



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 32 640 T2 2006.01.12

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 929 567 B1

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C07K 1/04 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 32 640.3

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/DK97/00375

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 939 974.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 98/011125

(86) PCT-Anmeldetag: 09.09.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 19.03.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 21.07.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 02.03.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 12.01.2006

(30) Unionspriorität:

97196 09.09.1996 DK

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Zealand Pharma A/S, Glostrup, DK

(72) Erfinder:

HOLM, Arne, 2840 Holte, DK; LARSEN, Bjarne Due, 2700 Broenshoej, DK

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(54) Bezeichnung: FESTPHASEN-PEPTIDSYNTHES

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### Hintergrund der Erfindung

#### 1. Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Peptiden durch Festphasensynthese.

#### 2. Stand der Technik

**[0002]** Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) ist ein äußerst erfolgreiches Verfahren, das von Merrifield im Jahr 1963 (Verweis 1) eingeführt wurde. Zahlreiche Peptide seither wurden mittels dieses Verfahrens synthetisiert. Ein ausgezeichneter Überblick über die gängigen chemischen Syntheseverfahren von Peptiden und Proteinen wird von S.B.H. Kent (Verweis 2) bereitgestellt, der hierin durch Verweis aufgenommen ist.

**[0003]** In der Praxis werden zwei Verfahrensweisen für die Anordnung von Peptidketten durch Festphasensynthese verwendet, nämlich die schrittweise Festphasensynthese und die Festphasen-Fragmentkondensation.

**[0004]** Bei schrittweiser SPPS wird die C-terminale Aminosäure in Form eines N- $\alpha$ -geschützten, falls erforderlich in Form eines Seitenketten-geschützten reaktiven Derivats kovalent entweder direkt oder mittels eines geeigneten Linkers an einen "festen" Träger, z.B. ein Polymerharz, gebunden, der in einem organischen Lösungsmittel gequollen wird. Die N- $\alpha$ -Schutzgruppe wird entfernt, und die folgenden geschützten Aminosäuren werden schrittweise hinzugefügt.

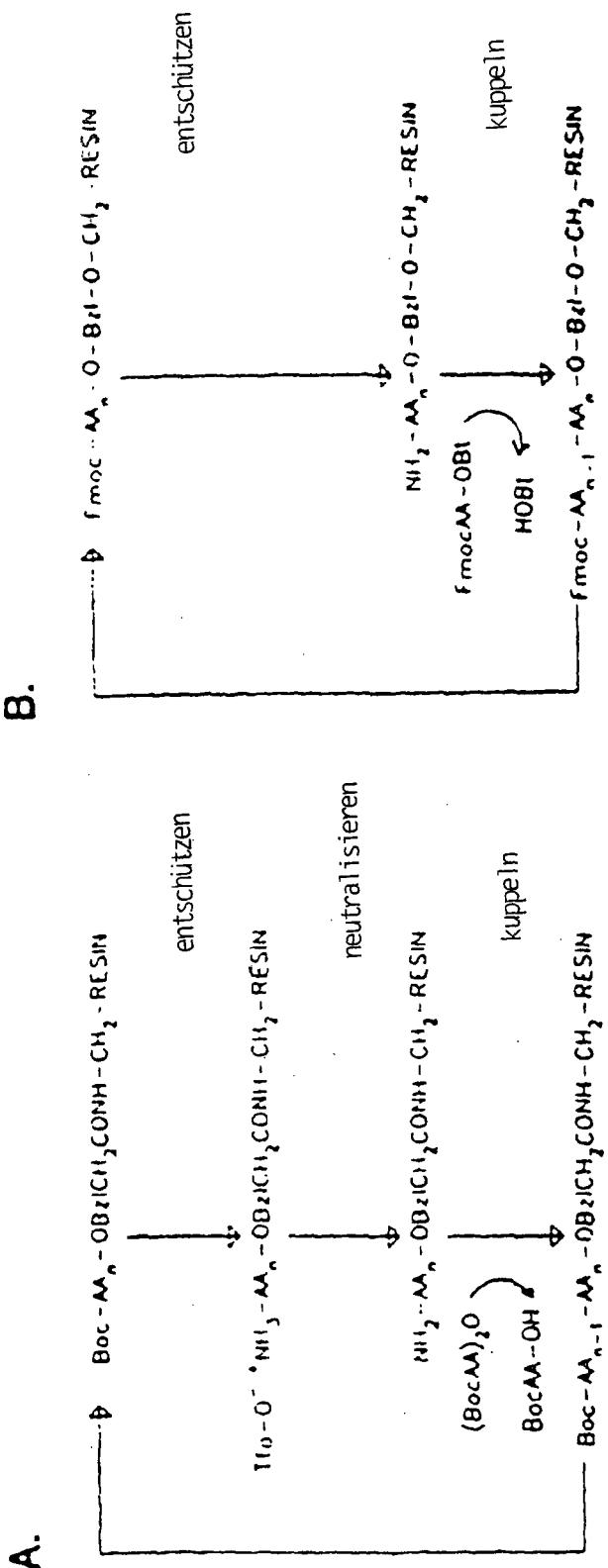
**[0005]** Nachdem die erwünschte Peptidkettenlänge erreicht wurde, werden die Seitenketten-Schutzgruppen entfernt, und das Peptid wird vom Harz gespalten, wobei dies in getrennten Schritten oder zugleich erfolgen kann.

**[0006]** Bei der Festphasen-Fragmentkondensation wird die Targetsequenz durch konsekutive Kondensation von Fragmenten auf einem festen Träger unter Verwendung von geschützten Fragmenten, die mittels schrittweiser SPPS hergestellt wurden, angeordnet.

**[0007]** Im Laufe der Jahre wurden zwei Kupplungsverfahren, basierend auf der Verwendung von verschiedenen N- $\alpha$ -Schutzgruppen und übereinstimmenden Seitenketten-Schutzgruppen, entwickelt.

**[0008]** Merrifield verwendete tert-Butyloxycarbonyl (Boc) als die N- $\alpha$ -Schutzgruppe, während 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) von Carpino & Han (Verweis 12) eingeführt wurde.

**[0009]** Die in einen Zyklus der Kettenverlängerung in schrittweiser SPPS unter Verwendung von Boc- und Fmoc-Chemieverfahren eingebundenen Arbeitsschritte sind in den nachstehenden Reaktionsschemata dargestellt (entnommen aus Verweis 2).



**[0010]** Beim N- $\alpha$ -Boc-geschützten Peptid, das an ein PAM-Harz gekuppelt ist, wird die N- $\alpha$ -Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure (TFA) entfernt. Das resultierende Aminsalz wird gewaschen und mit einem tertiären Amin neutralisiert. Die darauf folgende Peptidbindung wird durch Reaktion mit einer aktivierten Boc-Aminosäure, z.B. einem symmetrischen Anhydrid, gebildet. Im Allgemeinen ist der Seitenkettenenschutz Benzylbasiert, und die Entfernung der Schutzgruppe erfolgt mit HF oder einer Sulfonsäure.

**[0011]** Beim N- $\alpha$ -Fmoc-geschützten Peptid, das an ein Harz gekuppelt ist, wird die N- $\alpha$ -Schutzgruppe durch Behandlung mit einem sekundären Amin, normalerweise Piperidin, in einem organischen Lösungsmittel, z.B. N,N-Dimethylformamid (DMF) oder Dichlormethan (DCM), entfernt. Nach dem Waschen wird das neutrale Peptidharz mit einer aktivierten Fmoc-Aminosäure, z.B. einem aktiven Hydroxybenzotriazolester, umgesetzt.

**[0012]** Der Seitenketenschutz basiert auf tert-Butyl, Trityl und Arylsulfonyl, und zur Entfernung der Schutzgruppen der Seitenketten wird vorzugsweise TFA verwendet.

**[0013]** Wenn auch die Boc- und Fmoc-Verfahren für im Wesentlichen alle gängigen praktischen Peptidsynthesen eingesetzt werden, wurden auch andere N- $\alpha$ -Schutzgruppen bereits vorgeschlagen (Steward & Young, Verweis 13).

**[0014]** Boc bildet eine säurelabile Urethangruppe, und andere Vorschläge dieser Kategorie sind Biphenylisopropyloxycarbonyl (Bpoc), 3,5-Dimethoxyphenylisopropyloxycarbonyl (Ddz), Phenylisopropyloxycarbonyl (Poc) und 2,3,5-Tetramethylbenzyloxycarboxyl (Tmz).

**[0015]** Andere Arten verfügbarer N- $\alpha$ -Schutzgruppen umfassen Nitrophenylsulfenyl (Nps), das entweder durch sehr stark verdünnte, wasserfreie Säure, z.B. HCl, oder durch nucleophilen Angriff, z.B. mit Methyl-3-nitro-4-mercaptopbenzoat, entfernt werden kann. Auch Dithiasuccinyl (Dts), das durch nucleophilen Angriff entfernt werden kann, könnte verwendet werden.

**[0016]** SPPS hat den grundlegenden Vorteil, das sie sich für voll-automatisierte oder halbautomatisierte Kettenanordnungs-Chemie eignet. Ein System für SPPS unter Bedingungen wie niederer Druck und kontinuierlicher Durchfluss wurde von Dryland & Sheppard (Verweis 7) entwickelt und auch weiterentwickelt; siehe Cameron, Meldal & Sheppard (Verweis 14), Holm & Meldal (Verweis 15) und die WO 90/02605.

**[0017]** Während sich SPPS nun zu einem Eckpfeiler der Protein- und Peptidsynthese entwickelt hat, konnte bisher für bestimmte Probleme dennoch keine Lösung gefunden werden. Da manche dieser Probleme recht wahrscheinlich mit der Peptidstruktur zusammenhängen, ist an dieser Stelle eine kurze Erläuterung diesbezüglich angebracht.

**[0018]** Empirische Vorhersagen von Proteinkonformationen wurden von Chou & Fasman (Verweis 6) gemacht. Es ist bekannt, dass der Aufbau von Proteinen als Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur beschrieben werden kann. Die Primärstruktur bezieht sich auf die Aminosäuresequenz des Proteins. Die Sekundärstruktur ist die lokale räumliche Anordnung der Polymerhauptkette ohne Betrachtung der Seitenkettenkonformation. Als Beispiele für Sekundärstrukturen können  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter und  $\beta$ -Schleifen, die aus Tetrapeptiden bestehende Kettenumkehrregionen sind, genannt werden. Die Tertiärstruktur ist die Anordnung aller Atome im Raum, einschließlich Disulfidbrücken und Seitenkettenpositionen, sodass alle nahen und weitreichenden Wechselwirkungen berücksichtigt sind.

**[0019]** Die Bezeichnung Quartärstruktur kann verwendet werden, um die Wechselwirkung zwischen Untereinheiten des Proteins, z.B. den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von Hämoglobin, zu bezeichnen.

**[0020]** Nach einer Besprechung früherer Versuche, die Proteinsekundärstruktur mit Aminosäurezusammensetzungen zu korrelieren, worin z.B. Ser, Thr, Val, Ile und Cys als "Helixzerstörer" und Ala, Leu und Glu als "Helixbildner" klassifiziert wurden, während hydrophobe Reste als starke " $\beta$ -Bildner" und Prolin zusammen mit geladenen Aminosäureresten als " $\beta$ -Zerstörer" klassifiziert wurden, führten Chou & Fasman eine statistische Analyse von 29 Proteinen mit bekannter Röntgenstruktur durch, um Regeln zur Vorhersage von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Regionen zu erstellen.

**[0021]** Auf Grundlage dieser Studien bestimmten sie so genannte Neigungsfaktoren  $P\alpha$ ,  $P\beta$  und  $Pt$ , die Konformationsparameter sind, welche die Positionspräferenzen als  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt bzw.  $\beta$ -Schleife für natürliche L-Aminosäuren, die einen Teil von Proteinen darstellen, ausdrücken.

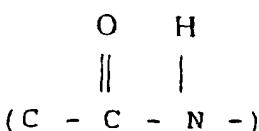
**[0022]** Aus praktischen Gründen sind die  $P\alpha$  und  $P\beta$  nachstehend aufgelistet. Einbuchstaben-Abkürzungen für die einzelnen Aminosäuren sind in Klammern angegeben.

	$P_\alpha$		$P_\beta$
Glu (E)	1,51	Val	1,70
Met (M)	1,45	Ile	1,60
Ala (A)	1,42	Tyr	1,47
Leu (L)	1,21	Phe	1,38
Lys (K)	1,16	Trp	1,37
Phe (F)	1,13	Leu	1,30
Gln (Q)	1,11	Cyr	1,19
Trp (W)	1,08	Thr	1,19
Ile (I)	1,08	Gln	1,10
Val (V)	1,06	Met	1,05
Asp (D)	1,01	Arg	0,93
His (H)	1,00	Asn	0,89
Arg (R)	0,98	His	0,87
Thr (T)	0,83	Ala	0,83
Ser (S)	0,77	Ser	0,75
Cys (C)	0,70	Gly	0,75
Tyr (Y)	0,69	Lys	0,74
Asn (N)	0,67	Pro	0,55
Pro (P)	0,57	Asp	0,54
Gly (G)	0,57	Glu	0,37

**[0023]** Im Allgemeinen bedeuten Werte unter 1,00, dass die betreffende Aminosäure als für die bestimmte Sekundärstruktur ungünstig zu betrachten ist.

**[0024]** Beispielsweise sind die hydrophoben Säuren (z.B. Val, Ile, Leu) starke  $\beta$ -Faltblatt-Bildner, während die geladenen Aminosäuren (z.B. Glu, Asp, His)  $\beta$ -Faltblatt-Zerstörer sind.

**[0025]** In der  $\alpha$ -Helix-Struktur wird die Spiralkonfiguration des Peptids durch Wasserstoffbindungen zwischen dem Wasserstoffatom, das an das Stickstoffatom in einer Wiederholungseinheit gebunden ist,



und dem Sauerstoffatom, das an ein Kohlenstoffatom drei Einheiten entlang der Kette gebunden ist, stark aufrechterhalten.

**[0026]** Wird ein Polypeptid in Lösung gebracht, so kann die  $\alpha$ -Helix durch Einstellung des pH dazu gebracht werden, sich zu entwinden und ein Zufallsknäuel zu bilden. Der Übergang von  $\alpha$ -Helix zu Zufallsknäuel tritt innerhalb eines sehr engen pH-Bereichs ein. Da die Wasserstoffbindungen in der  $\alpha$ -Helix alle dieselbe Bindungsstärke aufweisen, neigen sie dazu, sich alle gleichzeitig zu lösen. Die Veränderung kann auch durch Hitze induziert werden.

**[0027]** Die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur besteht aus gänzlich ausgedehnten Peptidketten, in denen Wasserstoffbindungen die Wasserstoffatome einer Kette mit den Sauerstoffatomen der benachbarten Kette verbinden. Somit tragen Wasserstoffbindungen nicht zur inneren Organisation der Kette bei, wie sie es in der  $\alpha$ -Helix tun, sondern sie binden lediglich Kette an Kette. Benachbarte Ketten können parallel oder antiparallel sein.

**[0028]**  $\beta$ -Schleifen werden häufig in diesen Teilen einer Peptidkette beobachtet, die antiparallele Ketten in einer  $\beta$ -Faltblattstruktur verbinden.

**[0029]** In einer  $\beta$ -Schleife bilden die CO- und NH-Gruppen aus Aminosäure Nr. n in der Peptidkette eine Wasserstoffbindung an die entsprechenden Gruppen in Aminosäure Nr. n+4.

**[0030]**  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt stellen stark variierende Anteile der Peptidkonformation von Proteinen dar (0

bis 80 %), und die verbleibenden Teile der Proteine werden zu anderen Strukturen gefaltet. In den meisten Proteinen sind Abschnitte der Peptidketten in Form von unregelmäßig gefalteten "Zufallsknäuel" vorhanden.

**[0031]** Im Rahmen einer Betrachtung der allgemeinen Probleme, die stets in Verbindung mit SPPS fortbestehen, konzentriert sich S.B.H. Kent (Verweis 2) auf die Synthese von "schwierigen Sequenzen".

**[0032]** Offenkundig beruht das gesamte Grundprinzip von SPPS auf einer vollständigen Entfernung von N- $\alpha$ -Schutzgruppen vor jedem der einzelnen eingebundenen Kupplungsschritte.

**[0033]** Umgekehrt sollten idealerweise alle Aminogruppen ohne N- $\alpha$ -Schutzgruppen an das reaktive Aminosäurederivat gemäß der erwünschten Sequenz gekuppelt werden, d.h. eine komplette Aminoacylierung sollte stattfinden.

**[0034]** Kent hält fest, dass das schwerwiegendste mögliche Problem bei schrittweiser SPPS unvollständige Peptidbindungsbildung darstellt, die Peptide mit einer oder mehreren fehlenden Aminosäuren (Deletionen) entstehen lässt, die jedoch der Targetsequenz ähnliche Eigenschaften aufweisen.

**[0035]** Solche unvollständigen Kupplungen kommen in manchen Sequenzen häufiger vor als in anderen, woher die Bezeichnung "schwierige Sequenzen" stammt, und sind augenscheinlich auch in Fmoc-Chemieverfahren stärker vorhanden als in Boc-Chemieverfahren.

**[0036]** Zahlreiche identifizierte "schwierige Sequenzen" wurden von Wissenschaftern, einschließlich den Erfindern der vorliegenden Beschreibung, untersucht.

**[0037]** Während SPPS von Homo-Oligopeptiden, die Leucin oder Alanin enthalten, unter Verwendung des Fmoc-Verfahrens wurde unwirksame Entfernung von N- $\alpha$ -Schutzgruppen mit Piperidin in einer sequenzabhängigen Weise (Verweise 3 und 4) beobachtet. Untersuchungen zeigten, dass dieses Phänomen mit darauf folgender langsamer oder unvollständiger Aminosäurekupplung zusammenhing, und der Nachweis von  $\beta$ -Faltblatt-Aggregation der wachsenden Peptidkette wurde als eine Ursache für die schwierigen Kupplungen und unvollständigen Fmoc-Schutzgruppenentferungen dargestellt. Dieser Nachweis basierte auf allgemeinen physikalisch-chemischen Beobachtungen (Verweis 4) und auf einer detaillierten "Raman-Near-Infrared-Spectroscopic"-Studie (Verweis 5). Die erwähnten physikalisch-chemischen Beobachtungen können wie folgt zusammengefasst werden: Im Fall von Synthese von H-(Ala)<sub>n</sub>-Lys-OH an einer Polyamid-polymerisierten Kieselgur-Matrize (PepSyn K) wurden bis n = 5 keine Probleme beobachtet, es waren jedoch nach Standard-Schutzentfernung mit Piperidin (20 % Piperidin in DMF) mit n = 6 stets etwa 20 – 25 % an Fmoc-geschütztem Peptid vorhanden. Wurde die Synthese bis n = 10 fortgesetzt, wurde ein relativ kompliziertes Gemisch erhalten, das das Targetpeptid (n = 10) sowie Deletionspeptide entsprechend n = 6, 7, 8 und 9 und Deletionspeptide, in denen die Fmoc-Gruppe immer noch an den N-Terminus gebunden war, worin n = 6, 7, 8 bzw. 9, umfasste ([Fig. 1](#)). Dieses Gemisch wurde durch FAB-MS nach HPLC-Auf trennung der einzelnen Komponenten identifiziert. Fehlsequenzen oder teilweise Schutzaufhebung bei n = 2 – 5 oder unvollständige Schutzaufhebung des Targetpeptids (n = 10) wurde nicht beobachtet, wodurch die Probleme auf einen bestimmten Abschnitt der Homo-Oligopeptidkette eingegrenzt werden konnten. Diese Art schwieriger Aminoacylierungen und unvollständiger Entschüttungen kann daher nicht zufällig auftretenden Schwierigkeiten zugeordnet werden, im Gegensatz zu zufällig auftretenden Schwierigkeiten, die nur auf gewöhnliche sterische Probleme zurückzuführen sind (Verweis 2). Obwohl Versuchsbedingungen variiert wurden, z.B. Harztyp, Entschüttungsdauer, Lösungsmittel, Zusatz von chaotropen Substanzen, blieben die Probleme trotz Erhitzen auf 50 °C, das eine optimale Wirkung auf unvollständige Fmoc-Entschüttung zeigte (Verweis 4), bestehen.

**[0038]** Es ist eine äußerst charakteristische Eigenschaft der Homo-Oligoalaninkette, dass auf die unvollständigen Schritte der Fmoc-Schutzaufhebung äußerst geringe Acylierungen der nächsten Aminosäure in der Sequenz folgen. Somit belaufen sich wirksame Acylierungsdauern für die ersten sechs Alanine auf weniger als 60 min, während vollständige Acylierung mit Ala<sub>7</sub>, Ala<sub>8</sub>, Ala<sub>9</sub> und Ala<sub>10</sub> 26, 28, 30 bzw. 7 Stunden dauert ([Fig. 2](#)).

**[0039]** Kent (Verweis 2) schlägt zahlreiche Lösungen für das mit Sequenz-abhängigen Kupplungsschwierigkeiten verbundene Problem vor, nämlich die Verwendung von Wärme im Kupplungsschritt und eine quantitative Umsetzung von verbleibenden, nicht umgesetzten, Harz-gebundenen Peptidketten zu mit Endgruppen versehenen Spezies in einem "Capping"-Verfahren.

**[0040]** Das US-Patent Nr. 5.021.550 offenbart ein Verfahren der Festphasen-Peptidsynthese, in der nicht umgesetzte Zwischenprodukte durch kovalentes Binden ihrer reaktiven N-Termini an den festen Träger, wodurch

die Zwischenprodukte an zwei Stellen gebunden werden, aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0041]** Ziel der vorliegenden Erfindung ist, eine SPPS bereitzustellen, mittels derer Peptide, die als "schwierige Sequenzen" erkannt wurden oder sich als solche zu erkennen geben, mit hoher Ausbeute und Reinheit synthetisiert werden können.

**[0042]** Ein weiteres Ziel der Erfindung ist, eine SPPS bereitzustellen, die zur Reduktion von Kupplungszeiten beiträgt, nicht nur für schwierige Sequenzen, sondern auch für sonst unkomplizierte Sequenzen, bei denen es wünschenswert ist, die normalerweise langen Kupplungszeiten zu reduzieren.

**[0043]** Die Art und Weise, auf die diese und andere Ziele und Vorteile der Erfindung erreicht werden, wird durch die folgende Beschreibung und die beiliegenden Zeichnungen, die HPLC-Diagramme für verschiedene Peptide zeigen, die durch Festphasensynthese erhalten wurden, klarer erscheinen.

#### Kurzbeschreibung der Zeichnungen

**[0044]** [Fig. 1](#) ist eine HPLC von rohem H-Ala<sub>10</sub>-Lys-OH, das eine wesentliche Menge an Deletionspeptiden (Peak 1, 2, 3 und 4) und unvollständig Fmoc-entschützten Peptiden (Peak 6, 7, 8 und 9) neben dem Zielpeptid (Peak 5) aufweist.

**[0045]** [Fig. 2](#) ist ein Diagramm, das aufeinander folgende Kupplungszeiten für jedes der Alanine in der Synthese von H-Ala<sub>10</sub>-Lys-OH zeigt.

**[0046]** [Fig. 3](#) ist eine HPLC von H-Ala<sub>10</sub>-Lys<sub>3</sub>-OH, die das Targetpeptid zeigt. Keine Deletionspeptide wurden beobachtet.

**[0047]** [Fig. 4](#) ist eine HPLC von H-Ala<sub>20</sub>-Lys<sub>3</sub>-OH, die Deletionspeptide (Peak 1, 2, 3, 4 und 5) neben dem Targetpeptid (Peak 6) zeigt.

**[0048]** [Fig. 5](#) ist eine HPLC von H-Ala<sub>10</sub>-Lys<sub>6</sub>-OH. Keine Deletionspeptide wurden beobachtet.

**[0049]** [Fig. 6](#) ist eine HPLC von H-Ala<sub>20</sub>-Lyss-OH. Keine Deletionspeptide wurden beobachtet.

**[0050]** [Fig. 7](#) ist eine HPLC von H-VQAAIDYING-OH, Acyl-Carrier-Protein (ACP) 65-74. Das Targetpeptid (Peak 3) von Deletionspeptiden begleitet (Peak 2 stellt das des-Val-Peptid dar).

**[0051]** [Fig. 8](#) ist eine HPLC von H-VQAAIDYING-K<sub>6</sub>-OH, Acyl-Carrier-Protein (ACP) 65-74, gekuppelt an die Lys(Boc)<sub>6</sub>-Präsequenz mit nur einer geringen Menge an des-Val-Peptid (Peak 1).

**[0052]** [Fig. 9](#) ist eine HPLC von H-Ala<sub>10</sub>-Lys-OH, hergestellt durch Einführen eines HMPA-Linkers. Mehrere Deletionspeptide werden beobachtet (von Ala<sub>10</sub>-Lys(tBOC)-HMPA-(Lys(tBoc))<sub>6</sub>-Harz); diese HPLC ist nur zur Veranschaulichung dargestellt.

**[0053]** [Fig. 10](#) ist eine ähnliche HPLC von H-Ala<sub>10</sub>-Lys-OH, hergestellt unter Verwendung eines MMA-Linkers, die eine signifikante Reduktion der Menge an Deletionspeptiden im Vergleich zu [Fig. 9](#) (von Ala<sub>10</sub>-Lys-MMA-(Lys(tBoc))<sub>6</sub>-Harz) zeigt und nur zur Veranschaulichung dargestellt ist.

#### Detaillierte Offenbarung der Erfindung

**[0054]** Um die zuvor unter Verweis auf Verw. 3 und 4 beschriebenen Probleme weiter zu untersuchen, beschäftigten sich die Erfinder der vorliegenden Beschreibung mit der Frage, bis zu welchem Ausmaß die  $\beta$ -Faltblatt-Bildung der Homo-Oligoalaninkette durch Einbindung einer kürzeren Peptidsequenz, einer Präsequenz, in die Kette am C-Terminus beeinflusst werden kann. Diese Frage ist mit der Tatsache verbunden, dass Proteinstrukturen und Polypeptidsequenzen je nach den Aminosäuren in der Sequenz und den vorangehenden Aminosäuren Abschnitte mit gut definierten Strukturen aufweisen können. Wie bereits erwähnt führen die Untersuchungen von Chou & Fasmans (Verweis 6) an Proteinstrukturen zur Erkennung von Klassen von Aminosäuren, die als überwiegend  $\alpha$ -Helix-induzierend oder  $\beta$ -Faltblatt- oder Zufallsknäuelinduzierend definiert sind. Obwohl a priori angenommen werden könnte, dass ähnliche Vorhersagen für Homo-Oligoalanine oder -Leuci-

ne getätigt werden können, wurde jedoch in Verweis 4 betont, dass die Regeln von Chou & Fasman Homo-Oligoalanin- oder -Leucin-Peptide nicht als  $\beta$ -Faltblatt-bildende Ketten vorherbestimmen. Weiters kann nicht erwartet werden, dass sich die Regeln von Chou & Fasman auf Situationen während der Peptidsynthese auf einem Harz anwenden lassen, und sie lassen sich ganz eindeutig nicht anwenden, wenn Seitenketten-geschützte Aminosäuren Teil der Synthese sind.

**[0055]** In den grundlegenden Studien wurde die Synthese von  $H\text{-}(Ala)_n\text{-(Lys)}_m\text{-OH}$ , worin  $(Lys)_m$  für die Präsequenz steht und  $m$  gleich 1, 3 und 6 ist, untersucht. Es wurde eine Durchflussversion des Polyamidfestphasen-Verfahrens (Verw. 7), entwickelt an einem voll automatisierten Peptidsyntheseautomaten, wie zuvor beschrieben (Verw. 14) mit DMF als Lösungsmittel und 3fachem Überschuss an Fmoc-Alanin- bzw. Fmoc-Lysin(tBoc)-pfp-Estern und herkömmlicher Fmoc-Schutzgruppenentfernung mit 20 % Piperidin in DMF 10 Minuten lang verwendet. Kupplungszeiten wurden mit Dhbt-OH beobachtet, das zum gelben Dbht-O-Anion deprotoniert ist, wenn nicht-acylierte Aminogruppen noch vorhanden sind, und das Verschwinden der gelben Farbe bezeichnet den Endpunkt der Synthese. Nach Spaltung des Peptids vom Harz mit 95 % wässriger TFA wurde das Produkt mit Ether gewaschen und mittels HPLC analysiert. Die Ergebnisse bei  $m = 1$  sind oben beschrieben (Fig. 1). Ist  $m = 3$ , so ist aus der HPLC-Spur in Fig. 3 ersichtlich, dass die Synthese ohne nachweisbare Mengen an Deletionspeptiden oder unvollständige Fmoc-Schutzgruppenentfernung bis  $Ala_{10}$  fortgesetzt werden kann. Wird die Synthese jedoch bis  $Ala_{20}$  fortgesetzt, so zeigt das Chromatogramm (Fig. 4) die Gegenwart von Deletionspeptiden. Die Ergebnisse sind bei  $H\text{-}(Ala)_n\text{-(Lys)}_6\text{-OH}$  noch erstaunlicher, worin Produkte ohne nachweisbare Deletionspeptide sowohl mit  $Ala_{10}$  (Fig. 5) als auch mit  $Ala_{20}$  (Fig. 6) erhalten wurden. Weiters sind Kupplungszeiten von bis zu 30 Stunden auf Standard-Kupplungszeiten (< 2 Stunden) in den einzelnen Schritten drastisch reduziert. Bereits zuvor wurde versucht, die  $H\text{-}Ala_{20}\text{-OH}$ -Sequenz mittels des Boc-Verfahrens zu synthetisieren, doch es wurden hohe Konzentrationen an Deletions- und Insertionspeptiden erhalten (Verw. 8). Eindeutig hat die Präsequenz  $Lys_6$ , die unter den vorherrschenden Synthesebedingungen gänzlich mit der tBoc-Gruppe geschützt ist, eine äußerst maßgebliche und günstige Wirkung auf die Struktur der wachsenden Peptidkette, wodurch die sonst sehr schwerwiegenden Syntheseprobleme, die auf unvollständige Entfernung von Schutzgruppen und extrem langsame Kupplungsvorgänge zurückzuführen sind, ausgeräumt werden.

**[0056]** In Übereinstimmung mit diesen überraschenden Erkenntnissen basiert die vorliegende Erfindung auf der Einbindung einer bestimmten Präsequenz in den C-terminalen Teil, der an den festen Träger gebunden ist.

**[0057]** Dies ist ein fundamentaler Fortschritt gegenüber den früheren Versuchen nach dem Stand der Technik, mit schwierigen Sequenzen umzugehen, bei denen der Fokus auf den Reaktionsbedingungen und der Beschaffenheit des festen Trägers lag.

**[0058]** Wie nachstehend noch eingehend erläutert wird, kann die C-terminale Sequenz, über die das erwünschte Peptid an den festen Träger gebunden ist, auch geeignete Linker umfassen, um für z.B. bessere Bindungs- oder Spaltungsbedingungen zu sorgen.

**[0059]** Somit betrifft ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Peptiden  $X\text{-}AA_1\text{-}AA_2\text{.....}AA_n\text{-}Y$  worin AA ein L- oder D-Aminosäurerest ist, X Wasserstoff oder eine Amino-Schutzgruppe ist und Y OH, NH<sub>2</sub> ist und n eine ganze Zahl größer als 2 ist, durch Festphasensynthese, worin die C-terminale Aminosäure in Form eines N- $\alpha$ -geschützten, und sofern erforderlich Seitenketten-geschützten, reaktiven Derivats an einen festen Träger oder ein Polymer, gegebenenfalls mittels eines Linkers, der danach N- $\alpha$ -entschützt wird, gekuppelt ist, wonach die folgenden Aminosäuren, die die Peptidsequenz bilden, schrittweise gekuppelt oder als ein Peptidfragment in Form von geeignet geschützten reaktiven Derivaten oder Fragmenten gekuppelt werden, worin die N- $\alpha$ -Schutzgruppe nach Bildung des erwünschten Peptids entfernt und das Peptid vom festen Träger gespalten wird, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren weiters das Auswählen einer Präsequenz mit 3 bis 9 Resten, die unabhängig aus nativen Aminosäuren ausgewählt werden, die eine Seitenkettenfunktionalität, die während der Kupplungsschritte geschützt wird, und einen Neigungsfaktor  $P\alpha > 0,57$  und einen Neigungsfaktor  $P\beta \leq 1,10$  aufweisen, wobei der C-terminale Teil von diesem Peptid die Präsequenz umfasst, und das Spalten dieser Präsequenz vom gebildeten Peptid umfasst.

**[0060]** L-Aminosäuren, die den oben beschriebenen Einschränkungen bezüglich der Neigungsfaktoren  $P\alpha$  und  $P\beta$  entsprechen, sind Lys, Glu, Asp, Ser, His, Asn, Arg, Met und Gln.

**[0061]** Diese Aminosäuren verfügen alle über eine Seitenkettenfunktionalität, die aus einer Carboxy-, Carboxamido-, Amino-, Hydroxy-, Guanidino-, Sulfid- oder Imidazolgruppe ausgewählt ist.

**[0062]** Zur Zeit bevorzugte Aminosäuren in der Präsequenz sind Lys und Glu und Kombinationen davon, z.B. (Glu)<sub>q</sub>(Lys)<sub>p</sub>, worin  $p + q = 3$  bis 9, vorzugsweise 6 bis 9, ergibt und die Reihenfolge von Lys und Glu willkürlich ausgewählt wird.

**[0063]** Die N- $\alpha$ -Aminogruppe der Aminosäuren oder Peptidfragmente, die in jedem Kupplungsschritt verwendet werden, sollten während des Kuppelns auf geeignete Weise geschützt sein. Die Schutzgruppe kann Fmoc oder Boc oder jede andere geeignete Schutzgruppe, z.B. jene, die oben unter Verweis auf Verw. 13 und 18 beschrieben werden, sein. Die gegenwärtig bevorzugte N- $\alpha$ -Schutzgruppe ist Fmoc.

**[0064]** Es ist wichtig, dass die Seitenkettenfunktionalität in der Präsequenz während der Kupplungsschritte geeignet geschützt ist. Solche Schutzgruppen sind Fachleuten bekannt, und die bevorzugten Gruppen sind in den Ansprüchen 7–12 aufgelistet.

**[0065]** Ohne hier spezifisch Bezug auf eine bestimmte Theorie zu nehmen, wird angenommen, dass die physikalisch-chemischen Eigenschaften der geschützten Seitenkette der Präsequenz, beispielsweise Lysin, für die beobachtete "strukturell gestützte Peptidsynthese" (SAPS) durch Reduzieren oder Eliminieren von  $\beta$ -Faltblatt-Bildung in der Polyalaninsequenz verantwortlich sind.

**[0066]** Im Fall von anderen Homo-Oligo-Präsequenzen wurde beobachtet, dass (Glu(tBu))<sub>6</sub> sowie die gemischte Sequenz (Glu(tBu)Lys(tBoc))<sub>3</sub> eine günstige Struktur in der Polyalaninkette hervorruft, was Produkte ohne Deletionspeptide liefert.

**[0067]** Um zu untersuchen, ob SAPS ein allgemeineres Phänomen oder nur auf Homo-Oligopeptide wie beispielsweise die Polyalaninsequenz beschränkt ist, wurden einige gemischte Sequenzen, die als schwierige Sequenzen angeblich bekannt sind, untersucht.

**[0068]** Die Synthese von H-VQAAIDYING-OH, Acyl-Carrier-Protein (ACP) 65-74, ist eine bekannte schwierige Synthese, die als eine Modellreaktion in zahlreichen Fällen verwendet wurde (Verw. 9). Deletionspeptide werden in Standard-Synthese mit einem des-Val-Peptid (Peak 2) als ein bekanntes Nebenprodukt beobachtet (siehe Beispiel 7 und [Fig. 7](#)).

**[0069]** Gemäß der Erfindung wurde die Sequenz H-VQAAIDYING-K<sub>6</sub>-OH unter Verwendung der Präsequenz (Lys(tBoc))<sub>6</sub>, am C-Terminus an ein Pepsyn K gebunden, synthetisiert. Die Synthese erfolgte unter Erhalt eines Produkts mit dem korrekten Molekulargewicht in hoher Reinheit und einer signifikant reduzierten Menge an des-Val-Peptid (siehe Beispiel 8 und [Fig. 8](#)).

**[0070]** H-VNVNVQVQVD-OH wird als andere schwierige Sequenz berichtet, die an zahlreichen verschiedenen Fließharzen (Rapp-Polymer, PEG-PS, Pepsyn K, PEGA 1900/300, PEGA 800/130 und PEGA 300/130) synthetisiert wurde, in allen Fällen in Verbindung mit beträchtlicher Glutamin-Vorhersage bereits von Val<sup>1</sup>, außer wenn ein PEGA-1900/300-Harz verwendet wurde (Verw. 10). Gemäß der Erfindung erfolgte die Synthese von H-VNVNVQVQVDK<sub>6</sub>-OH, um ein Produkt mit dem korrekten Molekulargewicht zu ergeben. Deletionspeptide wurden im Spektrum nicht nachgewiesen (siehe Beispiel 9).

**[0071]** Um einen anderen wichtigen Aspekt der vorliegenden Erfindung zu überprüfen, nämlich die reduzierten Kupplungszeiten, die durch Einführen einer Präsequenz am C-terminalen Teil des erwünschten Peptids erhalten wurden, wurden die Kupplungszeiten der einzelnen Aminosäuren in der Synthese von Enkephalin, H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH, mit und ohne Präsequenz (Lys(tBoc))<sub>6</sub> wie in Beispiel 15 beschrieben beobachtet.

**[0072]** Die Ergebnisse der Messungen zeigen, dass die Kupplungszeiten in dieser sonst unkomplizierten Synthese in Kombination mit der jeweils ausgewählten Präsequenz wirksam fortschreiten.

**[0073]** In den oben beschriebenen Fällen wurden die Peptidsequenzen mit einer Hexa-Lysin-Präsequenz erhalten, die für bestimmte Zwecke geeignet wenn nicht sogar von Vorteil ist. Somit kann eine  $\beta$ -Faltblatt-bildende Sequenz schwerwiegende Löslichkeitsprobleme verursachen, im Fall von H-Ala<sub>20</sub>(Lys)<sub>6</sub>-OH zeigte sich jedoch, dass das Peptid in wässrigen Lösungen löslich war, während H-Ala<sub>10</sub>-Lys-OH sehr rasch aus TFA-Lösungen ausfiel, wenn sie mit Wasser verdünnt wurden. Im Fall von (Glu)<sub>6</sub> kann die durch die Präsequenz und die zahlreichen Carbonsäuregruppen bereitgestellte Löslichkeit beispielsweise für ELISA, worin ortsgerichtete

Anbindung an eine geeignete Aminogruppen-aktivierte Oberfläche aufgrund von leichter Aktivierung in wässriger Lösung mit z.B. einem Carbodiimid möglich ist, verwendet werden. Es wurde jedoch auch in Betracht gezogen, wie die Beobachtungen für praktische Peptidsynthese ohne Gegenwart der Präsequenz im Endprodukt verwendet werden können. Daher wurde versucht, einen Linker zwischen die Präsequenz und das Targetpeptid, z.B. Harz-(Lys(tBoc))<sub>6</sub>-Linkerpeptid, einzuführen, was das Spalten des Peptids vom Linker mit Standardreagenzien wie beispielsweise Radikalfänger, der TFA-Lösungen enthielt, ermöglichte. Das Einführen des herkömmlich verwendeten HMPA-Linkers Harz-(Lys(tBoc))<sub>6</sub>-HMPA-Lys(tBoc)Ala<sub>10</sub>, wie nachstehend in Beispiel 10 beschrieben, hat jedoch eine eindeutig negative Wirkung auf die Synthese von H-Ala<sub>10</sub>-Lys-OH, was zur Bildung von Deletionspeptiden führt ([Fig. 9](#)). Eindeutig geht die Wirkung der Präsequenz auf die Polylanistruktur verloren, was darauf hinweist, dass die aromatische Gruppe im Linker die Strukturwirkung in der Peptid-Hauptkette von (Ala)<sub>n</sub>-(Lys)<sub>m</sub> unterbricht.

**[0074]** Die spezifischen Bedingungen, die in den Versuchen, auf denen diese Erfindung basiert, eingesetzt wurden, sind nachstehend im Abschnitt zu den allgemeinen Verfahren beschrieben.

**[0075]** Im Allgemeinen kann das Verfahren gemäß der Erfindung, abgesehen von den charakteristischen Eigenschaften, die mit der Präsequenz und den Spaltungslinkern verbunden sind, unter herkömmlichen Bedingungen für Festphasen-Peptidsynthese, wie sie in der Literatur, auf die in Bezug auf den Stand der Technik verwiesen wurde, beschrieben sind, durchgeführt werden.

**[0076]** Dennoch wird an dieser Stelle eine kurze Zusammenfassung als notwendig erachtet.

**[0077]** Fmoc-Gruppen können mittels eines Amins wie beispielsweise Piperidin oder Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en DBU) entschützt werden.

**[0078]** Seitenketten-Schutzgruppen können mittels einer Säure wie beispielsweise Trifluoressigsäure (TFA), Trifluormethansulfonsäure (TFMSA), HBr, HCl oder HF entfernt werden.

**[0079]** Der feste Träger ist vorzugsweise aus funktionalisierten Harzen wie beispielsweise Polystyrol, Polyacrylamid, Polyethylenglykol, Cellulose, Polyethylen, Latex oder Dynabeads ausgewählt.

**[0080]** Sofern erwünscht können die C-terminalen Aminosäuren an den festen Träger mittels eines herkömmlichen Linkers, wie beispielsweise 2,4-Dimethoxy-4'-hydroxybenzophenon, 4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxy)buttersäure (HMPB), 4-Hydroxymethylbenzoësäure, 4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure (HMPA), 3-(4-Hydroxymethylphenoxy)propansäure oder p-[(R,S)-a[1-(9H-fluoren-9-yl)methoxyformamido]-2,4-dimethoxybenzyl]phenoxyessigsäure (AM), gebunden werden.

**[0081]** Die Synthese kann chargenweise oder kontinuierlich an einem automatisierten oder halb-automatisierten Peptidsyntheseautomaten durchgeführt werden.

**[0082]** Die einzelnen Kupplungsschritte können in Gegenwart eines Lösungsmittels, z.B. ausgewählt aus Acetonitril, N,N-Dimethylformamid (DMF), N-Methylpyrrolidon (NMP), Dichlormethan (DCM), Trifluorethanol (TFE), Ethanol, Methanol, Wasser und Gemischen der erwähnten Lösungsmittel mit oder ohne Additive wie beispielsweise Perchlorat oder Ethylencarbonat, durchgeführt werden.

**[0083]** Die einzelnen Kupplungen zwischen zwei Aminosäuren, einer Aminosäure und der davor gebildeten Peptidsequenz oder einem Peptidfragment und der davor gebildeten Peptidsequenz können gemäß herkömmlichen Kondensationsverfahren wie beispielsweise dem Azidverfahren, dem gemischten Säureanhydridverfahren, dem symmetrischen Anhydridverfahren, dem Carbodiimidverfahren, dem Aktivesterverfahren mit beispielsweise Pentafluorphenyl (Pfp), 3,4-Dihydro-4-oxobenzotriazin-3-yl (Dhbt), Benzotriazol-1-yl (Bt), 7-Aza-benzotriazol-1-yl (At), 4-Nitrophenyl, N-Hydroxybernsteinsäureimidoestern (NHS), Säurechloriden, Säurefluoriden, In-situ-Aktivierung durch O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU), O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU), O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat (TBTU) oder Benzotriazolyloxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) durchgeführt werden.

**[0084]** Das gebildete Peptid kann vom Träger mittels einer Säure wie beispielsweise Trifluoressigsäure (TFA), Trifluormethansulfonsäure (TFMSA), Bromwasserstoff (HBr), Salzsäure (HCl), Flusssäure (HF) oder einer Base wie beispielsweise Ammoniak, Hydrazin, einem Alkoxid oder einem Hydroxid gespalten werden.

**[0085]** Alternativ dazu wird das Peptid vom Träger durch Photolyse abgespalten.

**[0086]** In dieser Ausführungsform, wo ein Linker zwischen die Präsequenz, die an den Träger gebunden ist, und die AA<sub>1</sub>-AA<sub>n</sub>-Sequenz insertiert ist, was eine selektive Spaltung der Sequenz ermöglicht, wobei die Spaltung durch eine Säure wie beispielsweise Trifluoressigsäure (TFA), Trifluormethansulfonsäure (TFMSA), Bromwasserstoff (HBr), Salzsäure (HCl), Flusssäure (HF) oder einer Base wie beispielsweise Ammoniak, Hydrazin, einem Alkoxid oder einem Hydroxid durchgeführt wird.

**[0087]** Die Präsequenz wird vom gebildeten Peptid enzymatisch gespalten. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Enzym aus geeigneten Carboxy- und Endopeptidasen ausgewählt.

#### Sequenzgestützte Peptidsynthese (SAPS)

#### EXPERIMENTELLE VERFAHREN:

##### Peptidsynthese

##### Allgemeine Verfahren

##### Geräte und Synthesestrategie

**[0088]** Peptide wurden entweder chargenweise in einem Polyethylengefäß, ausgestattet mit einem Polypropylenfilter zur Filtration, oder im Polyamid-Festphasenverfahren (Dryland, A., & Sheppard, R.C., Verweis 7) bei kontinuierlichem Durchfluss an einem voll automatisierten Peptidsyntheseautomaten (Cameron et al., Verw. 14) unter Verwendung von 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) oder tert-Butyloxycarbonyl (Boc) als N- $\alpha$ -Aminoschutzgruppe und geeigneten herkömmlichen Schutzgruppen für Seitenkettenfunktionalitäten synthetisiert.

##### Lösungsmittel

**[0089]** Das Lösungsmittel DMF (N,N-Dimethylformamid, Riedel de-Häen, Deutschland) wurde durch Durchleiten durch eine Säule, die mit einem starken Kationenaustauschharz (Lewatit S 100 MB/H starke Säure, Bayer AG Leverkusen, Deutschland) gepackt war, gereinigt und auf freie Amine vor der Verwendung durch Zusatz von 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin (Dhbt-OH) analysiert, was eine gelbe Farbe (Dhbt-O<sup>-</sup>-Anion) entstehen lässt, wenn freie Amine vorhanden sind. Das Lösungsmittel DCM (Dichlormethan, p.a., Riedel de-Häen, Deutschland) wurde direkt ohne Reinigung verwendet.

##### Aminosäuren

**[0090]** Fmoc-geschützte Aminosäuren und entsprechende Pentafluorphenyl- (Pfp-) Ester wurden bei Milli-Gen, UK, NovaBiochem, Schweiz, und Bachem, Schweiz, und Dhbt-Ester bei NovaBiochem, Schweiz, in geeigneten Seitenketten-geschützten Formen erworben. Boc-geschützte Aminosäuren wurden bei Bachem, Schweiz, erworben.

##### Kupplungs-Reagenzien

**[0091]** Das Kupplungs-Reagens Diisopropylcarbodiimid (DIC) wurde bei Riedel de-Häen, Deutschland, erworben und vor Verwendung destilliert, Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wurde bei Merck-Schuchardt, München, Deutschland, erworben und durch Destillation gereinigt. O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluorborat (TBTU) wurde bei PerSeptive Biosystems GmbH Hamburg, Deutschland, erworben.

##### Linker

**[0092]** Die Linker HMPA, Novabiochem, Schweiz; 4-Hydroxymethylbenzoësäure, Novabiochem; 4-Methoxy-mandelsäure, Aldrich, Deutschland; HMPB, Novabiochem; AM, Novabiochem; 3-(4-Hydroxymethylphenoxy)propansäure, Novabiochem, wurden an das Harz in Form eines vorgebildeten 1-Hydroxybenzotriazol-(HO<sub>bt</sub>-) Esters, der durch DIC gebildet wurde, gekuppelt.

## Feste Träger

**[0093]** Peptide, die gemäß dem Fmoc-Verfahren synthetisiert worden waren, wurden an drei verschiedenen Arten von festen Trägern unter Verwendung von 0,05 M oder höheren Konzentrationen von Fmoc-geschützter aktivierter Aminosäure in DMF synthetisiert. 1) PEG-PS (Polyethylenglykol, aufgepropft auf Polystyrol; Tentagel S NH<sub>2</sub>-Harz, 0,27 mmol/g, Rapp Polymere, Deutschland, oder NovaSyn-TG-Harz, 0,29 mmol/g, Novabiochem, Schweiz); 2) PepSyn-Gel (Polydimethylacrylamid-Harz, funktionalisiert mit Sarcosinmethylester, 1,0 mmol/g; MilliGen, GB); 3) PepSyn K (Kieselgurgetragenes Polydimethylacrylamidharz, funktionalisiert mit Sarcosinmethylester 0,11 mmol/g; MilliGen, UK).

**[0094]** Peptide, die gemäß dem Boc-Verfahren synthetisiert worden waren, wurden an einem Merrifield-Harz (Polystyroldivinylbenzol), wobei die erste Aminosäure gebunden war, synthetisiert (Novabiochem, Schweiz).

## Katalysatoren und andere Reagenzien

**[0095]** Diisopropylethylamin (DIEA) wurde bei Aldrich, Deutschland, und Ethylendiamin bei Fluka, Schweiz, Piperidin von Riedel de-Häen, Frankfurt, Deutschland, erworben. 4-(N,N-Dimethylamino)pyridin (DMAP) wurde bei Fluka, Schweiz, erworben und als ein Katalysator in Kupplungsreaktionen, die symmetrische Anhydride einbinden, verwendet. 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin (Dhbt-OH) wurde bei Fluka, Schweiz, und 1-Hydroxybenzotriazol (HObt) bei NovaBiochem, Schweiz, erworben.

## Kupplungsverfahren

**[0096]** Die erste Aminosäure wurde als ein symmetrisches Anhydrid in DMF, gebildet aus der geeigneten N- $\alpha$ -geschützten Aminosäure und DIC, gekuppelt. Die folgenden Aminosäuren wurden als Pfp- oder Dhbt-Ester oder als vorgebildete HOBT-Ester, hergestellt aus geeigneten N- $\alpha$ -geschützten Aminosäuren und HOBT durch DIC oder TBTU in DMF, gekuppelt. Im Fall von Fmoc wurden alle Acylierungen durch den Ninhydrintest geprüft, der bei 80 °C durchgeführt wurde, um Fmoc-Schutzgruppenentfernung während des Tests zu vermeiden (Larsen, B.D., & Holm, A., Verw. 4).

Entfernung der N- $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe

**[0097]** Die Entschützung der Fmoc-Gruppe wurde durch Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF (1 × 3 und 1 × 7 min, wenn chargeweise synthetisiert wurde) oder durch Fließenlassen des Entschützungs-Lösungsmittels durch das Harz (10 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min unter Verwendung von kontinuierlicher Durchflusssynthese) durchgeführt, gefolgt von einem Waschschritt mit DMF, bis keine gelbe Farbe (Dhbt-O<sup>-</sup>) nach Zusatz von Dhbt-OH zum abgetropften DMF mehr nachgewiesen werden konnte.

**[0098]** Die Entschützung der Boc-Gruppe wurde durch Behandlung mit 50 Vol.-% TFA in DCM 1 × 1,5 min und 1 × 20 min, gefolgt von Waschschritten 6 × 9 min jeweils mit DCM, Neutralisation mit 10 Vol.-% Triethylamin in DCM 2 × 1,5 min jeweils, gefolgt von 6 × 9 min Waschen mit DCM, durchgeführt.

## Peptidspaltung vom Harz mit Säure

**[0099]** Peptide wurden durch Behandlung mit 95 % Trifluoressigsäure (TFA, Halocarbon Products Corporation, USA; Biesterfeld & Co. Hamburg, Deutschland) in Wasser (Vol.-%) bei Raumtemperatur 2 Stunden lang von den Harzen gespalten. Die filtrierten Harze wurden mit 95 % TFA-Wasser gewaschen, und die Filtrate und Waschlösungen wurden unter reduziertem Druck eingedampft. Der Rückstand wurde mit Ether gewaschen und aus Essigsäure-Wasser gefriergetrocknet. Das rohe, gefriergetrocknete Produkt wurde durch HPLC analysiert und durch matrixgestützte Laser-Desorption/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) oder durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESMS) identifiziert.

## Peptidspaltung vom Harz mit Base

**[0100]** Das getrocknete Harz (1 g) wurde mit 1 M Natriumhydroxid (10 ml) bei 4 °C behandelt und 15 min lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Harz wurde in einen Kolben, der 10 % wässrige Essigsäure enthielt, filtriert. Das Peptid wurde durch Lyophilisierung isoliert und Gelfiltration unterzogen.

## Peptidspaltung vom Harz mit TFMSA

**[0101]** Das getrocknete Harz (250 mg) wurde in einen Rundkolben mit einem Rührstäbchen gegeben. Thioanisol/ethandithiol (2:1, 750 µl) wurde zugesetzt, das Gemisch wurde in Eis gekühlt, 5 ml TFA wurden zugesetzt, und das Gemisch wurde 5–10 min lang gerührt. TFMSA (500 µl) wurden zugetropft, und die Reaktion wurde bei Raumtemperatur 30–60 min lang fortiert gelassen. Das Peptid wurde nach Zusatz von Ether ausgefällt.

## Entfernung von Seitenketten-Schutzgruppen

**[0102]** Vorzugsweise wird der Schutz an den Seitenketten gleichzeitig mit der Spaltung des Peptids vom Harz aufgehoben.

## Vorgebildeter HObt-Ester

**[0103]** Verfahren a. 3 Äq. N- $\alpha$ -Amino-geschützte Aminosäure wurden in DMF zusammen mit 3 Äq. HObt und 3 Äq. DIC aufgelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 10 min lang stehen gelassen und anschließend dem Harz zugesetzt, das mit einer Lösung von 0,2 % Dhbt-OH in DMF vor dem Hinzufügen der präaktivierten Aminosäure gewaschen worden war.

**[0104]** Verfahren b. 3 Äq. N- $\alpha$ -Amino-geschützte Aminosäure wurden in DMF zusammen mit 3 Äq. HObt, 3 Äq. TBTU und 4,5 Äq. DIEA aufgelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 5 Minuten lang stehen gelassen und anschließend dem Harz zugesetzt.

## Vorgebildetes symmetrisches Anhydrid

**[0105]** 6 Äq. N- $\alpha$ -Amino-geschützte Aminosäure wurde in DCM aufgelöst und auf 0 °C gekühlt. DCC (3 Äq.) wurden zugesetzt, und die Reaktion wurde 10 min lang laufen gelassen. Das Lösungsmittel wurde in Vakuum entfernt und die Rückstände in DMF aufgelöst. Die Lösung wurde filtriert und dem Harz unverzüglich zugesetzt, gefolgt von 1 Äq. DMAP.

Schätzung der Kupplungs-Ausbeute der ersten N- $\alpha$ -Amino-geschützten Aminosäure

**[0106]** 3–5 mg trockenes Fmoc-geschütztes Peptidharz wurden mit 5 ml 20 % Piperidin in DMF 10 min lang bei Raumtemperatur behandelt, und die UV-Absorption für das Dibenzofulven-Piperidin-Addukt wurde bei 301 nm geschätzt. Die Ausbeute wurde unter Verwendung eines berechneten Extensionskoeffizienten  $e_{301}$ , basierend auf einem Fmoc-Ala-OH-Standard, bestimmt.

**[0107]** Im Fall von Boc-Schutz wurde die Kupplung gemäß dem Ninhydrinverfahren nach Entfernen der Boc-Gruppe geschätzt (Sarin, V.K., et al., Verw. 11)

## Peptidsynthese auf PepSyn-K-Harz

**[0108]** Trockenes PepSyn K (ca. 500 mg) wurde durch Ethylendiamin bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Harz wurde abtropfen gelassen und mit DMF 10 × 15 ml, 5 min jeweils, gewaschen. Nach Abtropfenlassen wurde das Harz mit 10 Vol.-% DIEA in DMF (2 × 15 ml, 5 min jeweils) gewaschen und schließlich mit DMF gewaschen, bis nach Zusatz von Dhbt-OH zum abgetropften DMF keine gelbe Farbe mehr nachzuweisen war. 3 Äq. HMPA, 3 Äq. Hobt und 3 Äq. DIC wurden in 10 ml DMF aufgelöst und zur Aktivierung 10 min lang stehen gelassen, wonach das Gemisch dem Harz zugesetzt wurde und die Kupplung 24 weitere Stunden fortdauerte. Das Harz wurde abtropfen gelassen und mit DMF (10 × 15 ml, 5 min jeweils) gewaschen, und die Acylierung wurde mittels Ninhydrin-Test überprüft. Die erste Aminosäure wurde als das Seitenketten-geschützte, vorgebildete symmetrische Anhydrid (siehe oben) gekuppelt und die Kupplungs-Ausbeute wie oben beschrieben geschätzt. In allen Fällen lag sie über 70 %. Die Synthese wurde entweder als "kontinuierliche Durchflusssynthese" oder als "charge-weise Synthese" wie nachstehend beschrieben fortgesetzt.

Fortgesetzte Peptidsynthese auf PepSyn K unter Verwendung des kontinuierlichen Durchflusssverfahrens

**[0109]** Das Harz (ca. 500 mg), wo die erste Aminosäure gebunden war, wurde in eine Säule gegeben, die mit dem voll automatisierten Peptidsyntheseautomaten verbunden war. Die Fmoc-Gruppe wurde wie zuvor be-

schrieben entschützt. Die verbleibenden Aminosäuren gemäß der Sequenz wurden als Fmoc-geschützte, und sofern erforderlich Seitenketten-geschützte, Pfp-Ester (3 Äq.) unter Zusatz von Dhbt-OH (1 Äq.) gekuppelt. Der Endpunkt jeder Kupplung wurde automatisch durch Beobachten des Verschwindens der gelben Farbe des Dhbt-OH-Anions mittels Spektralphotometrie bestimmt. Nach abgeschlossener Synthese wurde das Peptidharz mit DMF (10 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min), DCM (3 × 5 ml, 3 min jeweils) und schließlich Diethylether (3 × 5 ml jeweils) gewaschen, von der Säule entfernt und in Vakuum getrocknet.

#### Fortgesetzte chargeンweise Peptidsynthese auf PepSyn K

**[0110]** Das Harz (ca. 500 mg), wo die erste Aminosäure gebunden war, wurde in ein Polyethylengefäß gegeben, das mit einem Polypropylenfilter zur Filtration ausgestattet war, und die Fmoc-Gruppe wurde wie zuvor beschrieben entschützt. Die verbleibenden Aminosäuren gemäß der Sequenz wurden als vorgebildete Fmoc-geschützte, sofern erforderlich Seitenketten-geschützte, HOObt-Ester (3 Äq.) in DMF (5 ml), die wie zuvor beschrieben hergestellt waren, gekuppelt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Kupplungen 2 h lang fortgesetzt. Überschüssiges Reagens wurde dann durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt. Alle Acylierungen wurden durch den Ninhydrintest, durchgeführt bei 80 °C, überprüft. Nach abgeschlossener Synthese wurde das Peptidharz mit DMF (10 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min), DCM (5 × 5 ml, 1 min jeweils) und schließlich Diethylether (5 × 5, 1 min jeweils) gewaschen und in Vakuum getrocknet.

#### Chargenweise Peptidsynthese auf PEG-PS

**[0111]** TentaGel S NH<sub>2</sub> oder NovaSyn-TG-Harz (250 mg, 0,27–0,29 mmol/g) wurde in ein Polyethylengefäß, ausgestattet mit einem Polypropylenfilter zur Filtration, gegeben. Das Harz wurde in DMF (5 ml) gequollen und mit 20 % Piperidin in DMF behandelt, um die Gegenwart von nicht-protonierten Aminogruppen auf dem Harz sicherzustellen. Das Harz wurde abtropfen gelassen und mit DMF gewaschen, bis nach Zusatz von Dhbt-OH zum abgetropften DMF keine gelbe Farbe mehr nachgewiesen werden konnte. HMPA (3 Äq.) wurde als ein vorgebildeter HOObt-Ester wie zuvor beschrieben gekuppelt, und die Kupplung wurde 24 h lang fortgesetzt. Das Harz wurde abtropfen gelassen und wurde mit DMF (5 × 5 ml, 5 min jeweils) gewaschen, und die Acylierung wurde mittels Ninhydrintest überprüft. Die erste Aminosäure wurde als ein vorgebildetes symmetrisches Anhydrid wie zuvor beschrieben gekuppelt. Die Kupplungsausbeuten der ersten Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden wie zuvor beschrieben geschätzt. In allen Fällen lagen sie über 60 %. Die folgenden Aminosäuren gemäß der Sequenz wurden als vorgebildete Fmoc-geschützte, sofern erforderlich Seitenketten-geschützte, HOObt-Ester (3 Äq.) wie zuvor beschrieben gekuppelt. Die Kupplungen wurden, außer anders angegeben, 2 h lang fortgesetzt. Das Harz wurde abtropfen gelassen und mit DMF (5 × 5 ml, 5 min jeweils) gewaschen, um überschüssige Reagenzien zu entfernen. Alle Acylierungen wurden durch den Ninhydrintest überprüft, der bei 80 °C durchgeführt wurde. Nach abgeschlossener Synthese wurde das Peptidharz mit DMF (5 × 5 ml, 5 min jeweils), DCM (3 × 5 ml, 1 min jeweils) und schließlich Diethylether (3 × 5 ml, 1 min jeweils) gewaschen und in Vakuum getrocknet.

#### Chargenweise Peptidsynthese auf PepSyn-Gel

**[0112]** Trockenes PepSyn-Gel-Harz (500 mg, 1 mmol/g) wurde zur Filtration in ein Polyethylengefäß, das mit einem Polypropylenfilter ausgestattet ist, gegeben. Das Harz wurde in Ethylendiamin (15 ml) gequollen und durch Schütteln 20 h lang leicht in Bewegung gehalten. Das Harz wurde abtropfen gelassen und mit DMF (10 × 15 ml, 5 min jeweils) gewaschen. Nach dem Abtropfen wurde das Harz mit 10 Vol.-% DIEA in DMF (2 × 15 ml, 5 min jeweils) gewaschen und schließlich mit DMF (5 × 15 ml, 5 min jeweils) gewaschen, bis nach Zusatz von Dhbt-OH zum abgetropften DMF keine gelbe Farbe mehr nachgewiesen werden konnte. HMPA (3 Äq.) wurde als ein präaktivierter HOObt-Ester wie zuvor beschrieben (Verfahren a) gekuppelt, und die Kupplung wurde 24 h lang fortgesetzt. Das Harz wurde abtropfen gelassen und mit DMF (5 × 15 ml, 5 min jeweils) gewaschen. Die Acylierung wurde mittels Ninhydrintest überprüft. Die erste Aminosäure wurde als vorgebildetes Seitenketten-geschütztes, symmetrisches Anhydrid wie zuvor beschrieben gekuppelt. Die Kupplungsausbeuten der ersten Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden wie zuvor beschrieben geschätzt. In allen Fällen lagen sie über 70 %. Die verbleibenden Aminosäuren gemäß der Sequenz wurden als vorgebildete Fmoc-geschützte, sofern erforderlich Seitenketten-geschützte, HOObt-Ester (3 Äq.) wie zuvor beschrieben gekuppelt (Verfahren a). Die Kupplungen wurden 2 h lang fortgesetzt und, sofern erforderlich, über Nacht doppelt gekuppelt. Das Harz wurde abtropfen gelassen und mit DMF (5 × 5 ml, 5 min jeweils) gewaschen, um überschüssige Reagenzien zu entfernen. Alle Acylierungen wurden durch den Ninhydrintest überprüft, der bei 80 °C durchgeführt wurde. Die Fmoc-Gruppe wurde wie zuvor beschrieben entschützt. Nach abgeschlossener Synthese wurde das Peptidharz mit DMF (3 × 15 ml, 5 min jeweils), DCM (3 × 15 ml, 2 min jeweils) und schließlich Diethylether (3

× 15 ml, 2 min jeweils) gewaschen und in Vakuum getrocknet.

#### HPLC-Bedingungen

**[0113]** HPLC wurde an einem Waters-600-E- Instrument, ausgestattet mit einem Waters-996-Photodiode-nordnungsdetektor mit einer Waters-Radial-Pak-8 × 100-mm-C<sub>18</sub>-Umkehrphasensäule, durchgeführt. Puffer A war 0,1 Vol.-% TFA in Wasser und Puffer B 90 Vol.-% Acetonitril, 9,9 Vol.-% Wasser und 0,1 Vol.-% TFA. Die Puffer wurden durch die Säule bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min unter Verwendung des Gradienten: 1. Linearer Gradient aus 0 – 70 % B (20 min), linearer Gradient von 70 – 100 % B (1 min), isokratisch 100 % B (5 min). 2. Isokratisch mit 0 % B (2 min), linearer Gradient von 0 – 50 % B (23 min), linearer Gradient von 50 – 100 % B (5 min), isokratisch 100 % B (5 min); durchgepumpt.

#### Massenspektroskopie

**[0114]** Matrixgestützte Laserdesorption/Ionisations-Flugzeit- (MALDI-TOF-) Massenspektren wurden an einem Fisons-TofSpec-E-Instrument erhalten. Elektrospray-Ionisations-Massenspektren wurden an einem Finnigan-Mat-LCQ-Instrument, ausgestattet mit einer Elektrospray- (ESI-) Sonde, erhalten (ES-MS).

#### Peptidsynthese einzelner Peptide

##### Beispiel 1. Synthese von H-Ala<sub>10</sub>-Lys-OH (Vergleich)

**[0115]** 500 mg Fmoc-Lys(Boc)-PepSyn-KA-Harz (0,086 mmol/g) wurden zur Synthese gemäß dem "kontinuierlichen Durchflussverfahren" verwendet.

**[0116]** Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde durch HPLC analysiert und als kompliziertes Gemisch, das das Targetpeptid (n = 10) sowie Deletionspeptide entsprechend n = 6, 7, 8 und 9 und Deletionspeptide mit der Fmoc-Gruppe, die noch an den N-Terminus gebunden war, worin n = 6, 7, 8 bzw. 9 entsprach, enthielt, erkannt. Die Identität der einzelnen Peptide wurde durch MALDI-TOF-MS bestätigt.

##### Beispiel 2. Synthese von H-Ala<sub>10</sub>-Lys<sub>3</sub>-OH

**[0117]** 500 mg Fmoc-Lys(Boc)-PepSyn-KA-Harz (0,086 mmol/g) wurden zur Synthese gemäß dem "kontinuierlichen Durchflussverfahren" verwendet.

**[0118]** Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde durch HPLC analysiert und als homogen ohne Deletions- und Fmoc-geschützte Sequenzen erkannt. Die Ausbeute belief sich auf 91,0 %. Die Reinheit lag bei über 98 % gemäß HPLC (siehe [Fig. 3](#)). Die Identität des Peptids wurde durch MALDI-TOF-MS bestätigt.

##### Beispiel 3. Synthese von H-Ala<sub>10</sub>-Lys<sub>6</sub>-OH

**[0119]** 500 mg Fmoc-Lys(Boc)-PepSyn-KA-Harz (0,086 mmol/g) wurden zur Synthese gemäß dem "kontinuierlichen Durchflussverfahren" verwendet.

**[0120]** Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde durch HPLC analysiert und als homogen ohne Deletions- und Fmoc-geschützte Sequenzen erkannt. Die Ausbeute belief sich auf 90,9 %. Die Reinheit lag bei über 98 % gemäß HPLC (siehe [Fig. 5](#)). Die Identität des Peptids wurde durch ES-MS bestätigt.

##### Beispiel 4. Synthese von H-Ala<sub>20</sub>-Lys<sub>3</sub>-OH

**[0121]** 500 mg Fmoc-Ala<sub>10</sub>-(Lys(Boc))<sub>3</sub>-PepSyn-KA-Harz (aus der Synthese von H-Ala<sub>10</sub>-Lys<sub>3</sub>-OH) wurden zur Synthese gemäß dem "kontinuierlichen Durchflussverfahren" synthetisiert, und die Synthese wurde fortgesetzt.

**[0122]** Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde mittels HPLC analysiert, wobei erkannt wurde, dass es das Targetpeptid H-Ala<sub>n</sub>-Lys<sub>3</sub>-OH (n = 20) sowie Deletionspeptide entsprechend n = 19, 18, 17 und 16 (siehe [Fig. 4](#)) umfasst. Fmoc-geschützte Sequenzen wurden nicht nachgewiesen. Die Identität des Peptids wurde durch ES-MS bestätigt.

Beispiel 5. Synthese von H-Ala<sub>20</sub>-Lys<sub>6</sub>-OH

**[0123]** 500 mg Fmoc-Lys(Boc)-PepSyn-KA-Harz (0,086 mmol/g) wurden zur Synthese gemäß dem "kontinuierlichen Durchflussverfahren" verwendet.

**[0124]** Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde mittels HPLC analysiert und als homogen ohne Deletions- und Fmoc-geschützte Sequenzen erkannt. Ausbeute: 91,4 %. Die Reinheit lag bei über 98 % gemäß HPLC (siehe [Fig. 6](#)). Die Identität des Peptids wurde durch ES-MS bestätigt.

Beispiel 6. Synthese von H-Ala<sub>20</sub>-Lys-(Glu-Lys)<sub>3</sub>-OH

**[0125]** 500 mg Fmoc-Lys(Boc)-PepSyn-KA-Harz (0,086 mmol/g) wurden zur Synthese gemäß dem "kontinuierlichen Durchflussverfahren" verwendet.

**[0126]** Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde mittels HPLC analysiert. Es wurde eine Reinheit von über 98 % ohne Deletions- und Fmoc-geschützte Sequenzen erkannt. Ausbeute: 97 %. Die Identität des Peptids wurde durch ES-MS bestätigt.

## Beispiel 7. Synthese von Acyl-Carrier-Protein (ACP) 65-74, H-Val-Gln-Ala-Ala-Ile-Asp-Tyr-Ile-Asn-Gly-OH (Vergleich)

**[0127]** 500 mg Fmoc-Gly-PepSyn-KA-Harz (0,074 mmol/g) wurden zur Synthese gemäß dem "kontinuierlichen Durchflussverfahren" synthetisiert.

**[0128]** Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde mittels HPLC analysiert, wobei erkannt wurde, dass es das Zielmolekül neben etwa 16 % vom des-Val-Peptid enthielt. Die Identität der Peptide wurde durch MALDI-TOF-MS bestätigt.

Beispiel 8. Synthese von Acyl-Carrier-Protein (ACP) 65-74, N-Val-Gln-Ala-Ala-Ile-Asp-Tyr-Ile-Asn-Gly-Lys<sub>6</sub>-OH unter Verwendung der Präsequenz (Lys(Boc))<sub>6</sub>

**[0129]** 500 mg Fmoc-Lys(Boc)-PepSyn-KA-Harz (0,086 mmol/g) wurden zur Synthese gemäß dem "kontinuierlichen Durchflussverfahren" verwendet.

**[0130]** Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde mittels HPLC analysiert, wobei erkannt wurde, dass es das Zielmolekül in hoher Reinheit (~ 95 %) mit einer signifikant reduzierten Menge des des-Val-Peptids enthielt. Die Identität des Peptids wurde durch MALDI-TOF-MS bestätigt.

Beispiel 9. Synthese von N-Val-Asn-Val-Asn-Val-Gln-Val-Gln-Val-Asp-Lys<sub>6</sub>-OH unter Verwendung der Präsequenz (Lys(Boc))<sub>6</sub>

**[0131]** 500 mg Fmoc-Lys(Boc)-PepSyn-KA-Harz (0,086 mmol/g) wurden zur Synthese gemäß dem "kontinuierlichen Durchflussverfahren" verwendet.

**[0132]** Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde mittels HPLC analysiert, wobei erkannt wurde, dass es eine Reinheit von über 90 % ohne Deletions- und Fmoc-geschützte Sequenzen aufwies. Ausbeute: 100 %. Die Identität des Peptids wurde durch MALDI-TOF-MS bestätigt.

Beispiel 10. Synthese von H-Ala<sub>10</sub>-Lys-OH unter Verwendung von (Lys(Boc))<sub>6</sub> als Präsequenz und HMPA als Linker (H-Ala<sub>10</sub>-Lys(Boc)-OCH<sub>2</sub>-PhOCH<sub>2</sub>CO-(Lys(Boc))<sub>6</sub>-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-PepSyn-K) (nur zum Zwecke der Veranschaulichung)

**[0133]** 500 mg trockenes PepSyn K (0,1 mmol/g) wurden mit Ethyldiamin (5 ml) bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Harz wurde getrocknet und mit DMF 10 × 15 ml, 5 min jeweils, gewaschen. Nach dem Abtropfen wurde das Harz mit 10 Vol.-% DIEA in DMF (2 × 15 ml, 5 min jeweils) gewaschen und schließlich mit DMF gewaschen, bis nach Zusatz von Dhbt-OH zum abgetropften DMF keine gelbe Farbe mehr nachgewiesen werden konnte. Das derivatisierte Harz wurde zur Synthese gemäß dem "kontinuierlichen Durchflussverfahren" verwendet.

**[0134]** Die ersten 6 Lysine, die die Präsequenz bilden, wurden als Fmoc-Lys(Boc)-Pfp-Ester (3 Äq.) mit dem

Zusatz von Dhbt-OH (1 Äq.) gekuppelt. Der Endpunkt von jeder Kupplung wurde automatisch wie zuvor beschrieben bestimmt. Die Fmoc-Gruppe wurde wie zuvor beschrieben abgespalten. Nach Abschluss der Präsequenz wurden 3 Äq. HMPA, gekuppelt als ein präaktivierter HOt-Ester wie zuvor beschrieben, am oberen Ende der Säule eingeführt. Der Syntheseautomat wurde im Rückführungsmodus 2 h lang betrieben, und überschüssiges Reagens wurde dann durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt. Eine geringe Harzprobe wurde entnommen, um die Acylierung durch den Ninhydrintest zu überprüfen. Die nächste Aminosäure gemäß der Sequenz wurde als vorgebildetes, Seitenketteneschütztes, symmetrisches Anhydrid wie zuvor beschrieben gekuppelt und am oberen Ende der Säule zusammen mit (0,1 Äq.) DMAP eingeführt, und der Syntheseautomat wurde im Rückführungsmodus 90 min lang betrieben. Überschüssiges Reagens wurde dann durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt. Eine geringe Harzprobe wurde entnommen, um die Kupplungsausbeute zu überprüfen, die wie zuvor beschrieben geschätzt und als 84 % gefunden wurde. Die Synthese wurde durch Spalten der Fmoc-Gruppe wie zuvor beschrieben fortgesetzt. Die verbleibenden Aminosäuren gemäß der Sequenz wurden als Fmoc-eschützte, und sofern erforderlich Seitenketten-eschützte, Pfp-Ester (3 Äq.) mit Zusatz von Dhbt-OH (1 Äq.) gekuppelt. Der Endpunkt jeder Kupplung wurde automatisch wie zuvor beschrieben bestimmt. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptidharz mit DMF (10 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min), DCM (3 × 5 ml, 1 min jeweils) und schließlich Diethylether (3 × 5 ml, 1 min jeweils) gewaschen, von der Säule entfernt und in Vakuum getrocknet.

**[0135]** Das Peptid wurde vom Harz wie zuvor beschrieben abgespalten.

**[0136]** Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde mittels HPLC analysiert, wobei erkannt wurde, dass es das Targetpeptid H-Ala<sub>n</sub>-Lys-OH (n = 10) sowie Deletionspeptide entsprechend n = 9, 8, 7 und 6 (siehe [Fig. 9](#)) enthielt. Fmoc-eschützte Sequenzen wurden nicht nachgewiesen. Die Identität der Peptide wurden durch MALDI-TOF-MS bestätigt.

Beispiel 11. Synthese von H-Ala<sub>10</sub>-Lys-OH unter Verwendung von (+/-)-4-Methoxymandelsäure als Linker (H-Ala<sub>10</sub>-Lys(Boc)-OCH-(4-MeOPh)CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-PepSyn-K-Harz) (nur zum Zwecke der Veranschaulichung)

**[0137]** 500 mg trockenes PepSyn K (0,1 mmol/g) wurden mit Ethyldiamin wie zuvor beschrieben behandelt. Das derivatisierte Harz wurde zur Synthese gemäß dem "kontinuierlichen Durchflussverfahren" verwendet. 10 Äq. (+/-)-4-Methoxymandelsäure, 10 Äq. HOt und 10 Äq. DIC, aufgelöst in 5 ml DMF, 10 min lang präaktiviert, wurden am oberen Ende der Säule eingeführt, und der Syntheseautomat wurde im Rückführungsmodus 2 h lang betrieben. Überschüssiges Reagens wurde dann durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt. Eine kleine Harzprobe wurde entnommen, um die Acylierung durch den Ninhydrintest zu überprüfen. Die erste Aminosäure gemäß der Sequenz wurde als Fmoc-eschütztes und Seitenketten-eschütztes, vorgebildetes, symmetrisches Anhydrid wie zuvor beschrieben gekuppelt und am oberen Ende der Säule zusammen mit (0,1 Äq.) DMAP eingeführt, und der Syntheseautomat wurde im Rückführungsmodus 90 min lang betrieben. Überschüssiges Reagens wurde dann durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt. Eine kleine Harzprobe wurde entnommen, um die Kupplungsausbeute zu überprüfen, die wie zuvor beschrieben geschätzt und als 75 % gefunden wurde. Die Synthese wurde dann durch Spalten der Fmoc-Gruppe wie zuvor beschrieben fortgesetzt. Die verbleibenden Aminosäuren gemäß der Sequenz wurden als Fmoc-eschützte Pfp-Ester (3 Äq.) mit dem Zusatz von Dhbt-OH (1 Äq.) gekuppelt. Der Endpunkt jeder Kupplung wurde automatisch wie zuvor beschrieben bestimmt. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptidharz mit DMF (10 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min), DCM (3 × 5 ml, 1 min jeweils) und schließlich Diethylether gewaschen, von der Säule entfernt und in Vakuum getrocknet.

**[0138]** Das Peptid wurde vom Harz wie zuvor beschrieben abgespalten und aus Essigsäure-Wasser lyophilisiert.

**[0139]** Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde mittels HPLC analysiert, wobei erkannt wurde, dass es das Targetpeptid H-Ala<sub>n</sub>-Lys-OH (n = 10) sowie Deletionspeptide entsprechend n = 9, 8, 7 und 6 enthielt. Die Identität der Peptide wurden durch MALDI-TOF-MS bestätigt.

**[0140]** Beispiel 12. Synthese von H-Ala<sub>10</sub>-Lys-OH unter Verwendung von (Lys(Boc))<sub>6</sub> als Präsequenz und (+/-)-4-Methoxymandelsäure als Linker (H-Ala<sub>10</sub>-Lys(Boc)-OCH-(4-MeOPh)CO-(Lys(Boc))<sub>6</sub>-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-PepSyn-K-Harz) (nur zum Zwecke der Illustration 500 mg trockenes PepSyn K (0,1 mmol/g) wurden mit Ethyldiamin wie zuvor beschrieben behandelt. Das derivatisierte Harz wurde zur Synthese gemäß dem "kontinuierlichen Durchflussverfahren" verwendet. Die ersten 6 Lysine, die die Präsequenz bildeten, wurden als Fmoc-eschützte und Seitenketten-eschützte Pfp-Ester (3 Äq.) mit dem

Zusatz von Dhbt-OH (1 Äq.) gekuppelt. Der Endpunkt von jeder Kupplung wurde automatisch wie zuvor beschrieben bestimmt. Die Fmoc-Gruppe wurde wie zuvor beschrieben gespalten. Nach Abschluss der Synthese der Präsequenz wurden 10 Äq. (+/-)-4-Methoxymandelsäure als präaktivierter HObt-Ester wie zuvor beschrieben gekuppelt und am oberen Ende der Säule eingeführt. Der Syntheseautomat wurde im Rückführungsmodus 2 h lang betrieben, und überschüssiges Reagens wurde dann durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt. Eine kleine Harzprobe wurde entnommen, um die Acylierung durch Ninhydrin-Test zu überprüfen. Die nächste Aminosäure gemäß der Sequenz wurde als Fmoc-geschütztes und Seitenketten-geschütztes, vorgebildetes symmetrisches Anhydrid wie zuvor beschrieben gekuppelt und am oberen Ende der Säule zusammen mit (0,1 Äq.) DMAP eingeführt. Der Syntheseautomat wurde im Rückführungsmodus 90 min lang betrieben, und überschüssiges Reagens wurde dann durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt. Eine kleine Harzprobe wurde entnommen, um die Kupplungsausbeute zu überprüfen, die wie zuvor beschrieben geschätzt und als 68 % gefunden wurde. Die Synthese wurde dann durch Spalten der Fmoc-Gruppe wie zuvor beschrieben fortgesetzt. Die verbleibenden Aminosäuren gemäß der Sequenz wurden als Fmoc-geschützte Pfp-Ester (3 Äq.) mit dem Zusatz von Dhbt-OH (1 Äq.) gekuppelt. Der Endpunkt jeder Kupplung wurde automatisch wie zuvor beschrieben bestimmt. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptidharz mit DMF (10 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min), DCM (3 × 5 ml min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) und schließlich Diethylether (3 × 5 ml min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) gewaschen, von der Säule entfernt und in Vakuum getrocknet. Das Peptid wurde vom Harz wie zuvor beschrieben abgespalten und aus Essigsäure-Wasser lyophilisiert. Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde mittels HPLC analysiert, wobei erkannt wurde, dass es das Targetpeptid H-Ala<sub>n</sub>-Lys-OH (n = 10) sowie Deletionspeptide entsprechend n = 9, 8, 7 und 6 enthielt. Die Menge an Deletionspeptiden war im Vergleich zu den Beispielen 10 und 11 signifikant reduziert (siehe [Fig. 10](#)). Fmoc-geschützte Sequenzen wurden nicht nachgewiesen. Die Identität der Peptide wurde durch MALDI-TOF-MS bestätigt.

Beispiel 13. Synthese von H-Ala<sub>10</sub>-Lys-OH unter Verwendung von (Lys(Boc))<sub>6</sub> als Präsequenz und (+)-4-Methoxymandelsäure als Linker (H-Ala10-Lys(Boc)-OCH-(4-Me-OPh)CO-(Lys(Boc))<sub>6</sub>-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-PepSyn-K-Harz) (nur zum Zwecke der Illustration

**[0141]** Trockenes PepSyn K (ca. 500 mg, 0,1 mmol/g) wurde zur Filtration in ein Polyethylengefäß mit einem Polypropylenfilter gegeben und wie zuvor beschrieben mit Ethyldiamin behandelt. Die ersten 6 Lysine, die die Präsequenz bildeten, wurden als Fmoc-geschützte und Seitenketten-geschützte Pfp-Ester (3 Äq.) mit dem Zusatz von Dhbt-OH (1 Äq.) gekuppelt. Die Acylierungen wurden durch den Ninhydrin-Test, der bei 80 °C durchgeführt wurde, wie zuvor beschrieben überprüft. Die Fmoc-Gruppe wurde wie zuvor beschrieben entschützt. Nach Abschluss der Synthese der Präsequenz wurde das entschützte Peptidharz mit 10 Äq. (+)-4-Methoxymandelsäure als präaktivierter HObt-Ester wie zuvor beschrieben umgesetzt (wie zuvor beschrieben aufgelöst, 95,8 % optische Reinheit), und die Kupplung wurde 24 h lang fortgesetzt. Überschüssiges Reagens wurde durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt. Die Acylierung wurde durch den Ninhydrin-Test überprüft. Die nächste Aminosäure gemäß der Sequenz wurde als Fmoc-geschütztes und Seitenketten-geschütztes, vorgebildetes symmetrisches Anhydrid wie zuvor beschrieben gekuppelt, und die Reaktion wurde weitere 2 h laufen gelassen. Überschüssiges Reagens wurde dann durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt. Eine kleine Harzprobe wurde entnommen, um die Kupplungsausbeute zu überprüfen, die wie zuvor beschrieben geschätzt und als 66 % gefunden wurde. Die Synthese wurde dann durch Spalten der Fmoc-Gruppe wie zuvor beschrieben fortgesetzt.

**[0142]** Das erste Alanin wurde als ein Fmoc-geschützter Pfp-Ester (3 Äq.) mit dem Zusatz von Dhbt-OH (1 Äq.) in DMF (2 ml) 2 h lang gekuppelt. Überschüssiges Reagens wurde dann durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt, und die Acylierung wurde durch den Ninhydrin-Test, durchgeführt bei 80 °C, wie zuvor beschrieben geprüft. Die Fmoc-Gruppe wurde dann durch Behandlung mit 2 Vol.-% Piperidin in DMF (1 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt, woraufhin Spülen mit DMF (10 s, Durchflussgeschwindigkeit 10 ml/min), Fluten mit 0,2 % Dhbt-OH in DMF (20 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) und schließlich Waschen mit DMF (2 × 5 ml, 1 min jeweils) folgte. Das folgende Fmoc-geschützte Alanin wurde sofort als ein Pfp-Ester (3 Äq.) mit dem Zusatz von 1 Äq. Dhbt-OH in DMF (2 ml) 2 h lang gekuppelt. Die Acylierung wurde durch den Ninhydrin-Test, der wie zuvor beschrieben durchgeführt wurde, überprüft. Die verbleibenden Aminosäuren gemäß der Sequenz wurden als Fmoc-geschützte Pfp-Ester (3 Äq.) mit dem Zusatz von Dhbt-OH (1 Äq.) in DMF (2 ml) gekuppelt. Überschüssiges Reagens wurde durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt, und Acylierungen wurden durch den Ninhydrin-Test, durchgeführt bei 80 °C, wie zuvor beschrieben überprüft. Die Fmoc-Gruppe wurde wie zuvor beschrieben entschützt. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptidharz mit DMF (10 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min), DCM (3 × 5 ml, 1 min jeweils), Diethylether (3 × 5 ml, 1 min jeweils) gewaschen und in Vakuum getrocknet.

**[0143]** Das Peptid wurde vom Harz wie zuvor beschrieben abgespalten und aus Eisessig gefriergetrocknet. Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde mittels HPLC analysiert und als homogen ohne Deletions- und Fmoc-geschützte Sequenzen erkannt.

Beispiel 14. Synthese von H-Ala<sub>10</sub>-Lys-OH unter Verwendung von (Glu(OtBu))<sub>6</sub> als Präsequenz und (+)-4-Methoxymandelsäure als Linker (H-Ala<sub>10</sub>-Lys(Boc)-OCH-(4-MeOPh)CO-(Glu(OtBu))<sub>6</sub>-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-PepSyn-K-Harz) (nur zum Zwecke der Illustration

**[0144]** Trockenes PepSyn K (ca. 500 mg) wurde zur Filtration in ein Polyethylengefäß mit einem Polypropylenfilter gegeben und wie zuvor beschrieben mit Ethylen diamin behandelt. Die ersten 6 Glutaminsäuren, die die Präsequenz bildeten, wurden als Fmoc-Glu(OtBu)-Pfp-Ester (3 Äq.) mit dem Zusatz von Dhbt-OH (1 Äq.) gekuppelt. Die Acylierungen wurden durch den Ninhydrintest, der bei 80 °C durchgeführt wurde, wie zuvor beschrieben überprüft. Die Fmoc-Gruppe wurde wie zuvor beschrieben entschützt. Nach Abschluss der Präsequenz wurden 10 Äq. (+)-4-Methoxymandelsäure (aufgelöst wie zuvor beschrieben, 95,8 % optische Reinheit) als ein präaktivierter HObt-Ester wie zuvor beschrieben gekuppelt. Die Kupplung wurde 24 h lang fortgesetzt, und überschüssiges Reagens wurde dann durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt. Die Acylierung wurde durch den Ninhydrintest überprüft. Die nächste Aminosäure gemäß der Sequenz wurde als Fmoc-geschütztes und Seitenketten-geschütztes, vorgebildetes symmetrisches Anhydrid wie zuvor beschrieben gekuppelt, katalysiert durch DMAP (0,1 Äq.), und die Reaktion wurde weitere 2 h laufen gelassen. Überschüssiges Reagens wurde dann durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt. Eine kleine Harzprobe wurde entnommen, um die Kupplungsausbeute zu überprüfen, die wie zuvor beschrieben geschätzt wurde, wobei eine Ausbeute von 75 % gefunden wurde. Die Synthese wurde dann durch Spalten der Fmoc-Gruppe wie zuvor beschrieben fortgesetzt.

**[0145]** Das erste Alanin wurde als ein Fmoc-geschützter Pfp-Ester (3 Äq.) mit dem Zusatz von Dhbt-OH (1 Äq.) in DMF (2 ml) 2 h lang gekuppelt. Überschüssiges Reagens wurde dann durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt, und die Acylierung wurde durch den Ninhydrintest, durchgeführt bei 80 °C, wie zuvor beschrieben geprüft. Die Fmoc-Gruppe wurde dann durch Behandlung mit 2 Vol.-% Pipridin in DMF (1 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt, woraufhin Spülen mit DMF (10 s, Durchflussgeschwindigkeit 10 ml/min), Fluten mit 0,2 % Dhbt-OH in DMF (20 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) und schließlich Waschen mit DMF (2 × 5 ml, 1 min jeweils) folgte. Das folgende Fmoc-geschützte Alanin wurde sofort als ein Pfp-Ester (3 Äq.) mit dem Zusatz von 1 Äq. Dhbt-OH in DMF (2 ml) 2 h lang gekuppelt. Die Acylierung wurde durch den Ninhydrintest, der wie zuvor beschrieben durchgeführt wurde, überprüft. Die verbleibenden Aminosäuren gemäß der Sequenz wurden als Fmoc-geschützte Pfp-Ester (3 Äq.) mit dem Zusatz von Dhbt-OH (1 Äq.) in DMF (2 ml) gekuppelt. Überschüssiges Reagens wurde durch DMF-Waschen (12 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min) entfernt, und Acylierungen wurden durch den Ninhydrintest, durchgeführt bei 80 °C wie zuvor beschrieben, überprüft. Die Fmoc-Gruppe wurde wie zuvor beschrieben entschützt. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptidharz mit DMF (10 min, Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min), DCM (3 × 5 ml, 1 min jeweils), Diethylether (3 × 5 ml, 1 min jeweils) gewaschen und in Vakuum getrocknet.

**[0146]** Das Peptid wurde vom Harz wie zuvor beschrieben abgespalten und aus Eisessig gefriergetrocknet. Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde mittels HPLC analysiert und als homogen ohne Deletions- und Fmoc-geschützte Sequenzen erkannt.

Beispiel 15. Peptidsynthese von Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys<sub>6</sub>-OH an NovaSyn-TentaGel

**[0147]** Trockenes NovaSyn-TG-Harz (0,29 mmol/g, 250 mg) wurde zur Filtration in ein Polyethylengefäß, ausgestattet mit einem Polypropylenfilter, gegeben und wie unter "chargenweise Peptidsynthese auf PEG-PS" beschrieben behandelt, bis die Präsequenz Lyss abgeschlossen war. Die folgenden Aminosäuren, die die Leu-Enkephalin-Sequenz bildeten, wurden als vorgebildete Fmoc-geschützte HObt-Ester (3 Äq.) in DMF (5 ml), gebildet durch DIC, gekuppelt. Vor jeder der letzten fünf Kupplungen wurde das Harz mit einer Lösung von Dhbt-OH (80 mg in 25 ml) gewaschen, um das Verschwinden der gelben Farbe mit voranschreitender Kupplungsreaktion zu beobachten. War die gelbe Farbe nicht mehr sichtbar, so wurden die Kupplungen durch Waschen des Harzes mit DMF (5 × 5 ml, 5 min jeweils) abgebrochen. Die Acylierungen wurden dann durch den Ninhydrintest, durchgeführt bei 80 °C wie zuvor beschrieben, überprüft. Nach abgeschlossener Synthese wurde das Peptidharz mit DMF (3 × 5 ml, 1 min jeweils), DCM (3 × 5 ml, 1 min jeweils), Diethylether (3 × 5 ml, 1 min jeweils) gewaschen und in Vakuum getrocknet.

**[0148]** Das Peptid wurde vom Harz wie zuvor beschrieben abgespalten und aus Essigsäure gefriergetrocknet. Das rohe gefriergetrocknete Produkt wurde mittels HPLC analysiert und als homogen ohne Deletions- und

Fmoc-geschützte Sequenzen erkannt. Die Reinheit lag bei über 98 %, und die Identität des Peptids wurde durch ES-MS bestätigt. Ausbeute: 84 %.

Tabelle 1

Aminosäure	Peptidharz	Kupplungszeit	
	Präsequenz: (Lys(tBoc)) <sub>6</sub>	Mit Präsequenz	Ohne Präsequenz
Fmoc-Leu-OH	H-Lys(Boc) <sub>6</sub> -HMPA-R	< 2 min	-
Fmoc-Phe-OH	H-Leu-Lys(Boc) <sub>6</sub> -HMPA-R	< 5 min	< 120 min
Fmoc-Gly-OH	H-Phe-Leu-Lys(Boc) <sub>6</sub> -HMPA-R	< 2 min	< 60 min
Fmoc-Gly-OH	H-Gly-Phe-Leu-Lys(tBoc) <sub>6</sub> -HMPA-R	< 2 min	< 60 min
Fmoc-Tyr-OH	H-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys(t Boc) <sub>6</sub> -HMPA-R	< 1 min	< 40 min
	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys(t Boc) <sub>6</sub> -HMPA-R		

R= NovaSyn TG, derivatisiert mit dem Linker 4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure (HMPA) (Subst.: 0,29 mmol/g).

Die Kupplungszeiten basieren auf Dhtb-OH und dem Ninhydrintest.

## Materialien und Verfahren

## [0149] Abkürzungen:

AM, p-[(R,S)-a[1-(9H-fluoren-9-yl)-methoxyformamido]-2,4-dimethoxybenzyl]-phenoxyessigsäure  
 At, 7-Azabenzotriazol-1-yl  
 Boc, tert-Butyloxycarbonyl

BOP, Benzotriazolyloxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat  
 Bpoc, Biphenylpropyloxycarbonyl  
 Bt, Benzotriazol-1-yl  
 tBu, tert-Butyl  
 DBU, Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en  
 Ddz, 3,5-Dimethoxyphenylisopropyloxycarbonyl  
 DCC, Dicyclohexylcarbodiimid  
 DCM, Dichlormethan  
 DIC, Diisopropylcarbodiimid  
 DIEA, N,N-Diisopropylethylamin  
 DMAP, 4-(N,N-Dimethylamino)pyridin  
 Dhbt-OH, 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin  
 DMF, N,N-Dimethylformamid  
 Dts, Dithiasuccinyl  
 EDT, Etandithiol  
 FAB, Fast Atom Bombardment  
 Fmoc, 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl  
 HATU, O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat  
 HBTU, O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat  
 HMPA, 4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure  
 HMPB, 4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxy)buttersäure  
 HObt, 1-Hydroxybenzotriazol  
 HOAt, 1-Hydroxy-7-azobenzotriazol  
 HPLC, Hochleistungsflüssigchromatographie  
 MCPS, Vielfachsäulen-Peptidsynthese  
 MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex  
 MMA, 4-Methoxymandelsäure  
 NMR, Kernmagnetresonanz  
 NHS, N-Hydroxybernsteinsäureimidoester  
 NMP, N-Methylpyrrolidon  
 NPS, Nitrophenylsulfenyl  
 Mtr, 4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenylsulfonyl  
 PAM, Phenylacetamidomethyl  
 Pbf, 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl  
 PEG-PS, Polyethylenglykol, aufgepropft auf Polystyrol  
 PepSyn-Gel, Polydimethylacrylamidharz, funktionalisiert mit Sarcosinmethylester  
 PepSyn K, Kieselgur-gestütztes Polydimethylacrylamidharz, funktionalisiert mit Sarcosinmethylester  
 Pfp, Pentafluorphenyl  
 Pmc, 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl  
 Poc, Phenylisopropyloxycarbonyl  
 TBTU, O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat  
 TFA, Trifluoressigsäure  
 TFE, Trifluorethanol  
 TFMSA, Trifluormethansulfonsäure  
 Tmz, 2,4,5-Tetramethylbenzyloxycarboxyl

## VERWEISE:

1. Merrifield, R.B. (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 – 2154.
2. Kent, S.B.H. (1988), Annu Rev. Biochem. 57, 957 – 989.
3. B.D. Larsen, C. Larsen, and A. Holm., Peptides 1990; E. Giralt and D. Andreu, (Eds). 1991 ESCOM Science Publishers B.V., p. 183 – 185.
4. Larsen, B.D., and Holm, A. (1994), Int. J. Peptide & Protein Res. 43 , 1 – 9.
5. Due Larsen, B., Christensen, D.H., Holm, A., Zillmer, R., and Faurskov, O. (1993), J.Amer.Chem.Soc. 115, 6247 – 6253.
6. Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1978), Annu Rev. Biochem. 47, 251 – 276.
7. Dryland, A. and Sheppard, R.C. (1986) J.Chem. Soc. Perkin Trans. I, 125 – 137.
8. Merrifield, R.B., Singer, J. and Chait, B.T. (1988) Anal. Biochem. 174, 399 – 414.
9. Cameron, L.R., Meldal, M and Sheppard, R.C. (1987), J. Chem. Soc. Chem. Commun, 270–272.
10. Meldal, M. (1993), Peptides 1993; Schneider, C.H. and Eberle, A.N. (Eds). 1993 ESCOM Science Publis-

hers B.V., p. 61–62.

11. Sarin, V.K., Kent, S.B.H., Tam, J.P. and Merrifield, R.B. (1981), Anal. Biochem, 117, 147–157.
12. Carpino, L.A. and Han, G.Y. (1972), J. Org. Chem. 37, 3404–3409
13. Stewart, J.M. and Young, J.D., Solid phase peptide synthesis, Pierce Chemical Company (1984)
14. Cameron, L., Meldal, M. and Sheppard, R.C. (1987), J. Chem. Soc. Chem. Commun, 270–272.
15. Meldal, M., Bisgaard Holm, C., Boejesen, G., Havsteen Jakobsen, M. and Holm, A. (1993), Int. J. Peptide and Protein Res. 41, 250–260.
16. McKenzie, A., Pirie, D.J.C. (1936), Berichte 69, 868.
17. Knorr, E. (1904), Berichte 37, 3172.
18. Peptides: Synthesis, structures and applications. Gutte, B., Ed. Academic Press Inc. 1995.

### Patentansprüche

1. Ein Festphasensyntheseverfahren zur Herstellung von Peptiden

X-AA<sub>1</sub>-AA<sub>2</sub> ... AA<sub>n</sub>-Y

wobei AA ein L- oder D-Aminosäurerest ist,

X ein Wasserstoff oder eine Aminoschutzgruppe ist, und

Y ist OH, NH<sub>2</sub> und n eine ganze Zahl größer als 2 ist, wobei die C-terminale Aminosäure als N- $\alpha$ -geschütztes und falls nötig, Seitenketten geschütztes reaktives Derivat an einen festen Träger oder ein Polymer, gegebenenfalls über einen Linker und nachfolgend N- $\alpha$ -geschützt, gekoppelt ist, woran die nachfolgenden Aminosäuren, welche die Peptidsequenz bilden, schrittweise oder als Peptidfragmente in Form eines geeigneten, geschützten reaktiven Derivates oder Fragmentes gekoppelt werden, wobei die N- $\alpha$ -geschützte Gruppe im Anschluss an die gewünschte Peptidbildung entfernt wird und das Peptid von dem festen Träger abgespalten wird,

**dadurch gekennzeichnet,**

dass das Verfahren weiterhin:

das Auswählen einer Vorläufersequenz, welche zwischen 3 und 9 unabhängig voneinander, aus den natürlichen Aminosäuren ausgewählte Aminosäuren umfasst, welche eine Seitenkettenfunktionalität haben, die während der Kopplungsschritte geschützt ist und die einen Propensitätsfaktor  $P\alpha > 0,57$  und einen Propensitätsfaktor  $P\beta < 1,10$  haben, wobei die Vorläufersequenz von dem C-terminalen Anteil des besagten Peptides umfasst wird; und

das Abspalten besagter Vorläufersequenz von dem gebildeten Peptid, umfasst.

2. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Aminosäuren der Vorläufersequenz aus den Aminosäuren, die eine Seitenkettenfunktionalität haben, ausgewählt ist, wobei die Seitenkettenfunktionalität eine Carboxy-, Carboxamido-, Amino-, Hydroxy-, Guanidino-, Sulfid- oder Imidazolgruppe ist.

3. Das Verfahren gemäß Anspruch 2, wobei die Aminosäuren die einen Teil der Vorläufersequenz bilden unabhängig ausgewählt sind aus Lys, Glu, Asp, Ser, His, Asn, Arg, Met und Gln.

4. Das Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei die Aminosäuren entweder ausschließlich Lys oder Glu sind oder eine (Glu)  $q$ (Lys) $p$  Sequenz sind, wobei  $p + q$  3 bis 9, vorzugsweise 6 bis 9 ist und die Reihenfolge von Lys und Glu willkürlich ausgewählt ist.

5. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die N- $\alpha$ -Aminoschutzgruppe Fmoc, Boc oder jede andere geeignete Schutzgruppe ist.

6. Das Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei die N- $\alpha$ -Aminoschutzgruppe Fmoc oder Boc ist.

7. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Seitenkettenfunktionalität der Vorläufersequenz eine Carboxygruppe umfasst, welche auf geeignete Art und Weise und vorzugsweise mit tBu geschützt ist.

8. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Seitenkettenfunktionalität der Vorläufersequenz eine Aminogruppe umfasst, die in geeigneter Art und Weise und vorzugsweise mit Boc geschützt ist.

9. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Seitengruppenfunktionalität der Vorläufersequenz eine Hydroxygruppe umfasst, die in geeigneter Art und Weise und vorzugsweise mit tBu geschützt ist.

10. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Seitenkettenfunktionalität der Vorläufersequenz eine Carboxamidogruppe umfasst, die mit a) Benzhydryl, b) Trityl, c) tBu geschützt ist.

11. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Seitenkettenfunktionalität der Vorläufersequenz eine Guanidinogruppe umfasst, die mit 4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenylsulfonyl (Mtr), 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc) oder 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) geschützt ist.
12. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Seitenkettenfunktionalität der Vorläufersequenz eine Imidazolgruppe umfasst, die mit Boc geschützt ist.
13. Das Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei die Fmoc-Gruppen mittels eines Amines wie eines Piperidin oder Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) entschützt wird.
14. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Seitenkettenschutzgruppen mittels einer Säure wie Trifluoroessigsäure (TFA), Trifluoromethansulfonsäure (TFMSA), HBr, HCl oder HF entschützt werden.
15. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei der feste Träger aus den funktionellen Harzen wie Polystyren, Polyacrylamid, Polyethylenglycol, Cellulose, Polyethylen, Latex oder Dynabeads ausgewählt ist.
16. Das Verfahren gemäß Anspruch 15, wobei die funktionellen Harze aus PEG-PS (Polyethylenglycol aufgepropft aus Polystyren) oder Polydiemethylacrylamidharzen ausgewählt sind.
17. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Vorläufersequenz von 5 bis 7 Aminosäureresten umfasst.
18. Das Verfahren gemäß Anspruch 15, wobei die C-terminale Aminosäure an den festen Träger mittels eines herkömmlichen Linkers, wie einem 2,4-Dimethoxy-4'-hydroxybenzophenon, 4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxy)-buttersäure (HMPB), 4-Hydroxymethyl-benzolsäure, 4-Hydroxymethylphenoxy-essigsäure (HMPA), 3-(4-Hydroxymethylphenoxy)-propionsäure oder p-[(R, S)-a[I-(9H-fluoren-9-yl)-methoxyformamido]-2,4-dimethoxybenzyl]-phenoxy-essigsäure (AM) angebracht ist.
19. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Synthese chargenweise ausgeführt wird.
20. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Verfahren fortlaufend in einem automatisierten oder teilautomatisierten Peptidsynthesizer ausgeführt wird.
21. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Kupplungsschritte in Anwesenheit eines Lösungsmittels ausgewählt aus Acetonitril, N,N-Dimethylformamid (DMF), N-methylpyrrolidon (NMP), Dichlormethan (DCM), Trifluoroethanol (TFE), Ethanol, Methanol, Wasser oder Mischungen der erwähnten Lösungsmittel mit oder ohne Zusätzen wie Perchlorat oder Ethylencarbonat durchgeführt wird.
22. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Verbindung von zwei Aminosäuren, einer Aminosäure und einer vorangehend gebildeten Peptidsequenz oder eines Peptidfragmentes und einer vorangehend gebildeten Peptidsequenz oder eines Peptidfragmentes und einer vorangehend gebildeten Peptidsequenz gemäß der üblichen Kondensierungsmethoden ausgeführt wird, wobei als Kondensierungsmethoden in Frage kommen: die Azidmethode, gemischte Säureanhydridmethode, symmetrische Anhydridmethode, Carbodiimidmethode, aktive Estermethode wie Pentafluorophenyl (Pfp), 3,4-Dihydro-4-oxobenzotriazin-3-yl (Dhbt), Benzotriazol-1-yl (Bt), 7-Azabenzotriazol-1-yl (Ar), 4-Nitrophenyl, N-Hydroxybernsteinsäure-imidoester (NHS), Säurechloride, Säurefluoride, in situ Aktivierung durch O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HATU), O-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HBTU), O-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat (TBTU), oder Benzotriazolyl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphat (BOP).
23. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Peptide von dem Träger mittels einer Säure wie Trifluoroessigsäure (TFA), Trifluoromethansulfonsäure (TFMSA), Bromwasserstoff (HBr), Chlorwasserstoff (HCl), Fluorwasserstoff (HF) oder einer Base wie Ammoniak, Hydrazin, einem Alkyloxid oder einem Hydroxid abgetrennt wird.
24. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Peptid von dem Träger durch Phorolyse abgespaltet wird.
25. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Vorläufersequenz von dem gebildeten Peptid enzymatisch abgespalten wird.

26. Das Verfahren gemäß Anspruch 24, wobei das Enzym aus geeigneten Carboxy- und Endopeptidasen ausgewählt ist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

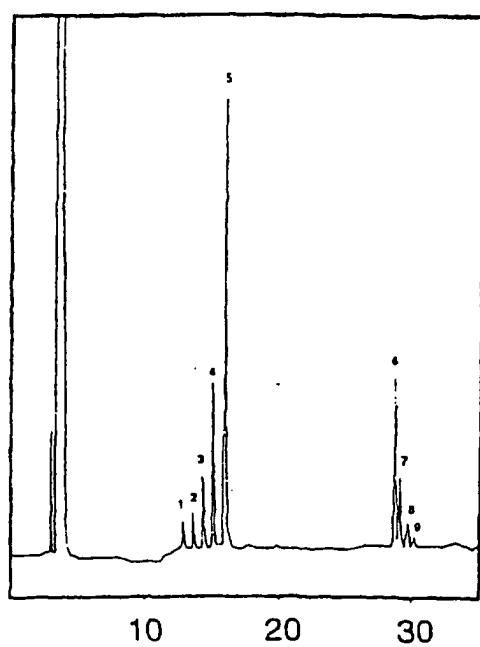


Fig. 2

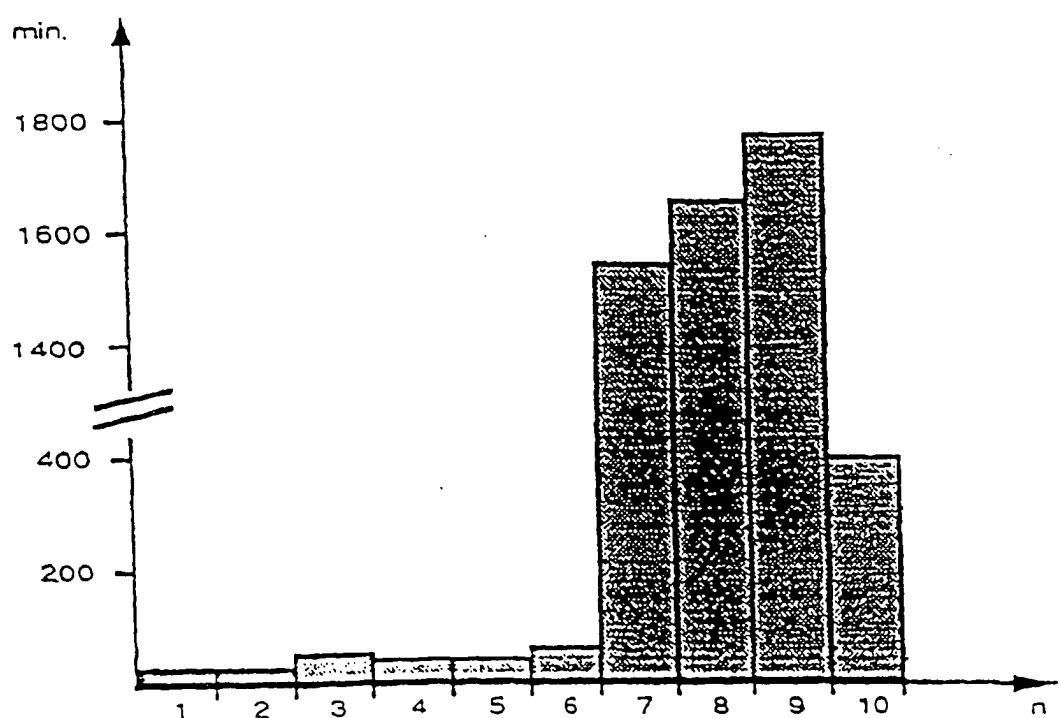


Fig. 3

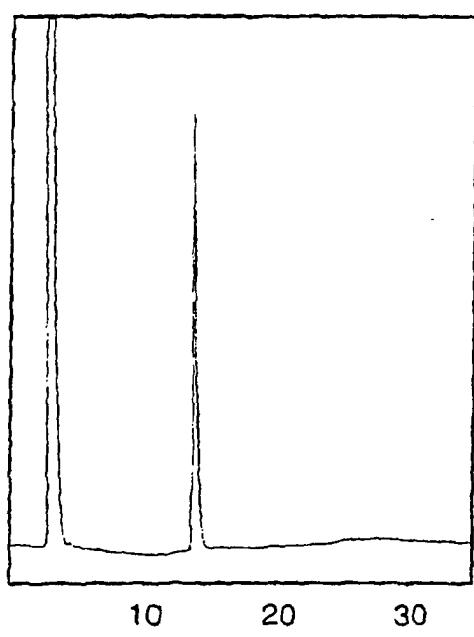


Fig. 4

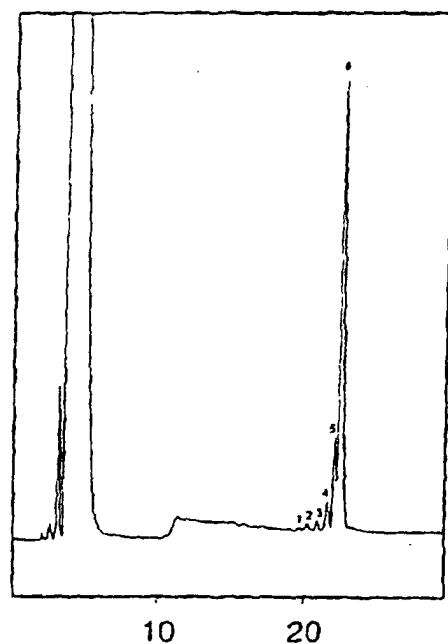


Fig. 5

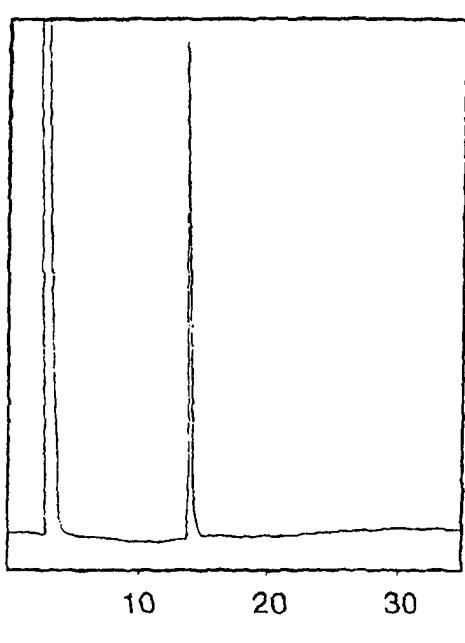


Fig. 6

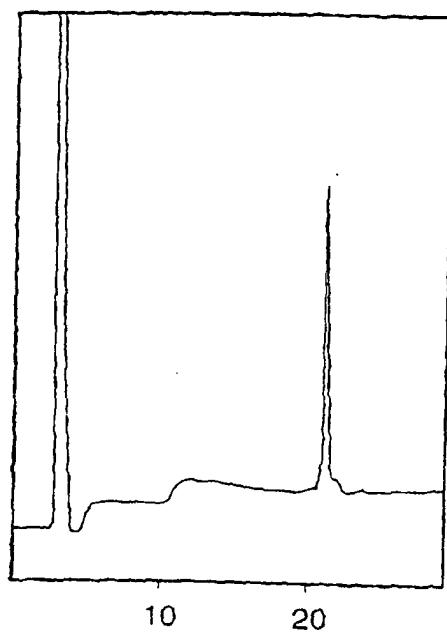


Fig. 7

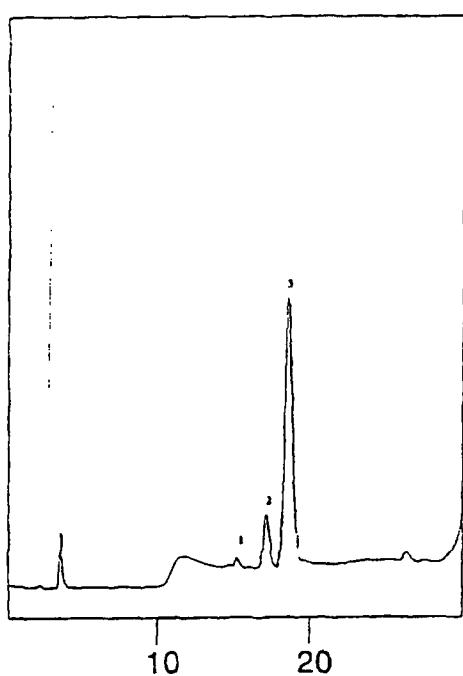


Fig. 8

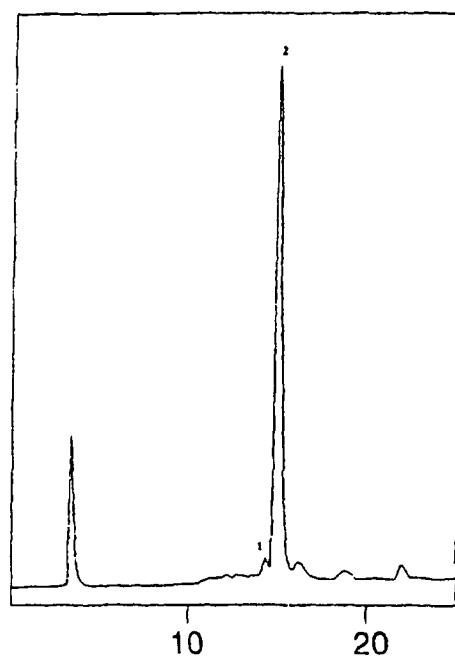


Fig. 9

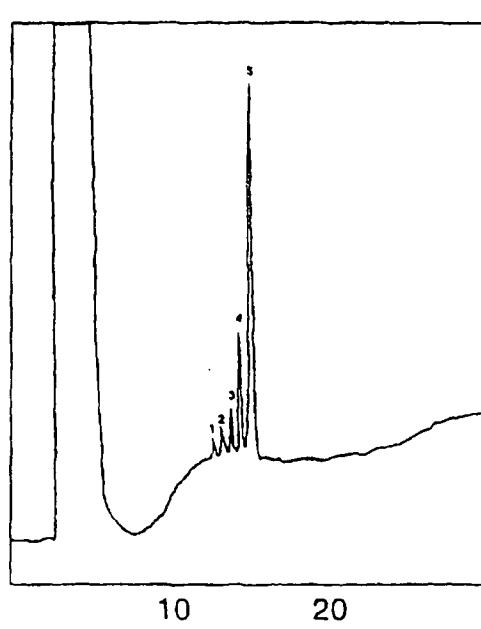


Fig. 10

