

(11) Número de Publicação: **PT 1651664 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 1/107 (2007.10) **C07K 19/00** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2004.08.05**

(30) Prioridade(s): **2003.08.05 GB 0318276**
2003.08.28 GB 0320122

(43) Data de publicação do pedido: **2006.05.03**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.04.22**
170/2009

(73) Titular(es):
ALMAC SCIENCES (SCOTLAND) LIMITED
4TH FLOOR SALTIRE COURT 20 CASTLE
TERRACE EDINBURGH EH1 2EN **GB**

(72) Inventor(es):
GRAHAM COTTON **GB**

(74) Mandatário:
MARIA MANUEL RAMOS LUCAS
LARGO DE S. DOMINGOS N° 1 2910-092 SETÚBAL **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE LIGAÇÃO**

(57) Resumo:

Descrição

Método de ligação

Campo da invenção

Esta aplicação relaciona-se com um método de ligação de duas ou mais moléculas, por exemplo, tal como ligações de um péptido sintético com um péptido recombinante.

Antecedentes da invenção

Metodologias de engenharia de proteínas têm provado ser indisponíveis para gerar ferramentas bases de proteínas para aplicação em investigação, diagnósticos, descoberta de medicamentos e proteínas terapêuticas. A habilidade para manipular a estrutura primária de uma proteína de uma forma controlada abre muitas possibilidades nas ciências biológicas e médicas. Como consequência há um esforço em desenvolver metodologias para modificação de local específico de proteínas e sua subsequente aplicação.

As duas principais aproximações para gerar proteínas são através de métodos ou sínteses químicas. Até à data os dois métodos têm provado ser complementares; metodologias recombinantes permitem proteínas de qualquer tamanho serem geradas mas em geral estão restrictos à montagem dos aminoácidos proteinogénicos. Assim, em geral, a introdução de camadas e sondas em proteínas recombinantes tem de ser implementado pós translacionalmente e não permite modificações ao esqueleto da proteína.

Os métodos mais comuns para rotular uma proteína recombinante usa uma amina ou um tiol versão reactiva da

camada que irá reagir covalentemente com a cadeia de lado lisina/ N^{α} grupo amina ou uma cadeia cisteína lateral com a proteína respectivamente. Para tais métodos de rotulagem para serem específicos num sítio, um derivativo da proteína apropriado tem que ser engendrado para conter uma única funcionalidade reactiva na posição a ser modificada. Isto requer que todas as outras funcionalidades naturalmente ocorrentes na sequência primária sejam removidas através de aminoácido mutagénese. No caso de funcionalidades de amina proteína, isto é essencialmente impossível devido à abundância de resíduos de lisina nas proteínas e a presença de funcionalidade amina no N terminal de sequência. Da mesma forma para a cisteína este processo é trabalhoso e é normalmente prejudicial para a função da proteína.

A produção de proteínas tendo modificações em sítio específico e/ou camadas é mais facilmente alcançável usando métodos de síntese químicos. As sínteses químicas de proteínas permitem múltiplas modificações a serem incorporadas em ambos os lados da cadeia e grupos do esqueleto da proteína de uma forma específica, mas, em geral, o tamanho máximo de sequência que pode ser sintetizado e isolado é cerca de 50-10 aminoácidos.

Ligação de proteína

Outra aproximação para a geração de proteínas é ligação de proteína/péptido. Nesta aproximação funcionalidades químicas mutuamente reactivas (ortogonal à química dos aminoácidos naturalmente ocorrentes, por exemplo que reage por químicas mutuas comprado com as reacções dos grupos reactivos dos aminoácidos ocorrentes naturalmente) são incorporadas no N e C terminal de fragmentos de polipeptido desprotegidos tal que quando eles são misturados eles

reagem de uma maneira químico selectiva para juntar as duas sequencias juntas (COTton GJ e Muir TW. Chem.Biol., 1999, 6, Re47-R454). O princípio de ligação química é mostrado esquematicamente na Figura 1.

Um número de químicos têm utilizado para a ligação de dois péptidos sintéticos onde um diverso intervalo de diferentes funcionalidades químicas podem ser incorporadas no terminal de polipeptidos usando sínteses de fases sólidas de péptidos.

Isto inclui a reacção entre um tioácido e bromo-alkil para formar tioéster (Scholzer M e Kent SBH, Science, 1992, 256, 221-225), reacção de um aldeído com uma cisteína N terminal ou teronina para formar tiazolidina ou oxazolidina respectivamente (Liu C-F e Tam J P. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 1994, 91, 6584 - 6588), reacção entre uma hidrazida e um aldeído para formar uma hidrazona (Gaertner HF e outros, Bioconj. Chem., 1992, 3, 262 - 268) reacção de um grupo amino e um aldeído para formar uma oxima (Rose K. J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 30 - 33), reacção de azidas e fosfinos de aril para formar uma ligação amida (Staudinger ligation) (Nilsson BL, Kiessling LL, e Raines RT. Org. Lett., 2001, 3, 9 - 12, Kiick e outros Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 2002, 99, 10 - 24) e a reacção de um péptido C terminal tioéster e um peptido N terminal cisteína para formar uma ligação amida nativa (Dawson e outros, Science, 1994, 266, 776) (Native chemical ligation US6184344, EP 0832096 B1). Este método de ligação química nativa é uma extensão de estudos por Wieland e co trabalhadores que mostraram que a reacção de ValSPH e CysOH é tampão aquoso rende o dipeptido ValCysOH (Wieland T e outros, Liebig's Ann. Chem., 1953, 583, 129-149).

Contudo o método de ligação nativa tornou-se popular, ele requer cisteína contendo péptido para a reacção e assim, se uma cisteína não estiver presente na posição apropriada na proteína, uma cisteína precisa ser incorporada no sitio e ligação. Contudo a introdução de grupos tiol extra na sequência da proteína pode ser prejudicial para a sua estrutura/função, especialmente uma vez que a cisteína tem uma propensão para formar ligações dissulfureto o que pode comprometer a função da proteína.

Como uma consequência das dificuldades e problemas associados com técnicas conhecidas para ligação, a ligação de dois fragmentos sintéticos geralmente apenas incorpora proteínas de cerca de 100 - 150 aminoácidos a serem quimicamente sintetizadas.

Contudo maiores proteínas têm sido sintetizadas por ligação de mais que dois fragmentos, isto provou-se ser tecnicamente difícil (Camarero e outros *J. Pept. Res.*, 1998, 54, 303-316, Canne Le e outros, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 8720 - 8727).

Semi-síntese de proteína

Tecnologias de ligação que permitem ambas proteínas sintéticas e fragmentos de proteínas derivadas recombinadas serem juntas foram descritos. Isso permite proteínas grandes serem construídas de combinações de fragmento sintéticos e recombinantes permitindo modificação de proteínas especificamente num sitio com ambas entidades naturais ou não naturais. Usando a chamada semi-síntese de proteína, muitos grupos diferentes podem ser incorporados especificamente num sitio em múltiplos sitios diferentes na proteína alvo.

De forma a utilizar proteínas recombinantes em estratégias de ligação os fragmentos recombinantes têm que conter as funcionalidades reactivas para facilitar a ligação. Um aproximação para introduzir uma única funcionalidade reactiva numa proteína recombinante tem sido através da oxidação periodato da serina N terminal contendo sequencias. Tal tratamento converte serina num grupo glioxil que contem o aldeio N terminal. Hidrazida sintética contendo péptidos foi então ligada ao N terminal destas proteínas de uma maneira químico selectiva através de formação de ligação hidrazona com a proteína grupo glioxil N terminal (Gaertner HF e outros *Bioconj. Chem.*, 1992, 3, 262 - 268, Gaertner HF, e outros, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 7224 - 7230). Outra aproximação tem sido gerada por proteínas recombinadas anexadas ao N terminal destas proteínas via formulação de ligação de amida de uma maneira análoga a "ligação química nativa" (Cotton GJ e Muir TW. *Chem. Biol.*, 2007, 7, 253 - 261). Contudo na ligação de péptidos sintéticos usando técnicas de ligação química, a tecnologia requer que cisteína seja introduzida no sítio de ligação se primeira sequência não contem um na posição apropriada.

Técnicas de união de proteína

Recentes tecnologias foram desenvolvidas para permitir proteínas recombinantes contendo grupos C terminais tioéster serem geradas. A funcionalidade do tioéster C terminal garante um único grupo reactivo na proteína que pode ser utilizado para libação de proteína. Proteínas recombinates C terminal tioéster são prduzidas por manipulação de fenómenos ocorrentes naturalmente conhecido como união de proteínas (Paulus H. *Annu Rev Biochem* 2000, 69, 447 - 486).

União de proteínas é um processo de pós translação em que o a proteína precursora entra num série de arranjos intra moleculares que resulta em remoção precisa de um região interna, referida aqui como intein, e ligação de duas sequencias de flancos, chamadas exteins (figura 2). Enquanto que normalmente não há requisitos de sequencia no intein e extein estes são caracterizados por muitos motivos conservadores de sequência e mais de cem membros deste domínio de proteína foram identificados.

O primeiro passo em união envolve uma N->S (ou N->O) troca de acil que a unidade N-extein é transferida para a cadeia lateral SH ou grupo OH de um resíduo conservado de Cys/Ser/Thr, sempre localizado no N terminal imediato do intein. Ensaio nestes mecanismos levaram ao desenho de um numero de inteins mutantes que so ajuda o primeiro passo de união de proteína (Chong e outros Gene. 1997, 192, 271 - 281, Noren e outros, Annu. Rev. Biochem., 2000, 69, 450 - 466). Proteínas expressas como na camada de fusões N terminal a um destes inteins pode ser clivado por tioles via reacção intramolecular transtioesterification, para gerar a proteína recombinante C terminal tioéster derivativo (figura 3) (Chong e outros Gene. 1997, 192, 271 - 281, Noren e outros, Annu. Rev. Biochem., 2000, 69, 450 - 466 New England Biolabs Impact system WO 00/18881, WO 0047751). Sequencias de péptido contendo um resíduo de cisteína N terminal podem ser especialmente ligadas co C terminal de proteínas tioéster recombinantes (Muir e outros Proc. Natl. Acad. Sci. EUA., 1998, 95, 6705 - 6710, Evans Jr e outros Prot. Sci., 1998, 7, 2256- 2264), num procedimento chamado ligação de proteína (EPL) ou ligação de proteína mediada de intein (IPL).

A ligação química selectiva de cisteína N terminal contendo péptidos para tioéster C terminal contendo peptídeos, sendo eles sintéticos ou recombinantes, é levada a cabo tipicamente em pH básico e na presença de cofactor tiol.

A estratégia também requer introdução de cisteína no sítio de ligação, se um não é adequadamente posicionado na sequência primária. Estes requerimentos desta aproximação de ligação têm o potencial de alterar a estrutura e/ou função de ambos o produto de proteína de ligação e os reagentes iniciais.

Por exemplo o chemokine RANTES é instável num tampão de 100 mM NaCl, 100 mM fosfato de sódio pH 7.4 contendo 100 mM ácido 2-mercaptoetanosulfónico (MESNA); um tampão tipicamente usado para a ligação de moléculas de C terminal tioéster com moléculas contendo N terminal (ligação de proteína expressa e ligação química nativa).

Rantes contem duas ligações dissulfido críticas para manter a estrutura e função da proteína. No tampão típico de ligação descrito em cima a proteína foi convertida em 48 horas numa mistura da proteína reduzida e a proteína MESNA oxidada. A maioria das misturas de proteína subsequente formam um precipitado, presumivelmente reflectindo a natureza destas espécies.

De acordo, os inventores acreditam que reacções de ligação que requerem tiol contendo tampões são, em geral, não adequadas para manter a integridade de proteínas contendo ligações dissulfido, tais como antibióticos, fragmentos anti corpos, domínios anti corpos, citoquina, factores de crescimento, etc. Assim existe um requisito para aproximações de ligação que são tipicamente levadas a cabo

na ausência de tiol. Por exemplo, quando monitorizado durante um numero de dias, foi descoberto que RANTES é estável em 100 mM NaCl, 100mM de tampão fosfato de sódio pH 7.4 e 100 mM tampão acetato de sódio pH 4.5 (resultados de inventor não publicados). Reacções de ligação que podem ser levadas a cabo sob tais condições devem ser aplicadas para ambas proteínas contendo dissulfido e não dissulfido.

Rotulagem de proteína

Historicamente ligação de proteína significa juntar dois fragmentos de péptidos/proteínas mas isto é sinónimo com rotulagem de proteína onde o rotulo é um péptido ou péptido derivativo. Igualmente se uma molécula pequena sintética não peptidica contem a funcionalidade química reactiva necessária para ligação de proteína, então ligação da molécula de síntese directamente ao N ou C terminal da proteína em sítios específicos de rotulagem da proteína. Assim tecnologias desenvolvidas para a ligação de fragmentos de proteína podem também ser usadas para a rotulagem directa de ambos N ou C terminais de péptidos ou proteínas num sítio específico.

Proteínas recombinantes contendo funções N-terminal glicoxi (geardo através de oxidação periodata do N-terminal correspondente proteína serina) têm sido especificas de sitio N terminal rotuladas atarves de reacção de hidrazida ou aminoxi derivativos do rótulo (Geoghegan KF e Stoh JG. *Bionof ~Chem.*, 1992, 3, 138 - 146, Alouni S e outros *Eur. J. Biochem.*, 1995, 227, 238 - 334). Também proteínas recombinantes contendo resíduos de cisteina N terminal foram rotuladas N terminalmente através de reacção com rótulos contendo tioéster funcionalidades, o rótulo sendo o

acil substituto do tioéster (Chem., 1990, 10, 424 - 430) para formar amidas e tiazolidinas respectivamente.

Ensinado um numero de métodos para ligação de proteínas cada uma tem as suas potencialidades. Esxiste a necessidade de um novo método de ligação, especialmente aqueles que são compatíveis com fragmentos ambos sintéticos e recombinantes e que podem ser usados em proteínas contendo ligação dissulfido ou em proteínas que não contem ligação dissulfido, que irão complementar as tecnologias existentes.

Sumário da invenção

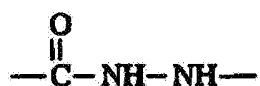
Os presentes inventores descobriram um numero de problemas associados com o estado da arte e desenvolveram um novo método para ligação de moléculas peptidicas que resolve um numero de problemas dos estado da arte.

De acordo, num primeiro aspecto da invenção é garantido um método para produção de produto oligopéptido, o método compreende os passos de:

- a) garantir um primeiro oligopéptido, o primeiro oligopéptido tendo um grupo reactivo onde o grupo reactivo é um grupo hidrazina, um grupo hidrazida ou um grupo aminoxy
- b) garantir um segundo oligopéptido, o segundo oligopéptido tendo um grupo activado Ester, onde o grupo Ester activado é um grupo tioéster, um grupo éster fenólico, um grupo hidroxisuccinimida, ou um O-acylisouned,
- c) permitir o grupo reactivo formar um produto oligopéptido para reagir com o éster activado.

Grupo do segundo oligopéptido para formar um produto oligopéptido, em que o primeiro e segundo oligopéptido estão ligados via grupo de ligação com Formula I, Formula II ou Formula III.

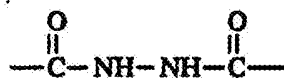
Formula I



Formula II



Formula III



Assim um nono aspecto da invenção garante um método para produzir um produto oligopéptido, o método compreende os passos:

- a) garantir um primeiro oligopéptido, o primeiro oligopéptido tendo um grupo cetona ou aldeído,
- b) garantir um molécula precursora de oligopéptido, a molécula precursora de oligopéptido compreendendo um segundo oligopéptido ligado a um domínio intein N terminalmente,
- c) reagir a dita molécula precursora de oligopéptido com hidrazina para gerar uma molécula de oligopéptido compreendendo um oligopéptido intermediário, dito

oligopéptido intermediário tendo um grupo hidrazida C terminal,

d) permitir ao grupo aldeído ou cetona do primeiro oligopéptido reagir com o grupo hidrazida da molécula oligopéptido para formar um produto oligopéptido, em que o primeiro oligopéptido e o segundo oligopéptido estão ligados através de um grupo de ligação hidrazona.

Um exemplo deste aspecto é mostrado na Figura 6.

Um décimo aspecto da invenção garante um método para rotular um oligopéptido, o método compreende os passos:

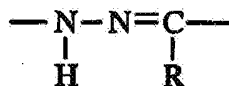
a) Garantir uma molécula rotulo, a molécula de rotulo tendo um grupo aldeído ou cetona,

b) garantir uma molécula precursora de oligopéptido, a molécula precursora de oligopéptido compreendendo um primeiro oligopéptido ligado N terminal a um domínio intein,

c) reagir a dita molécula precursora de oligopéptido com hidrazina para gerar uma molécula de oligopéptido compreendendo um oligopéptido intermediário, dito oligopéptido intermediário tendo um grupo terminal hidrazida.

d) permitir ao grupo aldeído ou cetona da molécula de rotulo reagir com o grupo hidrazida da molécula intermediária de oligopéptido para formar um produto oligopéptido rotulado, em que a molécula de rotulo e oligopéptido estão ligados via grupo de ligação hidrazona.

Numa incorporação preferida do nono e décimo aspecto da invenção, o grupo hidrazone tem Formula VII:



Onde R é H ou qualquer substituído ou não substituído, preferivelmente não substituído, grupo alquil.

Em aspectos preferidos do nono e décimos aspecto da invenção, o método é levado a cabo com um pH no intervalo de 1.0 a 7.0, preferivelmente pH 1.0 a pH 6.0, mais preferivelmente no intervalo de pH 2.0 a pH 5.5, mais preferivelmente o intervalo de pH 2.0 a pH 4.5.

Numa incorporação particular do nono e decimo aspecto da invenção, o grupo aldeído ou cetona do oligopéptido ou do rotulo é um grupo α -dicetona ou um grupo α -keto aldeído.

Num décimo primeiro aspecto da presente invenção é garantido um produto oligopéptido produzido usando um método de acordo com o primeiro, segundo ou quarto aspecto da invenção, em que o primeiro e segundo oligopéptidos são ligados via grupo de ligação tendo Formula II ou Formula III.

Num décimo segundo aspecto da presente invenção é garantido um oligopéptido rotulado pelo método de qualquer um dos aspectos do quinto ao oitavo aspectos da invenção, em que o rotulo e o oligopéptido são ligados via um grupo de ligação tendo Formula II ou Formula III.

Características preferidas de cada aspecto da invenção servem para cada um dos outros aspectos por analogia.

A invenção será agora descrita nos seguintes exemplos não limitativos com referências feitas aos desenhos incorporados em que:

A figura 1 ilustra esquematicamente o princípio geral de ligação química.

A figura 2 ilustra esquematicamente o mecanismo de junção de proteína.

A figura 3 ilustra a geração de proteínas recombinantes C-terminal tioésteres.

A figura 4 ilustra a ligação de proteínas e péptidos tioésteres com hidrazina e aminoóxi contendo entidades, tais como rótulos, péptidos e proteínas.

A figura 5 ilustra a geração de péptidos hidrazida sintéticos e recombinantes para ligação com tioésteres contendo moléculas. O péptido ou rótulo é o acil substituinte do tioéster.

A figura 6 ilustra a geração de péptidos hidrazidas recombinantes para ligação com aldeído ou cetona contendo moléculas.

A figura 7 ilustra análises SDS-PAGE de Grb2-SH2-GyrA-CBD (imobilizados em esferas de chitina) tratados com DTT e MESNA. Marcadores de peso molecular (linha 1); Grb2-SH2-Gyra-CBD purificado imobilizado em esferas de chitina (linha 4). Grb2-SH2-Gyra-CBD tratado com 100 mM DTT (linhas 5 e 7) ou 120 mM MESNA (linhas 7 e 10). Ambas as reacções a

solidez (linhas 5 e 8) e supernatantes da reacção(7 e 10) foram analisados.

A figura 8 ilustra análises SDS-PAGE de Grb2-SH2-Gyra-CBD (imobilizados em esferas de chitina) tratados com hidrazina. Marcadores de peso molecular (linha 1); Grb2-SH2-Gyra-CBD purificado imobilizado em esferas de chitina fica granuloso após 20 horas de tratamento com tampão fosfato apenas (linha 2). Grb2-SH2-Gyra-CBD tratado com 220 mM hidrazina em tampão fosfato durante 20 horas. Toda a rigidez da reacção foi analisada.

A figura 9 ilustra um espectro ESMS da hidrazida C terminal derivativa de Grb2-SH2.

A figura 10 mostra análises SDS-PAGE da reacção entre cetona sintética contendo péptido CH₃COCO-myc com Grb2-SH2-C-terminal hidrazida e citocromo C. Marcadores de peso molecular (linha 1); Grb2-SH2-C-terminal DTT tioéster (linha 2). A reacção entre Grb2-SH2-C-terminal hidrazida e CH₃COCO-myc em pontos de tempo t=0 h (linha 3), t=24 horas (linha 4), t=40 horas (linha 5) e t=72h (linha 6). Reacção entre citocromo C e CH₃COCO-myc em pontos de tempo t=0 (linha 7), t=24 horas (linha 8), t=72 horas (linhas 10).

A figura 11 mostra a estrutura de CH₃COCO-Lys(F1). O isomero posicional 5-carboxi fluoresceína é mostrado.

A figura 12 ilustra análises SDS-PAGE da reacção entre CH₃COCO-Lys(F1) e Grb2-SH2 C-terminal hidrazida em 50 mM tampão acetato de sódio pH 4.5. Marcadores de peso molecular (linha 1); Grb2-SH2 C terminal hidrazida (linha 2). A reacção entre Grb2-SH2 C terminal hidrazida e CH₃COCO-Lys(F1) em ponto de tempo t=4 horas (linha 3), t=24 horas (linha 4), t=48 horas (linha 5).

A figura 13 ilustra análises de SDS-PAGE da reacção entre CH₃COCO-Lys(F1) com citocromo C em 100 mM tampão de acetato de sódio pH 4.5. Marcadores de peso molecular (linha 1); Citocromo C (linha 2). A reacção entre Citocromo C e CH₃COCO-Lys(F1) em pontos de tempo t=4 horas (linha 3), t=24 horas (linha 4), t=48 horas (linha 5).

A figura 14 ilustra análises SDS-PAGE da reacção de CH₃COCO-Lys(F1) com Grb2-SH2 C terminal hidrazida e com citocromo C em 50 mM de tampão acetato de sódio pH 4.5. (A) mancha total de gel de proteína. Antes desta mancha de coomassie (A), o gel era verde fluorescente (B). Marcadores de peso molecular (linha 1); Grb2 SH2 C terminal hidrazida (linha 2); Reacção entre Grb2 SH2 C terminal hidrazida e CH₃COCO-Lys(F1) em pontos de tempo t=4 horas (linha 3), t=24 horas (linha 4), t=48 horas (linha 5). Citocromo C (linha 6); Reacção entre citocromo C e CH₃COCO-Lys(F1) em pontos de tempo t=4 horas (linha 7), t=24 horas (linha 8) e t=48 horas (linhas 9).

A figura 15 mostra análises SDS-PAGE da reacção entre CH₃COCO-Lys(F1) e Grb2 SH2 C terminal hidrazida em 40% acetonitrilo aquoso contendo 0.1% TFA; reacção após 4 horas (linha 1), 24 horas (linha 2), 48 horas (linha 3), Grb2 SHE C terminal hidrazida (linha 4).

Exemplos

Exemplo 1 ligação de proteína/proteína de sitio específico rotulagem usando a reacção de tioésteres péptido/proteína com composto contendo hidrazina/hidrazida ou funcionalidades aminoxi.

A) Reacção de um péptido tioéster C terminal com 100 mM hidrazina a pH 6.0

200 mM de tampão fosfato de sódio pH 6.0 contendo 100 mM monohidrato hidrazina (200 µL) foram adicionados a um modelo péptido tioéster sintético C terminal chamado AS626p1A (200 µg) para render uma concentração final de péptido de 317 µM. AS626p1A tem sequência ARTKQ TARK(Me)₃ STGGKAPRKQ LATKAARK-COS-(CH₂)₂-COOC₂H₅ (SEQ ID N°: 1) onde um único resíduo de alanina (que pode ser qualquer um dos resíduos da alanina de SEQ ID N°:1) é substituído por um resíduo de arginina. A reacção foi incubada a temperatura ambiente e monitorizada com tempo por fase reversa analítica HPLC. Coluna C18 Vydac (5µM, 0.46 x 25 cm). Gradientes lineares de água acetonitrila/0.1% TFA foram usados para eluir os péptidos numa taxa de fluência de 1 mL min⁻¹. Péptidos individuais que eluíram da coluna foram caracterizados por espectrometria massa electrospray.

B) Reacção de um péptido C terminal tioéster com 100mM hidroxilamina a pH 6.0.

200 mM de tampão fosfato de sódio pH 6.0 contendo 100 mM hidroxilamina cloreto de hidrogénio (200 µL) foi adicionado ao AS626p1A (200 µg) para render uma concentração de péptido final de 317 µM. A reacção foi incubada a temperatura ambiente e monitorizada com tempo por uma fase analítica reversa HPLC. Coluna C18 de vydac (5 µM 0.46 x 25 cm).

Gradientes lineares de água acetonitrila/0.1 % TFA foram usados para eluir os péptidos a uma taxa de fluência de 1 mL min⁻¹. Péptidos eluidos da coluna foram caracterizados por espectrometria massa electrospray.

C) Reacção de um péptido C-terminal tioéster com 100 mM hidroxilamina a pH 6.8

200 mM de tampão fosfato e sódio pH 6.8 contendo 100 mM hidroxilamina cloreto de hidrogénio (200 μ M) foi adicionado a AS626p1A (200 μ M) para render uma concentração final de péptido de 317 μ M. A reacção foi incubada a temperatura ambiente e monitorizada com tempo por fase analítica reversa HPLC. Coluna C18 Vydac (5 μ M, 0.46 x 25 cm).

Gradientes lineares eluindo da coluna foram caracterizados por espectrometria massa electrospray.

D) Reacção de um péptido C terminal tioéster com 10 mM hidroxilamina a pH 6.8.

O procedimento como descrito em C) foi repetido, substituindo 100 mM hidroxilamina com 10 mM hidroxilamina.

E) Reacção de um péptido C terminal tioéster com 10 mM hidroxilamina a pH 7.5

O procedimento como descrito em D) foi repetido, com pH 7.5

F) Reacção de um péptido C terminal tioéster com 2 mM hidroxilamina a pH 7.5

O procedimento como descrito em E) foi repetido, substituindo 10 mM hidroxilamina com 2mM hidroxilamania.

G) Reacção de um péptido tioéster C terminal com 100 mM O-metilhidroxilamina ($\text{NH}_2\text{-O-CH}_3$) com pH 7.5

200 mM de tampão fosfato de sódio com pH 7.5 contendo 100 mM O-metilhidroxilamina (200 μ M) foi adicionado a um péptido sintético tioéster C terminal AS626p1A (200 μ g) para render uma concentração final de péptido de 317 μ M. A reacção foi incubada a temperatura ambiente e monitorizada com tempo por fase analítica reversa HPLC. Coluna C18 vydac (5 μ M, 0.46 x 25 cm). Gradientes lineares de água acetoneitrila/0.1% TFA foram usados para eluir os péptidos numa taxa de fluência de 1 mL min⁻¹. Péptidos individuais eluindo da coluna foram caracterizados por espectrometria massa electrospray.

H) Reacção de um péptido tioéster C terminal com 10 mM O-metilhidroxilamina pH 7.5

O procedimento como descrito em G) foi repetido, substituindo 100 mM O-metilhidroxilamina por 10 mM O-metilhidroxilamina.

I) Reacção de um proteína recombinante tioéster C terminal com 100 mM O-metilhidroxilamina pH 7.5

O tioéster C terminal ácido mercaptoetanosulfonico derivado de Grb2-SH2 recombinante, foi gerado através de clivagem da proteína de fusão Grb2-SH2-Gyra intein-CBD como descrito no exemplo 2 em baixo. Esta proteína tioéster C terminal recombinante (100 μ g) reagiu com 100 mM O-metilhidroxilamina em 200 mM de tampão de fosfato de sódio pH 7.5 (200 μ L). A reacção foi incubada a temperatura ambiente e monitorizada com tempo por fase analítica reversa HPLC. Coluna C5 Vydac (5 μ M, 0.46 x 25 cm). Gradientes lineares de água acetoneitrila/0.1 % TFA foram usados para eluir os péptidos a uma taxa de fluência de 1 mL min⁻¹. Péptidos individuais

eluindo da coluna foram caracterizados por espectrometria massa electrospray.

Resultados

Estes exemplos demonstram a nova estratégia para ligação de proteína/sítio específico rotulagem de proteína de ambas sequências sintéticas ou recombinantes de proteínas da invenção usando a reação de péptido/proteína tioésteres C terminal com compostos contendo hidrazina/hidrazida ou funcionalidades aminoxi.

Como descrito em cima um péptido tioéster C terminal 27 aminoácido sintética (o etil 3-mercaptopropionato tioéster derivativo) foi tratado com hidrazina e hidroxilamina sob várias condições (Tabela 1).

Tratamento com 100 mM hidrazina a pH 6.0 formou uma espécie de péptido que elui antes do péptido tioéster inicial como analisado por HPLC. Este material foi identificado como o esperado péptido hidrazida por ESMS: massa observada=3054 Da, esperada (av. Isótopo comp) 3053. A reação do péptido tioéster C terminal com hidrazina para formar hidrazida foi monitorizada com tempo por fase reversa HPLC. Apenas o material desejado foi formado sem qualquer formação de produto lateral mesmo após 3 dias. A estabilidade do péptido hidrazida, sob as condições da reação, indica que a reação ocorre no grupo tioéster C terminal e é químico selectivo na natureza. Também realça a aplicação desta reação para ligação de proteínas e rotulagem (e horas 70% conversão, 4 horas > 95% conversão).

Para decidir qual aminoxi contendo compostos químicos selectivos reage com péptido/proteína tioésteres C terminal,

para permitir ligação de proteínas e rotulagem específica de sítio, um péptido tioéster C terminal sintético foi tratado com hidroxilamina sob várias condições (tabela 1).

Um péptido tioéster 27 aminoácidos sintético purificado (etil 3-mercaptopropionato tioéster, massa observada 3155 Da) foi incubado com temperatura ambiente com diferentes concentrações de hidroxilamina em tampões aquosos de pH variável. Em todos os casos o péptido tioéster C terminal reagiu para formar um único produto que eluiu primeiro que o péptido tioéster inicial como analisado por fase reversa HPLC. Este material corresponde ao péptido ácido hidroxâmico esperado como determinado por ESMS: massa observada = 3052 Da, esperada (av. Isótopo comp) 3054 Da. Os movimentos da reacção foram monitorizados usando fase reversa HPLC. O péptido tioéster C terminal foi convertido ao péptido correspondente ácido hidroxâmico de uma forma limpa sem formação de produtos laterais. Aumentando o pH do tampão da reacção acelera a taxa de reacção. Por exemplo, com uma concentração de 100 mM NH_2OH , movendo o pH 6.0 para pH 6.8 a percentagem de formação de produto após uma hora aumenta de 25% a 91%. A taxa de reacção com 100 mM NH_2OH com pH a 6.0, foi comparada com 10 mM NH_2OH com pH a 6.8.

A taxa de reacção do péptido tioéster C terminal com hidroxilamina para formar o correspondente ácido hidroxâmico, aumenta com o aumento de pH e decresce com a diminuição de concentrações de NH_2OH . Para identificar condições de pH e concentração de reagente adequadas para ligação e rotulagem de proteína/péptido, a rotulagem foi levada a cabo sob aumento de pH e diminuição da concentração de NH_2OH .

A reacção com 10 mM NH₂OH ficou 83% completa após 4 horas com pH a 6.8, enquanto pH a 7.5 diminui, 70% do péptido inicial α -tioéster sendo convertido no correspondente ácido hidroxamico após 8 horas. Foi notado que uma pequena quantidade de um produto lateral, correspondente em massa ao péptido ácido, foi formada durante a reacção. Presumivelmente isto foi formado por um reacção de hidrólise de competição lateral com pH a 7.5, que não foi observada com 10 mM NH₂OH com pH 7.5 devido à reacção rápida nesta maior concentração de reagente.

Tabela 1

Reagente	Cencentração	pH	Percentagem de formação de produto com o tempo				
			1 hora	2 horas	4 horas	8 horas	72 horas
NH ₂ NH ₂		6.0	-	70	100		
NH ₂ OH		6.0	25	48.1	76.3	-	100
NH ₂ OH		6.8	91	100			
NH ₂ OH		6.8	26	-	83	100	
NH ₂ OH		7.5	-	82.7	100	100	
NH ₂ OH		7.5	11.2	17	38	70	80*

* Todos os materiais iniciais reagiram com 80% conversão para o produto desejado e ~20% para o produto lateral de hidrólise.

Para investigar a reacção químico selectiva de amiooxi contendo composto com tioésteres péptido/proteína, para suportar ligação de proteínas e rotulagem específica de sitio, o péptido tioéster C terminal sintético AS626p1 foi tratado com O-metilhidroxilamina.

O péptido tioéster C terminal 27 aminoácidos purificado sintético (etil 3-mercaptopropionato tioéster, massa

observada 3155 Da) foi incubado em temperatura ambiente com 100 mM O-metilhidroxilamina em 200 mM de tampão de fosfato de sódio pH 7.5. O péptido tioéster C terminal reagiu para formar um único produto que elui antes que o péptido tioéster inicial como analisado por fase reversa HPLC. Este material corresponde ao péptido esperado N-metoxi péptido amida como determinado por ESMS: massa observada = 3070 Da, massa esperada 3068 Da. Os movimentos da reacção foram monitorizados usando fase reversa HPLC (Tabela II). O peptido tioéster C terminal foi convertido no correspondente N metoxi péptido amina derivativo de um forma limpa sem formação lateral de produtos, com a reacção 75% completa após 24 horas. Sob estas condições nenhuma hidrólise de tioéster foi observada.

Tabela II

Reagente	Concentração	pH	Percentagem de formação de produto com o tempo				
			1 hora	2 horas	5 horas	24 horas	72 horas
NH ₂ OCH ₃	100 mM	7.5	-	7.5	28	76	

Quando a reacção foi repetida sob as mesmas condições mas com 10 mM O-metilhidroxilamina substituindo oas 100 mM O-metilhidroxilamina, a taxa de reacção foi inferior. Contudo, após 72 horas, 88% do péptido tioeste C terminal reagiu. Sob estas condições formação de produto lateral foi observada, em adição à formação do produto desejado. Mesmo assim, após 72 horas, 30-40% do produto de reacção foi estimado ser o produto de reacção de ligação desejado (N-metoxi péptido amida) através de análise de HPLC da mistura de reacção.

As reacções de O-metilhidroxilamina com proteínas tioéster C terminal recombinantes foram também investigadas.

Grb2-SH2 recombinante foi gerado como o tioéster C terminal ácido mercaptoetanosulfónico derivativo, através de clivagem de tiol da proteína de fusão Grb2-Gyra intein-CBD, como descrito no exemplo 2. Esta proteína tioéster C terminal recombinante reagiu com 100 mM O-metilhidroxilamina com pH de 7.5. Análises da mistura de reacção após 18 horas por HPLC e ESMS mostraram que a proteína tioéster C terminal foi completamente convertida em duas espécies de proteínas. Estas duas proteínas derivativas correspondem ao produto de reacção de ligação desejado, nomeadamente Grb2-SH2 C terminal N-metoxi amida (massa esperada 12067 Da; massa observada 12067 Da), e uma forma oxidada proteína tioéster foi observada. Assim todas as proteínas tioéster C terminal recombinantes têm química selectividade ligada com O-hidroxilamina através de uma reacção de formação de ligação de amida especificamente no terminal da proteína por exemplo a reacção suportou rotulagem em sítio específico no C terminal da proteína recombinante.

Exemplo 2 Geração de proteína Grb2 SH2 C terminal hidrazida recombinante

Para investigar (i) a habilidade para gerar proteínas recombinantes C terminal hidrazina através de clivagem selectiva de proteína - fusões intein com hidrazina e (ii) seu subsequente uso em reacções de ligação/rotulagem, o domínio SH2 do adaptador de proteína Grb2 foi escolhido como sistema de modelo.

Sequência de domínio humano de Grb2 SH2

HPW FFGKIPRAKA EEMLSKQRHA GAFLIRESES APGDFSLSVK
FGNDVQHFVKV LRDGAGKYFL WVKFNSLNE LVDYHRSTSV
SRNQQIFLRD IEQVPQQPT

Expressão de domínio Grb2-SH2 - fusão intein Gyra

A sequência de ADN que codifica o domínio SH2 da Grb2 humana aparece no seu C terminal com um resíduo de glicina extra que foi clonado na expressão plasmídea (NEC) pTXB1. Este vector pTXB1_{Grb2-SH2(Gly)} codifica para uma proteína de fusão onde o domínio SH2 da Grb2 é ligado via um resíduo de glicina ao N terminal do intein GyrA, que por sua vez é ligado à região do N terminal de um chitina de ligação (CBC). Células E. coli foram transformadas com este plasmídeo e cresceram em LB médio para fase mid log e expressão de proteína induzida por 4 horas a 37° C com 0.5 mM IPTG. Após centrifugação as células foram resuspensas em tampão de lise (1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM PMSF, 25 mM HEPES, pH 7.4) e lisadas por sonicação. A fração solúvel foi carregada numa coluna de chitina pré equilibrada em tampão de lise. A coluna foi então lavada com tampão de lavagem (1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.1% Triton-X 100, 25 mM HEPES, pH 7.0) para render Grb2-SH2-Gyra-CBD purificado imobilizado em esferas de chitina (figura 7).

Geração de Grb2-SH2 C terminal tioésteres por indução de clivagem de tiol da fusão intein de Grb2-SH2-Gyra.

Para garantir que o domínio intein na proteína era funcional a proteína de fusão foi exposta a tiois para estimar a extensão de clivagem via transtioesterificação. Esferas de chitina contendo Grb2-SH2-GyrA-CBD imobilizado foram equilibradas em 200 mM NaCl, 200 mM tampão fosfato pH 7.4. Ditiotreitól (DTT) ou ácido 2-mercaptoetanosulfônico

foram equilibrados em 200 mM NaCl, 200 mM tampão fosfato pH 7.4 para dar 50% rigidez com uma concentração final de tiol de 100 mM ou 120 mM respectivamente. As misturas foram então endurecidas a temperatura ambiente e alíquotas analisadas por SDS-PAGE. Após 48 horas os sobrenadantes das reacções foram isolados e subsequentemente analisados por HPLC e ESMS.

Tratamento de fusão de Grb2-SH2-intein GyrA-CBD com ambos DTT e MESNA resulta em clivagem da proteína de fusão em duas espécies de proteínas (Figura 7). O tamanho molecular dos dois fragmentos correspondem ao do Grb2-SH2 e o GyrA-fusão intein, indicativo que a clivagem teve lugar na junção intein - SH2. Clivagem da proteína precursora de fusão libera o domínio SH2 no sobrenadante enquanto que a porção intein GyrA-CBD fica imobilizada nas esferas de quitina. Após clivagem com ambos DTT ou MESNA, análises ESMS dos sobrenadantes confirma que Grb2-SH2 foi gerado como também o espreado DTT ou MESNA C terminal tioéster derivativos respectivamente.

Massa esperada de Grb2-SH2 DTT - C terminal tioéster = 12173.9 Da; massa observada 12173.5 Da. Massa esperada de Grb2-SH2 MESNA - C terminal tioéster = 12162.0 Da; massa observada 12163.0 Da.

Geração de Grb2-SH2 C terminal hidrazida por clivagem induzida de hidrazina do Grb2-SH2-GyrA fusão intein.

A invenção sugere que a ligação tioéster entre Grb2-SH2 e o intein GyrA na proteína precursora de fusão é clivada com hidrazina. A reacção química selectiva de hidrazina no grupo tioéster ligando Grb2 SH2 ao intein, libera o domínio Grb2-SH2 no sobrenadante e o seu C terminal hidrazida

correspondente. Esferas de chilina contendo Grb2-SH2-GyrA-CBD imobilizado foram então equilibradas em 200 mM NaCl, 200 mM tampão de fosfato pH 7.4 e monohidrato de hidrazina adicionado no mesmo tampão dando 50% de rigidez com uma concentração final de hidrazina de 200 mM. A mistura foi então endurecida com temperatura ambiente e analisada por SDS-PAGE (figura 8). Após 20 horas o sobrenadante foi removido e analisado por HPLC e ESMS.

Tratamento de Grb2-SH2-intein GyrA-CBD fundido com hidrazina resulta em clivagem da proteína de fusão em duas espécies. O tamanho molecular dos dois fragmentos como analisado por SDS-PAGE corresponde a Grb2-SH2 e o GyrA-intein de fusão, indicativo que a clivagem teve lugar na única ligação tioéster entre o SH2 e os domínios intein. Clivagem da proteína precursora de fusão libera o domínio SH2 para o sobrenadante enquanto que a porção GyrA-intein-CBD fica imobilizada nas esferas de chilina. Análises HPLC e ESMS da clivagem sobrenadante confirma que uma espécie única de proteína foi gerada que corresponde à hidrazida C terminal derivativa do Grb2-SH2. Massa esperada de Grb2-SH2 C terminal hidrazida) 12051.7 Da; massa observada 12053.0 Da. (figura 9)

Após 20 horas de reacção Grb2-SH2 C terminal hidrazida foi isolada do sobrenadante por (i) uso de RPHPLC seguido de liofilização ou (ii) por filtração de gel. Nesta última a solução de reacção de hidrazida C terminal Grb2-SH2 foi carregada numa coluna de péptido superdex (Amersham Biosciences) e eluída com um tampão de andamento de 50 mM acetato de sódio pH 4.5. Isto rendeu uma solução de hidrazida C terminal Grb2-SH2 purificada em 50 mM acetato de sódio pH 4.5. Esta solução foi concentrada usando um

filtro centricon (3000MWC0) sendo depois congelada e armazenada a -20° C até ser usada.

Uma amostra da hidrazida C terminal Grb2-SH2 (100 µg) purificada e liofilizada foi tratada com a protease Lys-C (5 µg) em 100 mM de tampão bicarbonato de amônio com pH 8.2 (100 µL). Após incubação a 30° C durante a noite a reacção foi liofilizada e analisada por espectrometria de massa MALDI. A massa observada do fragmento C terminal proteolitico (FNSLNELVDYHRSTSVSRNQQIFLRDIEQVPQQPTG) corresponde ao da desejada hidrazida C terminal derivativa (massa esperada de fragmento de hidrazida C terminal proteolitica 4229 Da; massa observada 4231 Da).

Exemplo 3 venação de proteína de ligação recombinante C-terminal hidrazida maltose

Como uma demonstração do descrito para geração de proteínas recombinantes C-terminal hidrazia através de clivagem selectiva de proteína - fusões intein com hidrazina, a geração da hidrazida C terminal derivativa de proteína de ligação maltose (MBP) foi investigada.

Sequencias de MBP humanos usadas

M K I E E G K L V I W I N G D K G Y N G L A E V G K
K F E K D T G I K V T V E H P D K L E E K F P Q V A
A T G D G P D I I F W A H D R F G G Y A Q S G L L A
E I T P D K A F Q D K L Y P F T W D A V R Y N G K L
I A Y P I A V E A L S L I Y N K D L L P N P P K T W
E E I P A L D K E L K A K G K S A L M F N L Q E P Y
F T W P L I A A D G G Y A F K Y E N G K Y D I K D V
G V D N A G A K A G L T F L V D L I K N K H M N A D
T D Y S I A E A A F N K G E T A M T I N G P W A W S

N I D T S K V N Y G V T V L P T F K G Q P S K P F V
G V L S A G I N A A S P N K E L A K E F L E N Y L L
T D E G L E A V N K D K P L G A V A L K S Y E E E L
A K D P R I A A T M E N A Q K G E I M P N I P Q M S
A F W Y A V R T A V I N A A S G R Q T V D E A L K D

A Q T N S S S N N N N N N N N N N L G I E G R G T L
E G

Expressão de MBP - Sce VMA fusão intein

O vector de expressão pMYB5 (New England Biolabs) codifica para uma proteína de fusão compreendendo proteína de maltose de ligação (sequencia em cima) fundida no N terminal ao intein Sce VMA, que é por sua vez fundido ao N terminal de um domínio de ligação chitina (CBD) para facilitar a purificação.

Células E. coli foram transformadas com este plasmídeo desenvolvidas em LM médio para fase mid log e expressão de proteína induzida para 4 horas a 37° C com 0.5 mM IPTG. Após centrifugação as células foram de novo suspensas num tampão de lise (0.1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM PMSF, 25 mM HEPES, pH 7.4) e provocando-se lise por soniacção. A fracção solúvel foi carregada numa coluna de chitina pré equilibrada num tampão de lise. A coluna foi então lavada com um tampão de lavagem (1mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.1% Triton-X 100, 25 mM HEPES, pH 7.0) para render a proteína de fusão purificada (MBP-VMA-CBD) imobilizada em esferas de chitina.

Geração de MBP C-terminal tioésteres por tiol de clivagem induzida do MBP-VMA- proteína de fusão intein

Para verificar que o domínio intein na MBP-VMA-CBD era funcional, a proteína de fusão foi exposta ácido 2-mercapto-etano-sulfónico (MESNA) para avaliar a extensão de clivagem via transtioesterificação. Esferas de quitina contendo MBP-VMA-CBD imobilizado foram equilibradas em 200 mM NaCl, 200 mM tampão fosfato pH 7,4. MESNA foi então adicionada às esferas em 200 mM tampão fosfato pH 7,4 para dar uma mistura de 50 % com uma concentração final de tiol de 120 mM. A mistura foi então endurecida a temperatura ambiente e alíquotas analisadas por SDS-PAGE. Após 48 horas os sobrenadantes da reacção foram isolados e subsequentemente analisados por HPLC e ESMS.

Tratamento de MBP-VMA-CBD fusão com MESNA resulta em clivagem da proteína de fusão em duas espécies de proteínas. O tamanho molecular dos dois fragmentos correspondentes ao do MBP e da porção VMA-CBD, indicativo que a clivagem teve lugar na junção intein MBP-VMA. Clivagem da proteína precursora de fusão libera MBP para o sobrenadante enquanto a porção VMA-CBD fica imobilizada nas esferas de quitina. Isto foi confirmado por análises ESMS da clivagem do sobrenadante, que contem uma espécie de proteína. Massa esperada de MBP C terminal MESNA tioéster 43064Da; massa observada 43098 Da.

Geração de MBP C terminal por clivagem de hidrazina induzida do MBP-VMA proteína de fusão intein.

Esferas de quitina contendo MBP-VMA-CBD imobilizado foram equilibradas em 200 mM NaCl, 200 mM tampão fosfato pH 7.4 e monohidrato de hidrazina adicionado no mesmo tampão para dar uma mistura de 50% com uma concentração final de hidrazina de 200 mM. A mistura foi então endurecida a

temperatura ambiente e analisada por SDS-PAGE e por HPLC e ESMS.

Após 20 horas de reacção MBP C terminal hidrazida foi isolada do sobrenadante através (i) usando RPHPLC seguido por liofilização ou (ii) por filtração de gel. Nesta ultima abordagem a solução de reacção MBP C terminal hidrazida foi carregada numa coluna de peptídeo superdex (Amersham Biosciences) e eluido com um tampão de 50 mM de acetato de sódio pH 4.5. Isto rendeu uma solução de hidrazida MBP C terminal purificada em 50 mM tampão de acetato de sódio pH 4.5. Esta solução de proteína foi concentrada usando um filtro centricon (2000 MWCO) e congelada e armazenada a -20° C até ser usada.

Tratamento de MBP-VMA-CBD fusão com hidrazina resulta em clivagem da proteína fundida em duas espécies.

O tamanho molecular dos dois fragmentos como analisado por SDS-PAGE corresponde a MBP e a porção de VMA-CBD, indicativa que a clivagem teve lugar na única ligação de tioéster entre o domínio inteiro da porção MBP-VMA. Clivagem da proteína precursora de fusão libera MBP no sobrenadante, enquanto que a porção de VMA-CBD fica imobilizada nas esferas de chitina. Análises HPLC e ESMS da clivagem do sobrenadante confirmam que uma única espécie de proteína é gerada com uma massa absorvida de 42988 Da. A diferença de massa esperada entre o tioéster MESNA C terminal do MBP descobriu-se ser 43098 Da. Assim o produto da clivagem de hidrazina da MBP-VMA-CBD é 110 Da inferior, indicando que a hidrazida C terminal desejada do MBP foi formada.

Exemplo 4 ligação de aldeído e cetona contendo péptidos e rótulos para hidrazida C terminal recombinante contendo

proteínas: Ligação de um péptido sintético c-myc a um domínio recombinante Grb2 SH2

Os inventores puseram a hipótese de proteínas C terminal hidrazidas geradas por tratamento de hidrazida do correspondente precursor de fusão podem ser modificadas especificamente num sítio por ligação química selectiva com aldeído ou cetona contendo péptidos e rótulos. Para demonstrar isto a habilidade de uma cetona sintética conter péptido para ligar com a hidrazida C terminal Grb2-SH2 gerada em cima foi investigada. Um péptido sintético correspondente a sequência epítipo c-myc foi sintetizada GEQKLISEEDL-NH₂, onde ácido pirúvico foi junto à amina terminal do péptido como o último passo da montagem. Este péptido (designado CH₃COCO-myc) foi purificado a > 95% pureza por RPHPLC e liofilizado (ESMS massa monoisotópica esperada 1328.6 Da; massa observada 1328.6 Da).

Uma amostra de péptido CH₃COCO-myc foi dissolvida em 100 mM de tampão de acetato de sódio pH 4.5 para dar uma concentração de péptido de 4 mM. Esta solução de péptido (100 µL) foi então adicionada a uma alíquota de proteína hidrazida C terminal Grb2-SH2 liofilizada (- 250 µg) e a reacção monitorizada por SDS-PAGE (figura 10). Como controlo CH₃COCO-myc foi também incubado com citocromo C, uma proteína de tamanho similar a Grb2-SH2 mas sem funcionalidade de hidrazida.

Análises de SDS-PAGE mostram que o péptido CH₃COCO-myc ligou-se com Grb2-SH2 C terminal hidrazida, como indicado pela conversão de Grb2-Sh2 C terminal numa espécie de proteína de maior peso molecular (aproximadamente 1000-2000 Da maior). A reacção é virtualmente completa após 24 horas e o produto de reacção parece estar estável. Por outro lado

não mudança observável no citocromo C com o tempo, por exemplo, não ligação, mostrando que a reacção de ligação ocorre na funcionalidade do C terminal hidrazida do Grb2-SH2.

Após 96 horas de reacção o produto da reacção de ligação de Grb2-SH2 foi isolado por HPLC e caracterizado por ESMS. Ligação química selectiva de CH₃COCO-myc para Grb2-SH2 C terminal hidrazida através de formação de ligação de hidrazona dá um produto de massa esperada de 13363.7 Da. A massa de produto observada foi 13364.1 Da indicando que o produto de ligação foi formado.

Exemplo 5 Ligação de aldeído e cetona contendo péptidos e rótulos a hidrazida C terminal recombinante contendo proteínas: Rotulagem de fluoresceína de Grb2-SH2.

Neste exemplo a hidrazida C terminal recombinante derivativa gerada através de clivagem de hidrazina do proteína percursora de fusão intein, ragiu com uma cetona contendo derivativo de fluoresceína para suportar rotulagem fluorescentes especifica num sítio da proteína.

Para facilitar rotulagem fluorescente de proteínas recombinantes C terminal hidrazida usando o método descrito o fluorocromo precisa conter um grupo reactivo apropriado para ligação, nomeadamente uma funcionalidade de aldeído ou uma cetona.

Para este fim um derivativo de fluoresceína foi sintetizado contendo um grupo piruvil. Inicialmente, Fmoc-Lys(Mtt)-OH foi junto com uma pista de resina de amida e o grupo Mtt removido usando procedimentos standard (1% TFA, 4% triisopropilsilano em diclorometano).

5(6)carboxifluoresceína foi então junta com o grupo amino lisina. O grupo Fmoc foi então removido e o ácido piruvico junto com o grupo livre α -amino da lisina. Após lavagem da resina, a desejada fluoresceína derivativa [designada CH₃COCO-Lys(F1), ver figura 11] foi purificada > 95% pureza por RPHPLC e liofilizada (ESMS, massa monoisotopica esperada 576.2 Da; massa monoisotopica observada 576.0 Da).

Para estabelecer a reatividade de CH₃COCO-Lys(F1) com proteínas e péptidos hidrazida C terminal, a reacção de CH₃COCO-Lys(F1) com um péptido sintético hidrazida C terminal SLAYG-NH₂ foi investigada. Uma amostra de CH₃COCO-Lys(F1) e péptido SLAYG-NH₂ foram dissolvidos em 100 mM de tampão acetato de sódio pH 4.5 para dar concentrações finais de 0.3 mM e 2mM respectivamente. Após 20 horas de incubação a temperatura ambiente a reacção foi completa como determinado por análises RPHPLC. Todo o CH₃COCO-Lys(F1) inicial reagiu para originar predominantemente um único produto. A massa que corresponde ao desejado produto de ligação, nomeadamente conjugação dos dois reagentes através de formação de ligação hidrazona (ESMS massa monoisotopica esperada 1079 Da; massa observada 1080 Da).

Tendo estabelecido a reacção especifica de CH₃COCO-Lys(F1) com hidrazida contendo péptidos, este derivativo de fluoresceína foi usado para a rotulagem de sitio especifico de Grb2 SH2 C terminal hidrazida recombinante (gerada através de clivagem de hidrazina de Grb2 SH2-GryA-CBD).

Dois métodos complementares foram empregues para apurificação de Grb2 SH2 C terminal hidrazida da reacção de clivagem da proteína de fusão (exemplo2). A proteína purificada foi isolada como um liofilizado sólido ou numa

solução de 50 mM tampão de acetato de sódio pH 4.5. Este ultimo sistema de tampão foi escolhido de modo ao pH ser adequado para reacções de formação de ligação de hidrazona. Uma alíquota de Grb2 SH2 hidrazida C terminal em 50 mM de acetato de sódio pH 4.5 (250 µg, 200 µg) foi adicionada directamente numa amostra de CH₃COCO-Lys(F1) para dar uma concentração final de fluorocromo de cerca de 0.3 mM. A reacção foi incubada a temperatura ambiente e monitorizada por SDS-PAGE. Como controlo CH₃COCO-Lys(F1) foi também incubado sob as mesmas condições com citocromo C, uma proteína de tamanho similar com Grb2-SH2 mas sem funcionalidade de hidrazida.

Analises SDS-PAGE mostram que CH₃COCO-Lys(F1) ligou-se com Grb2-SH2 hidrazida C terminal (figura 12) como indicado pela conversão de Grb2-SH2 hidrazida C terminal numa única espécie de proteína com um aparente aumento no peso molecular (aproximadamente 1000-2000 Da maior). Após analises SDS-PAGE das reacções, imagem fluorescente do gel confirma que o novo produto de reacção formado contém um rotulo fluorescente e que a reacção é limpa com apenas uma única proteína fluorescente sendo formada (figura 14). A reacção é virtualmente completa após 24 horas e o produto de reacção aparenta ser estável sob estas condições.

Por outro lado não houve mudança observável no citocromo C ao longo do tempo da experiência, por exemplo não ligação, (Figura 13) com uma completa ausência de formação de qualquer produto de proteína fluorescente (Figura 14). Isto estabelece que a reacção de ligação ocorre na hidrazida C terminal do Grb2-SH2, para render rotulagem sítio específico no C terminal da proteína recombinante. Após 48 horas de reacção o produto da reacção de ligação com Grb2-

SH2 foi isolado por HPLC. A massa deste produto, por ESMS, confirmou a adição de um grupo fluorescente à proteína.

Noutro exemplo, Grb2-SH2 hidrazida C terminal liofilizada foi directamente dissolvida em 100 mM acetato de sódio pH 4.5 e adicionada a CH₃COCO-Lys(F1). Alguma precipitação de proteína foi observado, a fracção solúvel da proteína reagiu com CH₃COCO-Lys(F1) da maneira antecipada descrita em cima.

Numa estratégia alternativa uma amostra de Grb2 SH2 C terminal liofilizada (250 µg) foi dissolvida em 40% aquosa acetonitrila contendo 0.1 % TFA (200 µL). Esta solução foi então adicionada a uma amostra de CH₃COCO-Lys(F1) para dar uma concentração final de fluoresceína de cerca de 0.3 mM. A solução foi encubada a temperatura ambiente e a reacção periodicamente analisada. Análises SDS-PAGE mostraram que a reacção de rotulagem ocorreu de uma forma limpa e rapidamente sob estas condições (Figura 15). Grb2-SH2 hidrazida C terminal foi convertida numa única espécie de proteína com um aparente aumento de peso molecular esperado para o produto desejado e esta nova proteína formado era verde fluorescente quando visualizada com uma lamapada UV. ESMS do produto de reacção confirmou que uma molécula fluorescente foi adicionada à proteína. A reacção é virtualmente completa após 4 horas, com incubação prolongada parecendo ser prejudicial para a formação do produto de ligação.

Exemplo 6 ligação de aldeído ou cetona contendo péptidos e rótulos para hidrazida C terminal recombinante contendo proteínas: Rotulagem fluorescente de MBP.

Como exemplo a incorporação descrita foi usada para rotulagem de sítio específico C terminal de MBP com fluoresceína. Uma amostra (250 µg) de MBP hidrazida C terminal recombinante liofilizado (gerado através de clivagem de hidrazina de MBP-VMA-CBD proteína precursora de fusão) foi dissolvida em acetonitrila 40% aquosa contendo 0.1% TFA (200 µL). A solução foi então adicionada `amostra de CH₃COCO-Lys(F1) para dar uma concentração final de fluoresceína de cerca de 0.3 mM. A reacção foi então encubada a temperatura ambiente e periodicamente analisada por SDS-PAGE.

Análises SDS-PAGE mostraram que a reacção de rotulagem de fluoresceína ocorreu sob estas condições como indicado pela formulação de uma única espécie de proteína verde fluorescente com um peso molecular de cerca de 42 KDa. Analises MALDI da mistura de reacção após 48 horas foram consistentes com a adição de uma molécula de fluoresceína ao MBP.

Em suma, a presente invenção garante novos métodos de ligação de proteínas e rotulagem. Isto permite que ambos fragmentos de proteínas sintéticos e recombinadamente derivados sejam eficazmente juntos de uma maneira regioselectiva. Assim isto permite que grandes proteínas sejam construídas de combinações de fragmentos sintéticos e recombinantes e permite que proteínas de qualquer tamanho sejam modificadas especificamente num sítio de uma maneira sem precedentes. Isto é de grande importância para as ciências biológicas e biomédicas e descoberta de medicamentos quando se considera que - 30000 genes humanos comportam centenas de milhares de diferentes espécies de proteínas através de modificação pós translacional. Tais

proteínas modificadas pós translacionalmente não podem ser acedidas através de tecnologias recombinantes actuais.

A aplicação de tais técnicas de ligação de proteínas pode ser usada para ferramentas à base de proteínas, terapêuticos de proteínas e em de novo design e podem abrir muitas portas nas ciências biológicas e biomédicas que não tem sido possível.

Varias modificações e variações das incorporações descritas das invenções serão perceptíveis para os qualificados na arte. Contudo a invenção foi descrita com ligação a incorporações preferidas, deve ser entendido que a invenção como reivindicado não deve ser limitada às tais incorporações específicas. Várias modificações dos modos descritos para levar a cabo a invenção que sejam obvias para os qualificados na arte estão cobertas pela presente invenção.

Lisboa,

Referencias citadas na descrição

Documentos de patente citados na descrição

US 6184344 B
EP 0832096 B1
WO 0018881 A
WO 0047751 A

Documentos não patente citados na descrição

- COTTON GJ ; MUIR TW.** *Chem.Biol.*, 1999, vol. 6, R247-R254 [0006]
SCHNOLZER M ; KENT SBH. *Science*, 1992, vol. 256, 221-225 [0007]
LIU C-F ; TAM J.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 6584-6588 [0007]
GAERTNER HF et al. *Bioconj. Chem.*, 1992, vol. 3, 262-268 [0007] [0011]
ROSE K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, vol. 116, 30-33 [0007]
NILSSON BL ; KIESSLING LL ; RAINES RT. *Org. Lett.*, 2001, vol. 3, 9-12 [0007]
KIICK et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, 19-24 [0007]
DAWSON et al. *Science*, 1994, vol. 266, 776 [0007]
WIELAND T et al. *Liebigs Ann. Chem.*, 1953, vol. 583, 129-149 [0007]
CAMARERO et al. *J. Pept. Res.*, 1998, vol. 54, 303-316 [0009]
CANNE LE et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, vol. 121, 8720-8727 [0009]
GAERTNER HF et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 7224-7230 [0011]
COTTON GJ ; MUIR TW. *Chem. Biol.*, 2000, vol. 7, 253-261 [0011]
PAULUS H. *Annu Rev Biochem*, 2000, vol. 69, 447-496 [0012]
CHONG et al. *Gene*, 1997, vol. 192, 271-281 [0013] [0013] [0029] [0029]
NOREN et al. *Anew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2000, vol. 39, 450-466 [0013]
NOREN et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2000, vol. 39, 450-466 [0013] [0029] [0029]
MUIR et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998, vol. 95, 6705-6710 [0013]
EVANS JR et al. *Prot. Sci.*, 1998, vol. 7, 2256-2264 [0013]
GEOGHEGAN KF ; STROH JG. *Bioconj Chem.*, 1992, vol. 3, 138-146 [0018]
ALOUNI S et al. *Eur. J. Biochem*, 1995, vol. 227, 328-334 [0018]
SCHULER B ; PANNELL LK. *Bioconjug. Chem.*, 2002, vol. 13, 1039-43 [0018]
ZHAO et al. *Bioconj. Chem.*, 1999, vol. 10, 424-430 [0018]
HOJO et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1993, vol. 66, 2700-2706 [0027]
SHIN Y et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, vol. 121, 11684-11689 [0027]

Reivindicações

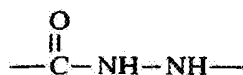
1. Um método para produzir um produto oligopéptido, o método compreendendo os passos:

a) tendo um grupo reactivo, onde o grupo reactivo é um grupo hidrazina, uma grupo de hidrazida ou um grupo de aminooxi;

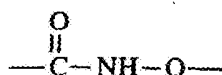
b) garantir um segundo oligopéptido, o segundo oligopéptido tendo um grupo éster activado, onde o grupos éster activado é um grupo tioéster, um grupo éster fenólico, um grupo hidroxisuccinimida ou um grupo O-acilisourea;

c) permitir ao grupo reactivo do primeiro oligopéptido reagir com o grupo éster activado do segundo oligopéptido para formar um produto oligopéptido, em que o primeiro e segundo oligopéptidos estão ligados através de um grupo de ligação tendo Formula I, formula II ou Formula III.

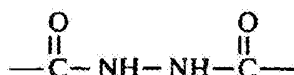
Formula I



Formula II



Formula III



2. O método de acordo com a reivindicação 1 onde o grupo de éster activado termicamente é um tioéster onde o péptido é o acil subsistente do tioéster.

3. O método de acordo com a reivindicação 2 onde o dito segundo polipéptido é gerado por reagente tiol dependente de clivagem de uma molécula precursora, dita molécula precursora compreendendo um segundo oligopéptido fundido N-terminal com um domínio intein.

4. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores onde o grupo reactivo é um grupo aminooxi e o grupo éster activado é um tiéster.

5. O método de acordo com a reivindicação 4 onde o dito primeiro oligopéptido é produzido por reacção de hidrazina com um precursor de molécula, dito precursor de molécula compreende um precursor de oligopéptido fundido N-terminal a um domínio intein através de um grupo tioéster.

6. Um método para produção de um produto oligopéptido, o dito método compreendendo os passos:

a) Garantir um primeiro oligopéptido, o primeiro oligopéptido tendo um grupo reactivo, onde o grupo reactivo é um grupo de hidrazina, um grupo de hidrazina ou um grupo de aminooxi;

b) Garantir uma molécula precursora de oligopéptido, a molécula precursora de oligopéptido compreendendo um segundo oligopéptido fundido terminal N a um domínio intein;

c) Permitir ao grupo reactivo do primeiro oligopéptido reagir com a molécula precursora de oligopéptido para

formar um produto oligopéptido, em que o primeiro e segundo oligopéptidos são ligados através de um grupo de ligação tendo Formula I, Formula II ou Formula III.

7. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores onde o primeiro ou segundo oligopéptido é um oligopéptido recombinante e outro do primeiro e do segundo oligopéptido é um polipéptido sintético.

8. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, onde o primeiro oligopéptido e o segundo oligopéptido são oligopéptidos recombinantes.

9. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, onde o primeiro oligopéptido e o segundo oligopéptido são oligopéptidos sintéticos.

10. O método para gerar uma proteína hidrazida, o dito método compreende os passos de:

(a) Garantir uma molécula de proteína compreendendo um oligopéptido fundido temrinal N a um domínio intein,

(b) Reagir a dita molécula de proteína com hidrazina, tal que o domínio intein seja clivado do oligopéptido para gerar a proteína hidrazida.

11. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9 onde o passo (c) do método é levado a cabo num pH no intervalo de 6.5 a 7.5.

12. O método de produção de um produto oligopéptido, o método compreende os passos:

a) Garantir um primeiro oligopéptido, o primeiro oligopéptido tendo um grupo aldeído ou cetona,

b) Garantir uma molécula precursora de oligopéptido, a molécula precursora de oligopéptido compreende um segundo oligopéptido ligado N terminal a um domínio intein,

c) Reagir a dita molécula precursora de oligopéptido com hidrazina para gerar uma molécula oligopéptida compreendendo um oligopéptido intermediário, o dito oligopéptido intermediário tendo um grupo terminal hidrazida,

d) Permitir o grupo aldeído ou cetona do primeiro oligopéptido reagir com o grupo hidrazida da molécula oligopéptida intermediária para formar um produto oligopéptido, em que o primeiro oligopéptido e o segundo oligopéptido estão ligados através de um grupo de ligação hidrazina.

13. Um produto oligopéptido produzido pelo método de qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, em que o primeiro e segundo oligopéptidos estão ligados através de um grupo de ligação de Formula II ou Formula III.

14. Um método para rotular um oligopéptido, o método compreende os passos:

a) Garantir uma molécula de rótulo, a molécula de rótulo tendo um grupo de reacção, onde o grupo de reacção é um grupo hidrazina, um grupo hidrazina ou um grupo aminooxi;

b) Garantir o oligopéptido, o oligopéptido tendo um grupo éster activado, onde o grupo éster activado é um grupo

tioéster, um grupo de éster fenólico, um grupo hidroxisuccinimida, ou um grupo O-acilisuurea;

c) permitir ao grupo de reacção da molécula rotulada reagir com o grupo éster activado do oligopéptido para formar o oligopéptido rotulado, em que a molécula rotulada e o oligopéptido são ligados através de um grupo de ligação tendo Formula I, Formula II ou Formula III.

15. O método de acordo com a reivindicação 14, onde no passo (c), onde a dita molécula rotulada e o oligopéptido estão ligados através de um grupo de ligação tendo Formula II e onde o dito grupo de éster activado do passo (b) não é um tioéster, dito éster activado é um grupo éster activado terminal.

16. O método para rotular um oligopéptido, o método compreende os passos:

a) garantir uma molécula rotulada, a molécula rotulada tendo um grupo éster activado do qual o rotulo é acil substituinte, onde o grupo de éster activado é um grupo tioéster, um grupo de éster fenólico, um grupo hidroxisuccinimida ou um O-acilisuurea;

b) garantir o oligopéptido, o oligopéptido tendo um grupo reactivo, onde o grupo reactivo é um grupo hidrazina, um grupo hidrazida ou um grupo aminooxi;

c) permitir o grupo éster activado da molécula rotulada reagir com o grupo reactivo do oligopéptido para formar o oligopéptido rotulado, em que a molécula rotulada e o oligopéptido estão ligados através de um grupo de ligação tendo Formula I, Formula II ou Formula III,

Onde, no passo (c), onde a dita molécula rotulada e o oligopéptido são ligados através de um grupo de ligação tendo Formula II, o dito éster activado é um tioéster.

17. O método de acordo com a reivindicação 16 onde o dito oligopéptido é produzido por reacção de hidrazina com uma molécula precursora, dita molécula precursora compreendendo um precursor de oligopéptido ligado N terminalmente com um domínio intein através de um grupo tioéster.

18. O método para rotular um oligopéptido, o método compreende os passos:

a) garantir um rotulo, o rotulo tendo um grupo reactivo,

b) (i) garantir um uma molécula precursora de oligopéptido, a molécula precursora de oligopéptido compreendendo um oligopéptido ligado N terminalmente a um domínio intein (ii) permitir ao reagente tiol dependente de clivagem da molécula precursora gerar a molécula de oligopéptido, dita molécula de oligopéptido tendo um grupo tioéster no seu C terminal,

c) permitir o grupo reactivo do rotulo reagir com a molécula de oligopéptido para formar um oligopéptido rotulado, em que o rotulo e oligopéptido estão ligados através de um grupo de ligação tendo Formula I, II ou III.

19. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 14 a 16 onde o grupo reactivo é um grupo de aminoóxido e o grupo de éster activado é um tioéster.

20. O método de acordo com a reivindicação 18, onde o grupo reactivo é um grupo de aminoóxido.

21. O método para rotular um oligopéptido, o método compreende os passos:

a) garantir uma molécula rotulada, a molécula rotulada tendo um grupo reactivo, onde o grupo reactivo é um grupo de hidrazina, um grupo de hidrazida ou um grupo de aminoóxi,

b) garantir uma molécula precursora de oligopéptido, a molécula precursora de oligopéptido compreendendo um oligopéptido ligado N terminal a um domínio intein (ii) permitindo clivagem de reagente tiol da molécula precursora para gerar molécula de oligopéptido, dita molécula de oligopéptido tendo um grupo tioéster na seu N terminal,

c) permitir ao grupo reactivo da molécula rotulada reagir com a molécula precursora de oligopéptido para formar um produto oligopéptido rotulado, em que a molécula rotulada e o oligopéptido são ligados através de um grupo de ligação tendo Formula I, Formula II ou Formula III como definido em cima.

22. O método de acordo com as reivindicações de 14 a 21 onde o passo (c) do meto é levado a cabo com um pH no intervalo de pH 6.5 a pH 7.5.

23. O método para rotular um oligopéptido, o método compreendendo os passos:

a) garantir uma molécula rotulada, a molécula rotulada tendo um grupo aldeído ou cetona,

b) garantir uma molécula precursora de oligopéptido, a molécula precursora de oligopéptido compreendendo um

primeiro oligopéptido ligado N terminalmente a um domínio intein,

c) reagir a dita molécula precursora de oligopéptido com a hidrazina para gerar uma molécula de oligopéptido compreendendo um oligopéptido intermediário, dito oligopéptido intermediário tendo um grupo terminal hidrazida,

d) permitir ao grupo aldeído ou cetona da molécula rotulada reagir com o grupo hidrazida da molécula de oligopéptido intermediária para formar um produto oligopéptido rotulado, em que a molécula rotulada e o oligopéptido estão ligados através de um grupo de ligação hidrazona.

24. O método de acordo com as reivindicações 12 ou 23 onde o grupo aldeído ou cetona é um grupo α -dicetona ou α -cetoaldeído.

25. Um oligopéptido rotulado produzido por um método de qualquer uma das reivindicações de 14 a 22 em que o rotulo e o oligopéptido estão ligados através de um grupo de ligação tendo Formula I ou Formula II.

Lisboa,

Mutually reactive groups

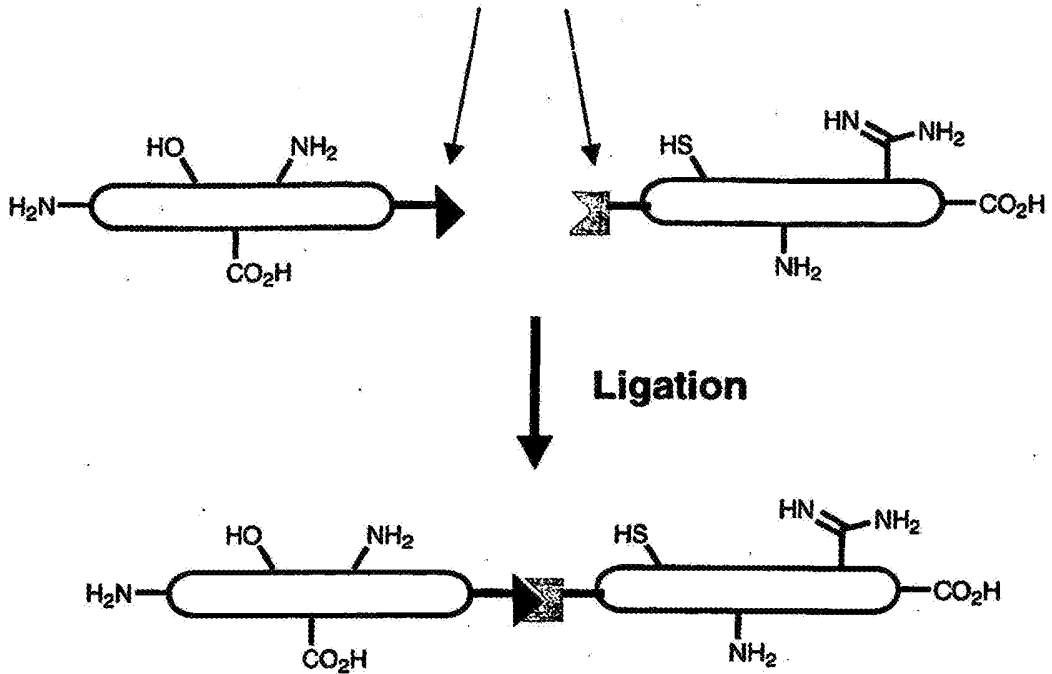


Figure 1 General principle of chemical ligation.

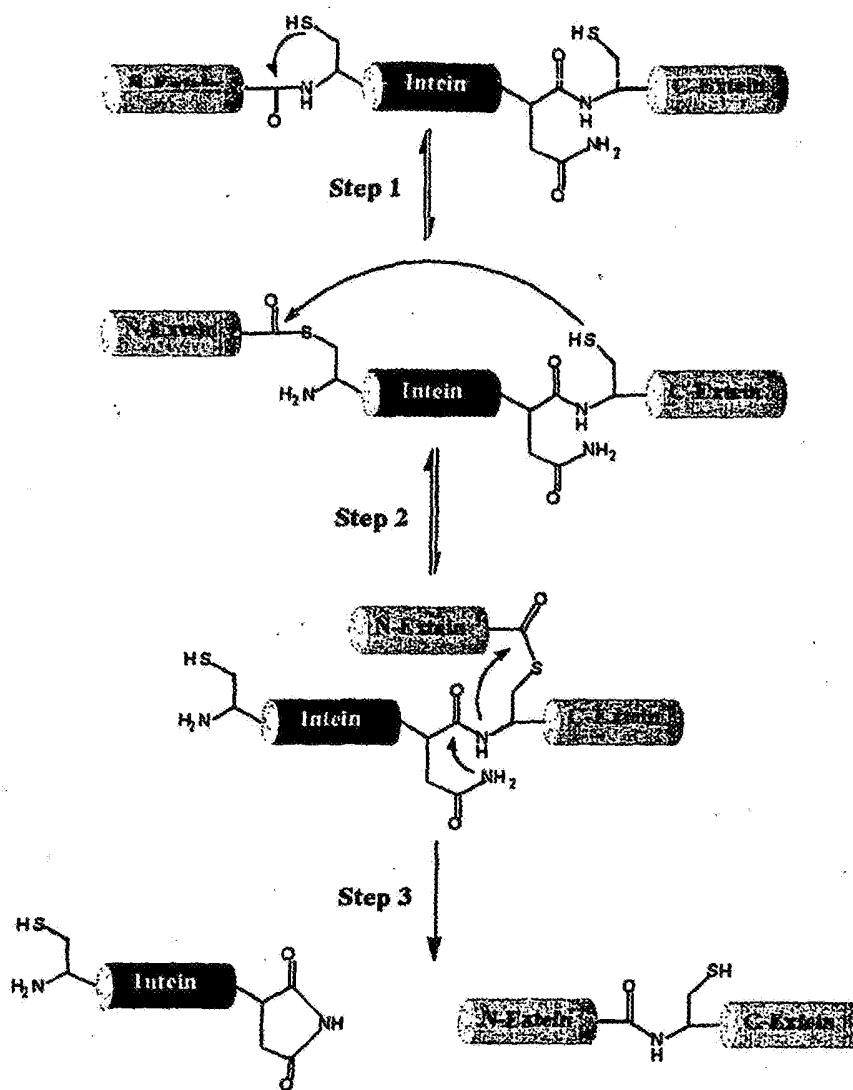


Figure 2 Mechanism of protein splicing

**Clone Gene into Engineered
Intein Expression Vector**

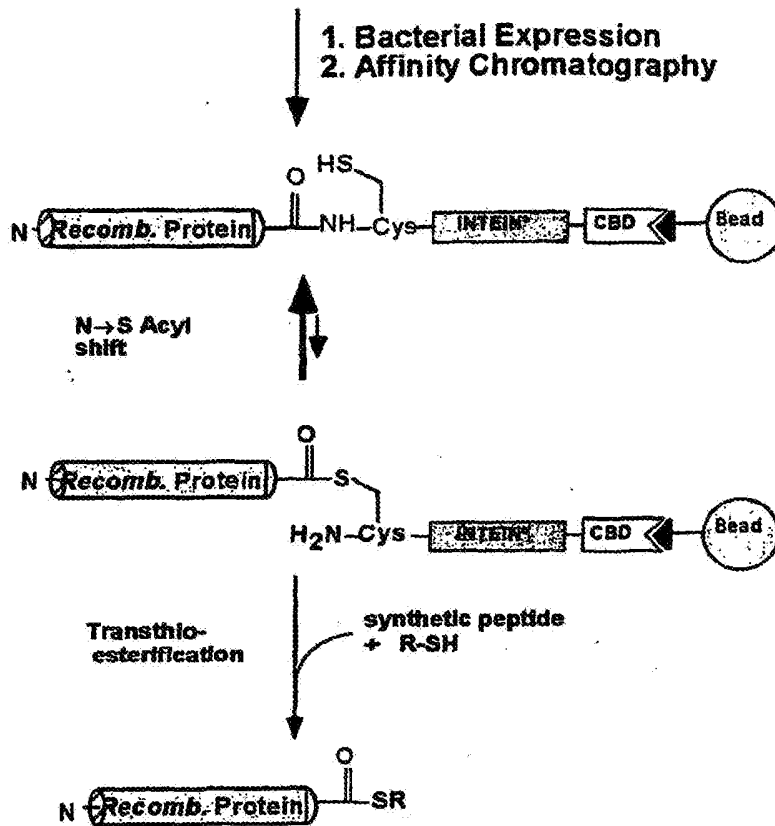


Figure 3 Generation of Recombinant C-terminal Thioester Proteins

Synthetic or recombinant peptide / protein α -thioester

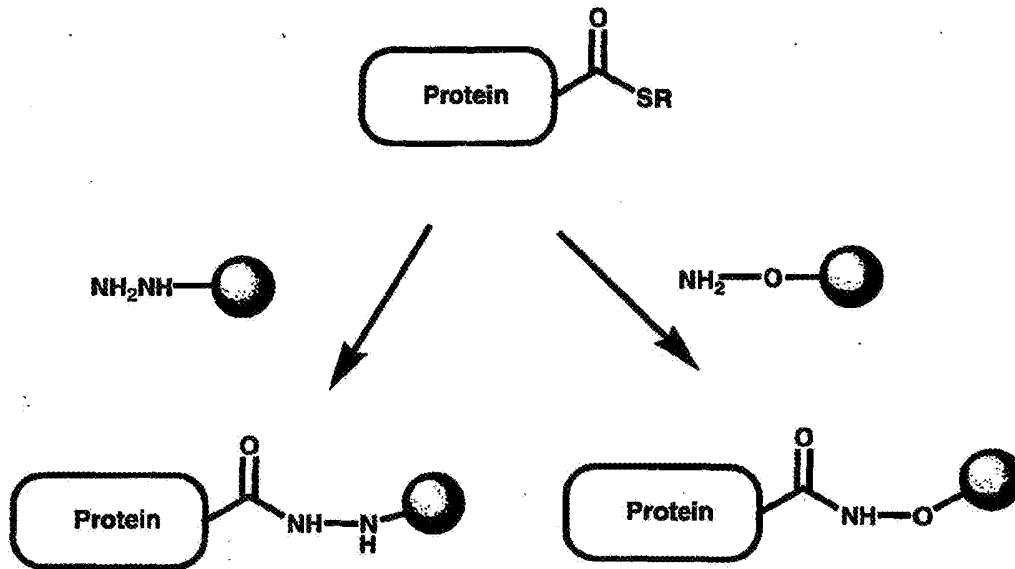


Figure 4 Ligation of protein and peptide thioesters with hydrazine and aminoxy containing entities such as labels, peptides and proteins.

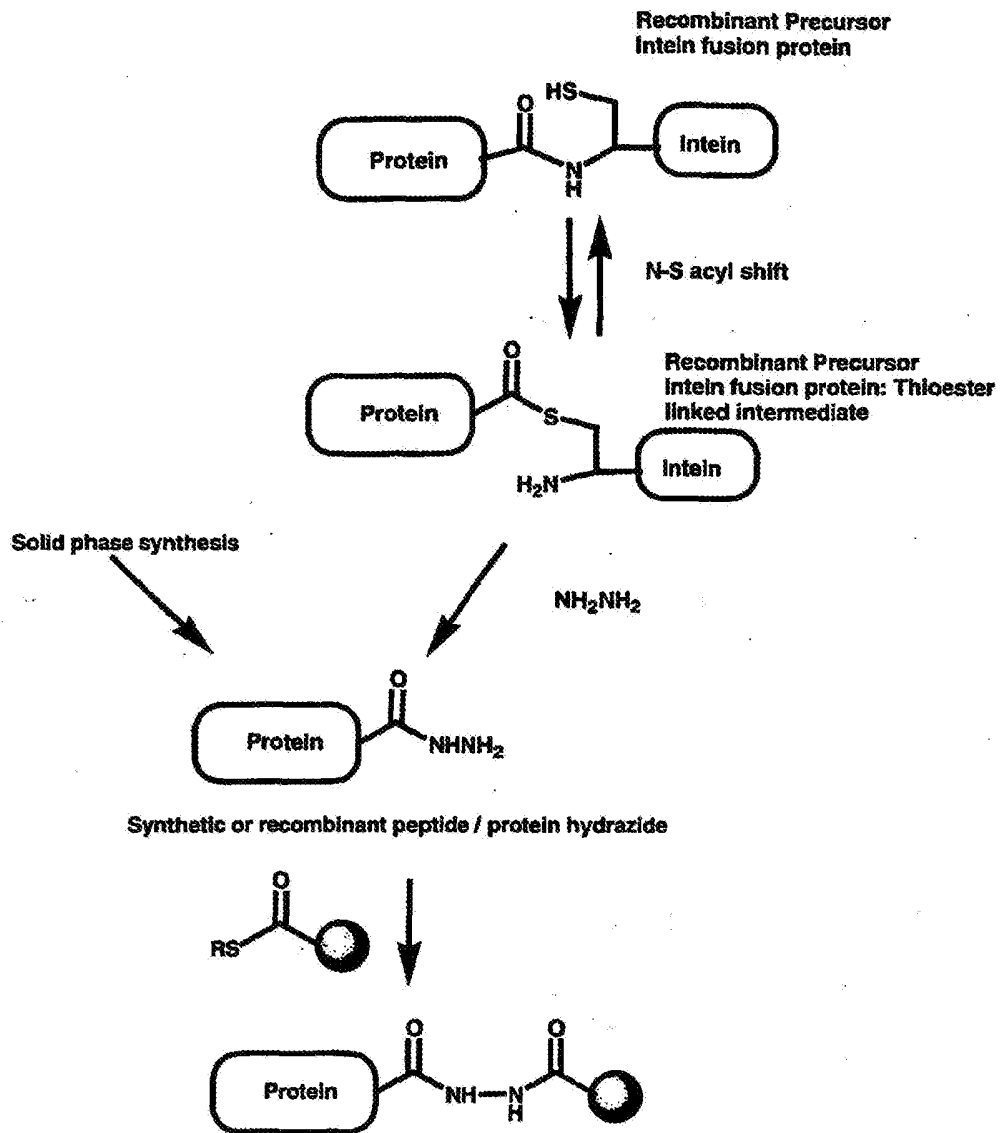


Figure 5 Generation of synthetic and recombinant peptide hydrazides for ligation with thioester containing molecules

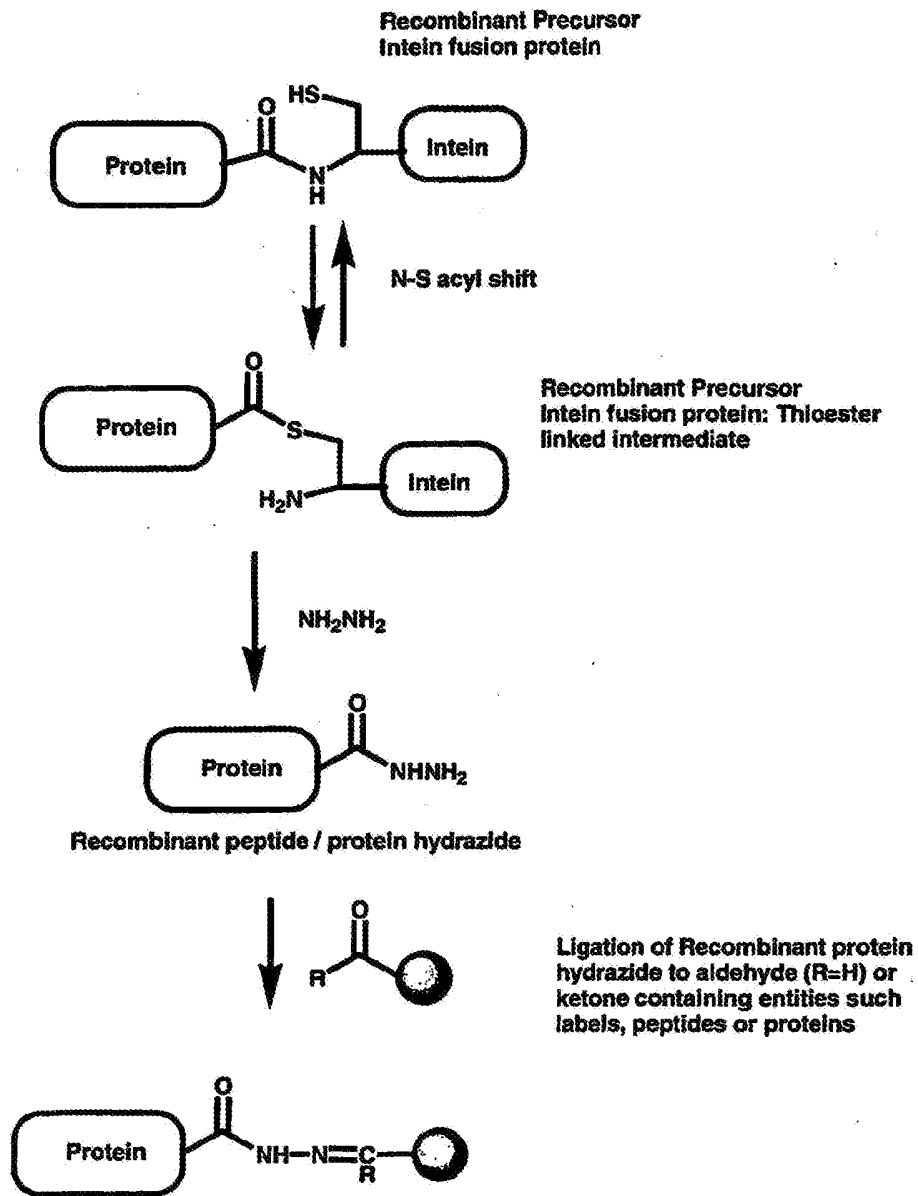


Figure 6 Generation of recombinant peptide hydrazides for ligation with aldehyde and ketone containing molecules

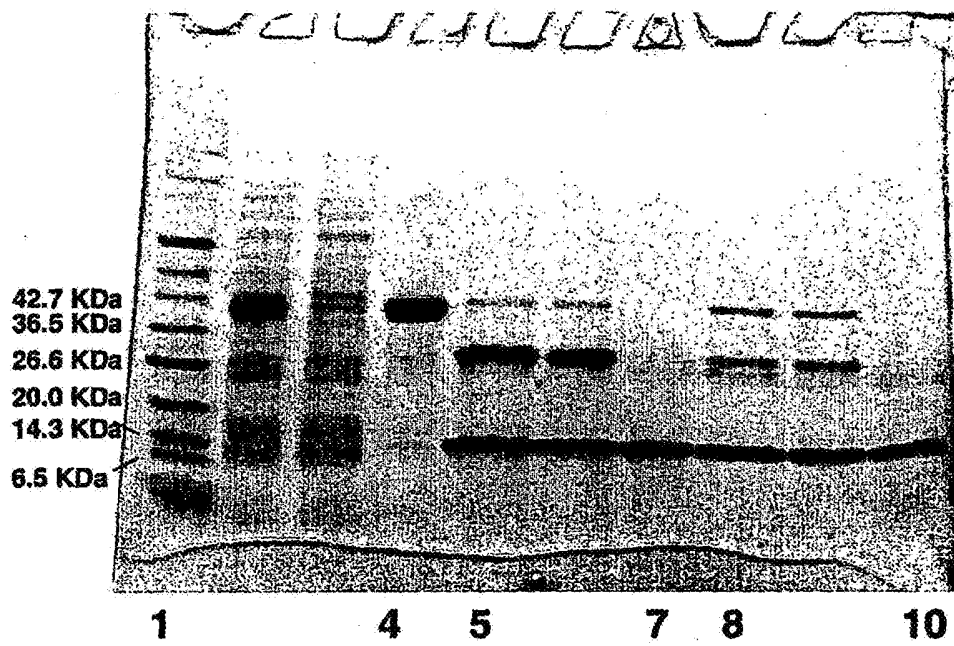


Figure 7

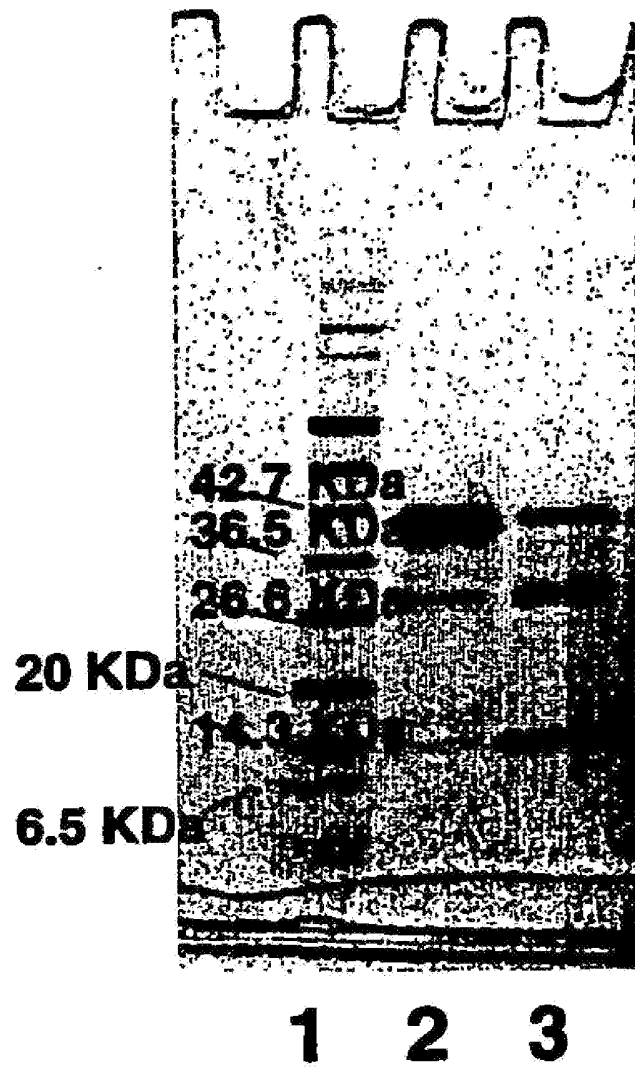


Figure 8

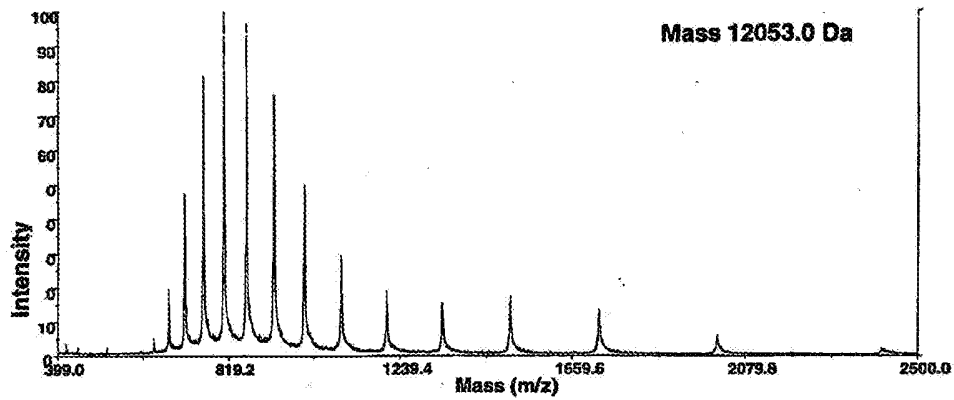


Figure 9. ESMS spectrum of the C-terminal hydrazide derivative of Grb2-SH2

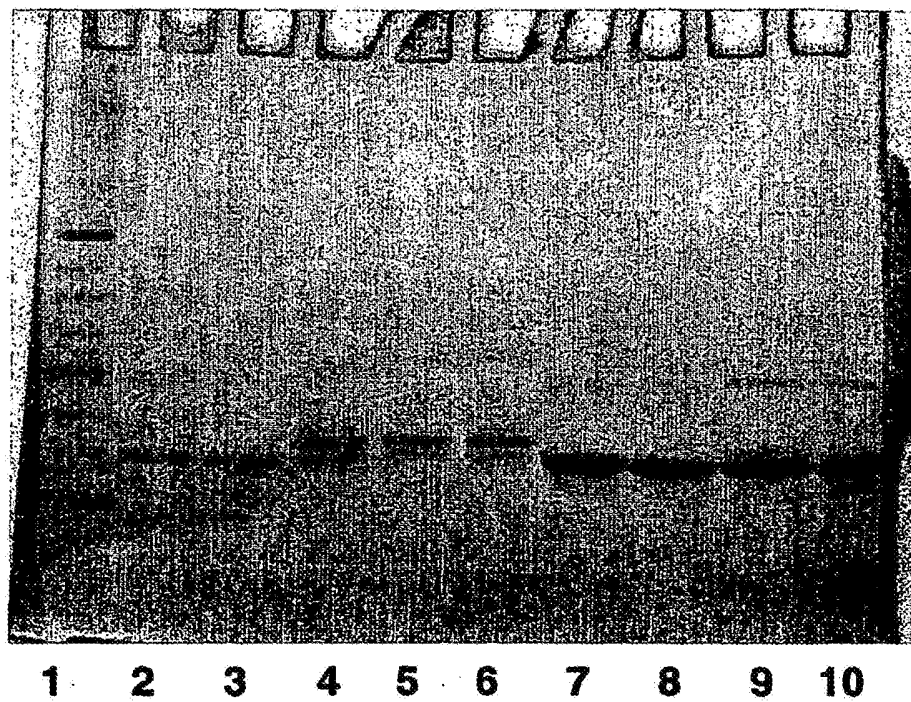


Figure 10. SDS-PAGE analysis of the reaction between synthetic ketone containing peptide CH₃COCO-myc with Grb2-SH2 – C-terminal hydrazide and Cytochrome C.

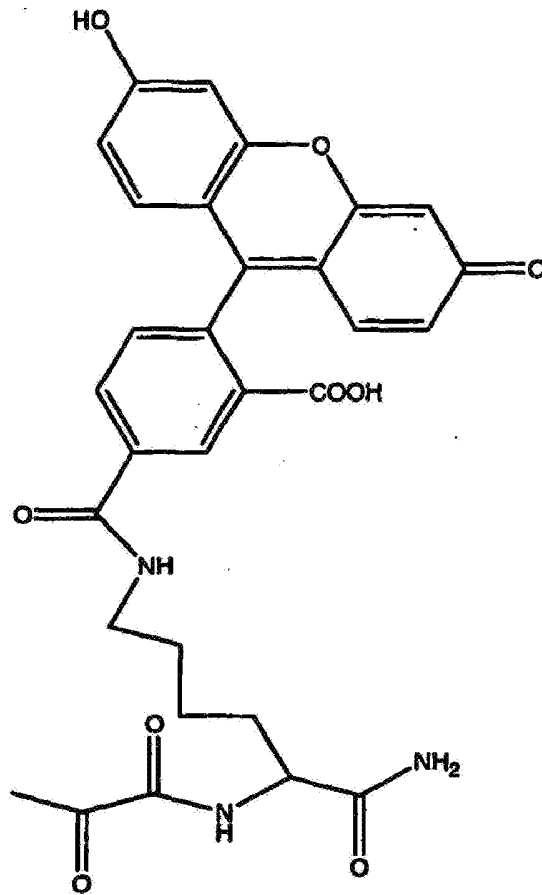


Figure 11 Structure of $\text{CH}_3\text{COCO-Lys(Fl)}$.

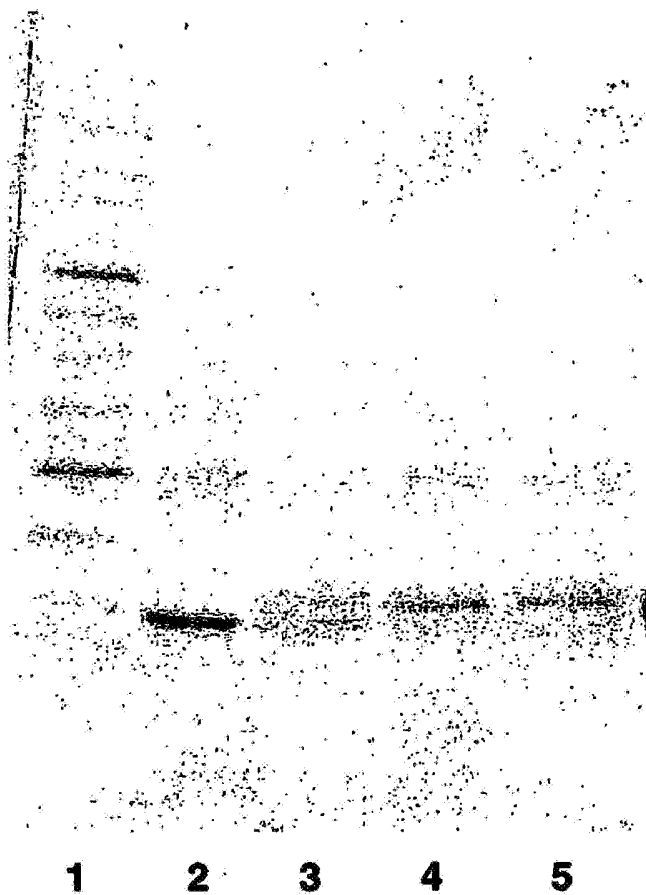


Figure 12

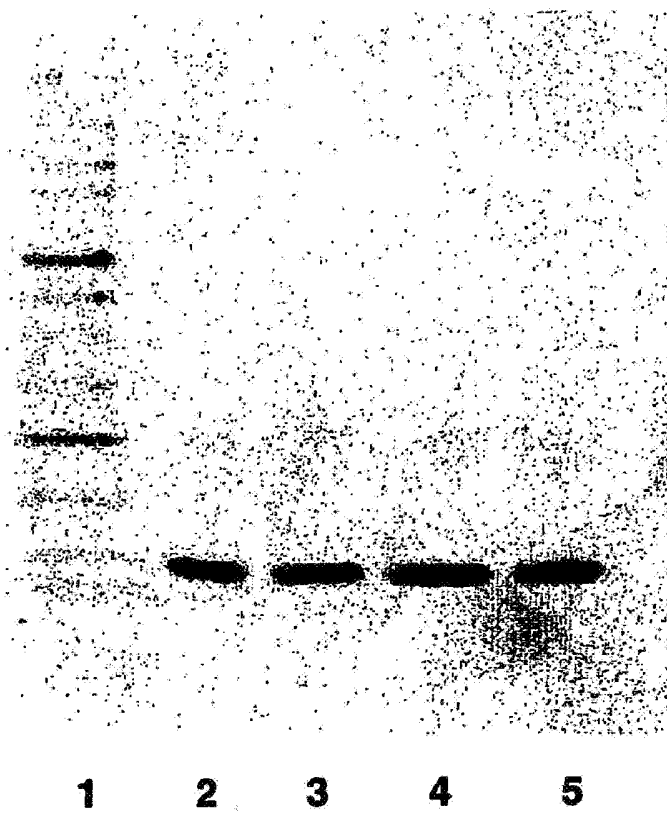


Figure 13

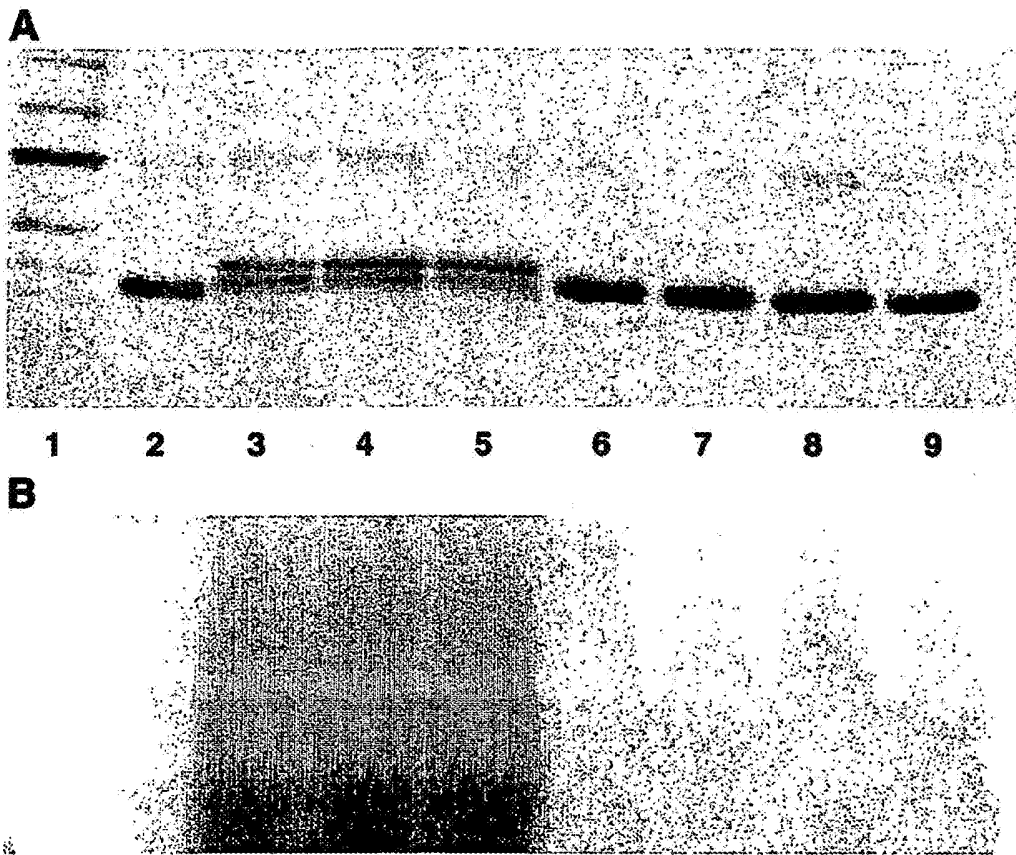


Figure 14

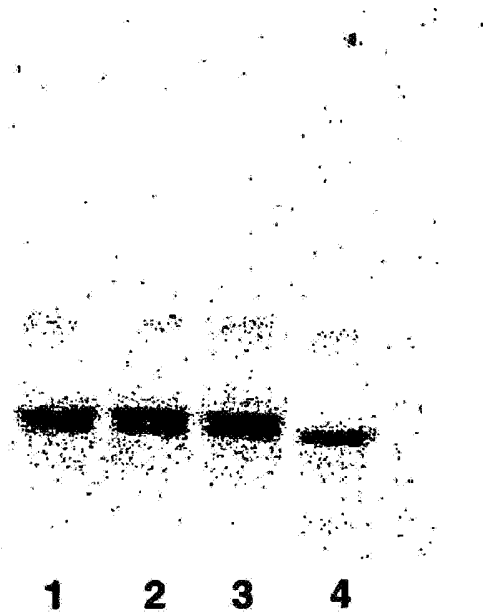


Figure 15.