



NORGE

(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **310464**

(13) **B1**

(51) **Int Cl⁷ C 07 K 1/04, C 07 H 21/00**

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19930613	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1991.08.12, PCT/EP91/01529
(22) Inng. dag	1993.02.22	(85) Videreføringsdag	1993.02.22
(24) Løpedag	1991.08.12	(30) Prioritet	1990.08.31, DE, 4027675
(41) Alm. tilgj.	1993.04.19		
(45) Meddelt dato	2001.07.09		

(71) Patenthaver	Jerini Bio Tools GmbH, Biochemische Produkte, Rodower Chaussee 29, D-12489 Berlin, DE
(72) Oppfinner	Ronald Frank, Braunschweig, DE Sinan Güler, Braunschweig, DE
(74) Fullmektig	Bryns Zacco AS, 0106 Oslo

(54) **Benevnelse** Fremgangsmåte for hurtig syntese av substratbundede eller frie peptider eller oligonukleotider, samt et flatemateriale fremstilt på denne måten og anvendelse av et slikt materiale

(56) **Anførte publikasjoner** NO 301233, EP 260634, US 4689405
Chemical Abstract 112:199140
Chemical Abstract 108:167891

(57) **Sammendrag**

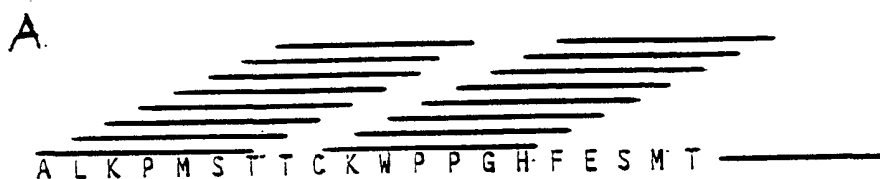
En fremgangsmåte for hurtig syntese av bærerbundede eller frie peptider, anordning for gjennomføring av fremgangsmåten, et flatemateriale med derpå bundede peptider fremstilt ifølge fremgangsmåten og anvendelse av flatematerialet er beskrevet.

Fremgangsmåte for hurtig syntese av bærerbundede eller frie peptider eller oligonukleotider, dermed fremstilt flate-materiale og anvendelse derav samt temperatur for gjennomføring av fremgangsmåten, er beskrevet.

5

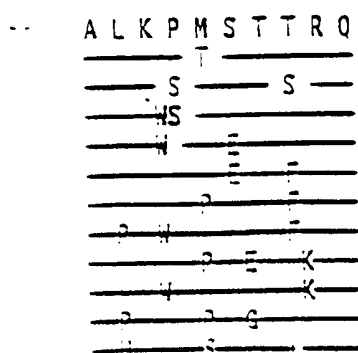
Proteiner spiller en avgjørende rolle i nesten alle biologiske prosesser som enzymatisk katalyse, transport og lagring, koordinerte bevegelser, mekaniske støttefunksjoner, immunbeskyttelse, nervestimulering og kontroll av vekst og differensiering. Proteiner er bygd opp av en eller flere lineære polypeptidkjeder. Deres mange funksjoner oppnår de gjennom deres tredimensjonale folding og assosiasjon av disse kjedene. Folding og 3D-strukturen er bestemt av aminosyre-primærsekvensen til kjeden. De mangfoldige proteinstrukturene i naturen blir oppnådd gjennom kombinasjon av 20 aminosyrebygggestener. Korte delsekvenser (oligopeptider) kan i en viss grad imitere de lokale strukturene og funksjonene til en sekvens i total protein samlingen. Oligopeptider kan videre bli fremstilt ved kjemisk syntese. Syntetiske oligopeptider er dermed et viktig hjelpemiddel ved strukturfunksjonsanalyse av proteiner.

25



30

B



35

På grunn av størrelsen og kompleksiteten til proteinene er det nødvendig med mange peptider for systematiske studier.

5 A) Lokalisering av en funksjonell region innenfor en lengre peptidkjede gjennom overlappende peptider (jfr. M. Z. Atassi, Eur. J. Biol. 145, 1-20 (1984); H. M. Geysen, R. H. Meloen og S. J. Barteling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3998 (1984).

10 B) Bestemmelse av aminosyrerester som er essensielle for funksjonen ved substitusjonsanalyse (jfr. R. A. Houghton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5131 (1985), H. M. Geysen, R. H. Meloen, og S. J. Barteling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3998 (1984).

15 Biologiske testreaksjoner som enzymatisk omsetning og antistoffdannelse er meget sensitive slik at bare små mengder (ng til μ g) peptidsubstrat er tilstrekkelig. For en hurtig, enkel gjennomføring av slike tester er det fordelaktig at
20 peptidsubstratet er immobilisert på et fast bærer materiale og som lett kan bli fjernet fra reaksjonsoppløsningen. Reaksjonen med peptider kan deretter bli målt kvantitativt enten i den dannede reaksjonsoppløsningen eller gjennom påfølgende analyse av det bærerbundede materialet.

25 Omfanget hvorved slike systematiske undersøkelser blir gjennomført med avhenger vesentlig av hurtigheten av peptidsyntesen og av teknisk/kjemisk konsepsjon av bærerene. Hurtige peptidsynteser kan bli gjennomført ifølge prinsippet
30 utviklet av Merrifield for trinnvis syntese på faste faser (R. B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1963)).

I det følgende blir det beskrevet en fremgangsmåte hvorved det er mulig å fremstille fordelaktig mange (flere hundre)
35 immobiliserte oligopeptider pr. arbeidsdag i en for testformål tilstrekkelig mengde og på et egnet bærer- henholdsvis et flatemateriale.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for hurtig syntese av bærerbundede eller frie peptider, hvor man utgår fra en eller flere funksjonaliserte bærere og trinn for trinn syntetiserer tilsvarende den gitte aminosyresekvensen de 5 ønskede peptidene ifølge en egnet syntese fremgangsmåte, kjennetegnet ved at man

- anvender et flatemateriale som bærer;
- for kobling av små alikvoter påføres punkt- eller 10 strekformig på flatebæreren en oppløsning av den ønskede aminosyren eller det ønskede di- eller oligopeptidet i form av aktiverte derivater derav, eller syntese av opptil flere forskjellige peptider på et flatemateriale samtidig ved siden av hverandre på punkt- eller strekformige 15 reaksjonsflater som ikke berører hverandre;
- koblingsreaksjon gjennomføres på reaksjonsflater som dannes ved fukting og eventuelt
- separere det ferdige peptidet fra flatebæreren ved hjelp av en egnet avspaltningsoppløsning.

20 Foreliggende oppfinnelse omfatter også et flatemateriale som er kjennetegnet ved at det er bundede peptider fremstilt som nevnt ovenfor. Videre omfatter oppfinnelsen anvendelse av flatemateriale for mikrobiologiske, og spesielt diagnostiske, 25 formål innen human- og veterinærmedisin for spesifikt bevis for bakterielle og virale infeksjoner.

Ved hjelp av en spesiell utførelsesform syntetiserer man opptil mange forskjellige peptider på et flatemateriale 30 samtidig ved siden av hverandre på punkt- eller strekformige reaksjonsflater som ikke berører hverandre.

Ifølge en ytterligere spesiell utførelsesform anvender man som et flatemateriale en porøs eller ikke-porøs folie, en 35 membran eller et slikt papir som for koblingen av aminosyrer eller peptider oppviser egnet, kjemisk reaksjonsdyktig funksjon.

Som bærer materiale anvendes, overfor de tilsatte reagensene og oppløsningsmidlene, et mekanisk stabilt kjemisk inert platemateriale. Dette kan være porøst eller ikke porøst og etter behov bli anbragt på et underlag eller være selv-
5 bærende. Benyttes kan for eksempel folier, plater, membraner, papirer. Det vesentlige er at flatematerialet bærer kjemiske reaksjonssyktige grupper (funksjoner) hvorpå de C-terminale byggestenene for peptidoppbygningen (egnede beskyttede
10 aminosyrer, di- eller oligopeptider) kan bli kovalent sammenkoblet.

Bærer materialet som blir tilsatt for den kjemiske syntesen er fortrinnsvis også egnet for tilsetning i de biologiske
15 testreaksjonene. De fremstilte peptidene kan på denne måten direkte bli tilsatt uten isolering og påfølgende immobili-
sering når koblingen mellom peptidet og bærer materialet blir valgt slik at de er stabile overfor alle kjemiske reaksjoner i løpet av peptidsyntesen.

20 Når bærer materialet er porøst står også den indre overflaten til rådighet for syntesen. Vaskeoperasjoner kan også bli gjennomført ved at man gjennom suger oppløsningen gjennom materialet. Ikke-porøst bærer materiale har en meget mindre
25 overflate. Vaskeoperasjonene kan foregå ved en enkel avspyling.

For fremgangsmåten for peptidsyntesen ifølge oppfinnelsen egner for eksempel flatematerialer av cellulose (bærer
30 hydroksylfunksjoner og kan bli tilsatt direkte) seg, glass eller kunststoffer som polyetylen, polypropylen og teflon, og deres overflate egnede kjemiske funksjoner blir innført for eksempel med podopolymerisering av akrylsyre eller derivatene derav. Funksjonaliseringen av overflatene kan videre
35 eksempelvis foregå gjennom innføring av aminopropylgrupper, glycin- eller diglycinankergrupper.

Størrelsen på reaksjonsoverflatene avhenger av de på bæreren påførte volumene, de absorberende egenskapene til bærer-materialet og hvor flytende oppløsningsmiddelet er. Avhengig av valgte bærere, eksempelvis den spesifikke funksjonaliteten til en papirbærer, vil størrelsen til volumene av det flytende selvfølgelig også avhenge av den valgte målestokken til peptidsyntesen. Størrelsen på væskevolumene bestemmer også den minimale avstanden mellom to reaksjonsflater og dermed indirekte mengde av reaksjonsflater som kan antas å være på den gitte bæreren, jfr. eksempelvis tabell 2.

Alt etter utførelsesform og kjemisk forbehandling av bæreren kan den flate spesifikke belastning med reaktive funksjoner varieres innenfor et stort område (for eksempel 1 pmol til 1 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$).

Spesielle eksempler på anvendbare papirer er Whatman Chr1, Whatman 540 og Whatman 3MM. Whatman 540 er foretrukket i forhold til Whatman Chr1 på grunn av den høyere mekaniske stabiliteten. Størrelsen på papirarket samt anordningen av reaksjonsoverflaten, henholdsvis flekken, henholdsvis prikken kan bli valgt fritt. Immunologer foretrekker formatet til en mikrotiterplater for 8x prikker. I dette tilfellet kan man velge en standard mikrotiterplate hvor det er boret inn små hull i midten av fordypningene og anvender disse standard mikrotiterskålene som mønster for å klippe ut papirark (8,5 x 12,5 cm) og tegne inn prikkposisjonene med en blyant.

Peptidene ble deretter trinnvis, og tilsvarende den forbestemte sekvensen ifølge kjente fastfasepeptidsyntesemetoder (E. Wunsch et al. i Houben-Wevl: Methoden der organischen Chemie, 4 opplag, bind 15 (E. Müller, Herausgeber), Thieme Stuttgart, 1974; G. Barany, R. B. Merrifield i The Peptides, vol. 2 (E. Gross, U. Meienhofer, Eds; Academic Press, New York, 1970, s. 1) på overflatefunksjonene oppbygget. Fortrinnsvis foregår dette ifølge Fmoc/tBu-metoden (C.-D. Chang, U. meienhofer, Int. J. Peptide Protein Res. 11, 246

(1978); E- Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R.C. Sheppard, B.J. Williams, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 537 (1978). Ved siden av de tyve essensielle aminosyrene kan også ønskelige modifiserte og ikke naturlige aminosyrer bli ført inn.

Aminosyrebyggestenen (egnete beskyttede og aktiverte aminosyrederivater) som er nødvendige for kjemisk produksjon av peptidene blir anbragt som konsentrerte oppløsninger (0,1 til 0,3 M) i et egnet oppløsningsmiddel med fortrinnsvis høyt kokepunkt og redusert fordampningshurtighet (for eksempel N-metyl-pyrrolidinon, kp. 203°C) i små lukkbare beholdere.

Kobling av aminosyrer til peptider foregår trinnvis begynnende med den C-terminale enden og eventuelt parallelt for mange peptider gjennom syklisk utførelse av de samme to reaksjonstrinnene. Koblingen kan eksempelvis forklares som følger:

- 1) Dannelsen av peptidbinding: en alikvot (0,1 til 10 µl) av den aktiverte aminosyreoppløsningen blir applisert på et forbestemt punkt eller en strek på flatebæreren. Gjennom fukting dannes det gjennom det påførte volumet en begrenset reaksjonsflate (flekk). Når mange forskjellige peptider blir syntetisert parallelt på en tilsvarende stor bærerflate blir appliseringsstedet satt i en avstand slik at ingen overlapping av reaksjonsflater blir mulige. Reaksjonstiden er eksempelvis 5 til 30 minutter. Deretter blir bæreren vasket flere ganger eksempelvis med dimetylformamid (DMF) i en egnet, lukkbar beholder eller på en filtreringsinnretning. Appliseringsstedet kan bli bestemt gjennom markering på bæreren (for eksempel blyantmarkering på cellulosepapir). Ved hjelp av en fargeindikator (for eksempel bromfenolblå; V. Krchnak, J. Vagner, P. Safar, M. Lebl. Collect. Czech. Chem. Commun. 53,2542 (1988)) kan de frie aminofunksjonene på reaksjonsflaten bli gjort synlig direkte slik at en annen markering ikke er nødvendig.

2) Avspaltning av den N-terminale beskyttelsesgruppen: bæreren blir deretter behandlet med tilstrekkelig avspaltningsoppløsning. Ved den foretrukne gjennomføringen av Fmoc/tBu-metoden blir Fmoc-beskyttelsesgruppen avspaltet med eksempelvis 20% piperidin i DMF. Etter eksempelvis 2 til 10 minutter blir det vasket flere ganger med DMF. Eventuelt blir det deretter behandlet med en oppløsning av farveindikatoren helt til reaksjonsflaten blir synlig. Deretter blir det vasket flere ganger med eksempelvis etanol og tørket i luft (eventuelt med en føner på maks 40°C).

Dersom alle peptidsekvenser er ferdig fremstilt blir fortrinnsvis de N-terminale aminogrupperne eksempelvis blokkert ved acetylering med eddiksyreanhydrid. Bæreren kan bli behandlet med acetyleringsoppløsning (for eksempel 5% eddiksyreanhydrid og 5% diisopropyletylamin i DMF) og deretter vasket flere ganger med DMF og etanol.

Deretter kan beskyttelsesgruppene på aminosyrekjedene bli avspaltet ved hjelp av egnet syrebehandling (tilsvarende den valgte syntesemetoden). Bæreren blir behandlet med avspaltningsoppløsning. Ifølge en spesiell utførelsesform under anvendelse av Fmoc/tBu-metoden (se følgende lister av anvendte aminosyrederivater) blir det for eksempel behandlet i 10 minutter med 50% trifluoreddiksyre (TFA), 5% anisol og 1% thioanisol i diklormetan.

Deretter blir bæreren vasket flere ganger med diklormetan, deretter med DMF og deretter etanol og tørket i luft. Avspaltning av beskyttelsesgruppene kan også foregå ved behandling med 50% TFA og 2% triisobutylsilan i DCM i løpet av omtrent 60 min. i det man eksempelvis vasker med DCM, DMF og etanol.

Peptidene er nå klare som immobiliserte substrater for den biologiske blandingen. Bæreren med de derpå kovalent bundede

peptidene kan i sin helhet for eksempel bli behandlet med en testreaksjonsoppløsning, eller så kan de enkelte reaksjonsflatene bli separert ved istykker riving av arket og bli individuelt behandlet.

5

Den letteste veien å koble peptidene på den beskrevne måten på bærere er å koble de tilsvarende C-terminale aminosyrebyggestenenene direkte med de reaktive funksjonene på bæreroverflaten over stabile amid- eller esterbindinger. Ifølge spesielle utførelsesformer kan først et såkalt bifunksjonelt linkerreagens (jfr. E. Atherton et al. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 538-546 (1981)) bli koblet på bærerfunksjonen. Det derpå oppbygde peptidet kan deretter bli avspaltet ifølge den kjemiske naturen til peptid-linker-bindingen for eksempel under egnede reaksjonsbetingelser med C-terminale karboksyl- eller karboksyamidgrupper og tilsatt i løselig form for testformål (labil linker). Linkerreagenser kan derimot også anvendes som en avstandsholder (Spacer) for å forhøye tilgjengeligheten av peptidet for store reaksjonspartnere som antistoffer eller enzymer (stabil linker).

20

Ved anvendelse av papirbærere kan man gå frem i to trinn.

25

Første trinn (A): det blir bestemt en regelmessig fordeling av reaktive aminofunksjoner. Hydroksylgruppen til cellulosen med et N-Fmoc-beskyttet aminosyrederivat blir forestrert og til slutt blir aminogruppene frigjort ved behandling med 20% piperidin oppløsning i DMF.

30

Andre trinn (B): En ytterligere N-Fmoc-aminosyre blir koblet punkt- eller strekformig på de innførte aminofunksjonene. Deretter blir alle gjenværende aminofunksjonene blokkert ved acetylering og Fmoc blir avspaltet.

35

Innenfor rammen av foreliggende oppfinnelse ble Fmoc-glycin også anvendt i begge derivatiseringstrinnene. Ikke ubetydelige mengder av Gly-Gly-Ankere gikk tapt ved Fmoc-be-

skyttelsen og ved lengre lagring og dette skyldes sansynligvis en diketopiperazindannelse. Videre ser det ut som om Gly-Gly-Enden til peptidet forstyrrer antistoffbindingen og det ser også ut som om noen sera bindes uspesifikt på Ac-Gly-Gly.

5 Fmoc- β -Ala er et bedre valg. β -alanin er en uvanlig aminosyre som ikke foreligger i naturlige proteiner, i det β -Ala- β -Ala-Ankere ikke innbefatter en diketopiperazindannelse og spaceren blir forstørret. Tørkede flatematerialer som var derivatisert med flekker av β -Ala- β -Ala og farvet med BPB
10 utviste etter flere måneders lagring ved -20°C ikke noe tap av aminosyrefunksjoner. Ved lengre lagring ved temperaturer opp til 30°C er et Fmoc-beskyttet anker enda mere stabilt.

For forklaring henvises det til figur 6. Denne figuren viser en typisk anordning av flekker på et papirark (β -Ala- β -Ala-
15 anker farvet med BPB). Formatet var dermed tilpasset til mikrotiterplate med 96 flekker.

Foreliggende fremgangsmåte utviser følgende fordeler i forhold til teknikkens stand (Geysen et al. 1984; Frank og
20 Krause, Deutsche Patentanmeldung P 39 35 572.1):

- ytterst enkel håndtering, for den kjemiske koblingen av aminosyrederivater til peptider må bare små volumer av de aktiverte aminosyreoppløsningene appliseres på flate-
25 bæreren;
- ytterligere mindre reaksjonsvolumer er mulig, for eksempel 0,1 til 1 μl , i det et ytterligere mer sparsomt forbruk av dyre aminosyrederivater er mulig;
30
- bærere som cellulose- eller Glasfaserpapiret er lett tilgjengelige;
- syntesemålestokken til det enkelte peptidet kan bli valgt
35 innenfor store områder på grunn av den variable flatespesifikke belastningen med reaktive funksjoner;

- pipetteringstrinnene (spesielt ved automatisk gjennomføring) kan utføres ekstremt hurtig slik at ytterligere flere peptider kan bli fremstilt pr. tidsenhet.

5 Fremgangsmåten beskrevet ovenfor kan på tilsvarende måte tilpasses for hurtig syntese av bærerbundede eller frie oligonukleotider. For kjemien og avvikling av oligonukleotidsyntesen kan det for eksempel henvises til europeisk patent 84 100 059.9.-

10

Foreliggende fremgangsmåte kan også bli automatisert. Her kan det anvendes pipetteringsautomater for alikvotedannelse og flekkanalysering av de aktiverte aminosyreoppløsningene henholdsvis nukleotidoppløsningene samt utførelse av de andre 15 vaske- og reaksjonsoppløsningene. Flatebæreren må da bli montert på en egnet vaske- eller filtreringsinnretning.

20

Kommersielle x/y-programmerbare TLC-Spotter eller pipette-arbeidsstasjoner er egnede innretninger for automatisk gjennomføring av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Volumet opp til 10 nl kan presist bli applisert på et ønsket sted, i det flere tusen peptider kan bli syntetisert på en god håndterbar flatmaterialbærer. Dermed ligger man to størrelsesordener under den litografiske teknikken til Fodor et al., Science, 251, 767-773 (1991). Selv i de minste væskemengdene (omtrent 10 nl) blir hvert peptid dannet i nmolmengder og som er tilstrekkelig for isolering og fullstendig karakterisering.

25

30 Utførelsesekesempel 1:

35

Analyse av et immunogent delavsnitt (CMV26) av 36/40K-proteinet til cytomegalie-virus. Figur 1: aminosyreprimærsekvens til klonet, immunogent delavsnitt CMV26. Derav ble det avledet overlappende, om en aminosyre forskjøvet dekaeptidsekvens. Figurene 2A - C: Liste av alle dekaeptider som skulle bli syntetisert med den angitte nummer-

eringen og forskrift for den samtidige, parallelle gjennomføringen av aminosyrekoblingene.

Flateformet bærer: Et 5,5 x 10,5 cm stort ark av cellulosepapir (Chr1 eller 540, Whatman, England) ble klippet ut. Deretter ble det anmerket 50 punkter med avstand på 1 cm med blyant. Arket ble lagt i en sylinderformet glassbeholder med slepet lokk og behandlet i 3 timer ved romtemperatur med 1 ml av en oppløsning bestående av

0,2 N Fmoc-glycin
0,3 M hydroksybenzotriazol (HOBt)
0,24 M diisopropylcarbodiimid (DIC)
0,2 M N-metylimidazol (MeIm) i DMF

og deretter vasket 3 ganger med hver 10 ml DMF og deretter behandlet i 10 minutter med 20% piperidin i DMF (avspaltning av Fmoc-gruppen) og deretter tre ganger med hver 10 ml DMF og to ganger med hver 10 ml etanol (abs) og så tørket med en føner. Den kvantitative bestemmelsen av den forestrede mengden av glycin på hydroksylgruppen til cellulosepapiret (frie aminogrupper) ga 0,2 til 0,3 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$.

Arket ble lagt i en flat skål bestående av glass eller polyetylen. Deretter ble det tilsatt alikvoter (1 μl) av en oppløsning av 0,3 M Fmoc-glycin, 0,45 M HOBt, 0,36 M DICD i N-metyl-pyrrolidon (MPD) på de merkede punktene til papiret og skålen ble dekt med en glasskive. Etter 20 minutter ble arket lagt i en glassylinder og vasket tre ganger med hver 10 ml DMF. Deretter ble tilstedeværende frie aminogrupper fortsatt på papiret fra den første glycinkoblingen blokkert ved acetylering. Deretter ble det behandlet i 10 minutter med 3 ml 5% eddiksyreanhydrid og 5% diisopropyletylamin i DMF. Deretter ble det vasket tre ganger med hver 10 ml DMF og deretter med 20% piperidin i DMF og igjen tre ganger med DMF. Deretter ble 3 ml 0,3% bromfenol blå (BPB) i DMF tilsatt og reaksjonsflaten til den andre glycinkoblingen ble farvet blå.

Det ble deretter vasket to ganger med hver 10 ml etanol og tørket. Celluloseflatebærere forbehandlet på denne måten, gir på de markerte reaksjonsflatene diglycinankergrupper med frie primære aminofunksjonen for bygging av peptider. De 49 oppførte dekaeptidene i figur 2A ble fortløpende nummerert og simultan-parallell syntetisert på de tilsvarende nummererte reaksjonsflatene som beskrevet ovenfor. Fordeling av de aktiverte aminosyreoppløsningene ble utført ved hjelp av den i figur 2B og 2C angitte listen.

Syntesemetode: Fmoc/tBu-metoden

Anvendte aminosyrederivater:

Fmoc Ala
Fmoc-Arg(Pmc)
Fmoc-Asn(Tmob)
Fmoc-Asp(OtBu)
Fmoc-Cys(Butthio)
Fmoc-Gln(Tmob)
Fmoc-Glu(OtBu)
Fmoc-Gly
Fmoc-His(Boc)-Pfp
Fmoc-Ile
Fmoc-Leu
Fmoc-Lys(Boc)
Fmoc-Met
Fmoc-Phe
Fmoc-Pro
Fmoc-Ser(tBu)
Fmoc-Thr(tBu)
Fmoc-Trp
Fmoc-Tyr(tBu)
Fmoc-Val

Alle beskyttelsesgruppene til aminosyresidekjedene (-) med unntagelse av (Butthio) på Cys kan bli avspaltet med 20- til

50-% TFA i diklormetan. Butthio-gruppen kan deretter bli fjernet ved hjelp av for eksempel dithiothreitol (DTT) eller dithioerythritol (DTE).

5 Aktivering av aminosyrederivatene kan foregå ifølge standard-metoder, for eksempel med et 1,5-ganger overskudd av 1-hydroksybenzotriazol (HOBt) og 1,2-ganger overskudd av diisopropylkarbodimid (DIC) i N-metylpyrrolidinon i 1 time. Andre aktiveringsmetoder eksempelvis med symmetriske an-
10 hydrider, pentafluorfenolester eller BOP er likeledes mulig. Tilsvarende det på forhånd beregnede forbruket ble det tilsatt 0,2 til 1 ml oppløsninger. Det ble anvendt alikvoter på 1 µl. Den med BPB blåfarvede reaksjonsflaten viste etter 5 til 20 minutter en fargeendring til gul som angir en
15 fullstendig omsetning av de frie aminogruppene. Avspaltning av Fmoc-beskyttelsesgruppen med 20% piperidin i DMF ble gjennomført i løpet av 5 minutter. Sluttacetylering av de ferdige peptidene ble oppnådd ved behandling med 5% eddik-syreanhydrid, 5% diisopropyletylamin i DMF i løpet av 10
20 minutter. Beskyttelsesgruppene til aminosyresidekjedene ble avspaltet med 20% TFA og 1% triisobutylsilan i diklormetan i løpet av 20 minutter og bæreren ble til slutt vasket hver med 10 ml porsjoner 3 ganger med diklormetan, tre ganger med DMF og tre ganger med etanol.

25

Med disse peptidene ble for eksempel den sekvensspesifikke bindingen av anti-CMV26 antistoffene bestemt i et kaninserum ved hjelp av en farvetest.

30

Figur 3: skjematisk gjennomføring av farvetester. De overflatebundede peptidene (P) blir inkubert med et kanin-anti-CMV26-serum, serum i overskudd blir vasket og deretter inkubert med et anti-kanin-antistoff fra geit som er kovalent koblet med enzymet β -galactosidase. Bare når anti-CMV26-
35 antistoffene kan binde peptidet blir enzymet bundet over det andre antistoffet. Dette kan deretter bli vist gjennom aktiviteten ved spaltning av 5-brom-4-klor-3-indolyl- β -D-

galactopyranosid, i det det i nærvær av et svakt oksydasjonsmiddel som kaliumheksacyanoferrat(III) vannes et i vann og alkohol uoppløselig blått indigofarvestoff.

5 Figur 4: fotografi av den flate cellulosebæreren etter farvetesten. Peptidene på reaksjonsflatene 11 til 16 og 30 til 33 reagerer positivt.

10 Etter behandling av bæreren med detergenter (som urinstoff, natriumdodecylsulfat og mercaptoetanol) kan de bundede antistoffene igjen bli frakoblet. Indigofarvestoffet kan bli vasket av med DMF. Deretter kan bæreren på ny bli blandet med de immobiliserte peptidene. Dette kan gjentas flere ganger dersom det ikke blir anvendt reaksjonsbetingelser som
15 ødelegger eller avspalter peptidene. Etter mere enn 10 antistoff bindingstester med samme bærer blir noen reaksjonsflater spaltet ut og peptidene blir løst med 1M NaOH. CMV26-Gly-Gly-peptidene kan bli bevist i HPLC-analysen og også ved FAB-massespektroskopi.

20

Utførelseseksempel 2:

Analyse av de like immunogene delavsnittene (CMV26) til 36/40K-proteinet fra cytomegali-virus.

25

Flatebærer: et 5,5 x 10,5 cm stort ark av glassfaserpapir (QM-A, Whatman, England) ble klippet ut og deretter ble 50 punkter avmerket i avstand på 1 cm med blyant. Arket ble kokt i en Erlenmeyerkolbe (250 ml med lokk med 50 ml 2% amino-propyltriethoxysilan i abs. toluen over natt med tilbakeløp.
30 Deretter ble det med porsjoner på 10 ml vasket tre ganger med toluen og tre ganger med aceton og tørket i 1 time ved 110°C. Den kvantitative bestemmelsen av de på denne måten innførte aminopropylgruppene (frie aminogrupper) ga 30 til 50
35 nmol/cm².

Alle ytterligere kjemiske operasjoner ble likeledes gjennomført som i utførelseseksempel 1 for cellulosepapirer etter første glycinokobling. Resultatet av antistoff bindings-testene var identiske.

5

Utførelseseksempel 1 og 2 viser et viktig anvendelsesaspekt for flatematerialene med de derpå bundede peptidene fremstilt ifølge den krevde fremgangsmåten. De kan bli anvendt for diagnostiske formål innen human- og veterinærmedisinen for
10 meget spesifikke bevis på bakterielle og virale infeksjoner. Slike infeksjoner fører ved hjelp av immunreaksjoner i den belastede organismen til dannelsen av antistoffer mot virale eller bakterielle proteiner. Med virus- eller bakteriespesifikke peptider kan slike antistoffer bli vist i serum og
15 dermed kan også typen og underklassen av fremkalleren bli bestemt. For oppdagelse av de spesifikke peptidene kan den samme fremgangsmåten bli anvendt i det (som vist i utførelseseksempelene) serier av på flatematerialbundede peptider blir fremstilt og testet.

20

Utførelseseksempel 3:

Det ble syntetisert fire til CMV26 i kontaktstående oligopeptider ved punktformig syntese på papirbærere med Boc-Lys-Pro-derivatisering og avspaltet fra bæreren ved hjelp av
25 diketopiperazin-dannelse. Detaljene fremgår av figur 5 A-B og tabell 1. De viser:

30

Figur 5A: HPLC-spor av rå-peptider;

Figur 5B: FAB-massespektrum av peptid 15 (på basis av positive ioner);

35

Tabell 1: tabellmessige angivelser av de syntetiserte peptidene.

Peptid nr.	Sekvens	Molekylmasse ^{a)} (teor.) [M+H] ⁺	Aminosyreanalyse ^{b)}						Mengde [nmol]		
			D	S	G	A	L	P		K	
14	Ac-G-G-S-L-S-S-DKP	755,4	756,4	-	2,88	1,98	-	1,00	x	x	66
15	Ac-G-S-L-S-S-L-DKP	811,4	812,4	-	2,90	0,97	-	2,00	x	x	52
16	Ac-S-L-S-S-L-A-DKP	825,4	826,4	-	2,90	-	0,99	2,00	x	x	54
17	Ac-L-S-S-L-A-N-DKP	852,4	853,4	0,89	1,98	-	1,00	2,00	x	x	57
R	Ac-DKP	268,2	267,2	-	-	-	-	-	x	x	ca. 75

(a) Ac-DKP ble ved FAB-massespektrum bare bestemt som (M-H)⁻ på basis av negative ioner.

(b) DKP-andelen ble under standard hydrolysebetingelser ikke fullstendig avspaltet; x betyr at Pro og Lys foreligger i like mengder, men ikke ekvimolar med hensyn på aminosyrerestene i peptidkjeden.

Utførelseseksempel 4:

Det ble tilsatt dråper ved hjelp av hånden med volumer ned til 0,1 µl med en vanlig mikropipette som var utstyrt med en polypropylentupp. Noen vanlige dataer som ble bestemt ved anvendelse av to forskjellige papirkvaliteter er stilt opp i følgende tabell 2.

Tabell 2: forholdet mellom dråpevolumer, flekkstørrelse og funksjonalitet.

A. Whatman 540			B: Whatman 3 MM forbehandlet		
β-ala- Anker			β-ala- Anker		
Volumer [µl]	Diameter [mm]	Anker [µmol]	Volumer [µl]	Diameter [mm]	Anker [µmol]
0,1	3	0,02	1	4	0,10
0,5	5	0,07	5	7	0,45
1,0	7	0,13	10	10	0,85
2,0	9	0,25	20	14	1,70
5,0	12	0,60	50	22	4,40

Verdien er ± 5%

Utførelseseksempel 5:

Det ble fremstilt alle 16 dinukleocidmonofosfatene med generell formel N₂pN₁ i det man anvender kjemien ifølge europeisk patent 84 100 059.9 samt Frank et al. i Nucleic

Acids Res., 11 (1983) 4365-4377 og anvender bærerens ifølge utførelseseksempel 1. Følgende detaljer kan det videre
5 henvises til.

Som flateformig bærer anvender man Whatman 540-papir med Di- β -Ala-ankere ifølge utførelseseksempel 1. Den første startbygggestenen N_1 blir tilsatt som 5'-DMTr-nukleosid-3'-
10 succinat (i NMP) og analogt med utførelseseksempel 1 med dråper koblet på aminoankere (med DIC og HOBT). Succinat er et eksempel på en labil linker. Deretter ble et Capping-skrutt foretatt ifølge teknikkens stand. Avspaltning av DMTr-gruppen kan foregå med 3% dikloreddiksyre i diklormetan. For
15 kobling blir den andre bygggestenen N_2p som 5'-DMTr-nukleosid-3'-o-klorfenylfosfat (med MSNT i pyridin) dråpevis under en argonpute for å utelukke luftfuktighet. DMTr-gruppen blir avspaltet som angitt ovenfor.

20 Flekkene blir stanset ut, behandlet med 30% vandig ammoniakk og supernatanten blir undersøkt på reaksjonsprodukter (dinukleosidmonofosfater) ved FAB-massespektroskopi ifølge Grotjahn et al i Nucleic Acids Res., 10 (1982) 4671-4678.

25

30

35

P a t e n t k r a v

5 1.

Fremgangsmåte for hurtig syntese av bærerbundede eller frie peptider, hvor man utgår fra en eller flere funksjonaliserte bærere og trinn for trinn syntetiserer tilsvarende den gitte aminosyresekvensen de ønskede peptidene ifølge en egnet syntese fremgangsmåte, k a r a k t e r i s e r t v e d a t man

- anvender et flatemateriale som bærer;
- for kobling av små alikvoter påføres punkt- eller strekformig på flatebæreren en oppløsning av den ønskede aminosyren eller det ønskede di- eller oligopeptidet i form av aktiverte derivater derav, eller syntese av opptil flere forskjellige peptider på et flatemateriale samtidig ved siden av hverandre på punkt- eller strekformige reaksjonsflater som ikke berører hverandre;
- koblingsreaksjon gjennomføres på reaksjonsflater som dannes ved fukting og
- separere eventuelt det ferdige peptidet fra flatebæreren ved hjelp av en egnet avspaltningsoppløsning.

25 2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det som flatemateriale anvendes en porøs eller ikke porøs folie, membran eller et slikt papir som er egnet for kobling av aminosyrer eller peptider og som oppviser kjemisk reaksjonsdyktig funksjon.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t flatematerialet består av cellulose, glass eller organiske polymerer og overflatene derav er egnede for kjemiske funksjoner.

4.

5 Fremgangsmåte ifølge krav 2 eller 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at funksjonaliseringen av overflaten foregår ved innføring av aminopropylgrupper, glycin- eller diglycinankergrupper.

5.

10 Fremgangsmåte ifølge krav 3 eller 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at man bygger opp det syntetiserende peptidet (a) C-terminalt direkte koblet til flatematerialet eller (b) koblet med flatemateriale over en linker.

15 6.

Fremgangsmåte ifølge et av de foregående kravene, k a r a k t e r i s e r t v e d at den flatespesifikke belastningen med reaktive funksjoner utgjør 1 pmol til 1 μ mol pr. cm^2 .

20 7.

Fremgangsmåte for hurtig syntese av bærerbundende eller frie oligonukleotider, i det man utgår fra en eller flere funksjonaliserte bærere og syntetiserer skritt for skritt tilsvarende den gitt nukleotidsekvensen ønskede oligonukleotider ifølge en egnet syntese fremgangsmåte, k a r a k t e r i s e r t v e d at man

- anvender et flatemateriale som bærer
- for kobling av små alikvoter påføres punkt- eller strekformig på flatebæreren en oppløsning av den ønskede nukleotidet eller det ønskede di- eller oligonukleotidet i form av aktiverte derivater derav, eller syntetese av opp til flere forskjellige nukleotider på et flatemateriale samtidig ved siden av hverandre på punkt- eller strekformige reaksjonsflater som ikke berører hverandre.
- koblingsreaksjon gjennomføres på reaksjonsflater som dannes ved fukting og
- separere eventuelt det ferdige oligonukleotidet fra flatebæreren ved hjelp av en egnet avspaltningsoppløsning.

8.

5 Fremgangsmåte ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det som flatemateriale anvendes en porøs eller
ikke porøs folie, membran eller et slikt papir som er egnet
for kobling av nukleotider og som oppviser kjemisk reaksjons-
dyktig funksjon.

10 9.

Fremgangsmåte ifølge krav 7 eller 8, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at man anvender målestokkene ifølge krav
4, 5 eller 7.

15 10.

Fremgangsmåte ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t
v e d at man oppbygger det syntetiserende oligonukleotidet
(a) 3'-terminalt direkte koblet med flatematerialet eller (b)
koblet med flatematerialet over en linker.

20

11.

Flatemateriale som er k a r a k t e r i s e r t v e d at
det er bundede peptider fremstilt ifølge et av kravene 1 til
6.

25

12.

Flatemateriale, k a r a k t e r i s e r t v e d at det
er med derpå bundede oligonukleotider, fremstilt ifølge et av
kravene 7 til 10.

30

13.

Anvendelse av flatemateriale ifølge krav 11, for mikro-
biologiske og spesielt diagnostiske formål innen human- og
veterinærmedisin for spesifikt bevis for bakterielle og
35 virale infeksjoner.

14.

Anvendelse av flatematerialet ifølge krav 12, for hybridi-
seringsformål.

Figure 1

CMV26 (36/40K protein)

ARGSIEGRGKSRGGGGGSSLSLANAGGLHDDGPGLDNDLMNEPMGLGGLGGGGGGKKHLDPSTCSQAC

1/11

310464

310464

Figur 2A ark 1

2/11

A:CMV26PEP

		Len	✓ M.W.	Beskyttelse/ modifikasjon
1- 1A	DEGRGKSRGG	10	1015.6	
2- 2A	EGRGKSRGGG	10	959.6	
3- 3A	GRGKSRGGGG	10	887.6	
4- 4A	RGRSRGGGGG	10	887.6	
5- 5A	GKSRGGGGGG	10	788.5	
6- 6A	KSRGGGGGGG	10	788.5	
7- 7A	SRGGGGGGGS	10	747.4	
3- 8A	RGGGGGGGSL	10	773.5	
9- 9A	GGGGGGGSLS	10	704.4	
10- 10A	GGGGGGGSLSS	10	734.4	
11- 11A	GGGGGSLSSL	10	790.5	

310464

3/11

Figur 2A ark 2

38- 38A	MNEPMGLGGL	10	1017.6
39- 39A	NEPMGLGGLG	10	943.5
40- 40A	EPMGLGGLGG	10	886.5
41- 41A	PMGLGGLGGG	10	814.5
42- 42A	MGLGGLGGGG	10	774.5
43- 43A	GLGGLGGGGG	10	700.4
44- 44A	LGGLGGGGGG	10	700.4
45- 45A	GGLGGGGGGG	10	644.4
46- 46A	GLGGGGGGGG	10	644.4
47- 47A	LGGGGGGGGK	10	715.5
48- 48A	GGGGGGGGTK	10	730.5
49- 49A	GGGGGGGTHH	10	310.5

Aminosyrebruk: A=13 D=36 E=11 G=185 H=9 I=1 K=9 L=63 M=18 N=27 P=18 R=12 S=34

310464

Figur 2A ark 3

4/11

25- 25A	GLHDDGPGLD	10	994.5
26- 26A	LHDDGPGLDN	10	1051.6
27- 27A	HDDGPGLDND	10	1053.5
28- 28A	DDGPGLDNDL	10	1029.5
29- 29A	DGPGLDNDLM	10	1045.5
30- 30A	GPGLDNDLMN	10	1044.5
31- 31A	PGLDNDLMNE	10	1116.6
32- 32A	GLDNDLMNEP	10	1116.6
33- 33A	LDNDLMNEPM	10	1190.6
34- 34A	DNDLMNEPMG	10	1134.5
35- 35A	NDLMNEPMGL	10	1132.6
36- 36A	DLMNEPMGLG	10	1075.6
37- 37A	LMNEPMGLGG	10	1017.6

310464

Figur 2A ark 4

5/11

12- 12A	GGGSLSSLA	10	804.5
13- 13A	GGGSLSSLAN	10	861.5
14- 14A	GGSLSSLANA	10	875.5
15- 15A	GSLSSLANAG	10	875.5
16- 16A	SLSSLANAGG	10	875.5
17- 17A	LSSLANAGGL	10	901.6
18- 18A	SSLANAGGLH	10	925.6
19- 19A	SLANAGGLHD	10	953.6
20- 20A	LANAGGLHDD	10	981.5
21- 21A	ANAGGLHDDG	10	925.5
22- 22A	NAGGLHDDGP	10	951.5
23- 23A	AGGLHDDGPG	10	394.5
24- 24A	GGLHDDGPGL	10	936.5

6/11

Figur 2B/C ark 1

syklus 0

G: 1 2 3 4 5 6 15 16 21 23 34 36 37 39 40 41 42 43 44
 45 46 (21/0)
 L: 8 11 17 24 28 35 38 (7/0)
 D: 19 20 25 27 (4/0)
 N: 13 26 30 (3/0)
 S: 7 9 10 (3/0)
 A: 12 14 (2/0)
 M: 29 33 (2/0)
 H: 18 49 (2/0)
 P: 22 32 (2/0)
 K: 47 48 (2/0)
 E: 31 (1/0)

syklus 1

G: 1 2 3 4 5 6 7 16 17 22 24 35 37 38 40 41 42 43 44
 45 46 47 (22/0)
 L: 9 12 18 25 29 36 39 (7/0)
 D: 20 21 26 28 (4/0)
 N: 14 27 31 (3/0)
 S: 8 10 11 (3/0)
 M: 30 34 (2/0)
 K: 48 49 (2/0)
 P: 23 33 (2/0)
 A: 13 15 (2/0)
 E: 32 (1/0)
 H: 19 (1/0)

syklus 2

G: 2 3 4 5 6 7 8 17 18 23 25 36 38 39 41 42 43 44 45
 46 47 48 (22/0)
 L: 10 13 19 26 30 37 40 (7/0)
 D: 21 22 27 29 (4/0)
 N: 15 28 32 (3/0)
 S: 9 11 12 (3/0)
 A: 14 16 (2/0)
 P: 24 34 (2/0)
 M: 31 35 (2/0)
 K: 49 (1/0)
 E: 33 (1/0)
 R: 1 (1/0)
 H: 20 (1/0)

syklus 3

G: 3 4 5 6 7 8 9 18 19 24 26 37 39 40 42 43 44 45 46
 47 48 49 (22/0)
 L: 11 14 20 27 31 38 41 (7/0)
 D: 22 23 28 30 (4/0)
 S: 1 10 12 13 (4/0)
 N: 16 29 33 (3/0)
 A: 15 17 (2/0)
 P: 25 35 (2/0)
 M: 32 36 (2/0)
 H: 21 (1/0)
 R: 2 (1/0)
 E: 34 (1/0)

syklus 4

G: 4 5 6 7 8 9 10 19 20 25 27 38 40 41 43 44 45 46 47
 48 49 (21/0)
 L: 12 15 21 28 32 39 42 (7/0)
 D: 23 34 39 31 (4/0)
 S: 2 11 13 14 (4/0)
 N: 17 30 34 (3/0)
 A: 16 13 (2/0)
 P: 26 36 (2/0)

M: 33 37 (2/0)
 K: 1 (1/0)
 E: 35 (1/0)
 R: 3 (1/0)
 H: 22 (1/0)

7/11

Figur 2B/C ark 2

syklus 5

G: 1 5 6 7 8 9 10 11 20 21 26 28 39 41 42 44 45 46 47
 48 49 (21/0)
 L: 13 16 22 29 33 40 43 (7/0)
 D: 24 25 30 32 (4/0)
 S: 3 12 14 15 (4/0)
 N: 18 31 35 (3/0)
 A: 17 19 (2/0)
 P: 27 37 (2/0)
 M: 34 38 (2/0)
 K: 2 (1/0)
 E: 36 (1/0)
 R: 4 (1/0)
 H: 23 (1/0)

syklus 6

G: 2 6 7 8 9 10 11 12 21 22 27 29 40 42 43 45 46 47 48
 49 (20/0)
 L: 14 17 23 30 34 41 44 (7/0)
 D: 25 26 31 33 (4/0)
 S: 4 13 15 16 (4/0)
 N: 19 32 36 (3/0)
 A: 18 20 (2/0)
 P: 28 38 (2/0)
 R: 1 5 (2/0)
 M: 35 39 (2/0)
 E: 37 (1/0)
 H: 24 (1/0)
 K: 3 (1/0)

syklus 7

G: 1 3 7 8 9 10 11 12 13 22 23 28 30 41 43 44 46 47 48
 49 (20/0)
 L: 15 18 24 31 35 42 45 (7/0)
 D: 26 27 32 34 (4/0)
 S: 5 14 16 17 (4/0)
 N: 20 33 37 (3/0)
 A: 19 21 (2/0)
 P: 29 39 (2/0)
 R: 2 6 (2/0)
 M: 36 40 (2/0)
 E: 38 (1/0)
 H: 25 (1/0)
 K: 4 (1/0)

syklus 8

G: 2 4 8 9 10 11 12 13 14 23 24 29 31 42 44 45 47 48 49
 (19/0)
 L: 16 19 25 32 36 43 46 (7/0)
 D: 27 28 33 35 (4/0)
 S: 6 15 17 18 (4/0)
 N: 21 34 38 (3/0)
 M: 37 41 (2/0)
 A: 20 22 (2/0)
 P: 30 40 (2/0)
 R: 3 7 (2/0)
 E: 1 39 (2/0)
 H: 26 (1/0)

310464

K: S (1/0)

8/11

Figur 2B/C ark 3

syklus 9

G: 3 5 9 10 11 12 13 14 15 24 25 30 32 43 45 46 48 49 (18/18)

L: 17 20 26 33 37 44 47 (7/7)

D: 28 29 34 36 (4/4)

S: 7 16 18 19 (4/4)

N: 22 35 39 (3/3)

M: 38 42 (2/2)

A: 21 23 (2/2)

P: 31 41 (2/2)

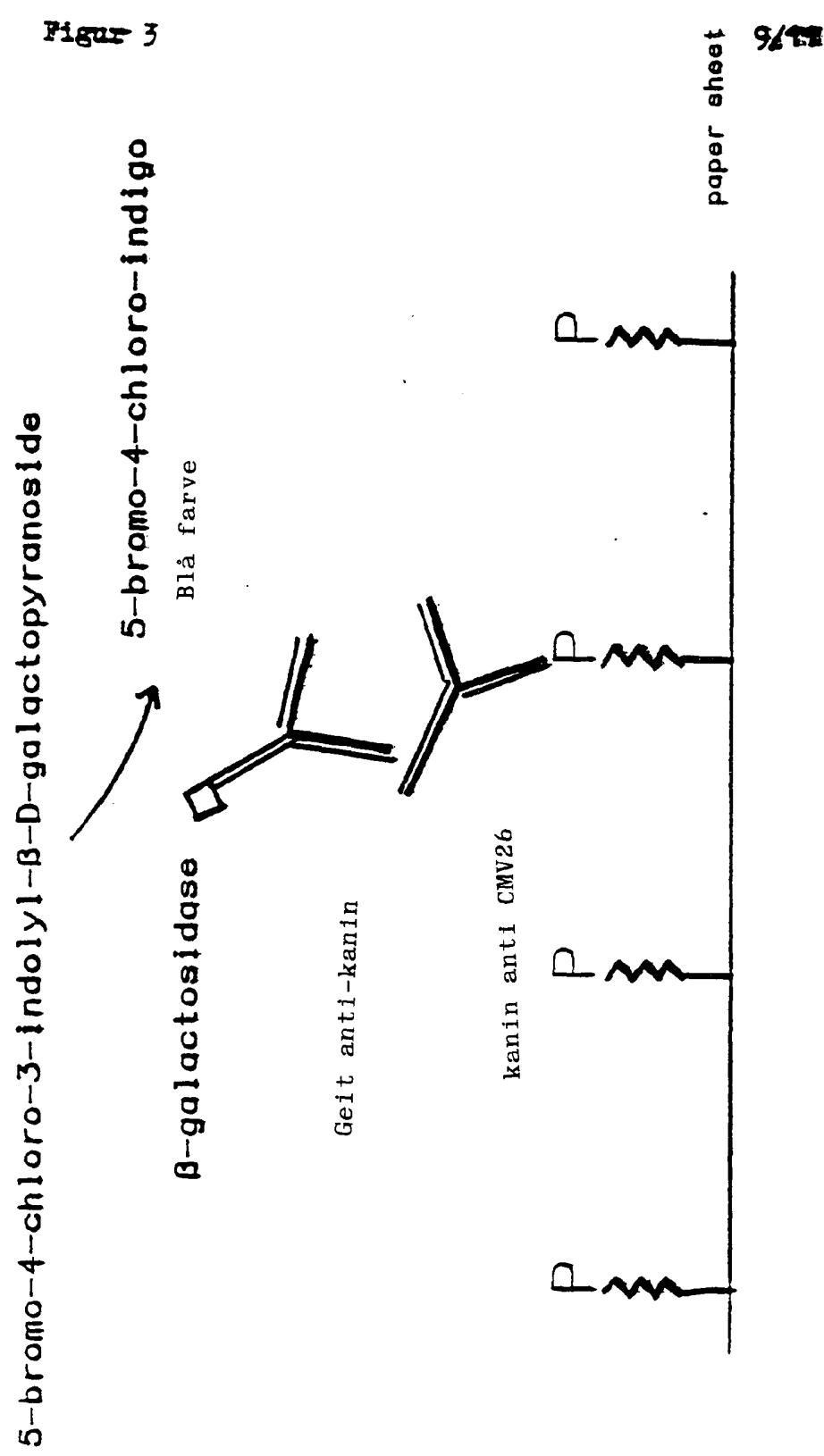
R: 4 8 (2/2)

E: 2 40 (2/2)

H: 27 (1/1)

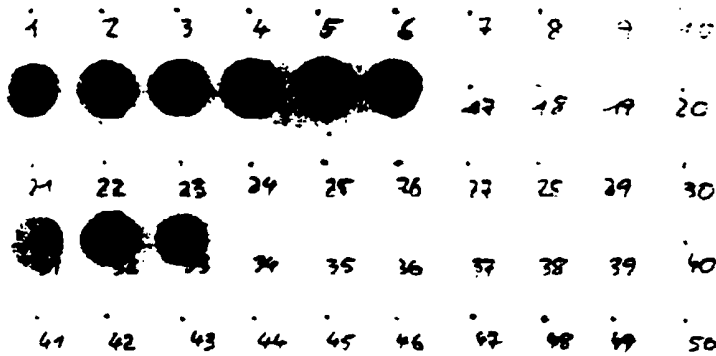
I: 1 (1/1)

K: 6 (1/1)



10/14

Figur 4



Figur 6

