



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110885355 A

(43)申请公布日 2020.03.17

(21)申请号 201911125162.7

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

公司 11227

(22)申请日 2014.02.24

代理人 顾晋伟 尹玉峰

(30)优先权数据

13/833,745 2013.03.15 US

(51)Int.Cl.

C07K 1/08(2006.01)

(62)分案原申请数据

C07K 1/04(2006.01)

201480022269.8 2014.02.24

C07K 1/06(2006.01)

(71)申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 马克·大卫·西蒙

布雷德利·L·彭泰卢特

安德烈亚·阿达莫

帕特里克·路易斯·海德尔

克拉夫斯·F·詹森

权利要求书2页 说明书38页

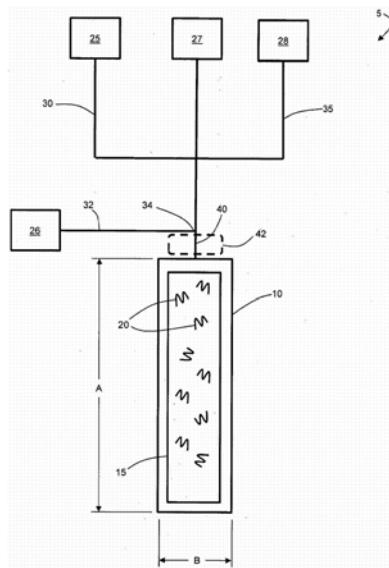
序列表16页 附图32页

(54)发明名称

固相肽合成方法及相关系统

(57)摘要

本发明涉及固相肽合成方法及相关系统。一般性描述了用于进行固相肽合成的系统和方法。固相肽合成是其中向已固定在固体支持物上的肽添加氨基酸残基的已知方法。在某些实施方案中，本发明的系统和方法可用于快速地进行固相肽合成同时保持高产率。某些实施方案涉及可用于以减少进行固相肽合成所需的时间量的方式来加热、运输和/或混合试剂的方法和系统。



1. 用于向肽添加氨基酸残基的方法,其包括:  
使包含氨基酸的第一流流动;  
使包含氨基酸活化剂的第二流流动;  
合并所述第一流和所述第二流以形成包含活化氨基酸的混合流体;以及  
在合并所述第一流和所述第二流以形成所述混合流体之后约30秒内,使所述混合流体暴露于固定在固体支持物上的多个肽。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述氨基酸活化剂包括碱性液体、碳二亚胺和/或脲鎓活化剂。
3. 根据权利要求1至2中任一项所述的方法,其包括加热氨基酸以使得所述氨基酸的温度提高至少约1℃,其中在使所述氨基酸暴露于固定肽之前且在30秒内进行所述加热步骤。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中在合并步骤之前、在合并步骤期间和/或在合并步骤之后进行所述加热步骤。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含聚苯乙烯和/或聚乙二醇。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含树脂,例如微孔聚苯乙烯树脂。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含在填充柱和/或流化床内。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中在使所述混合流体暴露于所述固定肽之后,至少约99%的所述固定肽添加了氨基酸残基。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中在使所述混合流体暴露于所述固定肽之后,少于约1%的所述固定肽结合了所述氨基酸残基的多份拷贝。
10. 根据权利要求8至9中任一项所述的方法,其中向所述固定肽添加氨基酸残基包括向所述固定肽添加单个氨基酸残基。
11. 根据权利要求8至10中任一项所述的方法,其中向所述固定肽添加氨基酸残基包括向所述固定肽添加包含两个或更多个氨基酸残基的肽。
12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其包括加热包含氨基酸的所述第一流以使得所述氨基酸的温度提高至少约1℃,其中在使经加热的氨基酸暴露于所述多个固定肽之前且在约30秒内进行所述加热步骤。
13. 用于向肽添加氨基酸残基的方法,其包括:  
提供多个包含保护基团的肽,每个肽固定在固体支持物上;  
进行第一氨基酸添加循环,其包括使氨基酸暴露于固定肽以使得向至少约99%的所述固定肽添加氨基酸残基;以及  
进行第二氨基酸添加循环,其包括使氨基酸暴露于所述固定肽以使得向至少约99%的所述固定肽添加氨基酸残基;  
其中:  
所述第一氨基酸添加循环结束与所述第二氨基酸添加循环结束之间的总时间量为约10分钟或更短,并且所述保护基团包括芴基甲氧羰基保护基团,和/或  
所述第一氨基酸添加循环结束与所述第二氨基酸添加循环结束之间的总时间量为约5

分钟或更短。

14. 用于向肽添加氨基酸残基的方法,其包括:

提供固定在固体支持物上的多个肽;以及

使活化氨基酸暴露于所述固定肽,以使得至少一部分的所述活化氨基酸与所述固定肽结合以形成新结合的氨基酸残基;

其中至少约99%的所述固定肽在约1分钟或更短的时间内添加了氨基酸残基。

15. 用于向肽添加氨基酸残基的方法,其包括:

提供多个包含保护基团的肽,每个肽固定在固体支持物上;

使去保护试剂暴露于固定肽以从至少一部分的所述固定肽中除去保护基团;

除去至少一部分的所述去保护试剂;

使活化氨基酸暴露于所述固定肽以使得至少一部分的所述活化氨基酸与所述固定肽结合以形成新结合的氨基酸残基;以及

除去至少一部分不与所述固定肽结合的活化氨基酸;

其中在氨基酸暴露步骤期间至少约99%的所述固定肽添加了氨基酸残基;并且

其中:

进行所有的去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤的组合所花费的总时间量为约10分钟或更短,并且所述保护基团包括芴基甲氧羰基保护基团,和/或

进行所有的去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤的组合所花费的总时间量为约5分钟或更短。

## 固相肽合成方法及相关系统

[0001] 本申请是申请号为201480022269.8的中国专利申请的分案申请,原申请是2014年2月24日提交的PCT国际申请PCT/US2014/017970于2015年10月19日进入中国国家阶段的申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请是2013年3月15日提交的名称为“Solid Phase Peptide Synthesis Processes and Associated Systems”的美国专利申请序列号13/833,745(其通过引用以其整体并入本文用于所有目的)的部分继续申请。

### 技术领域

[0004] 一般性描述了用于进行固相肽合成的系统和方法。

### 背景技术

[0005] 固相肽合成是用于在固体支持物上化学合成肽的方法。在固相肽合成中,氨基酸或肽通常通过C-末端与固体支持物结合。通过偶联反应将新的氨基酸添加至结合的氨基酸或肽。由于非期望反应的可能性,通常使用保护基团。迄今为止,固相肽合成已经成为化学肽合成的标准实践。已经通过自动化固相肽合成仪的商业成功证明了固相肽合成的广泛效用。虽然固相肽合成已被使用了30多年,但是还没有开发出快速合成技术。因此,需要改进的方法和系统。

### 发明内容

[0006] 一般性描述了固相肽合成方法及相关系统。某些实施方案涉及可用于快速地进行固相肽合成而同时保持高产率的系统和方法。在一些实施方案中,可以以减少进行固相肽合成所需的时间量的方式来加热、运输和/或混合试剂。在一些情况下,本发明的主题涉及相关的产品、特定问题的替代解决方案和/或一个或更多个系统和/或制品的多种不同的用途。

[0007] 在一些实施方案中,提供了用于向肽添加氨基酸残基的方法。在某些实施方案中,所述方法包括加热包含氨基酸的流以使得所述氨基酸的温度提高至少约1°C;以及使经加热的氨基酸暴露于固定在固体支持物上的多个肽,其中在使经加热的氨基酸暴露于所述肽之前且在约30秒内进行所述加热步骤。

[0008] 在某些实施方案中,所述方法包括提供多个包含保护基团的肽,每个肽均固定在固体支持物上;进行第一氨基酸添加循环,其包括使氨基酸暴露于固定肽以使得向至少约99%的所述固定肽添加氨基酸残基;以及进行第二氨基酸添加循环,其包括使氨基酸暴露于固定肽以使得向至少约99%的所述固定肽添加氨基酸残基。在一些实施方案中,第一氨基酸添加循环结束与第二氨基酸添加循环结束之间的总时间量为约10分钟或更短,并且保护基团包括芴基甲氧羰基(fluorenylmethyloxycarbonyl)保护基团和/或第一氨基酸添加循环结束与第二氨基酸添加循环结束之间的总时间量为约5分钟或更短。

[0009] 在某些实施方案中,所述方法包括提供固定在固体支持物上的多个肽;以及使活化氨基酸暴露于固定肽以使得至少一部分所述活化氨基酸与所述固定肽结合以形成新结合的氨基酸残基;其中至少约99%的所述固定肽在约1分钟或更短的时间内添加了氨基酸残基。

[0010] 在某些实施方案中,所述方法包括使包含氨基酸的第一流流动;使包含氨基酸活化剂的第二流流动;合并所述第一流和第二流以形成包含活化氨基酸的混合流体;并且在合并所述第一流和第二流以形成混合流体之后的约30秒内将所述混合流体暴露于固定在固体支持物上的多个肽。

[0011] 在某些实施方案中,所述方法包括提供多个包含保护基团的肽,每个肽均固定在固体支持物上;使去保护试剂暴露于固定肽以从至少一部分的所述固定肽中除去保护基团;除去至少一部分的所述去保护试剂;使活化氨基酸暴露于所述固定肽以使得至少一部分的所述活化氨基酸与所述固定肽结合以形成新结合的氨基酸残基;以及除去至少一部分不与所述固定肽结合的活化氨基酸;在一些实施方案中,在氨基酸暴露步骤期间,至少约99%的固定肽添加了氨基酸残基。在某些实施方案中,进行所有的去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤的组合所花费的总时间量为约10分钟或更短,并且所述保护基团包括芴基甲氧羰基保护基团和/或进行所有的去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤的组合所花费的总时间量为约5分钟或更短。

[0012] 当结合附图考虑对本发明的多种非限制性实施方案的以下详细描述时,本发明的其他优点和新的特征将变得明显。在本说明书和通过引用并入的文献包含冲突和/或不一致的公开内容的情况下,应以本说明书为准。

## 附图说明

[0013] 将通过参考附图举例的方式来描述本发明的非限制性实施方案,其是示意性的且并不意在按比例绘制。在图中,所示的每一个相同的或几乎相同的组件通常由单个数字表示。为了清楚的目的,在不必进行说明就可使本领域普通技术人员理解本发明的情况下,并非在每幅图中的每个组件都被加以标记,也不必示出本发明每个实施方案中的每个组件。在附图中:

[0014] 图1是根据一组实施方案之用于进行肽合成的一个系统的示意图;

[0015] 图2A-2D是根据某些实施方案的(A)肽合成系统的一个示例性示意图,(B)一个示例性肽合成系统的照片,(C)合成的肽Fmoc-ALFALFA-CONH<sub>2</sub>的色谱图以及(D)反应器的一个示例性示意图;

[0016] 图3A-3C是根据一组实施方案的(A)用不同的活化氨基酸暴露时间合成的LYRAG-CONH<sub>2</sub>肽的色谱图,(B)用不同的活化氨基酸暴露时间合成的Fmoc-ALF-CONH<sub>2</sub>肽的色谱图,和(C)一个示例性的合成时间线;

[0017] 图4A-4D是根据某些实施方案的通过以下条件合成的ACP(65-74)肽的色谱图和质谱:(A)在60℃下使用HATU合成和(B)在60℃下使用HBTU合成,(C)在室温下使用HBTU合成,以及(D)使用相同的合成时间线在分批条件下使用HBTU合成;

[0018] 图5A-5B是根据一组实施方案的(A)合成的PnIA(A10L)肽的色谱图和质谱以及(B)

合成的HIV-1 PR (81-99) 肽的色谱图和质谱；

[0019] 图6A-6E是根据某些实施方案的在如表1所示的多种条件 (A) 5、(B) 7、(C) 8和(D) 4下合成的GCF肽的总离子流色谱, 以及 (E) 是可靠 (authentic) 的Gly-D-Cys-L-Phe样品的一个示例性总离子流色谱；

[0020] 图7A-7E是根据某些实施方案的 (A) 来自三个肽片段的亲和体 (affibody) 蛋白之化学连接的一个示例性方案, (B) 第一亲和体片段的色谱图和质谱, (C) 第二亲和体片段的色谱图和质谱, (D) 第三亲和体肽片段的色谱图和质谱, 以及 (E) 纯化的亲和体的色谱图和质谱；

[0021] 图8A-8F是根据某些实施方案的 (A-B) 分别使用Fmoc N-末端保护基团的N-末端亲和体片段和使用Boc N-末端保护基团的常规手动排布的总离子色谱图, (C-D) 分别使用Fmoc N-末端保护基团的中间亲和体片段和使用Boc N-末端保护基团的常规手动排布的总离子色谱图, 以及 (E-F) 分别使用Fmoc N-末端保护基团的C-末端亲和体片段和使用Boc N-末端保护基团的常规手动排布的总离子色谱图；

[0022] 图9A-9E是根据某些实施方案的 (A) 纯化的第一亲和体片段的总离子色谱图, (B) 纯化的第二亲和体片段的总离子色谱图, (C) 纯化的第三亲和体片段的总离子色谱图, (D) 来自第一片段和第二片段之连接的纯化的亲和体片段的总离子色谱图, 以及 (E) 纯化的亲和体的色谱图和质谱；

[0023] 图10是根据一组实施方案的在肽的合成期间记录为时间之函数的紫外吸光度图；

[0024] 图11是根据一组实施方案的流量相对于洗涤时间的图；

[0025] 图12的A-G是根据一组实施方案的 (A) 入口 (左) 和出口 (右) 的照片, (B) 垫片 (spacer) 的照片, (C) 反应器主体单元的照片, (D) 组装式反应器的照片, 以及 (E) 示出了反应器主体、玻璃料和垫片之反应器的示意图, (F) 反应器的剖面图, 以及 (G) 用反应器所使用的合成时间线；

[0026] 图13是根据一组实施方案的用于进行肽合成之一个示例性系统的示意图；

[0027] 图14是根据某些实施方案的合成的肽ALFALFA-CONHNH<sub>2</sub>的一个示例性总离子色谱图；

[0028] 图15示出了使用本文描述的某些肽合成系统所制成的肽的两个示例性色谱图；

[0029] 图16的A-H是根据一组实施方案的用第二代方案在以下条件下合成的ACP (65-74) 的粗LCMS色谱图: (A) 在60°C下使用HATU, (B) 在60°C下使用HBTU, (C) 在室温下使用HBTU和 (D) 在室温下使用可比较的手动分批方法, 以及用第一代方案在以下条件下合成的ACP (E) (65-74) 的粗LCMS色谱图: (E) 在60°C下使用HATU, (F) 在60°C下使用HBTU, (G) 在室温下使用HBTU和 (H) 在室温下使用可比较的手动分批方法；

[0030] 图17包括根据一些实施方案合成的生物素化肽的色谱图；

[0031] 图18的A-D是根据一组实施方案的 (A) 用第二代方案合成的PnIA (A10L) 芋螺毒素 (conotoxin), (B) 用第二代方案合成的HIV-1 PR (81-99), (C) 用第一代方案合成的PnIA (A10L) 芋螺毒素和 (D) 用第一代方案合成的HIV-1 PR (81-99) 的色谱图；

[0032] 图19的A-F是根据某些实施方案的 (A-C) 用第二代方案在氯三苯甲基 (chlorotryptyl) 酰肼官能化的聚苯乙烯上合成的亲和体片段和 (D-F) 用第一代方案在修饰的Wang树脂上合成的亲和体片段的色谱图；

- [0033] 图20包括根据一组实施方案合成的谷胱甘肽类似物之文库的色谱图；
- [0034] 图21的A-C是根据某些实施方案合成的富含半胱氨酸的肽的色谱图；
- [0035] 图22的A-B是根据某些实施方案的(A) 使用自动化方法合成的(ALF) 7和(B) 使用手动的方法合成的(ALF) 7的色谱图。
- [0036] 图23的A-E是根据一组实施方案的(A) 自动化流动平台的示意图，(B) 通过自动化流动平台来掺入氨基酸残基而使用的合成时间线，(C) 示出ALFALFA的色谱图，(D) 示出ACP (65-74) 的色谱图和(E) 示出(ALF) 7的色谱图；
- [0037] 图24的A-B示出了(A) 使用包括除去步骤的添加循环合成的肽的色谱图和(B) 使用缺少一个或更多个除去步骤的添加循环合成的肽的色谱图；
- [0038] 图25的A-F示出了根据一组实施方案的(A) DARPin合成的一个合成方案，(B-E) 片段DARPin的色谱图和(F) DARPin的色谱图；
- [0039] 图26的A-F示出了根据某些实施方案的(A) 芽孢杆菌RNA酶(Barnase) 合成的一个合成方案，(B-E) 片段芽孢杆菌RNA酶的色谱图和(F) 芽孢杆菌RNA酶的色谱图；以及
- [0040] 图27的A-C示出了根据某些实施方案的(A) 人胰岛素A链的色谱图，(B) 人胰岛素B链的色谱图和(C) 进化的EETI-II整联蛋白结合肽的色谱图。

## 具体实施方式

- [0041] 一般性地描述了用于进行固相肽合成的系统和方法。固相肽合成是其中向已被固定在固体支持物上的肽添加氨基酸残基的已知方法。在某些实施方案中，本发明的系统和方法可用于快速地进行固相肽合成而同时保持高产率。某些实施方案涉及可用于以减少进行固相肽合成所需的时间量的方式来加热、运输和/或混合试剂的方法和系统。
- [0042] 某些实施方案涉及向固定肽添加氨基酸的方法。图1是可用于进行本文所描述的某些发明过程的示例性系统5的示意图。在某些实施方案中，本文所描述的系统和方法(例如，在图1中的系统5)可涉及基于流动的合成(与此相反的是用于许多传统的固相肽合成系统的基于分批的合成)。在一些这样的实施方案中，可进行持续的肽合成，其中将(一种形式或另一种形式的)流体基本上持续地运输经过固定肽。例如，在某些实施方案中，可将试剂和漂洗流体交替且持续地运输通过固定肽。

[0043] 在一些实施方案中，肽20可被固定在固体支持物15上。固体支持物15固定可包含在容器(例如反应器10)内。在一些实施方案中，如图1中所示，多个试剂储存器(reservoir)可位于反应器10的上游并与其流体地连接。在一些实施方案中，试剂储存器25容纳氨基酸(例如，预活化的氨基酸和/或未完全活化的氨基酸)。在一些情况下，试剂储存器26容纳能够完成氨基酸活化的氨基酸活化剂(例如，碱性液体、碳二亚胺和/或脲鎓(uronium)活化剂)。在某些实施方案中，试剂储存器27容纳去保护试剂，例如哌啶或三氟乙酸。试剂储存器28可容纳可用于例如试剂除去步骤的溶剂，例如二甲基甲酰胺(DMF)。虽然为了简单起见在图1中示出了单一储存器，但是应当理解在示出单一储存器的图1中，可使用多重储存器(例如，每个包含不同种类的氨基酸、不同种类的去保护试剂等)来代替单一储存器。

[0044] 在某些实施方案中，肽20包含保护基团，例如，在肽的N-末端。如本文所使用的术语“保护基团”具有其在本领域中的普通含义。保护基团包括连接至或被配置成连接至分子(例如，肽)内的反应性基团(即，受保护的基团)以使得所述保护基团阻止或以其他方式抑

制受保护的基团参与反应的化学部分。可通过将保护基团连接至分子来进行保护。当将保护基团从分子中除去时,例如,通过除去保护基团的化学转化,可发生去保护。

[0045] 在一些实施方案中,多个包含保护基团的肽可以与固体支持物结合以使得每个肽固定于固体支持物上。例如,所述肽可通过其C-末端与固相支持物结合,从而固定所述肽。

[0046] 在一些实施方案中,向固定肽添加氨基酸残基的方法包括使去保护试剂暴露于所述固定肽以从至少一部分固定肽中除去至少一部分保护基团。在某些实施方案中,可配置去保护试剂暴露步骤以使得保留侧链保护基团,而N-末端保护基团被除去。例如,在某些实施方案中,使用来保护肽的保护基团包括芴基甲氧羰基(Fmoc)。在一些这样的实施方案中,包含哌啶(例如哌啶溶液)的去保护试剂可暴露于固定肽以使得从至少一部分的固定肽中除去Fmoc保护基团。在一些实施方案中,用来保护肽的保护基团包括叔丁氧羰基(Boc)。在一些这样的实施方案中,包含三氟乙酸的去保护试剂可暴露于固定肽以使得从至少一部分的固定肽中除去Boc保护基团。在一些情况下,保护基团(例如,叔丁氧羰基,即Boc)可与肽的N-末端结合。

[0047] 在一些实施方案中,向固定肽添加氨基酸残基的方法包括除去至少一部分的去保护试剂。在一些实施方案中,可以除去至少一部分可在去保护步骤期间形成的任何反应副产物(例如,除去的保护基团)。在一些情况下,可通过用例如储存在任选的储存器28中的流体(例如,液体如含水溶剂或无水溶剂、超临界流体等)洗涤肽、固体支持物和/或周围区域来除去去保护试剂(以及在某些实施方案中的副产物)。在一些情况下,除去去保护试剂和反应副产物可能会改善随后步骤的性能(例如,通过防止副反应)。在某些实施方案中,随后步骤的性能并不依赖于至少一部分(例如,基本上全部)去保护试剂和/或反应副产物的除去。在一些这样的情况下,除去步骤是任选的。在其中除去步骤为任选的实施方案中,可以减少除去步骤(例如,减少除去步骤的时间、减少在除去步骤中使用的溶剂的量)和/或消除除去步骤。减少或消除一个或更多个除去步骤可减少总的循环时间。应当理解的是,如果减少或消除了任选的除去步骤,则添加循环中的随后步骤可用来除去至少一部分的去保护试剂和/或反应副产物,例如,由于系统中的流体流动。

[0048] 在某些实施方案中,向固定肽添加氨基酸残基的方法包括使活化氨基酸暴露于所述固定肽以使得至少一部分的所述活化氨基酸与所述固定肽结合以形成新结合的氨基酸残基。例如,所述肽可暴露于与肽的去保护N末端反应的活化氨基酸。在某些实施方案中,如在下面更详细地讨论的,可通过混合含氨基酸的流与活化剂流来活化氨基酸以用于与去保护的肽进行反应。在一些情况下,可保护活化氨基酸的氨基以使得添加氨基酸导致具有受保护N-末端的固定肽。

[0049] 在一些实施方案中,向固定肽添加氨基酸残基的方法包括除去至少一部分未与固定肽结合的活化氨基酸。在一些实施方案中,可除去可在活化氨基酸暴露步骤期间形成的至少一部分的反应副产物。在一些情况下,可通过用例如储存在任选的储存器28中的流体(例如,液体如含水溶剂或无水溶剂、超临界流体等)洗涤肽、固体支持物和/或周围区域来除去活化氨基酸和副产物。在一些情况下,除去至少一部分的活化氨基酸和反应副产物可提高随后步骤的性能(例如,通过防止副反应)。在某些实施方案中,随后步骤的性能并不依赖于至少一部分(例如,基本上全部)活化氨基酸和/或反应副产物的除去。在一些这样的情况下,除去步骤是任选的。在其中除去步骤为任选的实施方案中,可减少除去步骤(例如,减

少除去步骤的时间、减少除去步骤中所使用的溶剂的量)和/或消除除去步骤。减少或消除一个或更多个除去步骤可减少总的循环时间。应当理解的是,如果减少或消除了可选的除去步骤,则添加循环中的随后步骤可用来除去至少一部分的活化氨基酸和/或反应副产物,例如,由于系统中的流体流动。

[0050] 应当理解的是,以上提及的步骤是示例性的且氨基酸添加循环不必包括所有以上提及的步骤。例如,氨基酸添加循环可以不包括去保护试剂除去步骤和/或活化氨基酸除去步骤。通常,氨基酸添加循环包括导致氨基酸残基添加至肽的任何系列的步骤。

[0051] 在某些实施方案中,在氨基酸添加步骤期间,添加氨基酸可导致肽掺入单个额外的氨基酸残基(即,可向固定肽添加单个氨基酸残基,以使得在添加步骤后给定的肽包含单个额外的氨基酸残基)。在一些这样的实施方案中,随后的氨基酸添加步骤可用于通过单独地添加氨基酸残基直至合成所需的肽来建立肽。在一些实施方案中,可向固定在固体支持物上的肽添加一个以上的氨基酸残基(例如,以肽的形式)(即,可向给定的固定肽添加包含多个氨基酸残基的肽)。通过本领域普通技术人员已知的方法(例如,片段缩合、化学连接)可实现向固定肽添加肽。也就是说,在氨基酸添加步骤期间,向固定肽添加氨基酸可包括向固定肽添加单个氨基酸残基或者向固定肽添加多个氨基酸残基(例如,作为肽)。

[0052] 在一些实施方案中,可以比常规方法显著更快地向肽添加氨基酸。在某些实施方案中,进行步骤的组合所花费的总时间量受保护基团的影响。例如,在其中保护基团包括芴基甲氧羰基(Fmoc)的某些实施方案中,进行所有的去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤的组合所花费的总时间量为约10分钟或更短、约9分钟或更短、约8分钟或更短、约7分钟或更短、约6分钟或更短、约5分钟或更短、约4分钟或更短、约3分钟或更短、约2分钟或更短、约1分钟或更短、约10秒至约10分钟、约10秒至约9分钟、约10秒至约8分钟、约10秒至约7分钟、约10秒至约6分钟、约10秒至约5分钟、约10秒至约4分钟、约10秒至约3分钟、约10秒至约2分钟或约10秒至约1分钟。在某些实施方案(包括其中保护基团包括叔丁氧羰基(Boc)、芴基甲氧羰基(Fmoc)和/或其他类型的保护基团的实施方案)中,进行所有的去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤的组合所花费的总时间量为约5分钟或更短、约4分钟或更短、约3分钟或更短、约2分钟或更短、约1分钟或更短、约10秒至约5分钟、约10秒至约4分钟、约10秒至约3分钟、约10秒至约2分钟或约10秒至约1分钟。

[0053] 一般而言,通过将进行去保护试剂暴露步骤所花费的时间量加上进行去保护试剂除去步骤所花费的时间量和进行活化氨基酸暴露步骤所花费的时间量以及进行活化氨基酸除去步骤所花费的时间量来计算进行所有的去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤的组合所花费的总时间量。

[0054] 在其中如本文所描述的添加循环缺少一个或更多个除去步骤并且保护基团包括芴基甲氧羰基(Fmoc)的实施方案中,进行所有的添加循环步骤(例如,去保护试剂暴露步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤;去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤和活化氨基酸暴露步骤;去保护试剂暴露步骤和活化氨基酸暴露步骤)的组合所花费的总时间量为约10分钟或更短、约9分钟或更短、约8分钟或更短、约7分钟或更短、约6分钟或更短、约5分钟或更短、约4分钟或更短、约3分钟或更短、约2分钟或更短、约1分钟或更短、约0.75分钟或更短、约10秒至约10分钟、约10秒至约9分钟、约10秒至约8分钟、约10秒至约7分

钟、约10秒至约6分钟、约10秒至约5分钟、约10秒至约4分钟、约10秒至约3分钟、约10秒至约2分钟或者约10秒至约1分钟。在某些实施方案(包括其中保护基团包括叔丁氧羰基(Boc)、芴基甲氧羰基(Fmoc)和/或其他类型的保护基团的实施方案)中,进行缺少一个或更多个除去步骤的添加循环中所有步骤的组合所花费的总时间量为约5分钟或更短、约4分钟或更短、约3分钟或更短、约2分钟或更短、约1分钟或更短、约10秒至约5分钟、约10秒至约4分钟、约10秒至约3分钟、约10秒至约2分钟或约10秒至约1分钟。

[0055] 一般而言,通过将进行去保护试剂暴露步骤所花费的时间量加上进行去保护试剂除去步骤(如果存在的话)所花费的时间量和进行活化氨基酸暴露步骤所花费的时间量以及进行活化氨基酸除去步骤(如果存在的话)所花费的时间量来计算进行缺少一个或更多个除去步骤的添加循环中所有步骤的组合所花费的总时间量。

[0056] 在某些实施方案中,第一氨基酸添加步骤(和/或随后的氨基酸添加步骤)可以以相对高的产率添加氨基酸。例如,某些实施方案包括将氨基酸暴露于固定肽以使得向至少约99%、至少约99.9%、至少约99.99%或基本上100%的固定肽添加氨基酸残基。在某些实施方案中,可进行第二(以及在一些实施方案中,第三、第四、第五和/或随后的)氨基酸添加循环,其可包括使氨基酸暴露于固定肽以使得向至少约99%、至少约99.9%、至少约99.99%或基本上100%的固定肽添加氨基酸残基。在某些实施方案中,本发明的方法和系统的使用可以允许向固定肽添加一个以上氨基酸相对快速地(包括在上文或本文其他地方所公开的任何时间范围内)发生,同时保持了高的反应产率。

[0057] 在某些实施方案中,可以进行一个或更多个氨基酸添加步骤,而很少有或没有双掺入(即,在单个添加步骤期间添加所需氨基酸(例如,单个氨基酸残基或肽)的多份拷贝)。例如,在某些实施方案中,在第一(和/或第二、第三、第四、第五和/或随后的)氨基酸添加步骤期间,少于约1%(或少于约0.1%、少于约0.01%、少于约0.001%、少于约0.0001%、少于约0.00001%或基本上没有)的固定肽结合了所需氨基酸的多份拷贝。

[0058] 在一些实施方案中,可进行多个氨基酸添加循环。进行多个氨基酸添加循环可导致向肽添加一个以上的单氨基酸残基(或一个以上的肽,和/或至少一个单氨基酸残基和至少一个肽)。在某些实施方案中,向固定肽添加一个以上氨基酸的方法可包括进行第一氨基酸添加循环以添加第一氨基酸和进行第二氨基酸添加循环以添加第二氨基酸。在某些实施方案中,可进行第三、第四、第五和随后的氨基酸添加循环以产生任何期望长度的固定肽。在一些实施方案中,进行至少约10个氨基酸添加循环、至少约50个氨基酸添加循环或至少约100个氨基酸添加循环,从而导致向固定肽添加至少约10个氨基酸残基、至少约50个氨基酸残基或至少约100个氨基酸残基。在某些这样的实施方案中,可以以高产率(例如,至少约99%、至少约99.9%、至少约99.99%或基本上100%)进行相对高百分比的氨基酸添加循环(例如,至少约50%、至少约75%、至少约90%、至少约95%或至少约99%的此类氨基酸添加循环)。在一些这样的实施方案中,可以在例如,上文或本文其他地方所指定的任何时间范围内,快速地进行相对较高百分比的氨基酸添加循环(例如,至少约50%、至少约75%、至少约90%、至少约95%或至少约99%的此类氨基酸添加循环)。在一些这样的实施方案中,可以在有限的或没有双掺入的情况下,例如,在上文或本文其他地方所指定的任何双掺入范围内,进行相对高百分比的氨基酸添加循环(例如,至少约50%、至少约75%、至少约90%、至少约95%或至少约99%的此类氨基酸添加循环)。

[0059] 在其中具有一个以上添加循环的实施方案中,一个氨基酸添加循环结束与随后的氨基酸添加循环之间经过的总时间量可以相对短。例如,在其中使用芴基甲氧羰基保护基团的某些实施方案中,第一氨基酸添加循环结束和第二氨基酸添加循环结束之间的总时间量为约10分钟或更短、约9分钟或更短、约8分钟或更短、约7分钟或更短、约6分钟或更短、约5分钟或更短、约4分钟或更短、约3分钟或更短、约2分钟或更短、约1分钟或更短、约10秒至约10分钟、约10秒至约9分钟、约10秒至约8分钟、约10秒至约7分钟、约10秒至约6分钟、约10秒至约5分钟、约10秒至约4分钟、约10秒至约3分钟、约10秒至约2分钟或约10秒至约1分钟。在其中使用包括芴基甲氧羰基、叔丁氧羰基和/或任何其他合适的保护基团之保护基团的某些实施方案中,氨基酸添加循环结束与随后的氨基酸添加循环之间的总时间量可为约5分钟或更短、约4分钟或更短、约3分钟或更短、约2分钟或更短、约1分钟或更短、约10秒至约5分钟、约10秒至约4分钟、约10秒至约3分钟、约10秒至约2分钟或约10秒至约1分钟。

[0060] 如上所述,某些方面涉及使一个或更多个添加循环所需的总时间比之前的固相肽合成方法显著减少的方法和系统。自从连续固相肽合成在30年前出现以来,持续不断的努力集中在改进其效用和适用性上。虽然这些改进都促进了自动化固相肽合成仪的商业成功,但是减少合成时间仍然是一个重大的障碍。该领域30多年的研究和开发已无法产生快速的合成技术。使用Fmoc或Boc保护基团的典型连续固相肽合成添加单个氨基酸需要30至90分钟。在本发明的上下文中,已经发现了解决减少合成时间的长期需求的某些方法和技术。例如,可通过采用混合、加热和/或控制压降的专门技术来达到快速的合成时间。

[0061] 在氨基酸添加循环中的某些步骤可能需要使试剂混合。在一些常规的系统中,在暴露于固定肽之前很长时间混合试剂,这可能会导致在暴露于固定肽之前的不期望的副反应和/或试剂降解。在一些情况下,副反应和/或降解会对氨基酸添加循环中的一个或更多个步骤(例如,氨基酸暴露步骤)的产率和动力学产生不良的影响。在一些常规的系统中,在固定肽存在下混合试剂,这可导致例如较慢的反应动力学。用于实现迅速肽合成的一种技术可涉及在到达固定肽之前但在很短的时间量内合并试剂流,如图1中所示。

[0062] 在一些实施方案中,用于向肽添加氨基酸残基的方法包括使包含氨基酸的第一流流动,使包含氨基酸活化剂(例如,碱性液体、碳二亚胺和/或脲鎓活化剂)的第二流流动。例如,再参考图1,试剂储存器25可容纳氨基酸。在一些这样的实施方案中,试剂储存器26可容纳氨基酸活化剂。可合并第一流和第二流以形成包含活化氨基酸的混合流体。例如,参考图1,来自储存器25的氨基酸可流入第一流30,而氨基酸活化剂可流入第二流32。可混合第一流30和第二流32,例如,在流40的点34处。由于通过氨基酸活化剂而使氨基酸活化,因此混合流体可包含活化氨基酸。

[0063] 在某些实施方案中,在活化氨基酸之后,在相对短的时间段内可使固定肽暴露于混合流体。例如,在某些实施方案中,在合并第一流和第二流以形成混合流体之后约30秒内(或约15秒内、约10秒内、约5秒内、约3秒内、约2秒内、约1秒内、约0.1秒内或约0.01秒内)可使固定在固体支持物上的多个肽暴露于混合流体。

[0064] 在某些实施方案中,合并试剂流可用于如本文所述的氨基酸添加循环中。例如,在使活化氨基酸暴露于固定在固体支持物上的肽之前约30秒内,可合并包含氨基酸的第一流体流和包含氨基酸活化剂的第二流以形成包含活化氨基酸的混合流体。在其中进行一个以上氨基酸添加循环的一些实施方案中,一个或更多个氨基酸添加循环(例如,第一氨基酸添

加循环和第二氨基酸添加循环)可包括在使氨基酸暴露于固体支持物之前约30秒内合并包含氨基酸的第一流体流和包含氨基酸活化剂的第二流以形成包含活化氨基酸的混合流体。应当理解的是,合并试剂流可与添加循环中的任何合适步骤结合使用并且可与氨基酸添加循环中的一个或更多个步骤结合使用。

[0065] 一般而言,可使用本领域技术人员已知的任何合适的技术来合并流。在一些实施方案中,可通过基本上同时使第一流和第二流流入单股流中来合并流(例如,通过合并所述流在其中流动的通道)。也可使用其他的合并方法。

[0066] 用于实现快速的合成时间的另一种技术可能涉及在到达反应器之前但在短时期段内加热流。将经加热的流供给反应器可改变反应器中发生的过程的动力学。例如,使固定肽、固体支持物或其他合成组件暴露于经加热的流可改变氨基酸添加过程的反应动力学和/或扩散动力学。例如,使肽暴露于包含活化氨基酸的经加热的流可提高向肽添加氨基酸的速率。在一些实施方案中,在到达反应器之前,但在短时间段内加热流可明显减少或消除向反应器提供辅助热(即,不是来自一个或更多个预加热的流的热)的需要。在一些情况下,大部分或基本上所有的供给反应器的热都源于预加热的流。例如,在一些实施方案中,源于预加热的流之用于加热反应器的热能的百分比可大于或等于约50%、大于或等于约60%、大于或等于约70%、大于或等于约80%、大于或等于约90%、大于或等于约95%或者大于或等于约99%。在一些这样的实施方案中,以这种方式加热系统可减少加热反应器、固定肽、固体支持物、活化氨基酸、去保护试剂、洗涤流体和/或其他合成组分至期望反应温度的所需时间。

[0067] 因此,在一些实施方案中,用于将氨基酸残基添加至肽的方法可包括加热包含活化氨基酸的流以使得在使经加热的氨基酸暴露于固定肽之前,使所述活化氨基酸的温度提高至少约1°C(或至少约2°C、至少约5°C、至少约10°C、至少约25°C、至少约50°C,和/或小于或等于约450°C、小于或等于约300°C、少于或等于约200°C、小于或等于约100°C和/或小于或等于约75°C)。在某些实施方案中,在使流内容物暴露于固定肽之前,可将包含任何其他组分(例如,洗涤剂、去保护试剂或任何其他组分)的流加热以使得所述流内容物的温度提高至少约1°C(或至少约2°C、至少约5°C、至少约10°C、至少约25°C、至少约50°C,和/或小于或等于约450°C、小于或等于约300°C、少于或等于约200°C、小于或等于约100°C和/或小于或等于约75°C)。在一些情况下,可在使流内容物(例如,经加热的活化氨基酸)暴露于固定肽约30秒内(或约15秒内、约10秒内、约5秒内、约3秒内、约2秒内、约1秒内、约0.1秒内或约0.01秒内)进行加热步骤(例如,加热活化氨基酸和/或加热在流内被运输到固定肽的任何其他组分)。在一些这样的实施方案中,并且如图1中示例性的实施方案所示,可通过加热固定肽的上游位置来实现这样的加热。在一些这样的实施方案中,在使氨基酸暴露于固定肽之前至少约0.01秒、至少约0.05秒、至少约0.1秒、至少约0.5秒、至少约1秒、至少约5秒或至少约10秒开始加热氨基酸。在某些实施方案中,在使氨基酸暴露于固定肽之前至少约0.1秒、至少约1秒、至少约5秒或至少约10秒加热氨基酸至少约1°C(或至少约2°C、至少约5°C、至少约10°C、至少约25°C、至少约50°C,和/或小于或等于约450°C、小于或等于约300°C、少于或等于约200°C、小于或等于约100°C和/或小于或等于约75°C)。

[0068] 再参考图1,例如,系统5可包括加热区42,在其中可加热流40的内容物。加热区42可包含加热器。一般而言,任何适合的加热方法都可用来提高流的温度。本文描述的某些系

统和方法的一个优点是使用简单和/或廉价的加热方法和/或仪器的能力。例如,加热区42可包含液浴(例如,水浴)、电阻加热器、基于气体对流的加热元件或任何其他合适的加热器。在一些实施方案中,用于加热入口流(和/或反应器)的相对低百分比的热能可源于电磁辐射(例如,微波辐射)。例如,在一些实施方案中,源于电磁辐射的用于加热入口流和/或反应器的热能百分比可以小于或等于约20%、小于或等于约15%、小于或等于约10%、小于或等于约5%、小于或等于约1%或者小于或等于约0.5%。在一些实施方案中,可以不使用电磁辐射而加热入口流和/或反应器。在某些实施方案中,源于微波辐射的用于加热入口流和/或反应器的热能百分比可以小于或等于约20%、小于或等于约15%、小于或等于约10%、小于或等于约5%、小于或等于约1%或者小于或等于约0.5%。在一些实施方案中,可以不使用微波辐射而加热入口流和/或反应器。在一些情况下,加热机构可以在固定肽的短距离内,例如,约5米内、约1米内、约50cm内或约10cm内。

[0069] 在一些实施方案中,包括图1中所示的那些,可在使氨基酸与固定肽接触之前和相对短的时间内进行加热氨基酸以及合并氨基酸和氨基酸活化剂(例如,碱性液体、碳二亚胺和/或脲鎓活化剂)二者。可在合并包含氨基酸的流与包含氨基酸活化剂的流之前、期间和/或之后进行氨基酸加热。

[0070] 在某些实施方案中,刚好在使流暴露于固定肽之前加热流(与之相反,在将流内容物运输到固定肽之前很长时间加热流)可以最小化所述流中一种或更多种试剂(例如,将要被添加至肽的氨基酸和/或去保护试剂)的热降解。当然,如上面所讨论的,在流成分到达之前加热流可提高进行反应或洗涤步骤的速度。

[0071] 在一些实施方案中,如本文所述,可在氨基酸添加循环中使用加热步骤。例如,可在使活化氨基酸暴露于固定肽之前且在约30秒内(或其他地方提及的任何其他时间范围内)进行所述活化氨基酸加热以使得所述活化氨基酸的温度提高至少约1°C。应当理解的是,可在氨基酸添加循环的任何步骤(例如,去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤、活化氨基酸除去步骤)之前且在30秒内使用加热步骤。在一些实施方案中,氨基酸添加循环可包括一个以上的加热步骤。例如,可在去保护试剂暴露步骤和活化氨基酸暴露步骤之前进行加热步骤。

[0072] 在其中进行一个以上氨基酸添加循环的某些实施方案中,在一个或更多个氨基酸添加循环(例如,第一氨基酸添加循环和第二氨基酸添加循环)可包括在进行步骤(例如去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤、活化氨基酸除去步骤)之前且在约30秒内(或其他地方提及的任何其他时间范围内)的一个或更多个加热步骤。例如,一个或更多个氨基酸添加循环(例如,第一氨基酸添加循环和第二氨基酸添加循环)可包括在使活化氨基酸暴露于固定肽之前且在约30秒内(或其他地方提及的任何其他时间范围内)加热活化氨基酸。一般而言,加热步骤可与添加循环中的任何合适的步骤结合使用,并且可与任何单独添加循环中的一个或更多个步骤或与一系列添加循环中的所有步骤结合使用。

[0073] 如上所述,在一些实施方案中,加热流可将流内容物的温度提高(例如,可提高流内氨基酸的温度)至少约1°C、至少约2°C、至少约5°C、至少约10°C、至少约25°C或至少约50°C。应当理解的是,对于不同的添加循环步骤和/或添加循环,加热后流的温度可以相同或不同。在一些情况下,对于一个或更多个添加循环步骤和/或添加循环,加热后流的温度可

以相同。在一些情况下,加热流可使流的内容物的温度提高(例如,可提高流内氨基酸的温度)小于或等于约450°C、小于或等于约300°C、小于或等于约200°C、小于或等于约100°C或者小于或等于约75°C。上面提及的范围的组合也是可能的(例如,至少约1°C且小于或等于约100°C、至少约1°C且小于或等于约450°C等)。

[0074] 根据某些实施方案,可使用用于降低整个固定肽之压降的方法和系统来改善肽合成的速度。在一些实施方案中,整个固定肽的试剂的流量可影响肽合成的速度。例如,氨基酸添加循环中的一个或更多个步骤(例如,去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤、活化氨基酸除去步骤)所需的时间可随着流量增加而减少。一般而言,使用高流量确保了靠近固定肽的试剂浓度没有像在采用低流量时可观察到的那么严重的损耗。在许多传统的连续固相肽合成系统中,流量受到整个反应器的压降的限制。压降可能由于在合成期间固体支持物的膨胀和/或由于工艺设备的不合适尺寸而发生。在某些实施方案中,在氨基酸添加循环期间,在超过约5% (或超过约1%) 的进行该循环的时间段期间整个固体支持物的压降不超过700psi。例如,在某些实施方案中,在进行氨基酸添加循环的每个步骤(去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤)期间,在超过约5% (或超过约1%) 的进行该步骤的时间段期间整个固体支持物的压降不超过约700psi。在其中进行一个以上添加循环的实施方案中,在一个或更多个添加循环(例如,第一氨基酸添加循环和第二氨基酸添加循环)期间,在超过约5% (或超过约1%) 的进行该循环的时间段期间,压降可不超过约700psi。

[0075] 在一些实施方案中,在一个氨基酸添加循环的每个步骤期间和/或在一个或更多个添加循环期间,在超过约5% (或超过约1%) 的进行该步骤的时间段期间,整个反应器的压降不超过约700psi、约600psi、约500psi、约400psi、约250psi、约100psi或约50psi。

[0076] 在某些实施方案中,可通过用具有期望纵横比的加工容器(例如,填充柱的柱)来降低整个反应器的压降。一般而言,加工容器的纵横比是容器长度(基本上平行于通过该容器的流的方向)与容器最短宽度(垂直于容器的长度测量)的比。例如,在圆筒形容器的情况下,纵横比将是圆筒高度与圆筒截面直径的比。再参考图1,例如,反应器10的纵横比将是尺寸A长度与尺寸B长度的比(即,A:B)。在一些实施方案中,反应器的纵横比可以小于或等于约20:1、小于或等于约10:1、小于或等于约5:1、小于或等于约3:1、小于或等于约2:1、小于或等于约1:1、小于或等于约0.5:1、小于或等于约0.2:1或者小于或等于约0.1:1(和/或在某些实施方案中,低至0.01:1或更低)。

[0077] 在一些实施方案中,通过使用本文所描述的一种或更多种技术,可以实现具有高产率和/或有限的双掺入和/或没有双掺入的相对短的添加循环。例如,本文所描述的某些系统和方法可允许在约1分钟或更短的时间内(例如,约30秒或更短、约15秒或更短、约10秒或更短、约7秒或更短或者约5秒或更短,和/或在某些实施方案中,在低至1秒内或更短)进行氨基酸暴露步骤(即,使活化氨基酸暴露于固定肽的步骤)(例如,同时实现了本文所描述的高产率和/或避免任何程度的双掺入)。在一些情况下,本文所描述的某些系统和方法可允许在约2分钟或更短的时间内(例如,约1.5分钟或更短、约1分钟或更短、约45秒或更短、约30秒或更短、约15秒或更短、约10秒或更短、约5秒或更短,和/或在某些实施方案中,在低至1秒内或更短)进行去保护试剂除去步骤和/或活化氨基酸除去步骤。在某些实施方案中,本文所描述的某些系统和方法可允许在约20秒或更短的时间内(例如,约15秒或更短、约10

秒或更短、约8秒或更短、约5秒或更短、约1秒或更短,和/或在某些实施方案中,在低至0.5秒内或更短)进行去保护试剂暴露步骤(即,使固定肽暴露于去保护试剂的步骤)。

[0078] 在某些情况下,用于肽合成所需的时间可能受保护基团的选择的影响。例如,通常理解使用Fmoc保护基团需要更长的合成循环时间。然而,本文所描述的系统和方法可用于即使采用Fmoc保护基团化学品时也进行快速的氨基酸添加。在一些实施方案中,不管正在使用的保护基团的类型如何,氨基酸添加循环的总时间可能低。

[0079] 一般而言,可使用本领域普通技术人员已知的任何保护基团。保护基团(例如,N-末端保护基团)的非限制性实例包括芴基甲氧羰基、叔丁氧羰基、烯丙氧羰基(alloc)、羧基苄基和光不稳定保护基团。在某些实施方案中,固定肽包含芴基甲氧羰基保护基团。在一些实施方案中,固定肽包含叔丁氧羰基保护基团。

[0080] 如其他地方所述,在使氨基酸暴露于固定肽之前,可使用氨基酸活化剂来活化氨基酸或完成氨基酸的活化。可使用任何合适的氨基酸活化剂。在某些实施方案中,氨基酸活化剂包括碱性液体。在一些实施方案中,氨基酸活化剂包括碳二亚胺,例如N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)等。在某些实施方案中,氨基酸活化剂包括脲鎓活化剂,例如0-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)、2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HATU)、1-[1-(氨基-2-乙氧基-2-氧代亚乙基氨基氧基)二甲基氨基吗啉代]脲鎓六氟磷酸盐(COMU);等等。

[0081] 如其他地方所述,肽可固定在固体支持物上。一般而言,可在本文所描述的任何添加循环中使用任何固体支持物。固体支持物材料的非限制性实例包括聚苯乙烯(例如,以树脂的形式,例如微孔聚苯乙烯树脂、中孔聚苯乙烯树脂、大孔聚苯乙烯树脂)、玻璃、多糖(例如,纤维素、琼脂糖)、聚丙烯酰胺树脂、聚乙二醇或共聚物树脂(例如,包含聚乙二醇、聚苯乙烯等)。

[0082] 固体支持物可具有任何合适的形状(form factor)。例如,固体支持物可以是珠、颗粒、纤维或以任何其他合适的形式。

[0083] 在一些实施方案中,固体支持物可以是多孔的。例如,在一些实施方案中,可将大孔材料(例如,大孔聚苯乙烯树脂)、中孔材料和/或微孔材料(例如,微孔聚苯乙烯树脂)用作固体支持物。当涉及肽合成的固体支持物使用时,术语“大孔”、“中孔”和“微孔”是本领域普通技术人员已知的并且与以与其在国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)化学术语概略,2.3.2版,2012年8月19日(非正式地称为“金色书”)中的描述相一致的方式在本文中使用。通常,微孔材料包括具有截面直径小于约2纳米之孔的那些材料。中孔材料包括具有截面直径约2纳米至约50纳米之孔的那些材料。大孔材料包括具有截面直径大于约50纳米且大到1微米之孔的那些材料。

[0084] 本文描述的发明系统和方法的一个优点是它们可与标准固体支持物材料使用而不降低性能。例如,在某些实施方案中,可使用标准的商业聚苯乙烯树脂支持物。在许多之前的系统中,当用于基于流动的固相肽合成系统中时,这种支持物坍塌,从而引起压降增加。在合成期间,随着树脂膨胀,支持物变得越来越有可能坍塌,这导致整个树脂的压降增加,从而需要提高施加的压力以保持恒定的流量。增加施加的压力可导致树脂更严重的塌陷,从而导致其中施加到流体的压力必须反复增加的正反馈效应。在足够高的压力下,可通

过任何玻璃料或用于限制其的其他系统挤出树脂。本文所描述的系统和方法可用于管理压降以使得树脂(包括标准的聚苯乙烯树脂和其他标准树脂)在合成期间不会坍塌或仅坍塌至不引起上述正反馈效应的程度,从而导致更稳定且可控的系统。在某些实施方案中,固体支持物包含在填充柱内。

[0085] 一般而言,可使用本文描述的方法和系统合成任何肽和/或蛋白质。可使用本文描述的方法和/或系统合成的肽和/或蛋白质的非限制性实例包括胰高血糖素样肽(例如, GLP-1)、艾塞那肽、利拉鲁肽、GLP-1类似物(例如,ZP10)、普兰林肽、肽YY(Peptide YY)、胰高血糖素、替度鲁肽、地米肽(Delmitide)、降钙素(例如,鲑鱼降钙素)、甲状旁腺激素、硼替佐米、西仑吉肽、亮丙瑞林、组氨瑞林、戈舍瑞林、Stimuvax、Primovax、奈西立肽、依替巴肽、比伐卢定、艾替班特、Rotigaptide、环孢菌素、MPB8298、奥曲肽、兰瑞肽、去氨加压素、赖氨酸加压素、特利加压素、催产素、阿托西班、恩夫韦地、胸腺法新、Daptamycin、Dentonin、杆菌肽、短杆菌肽、粘菌素、培西加南、奥米加南(omiganan)、卡泊芬净、米卡芬净、阿尼芬净、组胺素、乳铁蛋白、芋螺毒素、奈米非肽、利钠肽、加压素、加压素类似物(例如,Arg加压素、Lys加压素)、齐考诺肽、棘白霉素类(Echinocandins)、胸腺法新和生长激素抑制素类似物(例如,奥曲肽、兰瑞肽)。可使用本文描述的方法和系统来合成用于治疗以下疾病的肽和/或蛋白质,例如,但不限于:糖尿病、胃肠病症、骨科病症(例如,骨质疏松)、癌症、心血管疾病、免疫学疾病(例如,自身免疫性病)、肢端肥大症、遗尿、感染(例如,细菌感染、真菌感染、病毒感染)和中枢神经系统病症。

[0086] 如本文所使用的术语“肽”具有其在本领域中的普通含义并且可指通过由一个氨基羧酸分子的羧基碳与另一个氨基羧酸分子的氮原子形式上失去水而形成共价键之来自两个或更多个氨基羧酸分子(相同或不同)的酰胺。“氨基酸残基”也具有其在本领域中的普通含义并且指氨基酸(作为单个氨基酸或作为肽的一部分)在其与肽、另一个氨基酸或氨基酸残基组合之后的组合物。通常,当氨基酸与另一个氨基酸或氨基酸残基组合时,除去水,并且保留下来的氨基酸被称为氨基酸残基。术语“氨基酸”也具有其在本领域中的普通含义并且可包括蛋白质氨基酸和非蛋白质氨基酸。

[0087] 以下实施例旨在说明本发明的某些实施方案,但并非示例本发明的全部范围。

#### [0088] 实施例

[0089] 利用例如Fmoc作为保护基团的标准固相肽合成方法可能需要约60分钟至100分钟以掺入每个氨基酸残基,一些专用程序使用复杂的微波系统以将其降低至约20分钟/残基。这些实施例描述了在没有微波辐射的情况下,在手动控制下小于10分钟(例如,每五分钟、每三分钟、每两分钟)或者在自动控制下1.8分钟掺入一个氨基酸残基的流动平台的开发。

[0090] 本文所述的基于流动的平台通过采用基于流动的方法进一步加速了SPPS化学,这远远超出了被认为目前用微波辅助或其他迅速肽合成仪的可能性。除了不断供给高浓度试剂之外,基于流动的平台克服了许多可阻碍标准和微波辅助方法的显著障碍。第一,可将完全密封的反应器和热交换器浸渍在温度控制的浴中,其允许在溶剂和试剂即将到达树脂床之前以一致和可控的方式进行加热。根据某些实施方案,迅速预热对于避免试剂的热降解同时快速地达到期望的温度很重要。然而,这在分批系统中极其困难。第二,流动平台在不增加循环时间的情况下可以进行扩展。如在从第一代反应器向第二代反应器的过渡所证明的,增加直径和流量有效地增加了最大规模,而不减缓合成。第三,不需要搅拌来实现足够

的物质传递,消除了易出故障的活动部件并有利于规模扩大。第四,在没有双偶联、双去保护或偶联效率的比色测试情况下可快速地获得高品质的肽。最后,与分批合成的一般缓慢自动化相比,这种系统的自动化可以允许更快的循环时间。

[0091] 实施例1

[0092] 该实施例描述了用于迅速Fmoc固相肽合成的基于流动的平台,其中每个氨基酸添加循环在小于五分钟内完成。在该实施例中,用于氨基酸添加的每个步骤(例如,酰胺键形成、洗涤和N-末端去保护)在通过限定于小的烧结塑料管中的树脂上之恒定的流体流下进行。流动法(与常规使用的分批法相反)允许溶剂和试剂一致地迅速预热、添加和除去。溶剂和试剂一致地迅速预热、添加和除去允许5分钟循环时间,其包括30秒的酰胺键形成步骤。在没有双偶联或双去保护的情况下,制备多个模型肽。此外,获得了良好产率和高纯度,如通过液相色谱-质谱(LC-MS)所示。该方法还应用于由三个多肽区段合成的58-残基蛋白质。最长的片段(27个残基肽)在2.3小时内制备,其比常规Fmoc方法快10倍。认为使多种加工步骤自动化、增加流量、减少不必要的长洗涤时间以及使用较小纵横比的反应器将明显减少本文所报道的合成时间。

[0093] 如图2A所示,高压液相色谱法(HPLC)泵用于将哌啶去保护溶液或二甲基甲酰胺(DMF)洗涤溶剂递送至反应器。使用手动开动的3向阀来选择将哪种试剂递送至反应器。HPLC泵出口通过luerlock快速连接器(quick connect)连接至反应器。在luerlock快速连接器与反应器之间存在八英尺的1/16"OD×0.03"ID管作为热交换器或“预热回路(preheat loop)”。对于偶联步骤,将快速连接器以手动的方式移动至注射泵,其递送活化氨基酸的溶液。认为可以通过使该步骤自动化获得比本文所报道甚至更快速的性能。反应器流出液通过UV检测器以持续监测在304nm处(其中Fmoc氨基酸吸收强烈的区域)的吸光度。将反应器设计成简单且易于构建。使用具有Swagelok异径活接头(reducing union)作为入口和出口的1/4"内径×3.5"长的全氟烷氧基管。使用具有%英寸外径的一段短管将玻璃料(frit)放置在出口中。安装出口接头(fitting)并且同时压合套圈(ferrule)和管将玻璃料密封在合适位置,参见图2B。反应器的总体积为约2.5ml。这种设计容纳多达100mg的树脂并且用于制备达27个残基长度的肽。

[0094] 为了验证用这种基于流动的SPPS系统的Fmoc SPPS的可行性,使用100mg的树脂在0.1mmol规模上合成模型肽Fmoc-ALFALFA-CONH<sub>2</sub>。基于最初的估计,选择在10mL/分钟下2分钟的DMF洗涤、6mL/分钟下的2分钟Fmoc去保护步骤和另外的DMF洗涤以及在用1mL/分钟下递送的活化氨基酸进行6分钟室温偶联作为氨基酸添加循环的起始点。这个顺序使得12分钟/残基有效的肽合成。用于粗肽的反相(RP)-HPLC迹线示于图2C中。

[0095] 验证该方法之后,确定改善的洗涤步骤、Fmoc除去和偶联时间。所有随后的研究在60°C下进行以在不显著增加副产物形成的情况下减少循环时间。认为较高的温度会改善合成的结果和/或降低每个氨基酸添加循环所需的总时间。最终的合成时间线(其用于该实施例中的所有后续实验)示于图3C中。最终的合成时间线具有在10mL/分钟下的2分钟DMF洗涤、10mL/分钟下的20秒Fmoc去保护步骤、另外的2分钟DMF洗涤以及与12mL/分钟下递送的活化氨基酸的30秒偶联步骤。通过合成肽ACP(65-74)来研究该方法。该肽作为证实基于流动的SPPS平台的模型,因为认为ACP(65-74)难以制备。认为当合成较容易制备的肽时,可实现合成时间的明显减少。

[0096] 在常规系统中,ACP (65-74) 合成中的主要合成杂质是色谱法解析的Val缺失。用基于流动的SPPS平台方法合成ACP (65-74) 以及两个对照组的LCMS数据示于图4A-4D中。使用上述方案和HATU偶联剂,观察到少量的Val缺失产物。当使用HBTU时,观察到更多的Val缺失,这与先前的报道一致。用基于流动的SPPS平台但在室温下合成的ACP (65-74) 示出大量的Val和Gln缺失,从而证实温度是重要的。观察到来自室温下合成与类似分批合成的产物组分之间没有明显的差别。还合成了两种另外的“困难”肽,芋螺毒素变体和HIV-1蛋白酶的片段。LCMS数据示于图5A-5B中。观察到这两个包含半胱氨酸残基的肽在活化期间外消旋。因此,进行使用肽GCF的模型研究。在所述模型研究期间,发现产生少于1%非对映异构体的若干条件,如图6A-6E所示。该外消旋作用的水平与Fmoc方案的文献一致。

[0097] 使用半胱氨酸的改进偶联条件,在0.1mmol的规模上制备芋螺毒素变体和HIV-1蛋白酶的片段。分离出89毫克(53%)的粗芋螺毒素与90mg (43%) 的粗HIV-I蛋白酶片段。为了探究流动平台在制备合成蛋白质中的效用,制备了基于蛋白质A(称为亲和体)之Z结构域的58个残基三螺旋蛋白质。合成策略(其可见于图7A中)使用肽酰肼作为用于天然化学连接中的硫酯前体。肽酰肼可用NaNO<sub>2</sub>氧化以形成C-末端肽叠氮化物(azide),其可以与硫醇反应以形成肽硫酯。图7B-D示出用于粗合成肽的LCMS数据。还使用Boc原位中和方法制备了这些肽的变体并且发现所述肽具有相似的粗品质(图8A-8F)。保留时间漂移是由于用Boc和Fmoc策略的天然化学连接制备的肽中的不同色谱条件和轻微变化。纯化亲和体的每个肽(图9),然后合成亲和体,并且在纯化之后将高纯度、全长亲和体分离出来(图7E)。

[0098] 虽然有可能在分批模式下实现该方案,但是基于流动的平台克服了许多显著的障碍。第一,使完全密封的反应器和预热回路浸渍在温度控制的浴中,其允许试剂即将到达树脂床之前以一致和可控的方式进行加热。这在一些分批系统中是困难的。第二,低体积反应器(约2.5mL)和用于递送溶剂和试剂的窄管的使用允许仅用20mL溶剂的有效洗涤。相反地,分批模式的自动化和手动合成通常使用大体积的溶剂(每次洗涤约70mL)。第三,在没有机器或玻璃商店(glass shop)支持的情况下,流动平台由低成本的常规实验室设备组装。第四,在没有双偶联、双去保护、比色测试或树脂混合的情况下快速地获得高品质的肽。用ACP (65-74) 的研究期间,在使双偶联Val和使之前的Gln双去保护之后,没有观察到Val缺失肽的减少。这些额外的步骤通常用于分批模式合成中。最后,基于流动的SPPS系统能够通过增加反应器的直径适应于较大的合成规模。例如,反应器直径加倍并且使用完全相同的方案将所得的反应器用于在0.2mmol规模上合成ACP (65-74)。增加合成规模的另一种选择是简单地增加反应器长度。然而,该策略显著地增加了反压力(backpressure),这在合成期间可能造成困难。在该实施例中基于流动的SPPS平台允许多肽的迅速Fmoc合成。发现在60°C的流动下,酰胺键的形成和Fmoc除去是快速的(在几秒钟内)且没有随着反应时间的增加而提高。在该实施例使用基于流动的Fmoc系统,在一个工作日内就能够合成并切割三个亲和体区段。与之相比,使用优化的Boc原位中和方法生产类似肽(15分钟循环时间)需要三天以上。此外,连接纯化的肽以生成合成的蛋白质。该方法允许迅速生产高纯度、中等大小的肽,容易连接所述肽以获得更大的片段。

[0099] 实施例2

[0100] 该实施例描述了去保护步骤时间的确定。用管线内UV-Vis检测器实时监测流出液使得去保护步骤的时长减少。通过在304nm下监测反应器流出液的UV吸光度来研究Fmoc除

去的速率。为了确定稳健Fmoc除去的最小处理时间,使去保护溶液以10mL/分钟流动60秒、30秒、15秒或6秒。发现以10mL/分钟流动二十秒足够用于完全的Fmoc除去。在6秒步骤期间还获得了有效的Fmoc除去。

[0101] 在开发Na去保护方案中,选择DMF中的哌啶作为标准去封闭试剂。选择浓度为DMF中的50% (v/v) 而不是更常见的DMF中的20% (v/v),因为随着去保护溶液进入柱其被稀释。因此期望更高的浓度。将流量设定为10mL/分钟(最大) 以在最少的时间内达到有效浓度。为了确定去保护步骤的时长,用每个残基的双去保护来合成ALF肽并且在304nm处监测流出液的UV吸光度。在该波长下哌啶和DMF不能良好的吸收,但是去保护产物哌啶-DBF可以。因此,在第二次去保护之后第二个峰的存在表明最初的去保护是不充分的。在60秒、30秒和15秒的去保护之后没有观察到第二个峰,并且仅在6秒的最初去保护之后观察到非常小的峰。在所有的情况下,第一次去保护在10mL/分钟下而第二次去保护在10mL/分钟下一分钟。因为已报道Fmoc除去是序列依赖性的,因此选择最终去保护时间为20秒。然而,认为6秒去保护步骤(以及甚至更快的去保护步骤)将适用于许多肽合成方法。此外,认为通过提高去保护剂的流量和/或包含去保护剂的流的温度,可在一秒或更短的时间内实现稳健的Fmoc除去。

[0102] 必须使用双去保护方案来确定去保护时间,因为将哌啶-DBF加合物从树脂中洗掉比除去NaFmoc基团花费显著更长的时间。如果简单地监视流出液直到吸光度返回至接近基线,则大部分“去保护”时间将用于在完成去保护之后用去保护试剂洗涤树脂。

[0103] 图10示出芋螺毒素合成期间最终8个残基掺入的UV记录。负标记表示手动操作。扫描的迹线已被颜色加深并添加时间线,采用零作为迹线的开始。一个循环的标记用1来标注表示先前洗涤的结束,2表示偶联的开始,3表示偶联的结束,4表示第一次洗涤的开始,5表示第一次洗涤的结束和去保护的开始,以及6表示去保护的结束和第二次洗涤的开始。快速连接器在1与2之间和3与4之间运动。循环时间的不一致和标记的缺失是由于人为误差。

[0104] 实施例3

[0105] 该实施例描述了洗涤步骤时间的确定。用管线内的UV-Vis检测器实时监测流出液允许洗涤步骤时间的减少。通过在304nm处监测反应器流出液的UV吸光度来系统地研究洗涤步骤的效率。然后研究作为流量函数的将氨基酸从反应器中洗出所需的时间。确定了洗涤效率主要由所使用的溶剂的总体积决定,除去99%的氨基酸前体需要约16mL的DMF。然而,在大于约6mL分钟的流量下,需要稍微少量的溶剂。因此得出结论,10mL/分钟下的2分钟DMF洗涤是足够的。如果DMF洗涤没有完全除去氨基酸或去保护溶液,则理论上可发生氨基酸的双掺入,而2分钟洗涤时间没有观察到氨基酸的双掺入。增加洗涤体积没有改进粗肽品质。认为甚至可以通过例如增加流量、改变入口的几何结构以减少再循环和/或降低反应器的纵横比以观察到更快的洗涤时间。不希望受到理论约束,进一步认为在一些情况下,如果减少或消除洗涤,粗肽品质可能不会有不可接受的降低。在一些此类情况下,可以使用氨基酸添加循环,其在去保护步骤之前不会明显除去所有的活化氨基酸和/或在氨基酸偶联步骤之前不会明显除去所有的去保护试剂。

[0106] 反应器在洗涤循环期间的目测观察显示DMF洗涤溶剂和偶联溶液的再循环和混合。另一些溶剂交换显示出相同的行为。颜色和折射率的差异允许直接观察所有交换。基于这些观察,如通过持续稀释模型所预测,预期洗涤效率主要取决于所使用溶剂的体积。为了检验该理论,在一式三份合成ACP (65-74) 期间在304nm处监测反应器流出液的UV吸光度。在

每个合成期间,两个连续残基以10mL/分钟洗涤,两个以7mL分钟洗涤,两个以4mL/分钟洗涤,两个以2mL/分钟洗涤并且最后的两个以1 mL/分钟洗涤。洗涤速率被随机分配至氨基酸的单元(block),确保没有单元在相同的速率下洗涤两次。测量了每个残基检测器去饱和所需的时间。去饱和表示氨基酸浓度约99%的降低。选择这种洗涤效率是因为基本上完成了洗涤,但是检测器中空气和颗粒污染没有较低信号水平下显著。数据示于图11中。指数(参数b)显著低于负1。指数的值意味着在较高流量下需要较少的溶剂来使检测器去饱和。去饱和与流量之间的关系与所提出的持续稀释模式不一致。

[0107] 基于这些结果,选择最大流量(10mL/分钟)用于洗涤。洗涤时间设定在两分钟,其可靠地将偶联溶液的最终浓度降低至最初浓度的0.2%。这种趋势对于高达至少100mL/分钟的洗涤速率是有效的,从而导致在10秒内观察到有效的洗涤。认为甚至例如通过增加洗涤液体流量可以实现更快的洗涤时间。没有观察到双掺入(不充分洗涤的可能结果)。所使用的仪器没有提供直接的方式来监测哌啶的除去(UV吸光度与DMF在可接近波长处相似),因此将相同的洗涤循环用于第二次洗涤。如果假定以与哌啶-DVB相同的速率除去哌啶,则如图10中的UV迹线所示,两分钟洗涤是高估的必要洗涤时间。可通过明显减少洗涤步骤来减少氨基酸添加循环的总时间。

[0108] 实施例4

[0109] 该实施例描述了最小偶联时间的确定。通过合成以下两种模型肽来研究偶联时间的作用:LYRAG-CONH<sub>2</sub>和Fmoc-ALF-CONH<sub>2</sub>。对于五个氨基酸添加循环的每一个而言,将每个氨基酸偶联的标称时间在60°C下为90秒、45秒、30秒、15秒或7秒,如图3所示。对于LYRAG-CONH<sub>2</sub>而言,当将所有残基偶联7秒时,观察到Arg缺失肽的显著增加。对于Fmoc-ALF-CONH<sub>2</sub>而言,没有发现作为偶联时间函数的粗产品品质的显著差异。基于这些结果,推断30秒的偶联时间是足够的。

[0110] 从文献中通常已知,在室温下,使用HBTU作为偶联剂,酰胺键形成在小于100秒内完成99%。如果假定温度每升高10°C,用于该过程的反应速率就加倍,在60°C下,酰胺键形成将在约6秒内完成,这将显著减少氨基酸添加循环时间。因此,所有随后的偶联研究在60°C下进行以在不显著增加副产物形成的情况下使循环时间最小化。该平台的一个重要特征是能够将反应器和预热回路简单放置在温度可控的水浴中。预热回路使得试剂储存在室温下并且然后在进入反应器之前立即加热,这使得试剂的热降解最小化。

[0111] 选择LYRAG作为模型肽以确定最小偶联时间,因为可以监测精氨酸缺失。对于90秒、45秒和30秒的标称偶联时间而言,偶联溶液分别以4mL/分钟、8mL/分钟和12mL/分钟递送。该流量允许递送2mmol的氨基酸。在该系统中不能可靠地获得超过12mL/分钟的流量(虽然其他系统可被设计包括更高的流量),所以对于15秒试验而言,使用一半的偶联溶液(含1mmol氨基酸之在DMF中的2.5mL 0.4M HBTU以及0.5mL N,N-二异丙基乙胺(DIEA))。在7秒的偶联时间下,手动移动快速连接器花费的时间(5秒至6秒)是非常显著的,所以递送1.2mL的偶联溶液。该体积是预热回路的体积,所以偶联溶液直到其通过DMF洗涤从管线中清除才到达反应器。10mL/分钟的洗涤花费7.2秒清洗1.2mL,给出7秒偶联时间。在另一些操作中,将移动快速连接器的5秒添加至标称偶联时间,正如递送增加超过偶联溶液标称体积的约10%所需的时间。减去DMF洗涤溶剂和偶联溶液清洗入口管线所用的时间差。更精确的偶联时间为93秒、53秒、39秒、23秒和7秒。这不包括洗涤来自反应器的偶联溶液所需的时间。七

秒偶联示出精氨酸缺失的增加,所以选择30秒方案作为保守估计。用相同过程产生Fmoc-ALF,并且显示肽品质随着偶联时间的减少没有变化。数据示于图3中。

[0112] 认为使用自动化的系统、使用较高的流量以及使用较高的温度将明显减少偶联时间。

[0113] 实施例5

[0114] 该实施例描述了半胱氨酸外消旋作用的最小化。将肽Pn1A (A10L) 芋螺毒素、HIV-1 PR (81-99) 和GCF用于探究使半胱氨酸外消旋作用最小化的技术。

[0115] 在Pn1A (A10L) 芋螺毒素和HIV-1 PR (81-99) 的最初合成中,将半胱氨酸像所有其他氨基酸一样进行活化(1当量HBTU,2.9当量DIEA) 并且在产物中观察到显著的非对映异构的杂质。这些被确定是半胱氨酸外消旋作用的结果。为了研究减少外消旋作用的条件,选择模型系统GCF,因为外消旋作用后形成的非对映异构体由RP-HPLC解析。使用标准的合成过程,不同之处在于将偶联时间增加至60°C允许的一分钟和室温(RT)运行的6分钟。根据标准过程用一当量的HBTU (5mL, 0.4M) 和2.9当量的DIEA (1mL) 将Rink、Gly和Phe全部进行活化。对于半胱氨酸而言,如以下归纳的使用多个活化过程。对于使用小于1mL DIEA的过程而言,使用DMF代替该体积。除了以下活化方法之外,使用Fmoc-D-Cys (Trt) -OH和活化过程5生产可靠的非对映异构体。在图6中示出了4、5、6、7和可靠的非对映异构体的TIC迹线。未示出的操作视觉上与4无法区分。在所有情况中,将活化剂、添加剂和2mmol氨基酸溶解于5mL DMF中,并且根据需要另外添加DMF。在即将使用前添加碱。反应8在没有另外的活化剂、添加剂或碱的情况下采用分离的C-末端五氟苯基(Pfp)酯(Fmoc-Cys (Trt) -OPfp)。表1归纳了通过提取的离子流整合来量化的外消旋作用的结果。这使得能够量化TIC基线以下的外消旋作用。获得的结果与之前报道的一致。

[0116] 表1.反应条件和外消旋作用的结果

反应	活化剂	添加剂	碱	温度	外消旋作用
[0117]	1 HBTU (1当量)	无	DIEA (2.9当量)	60℃	10%
	2 HBTU (1当量)	HOBt (1当量)	DIEA (2.9当量)	60℃	18%
	3 HBTU (1当量)	无	DIEA (2.9当量)	Cys 室温 G 和 F 60℃	11%
	4 HBTU (1当量)	无	DIEA (2.9当量)	室温	10%
	5 HBTU (1当量)	无	DIEA (0.9当量)	60℃	1%
	6 HBTU (1当量)	HOBt (1当量)	DIEA (0.9当量)	60℃	1%
	7 DCC (0.9当量)	HOBt (1.1当量)	无	60℃	1%
	8 OPfp	无	无	60℃	1%

[0118] 图6A-6E示出用多种半胱氨酸活化方案产生的GCF。A和B中期望产物与非对映异构体之间洗脱的峰是C-末端甲酰胺的水解。非对映异构体几乎不可见。条件列于表1中。图6A-D中的条件示出反应(a) 5、(b) 7、(c) 8、(d) 4和(e) 可靠的Gly-D-Cys-L-Phe的色谱图。每个色谱图中均显示了总离子流。

[0119] 实施例6

[0120] 该实施例描述了亲和体的合成。在整个本部分中,连接缓冲液是指特定pH下的6M GnHCl、0.2M磷酸钠缓冲液;缓冲液P是pH=7.5下的20mM Tris,150mM NaCl溶液。

[0121] 使用氧化化学将三个片段连接成合成的58个残基的蛋白质。发现噻唑烷(thiazolidine)在所使用的条件中不稳定,所以通过在pH=4下用5mL连接缓冲液中的83mg甲氧基胺盐酸盐过夜处理将9.6mg的片段Thz-[28-39]-CONHNH<sub>2</sub>转变成游离的N-末端半胱氨酸。观察到定量转变。使用图5A中所示的N-至-C组装代替直接接近硫酯时所使用的C-至-N合成。在pH=3和0℃下通过将0.1mL的200mM水性NaNO<sub>2</sub>逐滴添加至含11mg纯化的片段[1-27]CONHNH<sub>2</sub>之1mL连接缓冲液的溶液使片段[1-27]-CONHNH<sub>2</sub>氧化成C-末端叠氮化物。在0℃下将反应进行20分钟并且然后通过添加溶解于4.4mL连接缓冲液(pH=7,室温(RT))中的172mg 4-巯基苯乙酸(MPAA)和34mg三(2-羧乙基)膦·HCl(TCEP·HCl)来猝灭。向所得的硫酯添加3.4mL粗甲氧基胺处理的片段Thz-[28-39]-CONHNH<sub>2</sub>。在两小时RT连接之后,一半的粗反应混合物通过RP-HPLC来纯化,并且回收了2mg的高纯材料。其中,0.6mg在0℃下被溶解

在0.1mL连接缓冲液中并逐滴添加0.01mL的200mM水性NaNO<sub>2</sub>而氧化。将反应进行26分钟并且然后通过添加溶解在0.1mL连接缓冲液(pH=7, RT)中的3.1mg MPAA和0.78mg TCEP • HCl来猝灭。将pH调节至7并且向反应混合物添加0.3mg的片段Cys-[40-58]-CONH<sub>2</sub>。两小时室温连接之后,将混合物用0.21mL缓冲液P稀释然后进一步用0.63mL缓冲液P稀释以折叠所得的亲和体。粗混合物在3kDa膜之上浓缩成0.075mL的最终体积。粗的经折叠蛋白质用3mL缓冲液P中的36mg TCEP • HCl稀释并纯化至均一(图9)。

[0122] 图9A-9E示出了纯化的亲和体合成中间体和最终产物的LC-MS色谱图。图9A-9E是(a)片段[1-27]CONHNH<sub>2</sub>、(b)片段Thz-[28-39]-CONHNH<sub>2</sub>、(c)片段Cys-[40-58]-CONH<sub>2</sub>、(d)连接片段[1-39]-CONHNH<sub>2</sub>和(e)最终的亲和体的色谱图。

[0123] 比较实施例6

[0124] 该实施例描述了使用常规手动Boc原位中和方法合成亲和体。

[0125] 使用手动Boc原位中和方法合成比较的亲和体片段。这些粗肽的LC-MS数据示于图8A-8F中,紧邻在基于流动的SPPS平台上合成的粗肽。在所有情况中,品质是可比较的。保留时间漂移是由于色谱条件的改变和制备的用于用Boc和Fmoc策略连接的稍微不同的肽。

[0126] 实施例7

[0127] 该实施例描述了用于基于流动的SPPS系统的设计。在整个该实施例中,所述系统是指作为合成仪。合成仪的一个示意图示于图2A中。HPLC泵用于递送甲醇清洗溶剂以在使用之后洗涤泵压头(pump head)、反应器和UV检测器;DMF洗涤溶剂用于除去合成期间的试剂和副产物;或者含50% (v/v) 呲啶的DMF用于N-末端的去保护。阀1和阀2的位置决定递送哪个流体。注射泵用于递送偶联溶液。为了在注射泵与HPLC泵之间切换,以手动的方式将快速连接器从HPLC泵的出口移动至注射泵上的注射器。因为注射泵与阀之间的管线将保留偶联溶液,所以阀通常是无效的,从而引起下一个循环中不正确的掺入。将柱和1.2mL预热回路(未示出)浸没在水浴中以维持恒定的60°C。阀3和阀4选择高压旁路回路用于当UV检测器被沉淀物(例如半胱氨酸外消旋作用研究期间所遇到的DCC活化的尿素副产物)阻塞时清洗UV检测器。所述回路还用于净化管线中没有柱的检测器。

[0128] 将Varian Prostar 210 HPLC泵、KD Scientific KDS200注射泵、设定为304nm的Varian Prostar 320UV检测器、Amersham Pharmacia Biotech图表记录仪和VWR 39032-214水浴用于合成仪中。HPLC泵递送约95%的标称流量。将一次性10mL注射器(BD 309604)用于递送偶联溶液。阀1是Swagelok 1/8"3向阀(S5-41GXS2)。所述系统中的其他阀是Swagelok 1/16"3向阀(SS-41GXS1)。通过阀1直至阀2的甲醇、DMF和50% (v/v) 呲啶管线是1/8"OD, 1/16"ID FEP (Idex 1521)。阀3与阀4之间的管线是1/16"OD, 0.010"ID peek (Idex 1531)。所有其他管线是1/16"OD, 0.030"ID PFA (Idex 1514L)。为了将1/8"洗涤和去保护管线连接至阀2的1/16"入口, 使用Swagelok 1/8"至1/16" (SS-200-6-1) 异径活接头, 随后使用短段的1/16"管。除了快速连接器与反应器之间的管, 使所有长度最小化。这包括2.6m (1.2mL) 线圈(coil), 其与反应器一起浸没并且作为预热回路以确保反应物在到达反应器之前为60°C。当不得不连接管时, 使用Swagelok 1/16"活接头(SS-100-6)。将这些用于连接预热回路, 将柱的出口与来自阀4的管线连接并且修复受损的旁路回路(severed bypass loop)。手动改变的快速连接器是10-32凹型HPLC接头(fitting)的凹型鲁尔接口(1uer) (Idex P-659)。其直接连接至注射泵上的注射器或者连接至来自阀3管线上10-32凹型接头

的相配的凸型鲁尔接口 (Index P-656)。UV检测器与图表记录仪之间的连接是数据链路 (data link) (三个18ga绝缘的铜线)。

[0129] 图2B示出了反应器组件。反应器由在每端具有标准压力接头 (3/8"至1/16"异径活接头) 的管组成。在下游端还存在玻璃料。这通过设计成安装在反应器内部并抵靠在那个端部上之接头底部的支持物定位。使用多种玻璃料孔隙率。下面的零件编号为最常用的20微米的玻璃料。主体是3.5英寸PFA管段, 外径为3/8"并且内径为1/4"。玻璃料是1/4"烧结的不锈钢盘, 1/16"厚。玻璃料支持物是0.5"长度的1/4"OD PTFE管。当上紧接头时, 螺母将套圈压向接头主体, 将反应器主体密封至接头主体。这还将反应器主体压向玻璃料, 从而形成针对玻璃料的内部密封。反应器主体和玻璃料购自McMaster-Carr, 零件编号分别为S1805K73和94461314。螺母、套圈和接头主体以一套来自Swagelok零件编号为SS-600-6-1的1/16"螺母和套圈可得。替换套圈以SS-600-SET可得。通过将主体和玻璃料支持物首先切割成确保端部是正方形的长度来组装反应器。锋利刀片和稳定的手用于这些操作。接下来, 组装出口 (下游) 端。将玻璃料放置在实心、干净的表面上并且将反应器主体压在其上。在验证玻璃料是正方形并与反应器端部平齐之后, 将玻璃料支持物稍微推动, 从而将玻璃料向上推向其最终位置。将反应器主体稳固放置在接头主体中迫使玻璃料至其最终位置。验证玻璃料是正方形并适当地定位在套圈下, 然后根据制造商的说明书安装接头。一旦被密封, 就不能除去和重新放置玻璃料。最后, 根据制造商的说明书安装入口接头。还建造了具有不锈钢主体的高压反应器。在该情况中, 下游接头不得不被很好地远远超出规范地上紧以影响用玻璃料的密封。通常每3至8个合成中替换反应器。当替换反应器时, 不重复使用套圈、玻璃料和反应器主体。重复使用所有其他的零件。通过将反应器主体切成两半来回收螺母。

[0130] 为了装载反应器, 除去上游接头主体并且用吸移管加入甲醇中的树脂浆料。完全用甲醇填充反应器并且重新安装接头主体。入口管线和预热回路通过将其连接至快速连接器和在将其连接至反应器之前运行HPLC泵来用溶剂填充。然后将反应器在水浴中保持垂直以使得任何小气泡将移动至顶部而不干扰树脂的润湿。在第一次偶联之前, 将树脂用DMF以10ml/分钟洗涤两分钟。

### [0131] 实施例8

[0132] 该实施例描述了用于实施例10至11和13至17中基于流动的SPPS的大规模反应器的设计, 其允许更快的循环时间并增加合成规模。在整个实施例中, 不同于实施例7中所述的“第一代”反应器, 该反应器被称作“第二代”反应器。

[0133] 图12示出更大的反应器。将用于将实施例1至7中所有合成的小规模反应器 (即第一代反应器) 的设计原理直接转变为更大的规模。然而, 为了保存可比较的循环, 反应器的体积必须恒定。当规模增大至5/8"OD、1/2"ID管时遇到两个问题。第一, 没有标准5/8"至1/16"的压合接头 (compression fitting)。第二, 5/8"接头之间的最小距离相当大, 意味着存在大的最小体积。为了克服第一个问题, 使用5/8"至3/8"接头, 随后使用3/8"至1/16"接头, 但是这需要连接长度为3/8"的管, 这大大增加了反应器已有的大体积。

[0134] 为了减小反应器体积, 机械加工316SS插入件 (insert), 所述插入件由标称1/2"OD段和随后具有1/4"通孔的3/8"OD段组成。将5/8"至3/8"异径活接头镗孔以得到3/8"通孔, 放置插入件并且将3/8"套圈套 (swage) 在其上。在这之后, 不能将插入件与接头分离。当安装时, 该插入件接头的1/2"零件位于反应器的顶部中并限制体积。

[0135] 这是有效的,但是仍然存在来自1/4"通孔的大体积。通过插入1/4"OD、1/8"ID PFA管并将其切割平齐来减小该体积。为了进一步减小体积,通过将管的一部分加热并拉伸成较窄的直径来插入1/8"OD、1/16"IDPFA管、将其贯穿和拉出直到插入件中的所有管具有合适的直径。所述管的两侧均被切割平齐并且丢弃拉伸的部分。将3/8"至1/16"异径活接头安装在3/8"段的开口端上以与系统的其余部分联系。该插入接头在图12的A(左面)中示出。为了防止上游插入接头像玻璃料一样永久地被密封在管中,将标称1/2"段机械加工成0.496"并进行抛光。

[0136] 将相似件机械加工用于出口侧,具有1/2"段,该长度合适地位于套圈下的玻璃料。为了防止所有溶剂被强迫通过玻璃料的小中心段,以3/8"直径阶梯切割0.05"深。该阶梯的底部递变成与水平线31°的1/8"通孔(标准钻头锥)。插入1/8"OD、1/16"ID PFA管以进一步限制体积。出口插入件的1/2"段位于玻璃料并位于远低于套圈位置处,所以标准的磨光(finish)是足够的。图12的A中所示的一个是PTFE并且以与上游插入件完全相同的方式安装在穿过5/8"至3/8"异径活接头的膛中。包括图12的F所示剖面中的一个的随后反应器使用不锈钢出口插入件。将3/8"至1/16"异径活接头安装在3/8"段的开口端以与系统的其余部分联系。

[0137] 管用于限制插入件的内部体积,而不是直接制造具有小孔的插入件以简化制造。

[0138] 为了组装反应器,压入玻璃料并且安装的下游插入接头作为规则接头。然后安装上游插入接头作为规则接头。尽管将其切割得尺寸过小并抛光,但是上游插入接头非常紧并且难以除去。对于随后的反应器,将图12的B中所示的铝垫片用于使反应器具有一致的体积。垫片将内部体积设定为2mL并且使得能够可重现地组装反应器。此外,垫片有助于在合成之后除去入口插入接头。垫片防止螺母向下移动并且转动螺母时代替推出的插入接头。将垂直窗口添加至垫片以维持充足的光进入。组装的大反应器的图片示于图12的D中。

[0139] 为了装载反应器,除去入口插入接头,干燥的情况下添加树脂并且用甲醇填充反应器。然后将入口插入接头连接至热交换器并用甲醇清洗。在不将其从热交换器中除去的情况下,安装经清洗的入口插入接头,从而引起过量的甲醇通过出口插入接头从反应器排出。如果存在大的气泡,则将反应器颠倒(入口在出口下面)并清洗。如果这样没有逐出气泡,则对反应器进行拆卸并重复装载过程。为了在合成之后除去树脂,将用10mL空气填充的注射器连接至热交换器入口上的luer-lock快速连接器(其中连接试剂注射器)并用于递送空气。这样将溶剂从热交换器、反应器和洗涤管线中除去。然后将热交换器和洗涤管线与反应器断开连接并除去入口插入接头。树脂悬浮于DCM中并且倾析(decant)入烧结的注射器(Toviq)中,用DCM洗涤四次并且立即切割或者在减压下干燥用于储存。

[0140] 实施例9

[0141] 该实施例描述了用于降低第一代反应器压力的技术。压降固有地由树脂引起。通过采用高压流动之后的休息时段或者使用大的反应器克服压降。

[0142] 使用低压聚合物反应器,所以设定HPLC泵上的过压警报为在240psi下关掉所述泵,其偶尔被触发。当触发警报时,允许系统休息30秒并且重新启动泵而无其他事件。在该休息阶段期间,树脂明显膨胀。通过观察HPLC泵压力,推断如果向珠施加太多的压力,则其开始压紧。这增加了整个床的压降和压紧速率,其快速触发了过压警报。来自Bio-Rad可用于凝胶渗透色谱法的类似1%二乙烯苯交联的聚苯乙烯树脂被推荐仅用于重力驱动分离,

因为其一旦溶胀将非常软。

[0143] 当在这种情况下立即拆卸反应器时,树脂看起来像实心块并且当用移液管尖端探测时,觉得像硬物质。难以直接将其移液管移出。在几十秒之后,树脂松弛并可以移液管移出。建造并测试高压不锈钢反应器,但是维持高流动通过压紧床所需的非常高的压力(>1000psi)令人联想到之前受困于通过玻璃料挤出树脂的持续流动SPPS。

[0144] 认为最初的压紧发生在玻璃料与树脂的边界处,以使得所述树脂能够在相对小的变形下机械地封闭一层(course)玻璃料的孔。为了测试这个理论,将最初的40微米玻璃料用20微米玻璃料代替,并且在更多限制的试验中,用10微米玻璃料和2微米玻璃料代替。较小的孔没有消除该问题,但是似乎定性地降低了其严重性。由此推断该问题是树脂中固有的,并且仅可以通过在较低流量下运行或通过降低床的高度(使用较小规模和/或较大规模的反应器)来消除。

[0145] 已经报道了更硬、更加高度交联的树脂的用途,但是所得的肽具有差的品质。本文使用的溶液在高压的情况下等待30秒。这是有效的并且有利的,在不进一步最优化反应器尺寸下允许在合理规模上进展。(实施例8描述的)1/2" ID反应器的试验示出在相同循环下操作,有达200mg的树脂没有过压。

[0146] 为了克服这些问题,加速合成并增加合成规模,构建实施例8所述的大规模反应器。

[0147] 实施例10

[0148] 该实施例描述了在六分钟内制备ALFALFA-CONHNH<sub>2</sub>。将用于之前实施例的HPLC泵的高容量泵压头用于在洗涤步骤期间递送100ml/分钟的DMF,在去保护步骤期间递送100ml/分钟的DMF中的50%哌啶以及在偶联步骤期间递送12ml/分钟的活化氨基酸。反应器和预热回路通过浸没在水浴中维持在60°C。

[0149] 构建图13所示的仪器。储存器1容纳活化的丙氨酸,储存器2容纳活化的亮氨酸,储存器3容纳活化的苯丙氨酸,储存器4容纳DMF中的50%哌啶以及储存器5容纳DMF。通过将DMF中的50ml 0.4M HBTU与20mmol Fmoc保护的氨基酸组合来制备每个活化氨基酸。即将开始运行之前,将10mL的DIEA添加至每个氨基酸储存器。为了获得期望的流量,向每个储存器施加1.5bar的氮气压头(nitrogen head pressure)。泵上游的所有管都是1/8"OD、1/16" ID PFA。三向阀是Swagelok 1/8"三向阀。将三向阀的常规管线引导至转换阀(Valco C25-6180),所述转换阀在试剂之间选择。所有阀都手动控制。所述泵是具有100ml/分钟泵压头的Varian Prostar 210。预热回路是1.8m的1/16"OD、0.030" ID PFA管。所使用的反应器是图12所示和实施例8所述的较大反应器。所述反应器包含120mg氯三苯甲基酰肼官能化的聚苯乙烯树脂,其是使用本领域普通技术人员已知的标准方法由商业氯三苯甲基氯化物树脂制备的。使用较大的反应器有助于在100ml/分钟下维持可管理的压降。

[0150] 如下进行一个合成循环。以12ml/分钟进行第一个20秒偶联。将多点阀设定为期望的氨基酸并且将三向阀设定为氨基酸。所有其他三向阀设定为DMF。在二十秒之后,所选择的三向阀从氨基酸转换至DMF并且将泵流量设定为100ml/分钟。在五秒之后,将多点阀转换成哌啶。在另一个五秒之后,所选择的三向阀从DMF转换至哌啶。在10秒之后,所选择的三向阀被转换回DMF。在五秒之后,将多点阀移动至下一个期望的氨基酸。在另一个五秒之后,将流量降至12ml/分钟并且所选择的三向阀从DMF转换至下一个期望的氨基酸,开始下一个循

环。每个步骤的总时间如下：20秒偶联、10秒洗涤、10秒去保护和10秒洗涤。每个循环的总时间是50秒。图14示出了粗材料的LC-MS分析的总离子色谱图。

[0151] 所有上述所列的时间被认为是获得99%+产率所需时间的保守估计。现在已知在20ml/分钟的流量下,去保护在5秒内结束,并且期望在100ml/分钟下,去保护明显需要小于5秒。较长的肽(例如常规模型肽ACP (65-74))可例如通过整合另外的3向阀来制备。预期该实施例中所述的一般策略对于任何肽(包括使用实施例1所述的循环生产的那些)的产生是可行的。

[0152] 实施例11

[0153] 该实施例描述了改进的合成方案,其中明显减少了合成时间(相对于实施例1)。该实施例中合成的循环时间小于3分钟。为了减少相对于实施例1的循环时间,调整了洗涤步骤。泵上游的所有管都被1/8" OD 1/16" ID PFA代替,并且所述泵上游的两个阀被1/8" Swagelok三向阀代替。除了预热回路,使所有管长度最小化,并且使用实施例8所述的反应器。所有其他系统的组件相对于实施例1基本上没有改变。除非以下明确指出,否则所有过程相对于实施例1保持相同。

[0154] 将较大的管和高容量泵压头(最大50ml/分钟)用于以20ml/分钟递送DMF和去保护试剂。基于图11预期的,证实在20ml/分钟下一分钟洗涤在所有情况下是足够的。此外,5秒去保护步骤被发现在这些流量下是足够的。偶联步骤未改变。根据进行手动步骤的速度,这样产生的总循环时间为2分钟35秒至约2分钟和50秒。将洗涤设定在20ml分钟下而不是最大的50ml分钟,因为大多数使用者在较高的流量下难以手动操作所述系统。预期自动化可用于克服这种人类的限制并且允许用足够大的泵实施约10秒/残基的循环。

[0155] 图15示出了使用该循环制备的肽的两个色谱图。在每个情况下,主峰是期望的产物。这些是这种长度肽的典型结果。

[0156] 实施例12

[0157] 该实施例更加详细地描述了实施例1至11和实施例13至18所使用的材料以及实施例1至11所使用的方法。

[0158] 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)、2-(7-氮杂-1H苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HATU)、羟基苯并三唑(HOBT)和N<sub>α</sub>-Fmoc保护的氨基酸来自Chem-Impex International, IL, NovaBioChem, Darmstadt, 德国和Peptide Institute, 日本。4-甲基二苯甲基胺官能化的交联聚苯乙烯(MBHA树脂)和对-苯氧基苄基醇官能化的交联聚苯乙烯(Wang树脂)来自Anaspec, CA。N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷(DCM)、二乙醚、甲醇(MeOH)以及HPLC-级乙腈来自VWR, PA。三异丙基硅烷(TIPS)和1,2乙烷二硫醇来自Alfa Aeser, MA。三氟乙酸(TFA)购自NuGenTec, CA, Halocarbon, NJ和Sigma-Aldrich, MO。用于LC-MS的溶剂购自TJ Baker和Fluka。所有的其他试剂购自Sigma-Aldrich, MO。

[0159] 贯穿这些实验中所使用的常规溶剂混合物为：水中的0.1% (v/v) TFA (A)、水中的0.1% (v/v) 甲酸(A')、乙腈中的0.1% (v/v) TFA (B) 和乙腈中的0.1% (v/v) 甲酸(B')。

[0160] 除了图4D中的ACP (65-74) 批次,在基于流动的SPPS系统上合成所有肽。除了图4D和4C中RT的ACP (65-74) 批次和ACP (65-74) 流,在60°C下合成所有肽,以及在即将使用之前通过预热回路预热的试剂(参见合成仪设计)。一个合成循环由氨基酸暴露步骤(例如,酰胺

键形成,也称作实施例中的偶联)、氨基酸除去步骤(例如,偶联试剂的除去,也称作实施例中的洗涤步骤)、去保护剂暴露步骤(例如,NaFmoc除去,也称作实施例中的去保护)和去保护试剂除去步骤(例如,去保护试剂和反应产物、哌啶-二苯并富烯(哌啶-DBF)的除去,也称作实施例中的洗涤)组成。

[0161] 除非另有说明,否则在实施例1至7中的偶联通过将以下偶联溶液以12mL/分钟(大约30秒)递送来进行。活化的偶联溶液由溶解于DMF中之5mL 0.4M HBTU和1mL DIEA中的2mmol的Na-Fmoc和侧链保护的氨基酸组成。将半胱氨酸溶解于DMF中之5mL 0.4M HBTU、0.687mL纯DMF和0.313mL DIEA中。在这两种情况中,将氨基酸在使用之前溶解在HBTU溶液中达数小时,并且在使用的两分钟内添加DIEA。体积测量在RT(20°C)下进行。通过在上述溶液中用HATU代替HBTU来合成图4A中所示的ACP(65-74)。

[0162] 接下来,将偶联溶液用以10mL/分钟递送超过2分钟的20mL的DMF来除去并且然后将Na-Fmoc保护基团用以10mL/分钟递送超过20秒之3.3mL的DMF中的50%(v/v)哌啶来除去。过量的哌啶和哌啶-DBF用以10mL/分钟递送超过2分钟的20mL的DMF来除去以完成一个循环。

[0163] 在100mg的1%二乙烯苯交联的聚苯乙烯树脂上合成所有肽。为了产生C-末端甲酰胺肽,使用具有载荷为1mmol/克的MBHA官能化的树脂,并且偶联的第一个残基是TFA不稳定Rink连接臂(Rink linker)。为了产生用于连接的C-末端酰肼肽,使用如下官能化的Wang树脂。载荷为0.6mmol/g(0.06mmol规模)。

[0164] 通过用TFA中之2.5%(v/v)水和2.5%(v/v)TIPS处理两个小时从树脂切割不包含半胱氨酸的甲酰胺肽并且对其侧链去保护。用TFA中之2.5%(v/v)EDT、2.5%(v/v)TIPS和1%(v/v)水两个小时从树脂切割包含半胱氨酸的甲酰胺肽并且对其侧链去保护。用TFA中之5%(v/v)EDT、5%(v/v)TIPS和2.5%(v/v)水切割酰肼肽两个小时。在所有情况中,除去树脂并将压缩空气用于蒸发切割溶液以在RT下干燥。用冷的二乙醚洗涤三次所得的固体,溶解于50%A/50%B(v/v)中并冻干。侧链保护如下:Arg(Pbf)、Tyr(tBu)、Lys(Boc)、Asp(OtBu)、Gln(Trt)、Ser(tBu)、His(Trt)、Asn(Trt)、Trp(Boc)、Glu(OtBu)、Thr(tBu)、Cys(Trt)。

[0165] Wang树脂如下进行官能化:将5.47g Wang树脂添加至500mL的圆底烧瓶并悬浮于98mL的DCM和1.12mL的N-甲基吗啉中。将其在冰浴中搅拌5分钟并且添加2.03g对硝基苯酚氯甲酸酯粉末。将该混合物搅拌8.5小时。不补充浴中的冰,这使得反应缓慢地到达RT。过滤混合物并用DCM、DMF、MeOH和DCM洗涤固体以得到白色树脂。将所得的树脂置于冰浴中干净的500mL圆底烧瓶中,并悬浮于预冷冻至0°C的210mL DMF、54mL DCM和1.1mL酰肼一水合物的制备混合物中。这得到亮黄色溶液。反应在允许融化的冰浴中进行18小时。然后过滤混合物并且如前述洗涤固体以得到酰肼官能化的Wang树脂。

[0166] 在如下所示的四个条件之下,将所有肽在Agilent 6520 Accurate Mass Q-TOF LC-MS上进行分析。条件1:使用Agilent C3 Zorbax SB柱(2.1mm×150mm,5μm填充)(条件1)。流量为0.4mL/分钟的下列梯度:具有1%B'的A'保持3分钟,1%~61%B'线性增加超过15分钟和61%B'保持4分钟。条件2:对于GCF和LYRAG以及其他肽,使用Agilent C18Zorbax SB柱(2.1mm×250mm,5μm填充)。流量为0.4mL/分钟的以下梯度:具有1%B'的A'保持5分钟,1%~61%B'线性增加超过15分钟并且61%B'保持4分钟。条件3:使用Agilent C3 Zorbax

SB柱(2.1mm×150mm,5μm填充)以及流量为0.8mL/分钟的以下梯度:具有5%B'的A'保持3分钟,5%–65%B,线性增加超过9分钟并且65%B'保持1分钟。条件4:使用Agilent C3 Zorbax SB柱(2.1×150mm,5μm填充)以及流量为0.4mL/分钟的以下梯度:具有5%B'的A'保持3分钟,5%–95%B'线性增加超过15分钟并且95%B'保持4分钟。除非指出,否则肽在条件1下分析。偶联时间研究中使用的LYRAG和半胱氨酸活化研究中使用的GCF在条件2下进行分析。图23的C、21的A–B、20和17中的肽在条件3下进行分析。图23的E、22和21的C中的肽在条件4下进行分析。所有色谱图中均显示了总离子流。

[0167] 如下对肽进行纯化。粗肽溶解在95%A/5%B(v/v)中并在具有Agilent Zorbax SB C18柱(21.2mm×250mm,7μm填充)、线性梯度为A中之5%–45%的B超过80分钟和流量为10mL/分钟的Waters制备型HPLC上纯化。粗亲和体片段1–39连接产物在具有Zorbax C18柱(9.4mm×250 mm,5μm填充)、线性梯度为A中之10%至55%的B超过90分钟和流量为5mL分钟的Beckman System Gold半制备型HPLC上纯化。最终的亲和体使用Jupiter C18柱(4.6mm×250 mm,5μm填充)和流量为2.3mL/分钟下在具有相同梯度的相同系统上纯化。

[0168] 对于所有纯化,收集一分钟级分并使用2μL用2μL的50%A'/50%B'(v/v)共结晶的级分在PerSpective Biosystems Voyager-DE MALDI-TOF上筛选正确的物质,所述2μL的50%A'/50%B'(v/v)用α-氰基-4-羟基肉桂酸基质饱和。合并的级分的纯度通过上述LC-MS来证实。

[0169] 如下量化UV检测器响应。为了理解所产生的UV迹线和其呈现的洗涤效率,量化UV检测器的响应。为了确定UV迹线中氨基酸近似的浓度,制备一系列稀释的Fmoc-Ala-OH偶联溶液。氨基酸最初的浓度为约0.3M(在6.5mL总体积中2mmol),制备10×、100×、1000×、10,000和100,000×稀释标准物并且直接注射入UV检测器。100x稀释( $3 \times 10^{-3}$ M)刚刚低于饱和。10,000×稀释( $3 \times 10^{-5}$ M)标准物刚刚高于基线,如预期的,约1%的规模。100,000x稀释低于检测极限。高度可重现的洗去迹线(图10)显示这代表了所有氨基酸(如果吸光度极大地不同,则将定性地预期循环之间的不同迹线)。

[0170] 实施例13

[0171] 该实施例描述了用第二代反应器合成肽的一般条件。该方法足够稳健,使得在没有UV监测反应器流出液的情况下合成所有这些肽。

[0172] 增加反应器的直径降低了反压力,并且维持了可比较的体积,允许使用与第一代反应器相同体积的溶剂和试剂。第二代反应器适合达200mg的树脂并适合达100mL/分钟的流量。不使用更多的树脂,因为选择的树脂随着所述肽的加长而溶胀并且限制体积的插入件将树脂的溶胀体积限定为2mL。没有测试更高的流量,但是所观察到的反压力表明可以获得更高的流量。

[0173] 用第二代反应器,通过在更高流量下洗涤来减少循环时间。如预期的,所需的洗涤时间随着流量的增加继续减少,99%的氨基酸在20mL/分钟下在36秒内除去并且在40mL/分钟下在20秒内除去。然而,为了适应手动操作并允许操作者有足够的时间制备每个后续的氨基酸,使用20mL/分钟的一分钟洗涤或40mL/分钟的30秒洗涤。

[0174] 使用实施例8中所述的第二代反应器和实施例1所述的合成仪在60°C于该实施例所述的条件下合成图16的A–B、17、18的A–B、19的A–C、20、21、22的A和24的A中的肽,其中在即将使用之前通过水浴中管的线圈加热试剂。如下但是在室温下合成图16的C所示的ACP

(65-74) 以及在标准玻璃反应器中合成图16的D所示的ACP (65-74)。在所有情况下,一个合成循环由酰胺键形成(偶联)、偶联剂的除去(洗涤)、NaFmoc除去(去保护)以及去保护试剂和反应产物、哌啶-二苯并富烯(哌啶-DBF)的除去(洗涤)组成。

[0175] 除非另外说明,否则通过以6mL/分钟递送以下偶联溶液(持续约30秒)来进行偶联。偶联溶液由溶解在DMF中之2.5mL的0.4M HBTU和0.5mL的DIEA中的1mmol的Na-Fmoc和侧链保护的氨基酸组成。将半胱氨酸溶解在DMF中之2.5mL 0.4M HBTU和0.157mL DIEA中。在这两种情况下,将氨基酸在使用之前溶解在HBTU溶液中达数小时并且在使用的两分钟内添加DIEA。在RT (18°C至20°C)下进行体积测量。图16的A所示的ACP (65-74) 和图17中的蛋白酶位点通过在上述溶液中用HATU代替HBTU来合成。接下来,偶联溶液用20mL以20mL/分钟递送超过1分钟的DMF来除去并且然后Na-Fmoc保护基团用以20mL/分钟递送超过20秒的DMF中之6.6mL的50% (v/v) 哌啶来除去。过量的哌啶和哌啶-DBF用20mL以20mL/分钟递送超过1分钟的DMF来除去以完成一个循环。肽在1%二乙烯苯交联的聚苯乙烯树脂上合成。为了产生C-末端甲酰胺肽,使用175mg的MBHA官能化的树脂,所述树脂规定的载荷为1mmol/克,并且偶联TFA不稳定的Rink连接臂作为第一个氨基酸。为了产生C-末端酰肼肽,使用200mg如下制备的氯三苯甲基酰肼(酰肼)树脂。

[0176] 通过用TFA中之2.5% (v/v) 水和2.5% (v/v) TIPS在RT下处理两个小时从树脂切割不包含半胱氨酸的肽并且对其侧链去保护。用TFA中之2.5% (v/v) EDT、2.5% (v/v) 水和1% (v/v) TIPS在RT下两个小时从树脂切割包含半胱氨酸的肽并且对其侧链去保护。在所有情况下,除去树脂并将氮气用于蒸发切割溶液以在RT下干燥。将所得的固体用冷的二乙醚洗涤三次,溶解于50% A/50% B (v/v) 中并冻干。侧链保护如下:Arg (Pbf)、Tyr (tBu)、Iys (Boc)、Asp (OtBu)、Gln (Trt)、Ser (tBu)、His (Trt)、Asn (Trt)、Trp (Boc)、Glu (OtBu)、Thr (tBu)、Cys (Trt)。

[0177] 对于第二代反应器进行的研究,将不同的树脂用于生成C-末端酰肼,因为上述所使用的Wang树脂被发现促进了甘氨酸显著的双掺入。我们不能解决该问题,所以只能改变树脂。如下产生酰肼树脂:将16克的规定载荷为1.2mmol/克的氯三苯甲基氯化物树脂悬浮于150mL的干燥、无胺的DMF中并搅拌15分钟。向其中逐滴添加25mLDIEA、50mLDMF和10mL无水酰肼的悬浮液。在添加期间,形成两个层并首先添加底部。在添加完成之后,将混合物搅拌一个小时并且然后用50mL的甲醇猝灭。除去树脂并用五份各自100mL的DMF、水、DMF、甲醇和二乙醚(总洗涤体积为2.5L)洗涤。然后将树脂在减压( $\approx$ 5托)下干燥三个小时,导致具有块的自由流动的粉末。所述块在使用之前被轻轻破碎,注意不要产生会阻塞反应器玻璃料的细粉。

[0178] 图16的A-D示出了在以下条件下用第二代方案合成的ACP (65-74) 的粗LCMS色谱图:(A) 60°C 使用HATU作为活化剂,(B) 60°C 使用HBTU作为活化剂,(C) 室温使用HBTU作为活化剂,以及(D) 室温使用可比较的手动分批方法的合成。为了比较,图16的E-H示出了在可比较的条件下用第一代反应器和如下方案合成的ACP (65-74) :(E) 60°C 使用HATU作为活化剂,(F) 60°C 使用HBTU作为活化剂,(G) 室温使用HBTU作为活化剂,以及(H) 室温使用可比较的手动分批方法。在每个色谱图中都显示了总离子流。

[0179] 实施例14

[0180] 该实施例比较了使用图12的G中的合成时间线在第二代反应器中合成ACP (65-

74)、芋螺毒素、HIV-1蛋白酶片段和亲和体片段与在实施例1、5和6所述的第一代反应器中合成ACP (65-74)、芋螺毒素、HIV-1蛋白酶片段和亲和体片段。第二代反应器中形成的肽具有与第一代反应器中合成肽可比较的品质。

[0181] 为了比较第一代与第二代合成方案和反应器的性能,用第二代反应器合成ACP (65-74) 并用HATU活化、HBTU活化和在室温下用HBTU活化循环。为了比较,重现图4中的数据并重复加速的室温分批实验。HBTU和HATU的标准第二代合成比第一代合成稍差,但是第二代RT对照组显著较少共洗脱Gln缺失产物。两个方案的性能不同但是可比较。总之,第二代系统优选的是其较少的循环时间和极大改善的机械可靠性。本文写作时,我们实验室专门使用第二代方案和反应器用于肽合成。

[0182] 为了进一步比较第一代与第二代合成方案和反应器的性能,重复HIV-1蛋白酶片段与PnI (A10L) 芋螺毒素的合成。图18中所示数据与图5的数据一起用于比较。两个方案的性能是可比较的。

[0183] 为了证实氯三苯甲基酰肼树脂的性能并进一步探究用第二代反应器的合成和循环,重复亲和体片段的合成。图19中所示数据与图7的数据一起用于比较。当合成无甘氨酸的片段时,两个连接臂(linker)的性能是可比较的。改进的Wang树脂促进了甘氨酸显著的双掺入,这激发我们转向酰肼树脂。在这两种情况中,在制备型色谱法之后获得适用于连接的纯材料。

[0184] 为了进一步突出第二代合成仪的效用,合成10个谷胱甘肽类似物的文库(参见图20)、一些富含半胱氨酸的肽(参见图21)和两个生物素化蛋白酶识别位点(参见图17)。谷胱甘肽类似物都在一天内产生。在图21中,所有半胱氨酸是受乙酰氨基甲基(Acm)保护的以防止在切割和侧链去保护期间的副反应。用0.190mL的DIEA而不是0.157mL的DIEA活化这些肽中的半胱氨酸。在所有情况中,肽以0.2mmol规模产生,主要的峰是期望的产物并且粗材料随后在一个制备型RP-HPLC步骤中成功地纯化(未示出纯化的材料)。

[0185] 图17示出了合成的生物素化蛋白酶识别位点的色谱图。B是β-丙氨酸,K\*是生物素化赖氨酸并且K'是受烯丙基保护的赖氨酸。使受烯丙基保护的肽在分批树脂上氢化以得到游离的赖氨酸,并且生物素分批偶联。8分钟后洗脱的材料是非肽材料。

[0186] 图18示出了HIV-1蛋白酶片段和PnI (A10L) 芋螺毒素再合成的色谱图。特别地,图18的A-D示出了(A)用第二代反应器和条件合成的芋螺毒素,(B)用第二代反应器和条件合成的HIV-1PR (81-99),(C)用第一代反应器和条件合成的芋螺毒素,以及(D)用第一代反应器和条件合成的HIV-1PR (81-99)。晚期洗脱材料是侧链受保护的产物。保留时间稍微不同,因为LC/MS柱在第一代反应器与第二代反应器研究之间替换。15分钟后洗脱的材料是非肽材料。

[0187] 图19示出了亲和体片段的色谱图。图19的A-C示出了用第二代方案在氯三苯甲基酰肼官能化的聚苯乙烯上合成的片段,并且图19的D-F示出了用第一代方案在修饰的Wang树脂上合成的片段。

[0188] 图20示出了每18分钟内合成的谷胱甘肽类似物的文库的色谱图。E\*表示通过侧链羧酸酯(carboxylate)与多肽偶联的谷氨酸。所有的肽在条件3下进行分析并且主峰具有期望的物质。

[0189] 图21示出了多个富含半胱氨酸的肽的色谱图。所有半胱氨酸是受Acm保护的。图21的A和B中的材料在条件3下进行分析并且图21的C中的材料在条件4下进行分析。

[0190] 实施例15

[0191] 该实施例描述了自动化流动平台的设计和构建。

[0192] 没有操作人员施加对循环时间的限制情况下,设计自动化平台以进行与手动系统相同的标准。为了完成这些目标,我们组装了图23的A所示的系统。自动化基于流动的平台包含两个HPLC泵、静态混合器、微控制器(未示出)、热交换器、第二代反应器和UV检测器以及其他组件。两个HPLC泵递送试剂。一个HPLC泵递送氨基酸和溶解于DMF中的HBTU的溶液、另一个递送DIEA以完成活化。氨基酸与等摩尔的DMF中的HBTU储存为0.4M溶液,并且如果在密封的反应器中储存,在没有活化碱的情况下,其稳定数周。

[0193] 静态混合器用于确保DIEA与氨基酸溶液的有效混合,并且阀位置和泵流量通过Arduino微控制器来控制。在没有改进的情况下,使用上述掺合这两种流体的静态混合器和热交换器、第二代反应器以及UV检测器。为了增加静态混合器与反应器之间的停留时间,使用另外的六英寸0.030" ID管。增加的停留时间可促进完全活化并且观察到在所述系统中用此额外长度的管产生的肽比没有其产生的肽具有稍高的粗纯度。

[0194] 图23的A所示的所有阀被包含在两个歧管中并且通过24V螺线管启动。设计歧管以具有最小的内部体积并得到试剂之间的零交互作用。一个歧管由选择五种试剂之一的多个阀以及开关歧管的一个阀组成。当切断电源时,试剂阀选择DMF并且开/关阀关闭歧管。这些特征防止了任何不正确的氨基酸掺入,使得洗涤歧管所需的溶剂体积最小化并且防止虹吸溶剂。整个流路是PTFE。入口管线受2微米入口过滤器保护。

[0195] 所述泵是具有50mL/分钟泵压头的Knauer Smartline型号100。选择这些泵是因为其容易获得并且容易用模拟电压控制。然而,所述泵具有相对低的泵送能力并且需要约10mL的溶剂来洗涤泵压头。循环时间可进一步通过选择具有较高泵送容量和需要较低体积的溶剂洗涤泵压头的泵来减少。

[0196] 静态混合器由StaMixCo提供并由其6个最小的元件(6mm)组成。将之前描述的热交换器置于混合器与第二代反应器之间。将所有三个这些元件和额外长度的管都置于60°C的水浴中。之前描述的UV检测器用于监测废物流的吸光度。该装置通过Arduino Mega2560微控制器来控制,选择出于其简单化和稳定性。为了提供控制所述泵的0-10V模拟信号,使用Arduino的0-5V脉冲宽度调制的输出。过滤信号并放大以产生0-10V模拟控制电压。为了控制所述阀,Arduino的数字输出用于启动功率晶体管,然后由外部供给提供24V DC功率。所有地面(ground)是常见的建立地面。

[0197] 图23示出了自动化的肽合成平台和若干个用其合成的模型肽。图23A-E是(A)装置的示意图,(B)通过该装置每107秒掺入氨基酸残基所使用的合成时间线,(C)示出了12分钟内组装的ALFALFA的色谱图,(D)示出了18分钟内组装的ACP(65-74)的色谱图(1,2=Ile缺失,3=C-末端的水解),以及(E)示出了37分钟内组装的(ALF)7的色谱图。示出了总离子色谱图。

[0198] 实施例16

[0199] 该实施例描述了使用自动化系统合成肽。自动化循环时间不受其中使用者可以完成手动作业或者注射泵可以灌输的速率的限制,所以基本上加速了时间线(参见图23的B)。

在50mL份钟(可用的最大值)下的两个45秒洗涤、七秒偶联和十秒去保护导致每107秒(1.8分钟)掺入氨基酸残基。偶联时间和去保护时间代表总时间的这样小的一部分,使得时间不是最优化的。然而,可通过使偶联时间和去保护时间最佳化来获得甚至更快的时间。更快的添加循环还可通过消除一个或更多个洗涤步骤来获得。使用这些循环,在12.5分钟内产生ALFALFA,在17.8分钟内产生ACP(65-74)并且在37.5分钟内产生21-mer合成的模型(ALF)7,证明了所述系统机械稳健。(ALF)7的粗品质几乎与使用手动第二代合成方案的合成相同(参见图24)。

[0200] 以下控制循环用于使用自动化系统合成肽。选择氨基酸和活化剂的期望溶液并通过第一个HPLC泵以50mL/分钟递送。四秒之后,第二个HPLC泵开始以9mL/分钟递送DIEA。三秒多之后(总偶联为7秒),歧管选择DMF洗涤溶剂。十六秒之后,当氨基酸几乎完全被从歧管和泵洗去时,第二个HPLC泵失活。另一个31秒之后(在50mL份钟下45秒的总洗涤时间),DMF中的50%哌啶以50mL份钟递送10秒。最后,将DMF以50mL/分钟递送另外45秒,从而完成最终的洗涤和循环。氨基酸和活化剂的溶液通过将40mmol的受Na-Fmoc保护的氨基酸溶解在DMF中之100mL的0.4M HBTU中来制备。侧链保护如下:Arg(Pbf)、Tyr(tBu)、Asp(0tBu)、Gln(Trt)、Asn(Trt)。没有对溶解氨基酸时体积的改变进行校正。

[0201] 三种肽ALFALFA、ACP(65-74)和(ALF)7用全自动化的系统产生。ALFALFA具有极高的粗纯度并且在许多手动系统的条件下已经合成了ACP(65-74)许多次。为了比较(ALF)7的自动化合与手动系统,用第二代反应器和方案产生(ALF)7。所述色谱图示于图24中。两种粗产物的品质非常相似。图22示出了用(A)自动化的1.8分钟循环和(B)手动三分钟循环合成的(ALF)7的色谱图。

[0202] 实施例17

[0203] 该实施例描述了使用缺乏一个或更多个试剂除去步骤的添加循环合成肽。在一些情况下,如图24所示,可任择一个或更多个试剂除去步骤而且缺少除去步骤不会对随后步骤和/或添加循环的性能产生不利影响。

[0204] 合成仅在添加循环中包括的步骤不同的两个肽。所述肽的序列为H<sub>2</sub>N-CDINYTSGFRNSDRILYSSDWLIYKTTDHYQTFKIR-CONH<sub>2</sub>。根据实施例13所述合成一种肽并作为对照。添加循环由酰胺键形成(偶联)、偶联剂的除去(洗涤)、NaFmoc除去(去保护)和去保护试剂和反应产物、哌啶-二苯并富烯(哌啶-DBF)的除去(洗涤)组成。合成的肽的色谱图示于图24的A中。除了添加循环不包括偶联剂除去步骤(即,偶联剂洗涤步骤),根据实施例13所述合成另一种肽。由随后步骤(例如,去保护步骤)进入的溶剂用于洗掉至少一部分偶联剂和/或反应副产物并且剩余的偶联剂通过过量进入的去保护试剂来破坏。使用缺乏偶联剂洗涤步骤的添加循环合成的肽的色谱图示于图24的B中。没有观察到缺乏任选的洗涤步骤的肽与包括任选的洗涤步骤的肽之间有显著差异。

[0205] 实施例18

[0206] 该实施例描述了130个残基的DARPin pE59和113个残基的芽孢杆菌RNA酶(Barnase)的合成。使用本领域普通技术人员已知的并与实施例6关于亲和体所述基本上相似的连接化学由四个肽片段合成这些蛋白质的每一个。

[0207] DARPin由四个片段合成,其总离子色谱图示于图25的B-E中:

[0208] D[1] (H<sub>2</sub>N-[1Gly-31Gly]-CONHNH<sub>2</sub>) ,

- [0209] D[2] (H2N-[32Cys-64Gly]-CONHNH2) ,
- [0210] D[3] (H2N-[65Cys-97Gly]-CONHNH2) 和
- [0211] D[4] (H2N-[98Cys-130Asn]-CONH2) 。

[0212] 除了以下不同之处,使用实施例8所述的第二代反应器、实施例13所述的方法和HBTU偶联剂合成这些。所有半胱氨酸都受AcM保护。

[0213] 以两分钟/残基合成D[1],并且以40ml/分钟洗涤两个30秒。此外,由于难以手动改变泵流量,因此去保护以40ml/分钟进行20秒。认为较短的去保护和/或较低流量的去保护和/或用更多稀释的去保护试剂(例如DMF中的20%哌啶)的去保护将对这种加速的循环和保存去保护试剂有效。

- [0214] D[2]和D[3]如实施例8和13所述合成。

[0215] 在氨甲基聚苯乙烯树脂而不是MBHA聚苯乙烯树脂上合成D[4]。如实施例20所述制备所述树脂。掺入114Ser和113Ile作为2,2-二甲基丙氨酸二肽并在完成偶联剂递送之后通过暂停添加循环偶联10分钟。认为这种暂停不是必需的。用3-甲基戊酯侧链保护而不是标准的叔丁基酯侧链保护掺入116Asp。最后,以20ml/分钟用DMF中之20%哌啶和0.1MHOBt进行去保护20秒。

- [0216] 芽孢杆菌RNA酶由四个片段合成,其总离子色谱图示于图26的B-E中:

- [0217] B[1] (H2N-[1Gly-13Val]-CONHNH2) ,
- [0218] B[2] (H2N-[14Cys-39Val]-CONHNH2) ,
- [0219] B[3] (H2N-[40Cys-76Glu]-CONHNH2) 和
- [0220] B[4] (H2N-[74Cys-113Arg]-CONH2) 。

[0221] 除了以下不同之处,使用实施例8所述的反应器、实施例13所述的方法和HATU偶联剂合成这些。使用DMF中的20%哌啶作为去保护试剂合成所有肽。所有半胱氨酸是受AcM保护的并且掺入76Glu作为环己基酯。

[0222] 对于B[1]的合成,通过在递送缬氨酸偶联剂之后暂停添加循环将c-末端缬氨酸与树脂偶联10分钟。认为可使用较短的偶联和/或较高温度下的偶联,然而发现实施例13所述的60°C下30秒的偶联不足以数量上将位阻缬氨酸与位阻三苯甲基酰肼树脂结合。

[0223] 对于B[2]的合成而言,如B[1]中将c-末端缬氨酸与树脂偶联10分钟,并且用羟基甲氧基苄基(HMB)骨架保护掺入33Ala。该残基用DCC/HOBt而不是HATU活化并通过在完成偶联剂递送之后暂停氨基酸添加循环25分钟而偶联25分钟。随后谷氨酸通过在完成偶联剂递送之后暂停氨基酸添加循环30分钟来偶联30分钟。认为可通过在更高温度下操作来加速掺入受HMB保护的氨基酸。

- [0224] 如上所述以及实施例8和13合成B3。

[0225] B4在由ChemMatrix提供的Rink-PEG树脂上合成并且90Arg用DCC/HOBt而不是HATU活化。

[0226] 在粗蛋白质片段制备之后,使用本领域普通技术人员已知的和基本上与实施例12所述的那些相似的方法通过RP-HPLC纯化所述粗蛋白质片段。然后根据图25的A和26的A中的方案连接纯化的片段以得到分别在图25的F和26的F中所示的全长蛋白质。按照Liu和同事做了小改进的过程,用本领域普通技术人员已知的方法进行连接。

- [0227] 实施例19

[0228] 该实施例描述了基于EETI-II胰蛋白酶抑制剂之进化的结合骨架的整联蛋白以及人胰岛素的A链和B链的合成。粗合成产物的总离子色谱图分别示于图27的A-C中。使用氨基甲基官能化的聚苯乙烯代替MBHA官能化的聚苯乙烯来合成所有的这些肽。使用本领域普通技术人员已知的方法并如以下实施例20所述的方法制备氨基甲基官能化的聚苯乙烯。

[0229] 使用实施例8中所述的第二代反应器和实施例13所述的方法合成人胰岛素的A链，不同之处在于在85°C下进行合成并且所有半胱氨酸受AcM保护。除了在85°C下进行合成，使用实施例8所述的反应器和实施例13所述的方法合成人胰岛素的B链。使用实施例8所述的反应器和实施例13所述的方法合成结合骨架的整联蛋白，不同之处在于所有手性氨基酸具有反转的手性(即，右旋性(dextrorotatory))。

[0230] 尽管本文中已对本发明的几个实施方案进行了描述和说明，但是本领域普通技术人员将容易想到多种其他手段和/或结构来实现本文所述功能和/或获得本文所述结果和/或本文所述一个或更多个优点，并且认为这些变化或修改中的每一个均在本发明的范围内。更一般地，本领域技术人员将容易认识到，本文所述的所有参数、尺寸、材料和构造均是示例性的，并且实际的参数、尺寸、材料和/或构造将取决于使用本发明教导的具体应用。

#### [0231] 实施例20

[0232] 该实施例描述了用于制备实施例18和19中所使用的氨基甲基树脂的过程。

[0233] 为了制备氨基甲基树脂，在1L圆底烧瓶中，向450mL的DCM添加25g的Bio-Rad, Bio-beads S-X1(苯乙烯-二乙烯苯共聚物, 1%交联)和4.9g (27.6mmol) 的N-羟甲基苯邻二甲酰亚胺。向其中添加50mL的甲磺酸并且将反应在室温下轻轻地搅拌5小时。搅拌5小时之后，将浆料转移至粗糙的烧结玻璃漏斗中并用DCM (1500–2000mL) 和乙醇 (1500mL) 洗涤。然后将树脂在真空下干燥1小时。干燥之后，将苯邻二甲酰亚氨基甲基树脂转移至500mL圆底烧瓶中并且悬浮于200mL酰肼一水合物 (20% v/v) 的无水乙醇溶液中。连接回流冷凝器并且将溶液温和回流至少8小时。为了完全地洗掉白色邻苯二甲酰肼 (phthalhydrazide) 沉淀物，将所得的凝胶状材料热转移至烧结玻璃漏斗并用沸腾乙醇 (1000mL–2000mL) 洗涤，然后用热甲醇 (1000mL) 洗涤。然后用DMF (800mL)、DCM (800mL)、DMF中的10% (v/v) DIEA (500mL)、DMF (600mL) 和DCM (1000mL) 洗涤树脂。然后将所述树脂在真空下干燥并且载荷确定为1.2mmol/g。

[0234] 本领域技术人员仅使用常规实验将认识到或者将能够确定许多与本文所描述的本发明特定实施方案等同的方案。因此，应理解，前述实施方案仅作为示例示出，并且在所附权利要求及其等同方案的范围内，本发明可以以不同于已具体描述并要求保护的方式的其他方式进行实践。本发明涉及本文所述的每一个单独的特征、系统、制品、材料和/或方法。此外，如果这些特征、系统、制品、材料和/或方法不相互矛盾，则两个或更多个这些特征、系统、制品、材料和/或方法的任意组合均包括在本发明的范围内。

[0235] 除非明确指示相反情况，否则本文说明书和权利要求书中使用的没有数量词修饰的名词应理解为指“至少一个/种”。

[0236] 本文说明书和权利要求书中使用的短语“和/或”应理解为意指这样联合的要素中的“任一或两者”，即在一些情况下共同存在而在另一些情况下分开存在的要素。除非明确指示相反情况，否则除“和/或”表述具体指示的要素之外，还可任选地存在其他要素，无论与那些具体指示的要素是否相关。因此，作为一个非限制性实例，提及“A和/或B”，当与开放

式语言例如“包含/包括”联合使用时:在一个实施方案中,可指A而无B(任选地包括除B之外的要素);在另一个实施方案中,可指B而无A(任选地包括不除A之外的要素);在又一个实施方案中,可指A和B两者(任选地包括其他要素)等。

[0237] 本文说明书和权利要求书中使用的“或”应理解为与以上定义的“和/或”具有相同的含义。例如,当在列表中分列项目时,“或”或者“和/或”应解释为包括在内,即包括大量要素或要素列表中的至少一个,但是也包括其中的一个以上,并任选地包括其他未列出项目。只有明确指出相反的术语,例如“仅之一”或“正好之一”或者当在权利要求中使用的“由……组成”,将指包括大量要素或要素列表中的正好一个要素。一般而言,当前面有排他性术语,例如:“任一”、“之一”、“仅其一”或“恰好其一”时,本文使用的术语“或”仅应解释为指排他性替代方案(即“一个或另一个而非两者”)。“基本由…组成”当在权利要求书使用中时应具有其在专利法领域中所使用的一般含义。

[0238] 本文说明书和权利要求书中在提到一个或更多个要素的列表时使用的短语“至少一个”应理解为选自要素列表中的任何一个或更多个要素的至少一个要素,但并不一定包括元素列表中具体列出的每个和各个要素中的至少一个要素,并且不排除要素列表中要素的任意组合。该定义还允许除了在短语“至少一个”所指的要素列表内的具体指定的要素之外,还可任选地存在另一些要素,无论与具体指定的那些要素是否相关。因此,作为一个非限制性实例,“A和B中的至少一个”(或者等同地,“A或B中的至少一个”,或者等同地,“A和/或B中的至少一个”)可以是这样的:在一个实施方案中,指至少一个,任选地包括一个以上的A,但不存在B(并且任选地包括除B之外的要素);在另一个实施方案中,指至少一个,任选地包括一个以上的B,但不存在A(并且任选地包括除A之外的要素);在又一个实施方案中,指至少一个,任选地包括一个以上的A和至少一个(任选地包括一个以上的)B(并且任选地包括其他要素)等。

[0239] 在权利要求书及以上的说明书中,所有过渡性短语例如“包含”、“包括”、“携带”、“具有”、“含有”、“涵盖为”、“持有”等应理解为开放式的,即意指包括但不限于。仅过渡性短语“由…组成”和“基本由…组成”分别应是封闭式的或半封闭式的过渡性短语,如United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures,第2111.03章中所述。

[0240] 以下内容对应于母案申请中的原始权利要求书,现作为说明书的一部分并入此处:

[0241] 1. 用于向肽添加氨基酸残基的方法,其包括:

[0242] 加热包含氨基酸的流,以使得所述氨基酸的温度提高至少约1°C;以及

[0243] 使经加热的氨基酸暴露于固定在固体支持物上的多个肽,

[0244] 其中在使所述经加热的氨基酸暴露于所述肽之前且在约30秒内进行所述加热步骤。

[0245] 2. 根据项1所述的方法,其中所述固体支持物包含聚苯乙烯和/或聚乙二醇。

[0246] 3. 根据项1至2中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含树脂。

[0247] 4. 根据项3所述的方法,其中所述固体支持物包含微孔聚苯乙烯树脂。

[0248] 5. 根据项1至4中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含在填充柱和/或流化床内。

[0249] 6. 根据项1至5中任一项所述的方法,其中在使所述经加热的氨基酸暴露于固定肽

之后,至少约99%的所述固定肽添加了氨基酸残基。

[0250] 7. 根据项1至6中任一项所述的方法,其中在使所述经加热的氨基酸暴露于所述固定肽之后,少于约1%的所述固定肽结合了所述氨基酸残基的多份拷贝。

[0251] 8. 根据项1至7中任一项所述的方法,其中向所述固定肽添加氨基酸残基包括向所述固定肽添加单个氨基酸残基。

[0252] 9. 根据项6至8中任一项所述的方法,其中向所述固定肽添加氨基酸残基包括向所述固定肽添加包含两个或更多个氨基酸残基的肽。

[0253] 10. 根据项1至9中任一项所述的方法,其中使所述氨基酸的温度提高至少约10℃。

[0254] 11. 根据项1至10中任一项所述的方法,其中使所述氨基酸的温度提高至少约25℃。

[0255] 12. 用于向肽添加氨基酸残基的方法,其包括:

[0256] 提供多个包含保护基团的肽,每个肽固定在固体支持物上;

[0257] 进行第一氨基酸添加循环,其包括使氨基酸暴露于固定肽以使得向至少约99%的所述固定肽添加氨基酸残基;以及

[0258] 进行第二氨基酸添加循环,其包括使氨基酸暴露于所述固定肽以使得向至少约99%的所述固定肽添加氨基酸残基;

[0259] 其中:

[0260] 所述第一氨基酸添加循环结束与所述第二氨基酸添加循环结束之间的总时间量为约10分钟或更短,并且所述保护基团包括芴基甲氧羰基保护基团,和/或

[0261] 所述第一氨基酸添加循环结束与所述第二氨基酸添加循环结束之间的总时间量为约5分钟或更短。

[0262] 13. 根据项12所述的方法,其中所述保护基团包括芴基甲氧羰基保护基团。

[0263] 14. 根据项12所述的方法,其中所述保护基团包括叔丁氧羰基保护基团。

[0264] 15. 根据项12至14中任一项所述的方法,其中所述第一氨基酸添加循环结束与所述第二氨基酸添加循环结束之间的总时间量为约5分钟或更短。

[0265] 16. 根据项12至15中任一项所述的方法,其中所述第一氨基酸添加循环结束与所述第二氨基酸添加循环结束之间的总时间量为约10秒钟至约10分钟并且所述保护基团包括芴基甲氧羰基保护基团。

[0266] 17. 根据项12至16中任一项所述的方法,其中所述第一氨基酸添加循环结束与所述第二氨基酸添加循环结束之间的总时间量为约10秒钟至约5分钟。

[0267] 18. 根据项12至16中任一项所述的方法,其中在所述第一氨基酸添加循环和所述第二氨基酸添加循环期间,在超过约5%的进行所述循环的时间段期间整个所述固体支持物的压降不超过约700psi。

[0268] 19. 根据项12至18中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含在填充柱和/或流化床内。

[0269] 20. 根据项12至19中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含聚苯乙烯和/或聚乙二醇。

[0270] 21. 根据项12至20中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含树脂。

[0271] 22. 根据项21所述的方法,其中所述固体支持物包含微孔聚苯乙烯树脂。

[0272] 23. 根据项12至22中任一项所述的方法,其包括:在使所述氨基酸暴露于所述固体支持物之前约30秒内,合并包含氨基酸的第一流体流与包含氨基酸活化剂的第二流以形成包含活化氨基酸的混合流体。

[0273] 24. 根据项23所述的方法,其中所述氨基酸活化剂包括碱性液体、碳二亚胺和/或脲鎓活化剂。

[0274] 25. 根据项12至24中任一项所述的方法,其中在所述第一氨基酸添加循环期间,少于约1%的固定肽结合了所述氨基酸残基的多份拷贝。

[0275] 26. 根据项12至25中任一项所述的方法,其中在所述第二氨基酸添加循环期间,少于约1%的固定肽结合了所述氨基酸残基的多份拷贝。

[0276] 27. 根据项12至26中任一项所述的方法,其中向所述固定肽添加氨基酸残基包括向所述固定肽添加单个氨基酸残基。

[0277] 28. 根据项12至27中任一项所述的方法,其中向所述固定肽添加氨基酸残基包括向所述固定肽添加包含两个或更多个氨基酸残基的肽。

[0278] 29. 根据项12至28中任一项所述的方法,其包括加热包含氨基酸的流以使得所述氨基酸的温度提高至少约1℃,其中在使经加热的氨基酸暴露于所述固定肽之前且在约30秒内进行所述加热步骤。

[0279] 30. 用于向肽添加氨基酸残基的方法,其包括:

[0280] 提供固定在固体支持物上的多个肽;以及

[0281] 使活化氨基酸暴露于所述固定肽,以使得至少一部分的所述活化氨基酸与所述固定肽结合以形成新结合的氨基酸残基;

[0282] 其中至少约99%的所述固定肽在约1分钟或更短的时间内添加了氨基酸残基。

[0283] 31. 根据项30所述的方法,其中在暴露步骤期间,在超过约5%的进行所述暴露步骤的时间段期间整个所述固体支持物的压降不超过约700psi。

[0284] 32. 根据项30至31中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含在填充柱和/或流化床内。

[0285] 33. 根据项30至32中任一项所述的方法,其包括加热氨基酸以使得所述氨基酸的温度提高至少约1℃,其中在使所述氨基酸暴露于所述固定肽之前且在30秒内进行所述加热步骤。

[0286] 34. 根据项30至33中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含聚苯乙烯和/或聚乙二醇。

[0287] 35. 根据项30至34中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含树脂。

[0288] 36. 根据项35所述的方法,其中所述固体支持物包含微孔聚苯乙烯树脂。

[0289] 37. 根据项30至36中任一项所述的方法,其包括:在使所述氨基酸暴露于所述固体支持物之前约30秒内,合并包含氨基酸的第一流体流与包含氨基酸活化剂的第二流以形成包含活化氨基酸的混合流体。

[0290] 38. 根据项37所述的方法,其中所述氨基酸活化剂包括碱性液体、碳二亚胺和/或脲鎓活化剂。

[0291] 39. 根据项30至38中任一项所述的方法,其中在所述暴露步骤期间,少于约1%的所述固定肽结合了所述氨基酸残基的多份拷贝。

[0292] 40. 根据项30至39中任一项所述的方法,其中向所述固定肽添加氨基酸残基包括向所述固定肽添加单个氨基酸残基。

[0293] 41. 根据项30至40中任一项所述的方法,其中向所述固定肽添加氨基酸残基包括向所述固定肽添加包含两个或更多个氨基酸残基的肽。

[0294] 42. 根据项30至41中任一项所述的方法,其中至少约99.9%的所述固定肽在约1分钟或更短的时间内添加了氨基酸残基。

[0295] 43. 根据项30至42中任一项所述的方法,其中至少约99%的所述固定肽在约30秒或更短的时间内添加了氨基酸残基。

[0296] 44. 根据项30至43中任一项所述的方法,其包括加热包含氨基酸的流以使得所述氨基酸的温度提高至少约1℃,其中在使经加热的氨基酸暴露于所述固定肽之前且在约30秒内进行所述加热步骤。

[0297] 45. 用于向肽添加氨基酸残基的方法,其包括:

[0298] 使包含氨基酸的第一流流动;

[0299] 使包含氨基酸活化剂的第二流流动;

[0300] 合并所述第一流和所述第二流以形成包含活化氨基酸的混合流体;以及

[0301] 在合并所述第一流和所述第二流以形成所述混合流体之后约30秒内,使所述混合流体暴露于固定在固体支持物上的多个肽。

[0302] 46. 根据项45所述的方法,其中所述氨基酸活化剂包括碱性液体、碳二亚胺和/或脲鎓活化剂。

[0303] 47. 根据项45至46中任一项所述的方法,其包括加热氨基酸以使得所述氨基酸的温度提高至少约1℃,其中在使所述氨基酸暴露于固定肽之前且在约30秒内进行所述加热步骤。

[0304] 48. 根据项47所述的方法,其中在合并步骤之前进行所述加热步骤。

[0305] 49. 根据项47至48中任一项所述的方法,其中在所述合并步骤期间进行所述加热步骤。

[0306] 50. 根据项47至49中任一项所述的方法,其中在所述合并步骤之后进行所述加热步骤。

[0307] 51. 根据项45至50中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含聚苯乙烯和/或聚乙二醇。

[0308] 52. 根据项45至51中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含树脂。

[0309] 53. 根据项52所述的方法,其中所述固体支持物包含微孔聚苯乙烯树脂。

[0310] 54. 根据项45至53中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含在填充柱和/或流化床内。

[0311] 55. 根据项45至54中任一项所述的方法,其中在使所述混合流体暴露于所述固定肽之后,至少约99%的所述固定肽添加了氨基酸残基。

[0312] 56. 根据项45至55中任一项所述的方法,其中在使所述混合流体暴露于所述固定肽之后,少于约1%的所述固定肽结合了所述氨基酸残基的多份拷贝。

[0313] 57. 根据项55至56中任一项所述的方法,其中向所述固定肽添加氨基酸残基包括向所述固定肽添加单个氨基酸残基。

[0314] 58. 根据项55至57中任一项所述的方法,其中向所述固定肽添加氨基酸残基包括向所述固定肽添加包含两个或更多个氨基酸残基的肽。

[0315] 59. 根据项45至58中任一项所述的方法,其包括加热包含氨基酸的所述第一流以使得所述氨基酸的温度提高至少约1℃,其中在使经加热的氨基酸暴露于所述多个固定肽之前且在约30秒内进行所述加热步骤。

[0316] 60. 用于向肽添加氨基酸残基的方法,其包括:

[0317] 提供多个包含保护基团的肽,每个肽固定在固体支持物上;

[0318] 使去保护试剂暴露于固定肽以从至少一部分的所述固定肽中除去保护基团;

[0319] 除去至少一部分的所述去保护试剂;

[0320] 使活化氨基酸暴露于所述固定肽以使得至少一部分的所述活化氨基酸与所述固定肽结合以形成新结合的氨基酸残基;以及

[0321] 除去至少一部分不与所述固定肽结合的活化氨基酸;

[0322] 其中在氨基酸暴露步骤期间至少约99%的所述固定肽添加了氨基酸残基;并且

[0323] 其中:

[0324] 进行所有的去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤的组合所花费的总时间量为约10分钟或更短,并且所述保护基团包括芴基甲氧羰基保护基团,和/或

[0325] 进行所有的去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤的组合所花费的总时间量为约5分钟或更短。

[0326] 61. 根据项60所述的方法,其中所述保护基团包括芴基甲氧羰基保护基团。

[0327] 62. 根据项60所述的方法,其中所述保护基团包括叔丁氧羰基保护基团。

[0328] 63. 根据项60至62中任一项所述的方法,其中进行所有的去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤的组合所花费的总时间量为约10秒至约10分钟,并且所述保护基团包括芴基甲氧羰基保护基团。

[0329] 64. 根据项60至63中任一项所述的方法,其中进行所有的去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤的组合所花费的总时间量为约5分钟或更短。

[0330] 65. 根据项60至64中任一项所述的方法,其中进行所有的去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤的组合所花费的总时间量为约10秒至约5分钟。

[0331] 66. 根据项60至65中任一项所述的方法,其中在去保护试剂暴露步骤、去保护试剂除去步骤、活化氨基酸暴露步骤和活化氨基酸除去步骤的每个步骤期间,在超过约5%的进行所述步骤的时间段期间整个所述固体支持物的压降不超过约700psi。

[0332] 67. 根据项60至66中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含在填充柱和/或流化床内。

[0333] 68. 根据项60至67中任一项所述的方法,其包括加热氨基酸以使得所述氨基酸的温度提高至少约1℃,其中在使所述氨基酸暴露于所述固定肽之前且在约30秒内进行所述加热步骤。

[0334] 69. 根据项60至68中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含聚苯乙烯和/或

聚乙二醇。

[0335] 70. 根据项60至69中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含树脂。

[0336] 71. 根据项70所述的方法,其中所述固体支持物包含微孔聚苯乙烯树脂、微孔聚乙二醇树脂和/或微孔共聚物树脂。

[0337] 72. 根据项60至71中任一项所述的方法,其包括:在使所述氨基酸暴露于所述固体支持物之前约30秒内,合并包含所述氨基酸的第一流体流与包含氨基酸活化剂的第二流以形成包含活化氨基酸的混合流体。

[0338] 73. 根据项72所述的方法,其中所述氨基酸活化剂包括碱性液体、碳二亚胺和/或脲鎓活化剂。

[0339] 74. 根据项60至73中任一项所述的方法,其中在所述氨基酸暴露步骤期间,少于约1%的所述固定肽结合了所述氨基酸残基的多份拷贝。

[0340] 75. 根据项60至74中任一项所述的方法,其中向所述固定肽添加氨基酸残基包括向所述固定肽添加单个氨基酸残基。

[0341] 76. 根据项60至75中任一项所述的方法,其中向所述固定肽添加氨基酸残基包括向所述固定肽添加包含两个或更多个氨基酸残基的肽。

[0342] 77. 根据项60至76中任一项所述的方法,其包括加热包含氨基酸的第一流以使得所述氨基酸的温度提高至少约1℃,其中在使经加热的氨基酸暴露于多个所述固定肽之前且在约30秒内进行所述加热步骤。

## 序列表

- <110> Massachusetts Institute of Technology  
Simon, Mark David  
Pentelute, Bradley L.  
Adamo, Andrea  
Heider, Patrick Louis  
Jensen, Klavs F.
- <120> 固相肽合成方法及相关系统
- <130> M0925.70372W000
- <140> PCT/US2014/017970
- <141> 2014-02-24
- <150> US 13/833,745
- <151> 2013-03-15
- <160> 47
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成多肽
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1) .. (1)
- <223> 用Fmoc修饰
- <400> 1  
Ala Leu Phe Ala Leu Phe Ala  
1 5
- <210> 2
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成多肽
- <400> 2  
Leu Tyr Arg Ala Gly  
1 5
- <210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 3

Val Gln Ala Ala Ile Asp Tyr Ile Asn Gly

1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 4

Gly Cys Cys Ser Leu Pro Pro Cys Ala Leu Asn Asn Pro Asp Tyr Cys

1 5 10 15

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 5

Pro Val Asn Ile Ile Gly Arg Asn Leu Leu Thr Gln Ile Gly Cys Thr

1 5 10 15

Leu Asn Phe

<210> 6

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 6

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg

20 25

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 用Thz修饰

<400> 7

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser

1 5 10

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 8

Cys Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln

1 5 10 15

Ala Pro Lys

<210> 9

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 用Fmoc修饰

<400> 9

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg

20 25

<210> 10

<211> 33

- <212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成多肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> 用Boc修饰  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (33) .. (33)  
<223> Xaa可为任何天然氨基酸  
<400> 10  
Gly Gly Gly Gly Gly Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn  
1 5 10 15  
Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg  
20 25 30  
Xaa  
<210> 11  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成多肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> 用Fmoc和Thz修饰  
<400> 11  
Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
1 5 10  
<210> 12  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成多肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE

- <222> (1) .. (1)  
 <223> 用Boc和Thz修饰  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12) .. (12)  
 <223> Xaa可为任何天然氨基酸  
 <400> 12  
 Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Xaa  
 1 5 10  
 <210> 13  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> 用Fmoc修饰  
 <400> 13  
 Cys Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln  
 1 5 10 15  
 Ala Pro Lys  
 <210> 14  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> 用Boc修饰  
 <400> 14  
 Cys Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln  
 1 5 10 15  
 Ala Pro Lys  
 <210> 15  
 <211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 15

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Cys Ala Phe Ile Gln

20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser

35

<210> 16

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 16

Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Thr Ser Gly

1 5 10 15

Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly

20

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Gly Ala Arg Leu Leu Arg Leu

1 5 10

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa为bAla  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15) .. (15)  
 <223> Xaa为bAla  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18) .. (18)  
 <223> Xaa为bAla  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (19) .. (19)  
 <223> 烯丙氧羰基保护的  
 <400> 18  
 Gly Gly Gly Gly Gly Xaa Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Xaa Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Xaa Lys  
 <210> 19  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13) .. (13)  
 <223> Xaa为bAla  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16) .. (16)  
 <223> Xaa为bAla  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (19) .. (19)  
 <223> 生物素化的  
 <400> 19  
 Gly Gly Gly Gly Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Xaa Gly Gly Xaa  
 1 5 10 15

Gly Gly Lys

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 20

Cys Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser

1 5 10

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 21

Glu Cys Gly Gly Leu Leu

1 5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 谷氨酸通过侧链羧酸酯与多肽偶联

<400> 22

Glu Cys Gly Gly Leu Leu

1 5

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 23

Asp Cys Gly Pro Leu Leu

1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 谷氨酸通过侧链羧酸酯与多肽偶联

<400> 24

Glu Cys Gly Pro Leu Leu

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 25

Asp Glu Cys Gly Lys Leu Leu

1 5

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 谷氨酸通过侧链羧酸酯与多肽偶联

<400> 26

Glu Cys Gly Lys Leu Leu

1 5

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 27

Asn Cys Gly His Leu Leu

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 谷氨酸通过侧链羧酸酯与多肽偶联

<400> 28

Glu Cys Gly His Leu Leu

1 5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 29

Gln Cys Gly Leu Leu Leu

1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 谷氨酸通过侧链羧酸酯与多肽偶联

<400> 30

Glu Cys Gly Leu Leu Leu

1 5

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 31

Cys Ala Cys Gly Ala Leu Tyr Lys Lys Gly Ser Phe Ala Gly Cys Ala

1 5 10 15

Cys

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 32

Cys Ala Gly Cys Ala Leu Tyr Lys Lys Gly Ser Phe Ala Cys Gly Ala

1 5 10 15

Cys

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 33

Cys Cys Ala Gly Ala Leu Tyr Lys Lys Gly Ser Phe Ala Gly Ala Cys

1 5 10 15

Cys

<210> 34

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 34  
 Ala Leu Phe Ala Leu Phe Ala Leu Phe Ala Leu Phe Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Phe Ala Leu Phe  
 20  
 <210> 35  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <400> 35  
 Cys Asp Ile Asn Tyr Thr Ser Gly Phe Arg Asn Ser Asp Arg Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Ser Asp Trp Leu Ile Tyr Lys Thr Thr Asp His Tyr Gln Thr  
 20 25 30  
 Phe Thr Lys Ile Arg  
 35  
 <210> 36  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (28) .. (28)  
 <223> Xaa为Nle  
 <400> 36  
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Xaa Ala Asn Gly Ala  
 20 25 30  
 Asp Val Asn Ala Leu Asp Glu Asp Gly Leu Thr Pro Leu His Leu Ala  
 35 40 45  
 Ala Gln Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly  
 50 55 60  
 Ala Asp Val Asn Ala Glu Asp Asn Phe Gly Ile Thr Pro Leu His Leu  
 65 70 75 80

Ala Ala Ile Arg Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His  
                          85                         90                         95  
 Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp  
                          100                     105                     110  
 Ile Ser Ile Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys  
                          115                     120                     125  
 Leu Asn  
                          130  
 <210> 37  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (28) .. (28)  
 <223> Xaa为Nle  
 <400> 37  
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala  
                          1                         5                         10                     15  
 Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Xaa Ala Asn Gly  
                          20                     25                     30  
 <210> 38  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <400> 38  
 Cys Asp Val Asn Ala Leu Asp Glu Asp Gly Leu Thr Pro Leu His Leu  
                          1                         5                         10                     15  
 Ala Ala Gln Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr  
                          20                     25                     30  
 Gly  
 <210> 39  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;400&gt; 39

Cys Asp Val Asn Ala Glu Asp Asn Phe Gly Ile Thr Pro Leu His Leu

1 5 10 15

Ala Ala Ile Arg Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His

20 25 30

Gly

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;400&gt; 40

Cys Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile

1 5 10 15

Ser Ile Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu

20 25 30

Asn

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;400&gt; 41

Gly Gly Gly Ala Gln Val Ile Asn Thr Phe Asp Gly Val Ala Asp Tyr

1 5 10 15

Leu Gln Thr Tyr His Lys Leu Pro Asp Asn Tyr Ile Thr Lys Ser Glu

20 25 30

Ala Gln Ala Leu Gly Trp Val Ala Ser Lys Gly Asn Leu Ala Asp Val

35 40 45

Ala Pro Gly Lys Ser Ile Gly Gly Asp Ile Phe Ser Asn Arg Glu Gly

50 55 60

Lys Leu Pro Gly Lys Ser Gly Arg Thr Trp Arg Glu Ala Asp Ile Asn

65 70 75 80

Tyr Thr Ser Gly Phe Arg Asn Ser Asp Arg Ile Leu Tyr Ser Ser Asp

85 90 95

Trp Leu Ile Tyr Lys Thr Thr Asp His Tyr Gln Thr Phe Thr Lys Ile  
 100 105 110

Arg

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 42

Gly Gly Gly Ala Gln Val Ile Asn Thr Phe Asp Gly Val

1 5 10

<210> 43

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 43

Cys Asp Tyr Leu Gln Thr Tyr His Lys Leu Pro Asp Asn Tyr Ile Thr

1 5 10 15

Lys Ser Glu Ala Gln Ala Leu Gly Trp Val

20 25

<210> 44

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 44

Cys Ser Lys Gly Asn Leu Ala Asp Val Ala Pro Gly Lys Ser Ile Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Thr Trp Arg Glu

35

<210> 45

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 45

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 46

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 46

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr

1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

20

25

30

<210> 47

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 47

Gly Cys Asx Arg Pro Arg Gly Asp Asn Pro Pro Leu Asx Cys Ser Gln

1 5 10 15

Asp Ser Asp Cys Leu Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

20

25

30

Gly

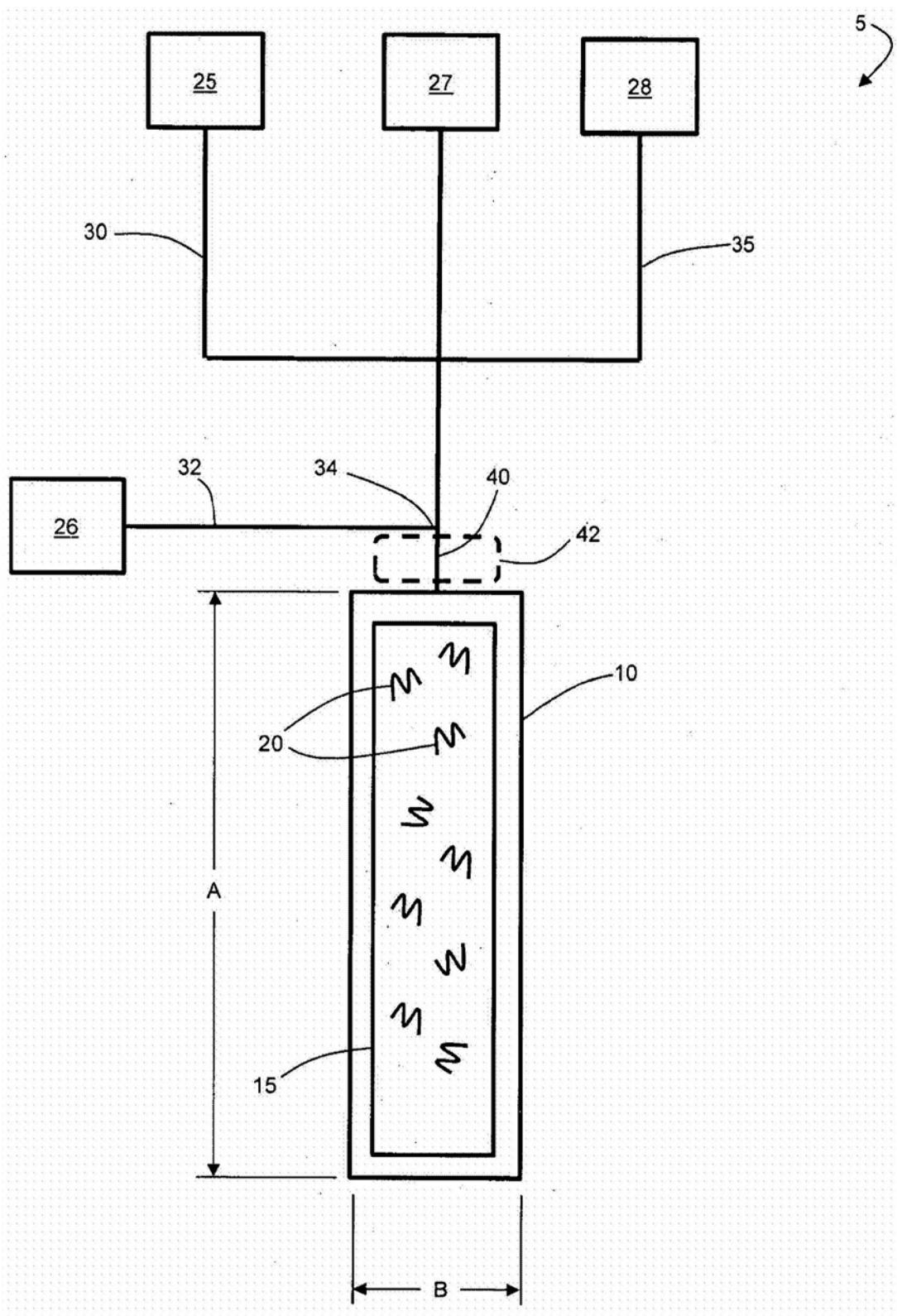


图1

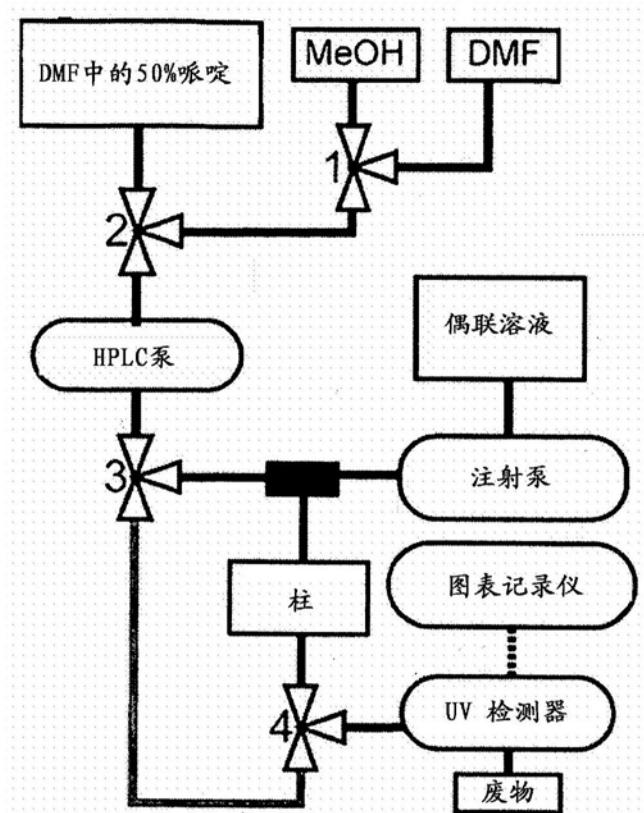


图2A

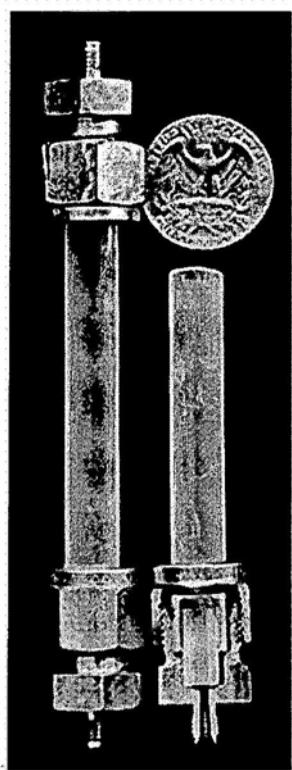


图2B

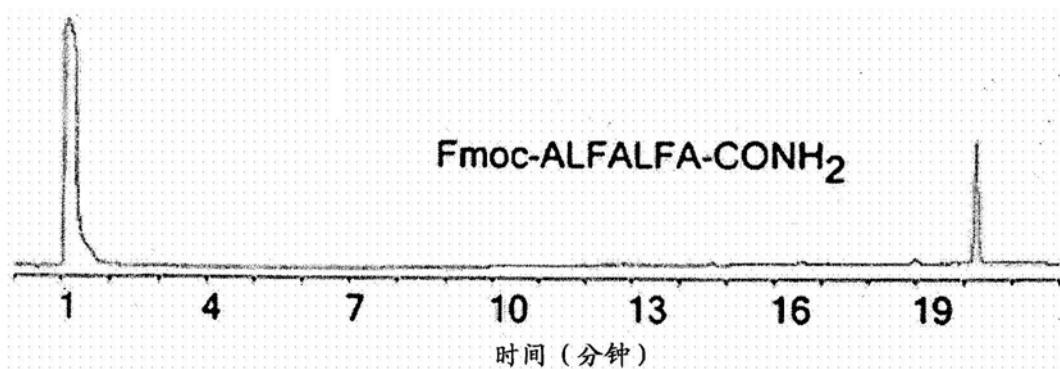


图2C

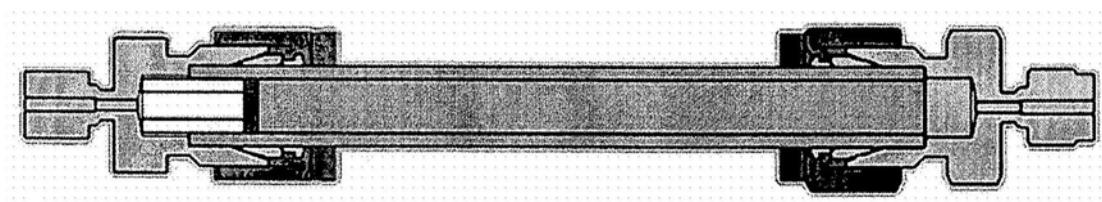


图2D

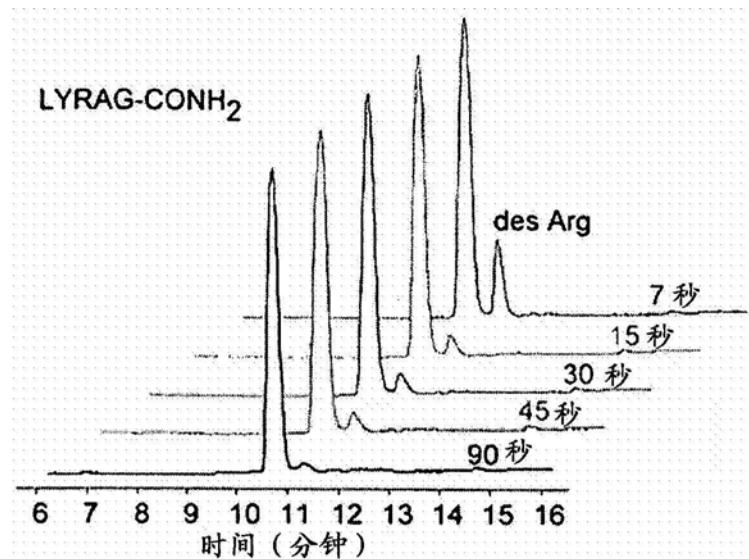


图3A

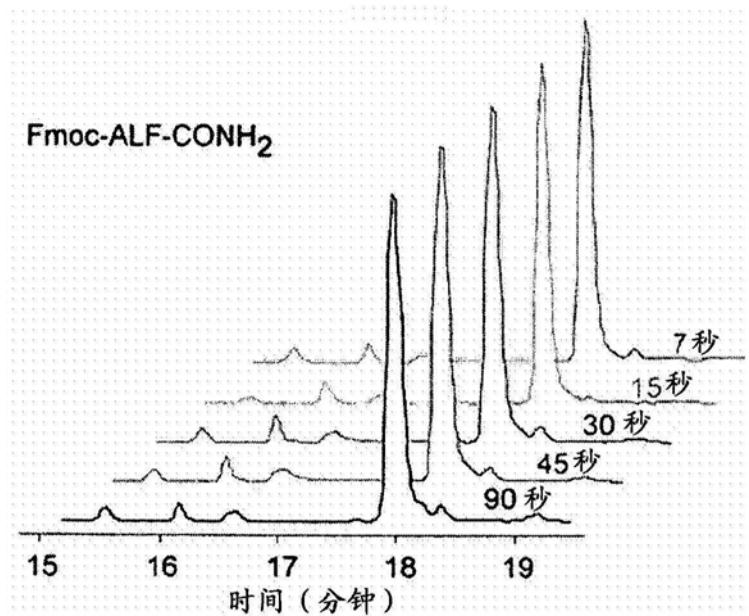


图3B

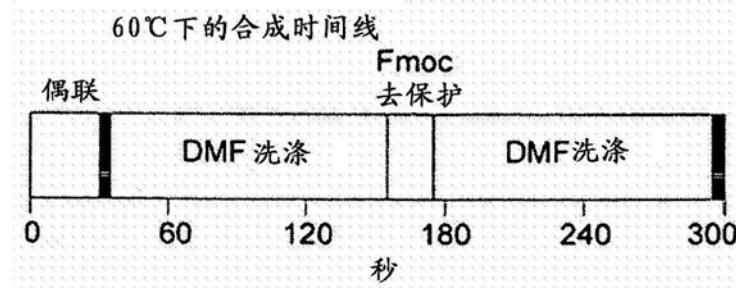


图3C

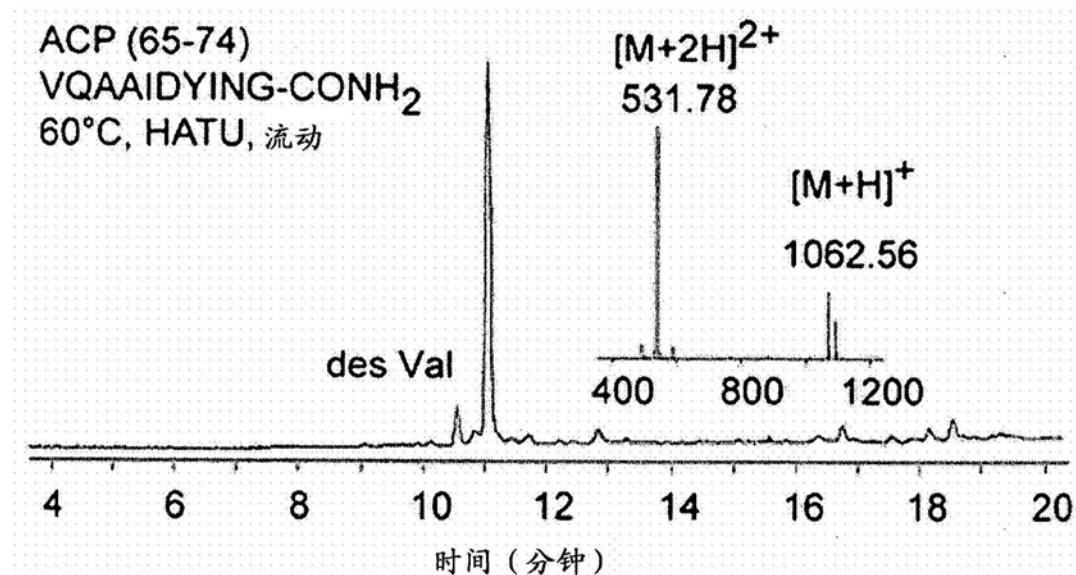


图4A

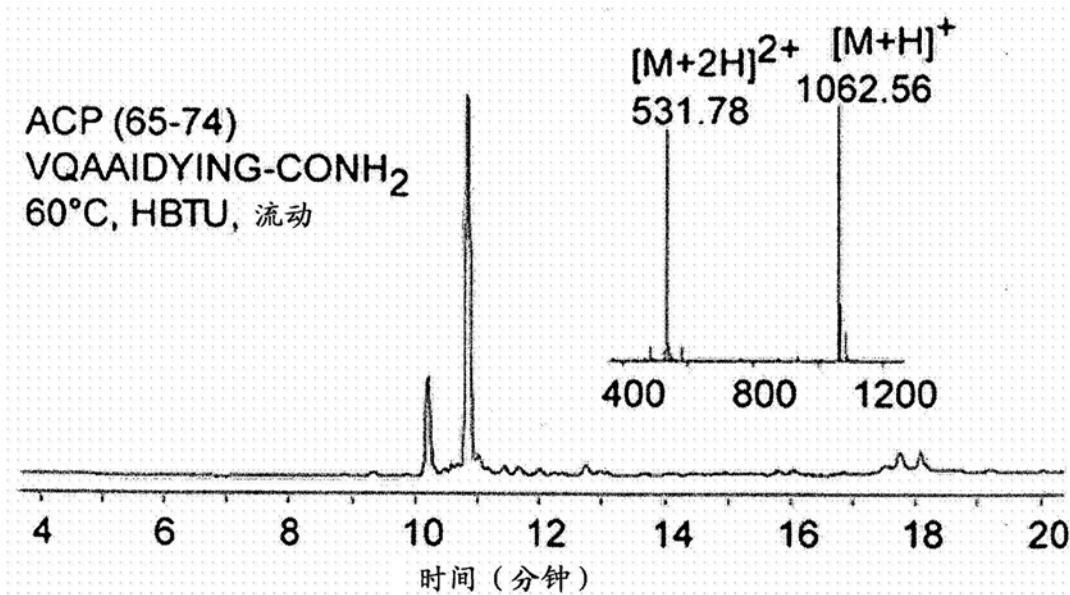


图4B

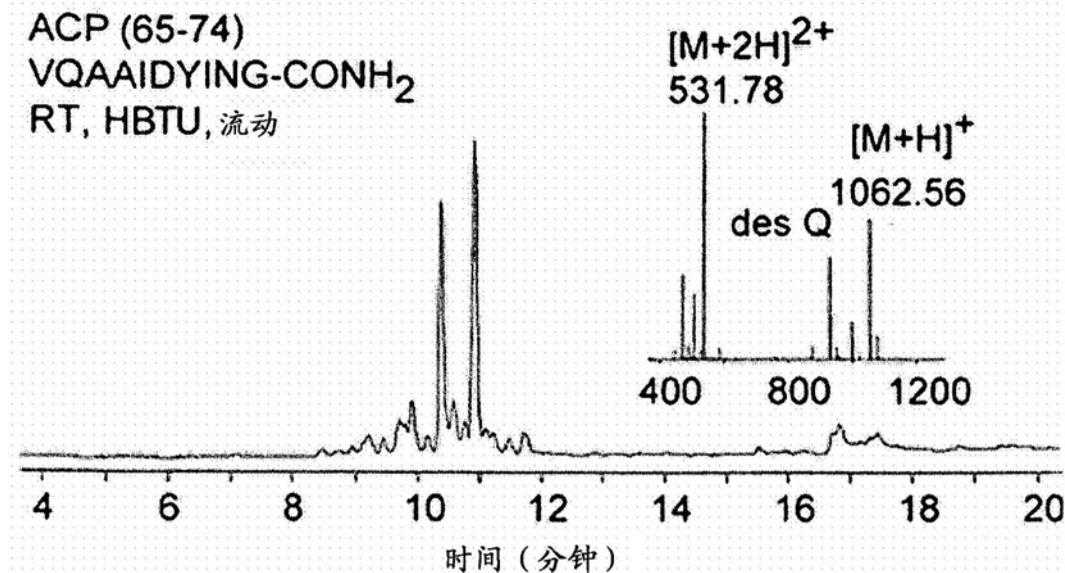


图4C

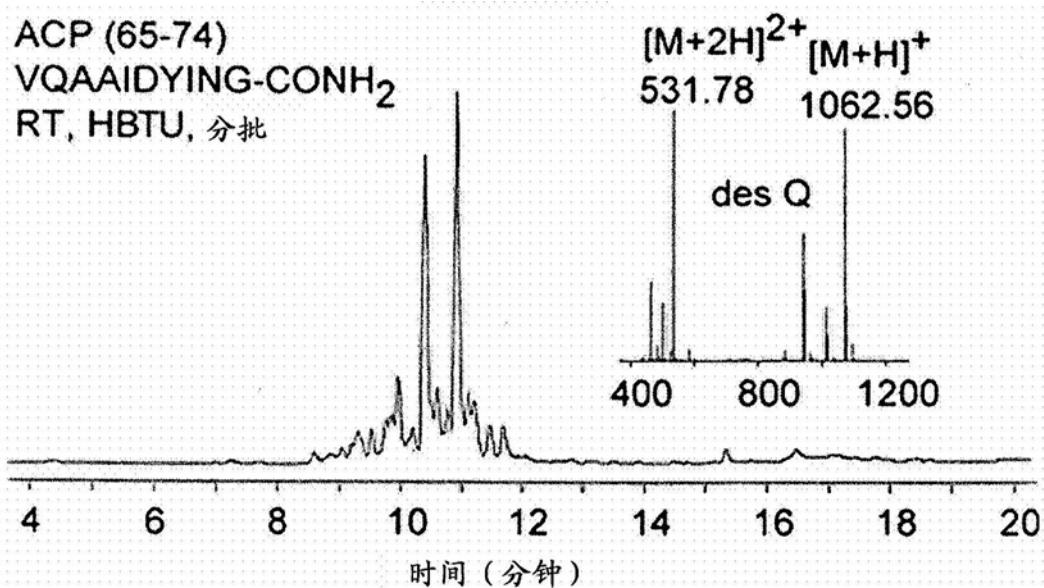


图4D

PnIA(A10L) 芋螺毒素 GCCSLPPCALNNPDYC-CONH2

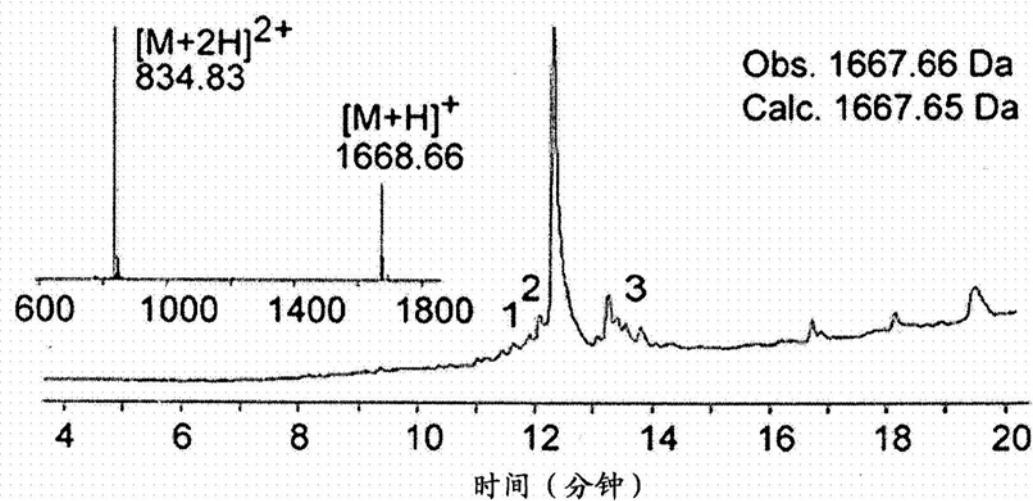


图5A

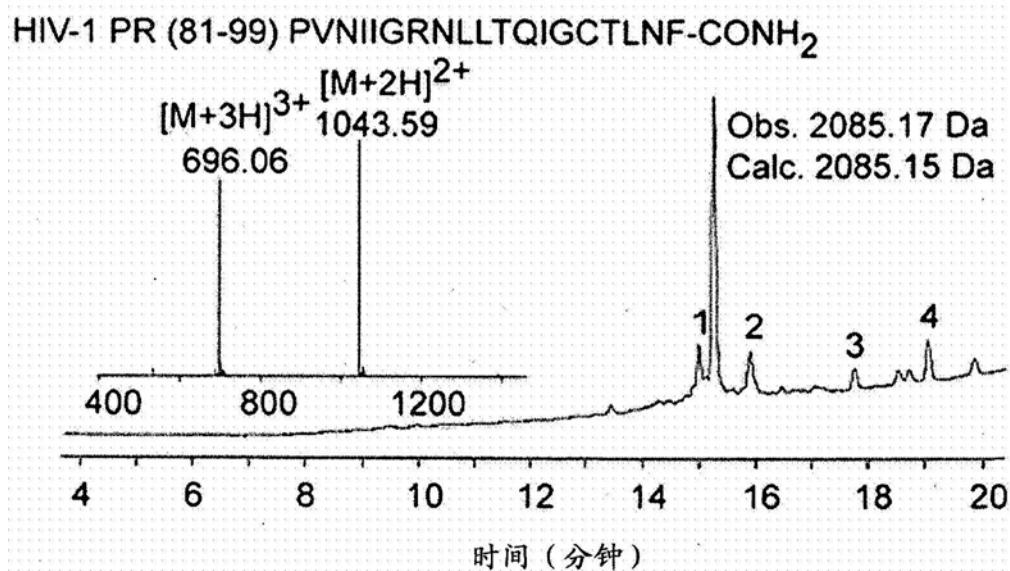


图5B

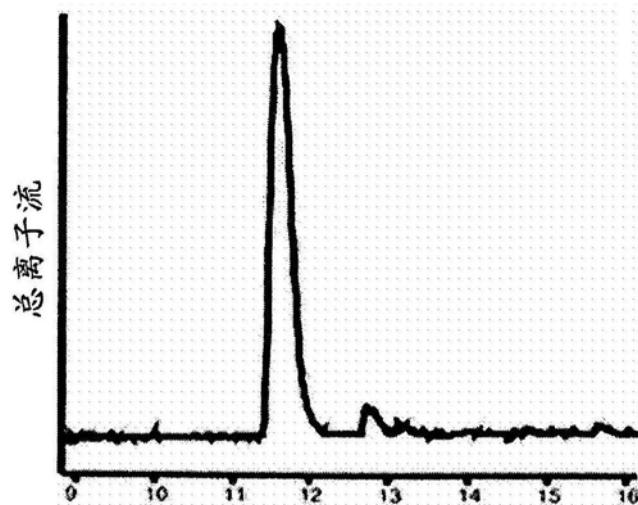


图6A

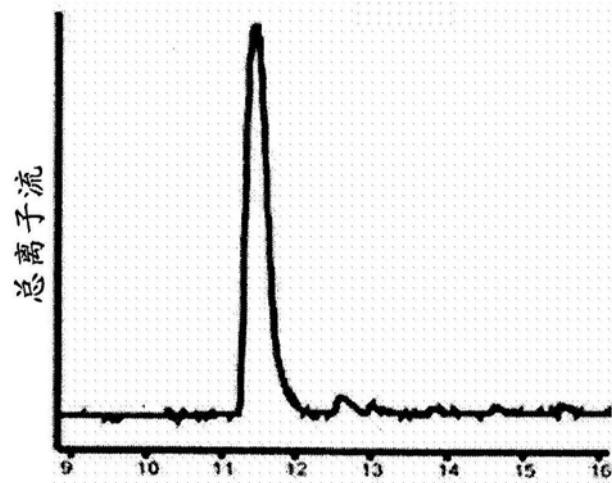


图6B

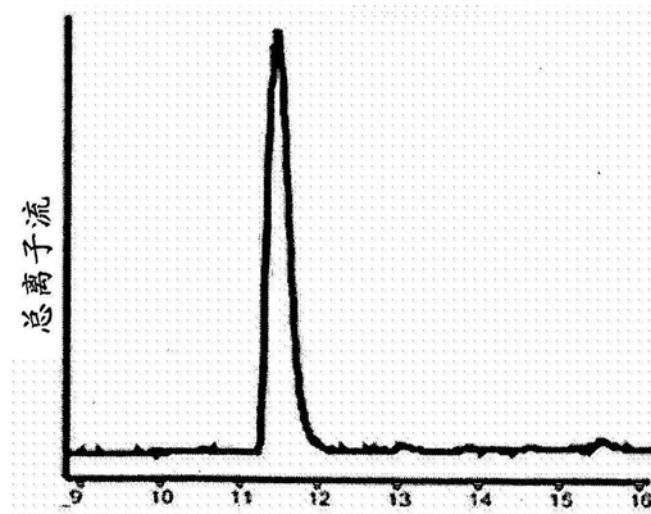


图6C

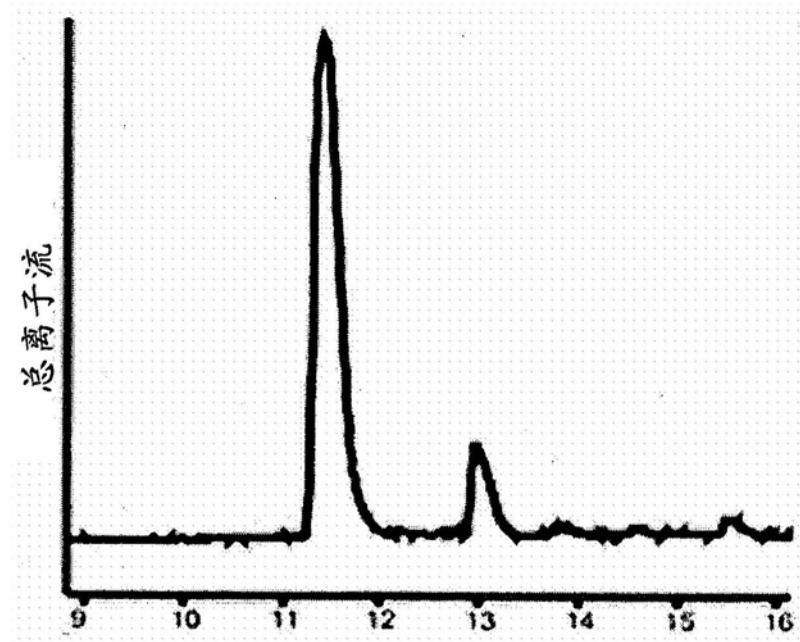


图6D

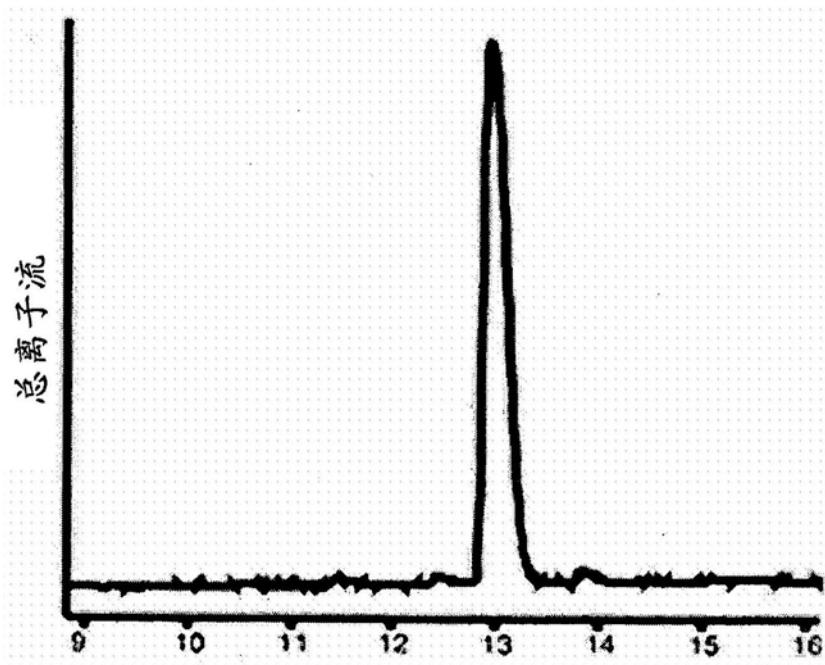


图6E

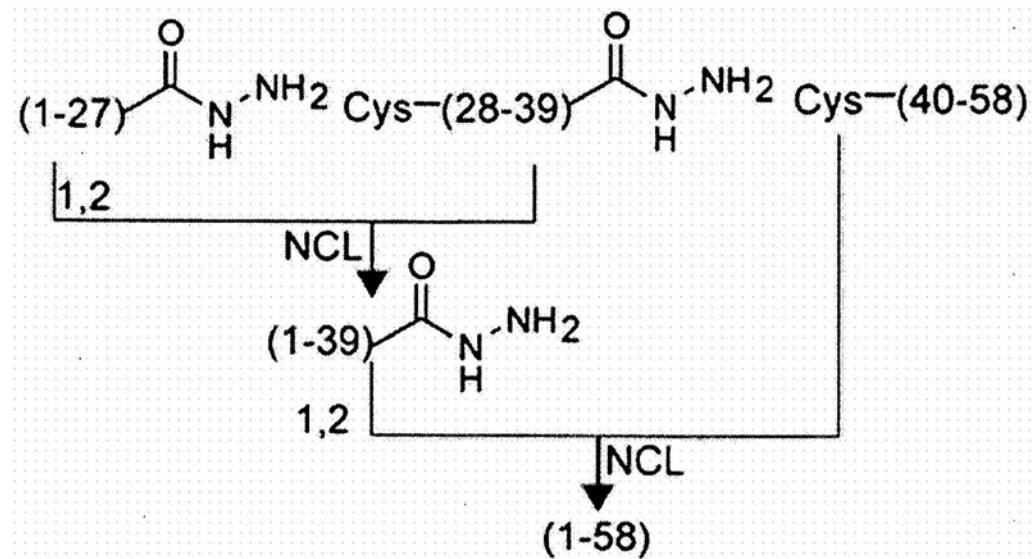


图7A

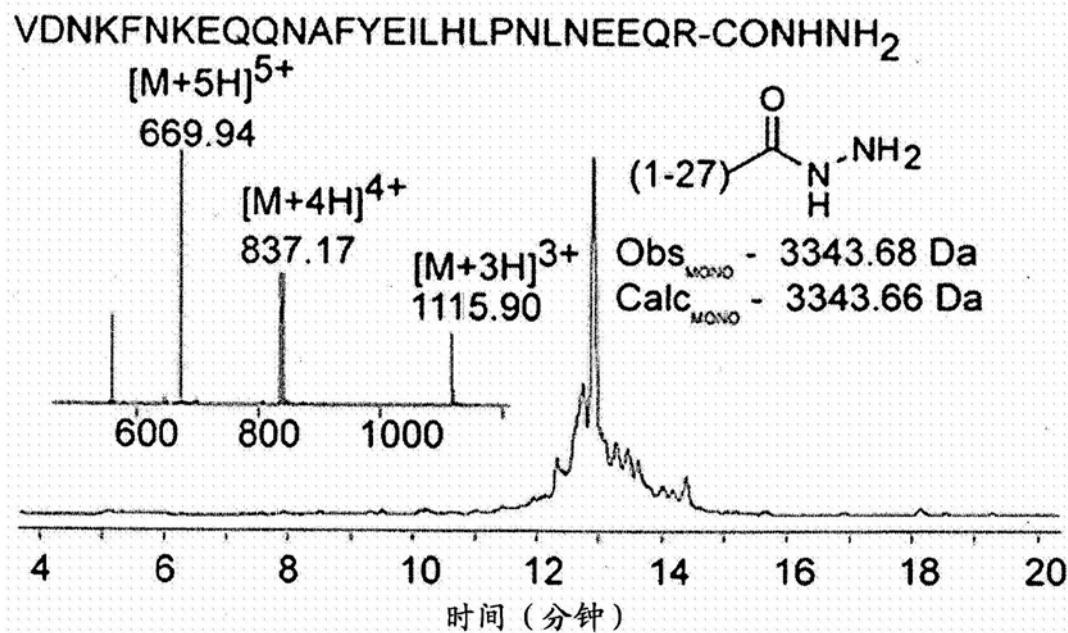


图7B

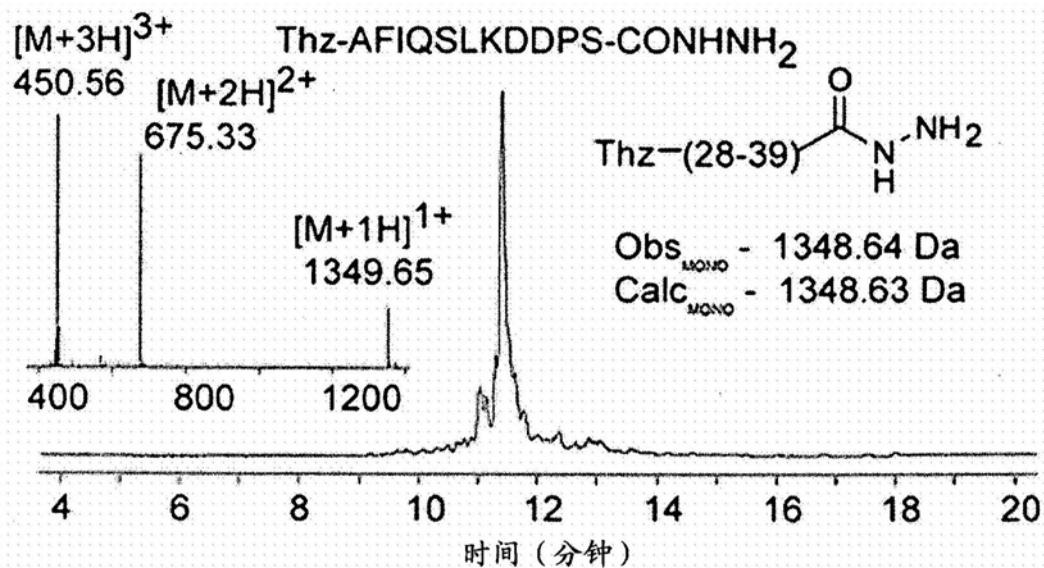


图7C

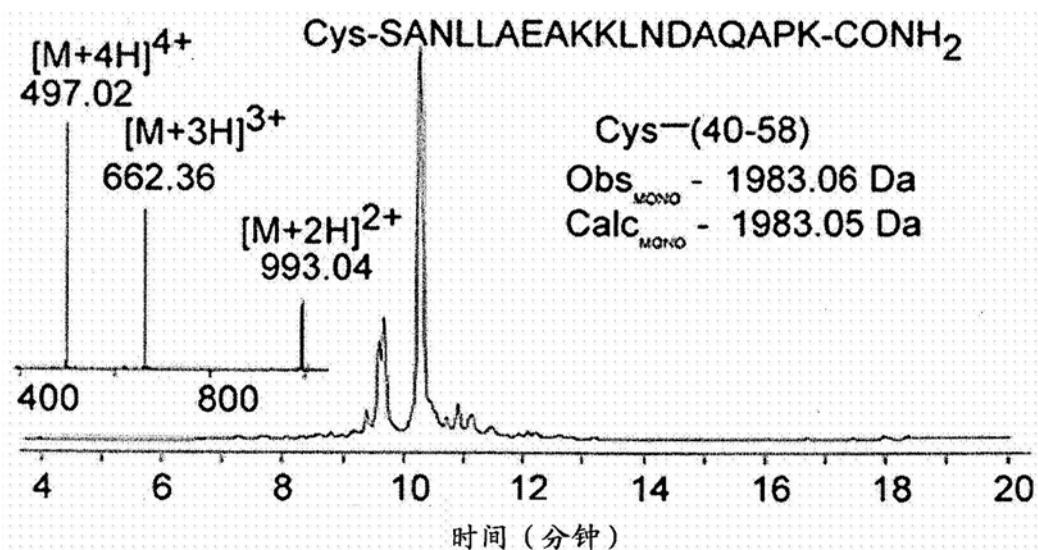


图7D

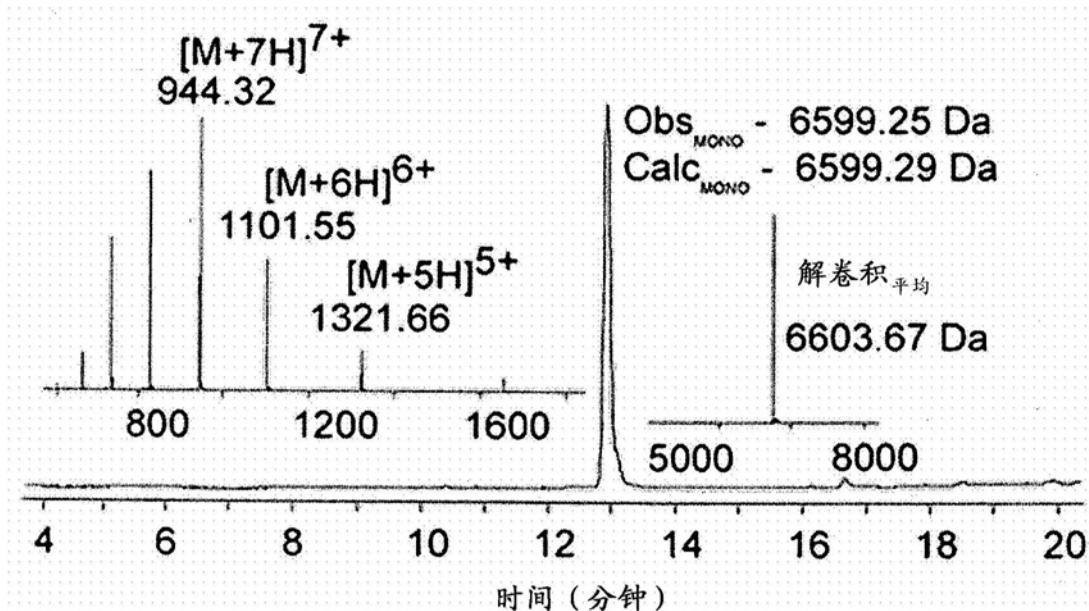


图7E

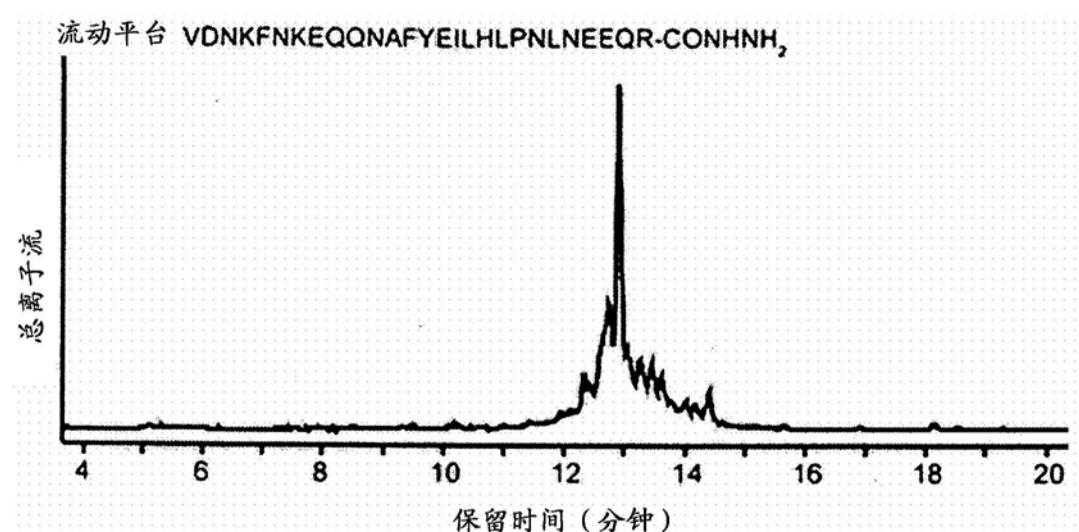


图8A

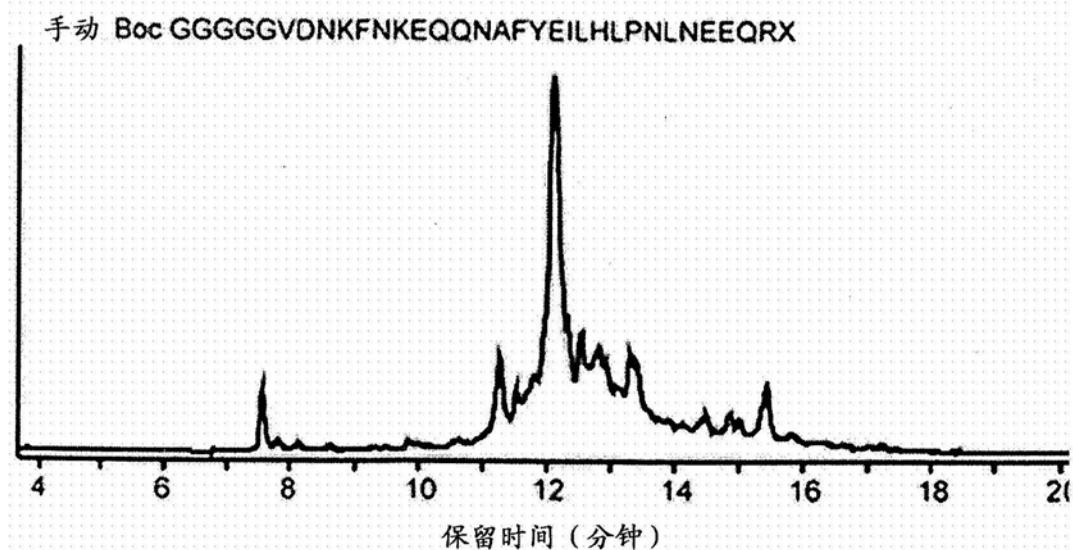


图8B

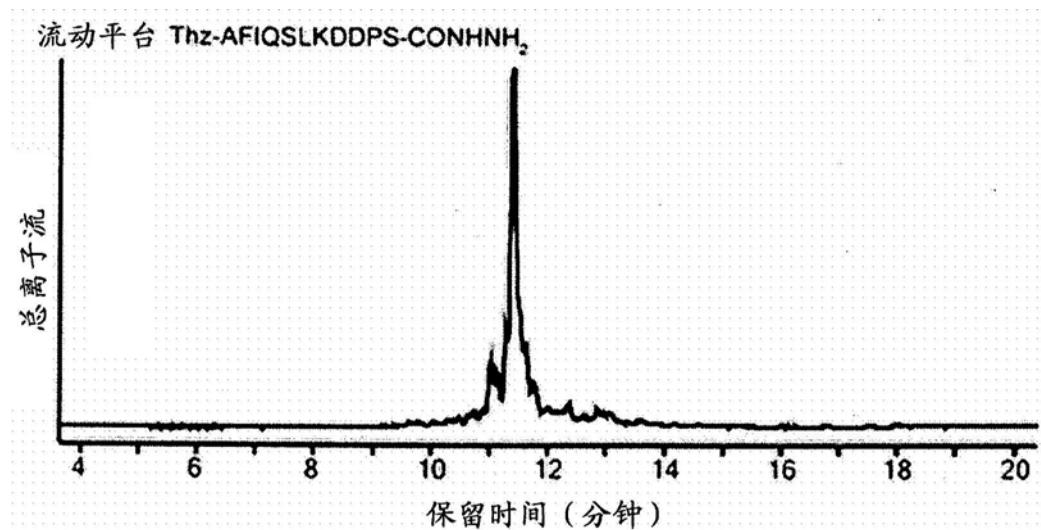


图8C

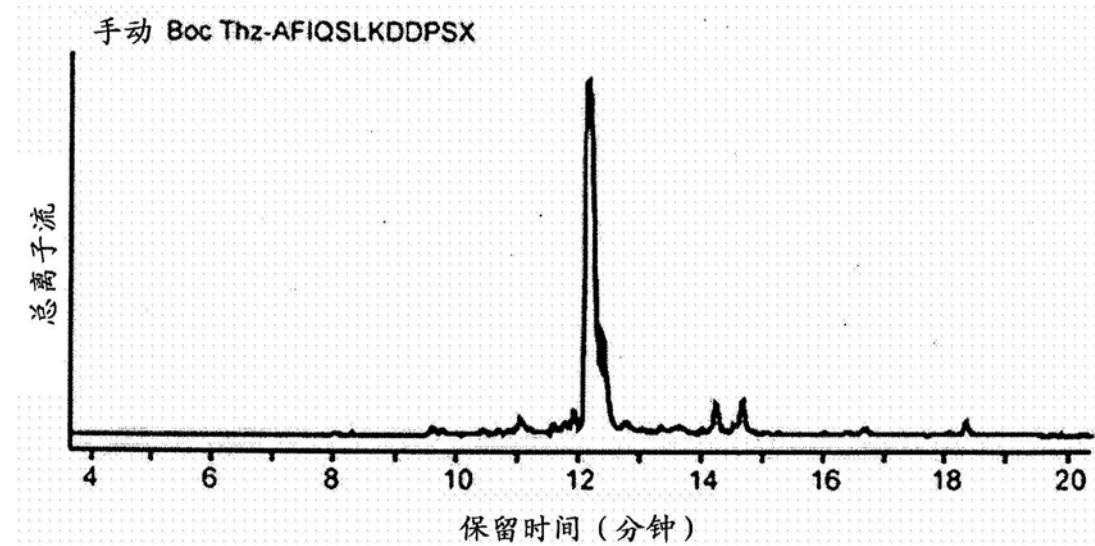


图8D

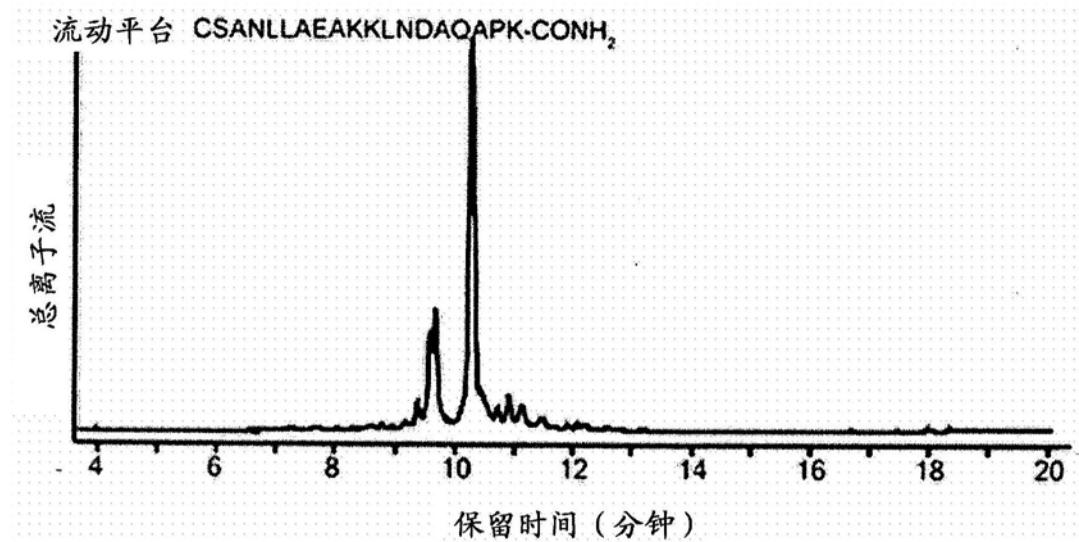


图8E

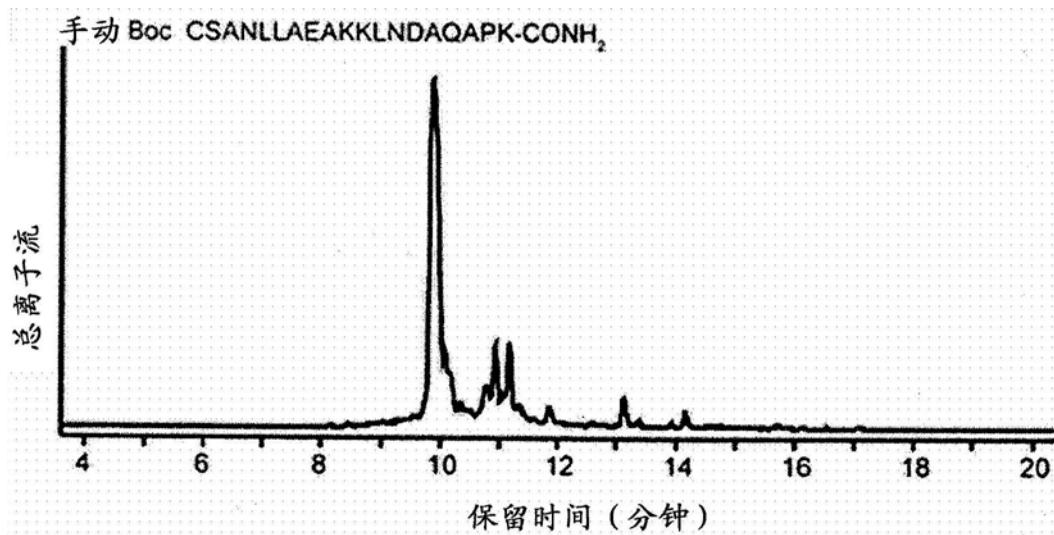


图8F

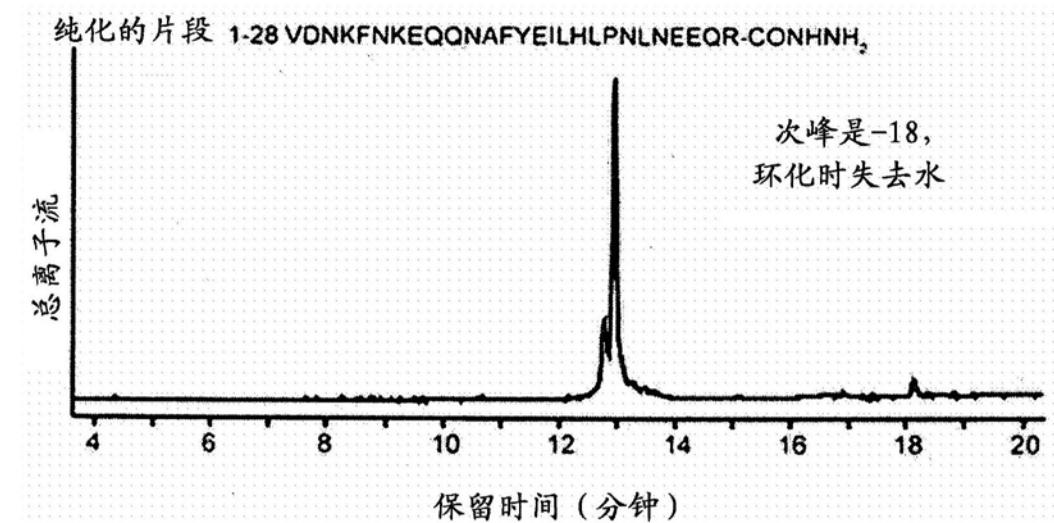


图9A

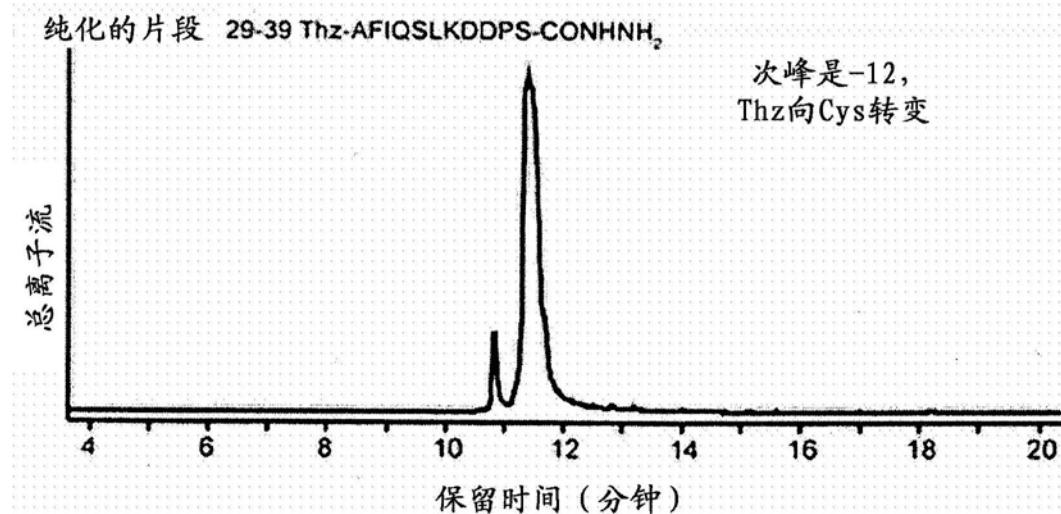


图9B

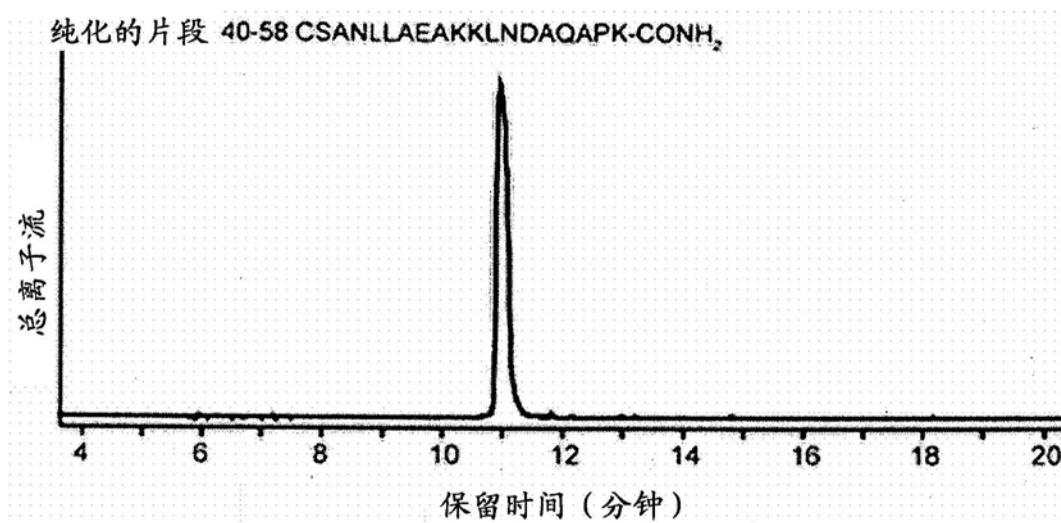


图9C

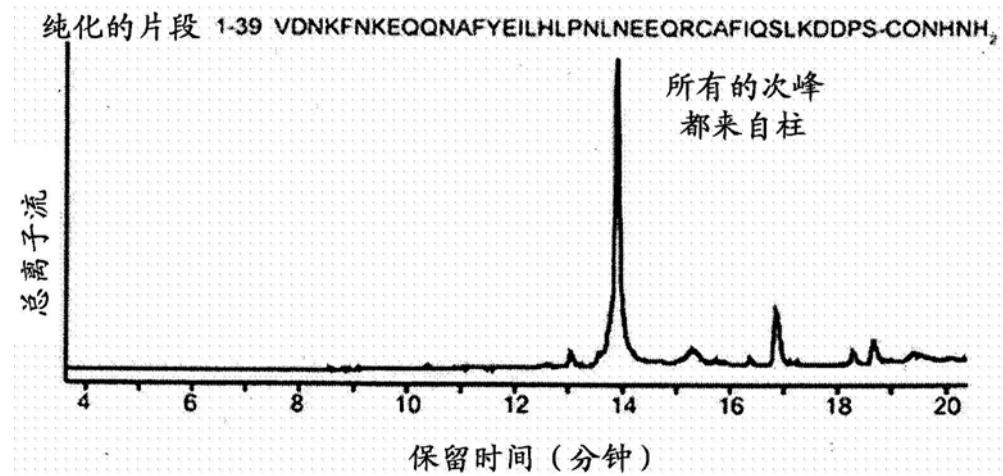


图9D

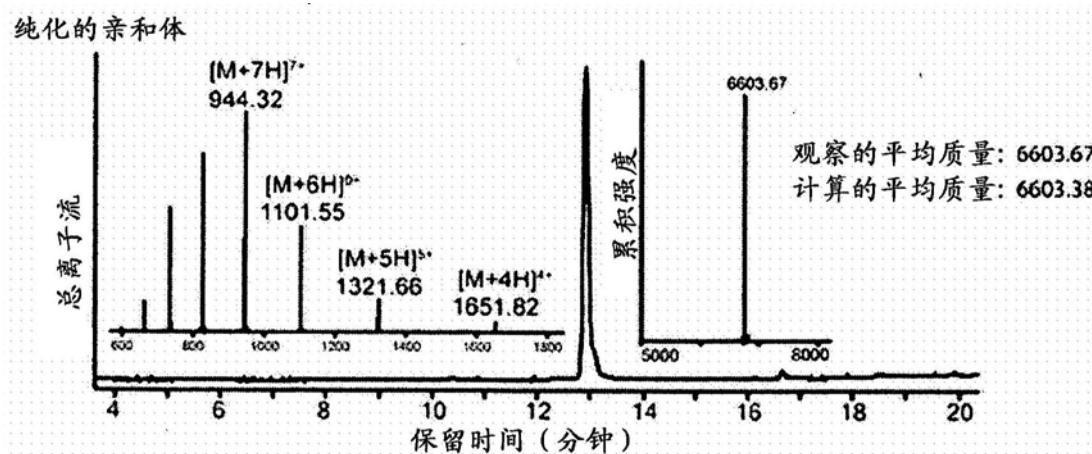


图9E

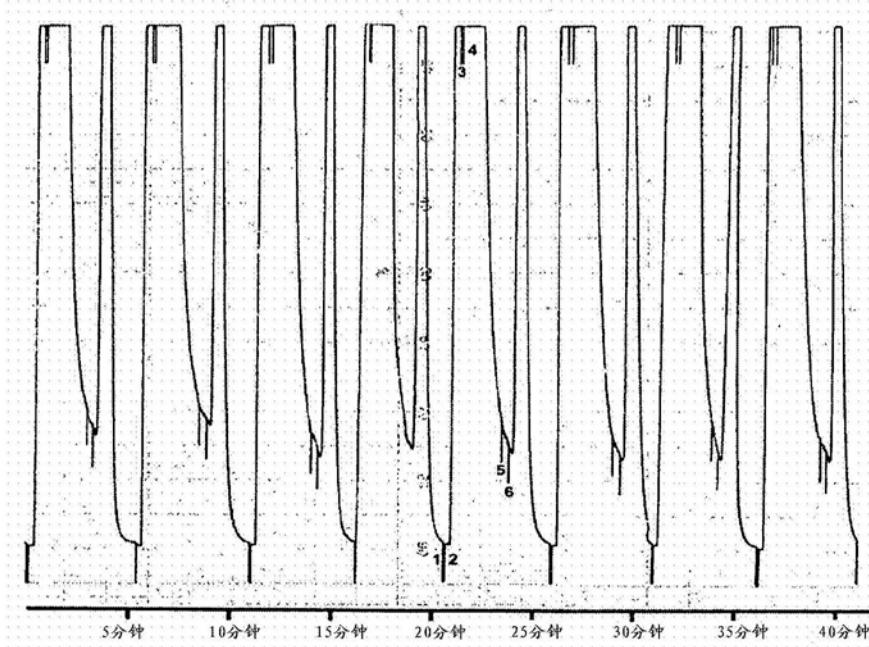


图10

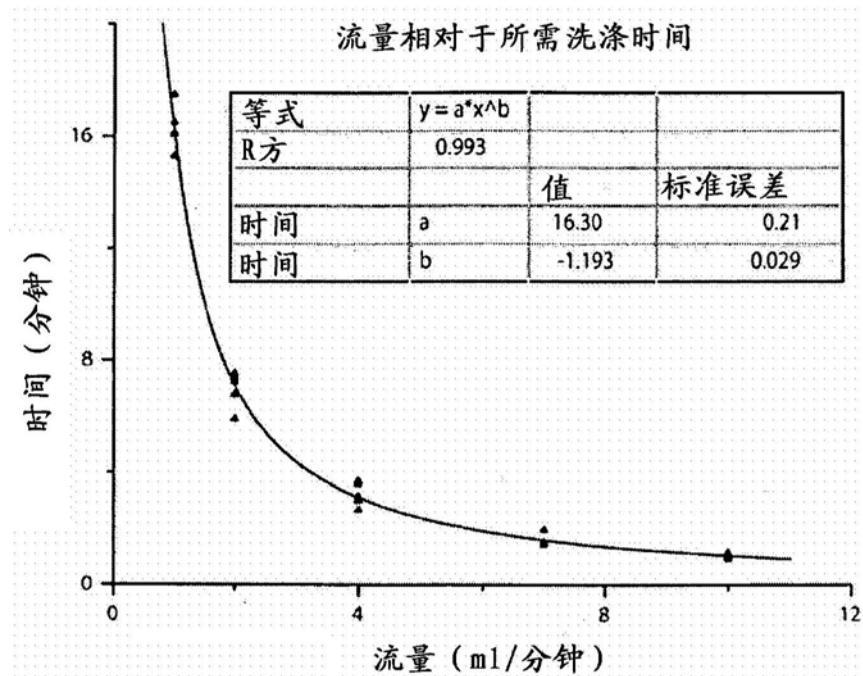


图11

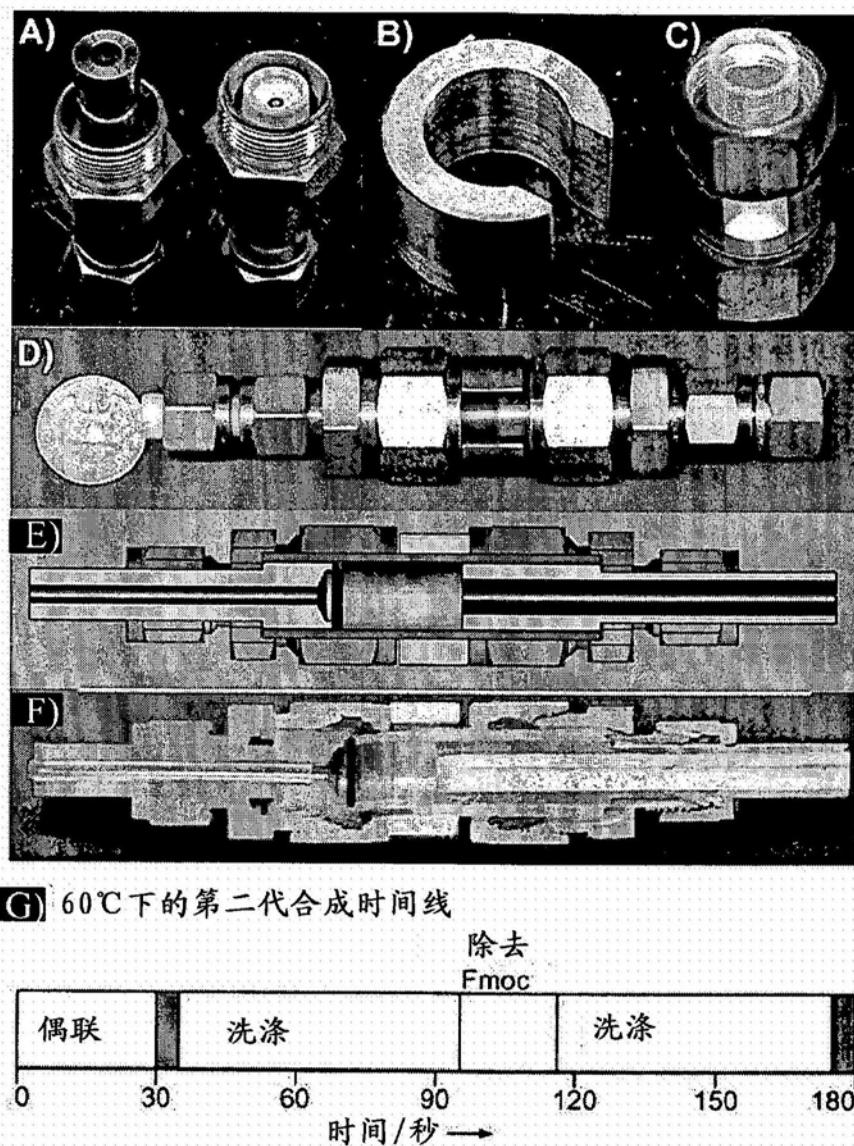


图12

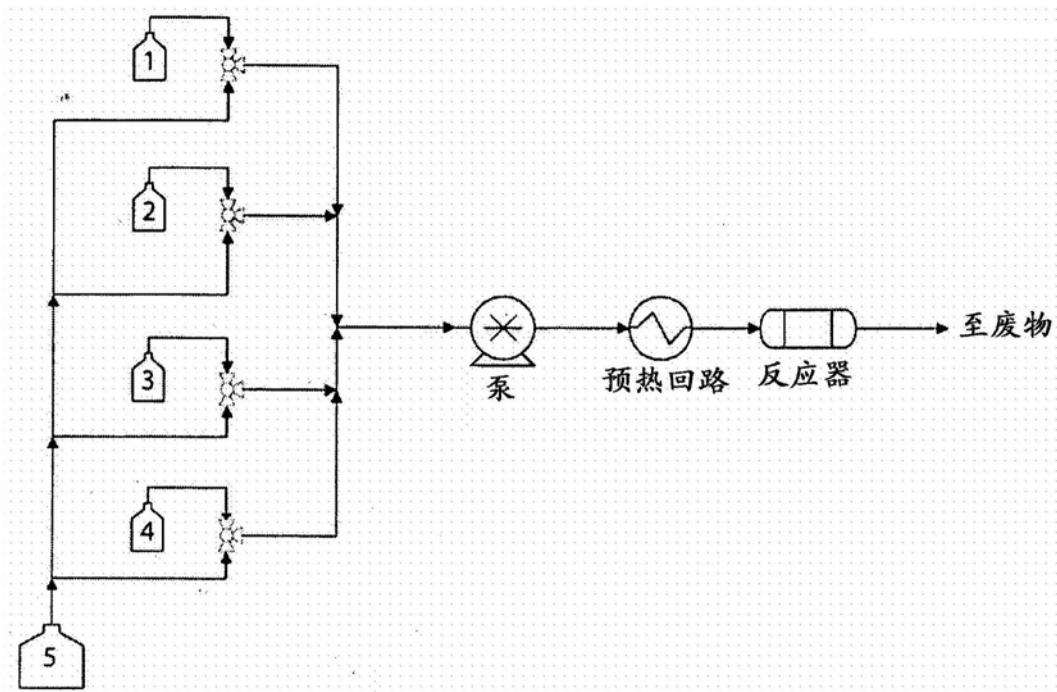


图13

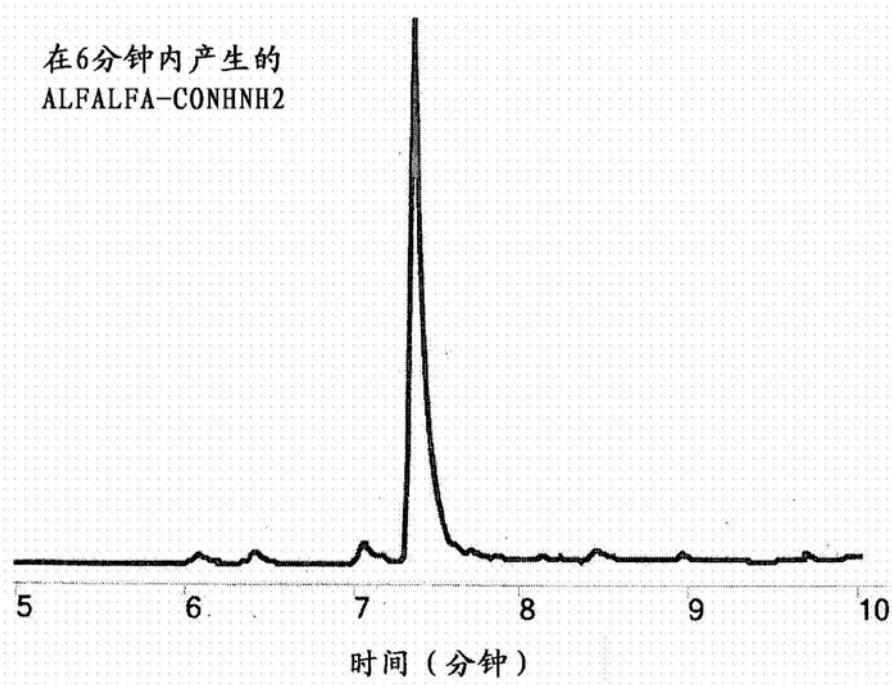


图14

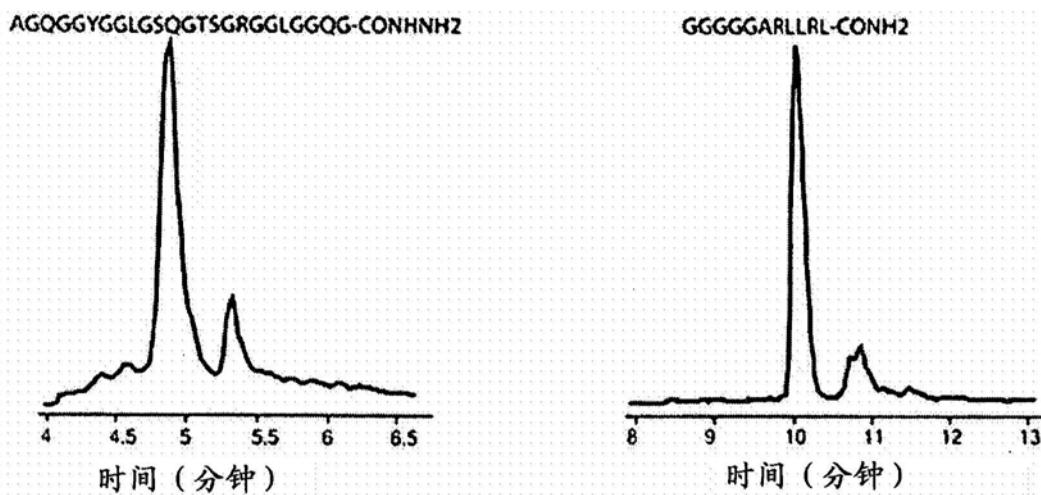


图15

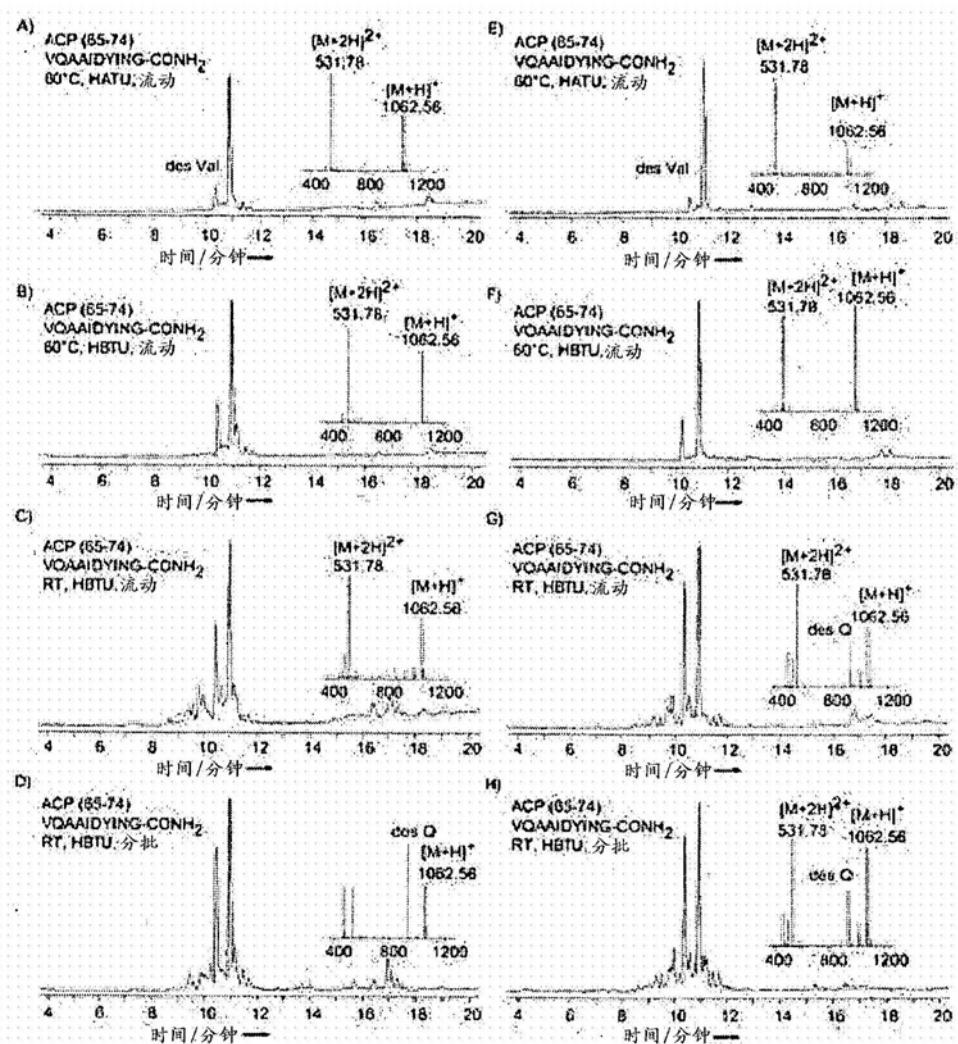


图16

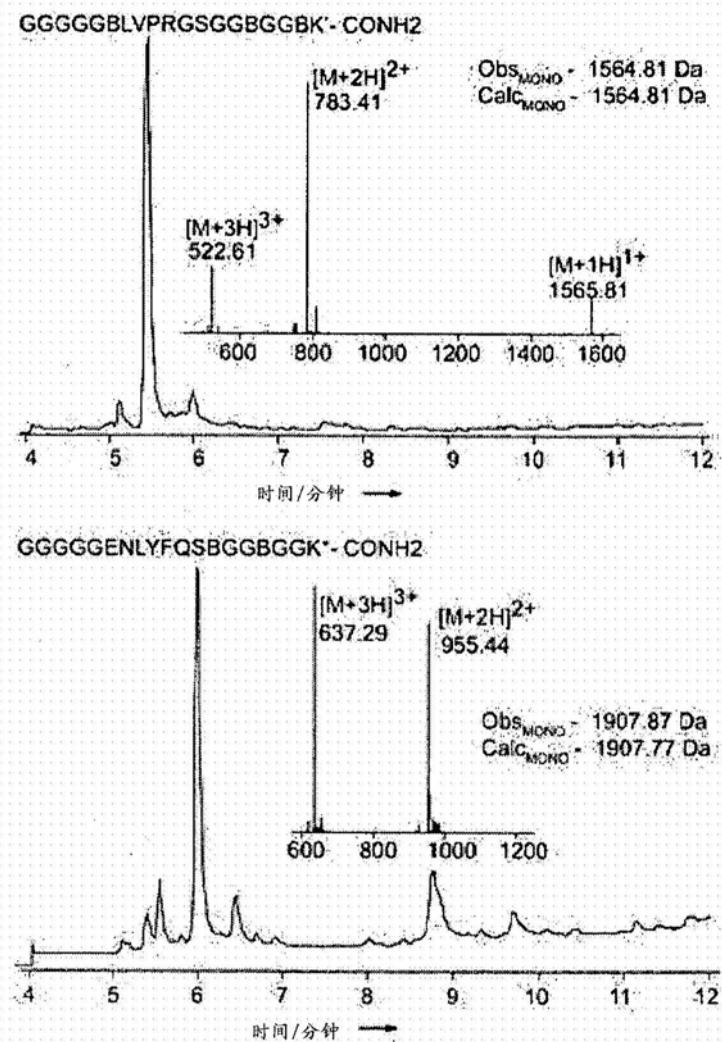


图17

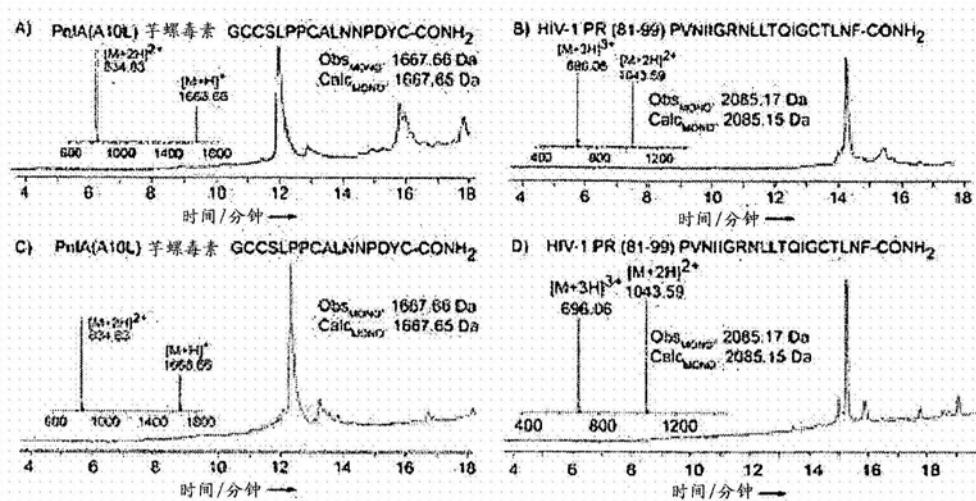


图18

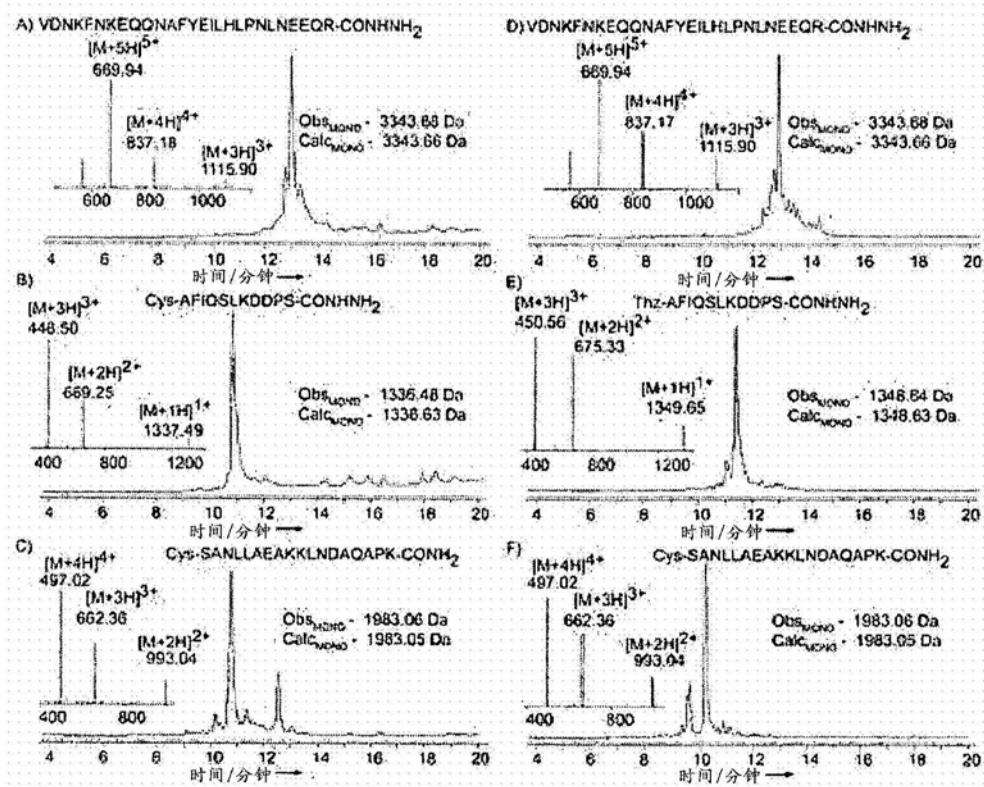
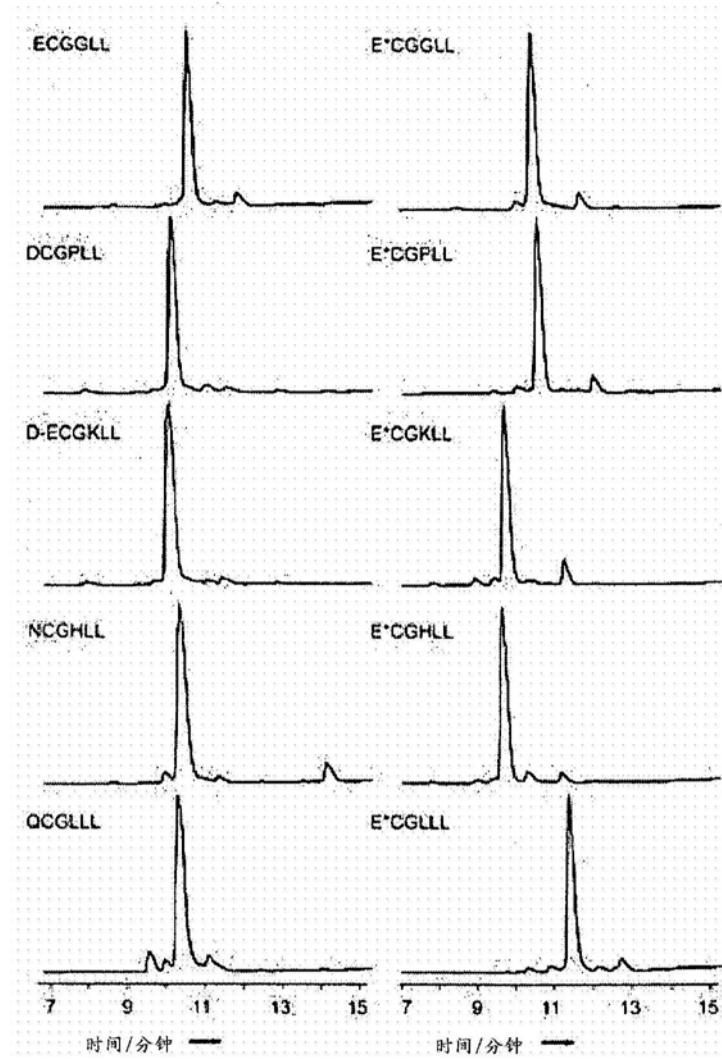


图19



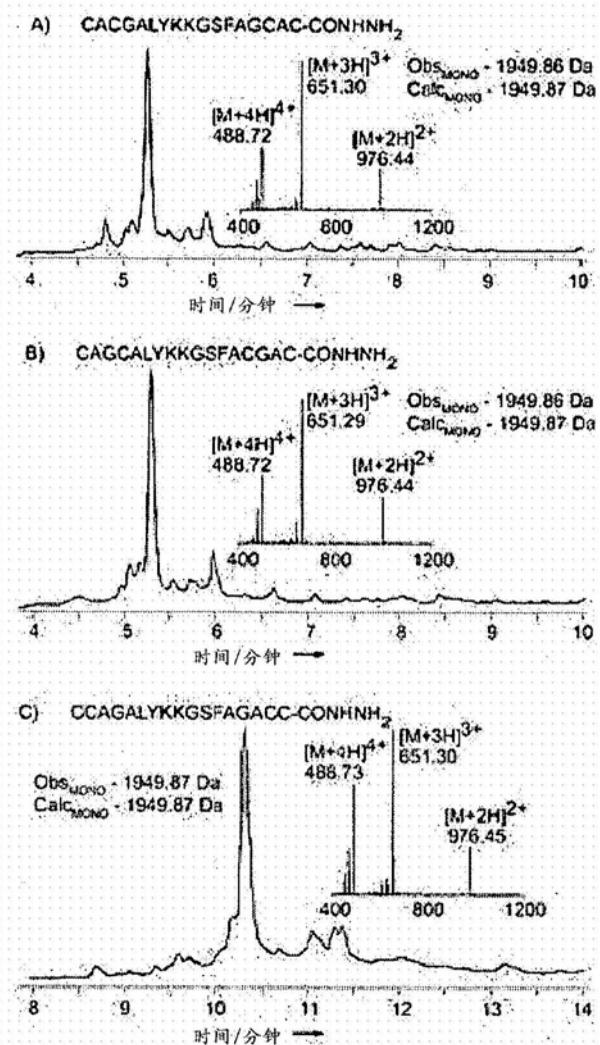


图21

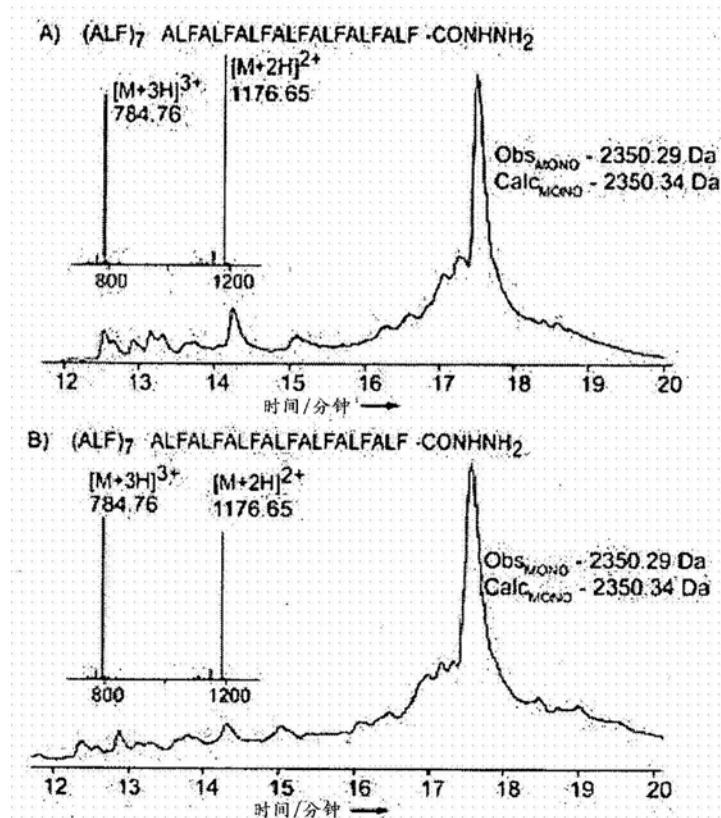


图22

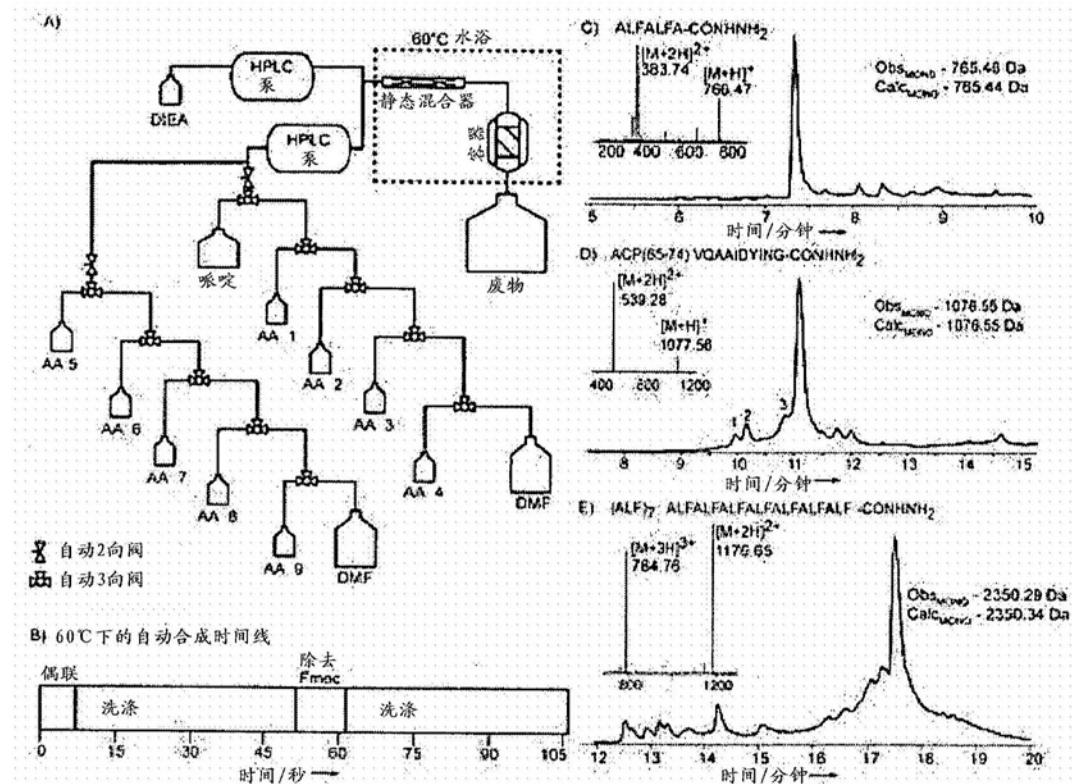


图23

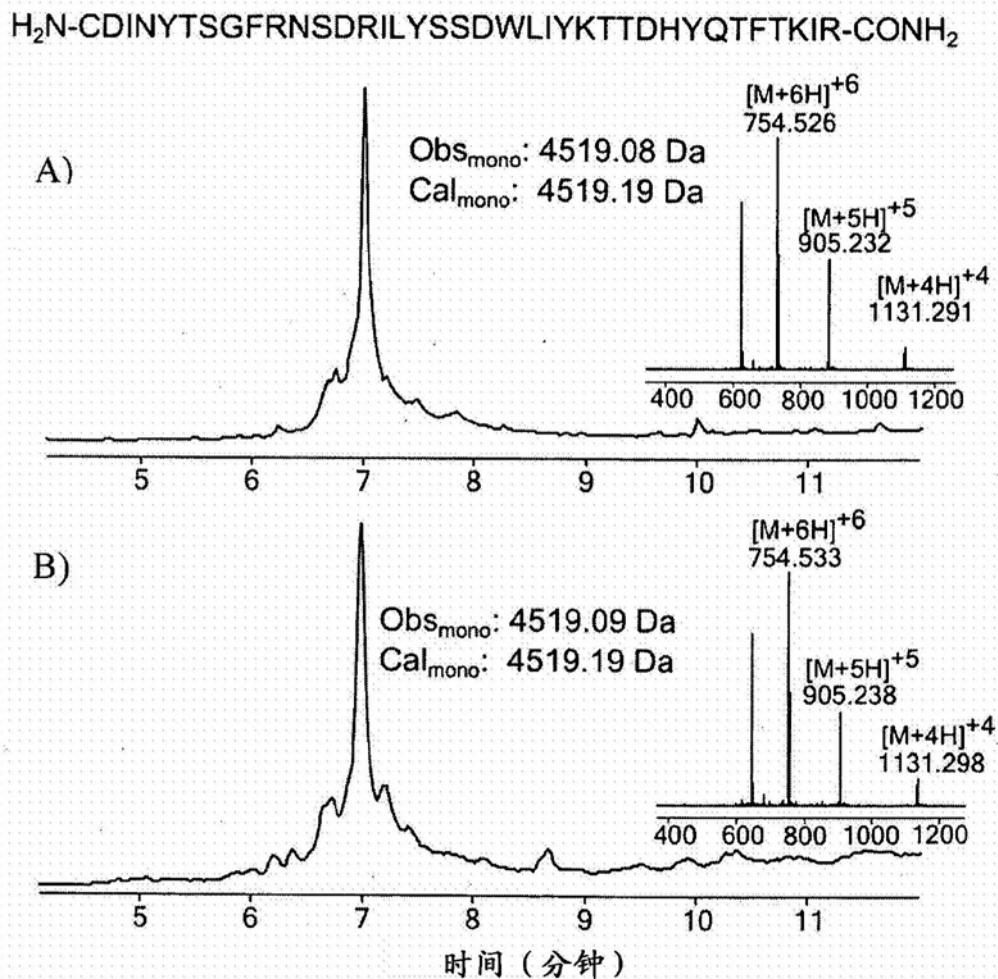


图24

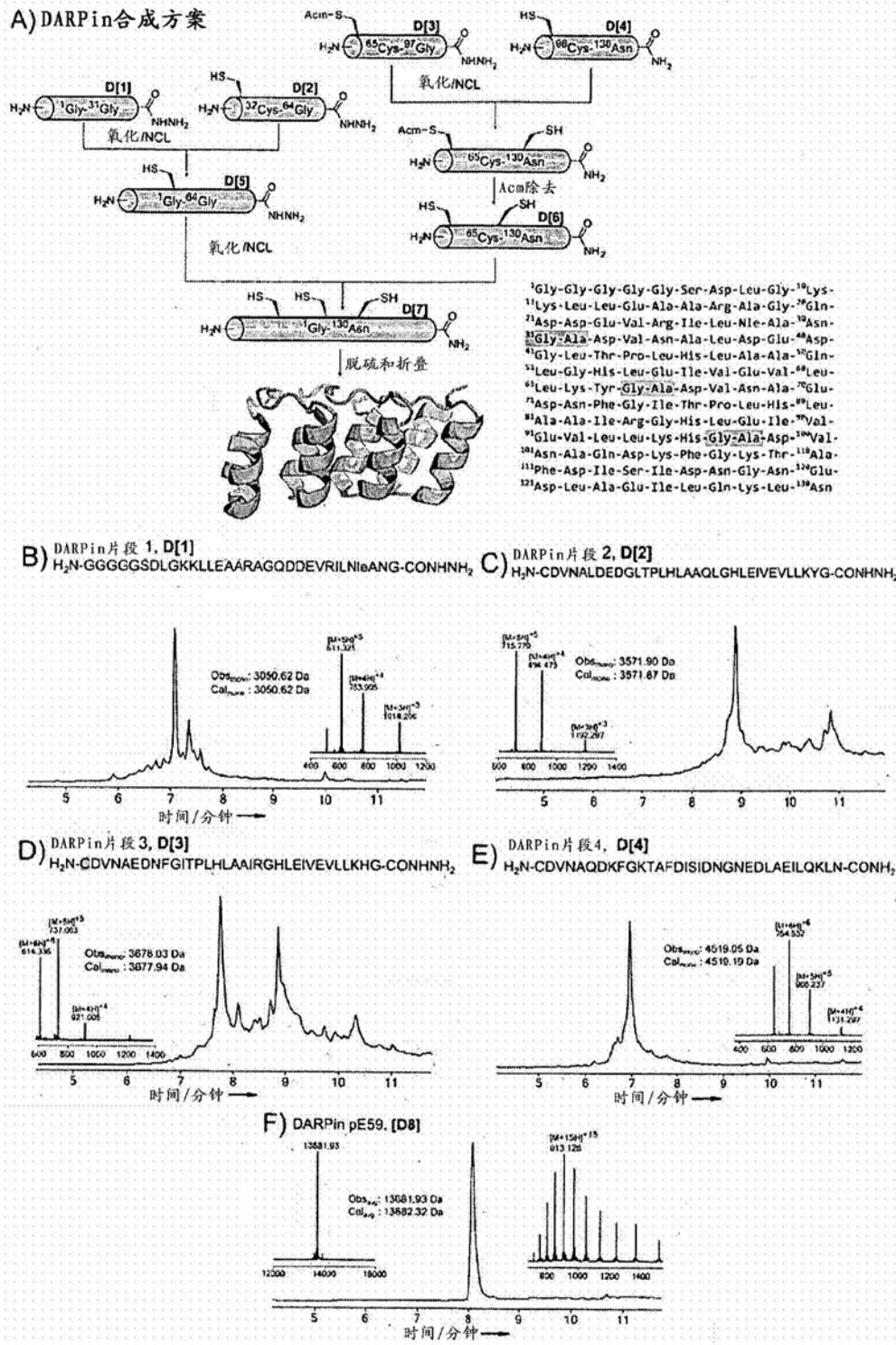


图25

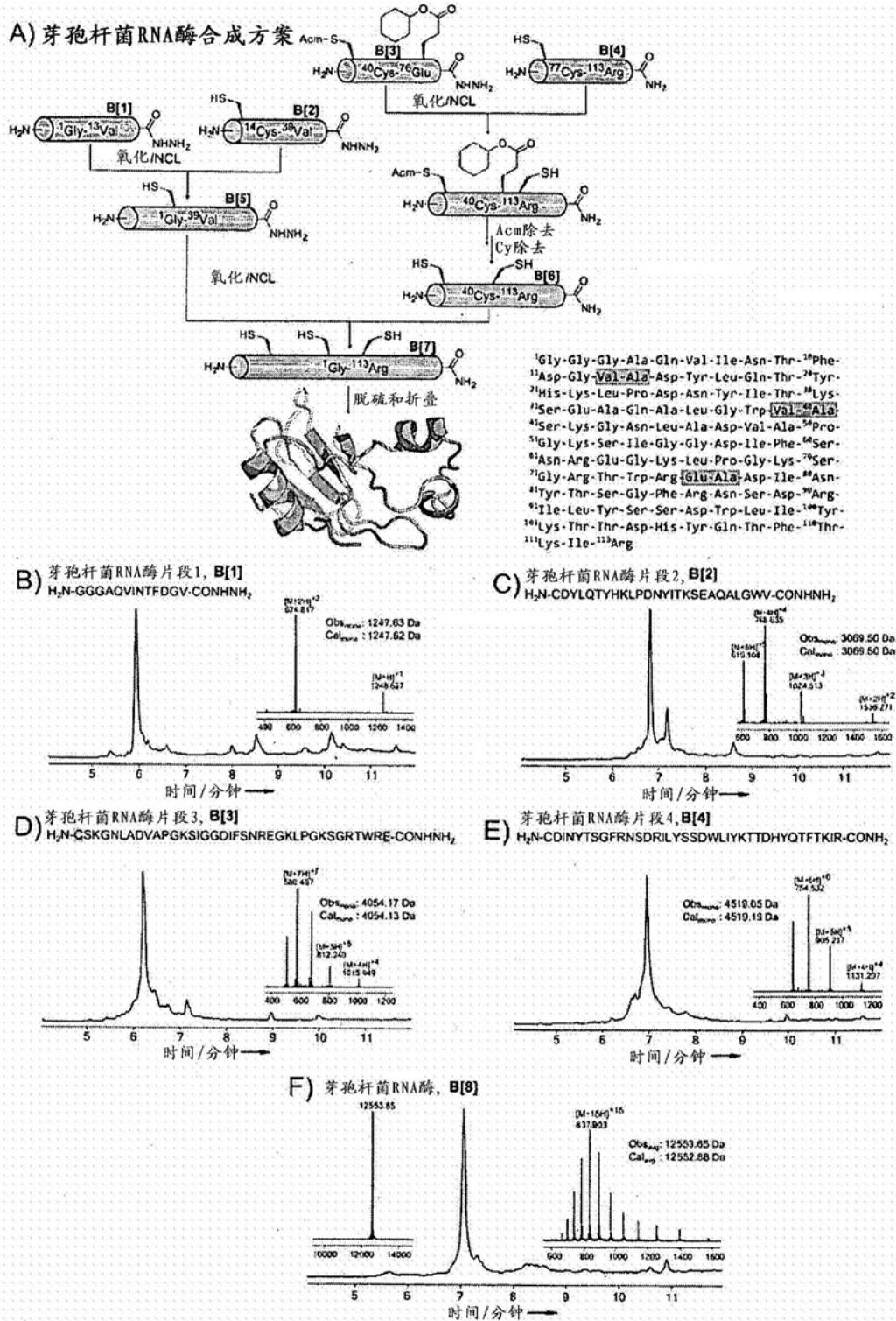


图26

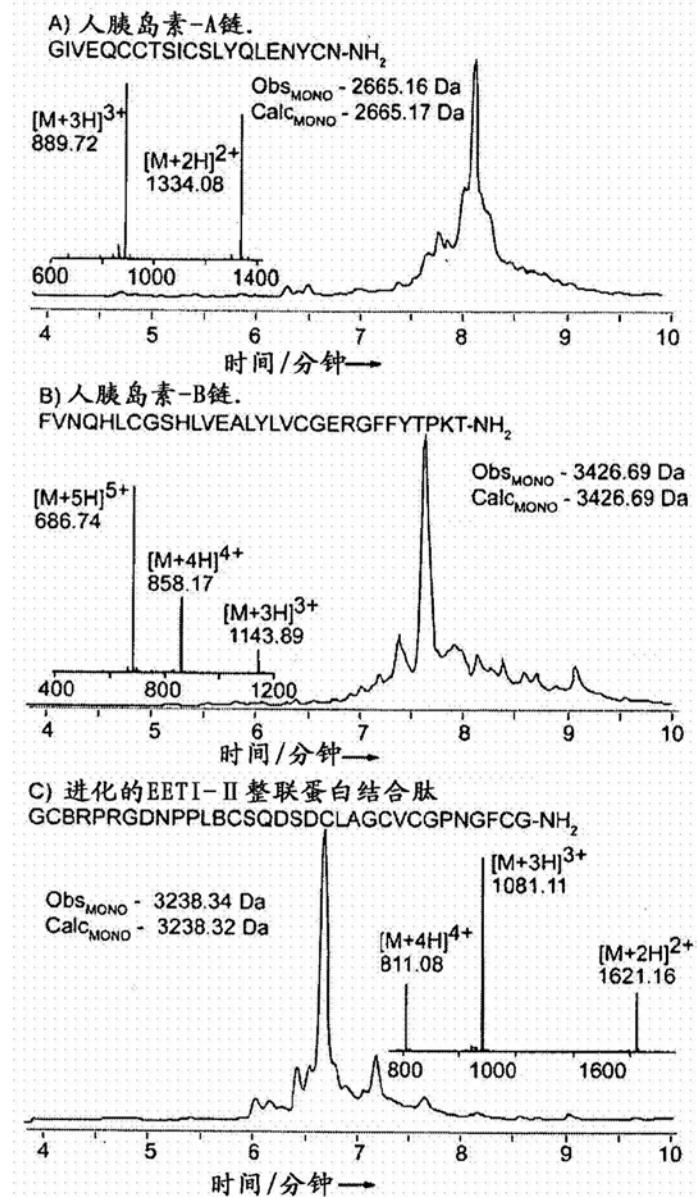


图27