图6是流程图,显示了根据本发明的另一个实施方案合成多肽的方法。序列Val-Arg-[p-ABA]-Gly被用作在固相(用圆圈描绘的树脂)上合成的例子。分子合成中的关键反应是步骤iii)。利用标准的肽化学,使用输入氨基酸的活化的酯,不容易实现该反应。但是,使用输入氨基酸的酰基氯化物,显著改进了反应化学。

[0059] 图 7(A) 显示了根据本发明的一个实施方案使用用于检测蛋白酶的产品和获得的阳性发色反应(阳性蛋白酶样品)的结果的图片。(B)是在图 3 描述的风格装置中,使用阳性[上方线]和阴性[下方线]样品时从电子读数器获得的数据的图形表示。(C)是与可商购发色底物苯甲酰基-精氨酸-萘胺(BANA)相比,同样的阳性蛋白酶样品的图形表示。在相同条件下,与 BANA 相比,发色底物显示出增加的酶转换和颜色产生。

[0060] 图 8A 显示了平板分析测定结果,比较了作为弹性蛋白酶底物的 AAPV-[pABA]-GGC 和 AAPV-[ANA]-GGC。图 8B 显示了纵向流分析测定的结果,比较了作为弹性蛋白酶底物的 AAPV-[pABA]-GGC 和 AAPV-[ANA]-GGC。

[0061] 图 9 显示了发色氨基酸 ANA(2-氨基萘甲酸)和 pABA(对氨基苯甲酸)的结构比较。

[0062] 图 10A 显示了 AAPV-[pABA]-GGC 的电子溅射质谱图;预计质量是 692.78,测量到的质量是 692.2。图 10B 显示了 AAPC-[ANA]-GGC 的电子溅射质谱图;预计质量是 742.84,测量到的质量是 742.4。

[0063] 图 11 显示了 Fmoc-Val-pABA-OH 的 ^1H NMR 谱图。

[0064] 图 12 显示了使用 Fmoc-Val-pABA-GGC 合成的 AAPV-[pABA]-GGC 的电子溅射质谱图;预计质量是 692.78,测量到的质量是 692.3。

[0065] 在本发明的第一个实施方案中,提供了检测样品中的蛋白酶例如木瓜蛋白酶或胰蛋白酶的方法。方法包括提供接受器,其中放置有可切开的多肽的溶液。可切开的多肽从 N-端到 C-端包含序列丙氨酸-[对氨基苯甲酰基]-甘氨酸。也就是说,多肽包含在其 N 和 C 端侧翼带有两个其他氨基酸(丙氨酸和甘氨酸)的发色氨基酸(对氨基苯甲酸)。例如这种包含对氨基苯甲酸的多肽,在被切开并与第二种试剂反应之前,是无色的。在本实施方案中使用的第二种试剂是共轭醛二甲基-氨基-肉桂醛(DMAC)。

[0066] 将样品放置在小管中,与多肽混合足够长的时间,以便靶酶切开肽底物,典型情况下少于 10 分钟。在本实施例中,由于所选的氨基酸序列,蛋白酶在不到 3 分钟内快速切开了多肽序列。结果,蛋白酶在丙氨酸残基的 $-\text{CO}-$ 部分与对氨基苯甲酸残基的 $-\text{NH}-$ 基团之间的肽键处切开多肽,如图 1 中所示。该切割导致释放了两个分子;第一个分子是游离的丙氨酸残基,第二个分子包含与甘氨酸残基相连的对氨基苯甲酸残基。第二个分子是发色中间体。

[0067] 在方法的下一个步骤中,向小管中加入 DMAC 并混合。如图 1 中所示,DMAC 与发色中间体在酸性条件下反应,形成了有色的加成物。跟具体来说,在阳性蛋白酶样品中,新产生的发色中间体与 DMAC 反应,产生了红色。相反,在阴性蛋白酶样品中,底物保持完整,屏蔽了 pABA 基团,使它不与输入的 DMAC 反应。DMAC 分子本身在微酸性条件下是黄色化合物,在不暴露 pABA 的情况下产生黄色。

[0068] 因此,本发明的本实施方案的方法,导致对样品中蛋白酶的存在(红色)或不存在(黄色)作出响应而产生颜色。

[0069] 根据图 1 中示例的实施方案,多肽中发色氨基酸的氨基一侧上的肽键被靶蛋白酶水解,因此暴露出发色氨基酸的胺基。在本实施方案中,共轭醛是 DMAC,但是在其他实施方案中可以使用可选的醛,例如取代的苯甲醛和肉桂醛,例如二甲基-氨基-苯甲醛(DMAB)。

[0070] 以下,将描述符合本发明的实施方案的多肽的合成。发色多肽通过常规的 Fmoc

化学在本技术领域的专业人员熟悉的固相上合成。在某些实施方案中,每个氨基酸连接通过使用输入氨基酸的活化的酯来实现。在其他实施方案中,使用酰基氯化物将输入氨基酸连接到发色残基上。通过在肽合成之前合成含有 P1 氨基酸和发色团 (P1') 的构件 (building block),并将整个构件作为单个部分导入,可以获得效率的提高。这种构件的例子是 Fmoc-丙氨酰-对氨基苯甲酸,可以以与氨基酸同样的方式添加到新生多肽上。多肽的长度典型地在 2 到 100 个残基的范围内。使用这种方法可以容易地合成不同长度的发色多肽,这种制造方法的自动化也容易实现。这对于大规模生产用于商业化应用来说是有利的。此外,本发明的发色多肽没有已知的致癌性质,因此在大规模制造中不存在安全性问题。

[0071] 在第一个实施方案中,多肽包含发色氨基酸对氨基苯甲酸。但是,在可选实施方案中,使用了不同的发色氨基酸,例如在图 2 中显示的之一。这些发色氨基酸含有芳族部分 (例如苯基或萘基) 或其他杂环类似物,并且芳香环部分接近发色氨基酸的氨基 (即它是苯胺)。但是,应该理解,在本发明的其他实施方案中,提供了不含芳香环部分的发色酸。重要的是,发色氨基酸的胺基具有明显低于 (例如小于 5) 多肽中存在的任何其他氨基酸 (氨基末端或侧链) 的 pKa。通过这种方式,在低 pH 条件下,发色胺至少部分去质子化,而结构中存在的其他胺事实上是完全质子化的。这使得与共轭醛的反应主要发生在发色氨基酸上。当然,对于发色酸来说,还必需使空间位阻不会阻止与共轭醛的相互作用。

[0072] 理想情况下,在多肽中使用的发色氨基酸与天然氨基酸等排性匹配,以便尽可能接近地模拟靶蛋白酶的底物结构。因此,合成了具有个体靶蛋白酶特异性靶区域的发色多肽。发色氨基酸可以位于多肽中的任何位置,前提是它不位于氨基酸的 C-末端。

[0073] 在某些实施方案中,本发明的多肽被掺入到用于检测样品中的蛋白酶的产品中,该产品采用小册子 (booklet) 的形式。适合的这种小册子公开在 PCT 申请 No. PCT/GB2007/000643 中,该申请在此引为参考。参考图 3,现在将描述符合本实施方案的小册子 1。小册子包含平面基材例如纸板的第一和第二个片层 2、3,通过铰链 4 相连。在第一个片层中央,在吸附性衬垫 5 的顶部提供了薄的反应薄膜 25。反应薄膜 25 浸有发色多肽并可以由 PVA 制成。在第二个片层 3 的中央,提供了孔隙 6,它与反应薄膜 25 和吸附性衬垫 5 对齐。孔隙 6 被可视化薄膜 7 覆盖,使得当第一和第二个片层 2、3 彼此压在一起时可视化薄膜 7 位于孔隙 6 与反应薄膜 25 之间。可视化薄膜浸有 DMAC 和 HCl。可选地,反应薄膜 25 和吸附性衬垫 5 在使用前用可移除薄膜 (未显示) 覆盖,以便反应薄膜 25 和吸附性衬垫 5 保持密封与环境隔离。

[0074] 在使用中,揭去覆盖反应薄膜 25 和吸附性衬垫 5 的任何可移除薄膜,将怀疑含有蛋白酶的样品沉积在反应薄膜 25 上并吸入吸附性衬垫 5。如果样品中存在蛋白酶,那么蛋白酶切开发色多肽,释放出发色中间体,正如在第一个实施方案中已描述的。然后将小册子 1 的第一和第二个片层 2、3 压到一起,使得反应薄膜 25 上的成分与可视化薄膜 7、更具体来说 DMAC 相接触。

[0075] 因此,某些发色中间体从反应薄膜 25 和吸附性衬垫 5 传递到可视化薄膜 7,在那里它与 DMAC 反应形成了有色加成物。正如前面描述的,有色加成物颜色为红色,小册子 1 的用户可以通过孔隙 6 观察到它。

[0076] 或者,如果样品不含能够切开发色多肽的蛋白酶,那么不形成发色中间体,发色多肽保持黄色的颜色。因此,可视化薄膜也保持其颜色或变成黄色。

[0077] 在本实施方案的变体中,提供了膜,它覆盖住可视化薄膜,不允许高于某个阈值尺寸的物质通过它。阈值的选择使得样品中任何天然具有颜色的物质太大而不能通过膜,而发色中间体小得足以通过膜,因此可以与与可视化薄膜、更具体来说是其上的 DMAC 相接触。

[0078] 现在参考图 4,将描述本发明的另一个实施方案。在本实施方案中,本发明的多肽被掺入到用于检测蛋白酶的产品中,该产品采用纵向流生化测定的形式。检测装置 8 包含接受器 9,它具有上层部分 10,在其顶端具有开口 11,在其底部具有漏斗 12,连接到颈部 13 上。颈部 13 由透明材料例如有机玻璃 (perspex) 或玻璃制成,通往倒置的漏斗 14,漏斗 14 反过来位于下层部分 15 的顶部。颈部 13 围住了基质 16,基质 16 中固定化有大量本发明的发色多肽。例如,在某些实施方案中,基质 16 含有大量颗粒,发色多肽在其 C- 末端处或附近使用酰胺键或通过巯基相互作用(形成硫醚)共价键合到颗粒上。在这种情况下,“附近”意味着 C- 末端的 10 或 20 个氨基酸残基之内。

[0079] 在使用中,通过接受器 9 的上层部分 10 的开口端 11 加入怀疑含有蛋白酶的样品,使得它流入漏斗 12,并缓慢释放到基质 16 中。样品通过重力和毛细作用以恒定速率通过基质 16。样品中的蛋白酶在发色氨基酸的 $-NH-$ 部分与在 N- 端方向上紧邻的氨基酸的 $-CO-$ 部分之间的肽键处,切开基质 16 中的发色多肽。因此,释放出发色多肽的 N- 端片段,而发色中间体保持固定化在基质 16 中。任选地,使用缓冲液将样品洗过,以便确保所有 N- 端片段都被洗过基质 16,进入接受器 9 中的下层部分 15 中。

[0080] 然后,将装有包含 DMAC 的缓冲液的容器(未显示)放置在接受器 9 的上层部分 10 的开口端 11 上,并将其下端刺穿,以便将缓冲液释放到接受器 9 的漏斗 12 中。含有 DMAC 的缓冲液流过基质 16,在那里它与发色中间体相接触,与其反应形成有色加成物。任何过量的 DMAC 流过基质 16,进入接受器 9 的下层部分 15。正如前面已经解释的,有色加成物颜色为红色,因此样品中存在蛋白酶将导致基质 16 变红。这可以通过颈部 13 观察到。

[0081] 或者,如果样品不含能够在靶序列处切开发色肽的蛋白酶,那么基质 16 中的发色肽保持未切开,因而没有发色中间体用于与 DMAC 反应。DMAC 颜色为黄色,有一部分通过非特异性吸附保留在基质 16 中。因此对蛋白酶阴性样品作出反应,基质 16 颜色变为黄色。

[0082] 已经发现,在发色多肽合成过程中,天然氨基酸与发色氨基酸的 $-NH_2-$ 部分的酰胺连接反应是合成的相对低效的部分。因此,合成反应经常产生一部分不完整的多肽,其中没有氨基酸连接到发色氨基酸的 N- 端。如果这种不完整多肽的比例明显,那么可能导致假阳性结果,因为不完整多肽具有与发色中间体相同的结构,并与完整的多肽一起结合到基质 16 上。因此,不完整多肽将与 DMAC 反应,即使在样品中不存在蛋白酶的情况下也产生颜色变化。因此,在某些可选实施方案中,发色多肽通过它们的 N- 末端固定化(即共价键合)到基质 16 上。通过这种方式,任何不完整多肽将不与基质结合,因为它们缺少用于连接到基质 16 上的 N- 末端氨基酸。在这样的实施方案中,当施加含有活性蛋白酶的样品时,发色中间体从基质 16 上释放,并在基质 16 下方提供吸附性集液器(例如棉塞),以便捕获释放的发色中间体,并显示颜色变化。

[0083] 在本发明的另一个实施方案中,发色多肽在两个末端各包含第一和第二个结合部分。这种多肽的合成例子提供在实施例 2 中。在该具体实施方案中,生物素连接到多肽的 C- 末端,荧光素连接到 N- 末端上。发色多肽用于包含侧向流的双功能配体捕获蛋白酶

检测分析中。侧向流分析测定的进一步详细情况,提供在 PCT 申请 No. PCT/GB2007/000637 和 GB0716492.4 中,这些申请在此引为参考。参考图 5,侧向流装置 17 包含硝酸纤维素条 18,它具有上游末端 22 和下游末端 23。靠近上游末端 22 置有由吸附性材料制成的样品接受区 19。进一步朝向下游末端 23 有第一个可视化区 20。再进一步朝向下游末端 23 是第二个可视化区 21。第一个可视化区 20 包含大量固定化在条 18 表面上的多肽结合分子。每个多肽结合分子能够结合到发色多肽的 C-末端上。因此,在该具体实施方案中,第一种结合分子是链亲和素,可以与多肽 C-末端上的生物素结合。第二个可视化区 21 包含大量固定化在条 18 表面上的抗小鼠抗体。

[0084] 在使用时,将怀疑含有蛋白酶的样品与上面描述的大量发色多肽混合。允许蛋白酶切开多肽,释放出对应于多肽的 C-末端的发色中间体,以及对应于多肽的 N-末端的片段。然后向混合物加入与连接到 N-末端片段上的荧光素基团结合的小鼠抗 FITC-金抗体。将样品混合物放置在样品接受区 19 上。然后样品混合物由于毛细作用沿着硝酸纤维素条 18 的长度吸附,以箭头 24 的方向朝向下游末端 23。因此,它通过第一个可视化区 20,然后通过第二个可视化区 21。

[0085] 当样品混合物通过第一个可视化区 20 时,生物素标签与链亲和素结合,将发色中间体固定化在第一个可视化区 20 上。发色中间体保持与第一个可视化区结合,而 N-末端片段进一步沿着硝酸纤维素条 20 吸附到第二个可视化区 21。抗小鼠抗体与小鼠抗 FITC-金抗体结合,从而将 N-末端片段固定化在第二个可视化区 21 处。

[0086] 然后,将 DMAC 添加到样品接受区 19,它沿着条以箭头 24 的方向吸附。当 DMAC 到达第一个可视化区时,它与固定化的发色中间体反应,形成了红色加成物。此外,与抗 FITC 抗体结合的金颗粒,由于它们在硝酸纤维素条 18 上的第二个检测区 21 处形成可见的线,可以被观察到。

[0087] 或者,如果样品中不存在蛋白酶,那么当整个多肽沿着硝酸纤维素条 18 吸附时,它被固定化在第一个检测区处。随后,当 DMAC 被加入到样品接受区 19 时,它沿着硝酸纤维素条 18 吸附,但是因为发色氨基酸没有暴露在多肽上,DMAC 没有反应地通过第一个检测区。因此,在第一个检测区 20 处没有颜色形成(除了任何残留的 DMAC 之外,它的颜色是黄色),此外,金颗粒浓缩在第一个检测区 20 处。因此,通过第一个检测区 20 处出现由金颗粒形成的可见的线而不是红色,并且在第二个检测区 21 不出现可见的线,可以表明样品中不存在有功能的蛋白酶。

[0088] 因此,本实施方案能够进行两波反应性检测,一次使用 DMAC,另一次使用金颗粒检测。

实施例

[0089] 实施例 1-Val-Arg-[pABA]-Gly 的合成

[0090] 参考图 6,现在将描述 Val-Arg-[pABA]-Gly 的合成。

[0091] 肽合成在固相上(Wang Resin Merck Biosciences)使用 Fmoc 化学方法进行(《Fmoc 固相合成实用方法》(Fmoc solid phase synthesis-a practical approach.) 2000 Chan, WC 和 White, PD Oxford University Press)。在典型的合成中,将 50mg 树脂(载量 0.91mmol/g)在 20 μ m 过滤柱(Kinesis)中,在二甲基甲酰胺(DMF)(2ml)中溶

胀 1 小时。将树脂用 DMF 进一步清洗 (2x2ml), 在真空下排流至干燥。第一个氨基酸的连接使用溶解在 2ml 无水 DMF 中的 0.23mmol PYBOP (苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷鎓六氟磷酸酯) 和 0.23mmol HOBt (羟基苯并三唑) 和 0.23mmol 保护的甘氨酸残基来进行。向溶液加入 0.46mmol DIPEA (二异丙基乙胺), 然后分配到树脂中。将树脂浆液在室温搅拌 90 分钟, 然后在真空下排液并用 DMF 清洗 (2x2ml)。进行了重复反应, 以确保完全覆盖树脂的反应性位点。在用 DMF (3x2ml)、(二氯甲烷) DCM (3x2ml) 清洗并用 DMF (2ml) 再清洗一次后, 通过加入 20% 哌啶在 DMF 中的溶液 (5ml) 并搅拌 5 分钟, 对树脂进行了 Fmoc 去保护。然后将树脂用 DMF (2x2ml) 清洗, 并将反应重复一次。将树脂在 DMF (3x2ml)、DCM (3x2ml)、然后最后在 DMF (2ml) 中充分清洗。然后对于其余的氨基酸残基重复该反应。为了添加发色基团后的氨基酸, 在如下进行连接之前制备了酰基氯化物。将三光气 (Triphosgene) (0.077mmol) 和 Fmoc 保护的氨基酸 (0.23mmol) 溶解在 1ml 四氢呋喃 (THF) 中。向溶液逐滴加入 0.76mmol 三甲基吡啶, 产生了白色悬液。然后将其加入到树脂中, 在室温下混合 1 小时。将反应混合物排液, 用 THF (2x2ml) 和 DCM (3x2ml) 清洗。重复反应以确保完全, 然后将树脂排液, 并用 THF (2x2ml)、DCM (3x2ml)、然后用 DMF (2ml) 充分清洗。按照上面的描述, 去保护得到促进。

[0092] 从树脂上切下和侧链的去保护, 通过加入 TFA : 水 : 三乙基硅烷 (TES) (95% : 2.5% : 2.5%) 来进行。将浆液剧烈搅拌 90 分钟。为了完成合成, 通过使用 0.1% TFA 水 (2x5ml) 进一步洗涤, 从树脂浆液除去粗品肽混合物。然后将混合物蒸发至干, 通过用溶剂小心地冲洗肽残渣然后倾析, 用无水乙醚 (2x10ml) 进行清洗。将残渣空气干燥 1 小时, 然后溶解在尽可能少量的水 (3-5ml) 中, 通过 0.2 μ m 滤器过滤。将滤液注射到 Phenomenex Jupiter proteo 柱上进行分析, 然后进行制备 HPLC。将纯的级份合并, 蒸发至干, 然后重新溶解在纯水 (0.5-1ml) 中, 在微量离心 (eppendorf) 管中速冻并冷冻干燥, 以获得白色 / 无色的粉末状固体。使用阳离子溅射质谱通过 LC-MS 对肽进行验证。

[0093] 实施例 2- 木瓜蛋白酶的检测

[0094] 在分析测定中使用发色多肽 Val-Arg-[pABA]-Gly 来检测样品溶液中木瓜蛋白酶的存在。将含有蛋白酶木瓜蛋白酶的样品施加到图 3 中描述的实施方案的小册子的第一个片层上 (参见图 8A)。小册子的第一个片层事先已经用发色多肽浸渍过。5 分钟后, 将小册子的第一和第二个片层折叠到一起。小册子的第二个片层事先已用 DMAC 浸渍过, 10 分钟后, DMAC 从黄色变为红色, 正如可以通过小册子的第二个片层上的孔隙观察到的。作为对照, 也使用水代替样品重复了分析测定, 颜色变化的结果显示在图 8B 的图中。

[0095] 也在相同的条件下使用 BANA 而不是发色多肽重复了蛋白酶分析测定。对于分析测定过程中检测到的颜色变化速率进行了比较, 结果用图形显示在图 8C 中。Val-Arg-[pABA]-Gly 与 BANA (苯甲酰基精氨酸胺) 相比, 显示出引发了更快的可检测的颜色变化, 这对于原位检测装置来说是有利的。

[0096] 实施例 3A- 用于检测弹性蛋白酶存在的适合的发色底物的确定

[0097] 合成了两种肽 AAPV-[pABA]-GGC 和 AAPV-[ANA]-GGC, 其中 pABA 是对氨基苯甲酸, ANA 是 2-氨基萘甲酸。测试了两种肽作为嗜中性弹性蛋白酶的底物的适合性。AAPV-[pABA]-GGC 和 AAPV-[ANA]-GGC 的电子溅射质谱图分别显示在图 10A 和 10B 中。

[0098] 在独立的板孔中, 向 0.5mg/ml 肽 (5 μ l) 添加不同浓度的弹性蛋白酶 (18、9、6 和 3

单位 /ml 的稀释液, 5 μ l)。将混合物用 20 μ l 缓冲液 (50mM 磷酸盐, 5mM EDTA ;pH 7.4) 稀释, 在 37°C 温育 30 分钟。向每个板孔加入 15 μ l DMAC 工作溶液 (0.3mg/ml DMAC, 50mM HCl), 充分混合, 以进行可视化。

[0099] 本实验的结果显示在图 8A 中。

[0100] 当孔中弹性蛋白酶终浓度为 3、1.5 或 1 单位 /ml 时, 使用 AAPV-[pABA]-GGC 的分析测定给出了弹性蛋白酶活性的阳性结果 (即孔变为红色 / 橙色 (Pantone™ 136U))。这种颜色变化表明存在弹性蛋白酶。含有 0.5 单位 /ml 弹性蛋白酶的孔当与 AAPV-[pABA]-GGC (Pantone™ 108U) 混合时, 给出了弱阳性结果。对照孔给出阴性结果。

[0101] 相反, 含有 AAPV-[ANA]-GGC 的孔都没有明显改变颜色, 它们保持黄色 (Pantone™ 394U)。因此, 尽管孔中存在弹性蛋白酶, 但弹性蛋白酶活性没能检测到。

[0102] 实施例 3B :

[0103] 使用了另一种格式来测试嗜中性弹性蛋白酶在存在两种肽 AAPV-[pABA]-GGC 和 AAPV-[ANA]-GGC 的情况下的活性。肽的 C- 末端半胱氨酸基团被用作与固相结合的手段。将用碘乙酰基团功能化的烧结聚乙烯玻璃料在 50mM 磷酸钠, 5mM EDTA, pH 7.4 溶液中清洗 10 分钟。然后将玻璃料转移到 0.5mg/ml 肽溶液 (在 PBS) 中敏化 30 分钟。然后将玻璃料再一次在磷酸盐 EDTA 缓冲液中清洗 10 分钟。将玻璃料装在空柱中, 加入 200 μ l 弹性蛋白酶, 流动接触时间大约 30 秒。为了使测定显色, 将 100 μ l DMAC 工作溶液 (0.3mg/ml DMAC, 50mM HCl) 通过柱子。

[0104] 该分析测定的结果显示在图 8B 中。含有 AAPV-[pABA]-GGC 和弹性蛋白酶的测定柱给出了阳性结果 (Pantone™ 参比值 1505U*), 含有 AAPV-[pABA]-GGC 但不含弹性蛋白酶的柱给出了阴性结果 (Pantone™ 参比值 3945U*)。含有 AAPV-[ANA]-GGC 的柱子, 一种具有存在的弹性蛋白酶, 另一种不含, 都给出了阴性结果 (Pantone™ 参比值 3945U*)。

[0105] 实施例 3A 和 3B 的结论

[0106] 根据在它们存在时检测到的弹性蛋白酶活性, 在两种肽之间观察到了明显的差异。弹性蛋白酶底物优选在 P1' 位置具有丝氨酸、苏氨酸 (二者都具有亲水侧链) 或甘氨酸 (来源 :MEROPS 数据库)。因此, 具有大的疏水表面的大体积发色氨基酸不可能与这些优选氨基酸空间匹配合适。苯甲酸 (ANA) 比对氨基苯甲酸 (pABA) 体积更大并且更加疏水, 因此 AAPV-[ANA]-GGC 不是良好的弹性蛋白酶底物。这两种分子的结构都显示在图 9 中。pABA 发色氨基酸与丝氨酸和苏氨酸的空间匹配好得多, 因此 AAPV-[pABA]-GGC 明显更适合作为弹性蛋白酶的底物, 在底物与酶混合时产生弹性蛋白酶活性。因此, AAPV-[pABA]-GGC 可用于检测弹性蛋白酶的存在。

[0107] 实施例 4 :AAPV-[pABA]-GGC 的合成

[0108] 制造了一种新类型的构件, 它们被开发用于改进含有发色氨基酸的肽的合成, 其中所述构件的合成与自动化合成相容。用于合成这种构件的方法不需要使用在实施例 1 中描述的 BTC/ 三甲基吡啶 (collidine) 步骤。BTC/ 三甲基吡啶步骤是有效的, 但是需要严苛的条件, 并产生不溶性沉淀, 使得它不适合与自动化肽合成组合使用。

[0109] 新类型的构件离线合成, 并掺入 P1 氨基酸和 P1' 发色氨基酸。它可以使用用于序列中所有其他氨基酸的标准条件, 方便地掺入到合成中。避免了困难的连接步骤中不想要的副反应, 导致了快速、整洁的步骤。

[0110] 将 Fmoc-Val-OH (10mmol) 和叔丁基 pABA (10mmol) 溶解在无水吡啶中 (30ml)。将溶液在乙二醇 / 干冰浴中冷却到 -15℃, 逐滴加入三氯氧磷 (1ml, 11mmol), 同时剧烈搅拌。30 分钟后将反应用 TLC 终止。加入碎冰 (100ml), 将水性混合物用乙酸乙酯 (3x50ml) 抽提。然后将该有机提取物用饱和 NaHCO₃ (3x50ml) 和盐水 (3x50ml) 洗涤。然后将有机提取物在无水硫酸钠上干燥。将粗混合物蒸发至干, 然后相继用甲苯、乙酸乙酯和甲醇共蒸发。将产物在硅胶上纯化, 使用 19 : 1 的二氯甲烷 / 甲醇洗脱。纯化的叔丁基酯用 1 : 1 的 TFA / 二氯甲烷去保护 1 小时并蒸发, 以获得浅黄色固体。将该化合物代替单独的 pABA 和缬氨酸连接步骤, 直接用于合成 AAPV-[pABA]-GGC, 成功地生产了预计的肽。粗品纯度通过 HPLC 分析典型地为 70%, 与使用原始步骤时观察到的 35% 形成对比。Fmoc-Val-pABA-OH 的 ¹H NMR 波谱显示在图 11 中, 使用 Fmoc-Val-pABA-OH 合成的 AAPV-[pABA]-GGC 的电子溅射质谱图显示在图 12 中。

[0111] 序列表的自由内容

[0112] <210>1

[0113] <223> 发色多肽 Ala-[pABA]-Gly

[0114] <210>2

[0115] <223> 发色多肽 Val-Arg-[pABA]-Gly

[0116] <210>3

[0117] <223> 发色多肽 AAPV-[pABA]-GGC

[0118] <210>4

[0119] <223> 发色多肽 AAPV-[ANA]-GGC

[0120] <210>5

[0121] <223> 发色多肽 Val-[pABA]-GGC

序列表

<110> 莫洛迪克有限公司

<120> 蛋白酶检测

<130> SCT102130-70

<150> GB 0722287.0

<151> 2007-11-13

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Chromogenic polypeptide Ala-[pABA]-Gly

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2).. (2)

<223> Chromogenic amino acid

<400> 1

Ala Xaa Gly

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223>Chromogenic Polypeptide Val-Arg-[pABA]-Gly

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(3)..(3)

<223>Chromogenic amino acid

<400>2

Val Arg Xaa Gly

1

<210>3

<211>8

<212>PRT

<213>Artificial

<220>

<223>Chromogenic Polypeptide AAPV-[pABA]-GGC

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(5)..(5)

<223>Chromogenic amino acid

<400>3

Ala Ala Pro Val Xaa Gly Gly Cys

1

5

<210>4

<211>8

<212>PRT

<213>Artificial

<220>

<223>Chromogenic Polypeptide AAPV-[ANA]-GGC

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(5).. (5)

<223>Chromogenic amino acid

<400>4

Ala Ala Pro Val Xaa Gly Gly Cys

1

5

<210>5

<211>5

<212>PRT

<213>Artificial

<220>

<223>Chromogenic polypeptide Val-[pABA]-GGC

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(2).. (2)

<223>Chromogenic amino acid

<400>5

Val Xaa Gly Gly Cys

1

5

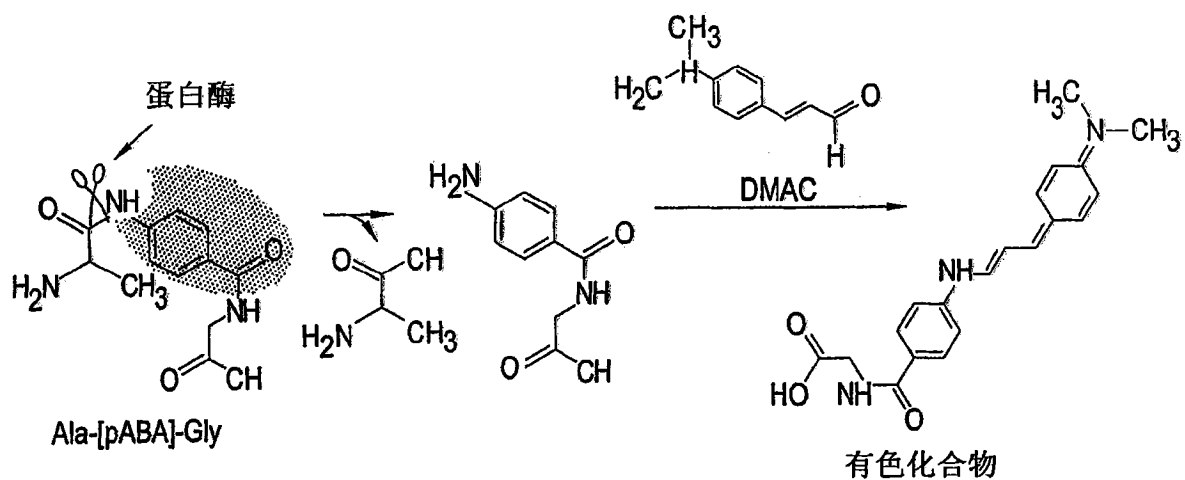


图 1

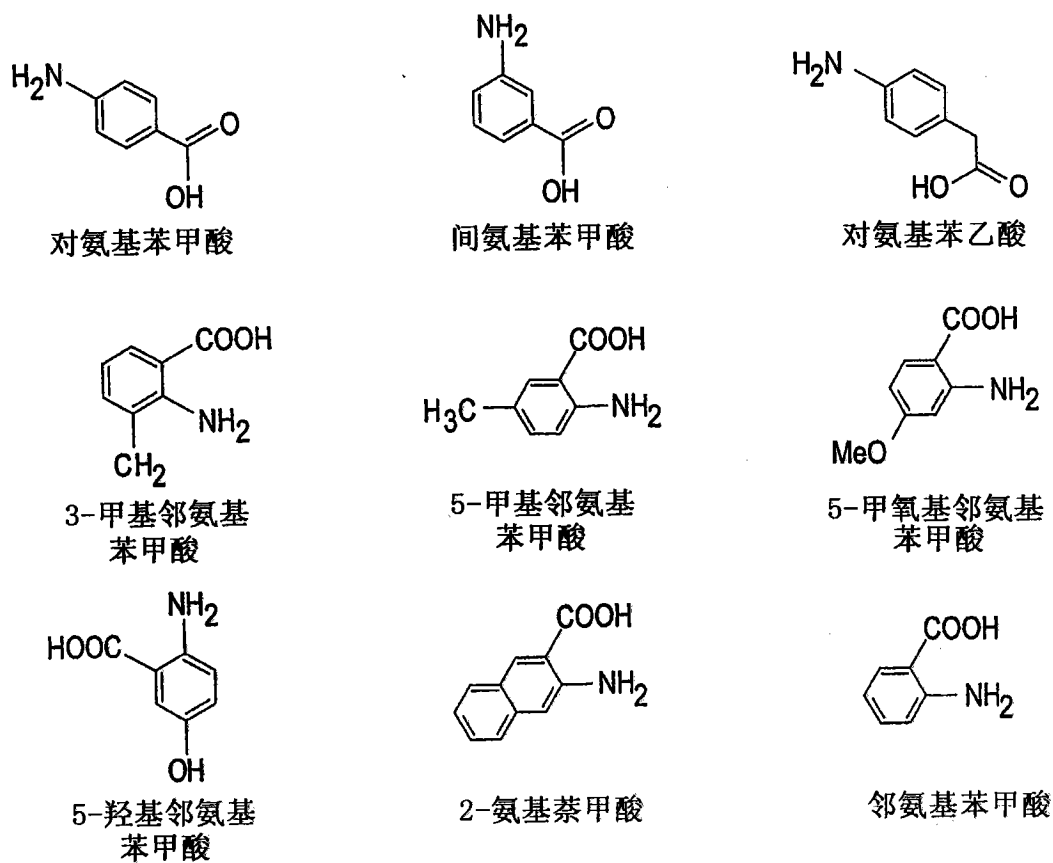


图 2

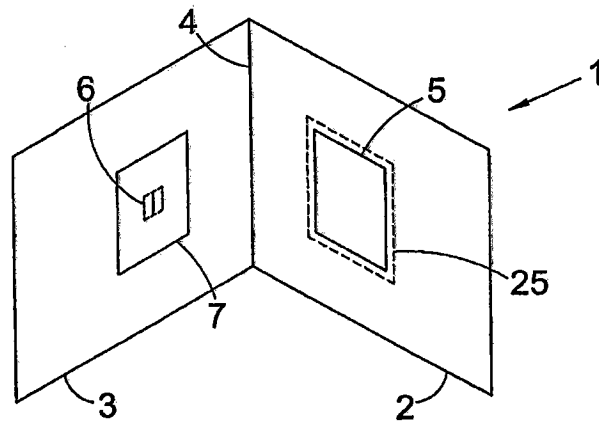


图 3

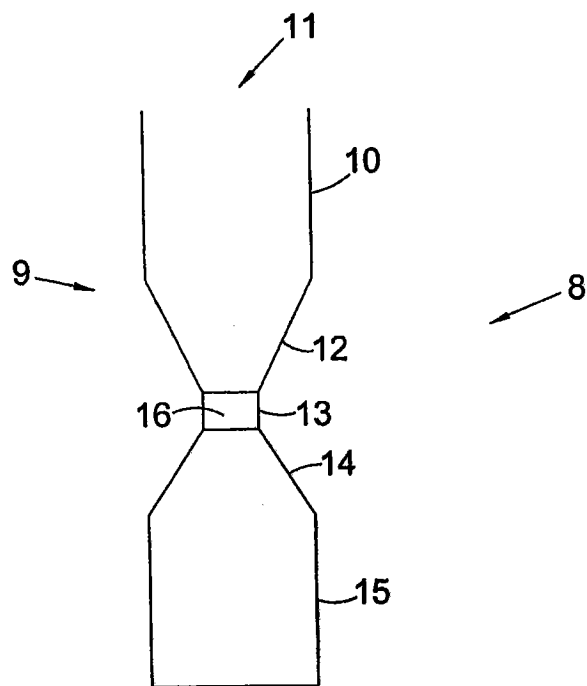


图 4

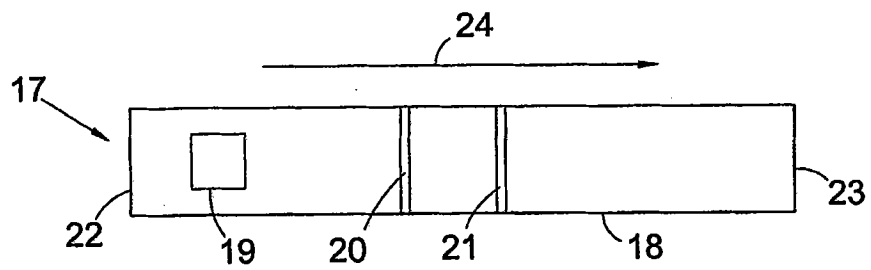


图 5

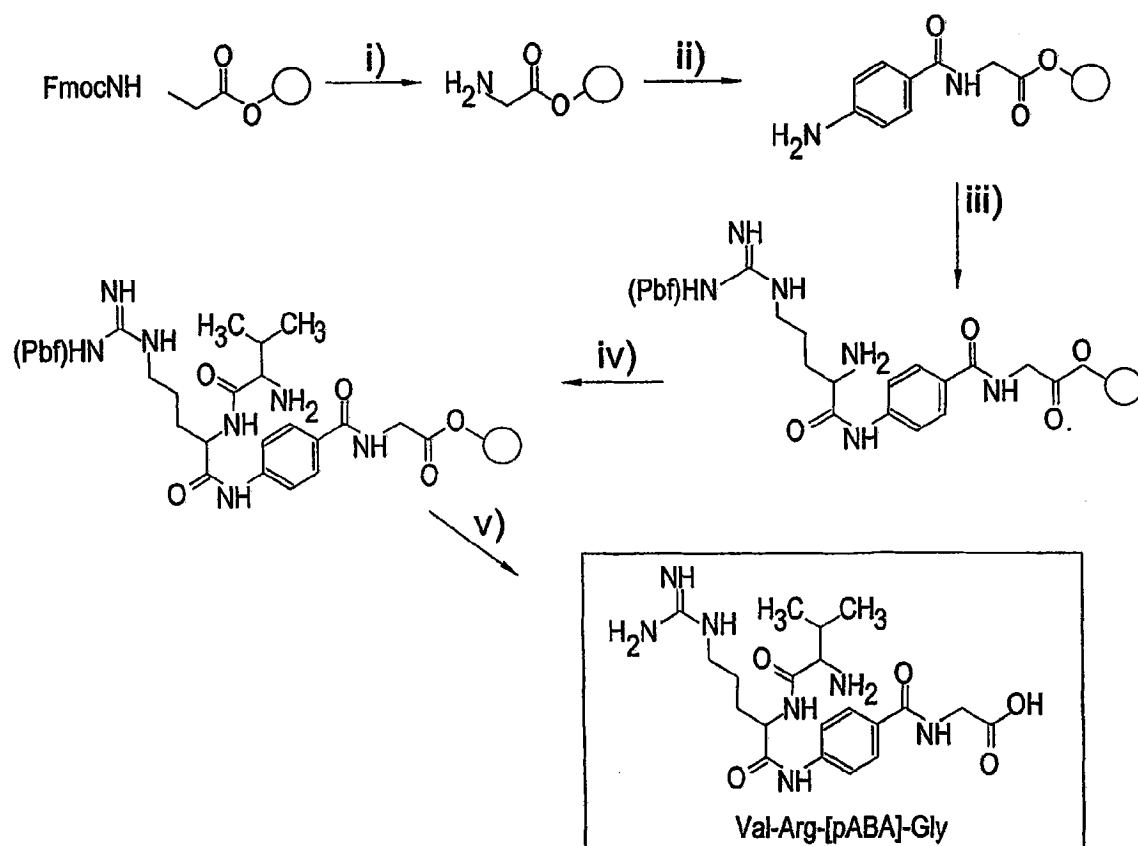


图 6

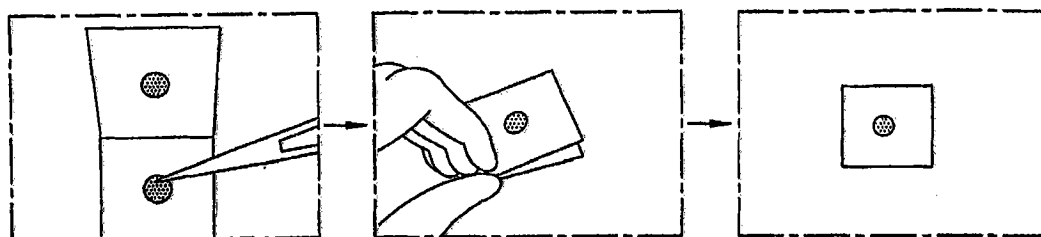


图 7A

发色响应曲线: M0L001

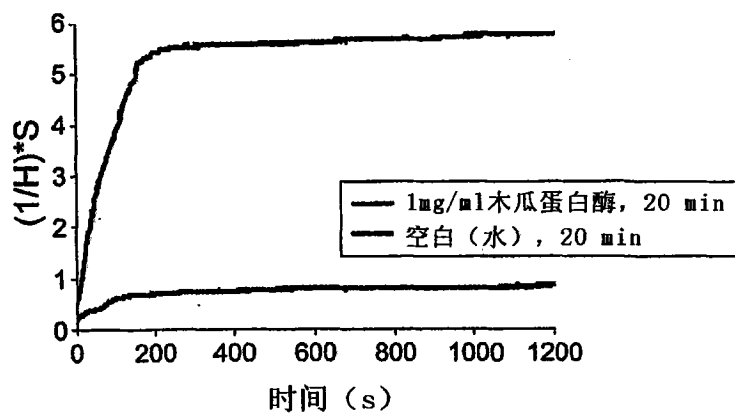


图 7B

发色响应曲线: M0L001

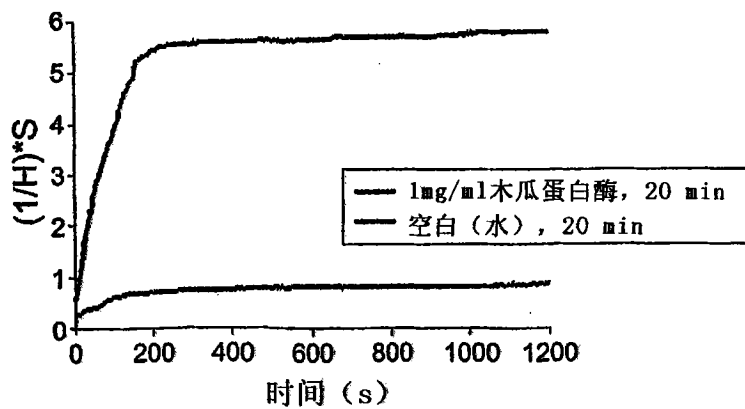


图 7C

AAPV-[pABA]-GGC				AAPV-[ANA]-GGC			
弹性蛋白酶 终浓度 (单位/ml)	含有酶 (两份平行样)		不含酶 (阴性)	含有酶 (两份平行样)		不含酶 (阴性)	
3	+	+	-	-	-	-	
1.5	+	+	-	-	-	-	
1	+	+	-	-	-	-	
0.5	+/-	+/-	-	-	-	-	

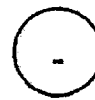
注解:



阳性结果
(潘通参比:
固体未涂层的
136U)



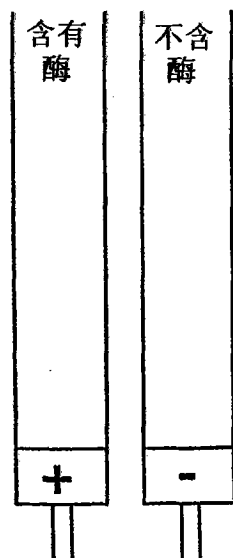
弱阳性结果
(潘通参比:
固体未涂层的
108U)



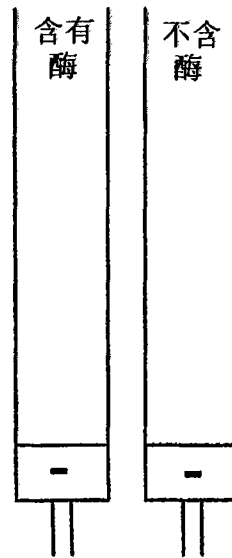
阴性结果
(潘通参比:
固体未涂层的
394U)

图 8A

AAPV-[pABA]-GGC



AAPV-[ANA]-GGC



注解:

+

阳性结果，
潘通参比：
固体未涂层的
1505U

-

阴性结果，
潘通参比：
固体未涂层的
3945U

图 8B

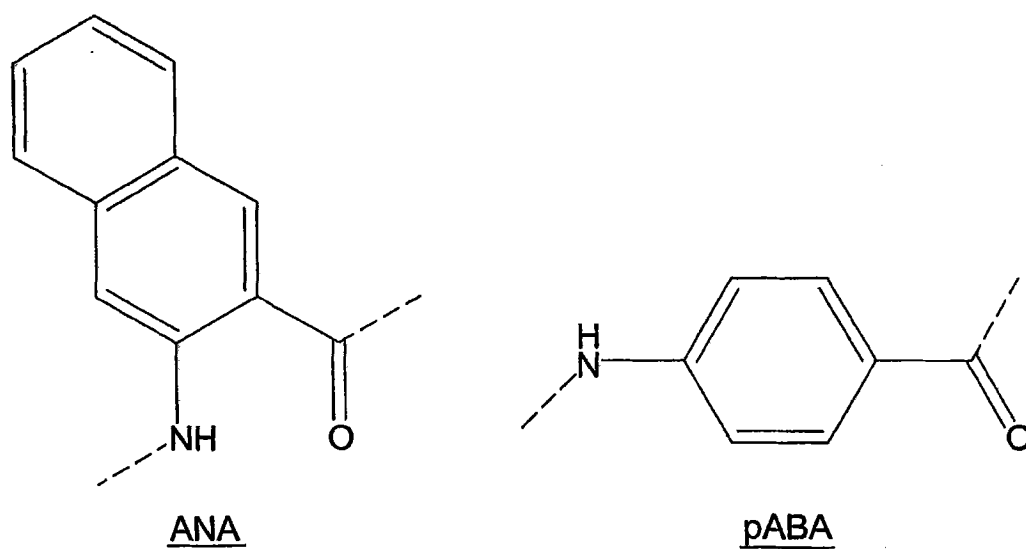


图 9

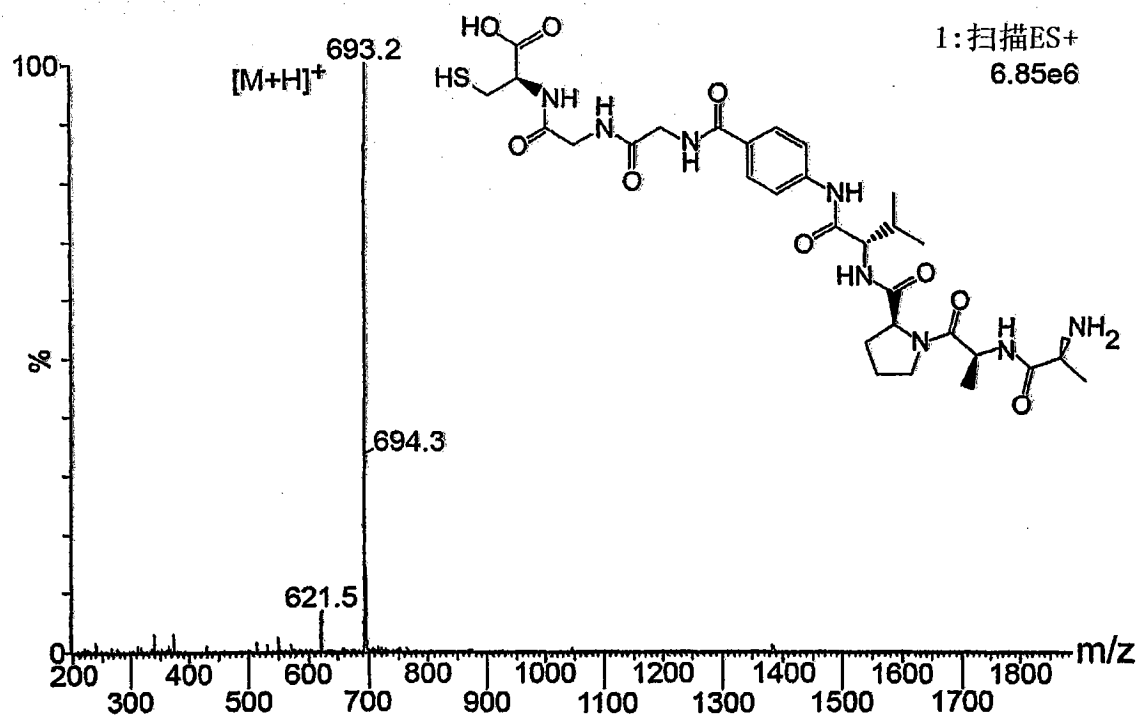


图 10A

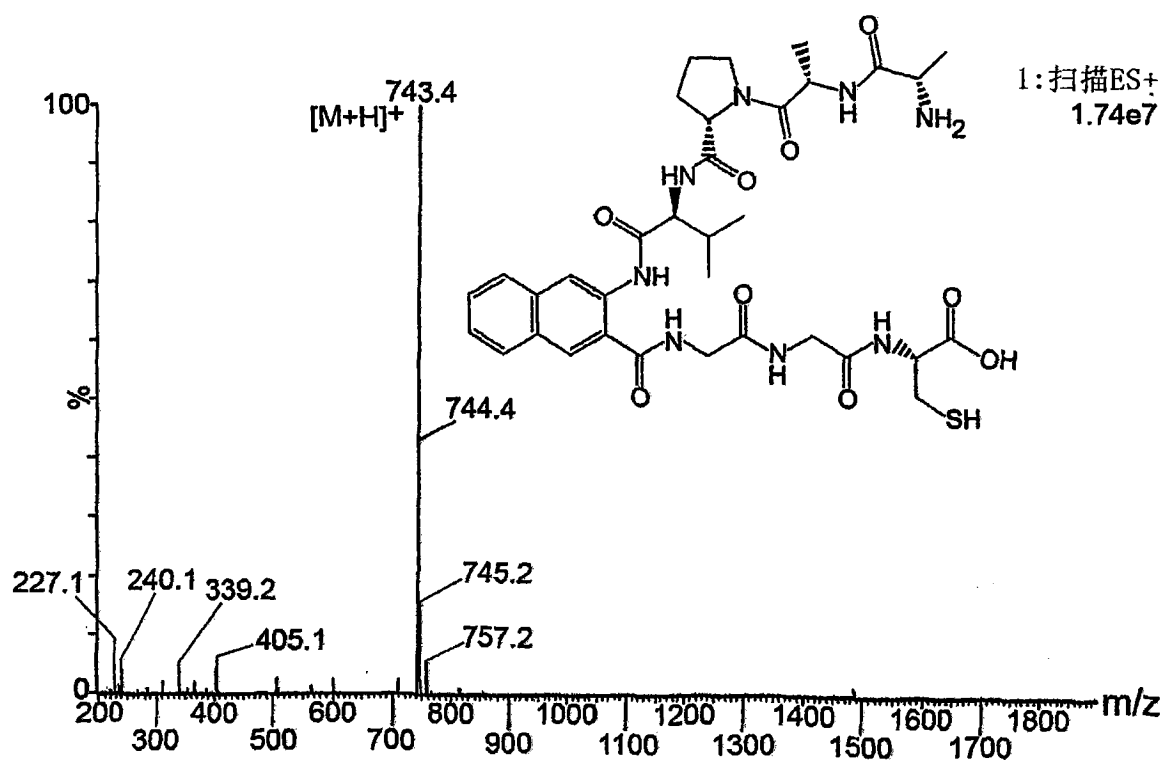


图 10B

在 DMSO 中的 MOL 131a

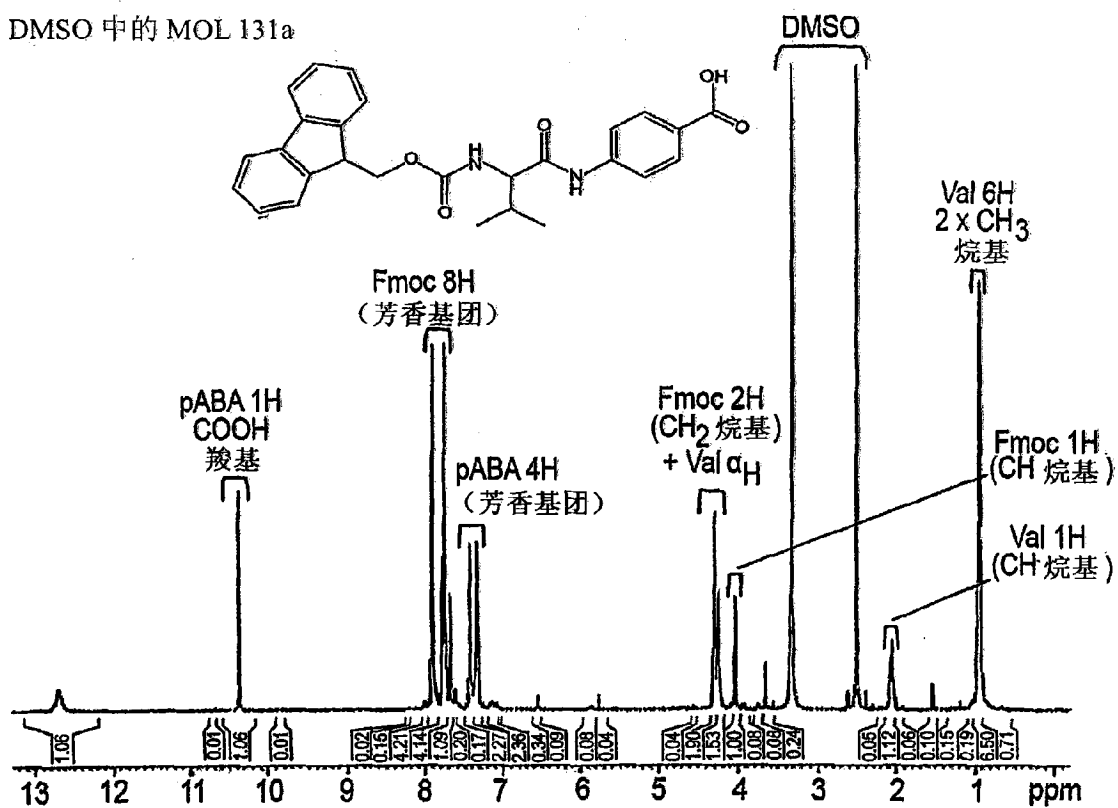


图 11

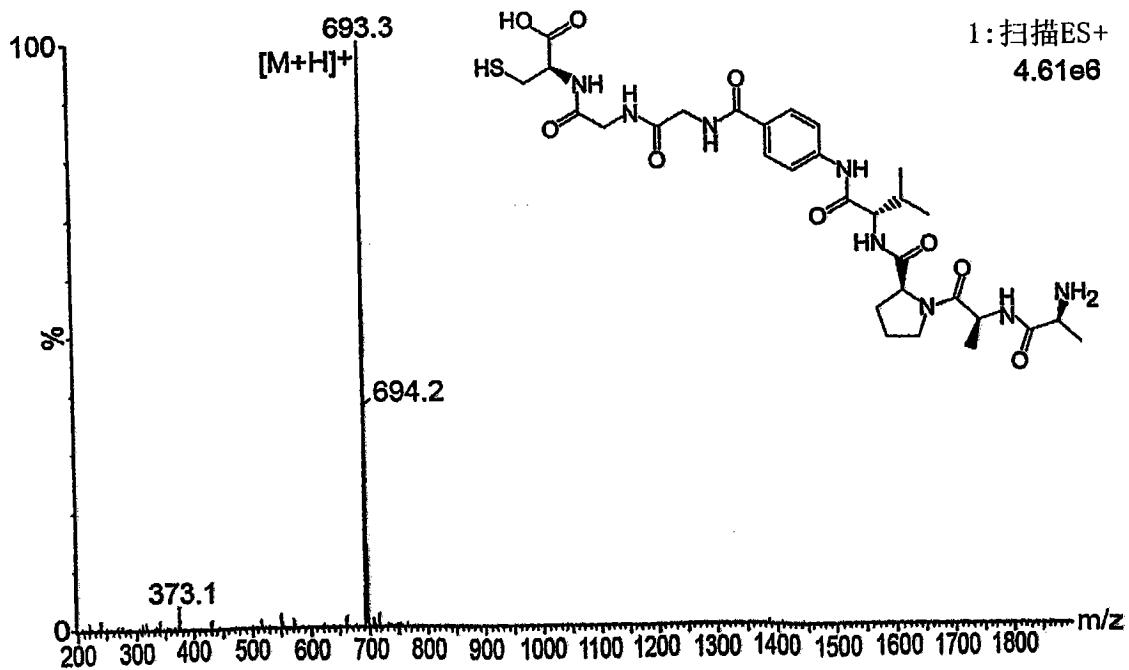


图 12