

österreichisches  
patentamt

(10) **AT 009 391 U1 2007-09-15**

(12)

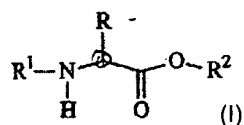
## Gebrauchsmusterschrift

- (21) Anmeldenummer: GM 166/06 (51) Int. Cl.<sup>8</sup>: C07K 1/13  
(22) Anmeldetag: 2000-09-29 C07K 1/107  
(42) Beginn der Schutzdauer: 2007-07-15  
Längste mögliche Dauer: 2010-09-30  
(45) Ausgabetag: 2007-09-15 (60) Abzweigung aus EP 01330471

(73) Gebrauchsmusterinhaber:  
THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE  
92037 LA JOLLA (US).

(54) **MARKIERTE PEPTIDE UND ZWISCHENPRODUKTE, DIE SICH ZU DEREN HERSTELLUNG EIGNEN**

(57) Eine Verbindung der Formel (I):



wobei:

- R<sup>1</sup> Wasserstoff oder eine Amino-Schutzgruppe ist;  
R<sup>2</sup> Wasserstoff oder eine Carboxy-Schutzgruppe ist, die kein (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl ist;  
R ein organischer Rest ist, welches eine oder mehrere Aminoxy-Gruppen umfasst.

AT 009 391 U1 2007-09-15

DVR 0078018

### Hintergrund der Erfindung

Modifizierte Peptide und Proteine stellen bei der Untersuchung von biologischen Prozessen, sowohl in vitro als auch in vivo, wertvolle biophysikalische Werkzeuge dar. Sie können ebenfalls in Assays zur Identifizierung neuer Wirkstoffe und therapeutischer Mittel verwendet werden. Insbesondere revolutioniert die quantitative Bildgebung von lebenden Zellen (quantitative live cell imaging) unter Verwendung von fluoreszierenden Proteinen und Peptiden die Untersuchung der Zellbiologie. Eine herausragende, kürzlich erfolgte Entwicklung auf diesem Gebiet stellt die Konstruktion von Peptid- und Protein-Biosensoren dar, die als Antwort auf Änderungen in ihrer Umgebung, ihres oligomeren Status, ihrer Konformation nach Bindung eines Liganden, ihrer Struktur oder der direkten Bindung von Liganden veränderte Fluoreszenzeigenschaften aufweisen. In geeigneter Weise markierte fluoreszierende Biomoleküle ermöglichen eine räumliche und zeitliche Bestimmung biochemischer Reaktionen innerhalb von lebenden Zellen. Siehe beispielsweise Giuliano, K.A., et al., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1995, 24:405-434; Day, R.N. *Mol. Endocrinol.* 1998, 12:1410-9; Adams, S.R., et al., *Nature* 1991, 349:694; Miyawaski, A., et al., *Nature* 1997, 388:882-7; Hahn, K., et al., *Nature* 1992, 359:736; Hahn, K.M., et al., *J. Biol. Chem.* 1990, 265:20335; und Richieri, G.V., et al., *Mol. Cell, Biochem.* 1999, 192:87-94.

Es wurden Verfahren zur ortsspezifischen Modifizierung von Polypeptiden beschrieben, die mit einschließen: chemisch-selektive Markierung in Lösung (Brinkley, M. *Bioconjugate Chemistry* 1992, 3:2-13) und auf Harz gebundene Peptide (Hackeng, T., et al., *J. Biol. Chem.*, eingereicht); Einbringen von Keton-Aminosäuren über synthetische Verfahren (Rose, K, *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116:30-33; King, T.P., et al., *Biochemistry*, 1986, 25:5774-5779; Rose, K., et al., *Bioconjugate Chem.* 1996, 7:552-556; Marcaurelle, L.A., Bertozzi, C.R. *Tett. Lett.* 1998, 39:7279-7282; und Wahl, F., Mutter, M., *Tett. Lett.* 1996, 37:6861-6864); sowie molekularbiologische Techniken (Cornish, V.W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118:8150).

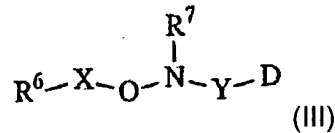
Während jedes dieser Verfahren seine Anwendung bei der Herstellung einer bestimmten Klasse eines Biosensors oder eines markierten Polypeptids findet, haben alle ihre Grenzen, die ihre allgemeine Verwendung einschränken. Die Markierung von Seitenketten natürlicher Aminosäuren in Lösung ist aufgrund des Auftretens vieler anderer kompetierender Nukleophile oftmals nicht durchführbar. Die Verwendung nicht-natürlich auftretender Aminosäuren, wie beispielsweise solcher, die Ketone enthalten, zur selektiven Markierung, erfordert zudem die Synthese von Farbstoff-Konstrukten oder Aminosäuren, welche schwierig herzustellen und kommerziell nicht erhältlich sind.

Zur Zeit sind die wesentlichsten Hindernisse bei der Entwicklung von fluoreszierenden Biosensoren noch immer vorhanden: (1) Das Problem der ortsspezifischen Positionierung des Farbstoffs im Polypeptid und (2) die genaue Bestimmung, welcher Ort für die Anordnung des Farbstoffs optimal ist (Giuliano, K.A., et al., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1995, 24:405-434). Für eine optimale Antwort auf Änderungen der Proteinstruktur ohne eine Interferenz mit der biologischen Aktivität müssen Lösungsmittel-sensitive Farbstoffe und andere biophysikalische Sonden genau angeordnet werden. Weiterhin hat sich das Erfordernis des ortsspezifischen Einbaus zweier Farbstoffe ohne Beeinträchtigung der biologischen Aktivität als ernstzunehmende Limitierung der Verwendung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET, fluorescence resonance energy transfer) innerhalb eines einzelnen Proteins erwiesen. Eine chemische Gesamtsynthese von Proteinen stellt eine mögliche Lösung für diese Probleme bereit (Wilken, J., Kent, S.B.H. *Curr. Op. Biotechnology.* 1998, 9:412; Kent, S.B.H., *Ann. Rev. Biochem.* 1988, 57, 957-989; Dawson, P.E., et al., *Science* 1994, 266:776-779; Muir, T.W., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, 95:6705-6710; und Cotton, G.J., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121:1100-1101). Gleichwohl sind viele für fluoreszierende Biosensoren oder andere Zwecke geeignete biophysikalische Sonden unter den in der Peptidsynthese verwendeten unterschiedlichen Bedingungen nicht stabil und nach der Synthese kann ein ortsspezifischer Einbau nur schwer erreicht werden.



synthetische Zwischenprodukte dar, die so modifiziert werden können, dass sie verwandte Peptide ergeben, welche veränderte biologische, chemische oder physikalische Eigenschaften aufweisen, beispielsweise ein mit einem Fluoreszenzmarker verknüpftes Peptid. Die Erfindung stellt folglich ebenfalls ein Peptid bereit, welches eine oder mehr (z.B. 1, 2, 3 oder 4) Aminoxy-Gruppen aufweist, vorausgesetzt, dass das Peptid nicht Glutathion ist. Die Erfindung stellt ebenfalls ein Peptid zur Verfügung, welches eine oder mehr (z. B. 1, 2, 3 oder 4) sekundäre Aminoxy-Gruppen aufweist.

Die Erfindung stellt allgemein Zwischenprodukte sowie Verfahren zur Verfügung, welche eine ortsspezifische Modifizierung von Peptiden nach deren Synthese ermöglichen. Entsprechend können funktionelle Moleküle selektiv mit einem Peptid verknüpft werden, um ein Peptidkonjugat bereitzustellen, welches veränderte biologische, chemische oder physikalische Eigenschaften aufweist. Beispielsweise können funktionelle Moleküle (z. B. biophysikalische Sonden, Peptide, Polynukleotide und therapeutische Mittel) mit einem Peptid verknüpft werden, um ein Peptidkonjugat bereitzustellen, welches davon abweichende und nützliche Eigenschaften aufweist. Die Erfindung stellt daher ebenfalls eine Verbindung der Formel (III) zur Verfügung:



wobei:

- R<sup>6</sup> ein Peptid ist;
- X eine direkte Bindung oder eine Verknüpfungsgruppe ist;
- R<sup>7</sup> Wasserstoff, ein (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl, eine Amino-Schutzgruppe oder ein Rest ist, umfassend eine oder mehrere Aminoxy-Gruppen;
- Y eine direkte Bindung oder eine Verknüpfungsgruppe ist; und
- D ein funktionelles Molekül ist.

Das funktionelle Molekül ist bevorzugt eine biophysikalische Sonde, wie beispielsweise eine fluoreszierende Gruppe, welche für FRET-Untersuchungen oder andere Untersuchungen verwendet werden kann, die Fluoreszenzsignale verwenden, wie beispielsweise eine Excimer-Paar-Bildung.

Verfahren zur Herstellung von Synthons gemäß der vorliegenden Erfindung sowie die erfindungsgemäßen Proteinkonjugate werden als weitere Gegenstände der Erfindung bereitgestellt und durch die Ausführungen in den unten gezeigten Beispielen näher erläutert.

Die Erfindung stellt daher ein Verfahren zur Herstellung eines Peptidkonjugats zur Verfügung, das ein Peptid und ein funktionelles Molekül umfasst, welches das Umsetzen eines Peptids, das eine oder mehrere Aminoxy-Gruppen aufweist, mit einem korrespondierenden funktionellen Molekül umfasst, das eine elektrophile Gruppe aufweist, um das Peptidkonjugat bereitzustellen.

#### *Kurze Beschreibung der Figuren*

FIG. 1 beschreibt eine allgemeine Strategie zur ortsspezifischen Markierung von Polypeptiden. Die geschützte Aminoxy-Gruppe wird während der Festphasen-Peptidsynthese (es wird die Synthese auf Thioester-Linker-Harz gezeigt) eingebaut; die Abspaltung vom Harz erzeugt ein Peptid, welches ungeschützte Seitenketten, eine Aminoxy-Gruppe und einen C-terminalen Thioester aufweist; und eine Ligation sowie eine darauf folgende ortsspezifische Markierung erzeugt das Vollängen-Peptid mit einem funktionellen Molekül, das an dem Aminoxy-Stickstoff angelagert ist.

FIG. 2 stellt die Synthese von PA-Test- und SA-Test-Peptiden dar.

FIG. 3 zeigt die HPLC-Analyse von aufgereinigtem SA-Test-Peptid (oben) und von Rohprodukten der Reaktion unter optimierten Markierungsbedingungen (unten).

5

FIG. 4 zeigt die Synthese eines geschützten Zwischenprodukts der Erfindung (4).

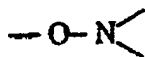
#### *Genaue Beschreibung*

10 Soweit nicht anders beschrieben, werden die folgenden Definitionen verwendet: Alkylen, Alkenylen, Alkynylen, etc. bezeichnen sowohl geradkettige wie auch verzweigte Gruppen; jedoch umfasst der Bezug auf einen einzelnen Rest, beispielsweise "Propylen", lediglich der geradkettige Rest; auf ein Isomer mit einer verzweigten Kette, wie beispielsweise "Isopropylen" wird spezifisch Bezug genommen. Aryl bezeichnet einen Phenylrest oder einen ortho-fusionierten  
15 bityklischen, carbozyklischen Rest, welcher etwa 9 bis 10 Ringatome aufweist, wobei mindestens ein Ring aromatisch ist.

Der Begriff "Aminosäure" schließt Reste der natürlich vorkommenden Aminosäuren (z. B. Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Hyl, Hyp, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr und Val) in D- oder L-Form ein, sowie nicht-natürlich vorkommende Aminosäuren (z. B. Phosphoserin, Phosphothreonin, Phosphotyrosin, Hydroxyprolin, Gamma-Carboxyglutamat, Hippursäure, Octahydroindol-2-carbonsäure, Statin, 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure, Penicillamin, Ornithin, Citrullin,  $\alpha$ -Methylalanin, para-Benzoylphenylalanin, Phenylglycin, Propargylglycin, Sarkosin, und tert-Butylglycin). Der Begriff schließt ebenfalls natürlich und  
20 nicht-natürlich vorkommende Aminosäuren ein, die eine konventionelle Amino-Schutzgruppe tragen (z. B. Acetyl oder Benzyloxycarbonyl), wie auch natürlich und nicht-natürlich vorkommende Aminosäuren, die am Carboxy-Ende geschützt sind (z. B. wie ein (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-, Phenyl- oder Benzylester oder -amid). Andere geeignete Amino- und Carboxy-Schutzgruppen sind Fachleuten bekannt (siehe beispielsweise T.W. Greene, *Protecting Groups In Organic Synthesis*; Wiley: New York, 1981, sowie dort zitierte Referenzen).  
30

Der Begriff "Peptid" schließt jede Sequenz von 2 oder mehr Aminosäuren ein. Die Sequenz kann linear oder zyklisch sein. Ein zyklisches Peptid kann beispielsweise durch Bildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinresten in einer Sequenz hergestellt werden bzw. daraus resultieren. Der Begriff schließt daher Proteine, Enzyme, Antikörper, Oligopeptide und Polypeptide ein. Insbesondere hier genannte Peptidsequenzen werden mit dem Amino-Ende auf der linken Seite und dem Carboxy-Ende auf der rechten Seite dargestellt.  
35

Eine "Aminoxy-Gruppe" ist eine Gruppe, die die folgende Formel aufweist  
40



45 wobei die offenen Valenzen durch jeden geeigneten Rest aufgefüllt werden. Eine "sekundäre Aminoxy-Gruppe" ist eine Aminoxy-Gruppe, bei der eine der offenen Valenzen am Stickstoff durch einen sich von Wasserstoff unterscheidenden Rest aufgefüllt wird.

Der Begriff "funktionelles Molekül" schließt jede Verbindung ein, die mit einem Peptid zur Bereitstellung eines Peptidkonjugats verknüpft werden kann, welches nützliche Eigenschaften aufweist. Solche Konjugate können bei der Untersuchung der Struktur oder der Funktion des Peptids nützlich sein. Solche Konjugate können ebenfalls beim Wirkstoff-Screening, als pharmakologische Werkzeuge, als Forschungswerkzeuge oder als therapeutische Mittel einsetzbar sein. Beispielsweise schließt der Begriff „funktionelles Molekül“ biophysikalische Sonden, Peptide, Polynukleotide, therapeutische Mittel, Cross-Linking-Gruppen (chemisch oder photochemisch),  
50  
55

eine die biologische Aktivität des Peptids modifizierende Verbindung oder ein eingeschlossenes Molekül (z. B. ein Reportermolekül oder ein biologisch aktives Mittel, welches maskiert ist und über Photoaktivierung oder durch chemische Mittel demaskiert werden kann) ein.

- 5 Der Begriff "biophysikalische Sonde" schließt jede Gruppe ein, welche *in vitro* oder *in vivo* detektiert werden kann, wie beispielsweise eine fluoreszierende Gruppe, eine phosphoreszierende Gruppe, einen Nukleinsäure-Indikator, eine ESR-Sonde, eine andere Reportergruppe, einen Rest, oder einen Farbstoff, welcher sensitiv bzw. empfindlich auf pH-Änderungen, Ligandenbindung oder andere Umgebungsaspekte reagiert.

10

Aminosäuren und Peptide, welche eine oder mehrere Aminoxy-Gruppen einschließen, sind für die Herstellung von Peptidkonjugaten verwendbare Zwischenprodukte. Die Aminoxy-Gruppe(n) kann/können typischerweise an jeder geeigneten Position auf der Aminosäure oder dem Peptid lokalisiert sein. Die Aminoxy-Gruppe(n) kann/können in geeigneter Weise in die Seitenkette der Aminosäure oder in eine oder mehr Seitenketten des Peptids eingebaut werden. Wie hier in Bezug auf die Aminosäuren und Peptide der Erfindung verwendet, schließt der Begriff "einen Rest, umfassend eine oder mehrere Aminoxy-Gruppen" daher jede organische Gruppe ein, welche an die Aminosäure oder das Peptid angelagert werden kann, welches eine oder mehrere Aminoxy-Gruppen enthält. Der Begriff schließt bspw. eine Kohlenstoffkette ein, welche zwei bis zehn Kohlenstoffatome aufweist; welche optional teilweise ungesättigt ist (d. h. eine oder mehr Doppel- oder Dreifachbindungen enthält); wobei die Kette optional durch eine oder mehrere (z. B. 1, 2 oder 3) -NH-, -O-, oder -S- unterbrochen wird; wobei die Kette optional am Kohlenstoff mit einer oder mehreren (z. B. 1, 2 oder 3) Oxo(=O)-Gruppen substituiert ist; und wobei die Kette optional mit einer oder mehreren (z. B. 1, 2 oder 3) Aminoxy-Gruppen substituiert ist. Bevorzugt ist/sind die Aminoxy-Gruppe(n) (eine) sekundäre Aminoxy-Gruppe(n).

15

20

25

30

Der Begriff "Cross-Linking-Gruppe" bezieht sich auf jede Funktionalität, die eine Bindung mit einer anderen Funktionalität eingehen kann, beispielsweise eine Photoaffinitäts-Markierung oder ein chemisches Cross-Linking-Mittel.

35

Der Begriff "eingeschlossenes Molekül" schließt ein Molekül oder eine Reportergruppe ein, welche so maskiert ist, dass diese zu einem vorgegebenen Zeitpunkt oder an einem Ort der Wahl aktiviert (d. h. demaskiert) werden kann, beispielsweise unter Verwendung von Licht oder einem chemischen Mittel.

40

Die weiter unten für Reste, Substituenten und Bereiche aufgeführten spezifischen und bevorzugten Werte dienen lediglich zur Illustration; sie schließen andere definierte Werte oder andere Werte innerhalb definierter Bereiche für die Reste und Substituenten nicht aus.

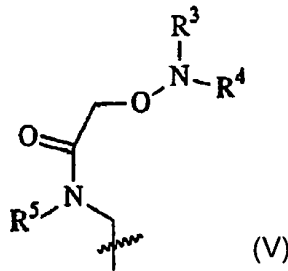
45

Insbesondere kann ein (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl ein Methylen, Ethylen, Propylen, Isopropylen, Butylen, iso-Butylen, sec-Butylen, Pentylen oder Hexylen sein; (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)Cycloalkyl kann ein Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl, oder Cyclooctyl sein; (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkenylen kann Vinylen, Allylen, 1-Propenylen, 2-Propenylen, 1-Butenylen, 2-Butenylen, 3-Butenylen, 1-Pentenylen, 2-Pentenylen, 3-Pentenylen, 4-Pentenylen, 1-Hexenylen, 2-Hexenylen, 3-Hexenylen, 4-Hexenylen, oder 5-Hexenylen sein; (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkynylen kann Ethynylen, 1-Propynylen, 2-Propynylen, 1-Butynylen, 2-Butynylen, 3-Butynylen, 1-Pentynylen, 2-Pentynylen, 3-Pentynylen, 4-Pentynylen, 1-Hexynylen, 2-Hexynylen, 3-Hexynylen, 4-Hexynylen, oder 5-Hexynylen sein; und Aryl kann Phenyl, Indenyl oder Naphthyl sein;

50

Ein spezifischer Wert für R ist ein Rest der Formel (V):

55



10 wobei:

$R^3$  Wasserstoff, ein (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl, eine Amino-Schutzgruppe oder ein Rest ist, umfassend eine oder mehrere Aminoxy-Gruppen;

$R^4$  Wasserstoff oder eine Amino-Schutzgruppe ist; und

15  $R^5$  Wasserstoff oder ein (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl ist.

Ein spezifischer Wert für  $R^1$  ist Wasserstoff oder Benzyloxycarbonyl.

Ein spezifischer Wert für  $R^2$  ist Wasserstoff.

20

Ein spezifischer Wert für  $R^3$  ist Methyl.

Ein spezifischer Wert für  $R^4$  ist Wasserstoff, 2-Chlorbenzyloxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl.

25

Ein spezifischer Wert für  $R^5$  ist Wasserstoff.

Ein spezifischer Wert für  $R^6$  ist ein Antikörper.

30

Ein spezifischer Wert für  $R^6$  ist ein Peptid, welches etwa 2 bis etwa 1000 Aminosäuren einschließt. Ein stärker spezifischer Wert für  $R^6$  ist ein Peptid, welches etwa 5 bis etwa 500 Aminosäuren einschließt. Ein noch spezifischerer Wert für  $R^6$  ist ein Peptid, welches etwa 10 bis etwa 100 Aminosäuren einschließt.

35

Insbesondere ist X eine Verknüpfungsgruppe, welche eine Länge von etwa 5 Angström bis etwa 100 Angström aufweist. Noch genauer ist X eine Verknüpfungsgruppe mit einer Länge von etwa 5 Angström bis etwa 25 Angström.

40

Insbesondere ist X ein  $-R_a-C(=O)-NH-R_b-$ , wobei jedes von  $R_a$  und  $R_b$  unabhängig voneinander ein (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkylen darstellt. Bevorzugt ist jedes von  $R_a$  und  $R_b$  ein Methylen (-CH<sub>2</sub>-).

Ein bevorzugter Wert für  $R^6$  ist KKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGF DACTGEFTGMPEQ-WARLLQT (SEQ ID NO: 1)

45

Ein spezifischer Wert für  $R^7$  ist Wasserstoff.

Ein weiterer spezifischer Wert für  $R^7$  ist ein (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl.

Ein bevorzugter Wert für  $R^7$  ist Methyl.

50

Insbesondere ist Y eine Verknüpfungsgruppe mit einer Länge von etwa 5 Angström bis etwa 100 Angström. Noch genauer ist Y eine Verknüpfungsgruppe mit einer Länge von etwa 5 Angström bis etwa 25 Angström.

55

Ein spezifischer Wert für Y ist (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkylen.

Ein bevorzugter Wert für Y ist Methylen (-CH<sub>2</sub>-).

Die biophysikalische Sonde kann bevorzugt ein Alexa-Farbstoff sein, ein solvatochromatischer Farbstoff, ein elektrochromatischer Farbstoff oder ein Farbstoff, welcher sensitiv bzw. empfindlich auf eine pH-Änderung, Ligandenbindung oder andere Umgebungsaspekte reagiert.

Bevorzugte fluoreszierende Gruppen schließen Moleküle ein, welche in der Lage sind, eine Strahlung bei einer Wellenlänge zu absorbieren und eine Strahlung bei einer anderen Wellenlänge zu emittieren, wie beispielsweise Alexa-532, Hydroxycumarin, Aminocumarin, Methoxycumarin, Aminomethylcumarin, Kaskaden-Blau, Luzifer-Gelb, NBD, P-Phycoerythrin, R-Phycoerythrin, (PE), PE-Cy5-Konjugate, PE-Cy7-Konjugate, Rot-613, Fluorescein, BODIPY-FL, BODIPY-TR, BODIPY-TMR, Cy3, TRITC, X-Rhodamin, Lissamin-Rhodamin-B, PerCP, Texas-Rot, Cy5, Cy7, Allophycocyanin (APC), TruRed, APC-Cy7-Konjugate, Oregon-Grün, Tetramethylrhodamin, Dansyl, Indo-1, Fura-2, FM-1-43, DiI18(3), Carboxy-SNARF-1, NBD, Indo-1, Fluo-3, DCFH, DHR, SNARF, Monochlorbiman und Calcein. Stärker bevorzugte fluoreszierende Gruppen schließen Rhodamin und Alexa-532 ein.

Bevorzugte Nukleinsäureindikatoren schließen interkalierende Mittel und Oligonukleotidstränge ein, wie beispielsweise YOYO-1, Propidiumiodid, Hoechst-33342, DAPI, Hoechst-33258, SYTOX-Blau, Chromomycin-A3, Mithramycin, SYTOX-Grün, SYTOX-Orange, Ethidiumbromid, 7-AAD; Acridin-Orange, TOTO-1, TO-PRO-1, Thiazol-Orange, Propidiumiodid, TOTO-3, TO-PRO-3, LDS-751.

Die synthetischen Zwischenprodukte (d. h. Synthons) gemäß der vorliegenden Erfindung, die eine oder mehrere Aminoxy-Gruppen enthalten, können unter Verwendung einer Vielzahl von Techniken, die im Stand der Technik bekannt sind, in Peptide eingebaut werden. Wie unten diskutiert, können die Synthons beispielsweise in ein Peptid unter Verwendung einer Festphasen-Peptidsynthese, einer Peptidsynthese in löslicher Phase, einer nativen chemischen Ligation, einer Intein-vermittelten Protein-Ligation und einer chemischen Ligation, eingebaut werden.

Die Peptide können unter Verwendung einer Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) hergestellt werden. Gemäß der SPPS-Technik können beispielsweise geschützte Aminosäuren in organischen Lösungsmitteln zu einer Harz-gebundenen Peptidkette (jeweils nacheinander) zugegeben werden, was zur Anordnung eines Zielpeptids (target peptide) führt, welches eine spezifische Sequenz in vollständig geschützter, Harz-gebundener Form aufweist. Das Produkt-Peptid kann anschließend durch Entschützung und Abspaltung vom Harz-Träger freigesetzt werden (Wade, L.G., JR., Organic Chemistry 4th Ed. (1999)). Wie unten in Beispiel 2 beschrieben, können unter Verwendung von SPPS Aminosäuren, die eine Aminoxy-funktionelle Gruppe enthalten, in Peptide eingebaut werden. Die Verwendung dieser Methode ermöglicht es, eine Aminosäure, welche eine Aminoxy-funktionelle Gruppe enthält, an einer gewünschten Position innerhalb einer synthetisierten Peptidkette zu positionieren.

Aminosäuren, die eine Aminoxy-Gruppe enthalten, können ebenfalls unter Verwendung einer Peptidsynthese in löslicher Phase in ein Peptid eingebaut werden (Wade, L.G., JR. Organic Chemistry 4th Ed. (1999)). Eine Peptidsynthese in löslicher Phase umfasst das Schützen des Amino-Endes einer Peptidkette, gefolgt von einer Aktivierung des Carboxy-Endes, was die Addition einer Aminosäure oder einer Peptidkette an das Carboxy-Ende ermöglicht (Wade, L.G., JR. Organic Chemistry 4th Ed. (1999)).

Eine native chemische Ligation ist ein Verfahren, welches verwendet werden kann, um zwei Peptide miteinander zu verbinden und damit ein einziges Peptid zu erzeugen, welches eine native Rückgrat(„Backbone“)-Struktur aufweist. Eine native chemische Ligation wird typischerweise durch Mischen eines ersten Peptids mit einem Carboxy-terminalen  $\alpha$ -Thioester und einem zweiten Polypeptid mit einem Amino-terminalen Cystein ermöglicht (Dawson, P.E., et al., (1994) Science 266:776-779; Cotton, G.J., et al., (1999), J. Am. Chem. Soc. 121:1100-1101).

Der Thioester des ersten Peptids wird einem nukleophilen Angriff durch die Seitenkette des Cysteinrestes am Amino-Ende des zweiten Peptids ausgesetzt. Das Ausgangsprodukt der Ligation des Thioesters geht anschließend aufgrund der bevorzugten geometrischen Anordnung der alpha-Aminogruppe des zweiten Peptids eine schnelle intramolekulare Reaktion ein. Dies führt zu einem Produkt mit einer nativen Peptidbindung an der Ligationsstelle. Ein mit Cystein beginnendes Polypeptid kann durch Intein-Vektoren, Proteolyse oder zelluläre Prozessierung des Start-Methionins chemisch synthetisiert oder erzeugt werden. Dieses Verfahren ermöglicht das Mischen und Zusammenbringen chemisch synthetisierter Polypeptidsegmente.

Die erfindungsgemäßen Synthons sind insbesondere in Kombination mit nativer chemischer Ligation einsetzbar, da es die native chemische Ligation ermöglicht, dass ein synthetisches Peptid, welches eine spezifisch positionierte Aminosäure (z. B. ein Synthon gemäß der Erfindung) aufweist, selektiv mit einem anderen Peptid ligiert wird. Die Fähigkeit, Aminoxy-modifizierte Aminosäuren spezifisch in eine Peptidkette einzubauen, ermöglicht es, nützliche Reste an jeder Position innerhalb eines Peptids zu verknüpfen. Beispiele solcher Reste, die in ein Peptid unter Verwendung dieses Verfahrens eingebaut werden können, schließen ein, ohne darauf begrenzt zu sein, phosphorylierte oder glykosylierte Aminosäuren, nicht-natürlich auftretende Aminosäuren, Tags, Markierungen (Label), Cross-Linking-Reagenzien, Biosensoren, reaktive Gruppen und Fluorophore. Ein anderer Vorteil der nativen chemischen Ligation ist, dass sie den Einbau von Peptiden in ein Peptid ermöglicht, welche nicht über eine ribosomale Biosynthese hinzugefügt werden können.

Eine Intein-vermittelte Proteinligation kann ebenfalls verwendet werden, um Aminosäuren, die Aminoxy-funktionelle Gruppen enthalten, selektiv in Peptiden zu positionieren. Inteine sind zwischengeschaltete Sequenzen, die aus Vorläuferproteinen über einen autokatalytischen Mechanismus ausgeschnitten werden und dabei die reaktiven Enden eines Peptids offen legen. Es wurden Intein-Vektoren entwickelt, die nicht nur die Aufreinigung von Proteinen in einem einzigen Schritt ermöglichen, sondern ebenfalls Polypeptide mit reaktiven Enden erzeugen, die für die Intein-vermittelte Proteinligation (IPL) (ebenfalls Ligation exprimierter Proteine genannt) (EPL, expressed protein ligation) erforderlich sind (Perler, F.R. und Adam, E., (2000) *Curr. Opin. Biotechnol.* 11(4):377-83; und Evans, T.C., et al., (1998) *Protein Sci* 7:2256-2264). Dieses Verfahren ermöglicht es, ein Peptid, welches eine selektiv positionierte Aminosäure aufweist, die eine Aminoxy-funktionelle Gruppe enthält, mit irgendeinem Peptid leicht zu ligieren, welches über das Ausschneiden eines Inteins erzeugte reaktive Enden aufweist.

Auch durch Anwendung einer chemischen Ligation können zwei Peptide miteinander verknüpft werden. Eine chemische Ligation tritt dann auf, wenn zwei Peptidsegmente jeweils mit funktionellen Gruppen verknüpft werden, die miteinander in einer solchen Weise eine Reaktion eingehen, dass sie eine kovalente Bindung unter Erzeugung einer Nicht-Peptid-Bindung an der Ligationsstelle bilden (Wilken, J. und Kent, S.B.H., (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:412-426). Dieses Verfahren kann eingesetzt werden, um ein Peptid, das eine spezifisch positionierte Aminoxy-funktionelle Gruppe aufweist, mit einem anderen Peptid zu verknüpfen, um ein gewünschtes Peptid zu erzeugen, welches später mit einer detektierbaren Gruppe verknüpft werden kann.

An ein Peptid, welches eine Aminoxy-Gruppe umfasst, kann ein funktionelles Molekül ("D") über eine direkte Verknüpfung (z. B. eine Amid-Bindung -O-N-C(=O)-D) oder mittels einer Verknüpfungsgruppe angelagert werden. Die Struktur der Verknüpfungsgruppe ist nicht entscheidend, vorausgesetzt, dass diese sich nicht störend auf die Verwendung des zu erhaltenden markierten Peptids auswirkt. Bevorzugte Verknüpfungsgruppen schließen Linker ein, die den Aminoxy-Stickstoff und die detektierbare Gruppe etwa 5 Angström bis etwa 100 Angström voneinander trennen. Andere bevorzugte Verknüpfungsgruppen trennen den Aminoxy-Stickstoff und die detektierbare Gruppe voneinander um etwa 5 Angström bis etwa 25 Angström.

Die Verknüpfungsgruppe kann beispielsweise einfach mit der detektierbaren Gruppe verknüpft werden über eine: 1) Amid (-N(H)C(=O)-, -C(=O)N(H)-), 2) Ester (-OC(=O)-, -C(=O)O-), 3) Ether (-O-), 4) Thioether (-S-), 5) Sulfinyl (-S(O)-), oder 6) Sulfonyl (-S(O<sub>2</sub>))-Verknüpfung. Solch eine Verknüpfung kann aus in geeigneter Weise funktionalisierten Ausgangsmaterialien unter Verwendung von synthetischen Verfahren gebildet werden, die im Stand der Technik bekannt sind.

Die Verknüpfungsgruppe kann einfach mit dem Stickstoff der Aminoxy-Gruppe zur Bildung einer Amid (-O-N(H)C(=O)-) oder einer Thioharnstoff (-O-N-C(=S)-N)-Verknüpfung unter Verwendung von Reagenzien und Bedingungen verknüpft werden, die im Stand der Technik bekannt sind.

Die Aminoxy-Gruppe kann an ein Peptid über eine direkte Bindung (z. B. eine Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung) zwischen dem Aminoxy-Sauerstoff und einer Seitenkette des Peptids angelagert werden, oder die Aminoxy-Gruppe kann an das Peptid über eine Verknüpfungsgruppe angelagert werden. Die Struktur der Verknüpfungsgruppe ist nicht wesentlich, vorausgesetzt, dass sich diese nicht störend auf die Verwendung des zu erhaltenden markierten Peptids auswirkt. Bevorzugte Verknüpfungsgruppen schließen Verknüpfungsgruppen ein, die den Aminoxy-Sauerstoff und die Seitenkette des Peptids etwa 5 Angström bis etwa 100 Angström voneinander trennen. Andere bevorzugte Verknüpfungsgruppen trennen den Aminoxy-Sauerstoff und die Seitenkette des Peptids voneinander um etwa 5 Angström bis etwa 25 Angström.

Eine spezifische Verknüpfungsgruppe (z. B. X oder Y) kann eine divalente (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkylen-, (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkenylen- oder (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkynylen-Kette oder ein divalentes (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)Cycloalkyl oder ein Arylring sein.

Es wurde daher ein einfaches und effizientes synthetisches Verfahren zur ortsspezifischen Markierung von Peptiden nach deren Synthese entwickelt, welches eine hohe Ausbeute, Selektivität und Kompatibilität sowohl mit einer Festphasen-Peptidsynthese und C<sup>α</sup>-Thioesterpeptiden bereitstellt. Der Ansatz und grundlegende Vorteile können wie folgt zusammengefasst werden:

- (1) Es wurde eine geschützte Aminoxy-Aminosäure synthetisiert, welche in Peptide eingebaut werden kann;
- (2) es wurden Verfahren optimiert, um eine höchst effiziente und spezifische Modifizierung des Aminoxy-Stickstoffs in der Anwesenheit nicht-geschützter kompetierender Nukleophile zu erzielen, welche Cystein, Lysin und Aminogruppen einschließen;
- (3) ein bevorzugtes Elektrophil, welches zur Markierung verwendet werden kann, ein aktivierter Carbonsäureester, ist für die meisten der kommerziell erhältlichen Fluoreszenzfarbstoffe und -markierungen leicht erhältlich;
- (4) die Markierung der Aminoxy-Gruppe erfolgt nach der Synthese und Aufreinigung, was folglich die Verwendung von chemisch sensitiven Fluorophoren und Markierungen ermöglicht, die andernfalls frühere synthetische Verfahren nicht überleben würden;
- (5) das synthetische Verfahren ist mit den zur Synthese von Proteinen über eine chemische Gesamtsynthese oder über eine Ligation von exprimiertem Protein erforderlichen Schritten kompatibel, nämlich der Synthese von C<sup>α</sup>-Peptidthioestern und Ligationen unter Bildung von Amid; und
- (6) kombinatorisches Screening sowohl des funktionellen Moleküls als auch seine Positionierung wird die schnelle Synthese von optimal markierten Polypeptid-basierten Biosensoren ermöglichen.

Die Erfindung wird im folgenden durch die nicht-begrenzenden Beispiele erläutert.

*Beispiel 1. Ortsspezifische Markierung einer sekundären Aminoxy-Gruppe*

Unter kontrollierten pH-Bedingungen legten der niedrige pKa und die erhöhte Nukleophilie einer Aminoxy-Gruppe im Verhältnis zu anderen nukleophilen Seitenketten, die in Peptiden gefunden wurden, die Möglichkeit einer ortsspezifischen Reaktion mit Standardelektrophilen, wie beispielsweise Succinimidylestern, nahe (Figur 1). Während die selektive Markierung einer primären Aminoxy-Gruppe im Kontext eines nicht-geschützten Peptids erreicht wurde, schlugen erhebliche Anstrengungen, die primäre Aminoxy-Gruppe während der Synthese zu nutzen, fehl. Selbst bei einem Schutz als 2-Chlorbenzyloxycarbonylcarbammat ermöglichte die Deprotonierung der primären Aminoxy-Gruppe eine schnelle Acylierung, so dass diese während der Peptidsynthese nicht so leicht eingebaut werden konnte. Unter bestimmten Bedingungen kann daher die Verwendung einer sekundären Aminoxy-Gruppe bevorzugt sein.

Es wurde ein Testpeptid hergestellt, welches sowohl eine sekundäre Aminoxy-Gruppe als auch nukleophile Aminosäuren enthält, die höchstwahrscheinlich die selektive Markierung am Aminoxy-Stickstoff (Lysin, Cystein und das Amino-Ende) stören könnten. Wie in Figur 2 beschrieben, wurde NH<sub>2</sub>-AKAARAAAAAK\*AARACA-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID NO: 2), hier als SA-Testpeptid bezeichnet, durch Einbau und Entschützen von N-(2-Cl-benzyloxycarbonyl)-N-methylaminoxyessigsäure (Figur 4, 3) während einer Festphasen-Peptidsynthese synthetisiert. Die Reaktivität der geschützten sekundären Aminoxy-Gruppe wurde ausreichend abgeschwächt, um während der Boc-Festphasen-Peptidsynthese auf Harzen mit Thioester-Linkern nicht reaktiv zu bleiben. Die 2-Cl-Z-Schutzgruppe für die N-Methylaminoxy-Aminosäure wurde über Standard-HF-Abspaltungsverfahren effizient entfernt.

Durch Variation des pH-Wertes der Reaktion und der Stöchiometrie der Farbstoffe wurden die Bedingungen für die selektive Markierung der sekundären Aminoxy-Gruppe bestimmt. Für die Markierung mit dem Succinimidester von Tetramethylrhodamin (TMR-OSu) wurde festgestellt, dass diese optimal in einem Lösungsmittelsystem abläuft, das aus 50 % DMSO/50 % wässrigem Azetatpuffer besteht, bei einem pH von 4,7 mit 2 Äquivalenten an Farbstoff pro Mol an Peptid (Tabelle 1). Die Rohprodukte der Reaktion wurden vom nicht umgesetzten Farbstoff abgetrennt und über RP-HPLC und ESI-MS charakterisiert. Unter diesen Bedingungen wurde ein einzelnes Farbstoffmolekül an der Aminoxy-Gruppe mit einer Ausbeute von 78 %, auf der Basis einer HPLC-Quantifizierung, eingebaut. Gleichwohl wurden Nebenprodukte der Reaktion ebenfalls isoliert und es wurde festgestellt, dass diese entweder als SA-Testpeptid vorlagen, das mit zwei Farbstoffmolekülen markiert war (~13 %), oder als acetylierte Peptidprodukte (~5 %). Die über das Verhältnis der Peakflächen des gewünschten, einfach-markierten Produkts gegenüber zweifach-markierten Produkten definierte Selektivität betrug 6/1 (Tabelle 1).

Tabelle 1: Markierung von SA-Test-Peptid

Reaktion	Puffer		Farbstoff					Prozentanteil		Selektivität
	Gelfiltration	TCEP	p	Äquivalente	SM	1	2	Farbstoffe		
Azetat	(NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub>	Nein	4	1,0	32	56	7	8:1		
Azetat	(NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub>	Nein	4	1,5	14	63	13	4,5:1		
Azetat	(NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub>	Nein	4	2,0	0	78	13	6:1		
Azetat	(NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub>	Nein	4	2,4	0	76	17	4,5:1		
Azetat	(NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub>	Nein	4	3,0	0	71	23	3:1		
Zitrat	0,1 % TFA	Ja	4	4,3	4,3	89,6	4,1	22:1		
Carbonat	0,1 % TGA	Ja	9	0,99	13	85	0	51:1**		

Es wurde festgestellt, dass viele dieser Nebenreaktionen während der Größenausschluss-Chromatographie im Ammoniumbicarbonatlösungsmittel auftraten, welches verwendet wurde, um die Reaktionsprodukte aufzutrennen. Die Verwendung eines sauren Lösungsmittelsystems,

0,1 % TFA, eliminierte nahezu vollständig mehrfach-markierte Nebenprodukte, was zu bemerkenswerten Verbesserungen sowohl in der Ausbeute als auch in der Selektivität führte. Die Verwendung eines milden Reduktionsmittels Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) im Reaktionspuffer verringerte ebenfalls in signifikanter Weise verschiedene in geringem Maße auftretende Nebenreaktionen, die durch HPLC entdeckt wurden, insbesondere die Disulfid-Bildung. Die Markierung und Gelfiltration unter solchen optimierten Bedingungen ergab eine 70 %-ige (Wiedergewinnungs-)Ausbeute an markiertem SA-Testpeptid (90 % Ausbeute auf Basis der HPLC-Quantifizierung), von dem 90% lediglich mit einem einzigen Farbstoff am Aminoxy-Amin markiert waren. Die Markierungs-Selektivität wurde auf 22/1 gesteigert (Tabelle 1).

Die Reinheit des Produkts wurde unter Verwendung von einer RP-HPLC bestätigt sowie durch Massenspektrometrie, durch weitere chemische Reaktion und durch Isolierung von absichtlich im Überschuß markierten Produkten. Die markierten Peptide eluierten als einzelner Peak bei allen HPLC-Bedingungen, die mit einer Masse getestet wurden, die in Übereinstimmung mit der steht, die für einfach-markiertes SA-Testpeptid vorhergesagt wurde (Masse = 1970). Um zu bestimmen, ob sich die Markierungsstelle tatsächlich an der N-Methylaminoxy-Gruppe befand, wurde ein selektives Zink/Essigsäure-Reduktionsverfahren verwendet, um die N-O-Bindung zu spalten (Figur 3). Die HPLC der Reduktionsreaktion zeigte >98% Umwandlung des Ausgangsmaterials und einen neuen, früher eluierenden Peak. Die Masse dieses Peaks (1530 amu) stimmt mit der vorhergesagten Masse für das nicht-markierte SA-Testpeptid überein, welches an der Aminoxy-N-O-Bindung gespalten wurde. Das verbleibende Zink wurde mehrmals mit einer gesättigten Lösung aus EDTA in Wasser gewaschen, was zeigte, dass die Reduktionsreaktion vollständig abgelaufen war.

Um die unwahrscheinliche Möglichkeit zu eliminieren, dass der HPLC-Peak, der isoliertes einfach-markiertes SA-Testpeptid als Produkt enthielt, eine Mischung aus zwei markierten Spezies war, wurde SA-Testpeptid unter den Bedingungen eines höheren pH-Wertes (pH 9,0) umgesetzt, um alle reaktiven Stellen zu markieren. Das SA-Testpeptid enthielt 3 nukleophile Markierungsstellen, welche irreversibel markiert werden würden: Aminoxy, Lysin und N-terminales Amin. Eine Farbstoff-Markierung bei einem hohen pH erzeugte eine Mischung aus Peptiden, die an allen möglichen Positionskombinationen mit 1, 2 oder 3 Farbstoffen markiert waren. Eine HPLC-Analyse dieser Reaktionsmischung zeigte, dass 8 Peaks, ermittelt durch ESI-MS, die mit nicht-umgesetztem SA-Testpeptid sowie mit SA-Testpeptid, das am Aminoxy-Stickstoff einfach-markiert war, korrespondierten, und sechs weitere Peaks, die mit zwei einfach-markierten Peptiden, mit drei Peptiden, die zwei Farbstoffe aufwiesen, und mit einer einzigen dreifach-markierten Peptidspezies korrespondierten. Dieses Experiment lieferte die HPLC-Verweilzeiten all dieser Produkte, von denen keines mit dem Peak co-eluierte, der als SA-Testpeptid identifiziert worden war, welches mit einem einzigen Farbstoff am sekundären Aminoxy-Stickstoff markiert wurde.

Eine ortsspezifische Markierung der Aminoxy-Gruppe kann selbst bei basischem pH erreicht werden (Tabelle 1). Bei der Verwendung von Carbonat-Puffer mit einem pH von 9,0 in unserem Lösungssystem, ergab die Zugabe von 0,5 Äquivalenten an Farbstoff nach 3 Stunden ~50 % Umwandlung des anfänglichen SA-Testpeptids in einen einzigen Peak mit der Elutionszeit des gewünschten einfach-markierten Produkts. Nach Zugabe von weiteren 0,5 Äquivalenten an TMR-OSu und weiteren 3 Stunden Reaktionszeit zeigte die HPLC ~85 % Umwandlung in einen Peak mit der Verweilzeit des gewünschten Produkts. Zwei kleinere Peaks (~2-3 % der Gesamtpeakfläche) traten ebenfalls auf und korrespondierten mit den zwei anderen einfach-markierten SA-Testpeptid-Spezies, die im oben beschriebenen Mehrfach-Markierungs-Experiment identifiziert wurden. Der N-Hydroxysuccinimidester von Rhodamin zeigte deutlich eine selektive Reaktivität mit der Aminoxy-Gruppe.

Die bei höherem pH beobachtete Selektivität kann durch die Nukleophilie der Aminoxy-Gruppe allein nicht erklärt werden. Tatsächlich haben andere gezeigt, dass bei einer nicht-katalysierten Reaktion mit Phenylacetat bei höherem pH Amine stärker reaktiv sind als O-Alkylaminoxy-

Gruppen. Wir schlagen daher vor, dass kinetische Faktoren einen Beitrag zur selektiven Reaktivität der N-Methylaminoxy-Gruppe leisten, selbst wenn kompetierende Gruppen nicht protoniert sind. Mögliche Gründe dafür schließen ein: (1) der Aminoxy-Sauerstoff lokalisiert den Stickstoff in der Nähe des aktivierten Esters über die Bildung eines Wasserstoff-gebundenen "verbrückten" Zwischenproduktes, (2) einen Basen-katalysierten Reaktionsweg unter den Bedingungen unserer Reaktion. Diese außergewöhnliche Reaktivität hat wichtige praktische Folgen, da diese die selektive Markierung von Säure-lablen Polypeptiden und synthetischen Proteinen unter physiologischen oder basischen Bedingungen ermöglicht.

10 *Beispiel 2. Die sekundäre Aminoxy-Gruppe ist mit C<sup>α</sup>-Thioestern und einer Amid-bildenden Ligation kompatibel.*

Die Herstellung von Proteinen über eine chemische Gesamtsynthese erfordert oftmals die Ligation großer Polypeptide, die über eine Festphasen-Peptidsynthese auf Thioester-Linker-Harzen hergestellt wurden. Die am allgemeinsten anwendbaren Verfahren, die für Ligationen verfügbar sind, sind die native chemische Ligation und die Ligation von exprimiertem Protein. Diese Verfahren nutzen die gleiche elementare Chemie zur Verknüpfung zweier Peptide, eines mit einem N-terminalen Cystein und das andere mit einem C-terminalen Thioester, über eine regiospezifische und ortsspezifische Reaktion zur Erzeugung eines größeren Polypeptids. Die Anwendung der Chemie zur Aminoxy-Markierung auf die Synthese von großen Polypeptiden und Proteinen erfordert eine Kompatibilität mit dieser Festphasen-Peptidsynthese und der Ligationschemie.

Der optimale Ansatz zur Verwendung der Chemie zur Aminoxy-Markierung bei der chemischen Synthese von Proteinen ist der direkte Einbau der Aminoxy-Gruppe als Bestandteil einer, während der Standard-Festphasen-Peptidsynthese verwendeten, Aminosäure. Zu diesem Zweck haben wir eine einfach geschützte N-Methylaminoxy-Aminosäure,  $\alpha$ -Boc- $\beta$ -[N-(2-chlorbenzyloxycarbonyl)-N-methylaminoxyacetyl]- $\alpha,\beta$ -diaminopropionsäure [Boc-2-Cl-Z-(SA)-Dapa-OH], erzeugt, wie in Figur 4 gezeigt. Diese Aminosäure, als SAOD bezeichnet, wurde in die Peptidsequenz LY-(SAOD)-AG-MPAL Thioester über eine Synthese auf dem TAMPAL-Thioester-Linker-Harz eingebaut, wie nachfolgend in den Methoden beschrieben. (MPAL ist die C-terminale Mercaptopropionylleucin-Gruppe, die durch Spaltung eines Peptids vom TAMPAL-Harz erzeugt wurde, siehe Hojo, H., et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1993, 66:2700-2706; und Hackeng, T.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; In Drucklegung).

Die Ligation des LY-(SAOD)-AG-MPAL (SEQ ID NO: 3)-Thioester-Peptids mit dem Peptid CRANK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 4) wurde unter Verwendung von Standardverfahren unter Einsatz von Phosphatpuffer mit 6M Guanidiniumhydrochlorid bei einem neutralen pH in der Gegenwart von 2-3 % Thiophenol pro Volumen getestet. Die Ligation verlief über 24 Stunden und erzeugte das gewünschte Ligationsprodukt, LY-(SAOD)-AGCRANK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 5), mit ~85 % Ausbeute. Das hauptsächlich anfallende Nebenprodukt war der Modifizierung von nicht-ligiertem CRANK-NH<sub>2</sub>-Peptid unter den Ligationsbedingungen zuzurechnen (Masse= 714,5, Daten nicht gezeigt), und stand nicht in Bezug zur Anwesenheit der Aminoxy-Gruppe. Es trat dort also eine einzige zeitabhängige Nebenreaktion auf, welche ein Produkt mit 14 Masseneinheiten geringer als das gewünschte Produkt erzeugte. Die Verwendung hoher Konzentrationen an reagierenden Peptiden und die Isolierung des Ligationsprodukts nach 24 Stunden reduzierte diese Nebenreaktion auf ein akzeptables Niveau (<5 %).

Die Ligation eines Peptids, das mehrfache, potentiell reaktive funktionelle Gruppen enthält, einschließlich eines für die Affinitäts-Chromatographie nützlichen Hexahistidin-Tags, wurde ebenfalls getestet. Die Kopplung von CEYRIDRVRLFVVDKLDNIAQVPRVGAA-HHHHHH (SEQ ID NO: 6) an den LY-(SAOD)-AG-MPAL-Thioester war innerhalb von 5 Stunden mit minimalen Nebenreaktionen beendet. Bei beiden Ligationsreaktionen trat weniger als 1 % LY-(SAOD)-AG-MPAL-selbstkondensiertes Produkt auf, was andeutet, dass die Aminoxy-Gruppe und der Thioester unter den Ligationsbedingungen nicht bevorzugt miteinander reagieren. Diese Ergeb-

nisse zeigen, dass die Einbeziehung einer nicht-geschützten Aminoxy-Gruppe in die Peptidkette mit der nativen chemischen Ligation kompatibel ist.

Die Markierung der zwei Ligationsprodukte unter Verwendung von Tetramethylrhodaminsuccinimidester verlief mit einer Selektivität, die ähnlich zu der des SA-Testpeptids war. Die HPLC-Integration zeigte, dass das Produkt der LY-(SAOD)-AG-MPAL-Ligation mit CRANK-NH<sub>2</sub> mit mehr als 95 % Effizienz und mit einer Selektivität von 34:1 markiert wurde. Eine massenspektrometrische Analyse und eine Zinkreduktion zeigten eine Markierung lediglich an der Aminoxy-Gruppe. Für das längere Hexahistidin-enthaltende Polypeptid-Ligationsprodukt betrug die Selektivität für die Aminoxy-Gruppe mehr als 10:1, jedoch war es schwierig, hohe Ausbeuten zu erreichen. Die Histidine könnten möglicherweise die Ausbeute und Selektivität durch Katalyse des nukleophilen Angriffs auf den Succinimidester des reaktiven Farbstoffs beeinträchtigt haben. Die Verwendung von Guanidiniumhydrochlorid im Lösungsmittel der Reaktion steigerte die Ausbeute auf etwa 50 %, was andeutet, dass die Faltung oder die schlechte Löslichkeit des Peptids ein Faktor bei der Verhinderung des Zugangs des reaktiven Farbstoffs zur Aminoxy-Gruppe war. Die Selektivität wurde ebenfalls verbessert, möglicherweise aufgrund der Verfügbarkeit der reaktiven sekundären Aminoxy-Gruppe. Die einfache Orts-Markierung an der Aminoxy-Gruppe wurde über eine massenspektrometrische Analyse von Verdaureaktionen des markierten Polypeptidprodukts mit Trypsin und  $\alpha$ -Chymotrypsin nachgewiesen.

### *Beispiel 3: Spezifität der Markierung von Proteindomänen, die Aminoxyaminosäuren enthalten*

Als Kontrolle zur Etablierung der Selektivität der Markierung mit Aminoxyaminosäure wurde die Markierung von nativem  $\beta$ -Lactoglobulin mit Tetramethylrhodamin-N-hydroxysuccinimidester durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass die nicht-spezifische Markierung dieses 162 Aminosäuren langen Proteins, welches 15 Lysine und 4 Cysteine enthält, selbst nach 6 Stunden minimal war (<1 %).

Abschließend wurde die GTPase-Bindungsdomäne von p21 -aktivierter Kinase (45 Aminosäuren, 4 Lys, 1 Cys) mit einer sekundären Aminoxyaminosäure hergestellt, die am Amino-Ende (SAOD-PBD) eingebaut wurde. Vorangegangene Experimente hatten gezeigt, dass PBD-Domänen, die an diesem Ende mit fluoreszierenden Reporterfarbstoffen markiert waren, als Biosensoren der GTPase-Aktivierung verwendet werden könnten. Die Markierung von PBD unter Verwendung des neuen Verfahrens wird die Herstellung ausreichender Mengen ermöglichen, um die Anwendung der Biosensoren *in vivo* und in pharmakologischen Screeninganwendungen zu ermöglichen. Sie wird weiterhin den Einbau sensitiv detektierbarer Gruppen ermöglichen, die Anwendungen innerhalb lebender Zellen erlauben.

Durch Addition von Farbstoff mittels Titration bei pH 4,7 über 72 Stunden wurde SAOD-PBD einfach mit Alexa-532-N-Hydroxysuccinimidester markiert. Die Markierungseffizienz war proportional zu der, die für das längste Modell-Peptid berichtet wurde (ungefähr 50 % Ausbeute gemäß HPLC-Quantifizierung) und es gab keine Anzeichen einer mehrfachen Markierung. In diesem Fall erwies sich die Isolierung von markiertem SAOD-PBD über RP-HPLC als schwierig. Die Auftrennung bis zur Grundlinien-Auflösung wurde nicht erreicht, jedoch schließen kleine Mengen an nicht-markiertem PBD im markierten Produkt die Verwendung des markierten Materials in Biosensor-Anwendungen nicht aus. Vorhergehende Berichte geben an, dass eine Abtrennung des markierten Produkts vom Ausgangs-Polypeptid in höchstem Maße von dem spezifischen Peptid und dem angelagerten Farbstoff abhängig ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die hier berichtete optimierte ortsspezifische Markierungschemie mit den Schritten kompatibel ist, die für die Herstellung von Proteinen über eine chemische Gesamtsynthese erforderlich sind.

### *Beispiel 4: Material und Methoden.*

*Allgemein:* Zur Säulenchromatographie wurde Silicagel (230-400er Porenweite) in Standardglassäulen unter (Einfluß von) Schwerkraft oder Luftdruck verwendet. Eine Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC, reversed-phase high performance liquid chromatography) wurde auf einem Waters HPLC-System mit UV-Detektion bei 214 nm unter Verwendung entweder einer analytischen Vydac C-18-Säule (5 µm, 0,46 x 25 cm), einem Waters RCM 8 x 10-Modul, das mit einer semipräparativen Delta Pack C-18 Radial Pack-Kartuschensäule (15 µm, 8 x 100 mm) von Milipore ausgestattet war, oder einer Vydac C-18-Säule für präparativen Maßstab (15 µm, 1,0 x 25 cm) durchgeführt. Es wurden lineare Gradienten des Lösungsmittels B (0,09% TFA in 90% Acetonitril/10 % Wasser) in Lösungsmittel A (0,1 % TFA in Wasser) für alle chromatographischen HPLC-Auftrennungen verwendet.

Die Massenspektren der Peptide wurden entweder mit einem Sciex API-III Electrospray-Ionisations-(ESI)-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (PE Biosystems, Foster City) oder mit Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeit (MALDI-TOF)-Instrumenten von Thermo Bioanalysis (Thermo Bioanalysis, LTD., UK) oder Kratos Analytical (Chestnut Ridge, NY) erhalten. Für ESI-MS wurden die gezeigten beobachteten Massen für alle beobachteten Ladungszustände einer molekularen Spezies aus den experimentellen *m/z*-Zuständen unter Verwendung des Programms MacSpec (Sciex, Version 2.4.1) für Elektrospray-Massenspektrometrie abgeleitet. Die im MALDI-MS beobachteten Massen standen in Bezug zur internen Kalibrierung unter Verwendung von  $\alpha$ -Cyanohydroxyzinnsäure- oder Sinipinsäure-Matrizen. Die berichteten berechneten Massen wurden entweder aus MacProMass (Terry Lee und Sunil Vemuri, Beckman Research Institute, Duarte, CA) oder aus PAWS (Version 8.1.1, ProteoMetrics) abgeleitet und reflektieren die durchschnittliche Isotopenzusammensetzung des einfach geladenen Moleküls. Die Protonen-Kern-Magnetresonanz-spektroskopie wurde auf einem Bruker AC-250-Massenspektrometer aufgezeichnet und die Daten wurden unter Verwendung von WinNMR (Bruker Instruments) analysiert. Die Spektroskopie im ultraviolettsichtbaren Bereich wurde auf einem Hewlett-Packard-Photodioden-Array-Spektrophotometer durchgeführt.

Die Boc-L-Aminosäuren wurden von Novabiochem (La Jolla, CA) oder Bachem Bioscience, Inc. (King of Prussia, PA) bezogen. [[4-(Hydroxymethyl)phenyl]-acetamido]methyl] (-OCH<sub>2</sub>-Pam)-Harz wurde von PE Biosystems (Foster City, CA) bezogen und Methylbenzylhydrilamin (MBHA)-Harz wurde von Peninsula Laboratories, Inc. (San Carlos, CA) bezogen. Die Lösungsmittel lagen in einem Synthese-Reinheitsgrad oder sauberer vor und wurden von Fisher Scientific (Tustin, CA) bezogen. Trifluoressigsäure (TFA) und wasserfreies Hydrogenfluorid wurden von Halocarbon (New Jersey) und Matheson Gas (Rancho Cucamonga, CA) bezogen. Die Farbstoffe wurden von Molecular Probes (Eugene, OR) erhalten. Alle anderen Reagenzien lagen in einem analytischen Reinheitsgrad oder sauberer vor und wurden von Aldrich (Milwaukee, WI), Lancaster (Windham, NH), Peptides International (Louisville, KY) oder Richelieu Biotechnologies (Montreal, Kanada) bezogen.

*Peptidsegmentsynthese.* Die Synthese von Peptiden wurde manuell unter Verwendung von optimierten stufenweisen Festphasen-Syntheseverfahren mit *in situ* Neutralisation und HBTU-Aktivierungsverfahren für die Boc-Chemie entweder auf -OCH<sub>2</sub>-Pam, MBHA- oder Trt-geschützten Mercaptopropionyl-Leu (TAMPAL)-Harz (Hojo, H., et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1993, 66:2700-2706; Hackeng, T.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; In Drucklegung; und Schnolzer, M., et al., *Int. J. Peptide Protein Res.* 1992, 40:180-193) durchgeführt. Es wurden Standard Boc-Schutzgruppen-Strategien eingesetzt. Die Kopplung wurde über einen quantitativen Ninhydrin-Assay nach 15-minütigen Kopplungszyklen verfolgt. Nach Anordnung der Ketten wurde eine Standard-Entschützung und eine Abspaltung vom Harz-Träger durch Behandlung mit wasserfreiem HF bei 0 °C für 1 Stunde durchgeführt, das entweder 10% p-Kresol oder Anisol als Restfänger enthält. Die Aufreinigung wurde unter Verwendung einer RP-HPLC durchgeführt.

*Synthese von TAMPAL-Harz (Hojo, H., et al., Bull Chem. Soc. Jpn. 1993, 66:2700-2706).* Man ließ 2,5 Gramm MBHA-Harz (0,865 mmol/g, 2,16 mmol an Amin) in DMF aufquellen. Boc-Leu-

OH (1,1 Gramm, 4,4 mmol) wurde mit HBTU (8 ml, 0,5M Lösung) und DIEA (2 ml) aktiviert, anschließend an das MBHA-Harz gekoppelt, bis über einen Ninhydrin-Assay eine vollständige Reaktion festgestellt wurde. Die N<sup>o</sup>-Boc-Gruppe des verknüpften Leucins wurde mit reinem TFA entfernt, anschließend wurde S-Trt- $\beta$ -Mercaptopropionsäure (1,5 Gramm, 4,3 mmol), welches in  
5 der gleichen Weise wie Boc-Leu-OH aktiviert wurde, zum entschützten Leu-MBHA-Harz zugegeben, und man ließ dieses bis zur vollständigen Umsetzung koppeln. Das S-Trt- $\beta$ -Mercaptopropionyl-Leu-MBHA-Harz wurde ausgiebig mit DMF gewaschen, danach mit DCM/MeOH (1/1), und anschließend unter Vakuum getrocknet, um 3,39 Gramm eines Thioester-Harzes zu ergeben. Die über die Gewichtszunahme berechnete Substitution betrug 0,549 mmol/Gramm.

10 *Entschützung von TAMPAL-Harz:* Der S-Trityl-Schutz wurde über zwei 5 Minuten dauernde Behandlungen mit 95 % TFA/5 % Triisopropylsilan entfernt. Das entschützte Harz wurde ausgiebig mit DMF vor der Kopplung der ersten Aminosäure unter Verwendung des optimierten *in situ* Neutralisierungsprotokolls aktiviert.

15 *Synthese von N-(2-Chlorbenzyloxycarbonyl)-N-methylhydroxylamin (1)* (Jencks, W.P., Carriuolo, J. J. Am. Chem. Soc. 1960, 82:675; Jencks, W.P. J. Am. Chem. Soc. 1958, 80:4581, 4585). N-Methylhydroxylaminhydrochlorid (0,95 g, 11,37 mmol) wurden in 3 ml Wasser unter schnellem Rühren aufgelöst. Der pH dieser Lösung wurde auf 6-7 durch tropfenweise Zugabe einer gesättigten  
20 Lösung an Natriumbicarbonat eingestellt. 2-Chlorbenzyloxycarbonyl-N-hydroxysuccinimidylcarbonat (1,2 g, 4,23 mmol) wurde in 4 ml THF gelöst und langsam zur schnell rührenden Lösung aus neutralisiertem N-Methylhydroxylamin zugegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 14 Stunden wurde die Reaktion mit 20 ml gesättigtem Natriumbicarbonat gestoppt (gequenched) und dreimal mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatschichten  
25 wurden einmal mit gesättigtem Natriumbicarbonat gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt, um eine Ausbeute von 0,77 g (3,77 mmol, 84 %) eines cremefarbenen Feststoffes zu ergeben. TLC Rf=0,2 (Hex/EtOAc/AcOH 80/20/1). <sup>1</sup>H NMR: 3,23 (s, 3H), 5,25 (s, 2H), 7,24 (m, 2H), 7,37 (m, 2H). HRMS: Erwartet = 216,0427, beobachtet = 216,0425.

30 *Synthese von N-(2-Chlorbenzyloxycarbonyl)-N-methylaminooxyessigsäure-tert.-butylester (2)* (Jerry March in *Advanced Organic Chemistry, Third Edition*. John Wiley & Sons, New York, 1989, S. 381; und Nyberg, D.D., Christensen, B.E., J. Am. Chem. Soc. 1957, 79:1222; Motorina, I.A., et al., *Synlett* 1996, 389). Die Verbindung 1 (0,96 g, 4,71 mmol) wurde bei Raumtemperatur in 10 ml THF unter schnellem Rühren aufgelöst. Es wurde Bromacetat-tert-butylester (1,05  
35 g, 5,38 mmol) zugegeben, anschließend Natriumiodid (1,5 g, 10,01 mmol), gefolgt von DIEA (2,5 ml, 15,92 mmol). Die Reaktion änderte sich zu einer orange-gelben Farbe nach Zugabe von Natriumiodid. Die Reaktion wurde mit 30 ml Wasser nach der vollständigen Umsetzung (~3 Stunden) gestoppt (gequenched) und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetat-Schichten wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Ethylacetat wurde unter Vakuum entfernt. Der erhaltene ölige Feststoff wurde über Silica-Chromatographie auf Silicagel mit  
40 230-400er Porenweite unter Verwendung von Hexanen/Ethylacetat/Essigsäure (80/20/1) aufgereinigt, um 1,40 g (4,29 mmol, 90%) eines reinen gelben Öls zu ergeben. TLC Rf = 0,5 (Hex/EtOAc/AcOH 80/20/1). <sup>1</sup>H NMR: 1,46 (s, 9H), 3,29 (s, 3H), 4,36 (s, 2H), 5,26 (s, 2H), 7,24 (m, 2H), 7,40 (m, 2H). HRMS: Erwartete Masse = 330,1108, beobachtete Masse = 330,1104.

50 *Synthese von N-(2-Chlorbenzyloxycarbonyl)-N-methylaminooxy-essigsäure (3)* (Bryan, D.B., et al., J. Am. Chem. Soc. 1977, 99:2353). Verbindung 2 (1,1 g, 3,30 mmol) wurde in 4 ml DCM gelöst und unter schnellem Rühren wurde reines TFA (5 ml) tropfenweise über 2 Minuten bei Raumtemperatur zugegeben. Nach 1 Stunde wurde die Reaktion mit 20 ml Wasser gestoppt (gequenched), 3 mal mit DCM extrahiert, und die vereinigten DCM-Schichten wurden über Natriumsulfat getrocknet. Das DCM wurde unter Vakuum entfernt, um 0,9 g Ausbeute (3,28 mmol, 99 %) eines cremefarbenen Feststoffes zu ergeben. TLC Rf=0,2 (Hex/EtOAc/AcOH 80/20/1).  
55 <sup>1</sup>H NMR: 3,23 (s, 3H), 4,50 (s, 2H), 5,32 (s, 2H), 7,28 (m, 2H), 7,40 (m, 2H). HRMS: Erwartete

Masse = 274,0482, beobachtete Masse = 274,0479.

*Synthese von N-(2-Chlorbenzyloxycarbonyl)-N-methylaminoxyacetal- $\alpha$ -Boc- $\alpha,\beta$ -diaminopropionsäure [(SA)Dapa-OH](4)* (Wahl, F., Mutter, M. *Tett. Lett.* 1996, 37:6861-6864; und Anderson, G.W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1964 86:1839). N-(2-Chlorbenzyloxycarbonyl)-N-methylaminoxyessigsäure (3) (2,5 g, 9,2 mmol) wurde mit N-Hydroxysuccinimid (2,11 g, 2 Äquiv.) und DIC (1,440 ml, 1,0 Äquiv.) in 20 ml DCM aktiviert. Diese Reaktion wurde bei Raumtemperatur für 2 h vor der Zugabe von N<sup>o</sup>-Boc- $\alpha,\beta$ -Diaminopropionsäure (2,3 g, 1,2 Äquiv.) und DIEA (3,20 ml, 2 Äquiv.) schnell gerührt. Nach 4 Stunden wurde das DCM-Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und es wurden 50 ml Ethylacetat zugegeben. Die Ethylacetat-Schicht wurde zweimal mit 0,5M Acetatpuffer, pH=4,0, gewaschen und anschließend zweimal mit 0,1N Schwefelsäure. Die vereinigten Säure-Waschlösungen wurden anschließend mit 50 ml Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten Ethylacetat-Schichten wurden über Natriumsulfat getrocknet, anschließend unter Vakuum aufkonzentriert, um einen viskosen gelben öligen Feststoff zu ergeben. Dieser Feststoff wurde 3 Fällungen mit Hexan aus Diethylether unterworfen, um 2,16 g (51% Ausbeute) eines cremefarbenen Feststoffes zu ergeben. TLC Rf=0,2-0,4 (Hex/EtOAc/AcOH 30/70/0,5). <sup>1</sup>H NMR: 1,45 (s, 9H), 3,16 (s, 3H), 3,54 (d-von-t, 1H, J = 14,3, 4,6 Hz), 3,93 (m, 1H, J=14,3, 7,5, 4,6 Hz), 4,31 (s, 0,5H), 4,38 (s, 1H), 4,45 (s, 1H), 4,51 (s, 0,5H), 5,34 (s, 2H), 5,97 (breit-d, 1H, J=7,3 Hz), 7,30 (m, 2H), 7,43 (m, 2H), 8,50 (breit-s, 1H). HRMS: Erwartete Masse = 460,1487, beobachtete Masse = 460,1480.

*Synthese des sekundären Aminoxy-Test-Peptids (SA-Test-Peptid)*. Das SA-Testpeptid, NH<sub>2</sub>-AKAARAAAAK\*AARACA-CO<sub>2</sub>H wurde mit einem Lys 10-Seitenketten-Fmoc-Schutz, wie kürzlich beschrieben (Canne, L.E., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117:2998-3007), synthetisiert. Der Einbau der sekundären Aminoxy-Gruppe wurde durch Kopplung von 2-Chlor-Z-geschützter N-Methylaminoxyessigsäure (300 mg, 1,09 mmol) bewirkt, welche mit Diisopropylcarbodiimid (157  $\mu$ l, 1,00 mmol) und N-Hydroxysuccinimid (140 mg, 1,22 mmol) in 2 ml DCM für 1-2 Stunden aktiviert wurde, (und) anschließend mit 2 ml DMF, direkt vor der Kopplung an die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lys 10, verdünnt. Es wurden die optimierten Kopplungs-, Spaltungs- und Aufreinigungs-Protokolle verwendet. Die Aminosäureanalyse stimmte mit dem gewünschten Peptid überein. Erwartete Masse = 1560, beobachtete Masse = 1559.

*Synthese von LY-(SAOD)-AG-MPAL-Thioester*. LY-(SAOD)-AG-MPAL-Thioester wurde unter Verwendung von optimierten *in situ* Neutralisierungsprotokollen für die Boc-Chemie auf TAM-PAL-Harz synthetisiert. Die Kopplung der N<sup>o</sup>-Boc-(SA)Dapa-OH-Aminosäure wurde durch Umsetzung des *in situ* aktivierten N-Hydroxysuccinimidesters mit dem entschützten Aminoterminalen Stickstoff von Alanin durchgeführt (Canne, L.E., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117:2998-3007). (SA)Dapa-OH (4) (230 mg, 0,5 mmol) wurde in 1 ml DCM und N-Hydroxysuccinimid (115,1 mg, 1,0 mmol) aufgelöst und es wurde DIC (74,4  $\mu$ l, 0,47 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde kurz gemischt und man ließ diese für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur vor der Kopplung mit dem entschützten N-Terminus der Peptidkette aktivieren. Nach dieser Kopplung waren keine weiteren Modifizierungen des Syntheseprotokolls erforderlich. Erwartete Masse = 797, beobachtete Masse = 797.

*Ligation von LY-(SAOD)-AG-MPAL-Thioester mit CRANK-NH<sub>2</sub>-Peptid*. LY-(SAOD)-AG-MPAL-Thioester (3 mg, 3,8  $\mu$ mol) wurde in 100  $\mu$ l von 50 mM Phosphatpuffer aufgelöst, der 6M Guanidiniumhydrochlorid, pH 7,2, enthielt. Zu dieser Lösung wurde CRANK-NH<sub>2</sub>-Peptid zugegeben, welches in 100  $\mu$ l des gleichen Phosphatpuffers und 3  $\mu$ l Thiophenol gelöst war. Die Reaktion wurde über analytische Umkehrphasen-HPLC beobachtet (analytical reversed-phase HPLC). Nach 24 Stunden wurde das Ligationsprodukt, LY-(SAOD)-AGCRANK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 10), über semi-präparative Umkehrphasen-HPLC (Gradient = 10-50% B über 60 Minuten) isoliert und lyophilisiert, um einen flockigen weißen Feststoff zu ergeben. Die Aminosäureanalyse stimmte mit dem gewünschten Peptidprodukt überein. Erwartete Masse = 1168, beobachtete Masse = 1168.

Ligation von LY-(SAOD)-AG-MPAL-Thioester mit CEYRIDRVRLFVDKLDNIAQ-VPRVGAA-HHHHHH (SEQ ID NO: 7). LY-(SAOD)-AG-MPAL (0,3 mg, 0,37 mmol) und CEYRIDRVRLFVDKLDNIAQ-VPRVGAA-HHHHHH (1,5 mg, 3,8 mmol) wurde den gleichen Ligations- und Aufreinigungsbedingungen unterworfen, wie zuvor beschrieben, um 1,0 mg (58 % Ausbeute) eines weißen Feststoffes zu ergeben. Erwartete Masse = 4518, beobachtete Masse = 4517.

Synthese eines Peptidfragments der Amino-terminalen-P21-Bindungs-Domäne (PBD), (SAOD)-KKKEKERPEISLPDFEHTIHVGFDA-MPAL-Thioester (SEQ ID NO: 8): Sekundäre Aminoxy enthaltende Amino-terminale PBD-Thioester wurden wie zuvor beschrieben, unter Verwendung von TAMPAL-Harz synthetisiert. Eine HF-Spaltung unter Verwendung von p-Kresol als Restfänger, gefolgt von einer HPLC-Aufreinigung, ergab (SAOD)-KKKEKERPEISLPDFEHTIHVGFDA-MPAL, enthaltend zwei DNP-Gruppen, die die Histidine schützen. Erwartete Masse = 3745, beobachtete Masse = 3745.

Synthese des Carboxy-Endes des Peptidfragments der P21-Bindungsdomäne (PBD), CTGEFTGMPEQWARLLQT (SEQ ID NO: 9): Die native Carboxy-terminale Hälfte von PBD wurde unter Verwendung eines Standard-FMOC-Syntheseprotokolls von der Scripps-Zentraleinheit für Peptide und Proteinkerne synthetisiert. Erwartete Masse = 2068, beobachtete Masse = 2068.

Synthese von SAOD-modifiziertem PBD, SAOD-KKKEKERPEISLPDFEHTIHVGFDA-CTGEFTGMPEQWARLLQT (SEQ ID NO: 11): 1,5 mg von SAOD-KKKEKERPEISLPDFEHTIHVGFDA-MPAL (0,4 mmol) wurden mit 1 mg (4,8 mmol) an Carboxy-terminalem Fragment, CTGEFTGMPEQWARLLQT, wie oben beschrieben, ligiert. Nach 48 Stunden wurden die ligierten PBD-Proteine über RP-HPLC isoliert und lyophilisiert, 1,5 mg (70 % Ausbeute), erwartete Masse = 5262, beobachtete Masse = 5262.

Selektive Markierung von SA-Test-Peptid mit Tetramethylrhodamin-N-hydroxysuccinimidylester. Eine Lösung aus SA-Testpeptid (3,396 µg/µl, 2,18 mM) in 5 % Acetatpuffer, pH = 4,7, welche 5 mM TCEP beinhaltet, wurde zur Markierung verwendet. Eine Stammlösung an Farbstoff (5 µg/µl, 9,5 mM) wurde durch Lösung von TMR-OSu in reinem DMSO hergestellt. Für jede Reaktion wurde die Stammlösung so verdünnt, dass die gewünschte Anzahl an Farbstoff-Äquivalenten in 20 µl DMSO zugegeben werden konnte. Die folgenden Äquivalente an Farbstoff wurden getestet: 1.2, 1.5, 1.8, 2.0, 2.4, 3.0 und 4.3. Unter konstantem Rühren wurden 20 µl Farbstofflösung in zwei 10 µl-Aliquots zu 20 µl Peptidlösung bei Raumtemperatur zugegeben. Das zweite Aliquot an Farbstoff in DMSO wurde 10 Minuten nach der anfänglichen Zugabe von Farbstoff hinzugegeben. Nach vollständiger Zugabe an Farbstoff wurde die Reaktion kurz gevortext, anschließend bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 Stunden wurde(n) das (die) markierte(n) Reaktionsprodukt(e) vom nicht-umgesetzten Farbstoff über Gelfiltration auf Sephadex-G-10- oder -G-15-Säulen unter Verwendung von entweder 100 µM Ammoniumbicarbonat oder, nach Optimierung, 0,1 % TFA in Wasser, abgetrennt. Das (die) individuelle(n) Peptidprodukt(e) wurden anschließend über RP-HPLC abgetrennt und über ESI-MS analysiert. Erwartete Masse = 1971, beobachtete Masse = 1970.

Nicht-selektive Markierung von SA-Test-Peptid mit Tetramethylrhodamin-N-hydroxysuccinimidylester. SA-Test-Peptid (3,396 µg/µl, 2,18 mM) wurde in 100 mM Natriumcarbonat, pH = 9,01, welches 5 mM TCEP enthielt, gelöst. 18 µl an reinem DMSO wurden zu 20 µl der Peptidlösung zugegeben. Unter schnellem Rühren wurde 1 µl Farbstoff-Stammlösung in DMSO zu dieser Mischung zugegeben. Nach Vervollständigung der Addition wurde die Reaktion kurz gevortext, anschließend bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 Stunden wurde ein 15 µl Aliquot entfernt und über RP-HPLC und ESI-MS ausgewertet. Dieser Prozess wurde so lange wiederholt, bis ein signifikantes Niveau der Reaktion durch Bildung von einfach-markierten SA-Lysin-Test-Peptid-Produkten detektiert wurde.

Selektive Markierung von LY-(SAOD)-AGCRANK-NH<sub>2</sub> und LY-(SAOD)-AGCEYRIDRVR-

*LFVDKLDNIAQVPRVGAA-HHHHHH* mit *Tetramethylrhodamin-N-hydroxy-succinimidylester*. Eine Probe mit 20 µl LY-(SAOD)-AGCRANK-NH<sub>2</sub> (2,5 µg/µl, 2,18 mM) in 200 mM Citratpuffer, pH=4,7, 5 mM TCEP wurde unter Verwendung von 4,3 Äquivalenten an Farbstoff in DMSO markiert, aufgereinigt und analysiert. Erwartete Masse = 1580, beobachtete Masse = 1580.

5 Eine 20 µl Probe von LY-(SAOD)-AGCEYRIDRVRLFVDKLDNIAQVPRVGAA-HHHHHH (SEQ ID NO: 12) (9,7 µg/µl, 2,12 mM) in 200 mM Citratpuffer, pH=4,7, welche 5 mM TCEP und 3 M Guanidiniumhydrochlorid enthielt, wurde unter Verwendung einer modifizierten Prozedur markiert. 18 µl einer Lösung aus Tetramethylrhodamin-N-hydroxysuccinimid (10 µg/µl) in DMSO wurde zu 6 µl Aliquots über 15 Minuten unter schnellem Rühren zugegeben. Die Reaktion

10 wurde bei Raumtemperatur für 5 Stunden vor der Gelfiltration/RP-HPLC-Aufreinigung und der massenspektroskopischen Analyse inkubiert. Erwartete Masse = 4930, beobachtete Masse = 4929.

*Markieren von β-Lactoglobulin mit Tetramethylrhodamin-N-hydroxysuccinimidester*: 10 µl einer 10 mg/ml Lösung aus Tetramethylrhodamin-N-hydroxysuccinimidester in DMSO (9,5 Äquivalente im Vergleich zu Protein) wurden zu einer Lösung zugegeben, die 10 µl an DMSO und 20 µl einer Lösung aus β-Lactoglobulin (20,3 mg/ml oder 1,1 mM) in 2,8 M Guanidiniumhydrochlorid mit 5 mM TCEP (pH 4,7) enthielt. Nach 3 Stunden wurde das Protein vom nicht-umgesetzten Farbstoff über Gelfiltration abgetrennt und die Markierung wurde über eine Analyse des Verhältnisses von Farbstoff zu Protein bestimmt (die Proteinkonzentration wurde über das Verfahren von Waddel bestimmt und ε wurde für Tetramethylrhodamin in Phosphatpuffer, pH=8,0, mit 81.000 bestimmt).

15

20

*Markieren von PBD-Proteinen mit Alexa-532-N-Hydroxysuccinimidester*: 150 µg an SAOD-modifiziertem PBD-Protein wurden in 105 µl an 200 mM Natriumcitratpuffer, pH=4,8, welcher 5 mM TCEP (Proteinkonzentration ~ 0,28 mM) enthielt, aufgelöst. Eine Lösung aus Alexa-532-OSu in DMSO (Farbstoffkonzentration ~10 mg/ml in DMSO) wurde in die Proteinlösung in 5 µl Aliquots über 72 Stunden titriert. Vier Stunden nach jeder Zugabe wurde das Ausmaß der Markierung über RP-HPLC und MS bestimmt. Die Markierung wurde solange fortgesetzt, bis

25

30 Mengen an zweifach-markiertem PBD erhalten wurden (SAOD-modifiziertes PBD). Alexa-532-markiertes SAOD-modifiziertes PBD, erwartete Masse = 5871, beobachtete Masse = 5870).

*Zink/Essigsäure-Reduktion der N-Methylaminoxy-N-O-Bindung in Peptiden*. Unter Verwendung von Zink und wässriger Essigsäure wurde eine reduktive Spaltung der N-O-Bindung durchgeführt. Das Sprudeln in der Reaktion war nach einigen Sekunden klar zu sehen und klang nach etwa 60-120 Minuten ab. Nach 14 Stunden wurde der Überstand der Reaktion über RP-HPLC und ESI-MS analysiert. Reduktion an markiertem SA-Test-Peptid, erwartete Masse = 1530, beobachtete Masse = 1530; Reduktion an markiertem (SAOD)-AGCRANK-NH<sub>2</sub>: Erwartete Masse = 1139, beobachtete Masse = 1139.

35

40

*Trypsin/Chymotrypsin-Spaltung von markiertem LY-(SAOD)-AGCEYRIDRVRLFVDKLDNIAQVPRVGAA-HHHHHH-Peptid*. 10 µl einer 0,05 mg/ml Lösung von entweder Trypsin oder α-Chymotrypsin in 25 mM Ammoniumcarbonat (ohne Anpassung des pH) wurden zu 5 µl einer 10-20 µg/µl Lösung aus reinem Tetramethylrhodamin-markiertem Peptid in Wasser (Endkonzentration an Protease beträgt 0,033 mg/ml) zugegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden vor der Analyse von Peptidfragmenten über MALDI-MS inkubiert.

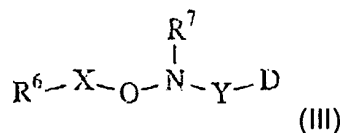
45

Alle Veröffentlichungen, Patente und Patentdokumente sind hiermit (in ihrer Offenbarung) so durch Bezug aufgenommen, als ob sie einzeln über Referenz mit aufgenommen wären. Die Erfindung wurde in Bezug auf verschiedene spezifische und bevorzugte Ausführungsformen und Techniken beschrieben. Gleichwohl soll verstanden werden, dass viele Variationen und Modifizierungen unter Beibehaltung des Gedankens und Gegenstandes der vorliegenden Erfindung durchgeführt werden können.

50



5. Verbindung gemäß Anspruch 1, welche eine  $\alpha$ -Benzyloxycarbonyl- $\beta$ -[N-(2-chlorbenzyloxycarbonyl)-N-methylaminoxyacetyl]- $\alpha,\beta$ -diaminopropionsäure ist.
6. Ein Peptid, umfassend ein Rückgrat („Backbone“) und eine oder mehrere Aminoxy-Gruppen;  
 5 vorausgesetzt, dass das Peptid nicht Glutathion ist; und  
 vorausgesetzt, dass das Peptid mindestens eine Aminoxy-Gruppe aufweist, welche nicht Bestandteil einer Gruppe  $\text{H}_2\text{N-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$  ist, die am N-Terminus des Peptids positioniert ist, oder die nicht Bestandteil einer Gruppe  $\text{-C=N-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$  ist, die im Backbone liegt.
7. Ein Peptid, umfassend ein Rückgrat („Backbone“) und eine oder mehrere sekundäre Aminoxy-Gruppen;  
 15 vorausgesetzt, dass das Peptid mindestens eine Aminoxy-Gruppe aufweist, welche nicht Bestandteil eines Oxims ( $\text{C=N-O-}$ ) im Rückgrat („Backbone“) ist.
8. Ein Peptidkonjugat der Formel (III):



wobei:

25  $\text{R}^6$  ein Peptid ist;

X eine direkte Bindung oder eine Verknüpfungsgruppe ist;

$\text{R}^7$  Wasserstoff, ein ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ )Alkyl, eine Amino-Schutzgruppe oder ein Rest ist, umfassend eine oder mehrere Aminoxy-Gruppen;

30 Y eine direkte Bindung oder eine Verknüpfungsgruppe ist; und

D ein funktionelles Molekül ist.

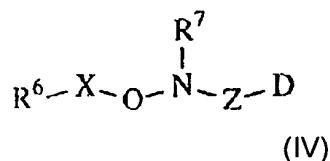
9. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei  $\text{R}^6$  ein Antikörper ist.
10. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei  $\text{R}^6$  2 bis 1000 Aminosäuren umfasst.
- 35 11. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei  $\text{R}^6$  5 bis 500 Aminosäuren umfasst.
12. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei  $\text{R}^6$  10 bis 100 Aminosäuren umfasst.
- 40 13. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei X 5 Angström bis 100 Angström Länge aufweist.
14. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei X 5 Angström bis 25 Angström Länge aufweist.
- 45 15. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei X ein  $\text{-R}_a\text{-C(=O)-NH-R}_b\text{-}$  ist, wobei jedes von  $\text{R}_a$  und  $\text{R}_b$  unabhängig voneinander ein ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ )Alkyl ist.
16. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 15, wobei jedes von  $\text{R}_a$  und  $\text{R}_b$  ein Methylen( $\text{-CH}_2\text{-}$ ) ist.
17. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei  $\text{R}^7$  Wasserstoff ist.
- 50 18. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei  $\text{R}^7$  ein ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ )Alkyl ist.
19. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei  $\text{R}^7$  Methyl ist.
- 55 20. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei  $\text{R}^7$  ein Rest ist, umfassend eine oder mehrere

Aminoxy-Gruppen.

21. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei Y 5 Angström bis 100 Angström Länge aufweist.
- 5 22. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei Y 5 Angström bis 25 Angström Länge aufweist.
23. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei Y ein (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkylen ist.
24. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei Y ein Methylen (-CH<sub>2</sub>-) ist.
- 10 25. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei D eine biophysikalische Sonde, ein Peptid, ein Polynukleotid oder ein therapeutisches Mittel ist.
26. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei D eine Cross-Linking-Gruppe oder eine eingeschlossene Verbindung zur Modifizierung einer Antwort („caged response modifier“) ist.
- 15 27. Peptidkonjugat gemäß Anspruch 8, wobei D eine biophysikalische Sonde ist.
28. Peptid gemäß Anspruch 27, wobei die biophysikalische Sonde eine fluoreszierende Gruppe, eine phosphoreszierende Gruppe, ein Nukleinsäure-Indikator, eine ESR-Sonde, ein responsiver Sensor, ein eingeschlossener Sensor oder ein Farbstoff ist, welcher sensitiv auf pH-Änderung, Ligandenbindung, oder andere Umgebungsaspekte reagiert.
- 20 29. Peptid gemäß Anspruch 8, wobei D ein Peptid ist.
- 25 30. Peptid gemäß Anspruch 8, wobei D ein Polynukleotid ist.
31. Peptid gemäß Anspruch 30, wobei das Polynukleotid DNA ist.
- 30 32. Peptid gemäß Anspruch 30, wobei das Polynukleotid RNA ist.
33. Peptid gemäß Anspruch 8, wobei D ein therapeutisches Mittel ist.
34. Peptid gemäß Anspruch 8, wobei D ein Alexa-Farbstoff, ein solvatochromatischer Farbstoff, ein elektrochromatischer Farbstoff oder ein Farbstoff ist, welcher sensitiv auf pH-Änderung, Ligandenbindung oder andere Umgebungsaspekte reagiert.
- 35 35. Peptid gemäß Anspruch 8, wobei D Alexa-532, Hydroxycumarin, Aminocumarin, Methoxycumarin, Aminomethylcumarin, Kaskaden-Blau, Luzifer-Gelb, NBD, P-Phycoerythrin, R-Phycoerythrin, (PE), PE-Cy5-Konjugate, PE-Cy7-Konjugate, Rot-613, Fluorescein, BODIPY-FL, BODIPY-TR, BODIPY-TMR, Cy3, TRITC, X-Rhodamin, Lissamin-Rhodamin-B, PerCP, Texas-Rot, Cy5, Cy7, Allophycocyanin (APC), TruRed, APC-Cy7-Konjugate, Oregon-Grün, Tetramethylrhodamin, Dansyl, Indo-1, Fura-2, FM-1-43, DilC18(3), Carboxy-SNARF-1, NBD, Indo-1, Fluo-3, DCFH, DHR, SNARF oder Monochlorbiman, Calcein ist.
- 40 36. Peptid gemäß Anspruch 8, wobei D YOYO-1, Propidiumiodid, Hoechst-33342, DAPI, Hoechst-33258, SYTOX-Blau, Chromomycin-A3, Mithramycin, SYTOX-Grün, SYTX-Orange, Ethidiumbromid, 7-AAD; Acridin-Orange, TOTO-1, TO-PRO-1, Thiazol-Orange, Propidiumiodid, TOTO-3, TO-PRO-3 oder LDS-751 ist.
- 45 37. Peptid gemäß Anspruch 8, wobei:  
 $R^6$  (SEQ ID NO: 1) ist;  
 $X \quad R_a-C(=O)CH(NH_2)CH_2N(H)C(=O)CH_2-R_b$  ist; wobei  $R_a$  eine direkte Bindung zum Amino-Ende von  $R^6$  ist und wobei  $R_b$  eine direkte Bindung zum Sauerstoff der Aminoxy-Gruppe von Formel (III) ist;
- 50
- 55

R<sup>7</sup> Methyl ist;  
 Y eine direkte Bindung ist; und  
 D Alexa-532 ist.

- 5 38. Verfahren zur Herstellung eines Peptidkonjugats, dass ein mit einem funktionellen Molekül verknüpftes Peptid umfasst, wobei das Peptid mit einem korrespondierenden funktionellen Molekül umgesetzt wird, *dadurch gekennzeichnet*, dass das Peptid ein oder mehrere sekundäre Aminoxy-Gruppen aufweist und das funktionelle Molekül einen elektrophilen Rest enthält, welcher mit der/den Aminoxy-Gruppe(n) reaktiv ist.
- 10 39. Verfahren nach Anspruch 38, *dadurch gekennzeichnet*, dass das funktionelle Molekül kein Peptid ist.
- 15 40. Verfahren nach Anspruch 38, *dadurch gekennzeichnet*, dass das funktionelle Molekül nicht über eine Oxim (C=N-O)-Verknüpfung angelagert wird.
- 20 41. Verfahren nach Anspruch 38, *dadurch gekennzeichnet*, dass das funktionelle Molekül ein Rückgrat („backbone“) aufweist und mit der Maßgabe, dass falls das funktionelle Molekül ein zweites Peptid ist, das funktionelle Molekül und das erste Peptid nicht über eine -C=N-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-Verknüpfung im „backbone“ des ersten Peptids miteinander verknüpft sind.
- 25 42. Peptidkonjugat gemäß Formel (IV):

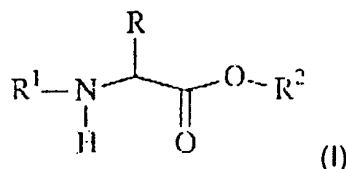


wobei:

30 R<sup>6</sup> ein Peptid ist;  
 X eine direkte Bindung oder eine Verknüpfungsgruppe ist;  
 R<sup>7</sup> Wasserstoff, ein (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl, eine Amino-Schutzgruppe oder ein Rest ist, welches eine oder mehrere Aminoxy-Gruppen umfasst;  
 35 Z eine Verknüpfungsgruppe ist, oder Z eine direkte Einfachbindung oder eine Doppelbindung zwischen N und D ist; und  
 D ein funktionelles Molekül ist;  
 vorausgesetzt, dass, falls D ein Peptid ist, N und D nicht über eine -C=N-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-Verknüpfung im Rückgrat („Backbone“) des Peptidkonjugats miteinander verknüpft sind.

40

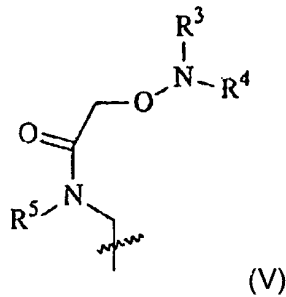
43. Verbindung der Formel (I):



wobei:

50 R<sup>1</sup> Wasserstoff oder eine Amino-Schutzgruppe ist;  
 R<sup>2</sup> Wasserstoff oder eine Carboxy-Schutzgruppe ist;  
 R ein Rest der Formel (V) ist:

55



10 wobei:

$R^3$  Wasserstoff, ein (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl, eine Amino-Schutzgruppe oder ein Rest ist, umfassend eine oder mehrere Aminoxy-Gruppen;

$R^4$  Wasserstoff oder eine Amino-Schutzgruppe ist; und

15  $R^5$  Wasserstoff oder ein (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl ist.

### Sequenzprotokoll

20 <110> The Scripps Research Institute

Hahn, Klaus M.

Bark, Steve

<120> Markierte Peptide und Verfahren und Zwischenprodukte,  
die sich zu deren Herstellung eignen

25 <130> 1361.003WO1

<160> 12

30 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 44

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Lys Lys Glu Lys Glu Arg Pro Glu Ile Ser Leu Pro Ser Asp Phe

1 5 10 15

40 Glu His Thr Ile His Val Gly Phe Asp Ala Cys Thr Gly Glu Phe Thr

20 25 30

Gly Met Pro Glu Gln Trp Ala Arg Leu Leu Gln Thr

35 40

45 <210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

50 <220>

<221> SITE

<222> 10

<223> Ein modifizierter Rest

55 <223> Ein synthetisches Peptid

&lt;400&gt; 2

Ala Lys Ala Ala Arg Ala Ala Ala Ala Xaa Ala Ala Arg Ala Cys Ala  
1 5 10 15

5 <210> 3  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

10 <220>  
 <221> SITE  
 <222> 3  
 <223> Eine geschützte N-methylaminooxy-Aminosäure

15 <223> Ein synthetisches Peptid

&lt;400&gt; 3

Leu Tyr Xaa Ala Gly Met Pro Ala Leu  
1 5

20 <210> 4  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 4  
 Lys Asn Ala Arg Cys  
 1 5

30 <210> 5  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

35 <220>  
 <221> SITE  
 <222> 8  
 <223> Eine geschützte N-methylaminooxy-Aminosäure

40 <223> Ein synthetisches Peptid

&lt;400&gt; 5

Lys Asn Ala Arg Cys Gly Ala Xaa Tyr Leu  
1 5 10

45 <210> 6  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

50 <220>  
 <223> Ein synthetisches Peptid

&lt;400&gt; 6

55 Cys Glu Tyr Arg Ile Asp Arg Val Arg Leu Phe Val Asp Lys Leu Asp



<221> SITE  
 <222> 8  
 <223> Eine geschützte N-methylaminooxy-Aminosäure

5 <400> 10  
 Lys Asn Ala Arg Cys Gly Ala Xaa Tyr Leu  
 1 5 10

<210> 11  
 10 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 15 <223> Ein synthetisches Peptid

<221> SITE  
 <222> 1  
 <223> Eine geschützte N-methylaminooxy-Aminosäure

20 <400> 11  
 Xaa Lys Lys Lys Glu Lys Glu Arg Pro Glu Ile Ser Leu Pro Ser Asp  
 1 5 10 15  
 Phe Glu His Thr Ile His Val Gly Phe Asp Ala Cys Thr Gly Glu Phe  
 20 25 30  
 25 Thr Gly Met Pro Glu Gln Trp Ala Arg Leu Leu Gln Thr  
 35 40 45

<210> 12  
 30 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 35 <223> Ein synthetisches Peptid

<221> SITE  
 <222> 3  
 <223> Eine geschützte N-methylaminooxy-Aminosäure

40 <400> 12  
 Leu Tyr Xaa Ala Gly Cys Glu Tyr Arg Ile Asp Arg Val Arg Leu Phe  
 1 5 10 15  
 Val Asp Lys Leu Asp Asn Ile Ala Gln Val Pro Arg Val Gly Ala Ala  
 20 25 30  
 45 His His His His His  
 35

50 **Hiezu 4 Blatt Zeichnungen**

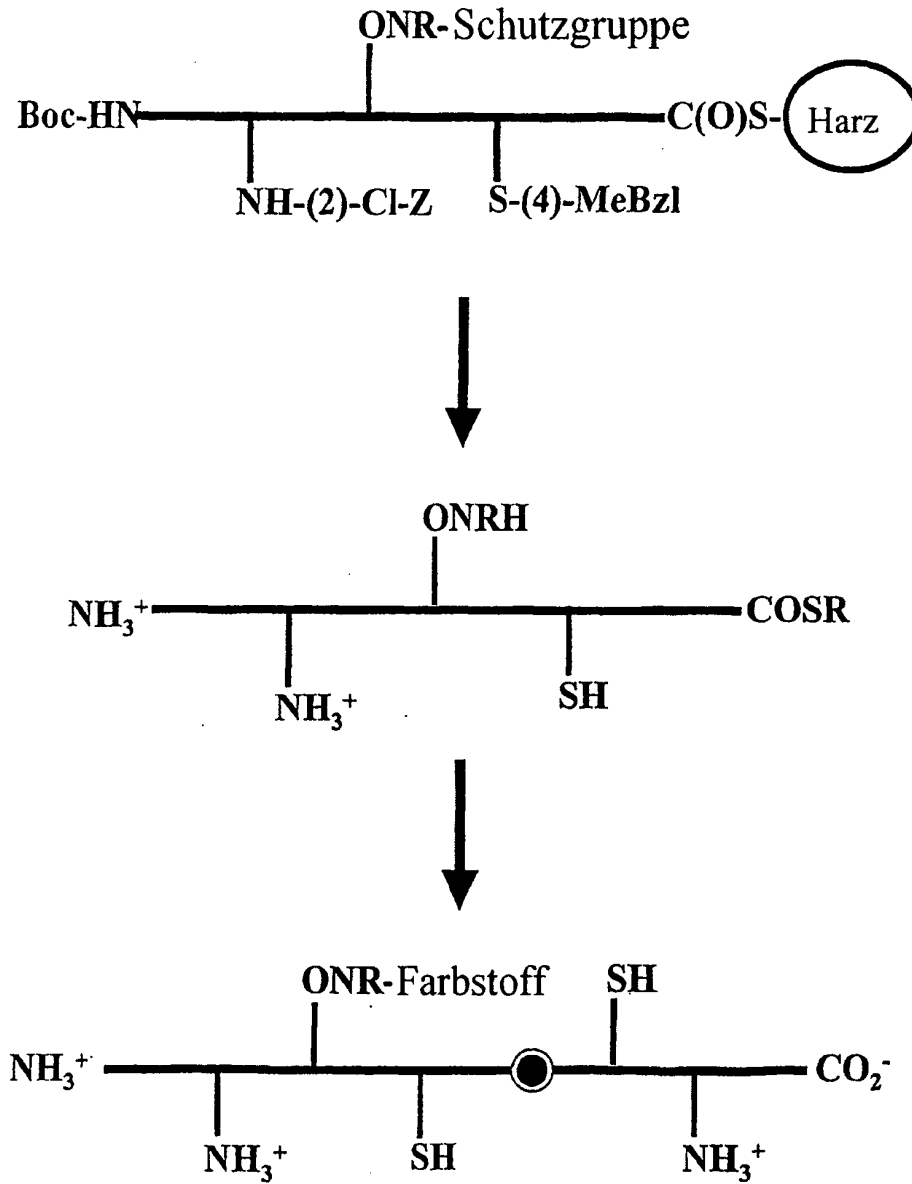


FIG. 1



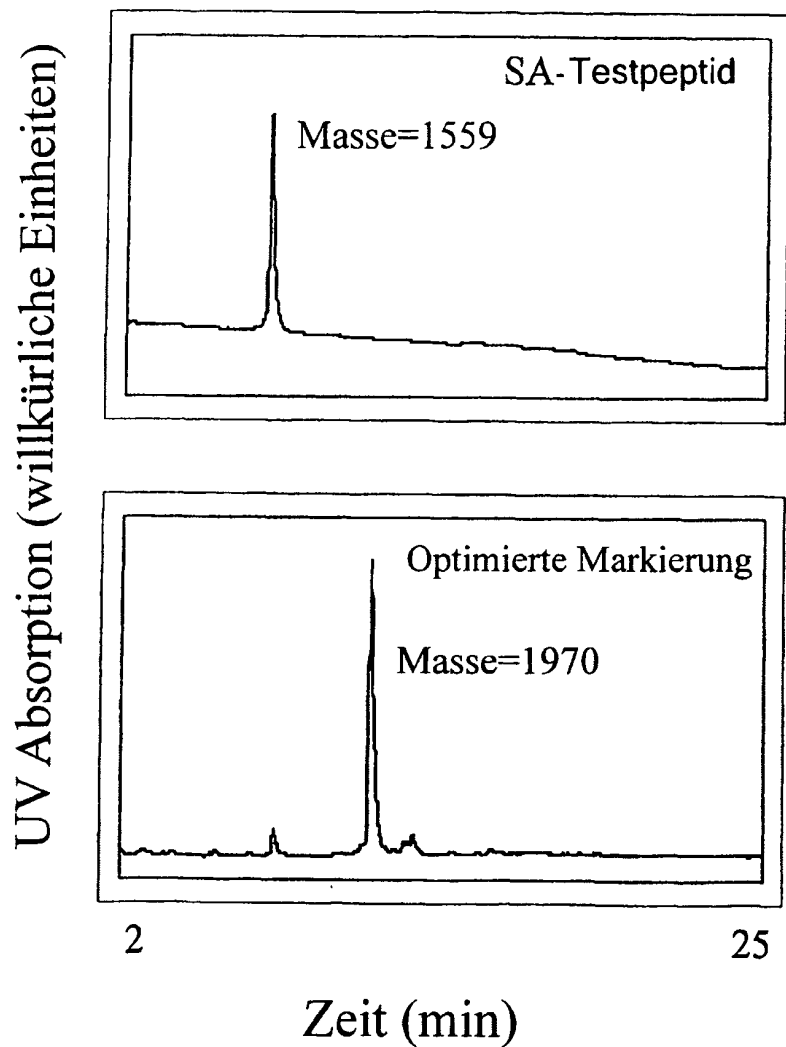


FIG. 3

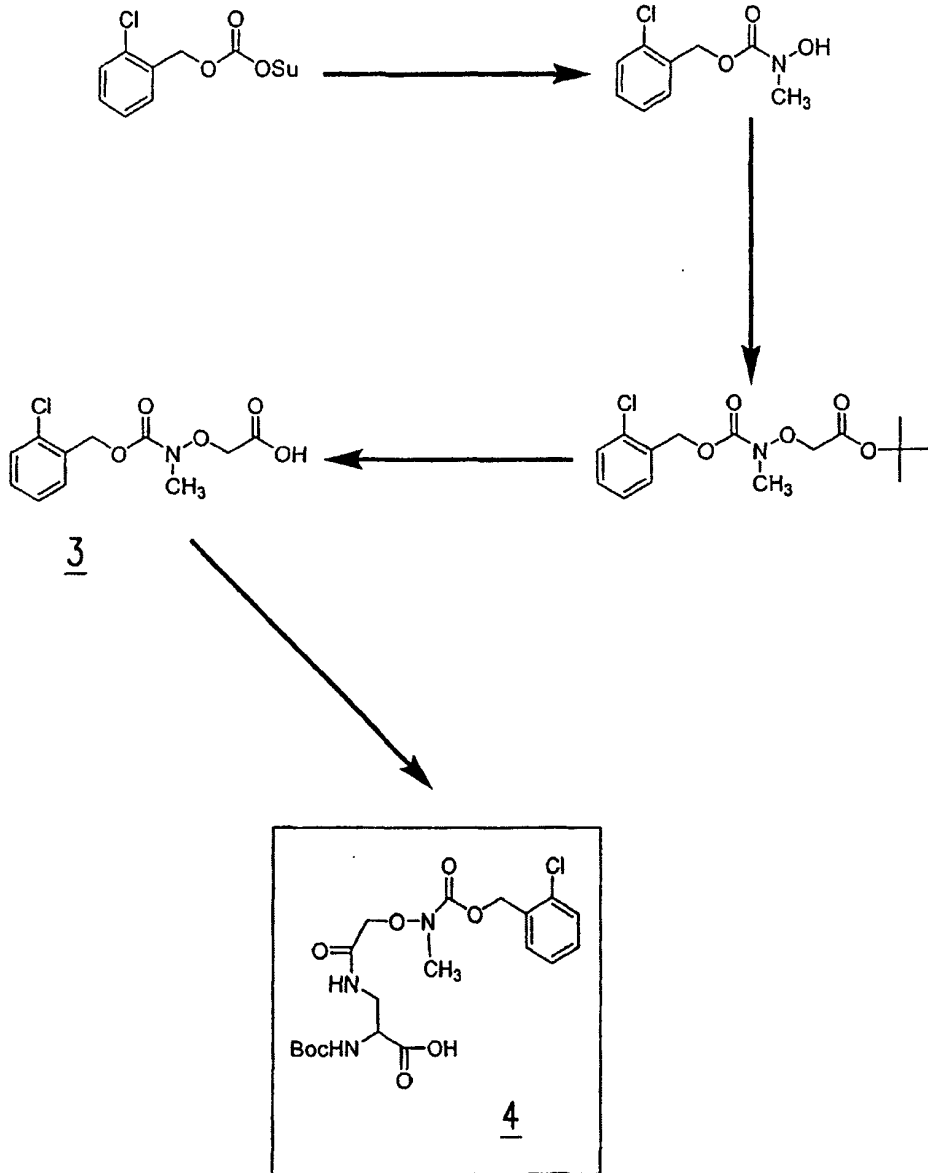


FIG. 4

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC <sup>8</sup> : <b>C07K 1/13 (2006.01); C07K 1/107 (2006.01)</b>		<b>AT 009 391 U1</b>
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: C07K 1/13, C07K 1/107, C07K 1/107D2		
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): C07K		
Konsultierte Online-Datenbank: WPI, EPODOC, Internet, Pubmed, EMBASE, CA		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am <b>23.11.2006 eingereichten</b> Ansprüchen erstellt.		
Die in der Gebrauchsmusterschrift veröffentlichten Ansprüche könnten im Verfahren geändert worden sein (§ 19 Abs. 4 GMG), sodass die Angaben im Recherchenbericht, wie Bezugnahme auf bestimmte Ansprüche, Angabe von Kategorien (X, Y, A), nicht mehr zutreffend sein müssen. In die dem Recherchenbericht zugrundeliegende Fassung der Ansprüche kann beim Österreichischen Patentamt während der Amtsstunden Einsicht genommen werden.		
Kategorie <sup>7)</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	Steven J. Bark, Sandra Schmid, and Klaus M. Hahn. "Highly Efficient Method for Site-Specific Modification of Unprotected Peptides after Chemical Synthesis." J. Am. Chem. Soc.; 2000; 122(15) pp 3567 - 3573 <i>*Ganzes Dokument, besonders Schema 1, Seiten 3568-3571*</i>	1-4, 6-8, 10-20, 25,27-29,34,35,37-42
	--	
A	Vilaseca LA, Rose K, Werlen R, Meunier A, Offord RE, Nichols CL, Scott WL. "Protein conjugates of defined structure: synthesis and use of a new carrier molecule." Bioconjug Chem. 1993 Nov-Dec;4(6):515-20. <i>*Ganzes Dokument*</i>	1-43
	--	
A	WO96/40662 (Cellpro Incorporated) 19. Dezember 1996 (19.12.1996) <i>*Seiten 1-3, Ansprüche*</i>	1-43
	--	
A	Geoghegan KF, Stroh JG. "Site-directed conjugation of non-peptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine." Bioconjug Chem. 1992 Mar-Apr;3(2):138-46. <i>*Ganzes Dokument*</i>	1-43
	----	
<sup>7)</sup> Kategorien der angeführten Dokumente: <b>X</b> Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: der Anmeldegegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. <b>Y</b> Veröffentlichung von Bedeutung: der Anmeldegegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist.		<b>A</b> Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. <b>P</b> Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. <b>E</b> Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). <b>&amp;</b> Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist.
Datum der Beendigung der Recherche: 12. Februar 2007	<input type="checkbox"/> Fortsetzung siehe Folgeblatt	Prüfer(in): Dr. GÖRNER

## Hinweis

Die **Kategorien** der angeführten Dokumente dienen in Anlehnung an die Kategorien der Entgegenhaltungen bei EP- bzw. PCT-Recherchenberichten zur raschen Einordnung des ermittelten Stands der Technik.

Bitte beachten Sie, dass nach **der Zahlung der Veröffentlichungsgebühr** die **Registrierung** erfolgt und die **Gebrauchsmusterschrift veröffentlicht** wird, auch wenn die Neuheit bzw. der erforderliche erfinderische Schritt nicht gegeben ist. In diesen Fällen könnte ein allfälliger **Antrag auf Nichtigkeitsklärung** (kann von jedermann gestellt werden) zur Löschung des Gebrauchsmusters führen. Auf das Risiko allfälliger im Fall eines Nichtigkeitsantrags anfallender Prozesskosten (die gemäß §§ 40 bis 55 Zivilprozessordnung zugesprochen werden) darf hingewiesen werden.

## Ländercodes von Patentschriften (Auswahl, weitere Codes siehe **WIPO ST. 3**.)

**AT** = Österreich; **AU** = Australien; **CA** = Kanada; **CH** = Schweiz; **DD** = ehem. DDR; **DE** = Deutschland; **EP** = Europäisches Patentamt; **FR** = Frankreich; **GB** = Vereinigtes Königreich (UK); **JP** = Japan; **RU** = Russische Föderation; **SU** = Ehem. Sowjetunion; **US** = Vereinigte Staaten von Amerika (USA); **WO** = Veröffentlichung gem. PCT (WIPO/OMPI);

**Die genannten Druckschriften** können in der Bibliothek des Österreichischen Patentamtes während der Öffnungszeiten (Montag bis Freitag von 8 bis 12 Uhr 30, Dienstag von 8 bis 15 Uhr) unentgeltlich eingesehen werden. Bei der von der Teilrechtsfähigkeit des Österreichischen Patentamtes betriebenen Kopierstelle können **Kopien** der ermittelten Veröffentlichungen bestellt werden.

Über den Link <http://at.espacenet.com/> können **Patentveröffentlichungen am Internet** kostenlos eingesehen werden.

Auf Bestellung gibt die von der Teilrechtsfähigkeit des Österreichischen Patentamtes betriebene Serviceabteilung gegen Entgelt zu den im Recherchenbericht genannten Patentedokumenten allfällige veröffentlichte "**Patentfamilien**" (den selben Gegenstand betreffende Patentveröffentlichungen in anderen Ländern, die über eine gemeinsame Prioritätsanmeldung zusammenhängen) bekannt.

**Auskünfte und Bestellmöglichkeit** zu den Serviceleistungen erhalten Sie unter der Telefonnummer

**+43 1 534 24 - 738 bzw. 739**

Schriftliche Bestellungen:

per FAX Nr. + 43 1 534 24 – 737 oder per E-Mail an [Kopierstelle@patentamt.at](mailto:Kopierstelle@patentamt.at)