



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 28 287 T2** 2005.12.15

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 001 968 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 28 287.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/12278**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 929 035.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/056807**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.06.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **17.12.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.05.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **22.12.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.12.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C07K 1/02**

C07K 1/04, C07K 1/08

(30) Unionspriorität:

49553 P 13.06.1997 US

(73) Patentinhaber:

**Gryphon Therapeutics, Inc., South San Francisco,
Calif., US**

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IE, IT, LI, NL, SE

(72) Erfinder:

**CANNE, Lynne, Pacifica, US; KENT, B., Stephen,
San Francisco, US; SIMON, Reyna, Los Gatos, US**

(54) Bezeichnung: **FESTPHASIGE NATIVE CHEMISCHE LIGATION VON UNGESCHÜTZTEN ODER N-CYSTEIN-GE-
SCHÜTZTEN PEPTIDEN IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN**

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

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

Beschreibung

EINFÜHRUNG

Hintergrund

[0001] Bestehende Verfahren zur chemischen Synthese von Proteinen umfassen schrittweise Festphasensynthese und Fragmentkondensation entweder in Lösung oder auf einer festen Phase. Die klassische schrittweise Festphasensynthese von Merrifield umfasst kovalentes Binden einer Aminosäure, die der Carboxyl-terminalen Aminosäure der gewünschten Peptidkette entspricht, an einen festen Träger und Verlängern der Polypeptidkette in Richtung des Aminoendes durch schrittweises Binden von aktivierten Aminosäurederivaten, die aktivierte Carboxylgruppen aufweisen. Nach Fertigstellung des Zusammenbaus der zur Gänze geschützten, Festphasen-gebundenen Peptidkette wird die kovalente Peptid-Festphasen-Bindung mittels geeigneter chemischer Verfahren gespalten, und die Schutzgruppen werden entfernt, um das Polypeptid-Produkt zu ergeben.

[0002] Manche Nachteile des schrittweisen Festphasen-Syntheseverfahrens umfassen: unvollständige Reaktion bei den Schritten des Bindens und der Schutzgruppenabspaltung in jedem Zyklus führt zur Bildung von Festphasen-gebundenen Nebenprodukten. In ähnlicher Weise führen Nebenreaktionen aufgrund von mangelhaften chemischen Verfahren und/oder Verunreinigungen, die in den Reagenzien/geschützten Aminosäuren vorhanden sind, zu einer Vielzahl von Festphasen-gebundenen Produkten bei jedem Schritt des Kettenzusammenbaus und zur Bildung komplexer Produktgemische im Endprodukt. Je länger also die Peptidkette ist, desto schwieriger ist es, gut definierte Produkte mit hoher Reinheit zu erhalten. Aufgrund der Bildung von komplexen Gemischen hat die Variante der schrittweisen Festphasensynthese auch Einschränkungen hinsichtlich der Größe. Im Allgemeinen werden gut definierte Polypeptide aus 100 Aminosäureresten oder mehr üblicherweise nicht mittels Festphasensynthese gebildet. Die Synthese von Proteinen und großen Polypeptiden auf diesem Weg ist eine zeitintensive und arbeitsaufwändige Aufgabe.

[0003] Der Ansatz der Festphasen-Fragmentkondensation (auch bekannt als Segmentkondensation) wurde entworfen, um den Schwierigkeiten beizukommen, die bei der Bildung langer Peptide über das schrittweise Festphasen-Syntheseverfahren auftreten. Das Segmentkondensationsverfahren umfasst die Herstellung mehrerer Peptidsegmente durch das schrittweise Festphasenverfahren, woraufhin Abspaltung von der Festphase und die Reinigung dieser maximal geschützten Segmente erfolgen. Die geschützten Segmente werden eines nach dem anderen an das erste Segment, das an die Festphase gebunden ist, ankondensiert.

[0004] Häufig treten in zahlreichen Schritten der Festphasen-Segmentkondensation technische Schwierigkeiten auf. Siehe E. Atherton et al., "Solid Phase Fragment Condensation – The Problems", in *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis*, 11–25 (R. Epton et al., 1990). Beispielsweise kann die Verwendung von Schutzgruppen an Segmenten, um ungewünschte Ligationsreaktionen zu blockieren, die geschützten Segmente häufig schwerlöslich machen, was wirksame Aktivierung der Carboxylgruppe stört. Eingeschränkte Löslichkeit geschützter Segmente kann auch die Reinigung geschützter Segmente beeinträchtigen. Siehe K. Akaji et al., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 33, 184–102 (1985). Geschützte Segmente sind hinsichtlich der Reinheit, der kovalenten Struktur schwierig zu charakterisieren und sind für hochauflösende analytische ESMS (Elektrospray-Massenspektrometrie) (auf Ladung basierend) nicht geeignet. Racemisierung des C-terminalen Rests jedes aktivierten Peptidsegments ist auch ein Problem, außer wenn das Ligieren an Glycin-Resten erfolgt. Darüber hinaus können das Spalten des gänzlich assemblierten Festphasen-gebundenen Polypeptids von der Festphase und das Entfernen der Schutzgruppen häufig schwierige und komplizierte chemische Verfahren und lange Reaktionszeiten erfordern, was zum Abbau des gänzlich assemblierten Polypeptids führt.

[0005] Segmentkondensation kann in Lösung und nicht in Festphase durchgeführt werden. Siehe H. Muramatsu et al., *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 203 (2), 1131–1139 (1994). Doch Segmentkondensation in Lösung erfordert die Reinigung der Segmente vor der Ligation sowie die Verwendung von Schutzgruppen in einem Bereich verschiedener funktioneller Seitenketten-Gruppen, um mehrfache unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden. Darüber hinaus ermöglicht die Ligation in Lösung keine einfachen Reinigungs- und Waschschritte, wie sie bei Festphasen-Ligationen geboten werden. Weiters sind die Einschränkungen hinsichtlich der Löslichkeit geschützter Peptidsegmente und geschützter Peptid-Zwischenreaktionsprodukte noch verstärkt.

[0006] Chemisches Ligieren minimal geschützter Peptidsegmente wurde untersucht, um den Löslichkeitsproblemen beizukommen, die oft bei maximal geschützten Peptidsegmenten auftreten. Siehe Cheng et al., "Che-

mical Synthesis of Human δ -endorphin(1–27) Analogs by Peptide Segment Coupling", *Int. J. Pept. Protein Res.* 38, 70–78 (1991); J. Blake, "Total Synthesis of S-Carbamoylmethyl Bovine Apocytochrome c by Segment Coupling", *Int. J. Pept. Protein Res.* 27, 191–200 (1986); und H. Hojo et al., "Protein Synthesis using S-Alkyl Thioester of Partially Protected Peptide Segments, Synthesis of DNA-Binding Protein of *Bacillus stearothermophilus*", *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 65, 3055–3063 (1992). Dieses Verfahren erfordert jedoch die Verwendung von Schutzgruppen an allen Lysin-Seitenketten-Aminogruppen, selektiven N- α -Schutz eines oder mehrerer Segmente und arbeitsaufwändige Reinigungsschritte, die Reinigung, neuerlichen Schutz und neuerliche Reinigung umfassen.

[0007] Die Verwendung mehrfach geschützter Peptidsegmente ist mit dem zusammenfassenden Schema der Bearbeitung von Proteinen unter Verwendung von Peptiden, die mittels rekombinanter DNA-Expression gebildet wurden, als eine Quelle nicht vereinbar. Verfahren mit geschützten Peptidsegmenten sind arbeitsintensiv, und die geschützten Peptidsegmente haben teilweise aufgrund der Löslichkeits- und Ligationsschwierigkeiten geschützter Peptidsegmente unvorhersehbare Eigenschaften in Bezug auf den Umgang damit. Oft sind stark geschützte Peptidsegmente sogar in den stärksten polaren aprotischen Lösungsmitteln wie Dimethylsulfoxid (DMSO) und Dimethylformamid (DMF) nur minimal löslich. Das Problem der Unlöslichkeit von geschützten Peptidsegmenten wurde nur mit geringem Erfolg auf verschiedene Arten behandelt, umfassend die Anwendung (1) einer Strategie mit partiellen Schutzgruppen, die alle Seitenketten außer jenen von Ser, Thr und Tyr maskieren; (2) einer Strategie mit minimalen Schutzgruppen, die nur Thiol- und Amino-Seitenketten maskieren; und (3) die Anwendung reversiblen Schutzes einer Hauptketten-Amidgruppierung, um Aggregation/Unlöslichkeit zu unterbinden. Schutzgruppen, die im letzten Ansatz verwendet werden, ändern Peptidkonformationen. Die Verwendung von Hauptketten-Schutzgruppen ist bis heute noch nicht ganz unkompliziert oder vorhersehbar und erfordert intensives Experimentieren für jede Ziel-Polypeptidkette.

[0008] Es gibt zahlreiche Verfahren zum Ligieren ungeschützter Peptidsegmente über nichtnatürliche Hauptkettenbindungen. Im Gegensatz dazu gibt es nur wenige Verfahren zum Erhalt einer "nativen chemischen Ligation". Eine "native chemische Ligation" ist die chemoselektive Reaktion von ungeschützten oder N-terminal Cystein-geschützten Peptidsegmenten mit einem anderen ungeschützten Peptidsegment, was zur Bildung eines ligierten Peptids mit einer Amidbindung an der Ligationsstelle führt.

[0009] Demgemäß besteht auf dem Gebiet der Erfindung Bedarf an raschen Verfahren zur Synthese assemblierter Polypeptide über chemische Ligation von zwei oder mehr ungeschützten Peptidsegmenten unter Verwendung eines festen Trägers mit verbesserter Ausbeute und erleichterter Handhabung der Zwischenprodukte.

[0010] Die vorliegende Erfindung ermöglicht unter anderem eine rasche Festphasen-Synthese großer Polypeptide mit einer natürlichen Peptid-Hauptkette über native chemische Ligation von zwei oder mehreren ungeschützten Peptidsegmenten, worin keine der reaktiven Funktionalitäten an den Peptidsegmenten vorübergehend mit Schutzgruppen maskiert werden muss. Die vorliegende Erfindung vervollständigt zum ersten Mal sequenzielle chemische Festphasenligation von Peptidsegmenten in Richtung vom N-Terminus zum C-Terminus, wobei das erste, Festphasen-gebundene, ungeschützte Peptidsegment einen C-terminalen α -Thioester trägt, der mit einem anderen ungeschützten Peptidsegment reagiert, das ein N-terminales Cystein und eine C-terminale Thiosäure enthält.

[0011] Andere Ausführungsformen der Erfindung ermöglichen auch native chemische Festphasenligation in Richtung vom C- zum N-Terminus mit vorübergehendem Schutz von N-terminalen Cysteinresten an einem hinzukommenden (zweiten) Peptidsegment. Durchschnittlichen Fachleuten wird bekannt sein, dass die Erfindung auch die Anwendung nichtnativer chemischer Ligation mit sequenziell ligierten Peptidsegmenten über nichtnatürliche Bindungen an eine Festphase umfassen kann. Alternativ dazu kann die Erfindung die Verwendung von nativer chemischer Ligation von Peptidsegmenten umfassen, worin diese Peptidsegmente eine oder mehrere nichtnatürliche Hauptkettenbindungen umfassen.

[0012] Die WO 96/34878 und Le Canne et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 118 (25), 5891–5896, offenbaren die Ligation von Oligopeptiden, die mittels Festphasensynthese hergestellt werden. Eines kann eine C-terminale Thioestergruppe aufweisen. Beide Oligopeptide müssen vor der Ligation vom Träger abgespalten werden. Die folgenden Verweise können auch von Interesse sein:

Matthys J. Janssen, "Thiolo, Thiono, and Dithio Acids and Esters", Kapitel 15, in: *The Chemistry of Carboxylic Acids and Their Esters* (1969).

Schnolzer et al., *Science* 256, 221–225 (1992).

Rose et al., *J. Am. Chem. Soc.* 116, 30–34 (1994).

Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6584–6588 (1994).
 Dawson et al., Science 266, 77–779 (1994).
 Sakakibara S., Biopolymers (Peptide Science) 37, 17–28 (1995).
 Tam et al., PNAS USA 92, 12485–12489 (1995).

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Die vorliegende Erfindung stellt unter anderem neue Verfahren zur Herstellung großer Polypeptide durch native chemische Ligation von Peptidsegmenten in wässriger Lösung an ein ungeschütztes, Festphasen-gebundenes Peptid ohne erforderliche Schutzgruppen an den Peptidsegmenten oder mit vorübergehendem Schutz des N-terminalen Cysteins von hinzukommenden Peptidsegmenten bereit. Zu den zahlreichen Vorteilen dieser Ausführungsform der Erfindung zählen: einfache Reinigung der Zwischen- und Endprodukte; raschere Ligationsreaktionen aufgrund nicht vorhandener Schutzgruppen und daraus resultierende verbesserte Löslichkeit von Peptidsegmenten in wässrigen oder gemischten wässrigen/organischen Lösungen; chemo-selektive Ligation aufgrund nicht vorhandener Reaktivität der Thioestergruppierung mit anderen funktionellen Gruppen, die in beiden reaktiven Peptidsegmenten vorhanden sind, um stabile Nebenprodukte zu bilden, was zu einem reineren Endprodukt ohne Nebenreaktionen führt; Anwendbarkeit zur Überwachung an der Festphase über MALDI-Massenspektrometrie oder ESI-MS (Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie); herabgesetzte Racemisierung aufgrund der Anwendung schonender Aktivierung unter Einsatz eines Thioesters und der Vermeidung erhöhter pH-Werte; direkte Gewinnung des Polypeptid-Produkts in ungeschützter Form; und Anwendbarkeit in Automatisierungs- und Kombinationsverfahren.

[0014] Ein signifikanter Vorteil der Festphasen-Ligationen gegenüber Lösungsligationen ist, dass die Festphasen-Ligationsverfahren keine mühsamen HPLC- (Hochdruckflüssigchromatographie-) Reinigungs- und Lyophilisierungsschritte nach jeder Ligationsreaktion erfordert, was für Ligationen in Lösung sehr wohl gilt. So machen die Festphasenligationen zahlreiche zeitaufwändige Reinigungsschritte überflüssig, die die Gewinnung des Endprodukts behindern. Anstedessen erfordern die hierin beschriebenen sequenziellen Festphasen-Ligationsverfahren nur einen einzigen HPLC-Reinigungs- und Lyophilisierungsschritt, nachdem das ungeschützte End-Peptidsegment ligiert wurde und das assemblierte Peptid von der Festphase abgespalten ist. Die Vermeidung dieser zeitintensiven Reinigungsschritte ermöglicht raschere Synthese des Endprodukts, d. h. des assemblierten Peptids, als dies beim analogen Verfahren in Lösung möglich wäre. Rasche Reinigung des gewünschten Festphasen-gebundenen Produkts von löslichen Nebenprodukten stellt hinsichtlich der Ausbeute des assemblierten End-Polypeptids einen außergewöhnlichen Fortschritt dar.

[0015] Ein anderer Vorteil von Festphasen-Ligationen ist, dass sie höhere Konzentrationen von Reaktanten erlauben, was zu rascheren Reaktionsgeschwindigkeiten führt. Beispielsweise können unter Verwendung eines Überschusses des hinzukommenden Peptidsegments in hoher Konzentration im Vergleich zum Festphasen-gebundenen Peptid Reaktionen sehr viel rascher abgeschlossen werden. Das überschüssige Peptidsegment kann leicht von der Festphase abgewaschen werden, nachdem die Ligationsreaktion abgeschlossen wurde. Eine erhöhte Ausbeute an Endprodukten kann durch erhöhte Konzentrationen von Peptidsegmenten erreicht werden. Beispielsweise kann das Festphasen-gebundene Polypeptid an der Festphase ausgetrocknet und in Ligationslösung neuerlich aufgelöst werden. Alternativ dazu kann das Festphasen-gebundene Peptid mit einer Lösung des hinzukommenden Peptidsegments in hoher Konzentration gewaschen werden.

[0016] Andere Vorteile der vorliegenden Erfindung sind, dass sie Synthese von viel größeren Peptiden und Proteinen ermöglicht, als es bisher mittels herkömmlicher Verfahren der Fall ist, sie ist zur Automatisierung geeignet, und die Verwendung von hohen Harzbeladungen ermöglicht einfaches Scale-up. Darüber hinaus ermöglicht die Ligation in Richtung vom N- zum C-Terminus die Verwendung roher Peptidsegmente ohne erforderliche Reinigung oder Lyophilisierung, da Terminationsprodukte, die während schrittweiser Festphasensynthese der Peptidsegmente gebildet werden, mit dem Festphasen-gebundenen Peptid nicht reaktionsfähig sind.

[0017] In einer Ausführungsform umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines assemblierten Peptids mit einer nativen Peptid-Hauptkette durch Ligieren von Peptidsegmenten in Richtung vom N- zum C-Terminus, umfassend: (a) kovalentes Binden eines ungeschützten ersten Peptidsegments an eine Festphase über einen Linker, der eine spaltbare Gruppierung umfasst, worin diese spaltbare Gruppierung unter Ligationbedingungen stabil ist und das ungeschützte erste Peptidsegment an jene spaltbare Gruppierung an seinem N-Terminus gebunden ist und an seinem C-Terminus einen α -Thioester aufweist; (b) gegebenenfalls Einführen eines zweiten ungeschützten Peptidsegments, worin das zweite Segment einen Cysteinrest an seinem N-Terminus und eine Thiosäure an seinem C-Terminus umfasst, unter geeigneten Bedingungen, um Ligation zwischen dem ersten ungeschützten Peptidsegment und dem zweiten ungeschützten Peptidsegment zu er-

möglichen, um ein nativ ligiertes Peptid zu bilden, das an die Festphase gebunden ist, worin das Festphasen-gebundene Peptid eine Thiosäure an seinem C-Terminus umfasst, und anschließendes Überführen der Festphasen-gebundenen Peptid-Thiosäure in einen Thioester; (c) gegebenenfalls das Wiederholen von Schritt (b) mit zusätzlichen ungeschützten Peptidsegmenten; (d) Einführen eines nichtgeschützten End-Peptidsegments, das einen Cysteinrest an seinem N-Terminus umfasst, unter geeigneten Bedingungen, um Ligation zwischen dem Festphasen-gebundenen Peptid und dem ungeschützten End-Peptidsegment zu ermöglichen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die spaltbare Gruppierung gespalten, um das Festphasen-gebundene Peptid in der Form des assemblierten Peptids freizusetzen. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die spaltbare Gruppierung ein spaltbarer Linker, der in der Lage ist, zum Zwecke der Überwachung der sequenziellen Ligationsreaktionen gespalten zu werden. In einer anderen Ausführungsform wird das erste ungeschützte Peptidsegment als eine Peptid- α -COSH-Thiosäure zugesetzt und anschließend zu einem Thioester umgesetzt.

[0018] Die sequenzielle Ligation in Richtung vom N- zum C-Terminus ist ein überraschend wirksames und elegantes Mittel zum Erhalt chemoselektiver Ligation von ungeschützten Peptidsegmenten ohne Racemisierung. Vor der vorliegenden Erfindung wurden sequenzielle Ligationen in Richtung vom N- zum C-Terminus aufgrund von Bedenken hinsichtlich der Racemisierung am α COX am C-Terminus des Peptids (Peptid- α COX) nicht durchgeführt. Unter Einsatz der vorliegenden Erfindung wird das α COSH am C-Terminus des Peptidsegments schonend zu einem Thioester aktiviert, und die Ligationsreaktion wird in Abwesenheit von Base in einer wässrigen gepufferten Lösung durchgeführt, was zu schonenden Bedingungen führt, die keine racemischen Gemische hervorbringen.

[0019] Die Verfahren der Erfindung können zur nativen chemischen Ligation von Peptidsegmenten, die durch schrittweise Festphasensynthese gebildet werden, verwendet werden. Das letzte Peptidsegment, das am C-terminalen Ende des letzten Festphasen-gebundenen Peptids im Reaktionsschema zuzusetzen ist, kann ein rekombinant exprimiertes Peptid sein, das einen N-terminalen Cysteinrest aufweist (Cys-rekombinantes Peptid). Die Thiosäure-Gruppierung, die zu einer Thioester-Gruppierung aktiviert wurde, kann überall dort platziert werden, wo eine native chemische Ligation erwünscht ist, umfassend an einer Seitenkette. So sind die sequenziellen Ligationen der Erfindung nicht auf linear assemblierte Peptide eingeschränkt.

[0020] In einer anderen Ausführungsform umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines assemblierten Peptids mit einer nativen Peptid-Hauptkette durch Ligieren von Peptidsegmenten in Richtung vom C- zum N-Terminus, umfassend: (a) kovalentes Binden eines ungeschützten ersten Peptidsegments an eine Festphase über einen spaltbaren "Handle" ("Henkel"), der eine spaltbare Gruppierung umfasst, worin diese spaltbare Gruppierung unter Ligationsbedingungen stabil ist und das ungeschützte erste Peptidsegment an jene spaltbare Gruppierung an seinem C-Terminus gebunden ist und an seinem N-Terminus ein Cystein aufweist; (b) Einführen eines zweiten Peptidsegments, worin das zweite Segment einen Cysteinrest an seinem N-Terminus und einen α -Thioester an seinem C-Terminus umfasst und worin das zweite Peptidsegment eine Schutzgruppe an seinem N-terminalen Cysteinrest aufweist, unter geeigneten Bedingungen, um Ligation zwischen dem ersten Peptidsegment und dem zweiten N-terminal geschützten Peptidsegment zu ermöglichen, um ein nativ ligiertes Peptid zu bilden, das an die Festphase gebunden ist, worin das Festphasen-gebundene Peptid eine an das N-terminale Cystein gebundene Schutzgruppe umfasst; (c) Entfernen der Schutzgruppe vom Festphasen-gebundenen Peptid; (d) gegebenenfalls Wiederholen der Schritte (b) und (c) mit zusätzlichen Peptidsegmenten, die ein N-terminales Cystein und einen C-terminalen α -Thioester umfassen, worin diese zusätzlichen Peptidsegmente eine Schutzgruppe aufweisen, die an den N-terminalen Cysteinrest gebunden sind; (e) Einführen eines End-Peptidsegments, das einen α -Thioester an seinem C-Terminus umfasst, was dafür sorgt, dass, sofern das End-Peptidsegment ein N-terminales Cystein umfasst, dieses N-terminale Cystein durch eine Schutzgruppe geschützt ist, worin dieses Einführen unter geeigneten Bedingungen erfolgt, um Ligation zwischen dem Festphasen-gebundenen Peptid und dem End-Peptidsegment zu ermöglichen; und (f) gegebenenfalls Entfernen der Schutzgruppe vom N-terminalen Cystein des Festphasen-gebundenen Peptids.

[0021] In einer anderen Ausführungsform umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines assemblierten Peptids mit einer nativen Peptid-Hauptkette durch Ligation von Peptidsegmenten in Richtung vom C- zum N-Terminus, umfassend: (a) kovalentes Binden eines ungeschützten ersten Peptidsegments an eine Festphase über einen spaltbaren Handle, der eine spaltbare Gruppierung umfasst, worin die spaltbare Gruppierung unter Ligationsbedingungen stabil ist und das ungeschützte erste Peptidsegment an die spaltbare Gruppierung an seinem C-Terminus gebunden ist und ein Cystein an seinem N-Terminus aufweist; (b) gegebenenfalls Einführen eines zweiten Peptidsegments, worin das zweite Segment einen Cysteinrest an seinem N-Terminus und einen α -Thioester an seinem C-Terminus umfasst und worin das zweite Peptidsegment eine Schutzgruppe aufweist, die an seinen N-terminalen Cysteinrest gebunden ist, unter geeigneten Bedingungen, um Ligation zwi-

schen dem ersten Peptidsegment und dem zweiten N-terminalen geschützten Peptidsegment zu ermöglichen, um ein nativ ligiertes Peptid zu bilden, das an die Festphase gebunden ist, worin das Festphasen-gebundene Peptid eine Schutzgruppe umfasst, die an ein N-terminales Cystein gebunden ist, und anschließendes Entfernen der Schutzgruppe vom Festphasen-gebundenen Peptid; (c) gegebenenfalls Wiederholen von Schritt (b) mit zusätzlichen Peptidsegmenten, die ein N-terminales Cystein und einen C-terminalen α -Thioester umfassen, worin diese zusätzlichen Peptidsegmente eine Schutzgruppe aufweisen, die an deren N-terminalen Cysteinrest gebunden sind; (d) Einführen eines End-Peptidsegments, das einen α -Thioester an seinem C-Terminus umfasst, der dafür sorgt, dass, sofern das End-Peptidsegment ein N-terminales Cystein umfasst, dieses N-terminale Cystein durch eine Schutzgruppe geschützt wird, worin das Einführen unter geeigneten Bedingungen erfolgt, um Ligation zwischen dem Festphasen-gebundenen Peptid und dem End-Peptidsegment zu ermöglichen; und (e) gegebenenfalls Entfernen der Schutzgruppe vom N-terminalen Cystein des Festphasen-gebundenen Peptids.

[0022] In wiederum einer anderen Ausführungsform besteht die sequenzielle Festphasen-Ligation von Peptidsegmenten entweder in eine oder in beide Richtungen, wobei ein spaltbarer Linker verwendet wird, um die Ligungsreaktionen über Massenspektrometrie zu beobachten und um das assemblierte Peptid aus der Festphase zu reinigen.

[0023] Eine andere Ausführungsform ist ein Verfahren zur nativen chemischen Festphasenligation in zwei Richtungen, umfassend das Bereitstellen eines ersten Peptidsegments, das über einen seiner inneren Aminosäurereste an einen festen Träger gebunden ist, worin dieses erste Peptidsegment ein N-terminales Cystein und einen C-terminalen Thioester umfasst, und das Ligieren eines zweiten Peptidsegments an beide Termini.

[0024] In einer anderen Ausführungsform wird ein Set bereitgestellt, das ein ungeschütztes Peptidsegment umfasst, das kovalent über eine innere funktionelle Aminosäure-Seitenkettengruppe an einen spaltbaren Handle gebunden ist, worin dieser spaltbare Handle über eine chemoselektive funktionelle Gruppe, die zu einer chemoselektiven funktionellen Gruppe an der Festphase komplementär ist, an eine Festphase gebunden wird. Dieses Set kann zur chemischen Festphasenligation ungeschützter oder N-terminal Cystein-geschützter Peptidsegmente an das Festphasen-gebundene Peptid verwendet werden. Ein bevorzugtes Beispiel für solch einen spaltbaren Handle ist ein funktionalisierter spaltbarer Handle, X-Aminoethylsulfonylethylloxycarbonyl (worin X = $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{-MSC-}$ ist oder X = $\text{AOA-NHCH}_2\text{-MSC-}$ (AOA = Aminoxyacetal) ist).

[0025] In einer anderen Ausführungsform gibt es Verfahren unter Verwendung von Bromessigsäure oder Iodessigsäure, um eine Peptidsegment-Thiosäure (Peptid- α -COSH) zu einem Thioester (Peptid- α -COSR) an einer Festphase umzusetzen.

[0026] In wiederum einer anderen Ausführungsform wird ein Verfahren zur Beobachtung des sequenziellen Festphasen-Ligationsverfahrens an der Festphase über MALDI- oder ESI-Massenspektrometrie unter Verwendung spaltbarer Linker bereitgestellt. Beobachtung mittels ESI-MS kann auch unter Verwendung eines TFA-spaltbaren Linkers durchgeführt werden, oder, wenn MALDI das eingesetzte Massenspektrometrieverfahren ist, kann vorzugsweise ein lichtspaltbarer Linker verwendet werden.

[0027] In einer weiteren Ausführungsform werden neue Verfahren zur Herstellung modularer, großer Peptid- oder Proteinbibliotheken unter Verwendung von Kombinationen der hierin beschriebenen Aspekte der Erfindung bereitgestellt. Besonders nützlich sind Verfahren der sequenziellen Festphasenligation von Peptidsegmenten, um mehrere Analoge bekannter Proteine oder Polypeptide rasch zu synthetisieren.

[0028] Auch werden Sets und Vorrichtungen zum Assemblieren von Polypeptiden und Polypeptidbibliotheken durch die hierin beschriebenen Verfahren bereitgestellt.

[0029] Fachleuten wird verständlich sein, dass jede der Ausführungsformen der Erfindung mit anderen Ausführungsformen kombiniert werden kann, um eine breite Palette an nützlichen Erfindungen zu erhalten.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0030] **Fig. 1** ist ein schematisches Diagramm eines nativen chemischen Festphasenschemas in Richtung vom N- zum C-Terminus. In einer Ausführungsform ist der Linker ein MSC-Handle, der unter Ligungsbedingungen spaltbar und dennoch stabil ist. In einer anderen Ausführungsform ist das ungeschützte erste Peptidsegment kovalent über eine Aminoxy-Keton-Bindung an eine Festphase (Harz) gebunden.

[0031] [Fig. 2A](#) veranschaulicht die Stabilität eines 13-Rests Peptid- α -COSH mit einem Cysteinrest am N-Terminus unter Ligationsbedingungen. Das HPLC-Chromatogramm zeigt, dass nur ein geringer Prozentsatz des Peptids zyklisierte oder größere Aggregate bildete, sogar nach Über-Nacht-Lagerung unter Ligationsbedingungen.

[0032] [Fig. 2B](#) veranschaulicht die Stabilität desselben 13-Rests Peptid- α COSH in Gegenwart eines Thioesterpeptids mit einem Molekulargewicht von 1.230,2. Das HPLC-Chromatogramm zeigt, dass das Cys- α -COSH-Peptid geeignet stabil ist, um zur Ligation verwendet zu werden, ohne signifikante Reaktion mit sich selbst zu zeigen. Weiters sind solche Nebenprodukte, wie sie in geringen Anteilen durch Reaktion des 13-Rests Peptid- α -COSH (mit einem N-terminalen Cystein) mit sich selbst gebildet werden, mit einem Harz-gebundenen Peptid- α -COSR nicht reaktionsfähig und können leicht durch einfaches Filtrieren und Waschen entfernt werden.

[0033] Die [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) zeigen HPLC-Chromatogramme der Wirkung von Hydrazin auf die Entfernung des MSC-Handles von einem Peptid mit einem N-terminalen Cysteinrest. Der Peak, der einer Masse von 1.708,2 entspricht, stellt das gewünschte Peptid mit entferntem MSC-Handle dar. Der der Masse von 1.814,5 entsprechende Peak stellt ein reaktives Nebenprodukt dar, das bei der Spaltung gebildet wurde und mit dem gewünschten Peptid ohne den MSC-Handle reagieren kann. [Fig. 3A](#) zeigt einen ziemlich großen Peak bei einem Molekulargewicht von 1.814,5, wenn eine Aliquote des Peptids mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,5 versetzt, anschließend in 1 N NaOH 2 Minuten lang verdünnt und dann mit 1 N HCl gequenchet wurde. [Fig. 3B](#) ist ein HPLC-Chromatogramm des resultierenden Produkts, als die Bedingungen von [Fig. 3A](#) unter Einbindung von 50 mM Hydrazin in der 6 M-Guanidin-HCl-Lösung wiederholt wurden. [Fig. 3C](#) ist ein HPLC-Chromatogramm des resultierenden Produkts, als die Bedingungen von [Fig. 3A](#) mit 200 mM Hydrazin in der 6 M-Guanidin-HCl-Lösung wiederholt wurden. Hydrazin fängt das Nebenprodukt ein, wodurch ein reineres Produkt entsteht.

[0034] [Fig. 4](#) ist ein HPLC-Chromatogramm der Entfernung eines spaltbaren MSC-Handles von einem Peptid, das keinen N-terminalen Cysteinrest, aber einen N-terminalen Leucinrest und einen Cysteinrest in etwa in seinem Zentrum aufweist. Das Molekulargewicht des Peptids mit dem MSC-Handle beträgt 4.022,4 und ohne den MSC-Handle 3.745,1. Eine Aliquote des Peptids in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaAc, pH 4,6, wurde in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaAc, pH 14 2 Minuten lang verdünnt und mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaAc, pH 2,0 gequenchet. HPLC zeigt, dass immer noch eine innere Reaktion mit dem Nebenprodukt auftritt, um einen Peak mit einem Molekulargewicht von 3.979,7 (entsprechend der Modifikation durch den LEV-NHCH₂-Handle) zu bilden, dass jedoch das Ausmaß der Reaktion geringer ist als bei einem Peptid mit einem N-terminalen Cystein.

[0035] [Fig. 5A](#) ist ein Reaktionsschema, das die Herstellung des PEGA-Harzes zeigt, das als fester Träger in sequenziellen N-zu-C-Terminus-Ligationen verwendet wird. Die Schritte A und B1 können wahlweise eingesetzt werden, um einen lichtempfindlichen Linker zur Verwendung bei MALDI-Analyse der Harzproben zu bilden.

[0036] [Fig. 5B](#) ist ein Diagramm, das ein verallgemeinertes Schema zur Herstellung einer Festphase (Harz) zur Verwendung in den sequenziellen Festphasenligationen der Erfindung veranschaulicht. Struktur 1 ist ein spaltbarer Linker, der zur Beobachtung der Entwicklung von Bindungs- und Ligationsreaktionen durch Massenspektrometrie nützlich ist. Beispielsweise kann ein lichtspaltbarer Linker zur Beobachtung auf Harz durch MALDI-MS verwendet werden, während ein TFA-spaltbarer Linker zur Beobachtung durch Elektrospray-MS verwendet werden kann. Ist Struktur 1 an das Harz gebunden, so wird die Schutzgruppe (PG) entfernt, und eine funktionelle Gruppierung (Struktur 3), die in der Lage zu chemoselektiver Reaktion mit dem ersten Peptidsegment ist, wird dem Harz zugesetzt. Nachdem 3 mit dem Harz verbunden wurde, wird die Schutzgruppe entfernt, wodurch Struktur 4 entsteht, die zur chemoselektiven Reaktion mit Struktur 5 bereit ist, einem Peptid, das mit einem spaltbaren Handle und einer funktionellen Gruppe modifiziert ist und in der Lage ist, mit dem nun modifizierten Harz (4) zu reagieren. Sind alle nachfolgenden Ligation erst einmal vollständig, so wird der "spaltbare Handle" abgespalten, um das Volllängenpeptid (assemblierte Peptid) von der Festphase freizusetzen.

[0037] [Fig. 6](#) ist ein Reaktionsschema, das die Derivatbildung von Peptidsegment 1 (dem N-terminalen Peptidsegment) veranschaulicht.

[0038] Die [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) sind HPLC-Chromatogramme der Bindung eines ersten ungeschützten Peptidsegments (1) an den festen Träger, in diesem Beispiel ein AOA-funktionalisiertes Harz (PEGA). [Fig. 7A](#) ist eine HPLC der Peptidlösung, die dem Harz zugesetzt wird. [Fig. 7B](#) ist eine HPLC des Überstandes nach der

Reaktion des Peptids mit einem Molüberschuss des Harzes über Nacht. Eine signifikante Menge des Peptids wurde vom Überstand entfernt, was darauf hinweist, dass es nach der Über-Nacht-Reaktion an das Harz gebunden war.

[0039] Die [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#) sind HPLC-Chromatogramme derselben Experimente, die in den [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) dargestellt sind, wobei jedoch Isco-Harzkügelchen als Festphase verwendet wurden.

[0040] Die [Fig. 9A](#), [Fig. 9B](#) und [Fig. 9C](#) sind Analysen der Produkte nach Schritt 1 dieser Fig., dem Binden des ersten ungeschützten Peptidsegments an die Festphase. [Fig. 9A](#) ist ein analytisches HPLC-Chromatogramm der (Base-plus-Hydrazin-) Spaltung des Harzgebundenen Peptids. [Fig. 9B](#) ist ein MALDI-Massenspektrum des Harzes, das einen Peak zeigt, der (1), dem Harz-gebundenen Peptid, entspricht. [Fig. 9C](#) ist ein MALDI-Massenspektrum nach der Basenspaltung des Linkers, welches das Fehlen eines Peaks entsprechend (1) zeigt, sowie, dass kein Peptid an der Festphase (Harz) anhaftet.

[0041] Die [Fig. 10A](#), [Fig. 10B](#) und [Fig. 10C](#) sind Analysen der Produkte nach Schritt 3 dieser Fig., d. h. nach dem Ligieren des zweiten ungeschützten Peptidsegments (2) an das Harz-gebundene Peptid (1). [Fig. 10A](#) ist eine analytische HPLC des Produkts, des Harz-gebundenen Zwischenpeptids, die einen großen Peak mit der Masse von (1) + (2) zeigt. [Fig. 10B](#) ist ein MALDI-Massenspektrum des Harzes vor der Spaltung des Linkers, und [Fig. 10C](#) ist ein MALDI-Massenspektrum des Harzes nach Basenspaltung des Linkers.

[0042] [Fig. 11](#) ist ein HPLC-Chromatogramm des entsalzten, lyophilisierten Peptidprodukts (1 + 2 + 3 aus Tabelle 1) nach 2 sequenziellen Ligationen an eine Festphase (Isco-Harz) in Richtung vom N- zum C-Terminus. Der größte Peak entspricht dem rohen lyophilisierten Produkt und gibt eine Ausbeute von etwa 36% an.

[0043] Die [Fig. 12A](#) und [Fig. 12B](#) sind ESI-MS (Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektren) des Hauptpeaks, der dem assemblierten Peptid (1 + 2 + 3 aus Tabelle 1) entspricht. [Fig. 12B](#) ist eine rekonstruierte Darstellung des Massenspektrums aus [Fig. 12A](#), das die Masse des Produkts, des ligierten Peptids, zeigt.

[0044] [Fig. 13](#) ist ein HPLC-Chromatogramm des entsalzten lyophilisierten Peptids (1 + 2 + 3) nach Basenspaltung des Linkers, um das assemblierte Peptid von der Festphase (PEGA-Harz) zu entfernen.

[0045] Die [Fig. 14A](#) und [Fig. 14B](#) sind Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektren des 7.434-Massenpeaks, worin [Fig. 14B](#) eine Rekonstruktion des Massenspektrums von [Fig. 14A](#) ist.

[0046] Die [Fig. 15A](#), [Fig. 15B](#) und [Fig. 15C](#) sind 3 HPLC-Chromatogramme, die veranschaulichen, dass das Festträger-Verfahren sowohl zur Reinigung als auch zur Ligation verwendet werden kann. Die [Fig. 15A](#) und [Fig. 15B](#) zeigen Lösungsverarbeitung eines rohen Peptids vor bzw. nach dem Entfernen von DNP-Gruppen. Beide HPLC zeigen ein Rohgemisch der Peptide. [Fig. 15C](#) ist ein HPLC-Chromatogramm derselben Peptidlösung, die in [Fig. 15A](#) gezeigt ist, nach dem Binden an einen festen Träger, dem Entfernen von DNP-Gruppen und der Basenspaltung von der Festphase, woraus ein signifikant reineres assembliertes Peptidprodukt entsteht.

[0047] Die [Fig. 16A](#) und [Fig. 16B](#) veranschaulichen das Reaktionsschema für die Synthese von MIF (1–115) über sequenzielle native Festphasenligationen in Richtung vom N-Terminus zum C-Terminus.

[0048] [Fig. 17A](#) ist ein Reaktionsschema für die Modifikation des N-terminalen Peptidsegments. [Fig. 17B](#) ist ein Diagramm, das die Modifikation der wässrig-verträglichen Festphase zur Vorbereitung der Bindung des ersten ungeschützten Peptidsegments veranschaulicht.

[0049] [Fig. 18A](#) ist ein Reaktionsschema für das Binden von N-terminalem modifiziertem MIF (1–59) an eine Festphase. [Fig. 18B](#) ist ein HPLC-Chromatogramm des freigesetzten Peptids nach Basenspaltung, das eine erwartete Masse von 6.271 Da aufweist. Die [Fig. 18C](#) und [Fig. 18D](#) sind Elektrospray-Massenspektren der Hauptkomponente des freigesetzten Peptids nach der Spaltung des spaltbaren Handles. [Fig. 18D](#) ist eine Rekonstruktion von [Fig. 18C](#).

[0050] [Fig. 19A](#) ist ein Diagramm des Ligationsschritts, um Harz-gebundenes MIF (1–80) zu bilden. [Fig. 19B](#) ist ein HPLC-Chromatogramm der Produkte nach Spaltung des spaltbaren Handles. Die [Fig. 19C](#) und [Fig. 19D](#) sind Massenspektren der Hauptkomponenten des freigesetzten Peptids nach Basenspaltung, das eine erwartete Masse von 8.502 Da aufweist. [Fig. 19D](#) ist eine rekonstruierte Darstellung des Massenspektrums aus [Fig. 19C](#).

[0051] [Fig. 20A](#) ist ein Diagramm des Ligationsschritts, um Harz-gebundenes MIF (1–115) zu bilden. [Fig. 20B](#) ist ein HPLC-Chromatogramm der Produkte nach Spaltung des spaltbaren Handles. Die [Fig. 20C](#) und [Fig. 20D](#) sind Massenspektren des freigesetzten Produkts nach Basenspaltung, das eine erwartete Masse von 12.450 Da aufweist.

[0052] [Fig. 21](#) ist ein schematisches Diagramm von Festphasenligationen in Richtung C-Terminus zu N-Terminus. Das "Harz" stellt eine Festphase dar. Das Dreieck und seine seitlich liegenden, M-förmigen Partner sind komplementäre funktionelle Gruppen, die chemoselektiv eine kovalente Bindung bilden. Der "Handle" ist ein spaltbarer Handle, der gespalten werden kann, um das assemblierte Peptidprodukt von der Festphase zu entfernen. Die Wellenlinien umfassen Aminosäurereste von Peptidsegmenten. Die "PG" stellt eine Schutzgruppe dar, die entweder an einem Seitenkettenthio oder an einer α -Aminogruppe des N-terminalen Cysteins platziert werden kann. Die Schritte 2 und 3 können, wie durch den Pfeil 4 bezeichnet, für zusätzliche Peptidsegmente wiederholt werden. Auch kann ein spaltbarer Linker zum Zwecke des Beobachtens der Bindungs- und Ligungsreaktionen zwischen dem "Handle" und dem "Harz" zugesetzt werden.

[0053] [Fig. 22](#) ist ein Reaktionsschema für sequenzielle Festphasenligation in Richtung vom C- zum N-Terminus von PLA2G5.

[0054] [Fig. 23](#) ist ein Reaktionsschema für das Synthetisieren eines Cam-Esterderivats zur sequenziellen Festphasenligation in Richtung vom C- zum N-Terminus.

[0055] [Fig. 24](#) ist ein Reaktionsschema für das Synthetisieren des C-terminalen Peptidsegments zur sequenziellen Festphasenligation in Richtung vom C- zum N-Terminus.

[0056] Die [Fig. 25A](#), [Fig. 25B](#) und [Fig. 25C](#) sind ein Diagramm eines Schemas zum Synthetisieren eines assemblierten Polypeptids über sequenzielle Festphasenligation für zwei oder mehrere Peptidsegmente in zwei Richtungen.

[0057] Die [Fig. 26A](#) und [26B](#) sind HPLC-Chromatogramme gemäß der nativen chemischen Festphasen-Festphasen-Ligation von 3 Peptidsegmenten in Richtung vom N- zum C-Terminus, woraus das assemblierte Peptid, C5a 1–74, entsteht.

[0058] [Fig. 27](#) ist ein Reaktionsschema für die Synthese eines C-terminalen Peptidsegments zur Verwendung in nativen chemischen Festphasenligationen, die hierin beschrieben werden, unter Verwendung eines spaltbaren CAM-Ester-Handles, um das synthetisierte Peptidsegment von der Festphase zu entfernen.

[0059] Die [Fig. 28A](#) und [28B](#) sind HPLC-Chromatogramme und rekonstruierte ESI-MS des assemblierten Peptids, das aus sequenzieller Festphasenligation von 3 Peptidsegmenten entsteht: Peptidsegment 1 (Seq.-ID Nr. 2) (CADRKNILA), Peptidsegment 2 (Seq.-ID Nr. 3) (CYGRLEEKG) und Peptidsegment 3 (Seq.-ID Nr. 4) (ALTKYGFYG) an Festphase in Richtung vom C- zum N-Terminus unter Verwendung von Fmoc-Schutzgruppen.

[0060] Die [Fig. 29A](#) und [29B](#) sind ein HPLC-Chromatogramm bzw. ESI-MS des Endligationsprodukts, d. h. des ersten Ligungsprodukts, das mit dem dritten Peptidsegment (ALTKYGFYG) ligiert ist, das aus sequenzieller Festphasenligation von 3 Peptidsegmenten in Richtung vom C- zum N-Terminus unter Verwendung von ACM als Schutzgruppe entsteht.

[0061] Die [Fig. 30A–H](#) sind HPLC-Chromatogramme und rekonstruierte ESI-MS der Schritte des Synthetisierens von Phospholipase A2 Gruppe 5, ein 118-Rest-Protein, unter Verwendung sequenzieller nativer chemischer Festphasenligation von vier Peptidsegmenten in Richtung vom C- zum N-Terminus. Das erste Peptidsegment ist PLA2G5 88–118, das zweite ist PLA2G5 59–87, das dritte ist PLA2G5 26–58 und das vierte ist PLA2G5 1–25. Die [Fig. 32A](#) und [32B](#) sind ein HPLC-Chromatogramm bzw. ein rekonstruiertes ESI-MS des ersten Peptidsegments. Die [Fig. 32C](#) und [32D](#) sind ein HPLC-Chromatogramm bzw. ein rekonstruiertes ESI-MS des Ligungsprodukts des ersten und zweiten Peptidsegments (PLA2G5 59–118), Die [Fig. 32E](#) und [32F](#) sind ein HPLC-Chromatogramm bzw. ein rekonstruiertes ESI-MS von PLA2G5 26–118, dem Ligungsprodukt von PLA2G5 59–118 und PLA2G5 26–58 (das dritte Peptidsegment). Die [Fig. 32G](#) und [32H](#) sind ein HPLC-Chromatogramm bzw. ein rekonstruiertes ESI-MS von PLA2G5 1–118, dem assemblierten Polypeptid.

Terminologie

[0062] Aminosäuren: Aminosäuren umfassen die 20 genetisch kodierten Aminosäuren, seltene oder übliche Aminosäuren, die in der Natur vorkommen und jegliche nicht natürlich vorkommenden und modifizierten Aminosäuren.

[0063] Wässrige Lösung: Lösungen, die Wasser enthalten, umfassend bis zu 8 M Harnstoff in Wasser, bis zu 6 M Guanidin-HCl in Wasser, bis zu 60% Acetonitril in Wasser.

[0064] Assembliertes Peptid: Das Endprodukt einer sequenziellen oder in zwei Richtungen erfolgenden Festphasenligation nach Spaltung des spaltbaren Handles. Das assemblierte Peptid umfasst zumindest zwei getrennte Peptidsegmente, die sequenziell an eine Festphase ligiert sind. Das assemblierte Peptid kann biologische Aktivität aufweisen oder nicht.

[0065] Spaltbarer Handle: Eine spaltbare Gruppierung, die in der Lage ist, selektiv gespalten zu werden, um das assemblierte Peptid aus der Festphase freizusetzen. Der spaltbare Handle muss in der Lage, unter geeigneten Bedingungen für Binden, Aktivieren, Entschützen, Ligieren, Waschen und andere Verfahrensschritte, die in die Bildung eines assemblierten Peptids eingebunden sind, Spaltung standzuhalten. Der spaltbare Handle muss auch stabil bei Bedingungen sein, die verwendet werden, um das erste Peptidsegment zu erzeugen, das in der Lage ist, an eine Festphase gebunden zu werden, umfassend beispielsweise schrittweise Festphasen-Peptidsynthese. Der spaltbare Handle ist vorzugsweise direkt neben dem ersten Peptidsegment angeordnet, sodass bei Spaltung des spaltbaren Handles das gewünschte assemblierte Peptid aus der Festphase freigesetzt wird. Der spaltbare Handle kann aus einer Vielzahl verschiedener spaltbarer Handles ausgewählt werden, die auf dem Gebiet der Erfindung verwendet werden. Siehe z. B. L. Canne et al., Tetrahedron Letters 38 (19), 3361–3364 (1997); Ball et al., J. Pept. Sci. 1, 288–294 (1995); Funakoshi et al., PNAS USA 88, 6981–6985 (1991); Funakoshi et al., J. Chromatog. 638, 21–27 (1995); Garcia-Echeverria et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 779–780 (1995). Ein bevorzugter spaltbarer Handle ist Boc-HN-CH₂-CH₂-SO₂-CH₂-CH₂-O-CO-ONp (Boc-HNCH₂-MSC-) oder ein funktionalisierter spaltbarer Handle, X-Aminoethylsulfonylethylloxycarbonyl (worin X = CH₃COCH₂CH₂CH₂CONHCH₂-MSC- ist oder X = AOA-NHCH₂-MSC- ist; AOA = Aminoxyacetal). Ein anderer bevorzugter Handle ist ein CAM-Ester. Siehe M. L. Ceccato et al., Tetrahedron Lett. 31, 6189–6192 (1990).

[0066] Spaltbare Linker: Eine spaltbare Gruppierung, die in der Lage ist, selektiv gespalten zu werden, um die sequenzielle Festphasen-Ligation unter Anwendung von Massenspektrometrie von kleinen Proben des Reaktionsgemisches zu jedem Zeitpunkt während des Ligationsverfahrens, d. h. nach Ligieren des zweiten Peptidelements, nach Ligieren des dritten Peptidsegments usw. zu beobachten. Der spaltbare Linker muss unter Bindungs- und Ligationsbedingungen, Entschützungs-Bedingungen (sofern erforderlich) und Waschbedingungen stabil sein. Bevorzugte Linker umfassen lichtempfindliche Linker und TFA-labile Linker.

[0067] Binden: Chemoselektive Reaktionen, umfassend kovalentes Binden eines ersten Peptidsegments an eine Festphase.

[0068] Ligieren: Chemoselektive Reaktionen, umfassend kovalentes Binden eines Peptidsegments an ein Festphasen-gebundenes Peptid.

[0069] Linker: Eine kovalente Bindung, die verschiedene Gruppierungen verbindet. Beispielsweise kann ein Linker ein erstes Peptidsegment und einen festen Träger miteinander verbinden, und solch ein Linker kann gegebenenfalls eine beliebige Anzahl an Gruppierungen umfassen, einschließlich spaltbarer Handles, spaltbarer Linker, komplementärer funktioneller Gruppen, die in der Lage sind, chemoselektiv eine kovalente Bindung zu bilden (z. B. Amino-oxy und Keton, um ein Oxim zu bilden).

[0070] Peptid: Ein Polymer aus zumindest zwei Monomeren, worin die Monomere Aminosäuren sind, die manchmal als Aminosäurereste bezeichnet werden, die miteinander über eine Amidbindung verbunden sind. Für die Zwecke dieser Erfindung sind die Bezeichnungen "Peptid", "Polypeptid" und "Protein" durchwegs austauschbar, da alle drei Typen über die hierin beschriebenen Verfahren hergestellt werden können. Peptide werden alternativ als Polypeptide bezeichnet. Aminosäuren umfassen die L- und D-Isoformen chiraler Aminosäuren.

[0071] Peptidsegment: Ein Peptid oder Polypeptid mit entweder einer völlig nativen Amid-Hauptkette oder einer nichtnatürlichen Hauptkette oder einem Gemisch davon im Bereich von 2 bis 1.000 Aminosäureresten, vorzugsweise von 2–99 Aminosäureresten, noch bevorzugter von 10–60 Aminosäureresten, und am meisten bevorzugt von 20–40 Aminosäureresten. Jedes Peptidsegment kann native Amidbindungen oder jede der unbekannten nichtnatürlichen Peptidhauptketten oder ein Gemisch davon umfassen. Jedes Peptidsegment kann mittels eines bekannten Syntheseverfahrens hergestellt werden, umfassend Lösungssynthese, schrittweise Festphasensynthese, Segmentkondensation und konvergente Kondensation. Das End-Peptidsegment, das zuzusetzen ist, um das assemblierte Peptidprodukt zu bilden, kann rekombinant exprimiert werden.

[0072] Schutzgruppe: Eine chemische Gruppierung, die in der Lage ist, eine funktionelle Gruppe vor einer Reaktion mit einer anderen funktionellen Gruppe zu schützen, und ohne Schaden an der gebildeten Aminosäure oder dem Peptid entfernt werden kann.

[0073] Sequenzielle Ligation: Das Ligieren von drei oder mehreren Peptidsegmenten in Reihenfolge vom C-Terminus zum N-Terminus oder vom N-Terminus zum C-Terminus, je nach ausgewählter Richtwirkung, um ein assembliertes Peptidprodukt zu erhalten. Die Richtwirkung der sequenziellen Ligationen wird stets bei dem Festphasen-gebundenen, ersten Peptidsegment beginnen und zum letzten Peptidsegment hin verlaufen, das zuzusetzen ist, um das assemblierte Peptidprodukt zu bilden.

[0074] Festphase: Ein Material mit einer Oberfläche, das im Wesentlichen unlöslich ist, wenn es organischen oder wässrigen Lösungen ausgesetzt wird, die für Bindungs-, Entschützungs- und Spaltungsreaktion verwendet werden. Beispiele für Festphasenmaterialien umfassen Glas, Polymere und Harze, umfassend Polyacrylamid, PEG, Polystyrol PEG-A, PEG-Polystyrol, makroporöse POROSTM-Cellulose, rekonstituierte Cellulose (z. B. Perloza), Nitrocellulose, Nylonmembranen, Controlled Pore Glass-Kügelchen, Acrylamidgele, Polystyrol, aktiviertes Dextran, Agarose, Polyethylen, funktionalisierte Kunststoffe, Glas, Silicium, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel und Gold. Solche Materialien können in Form von Platten, Blättern, Petri-Schalen, Kügelchen, Pellets, Scheiben oder anderen passenden Formen vorhanden sein. Cellulose-Blätter können als eine Festphase in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um Punktligation in einem räumlich adressierbaren Bereich zu vollziehen. Viele der Beispiele und Ausführungsformen, die hierin beschrieben sind, beziehen sich auf Harze, die eine Art von Festphase sind, und Fachleuten wird verständlich sein, dass solche Beispiele nicht auf Harze beschränkt sein sollten, sondern auf Festphasen im Allgemeinen. Die Bezeichnung Festphase und fester Träger werden hierin austauschbar verwendet.

[0075] Festphasen-gebundenes Peptid: Ein Festphasen-gebundenes Peptid umfasst zumindest ein Peptidsegment, das über jede beliebige Kombination von spaltbaren Linkern, Handles oder Gruppierungen an eine Festphase gebunden ist. Ein Festphasen-gebundenes Peptid kann jedes beliebige Zwischen-Peptidprodukt der sequenziellen Ligationsreaktion umfassen, einschließlich des Festphasen-gebundenen Endpeptids, das gebildet wird, nachdem das End-Peptidsegment mit dem vorletzten Festphasen-gebundenen Peptid ligiert wurde.

[0076] Thiosäure: Eine ionisierbare Thiosäure-Gruppierung, die entweder durch -COSH oder -COS⁻ dargestellt ist und sich häufig auf eine Peptid-Thiosäure bezieht, die durch "Peptid- α -COSH" oder "Peptid- α -COS⁻" dargestellt ist.

[0077] Thioester: Eine Gruppierung, die durch -COSR dargestellt und häufig mit einem Peptid verbunden ist. Beispielsweise kann ein Peptid-Thioester als "Peptid- α -COSR" dargestellt werden. Die R-Gruppe kann jede beliebige Anzahl von Gruppen sein, umfassend 1–15 C-funktionalisiertes Alkyl, unverzweigt oder verzweigt, 1–15 C-Aromaten-Strukturen, 1–4 Aminosäuren oder Derivate davon, worin vorzugsweise die R-Gruppe so ausgewählt ist, dass das Peptid- α -COSR ein aktivierter Thioester ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist R = -CH₃- ϕ , - ϕ . Die Bezeichnung "Thioester" wird üblicherweise verwendet, doch die korrekte IUPAC-Bezeichnung lautet "Thioloester". Siehe Matthys J. Janssen, s. o.

I. SEQUENZIELLE NATIVE FESTPHASEN-LIGATION VON UNGESCHÜTZTEN PEPTIDSEGMENTEN IN RICHTUNG VOM N- ZUM C-TERMINUS

[0078] Es gab bisher wenige Berichte in Bezug auf Proteine, die mittels sequenzieller Mehrfachligationen von drei oder mehr ungeschützten Peptidsegmenten synthetisiert wurden. Solche sequenzielle Ligationen von freien Peptidsegmenten in Lösung erfordern in weiterer Folge eine Reinigung (z. B. HPLC) nach jeder Ligation und erfordern typischerweise vorübergehenden Schutz einer der Funktionalitäten der mittleren Segmente.

[0079] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren der sequenziellen Festphasenligation, das den Bedarf an zahlreichen Reinigungen und den Bedarf, die mittleren Peptidsegmente vorübergehend zu schützen, vermeidet. Diese Strategie verwendet (1) die Modifikation des N-terminalen Peptidsegments mit einem spaltbaren Handle, der mit einer Gruppe funktionalisiert ist, die zu chemoselektiver Reaktion mit dem festen Träger fähig ist, und (2) sequenzielle native chemische Ligationen von ungeschützten Peptidsegmenten in Richtung vom N- zum C-Terminus. Native chemische Ligation umfasst die Reaktion eines ungeschützten Peptidsegments, das einen C-terminalen α -Thioester aufweist, mit einem zweiten ungeschützten Peptidsegment, das einen N-terminalen Cysteinrest enthält. Thiolaustausch führt zu einem Thioester-gebundenen Zwischenprodukt, das sich spontan zu einer nativen Amidbindung an der Ligationsstelle umordnet. Die Erfinder haben bestimmt, dass ein Peptidsegment, das ein N-terminales Cystein und eine C-terminale Thiosäure trägt, unter nativen Ligationsbedingungen ausreichend stabil ist und dass es keinen vorübergehenden Schutz der C-terminalen Thiosäure-Funktionalität erfordert. Demgemäß können diese Peptidsegmente als Mittelsegmente in einem sequenziellen Ligationsschema, das drei oder mehrere Peptidsegmente einbindet, wie in [Fig. 1](#) gezeigt ist, verwendet werden. Nachdem solch ein Mittelsegment an das Festphasen-gebundene, Thioester-hältige Peptid ligiert wurde, um eine Festphasen-gebundene Peptidthiosäure zu bilden, kann die Thiosäure leicht zu einem Thioester umgesetzt werden und kann mit dem N-terminalen Cystein des nächsten zu ligierenden Peptidsegments umgesetzt werden. Alternativ dazu kann das hinzukommende Peptidsegment eine innere Aminosäure mit einer nichtnatürlichen Seitenkette aufweisen, die Amino- und Thio-Gruppierungen an benachbarten C-Atomen, d. h. in einer 1,2-Beziehung zueinander, und einen nicht reaktiven, ungeschützten Nicht-Cystein-Aminosäurerest an ihrem N-Terminus trägt, was zu einem nichtlinearen assemblierten Peptid führt. Mehrfache Ligationen unterschiedlicher Peptidsegmente zur Bildung eines assemblierten Peptids, das an die Festphase gebunden ist, werden ebenfalls erwogen. Nachdem alle Ligationen vollständig sind, wird der Linker, der das Festphasen-gebundene Peptid an die Festphase bindet, abgespalten, wodurch das assemblierte Peptid, d. h. das Volllängenpeptid, freigesetzt wird. Dieses Verfahren wird bei der gesamten chemischen Synthese eines Zufallpeptids mit künstlicher Sequenz (Tabelle 1 im Experimentellen Teil) und des menschlichen Makrophagenmigrationshemmfaktors (MIF), einem 115-Aminosäure-Cytokin, das in Immunsystemfunktionen eingebunden ist, eingesetzt. Siehe die [Fig. 16–20](#).

A. Peptidsynthese

[0080] Peptidsegmente werden schrittweise mittels bekannter, Maschinen-unterstützter Festphasen-Verfahren auf Polystyrolharzen unter Verwendung von In-situ-Neutralisierungs/HBTU-Aktivierungs-Arbeitsvorschriften für Boc-Chemie (L. Canne et al., Tetrahedron Lett. 38, 3361–3364 (1997)) an Boc-Aminocycl-OCH₂-PAM-Harzen, Thioester-bildenden Harzen (Hojo et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 64, 111–117 (1991)) oder Thiosäure-bildenden Harzen synthetisiert. Nachdem die Kettenassemblierung abgeschlossen worden war, wurden Peptide entschützt und gleichzeitig durch Behandlung mit wasserfreier HF, die 5% p-Kresol enthielt, vom Harz abgespalten, lyophilisiert und durch präparative HPLC gereinigt. Das N-terminale Peptidsegment wurde vor der HF-Spaltung gereinigt, wie in [Fig. 17A](#) gezeigt wird.

B. Herstellung der Festphase

[0081] Die Festphase wird wie in den [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) dargestellt gebildet. [Fig. 5A](#) ist ein Schema zur Herstellung von PEGA-Harz als festem Träger. [Fig. 5B](#) ist ein verallgemeinertes Diagramm zur Herstellung jeder beliebigen Festphase. Ein Amino-SpheriloseTM- (Isco-) Affinitätsharz wurde mit Boc-Aminooxyessigsäure, wie in [Fig. 17B](#) gezeigt, derivatisiert.

[0082] Andere Harze, die als die Festphase zu verwenden sind, umfassen EAH-Sepharose (Pharmacia), Amino-PEGA (Novabiochem), CLEAR-Grundharz (Peptides International), Langketten-Alkylamin-Controlled-Pore-Glass (Sigma), HCL-PEG-Polystyrol (PerSeptive Biosystems), Lysine-Hyper-D-Harz (Biospera) und AgroGel-Grundharz (Argonaut Technologies). Diese Harze sind in Amino-derivatisierter Form erhältlich oder können leicht zu einer Amino-derivatisierten Form umgesetzt werden.

C. Binden modifizierter N-terminaler Peptidsegmente an die Festphase

[0083] Das modifizierte Peptid, das eine Keton-Gruppierung enthält, dargestellt in [Fig. 17A](#), wird in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, 0,15 M Methionin, pH 4,6 (1,6 mM) gelöst, dem Aminooxy-funktionalisierten festen Träger zugesetzt, der davor gründlich mit demselben Puffer gewaschen wurde, und bei Raumtemperatur über Nacht reagieren gelassen ([Fig. 16A](#), Schritt Nr. 1).

II. LIGATION IN RICHTUNG VOM N- ZUM C-TERMINUS

A. Ligationsreaktionen. Das Peptidsegment, das an den Harz-gebundenen

[0084] Peptidthioester zu ligieren war, wurde in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, 0,15 M Methionin, 0,5% Thiophenol, pH 7,5 (3,7–4,0 mM) gelöst, dem Harz-gebundenen Peptidthioester zugesetzt, der davor mit demselben Puffer gründlich gewaschen worden war, und bei Raumtemperatur über Nacht reagieren gelassen ([Fig. 16A](#) und [Fig. 16B](#), Schritte Nr. 2 und 4). Vorzugsweise liegt die Konzentration des ersten Peptidsegments je nach spezifischem Peptidsegment im Bereich von 1 bis 150 mM, noch bevorzugter im Bereich von 5 bis 100 mM, am meisten bevorzugt im Bereich von 10 bis 50 mM.

[0085] Fachleuten wird verständlich sein, dass Konzentrationen des ersten und des zweiten Peptidsegments und anderer hinzukommender Peptidsegmente unter Verwendung von Routine-Experimenten optimiert werden kann. Konzentrationen des zweiten und zusätzlicher hinzukommender Peptidsegmente können je nach spezifischem Peptidsegment im Bereich von 1 bis 200 mM, noch bevorzugter von 5 bis 100 mM, und am meisten bevorzugt von 10 bis 59 mM, liegen.

[0086] Überschüssiges erstes Peptidsegment und/oder überschüssige hinzukommende Peptidsegmente können leicht vom Festphasen-gebundenen Peptid mittels Filtration und Waschen entfernt werden.

B. Umsetzung von Thiosäure zu Thioester unter Verwendung von Bromessigsäure oder Iodessigsäure

[0087] Die Verwendung von Bromessigsäure oder Iodessigsäure ist ein verbessertes Verfahren zur Bildung von Peptid- α COSR-Thioestern aus Peptid- α COSH-Thiosäuren. Um die Löslichkeit von langen ungeschützten Peptiden sicherzustellen, werden 6 M Guanidin-HCl bei einem pH von etwa 4 verwendet. Reaktionen werden bei einem pH von etwa 4 durchgeführt. Unter solchen Bedingungen ist die einzige Gruppe, die mit Bromessigsäure oder Iodessigsäure reaktiv ist, die Thiosäure. Benzylbromid, eine hydrophobe Verbindung, geht nicht zur Gänze in Lösung, was zu langsamen und heterogenen Reaktionen führt. Die Vorteile der Verwendung von Bromessigsäure oder Iodessigsäure sind, dass beide in 6 M Guanidin-HCl (einer wässrigen Lösung) bei einem pH von etwa 4 leicht löslich sind, beide zu einem raschen Abschluss der gewünschten Reaktion führen, sich beide aus dem Hohlraumvolumen typischer Umkehr-Phasen-HPLC herauslösen und somit das Verarbeiten großer Mengen an Peptidsegmenten ermöglichen.

[0088] Die Harz-gebundene Peptidthiosäure wird in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, 0,15 M Methionin, pH 4,6 sorgfältig gewaschen und mit einer 50-mM-Lösung von Bromessigsäure in demselben Puffer 15 min lang behandelt, wonach sorgfältiges Waschen mit dem pH-4,6-Puffer erfolgt ([Fig. 16B](#), Schritt Nr. 3).

C. Abspalten von der Festphase

[0089] Spaltbare Handles, die bei Ligationen in Richtung vom N- zum C-Terminus nützlich sind, müssen in der Lage sein, unter Ligationsbedingungen stabil zu sein, bei schrittweisen Festphasen-Chemieverfahren stabil zu sein, müssen sich kovalent in ungeschützter Form an die Festphase binden lassen und müssen spaltbar sein, ohne das assemblierte Peptid zu beschädigen. Jeder beliebige spaltbare Handle, der diesen Anforderungen gerecht wird, kann verwendet werden, umfassend, jedoch nicht beschränkt auf: MSC-Handle, lichtempfindliche Linker, CAM-Ester (-OCHCONH-), (-O-CH₂- ϕ -SO-CH₂-CO-), (-O-CRH-CO- ϕ -O-CH₂-CO-). Beispielsweise kann (-O-CH₂- ϕ -SO-CH₂-CO-) als Handle verwendet werden, der unter jeder der folgenden Bedingungen spaltbar ist: (1) HF, DMS; (2) SiCl₄, TFA; oder Reduktion von Sulfoxid und TFA-Spaltung; (3) NaOH, Wasser; oder (4) Reduktion von Sulfoxid und TBAF in DMA. Siehe Samamen, J. M., J. Org. Chem. 53, 561 (1988). Als weiteres Beispiel kann das (-O-CRH-CO- ϕ -O-CH₂-CO-) als spaltbarer Handle unter den folgenden Bedingungen verwendet werden: (1) NaOH, Wasser (CAM-Linker); (2) ZnCH₃COOH/Wasser; (3) Photolyse. Siehe Tjoeng et al., Synthesis 897 (1981); Sheehan et al., J. Org. Chem. 38, 3771 (1973); Serebryakov et al., Tetrahedron 34, 345 (1978); Hendrickson et al., Tetrahedron Lett. 343 (1970); M. L. Ceccato et al., Tetrahedron Lett. 31, 6189–6192 (1990); J. Martinez et al., Tetrahedron Lett. 41, 739 (1985). Fachleuten wird die Eignung bekannter spaltbarer Handles für die hierin beschriebenen Zwecke bekannt sein.

[0090] Die folgenden Bedingungen können zur Spaltung des Linkers verwendet werden, um das assemblierte Polypeptid aus der Festphase freizusetzen, insbesondere, wenn ein MSC-Handle verwendet wird. Aliquoten für Harz-gebundenes Peptid werden mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, 0,15 M Methionin, das 200 mM Hydrazin enthält, bei einem pH von ~14 2 Minuten lang behandelt, woraufhin Waschen mit einer entsprechenden Menge an 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, 0,15 M Methionin, pH ~2 und einer entsprechenden Menge

von 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, 0,15 M Methionin, pH 4,6 folgt. Die kombinierten Eluate von freiem Peptid werden mittels analytischer HPLC und Elektrospray-Massenspektrometrie analysiert ([Fig. 16B](#), Schritt Nr. 5).

III. FESTPHASENLIGATIONEN IN RICHTUNG VOM C- ZUM N-TERMINUS

[0091] Die obige Erläuterung in Bezug auf N- zu C-Terminus-Ligationen gilt ebenso für C- zu N-Terminus-Ligationen, außer, wie in [Fig. 23](#) gezeigt wird, wenn: (1) das erste Peptidsegment an die Festphase über seinen C-Terminus gebunden ist, d. h. wenn das C-terminale Peptidsegment des resultierenden assemblierten Polypeptids jenes ist, das mit einem spaltbaren Handle modifiziert ist, und (2) die hinzukommenden (d. h. zweiten, dritten und zusätzlichen) Peptidsegmente vorübergehenden Schutz ihres N-terminalen Cysteins erfordern (siehe Schritte Nr. 2–4). Gegebenenfalls können alle Cysteinreste der hinzukommenden oder mittleren Peptidsegmente zusammen mit dem N-terminalen Cystein vorübergehend geschützt werden.

[0092] Wie im Schema ([Fig. 23](#)) beschrieben wird das C-terminale Peptidsegment, das einen spaltbaren Handle trägt, über Reaktion mit einer entsprechenden funktionellen Gruppe am festen Träger (z. B. Harz), beispielsweise durch eine Oxim-Bindung (Aminooxyacetylgruppe am Harz und ein Keton [über Lävulinsäure] am Peptid) oder umgekehrt (Aminooxyacetylgruppe am Peptid und ein Keton an der festen Phase) an den festen Träger gebunden.

[0093] Nachdem das erste Peptidsegment an die Festphase gebunden wurde, wie in Schritt 1 von [Fig. 21](#) gezeigt wird, reagiert das hinzukommende (zweite) Peptidsegment, umfassend ein N-terminales geschütztes Cys (PG-Cys) und einen C-terminalen Thioester, mit dem N-terminalen ungeschützten Cys des Harz-gebundenen ersten Peptidsegments mittels der nativen chemischen Ligationsreaktion. Ist die Ligation vollständig, so wird die Schutzgruppe des N-terminalen Cys entfernt (Schritt 3 aus [Fig. 21](#)), und das nächste Peptidsegment wird zugesetzt (Schritt 4/2 aus [Fig. 21](#)). Nachdem alle Ligationen abgeschlossen wurden (Schritt 5 aus [Fig. 21](#)), wird der Handle, der das sequenziell ligierte Peptid an das Harz bindet, gespalten, wodurch das Voll-längenpeptid freigesetzt wird. Dieses Verfahren in Richtung C- zu N-Terminus wird bei der gesamten chemischen Synthese eines Zufallpeptids mit künstlicher Sequenz und für menschliche Sekretionsphospholipase A2, Gruppe 5 ("PLA2G5"), ein 118-Aminosäureenzym, wie nachstehend beschrieben eingesetzt.

A. Peptidsynthese

[0094] Peptidsynthese zur sequenziellen nativen chemischen Festphasenligation in Richtung C- zu N-Terminus ist im Wesentlichen dieselbe wie jene, die zuvor für die sequenzielle native chemische Festphasenligation in Richtung N- zu C-Terminus beschrieben wurde.

[0095] Siehe nachstehendes Beispiel 7 bezüglich Details zur schrittweisen Festphasen-Peptidsynthese der Peptidsegmente.

B. Herstellung der Festphase

[0096] Die Herstellung der Festphase für die C-zu-N-Terminus-Richtung ist mit jener, die für die N-zu-C-Terminus-Richtung beschrieben wurde, identisch.

C. Binden des modifizierten C-terminalen Peptidsegments an die Festphase

[0097] Bedingungen zum Binden des modifizierten C-terminalen Peptidsegments an den festen Träger können mit jenen identisch sein, die zuvor für das Binden des modifizierten N-terminalen Peptids in N-zu-C-Terminus-Ligationen beschrieben wurden.

D. Ligation in Richtung vom C- zum N-Terminus

[0098] Bedingungen für native chemische Ligationsreaktionen in Richtung vom C- zum N-Terminus können mit jenen identisch sein, die zuvor für N-zu-C-Terminus-Ligationen beschrieben wurden, mit der Ausnahme, dass das N-terminale, Cystein-hältige Peptidsegment Festphasen-gebunden und das hinzukommende Thioester-enthaltende Peptidsegment in Lösung ist.

E. Cystein-Schutzgruppen und deren Entfernung

[0099] Jede beliebige bekannte Schutzgruppe, die zum Schützen des N-terminalen Cys eines Peptidsegments geeignet ist, kann verwendet werden, mit der Maßgabe, dass sie unter Ligationsbedingungen stabil ist, dass sie unter Bedingungen zum Zusetzen des Linkers stabil ist und vom Peptidsegment unter Bedingungen entfernt werden kann, die für das Festphasen-gebundene Peptid, den Linker, das Harz oder den spaltbaren Handle, sofern verwendet, nicht abträglich sind. Die Schutzgruppen müssen auch unter Bedingungen zur schrittweisen Festphasen-Peptidsynthese stabil sein. Ein Beispiel für eine Schutzgruppe ist ACM (Acetamidomethyl), das für Schutz der Cysteinseitenketten ($-\text{SCH}_2\text{NHCOCH}_3$) sorgt, und kann mit Quecksilber(II)-acetat oder anderen geeigneten Reagenzien gespalten werden. Fmoc (9-Fluorenylmethylcarbamate) stellt α -Aminoschutz bereit, kann in 20% Piperidin in DMF gespalten werden und funktioniert gut mit hydrophilen Peptiden. DNPE (2-(2,4-Dinitrophenyl)ethyl) sorgt für Schutz der Cystein-Seitenketten und spaltet sich in 50% Piperidin in DMF ab. p-Nitrobenzolsulfonyl sorgt für α -Aminoschutz und wird in 1 M DBU/1 M β -Mercaptoethanol in DMF gespalten. Zusätzliche Cystein-Schutzgruppen umfassen, sind jedoch nicht darauf beschränkt, Sulfmoc, NSC, Dde, Boc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Cys(Mob)-OH, Boc-Cys(Fm)-OH und Boc-Cys(DNPE)-OH, worin Acm = Acetamidomethyl, Mob = Methoxybenzyl, DNPE = 2-(2,4-Dinitrophenyl)ethyl, Fm = 9-Fluorenylmethyl. Siehe Protective Groups in Organic Synthesis, T. W. Green & P. G. M. Wuts (Hrsg.) (2. Auflage, 1991), insbesondere 293–294, 318–319; R. Merrifield, J. Org. Chem. 43, 4808–4816 (1978); V. V. Samukov et al., Tetrahedron Lett. 35, 7821–7824 (1994); B. W. Bycroft et al., J. Chem. Soc. Chem. Comm. 776–777 (1993); M. Royo et al., Tetrahedron Lett., 33, 2391–2394 (1992); S. C. Miller, J. Am. Chem. Soc. 119, 2301–2302 (1997). Bestimmte Schutzgruppen können Peptidsegmente löslich machen. Beispielsweise können bestimmte hydrophobe Peptidsegmente unter Zusatz einer Schutzgruppe löslich werden. Fachleute werden die Eignung jeder beliebigen spezifischen Schutzgruppe für ein Peptidsegment leicht erkennen.

[0100] Entfernen von Fmoc als Cys-Schutzgruppe. Eine Ausführungsform umfasst das Entfernen einer Fmoc-Schutzgruppe vom N-terminalen Cys eines Festphasen-gebundenen Peptids. Nach der Ligation mit einem Peptid mit einem N-terminalen Fmoc-Cys wird das Harz-gebundene Peptid mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, 0,15 M Methionin, pH 7, gefolgt von Wasser, gefolgt von DMF, gewaschen. Das Harz wird anschließend mit zwei Aliquoten von 20% Piperidin in DMF jeweils 5 Minuten lang behandelt. Das Harz wird dann sorgfältig mit DMF, anschließend mit Wasser, daraufhin mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, 0,15 M Methionin, pH 7, gewaschen.

[0101] Entfernen von ACM als eine Cys-Schutzgruppe. Nach der Ligation mit einem Peptid mit einem N-terminalen Cys(ACM) wird das Harz-gebundene Peptid mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, 0,15 M Methionin, pH 7, gefolgt von 3%iger wässriger Essigsäure, gewaschen. Das Harz wird dann mit einer Lösung von Quecksilber(II)-acetat in 3%iger wässriger Essigsäure (15 mg/ml) 30 Minuten lang behandelt, woraufhin Waschen mit 3%iger wässriger Essigsäure folgt. Das Harz wird dann mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, 0,15 M Methionin, pH 7, gewaschen, woraufhin die Behandlung mit 20%igem β -Mercaptoethanol in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, 0,15 M Methionin, pH 7, 30 Minuten lang erfolgt. Das Harz wird anschließend mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, 0,15 M Methionin, pH 7, gewaschen.

F. Abspalten von der Festphase

[0102] Spaltbare Handles werden verwendet, um das Festphasen-gebundene Peptid von der Festphase für Ligationen in Richtung vom N- zum C-Terminus, in Richtung vom C- zum N-Terminus und für den zweigerichteten Ansatz (sowohl N-zu-C-Terminus-Ligation als auch C-zu-N-Terminus-Ligation) zu spalten. Bei sequenziellen nativen chemischen Festphasenligationen in Richtung vom C- zum N-Terminus (und bei zweigerichteten Ligationen unter Verwendung von C-zu-N-Terminus-Ligation) sind die Anforderungen für das spaltbare Handle dieselben wie jene, die in Richtung N-Terminus zu C-Terminus nützlich sind, mit der zusätzlichen Bedingung, dass der spaltbare Handle unter Bedingungen stabil ist, die zur Entfernung der Schutzgruppe vom N-terminalen Cystein des Festphasen-gebundenen Peptids eingesetzt werden.

[0103] Spaltung einer Peptid-CAM-Esterbindung zur Festphase. Aliquoten von Harzgebundenem Peptid werden mit 8 M Harnstoff, 0,1 M NaPi, pH 7, gewaschen, woraufhin eine 2-minütige Behandlung mit 0,25 N NaOH in demselben 8-M-Harnstoffpuffer erfolgt (resultierender pH: ~14). Das Harz wird anschließend mit einer entsprechenden Menge an 0,25 N HCl in demselben 8-M-Harnstoffpuffer gewaschen (resultierender pH: ~2), wonach sorgfältiges Waschen mit dem 8-M-Harnstoffpuffer erfolgt. Die kombinierten Eluate von freiem Peptid werden mittels HPLC und Elektrospray-Massenspektrometrie analysiert.

IV. ZWEIGERICHTETE SEQUENZIELLE NATIVE CHEMISCHE FESTPHASENLIGATION

[0104] Wiederum eine andere Ausführungsform der Erfindung betrifft zweigerichtete Festphasen-Proteinsynthese, die Aspekte von Ansätzen sowohl für sequenzielle Festphasen-Proteinsynthese in Richtung vom N- zum C-Terminus und vom C- zum N-Terminus einbindet. Im zweigerichteten Ansatz wird ein Peptidsegment, das entweder ein N-terminales Cystein und/oder einen C-terminalen Thioester aufweist, über eine Seitenkette eines seiner Aminosäurereste an eine Festphase gebunden. Siehe die [Fig. 25A](#), [Fig. 25B](#) und [Fig. 25C](#). Das Peptidsegment kann dann an dem einen Terminus an ein zweites Peptidsegment ligiert werden, woraufhin Ligation am anderen Terminus an ein drittes Peptidsegment erfolgt. In diesem zweigerichteten Ansatz können zweite und dritte Peptidsegmente an beiden Enden in nachfolgenden Ligationen zugesetzt werden, sofern das Peptidsegment, das an die Festphase gebunden ist, sowohl ein geschütztes N-terminales Cystein als auch einen geschützten C-terminalen Thioester aufweist. Zusätzliche Peptidsegmente können anschließend an beiden Enden des ligierten Festphase-gebundenen Peptids zugesetzt werden. Die Ligationen in beide Richtungen erfolgen unter Verwendung der Verfahren, die hierin sowohl für Ligationen in Richtung vom C- zum N-Terminus als auch für solche in Richtung vom N- zum C-Terminus beschrieben wurden.

[0105] Alternativ dazu kann das erste Peptidsegment, das über einen seiner inneren Aminosäurereste an die Festphase gebunden ist, für Ligationen in nur eine Richtung verwendet werden. Beispielsweise kann das an die Festphase gebundene Peptidsegment an ein zweites Peptidsegment an einem Terminus ligiert werden, woraufhin eine oder mehrere Ligationen an zusätzliche Peptidsegmente am selben Terminus des zweiten Peptidsegments folgen. In dieser Ausführungsform kann das an die Festphase gebundene Peptidsegment entweder für sequenzielle native chemische Festphasenligationen in Richtung vom C- zum N-Terminus oder für sequenzielle native chemische Festphasenligationen in Richtung vom N- zum C-Terminus verwendet werden. In dieser Ausführungsform kann das an die Festphase gebundene Peptidsegment zweigerichtet fähig sein (d. h. sowohl ein geschütztes N-terminales Cystein als auch einen C-terminalen Thioester aufweisen), während es für eingerichtete sequenzielle Ligationen verwendet wird (d. h. dass es entweder ein geschütztes N-terminales Cystein oder einen C-terminalen Thioester aufweist).

[0106] Das erste Peptidsegment ist an die Festphase über eine Seitenkette eines seiner Aminosäurereste gebunden, die an einen spaltbaren Handle gebunden ist, der über eine funktionelle Gruppierung, die in der Lage ist, chemoselektiv eine kovalente Bindung mit einer komplementären funktionellen chemischen Gruppierung an die Festphase zu bilden, an die Festphase gebunden ist, wie in **Fig. 25** dargestellt.

[0107] Beispielsweise kann das erste Peptidsegment über die Seitenkette eines Lysins, von Asparaginsäure oder Glutaminsäure, an die Festphase gebunden sein, wobei hierbei ein spaltbarer Handle, basierend auf Funktionalitäten wie Allyloxycarbonyl (alloc) oder Fmoc, d. h. spaltbar unter orthogonalen Bedingungen, verwendet werden kann, um das Peptidsegment mit der Festphase über die Seitenkette seines Lysins, seiner Asparaginsäure oder Glutaminsäure zu verbinden. Als ein anderes Beispiel kann eine Oximbindung durch das erste Peptidsegment und die Festphase gebildet werden, worin das erste Peptidsegment entweder eine Aminooxy- oder Keton-chemoselektive funktionelle Gruppe umfasst und die Festphase eine komplementäre chemoselektive funktionelle Gruppe, wie beispielsweise Keton bzw. Aminooxy, umfasst.

V. VERWENDUNG VON SPALTBAREN LINKERN UND MASSENSPEKTRO METRIE ZUR BEOBACHTUNG VON LIGATIONSREAKTIONEN

[0108] Verschiedene bekannte Linker können verwendet werden, um die sequenziellen Festphasenligationen zu beobachten. Diese spaltbaren Linker werden zwischen die Festphase und das erste Peptidsegment platziert, das kovalent an den spaltbaren Handle gebunden ist, z. B. Festphase – spaltbarer Linker – spaltbarer Handle – Peptidsegment. Die spaltbaren Linker sind in der Lage, leicht gespalten zu werden, um Massensepektrometrie-Analyse eines geringen Anteils an Festphasen-gebundenem Peptid zu ermöglichen, um die Bindungs- und Ligrationsreaktionen zu beobachten.

[0109] Besteht beispielsweise die Festphase aus Harzkügelchen, so können einige wenige Harzkügelchen aus dem Harzgemisch nach der Bindungsreaktion oder nach jeder Ligrationsreaktion entnommen werden, um das Ausmaß der Reaktion zu bestimmen. Besonders bevorzugte spaltbare Linker umfassen lichtempfindliche spaltbare Linker zur MALDI-Massenspektrometrie, umfassend 3-Nitro-4(methylamino)benzoyl-. Siehe [Fig. 5A](#). Eine kleine Aliquote des Reaktionsgemischs wird zur MALDI-MS-Analyse entfernt und auf einem Objektträger vermischt mit einer Matrixlösung getrocknet. Der Laser des MALDI-Massenspektrometers spaltet den lichtempfindlichen Linker auf Massenspektrometer-Ebene, was eine Analyse der freigesetzten Peptide ermöglicht.

[0110] Ein anderer bevorzugter Linker ist einer, der durch TFA (Trifluoressigsäure) spaltbar ist, da dieser für Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie nützlich ist. Mit TFA-spaltbaren Linkern werden die Peptide vor ESI-MS von der Festphase abgespalten.

Beispiel 1: Herstellung der Festphase für N-zu-C-Terminus-Ligationen

[0111] Die Herstellung der Festphase ist schematisch im Diagramm in **Fig. 5** dargestellt. Die Festphase ist ein Harz, beispielsweise Amino PEGA (0,2–0,4 mmol/g, gequollen in Methanol), oder ein Amino-Spherilose-Affinitätsharz (15–20 Tmol/ml, 0,6–0,9 mmol/g Trockenharz), erhältlich bei Pharmacia, NovaSyn oder Isco. Das Harz (PEGA oder Isco) wird zuerst mit DMF (Dimethylformamid) und dann kurz mit 10%igem DIEA (Diisopropylethylamin) gewaschen. Es werden zwei 30-s-DMF-Durchflusswaschschritte verwendet. Ein lichtspaltbarer Linker (PCL) (siehe [Fig. 5A](#)) wird mit einem Äquivalent HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat und DIEA in DMF 5 bis 10 Minuten lang aktiviert. Dieser aktivierte lichtspaltbare Linker wird dann dem Harz zugesetzt und wird bei Raumtemperatur ~3 Stunden lang stehen gelassen (Ninhydrin kann mit Isco verwendet werden). Zwei 30-s-DMF-Durchflusswaschschritte werden verwendet, gefolgt von TFA (1 min × 2) und zwei weiteren 30-s-DMF-Durchflusswaschschritten. Die verbleibenden Schritte werden in abgekürzter Form dargestellt:

- 10% DIEA (1 min × 2)
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- Zusatz von aktivierter Boc-Aminooxyessigsäure (aktiviert mit einem Äquivalent DIC und N-Hydroxysuccinimid in DMF, 30–60 min lang)
- Stehenlassen bei Raumtemperatur, 1 Stunde lang (Ninhydrin kann mit Isco verwendet werden)
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2) [Harz kann in dieser Phase gelagert werden]
- TFA (1 min × 30)
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- 10% DIEA (1 min × 2)
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- sorgfältiges Waschen mit wässrigem Puffer (6 M GuHCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6) (1 ml × 5)

Beispiel 2: Herstellung des ersten ungeschützten Peptidsegments für N-zu-C-Terminus-Ligationen

[0112] Die folgenden Verfahren werden verwendet, um das erste Peptidsegment (N-Terminus) herzustellen, das in den [Fig. 6](#), [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) in Form eines Diagramms dargestellt ist.

[0113] Das Peptidharz wird in DMF gequollen.

- TFA (1 min × 2)
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- 10% DIEA (1 min × 2)
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- Zusatz von MSC-Handle in DMF
- Stehenlassen bei Raumtemperatur, 1 h
- Zusatz von DIEA und Stehenlassen für eine weitere Stunde
- Einsatz des Ninhydrintests zur Überprüfung korrekter Bindung
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- TFA (1 min × 2)
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- 10% DIEA (1 min × 2)
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- Zusatz von aktivierter Lävulinsäure (aktiviert als symmetrisches Anhydrid mit 0,5 Äquivalenten DIC in DCM, 5 bis 10 min)
- Stehenlassen bei Raumtemperatur, 30 min lang
- Ninhydrintest zur Überprüfung korrekter Ligation
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- sorgfältiges Waschen mit DCM
- Trocknen im Gefriertrockner
- HF-Spaltung bei 0°C 1 Stunde lang unter Verwendung von p-Kresol als Fänger
- Trituration und Waschen mit kaltem Ethylacetat
- Auflösen in 50% B und Gefriertrocknen
- Reinigen mittels präparativer HPLC

Tabelle 1

Sequenzielle Festphasenligationen: N-Terminus zu C-Terminus	
3-Zufallspeptidsegment-Modellsystem	
Lev-MSCLTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHG-COS) (1)	
+ Harz-PCL-ONH ₂	
↓ 1. pH 4,6, 6 M GuHCl, 0,1 M Acetat	
Harz-PCL-Oxim-MSCLTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHG-COS) (1)	
↓ 2. pH 4,6, 6 M GuHCl, 0,1 M Acetat, 50 mM BrAcOH	
Harz-PCL-Oxim-MSCLTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHG-COSAc (1)	
+ H-CGFRVREFGDNTA-COS) (2)	
↓ 3. pH 7,5, 6 M GuHCl, 0,1 M Phosphat, 0,5 % Thiophenol	
Harz-PCL-Oxim-MSCLTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHG	
CGFRVREF-GDNTA-COS) (1+2)	
↓ 4. pH 4,6, 6 M GuHCl, 0,1 M Acetat, 50 mM BrAcOH	
Harz-PCL-Oxim-MSCLTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHG	
CGFRVREF-GDNTA-COSAc (1+2)	
+ H-CADPSEEWVQKYVSDLELSA-OH (3)	
↓ 5. pH 7,5, 6 M GuHCl, 0,1 M Phosphat, 0,5 % Thiophenol	
Harz-PCL-Oxim-MSCLTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHG	
CGFRVREF-GDNTACADPSEEWVQKYVSDLELSA-OH (1+2+3)	
↓ 6. pH 14, 6 M GuHCl, 0,1 M Phosphat, 200 mM Hydrazin	
H-LTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHGCCGFRVREF-	
GDNTACADPSEEWVQKYVSDLELSA-OH (1+2+3)	
PCL= lichtspaltbarer Linker	

Beispiel 3: Native chemische Festphasenligation von Zufallspeptidsegmenten in wässriger Lösung in Richtung N- zu C-Terminus

[0114] Die folgenden Verfahren werden für Festphasenligationen in Richtung vom N- zum C-Terminus, wie in Tabelle 1 dargestellt ist, verwendet. Allgemeine Prinzipien für native chemische Ligation sind in der WO 96/34.878, PCT/US95/05.668, durch Verweis hierin aufgenommen, beschrieben.

[0115] Das Harz wird mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 (1 ml × 5) gewaschen und entwässert. Das modifizierte N-terminale Peptidsegment wird in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 aufgelöst, dem Harz zugesetzt und bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. (Die Konzentration des ersten Segments beträgt zumindest 5 mM.) Am nächsten Morgen wird das Harz mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 (1 ml × 5) gewaschen und entwässert. Eine Harzprobe wird für MALDI-MS-Analyse gezogen und mit 50% B, MeOH, DCM gewaschen und getrocknet. Eine Harzprobe wird zur Basenspaltung gezogen und mit 200 µl 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, 200 mM Hydrazin, pH ~14 2 Minuten lang behandelt und entwässert, das Harz wird mit 200 µl 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, 200 mM Hydrazin, pH ~2 und mit 200 µl 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 gewaschen, und die kombinierten Eluate werden mit TCEP vor Injektion auf HPLC behandelt.

[0116] Zur Vorbereitung auf den Zusatz des nächsten Peptidsegments wird das Harz mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,5 (1 ml × 5) gewaschen und entwässert. Das zweite Peptidsegment (Cys-COSH) wird in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,5, 0,5% Thiophenol aufgelöst und dem Harz zugesetzt. Dieses Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Am nächsten Morgen wird das Harz mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 (1 ml × 5) gewaschen und entwässert. Harzproben werden zur MALDI-MS und Basenspaltung entnommen und wie zuvor beschrieben behandelt.

[0117] Das Festphasen-gebundene Harz wird dann durch Behandeln des Harzes mit 50 mM BrAcOH in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 (1 ml × 5) von COSH zu COSAc umgesetzt.

[0118] Das Harz wird mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 (1 ml × 5) gewaschen und entwässert.

[0119] Zur Vorbereitung auf den Zusatz des nächsten Peptidsegments wird das Harz in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,5 (1 ml × 5) gewaschen und entwässert. Das End-Peptidsegment wird in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,5, 0,5% Thiophenol gelöst und dem Harz zugesetzt. Dieses Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Morgen wird das Harz mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 (1 ml × 5) gewaschen und entwässert. Eine Harzprobe wird zur Beobachtung durch MALDI-MS-Analyse gezogen.

[0120] Das assemblierte Peptid wird von der Festphase über Basenspaltung des spaltbaren Handles vom verbleibenden Harz, wie zuvor beschrieben wurde, entfernt, jedoch in größerem Maßstab, woraufhin die Schritte der Reinigung mittels HPLC oder Entsalzung auf einer PD-10-Säule und des Gefriertrocknens folgen.

Beispiel 4: Native chemische Festphasenligation von C5a(1–74) (74aa) in Richtung vom N- zum C-Terminus

[0121] Dieses Beispiel beschreibt sequenzielle native chemische Festphasenligation in Richtung vom N- zum C-Terminus von C5a, Komplementärfaktor 5A. Die Sequenz von C5a ist:
TLQKKIEEIAAKYKJSVVKCCYDGACVNDETCEQRAARISLGPCKIKAFTECCVV ASQLRANISHKDMQL-GR.

[0122] Dieses Peptid wird unter Anwendung von sequenzieller nativer Festphasenligation aus 3 Peptidsegmenten hergestellt: C5a(1–20), C5a(21–46) und C5a(47–74). Die Verfahren, die eingesetzt werden, um C5a durch Festphasenligation zu synthetisieren, sind mit jenen identisch, die für die sequenzielle native Festphasenligation von MIF beschrieben werden (siehe Beispiel 5).

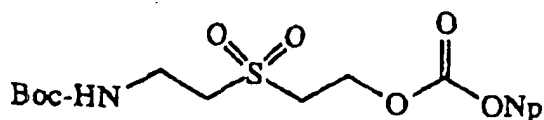
Beispiel 5: Sequenzielle native chemische Festphasenligation von MIF (1–115) (115aa) in Richtung vom N-Terminus zum C-Terminus

[0123] Die Sequenz von MIF (1–115) ist:
MPMFIVNTNVPRAVDPDGLSELTQQLAQATGKPPQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPC
ALCSLHSIGKIGGAQNRYSKLLCGLLAERLRISPDRVYINYYDMNAASVGVWNNSTF

[0124] A. Dieses Peptid wird unter Verwendung von sequenzieller nativer Festphasenligation aus 3 Peptidsegmenten hergestellt: MIF (1–59), MIF (60–80) und MIF (81–115). Siehe die **Fig. 16–20**.

[0125] Schritt Nr. 1: Das erste ungeschützte Peptidsegment, MIF (1–59) wird an eine Festphase, wie in **Fig. 18** dargestellt, gebunden. Die Bindungsbedingungen sind 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, 0,15 M Methionin, pH 4,6, 24 Stunden.

[0126] Der verwendete MSC-Handle ist:



[0127] Der spaltbare Handle basiert auf Methylsulfonylethyloxycarbonyl- (MSC-) Amino-Schutzgruppe. Er kann leicht an den ungeschützten Amino-Terminus von Peptidharzen addiert werden, überlebt HF-Schutzaufhebung und Spaltung vom Harz, wird durch wässrige Basen leicht und sauber abgespalten und ist mit einem geschützten Amin versehen, das mit zahlreichen Funktionalitäten derivatisiert werden kann.

[0128] Schritt Nr. 2: Das zweite ungeschützte Peptidsegment (Cys60-MIF(61–80)-COSH) wird anschließend unter den Bedingungen 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, 0,5% Thiophenol, 0,15 M Methionin, pH 7,5, 24 Stunden lang an das erste ungeschützte Festphasen-gebundene Peptidsegment ligiert.

[0129] Schritt Nr. 3: Das Festphasen-gebundene Peptid, MIF(1–80)-COSH wird dann unter den folgenden Bedingungen zum Thioester aktiviert: 50 mM BrCO₂COOH, 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, 0,15 M Methionin, pH 4,6, 15 min.

[0130] Schritt Nr. 4: Das dritte ungeschützte Peptidsegment (Cys81-MIF82–115-COOH) wird mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPi, 0,5% Thiophenol, 0,15 M Methionin, pH 7,5 24 Stunden lang an das Festphasen-gebundene Peptid ligiert.

[0131] Schritt Nr. 5: Das MIF(1–115), das an die Festphase gebunden ist, wird dann vom festen Träger durch Basenspaltung des spaltbaren Handles unter den folgenden Spaltungsbedingungen abgespalten: 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, 0,15 M Methionin, 200 mM Hydrazin, bei einem pH von ~14 2 Minuten lang, gefolgt von 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Na-Acetat, 0,15 M Methionin, 200 mM Hydrazin, bei pH ~2. Die erwartete Masse des assemblierten Peptids MIF(1–115), das bei der Basenspaltung freigesetzt wird, beträgt 12.450 Da. Die [Fig. 20C](#) und [Fig. 20D](#) sind Massenspektren des assemblierten Peptids mit einer erwarteten Masse von 12.450. [Fig. 20D](#) ist eine Rekonstruktion des Massenspektrums aus [Fig. 20C](#). [Fig. 20B](#) ist ein HPLC-Chromatogramm des assemblierten Peptids.

Beispiel 6: Native chemische Festphasenligation von Phospholipase A2, Gruppe 5(1–118) (118aa) in Richtung vom C- zum N-Terminus

[0132] Die Sequenz von Phospholipase A2, Gruppe 5 (PLA2G5) ist:
 GLLDLKSMIEKVTGKNALTNYGFGYGCYCGWGGRGTPKDGTDWCCWANDHCYGRLL
 EEKGCNIRTQSYKYRFAWGVVTCEPGPFCHVNLACDRKLVYCLKRNLRNLSYNPQYQ YFPNILCS.

[0133] Dieses Peptid wird unter Verwendung von sequenzieller nativer Festphasenligation aus 4 Peptidsegmenten hergestellt: PLA2G5 (1–25), PLA2G5 (26–58), PLA2G5 (59–87) und PLA2G5 (88–118). Die Verfahren, die verwendet werden, um PLA2G5 durch Festphasenligation zu synthetisieren, sind mit jenen identisch, die verwendet werden, um die Zufallssequenz unter Verwendung von ACM-Schutz für die N-terminalen Cys-Reste der Mittelsegmente zu synthetisieren, wie in Beispiel 9 beschrieben wird. Siehe [Fig. 22](#) für das Reaktionsschema. Das Cam-Ester-Derivat wird synthetisiert und in das C-terminale Peptidsegment gemäß den Diagrammen der [Fig. 23](#), [Fig. 24](#) und [Fig. 27](#) eingebunden.

Beispiel 7: Herstellung des modifizierten C-terminalen Peptidsegments (mittels Harz-CAM-Linker-Synthese) ([Fig. 27](#))

[0134] Das ausgewählte, im Handel erhältliche Harz (MBHA, jedes beliebige Boc-AA-OCH₂-Pam-Harz) wird in DMF-TFA (1 min × 2) gequellt (nicht erforderlich, sofern mit MBHA-Harz gearbeitet wird).

- TFA (1 min × 2) (nicht erforderlich, sofern mit MBHA-Harz gearbeitet wird)
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- Zusatz von aktiviertem Boc-Lys(Fmoc)-OH (HBTU/DIEA-Aktivierung), Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion nach 10–15 Minuten mittels Ninhydrintest
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- TFA (1 min × 2)
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- 10% DIEA in DMF (1 min × 2)
- Zusatz von aktivierter Bromessigsäure (aktiviert wie das symmetrische Anhydrid mit 0,5 Äquivalenten DIC in DCM 5–10 Minuten lang), Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion nach 30 Minuten mittels Ninhydrintest
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- Zusatz der ersten Boc-geschützten Aminosäure der Sequenz (Boc-AA-OH) 2 M in 20% DIEA in DMF. Stehenlassen bei Raumtemperatur, 3 Stunden lang.
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- Synthetisieren der verbleibenden Sequenz mittels Standard-Arbeitsvorschriften für Boc-Chemieverfahren
- Entfernen der Fmoc-Gruppe durch Behandlung mit 20% Piperidin in DMF (5 min × 2)
- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- Zusatz von aktivierter Lävulinsäure (aktiviert wie das symmetrische Anhydrid mit 0,5 Äquivalenten DIC in

DCM 5–10 Minuten lang), Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion nach 30 Minuten durch Ninhydrin-test

- DMF-Durchflusswaschen (30 s × 2)
- sorgfältiges Waschen mit DCM
- sorgfältiges Trocknen des Harzes
- HF-Spaltung bei 0°C 1 Stunde lang unter Verwendung von p-Kresol als Fänger
- Trituration und Waschen mit kaltem Ethylether
- Lösen in wässrigem HPLC-Puffer und Lyophilisieren
- Reinigen durch präparative HPLC

Beispiel 8: Native chemische Festphasenligation von Zufallspeptidsegmenten in Richtung vom C- zum N-Terminus unter Verwendung von Fmoc-Schutz (Siehe [Fig. 28](#))

[0135] Die folgenden Verfahren können für Festphasenligationen in Richtung vom C- zum N-Terminus, wie in Tabelle 2 dargestellt, verwendet werden. Beispielsweise kann das Zufallspeptid ALTKYGFYGCYGRLEEKGCADRNILA in drei Peptidsegmenten ligiert werden (in Richtung C- zu N-Terminus): Segment 1 = CADRNILA; Segment 2 = CYGRLEEKGC; und Segment 3 = ALTKYGFYG.

[0136] Das Harz wird mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 (1 ml × 5) gewaschen und entwässert. Das modifizierte C-terminale Peptidsegment (erstes Peptidsegment) wird in 6 M Gu·HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 (5 mM erstes Peptidsegment) gelöst, dem Harz zugesetzt und wird bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Das Harz wird mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 (1 ml × 5) gewaschen und entwässert. Eine Probe wird zur Basenspaltung gezogen und wird mit 8 M Harnstoff, 0,1 M NaPi, pH 7 behandelt, wird 2 Minuten lang mit 0,25 N NaOH im selben 8-M-Harnstoff-Puffer behandelt (resultierender pH: ~14), mit einer entsprechenden Menge an 0,25 N HCl in demselben 8-M-Harnstoff-Puffer gewaschen (resultierender pH: ~2), und die kombinierten Eluate werden vor Injektion auf HPLC mit TCEP behandelt.

[0137] Zur Vorbereitung des Zusatzes des nächsten Segments wird das Harz mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0 (1 ml × 5) gewaschen und entwässert. Das zweite Peptidsegment (Fmoc-Cys-Peptid-COSR) wird in 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0, 0,5% Thiophenol (zu zumindest 10 mM bis 50 mM an zweitem Peptidsegment) gelöst und dem Harz zugesetzt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Das Harz wird mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0 (1 ml × 5), Wasser (1 ml × 5), DMF (1 ml × 5) gewaschen, und die Fmoc-Schutzgruppe wird durch Behandeln mit zwei Aliquoten von 20% Piperidin in DMF (5 min jeweils) entfernt. Das Harz wird anschließend mit DMF (1 ml × 5), Wasser (1 ml × 5) und mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0 (1 ml × 5) gewaschen. Eine Harzprobe wird gezogen und wie zuvor beschrieben basengespalten.

[0138] Das Endpeptidsegment wird in mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0, 0,5% Thiophenol gelöst und dem Harz zugesetzt. Dieses Gemisch wird bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Das Harz wird dann mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0 gewaschen, und anschließend wird das assemblierte Peptid von der Festphase mittels Basenspaltung des spaltbaren Handles vom verbleibenden Harz, wie zuvor beschrieben wurde, entfernt, dies jedoch in größerem Maßstab, woraufhin Reinigung mittels HPLC oder Entsalzen an PD-10-Säule und Gefriertrocknen erfolgen.

[0139] Diese Verfahren können angewandt werden, um jedes beliebige Peptid, das Cysteinreste aufweist, herzustellen.

Beispiel 8A: Native chemische Festphasenligation von Zufallspeptidsegmenten in Richtung vom C- zum N-Terminus unter Verwendung von DNPE-Schutz

[0140] DNPE (2-(2,4-Dinitrophenylethyl)) ist eine andere Cystein-Seitenketten-Schutzgruppe, die für Ligationen in Richtung vom C- zum N-Terminus verwendet werden kann. Beispiel 8 wurde unter Verwendung von DNPE als Schutzgruppe wiederholt. Die Bedingungen zur chemischen Festphasenligation von Zufallspeptidsegmenten in Richtung vom C- zum N-Terminus waren mit jenen identisch, die in Beispiel 8 verwendet wurden, mit der Ausnahme, dass beim Entfernen der DNPE-Schutzgruppe 50%iges Piperidin verwendet wurde.

Beispiel 9: Native chemische Festphasenligation von Zufallspeptidsegmenten in Richtung vom C- zum N-Terminus unter Verwendung von ACM-Schutz

[0141] Die folgenden Verfahren werden für Festphasenligationen in Richtung vom C- zum N-Terminus verwendet, wie in Tabelle 3 dargestellt ist. Es wird dasselbe Zufallspolypeptid wie im obigen Beispiel ligiert.

[0142] Das Harz wird mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 (1 ml × 5) gewaschen und entwässert. Das modifizierte C-terminale Peptidsegment wird in 6 M Gu·HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 gelöst, dem Harz zugesetzt und wird bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Das Harz wird mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 4,6 (1 ml × 5) gewaschen und entwässert. Eine Probe wird zur Basenspaltung gezogen und wird mit 8 M Harnstoff, 0,1 M NaPi, pH 7 behandelt, wird 2 Minuten lang mit 0,25 N NaOH im selben 8-M-Harnstoff-Puffer behandelt (resultierender pH: ~14), mit einer entsprechenden Menge an 0,25 N HCl in demselben 8-M-Harnstoff-Puffer gewaschen (resultierender pH: ~2), und die kombinierten Eluate werden vor Injektion auf HPLC mit TCEP behandelt.

[0143] Zur Vorbereitung des Zusatzes des nächsten Segments wird das Harz mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0 (1 ml × 5) gewaschen und entwässert. Das zweite Peptidsegment (Fmoc-Cys-Peptid-COSR) wird in 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0, 0,5% Thiophenol (zu zumindest 10 mM zweites Peptidsegment) gelöst und dem Harz zugesetzt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Das Harz wird mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0 (1 ml × 5), 3%iger Essigsäure in Wasser (1 ml × 5) gewaschen, und die ACM-Schutzgruppe wird durch Behandeln mit Quecksilber(II)-acetat in 3%iger Essigsäure in Wasser (15 mgs/ml) 30 Minuten lang entfernt. Das Harz wird anschließend mit 3%iger Essigsäure in Wasser (1 ml × 5) und mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0 (1 ml × 5) gewaschen und mit 20%igem β-Mercaptoethanol in 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0 30 Minuten lang behandelt, woraufhin es mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0 (1 ml × 5) gewaschen wurde. Eine Harzprobe wird gezogen und wie zuvor beschrieben basengespalten.

[0144] Das Endpeptid wird in 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0, 0,5% Thiophenol gelöst und dem Harz zugesetzt. Dieses Gemisch wird bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Das Harz wird dann mit 6 M Gu·HCl, 0,1 M NaPi, pH 7,0 gewaschen, und das assemblierte Peptid wird von der Festphase über Basenspaltung des spaltbaren Handles vom verbleibenden Harz wie zuvor beschrieben entfernt, dies jedoch in größerem Maßstab, woraufhin Reinigung mittels HPLC oder Entsalzen auf PD-10-Säule und Gefriertrocknen durchgeführt werden.

Tabelle 2

Polymer-unterstützte Ligationen

in Richtung C-Terminus zu N-Terminus

Fmoc-Schutz

H-CADRKNILA-CAM-Lys(Lävulinsäure)-NH₂ (1)+ Harz-ONH₂

↓ 1. pH 4,6, 6 M Gu·HCl, 0,1 Acetat

H-CADRKNILA-CAM-Lys-Oxim-Harz (1)

+ Fmoc-CYGRLEEKGCOSR (2)

↓ 2. pH 7,5, 6 M Gu·HCl, 0,1 Phosphat, 0,5 % Thiophenol

Fmoc-CYGRLEEKGCADRKNILA-CAM-Lys-Oxim-Harz (1+2)

↓ 3. 20 % Piperidin/DMF

H-CYGRLEEKGCADRKNILA-CAM-Lys-Oxim-Harz (1+2)

+ H-ALTKYGFYGCOSR (3)

↓ 4. pH 7,5, 6 M Gu·HCl, 0,1 M Phosphat, 0,5 % Thiophenol

H-ALTKYGFYGCYGRLEEKGCADRKNILA-CAM-Lys-Oxim-Harz (1+2+3)

↓ 5. pH 14, 8 M Harnstoff, 0,1 M Phosphat, 0,25 N NaOH

H-ALTKYGFYGCYGRLEEKGCADRKNILA-OH

Polymer-unterstützte Ligationen

in Richtung C-Terminus zu N-Terminus

ACM-Schutz

H-CADRKNILA-CAM-Lys(Lävulinsäure)-NH₂ (1)

+ Harz-OH

↓ 1. pH 4,6, 6 M Gu·HCl, 0,1 Acetat

H-CADRKNILA-CAM-Lys-Oxim-Harz (1)

+ H-C(ACM)YGRLEEKGCOSR (2)

↓ 2. pH 7,5, 6 M Gu·HCl, 0,1 Phosphat, 0,5 % Thiophenol

H-C(ACM)YGRLEEKGCADRKNILA-CAM-Lys-Oxim-Harz (1+2)

↓ 3. Quecksilber(II)-acetat in 3 % wässr. AcOH

b. 20 % Mercaptoethanol in pH 7,5, 6 M Gu·HCl, 0,1 M Phosphat

H-CYGRLEEKGCADRKNILA-CAM-Lys-Oxim-Harz (1+2)

+ H-ALTKYGFYGCOSR (3)

↓ 4. pH 7,5, 6 M Gu·HCl, 0,1 M Phosphat, 0,5 % Thiophenol

H-ALTKYGFYGCYGRLEEKGCADRKNILA-CAM-Lys-Oxim-Harz (1+2+3)

↓ 5. pH 14, 8 M Harnstoff, 0,1 M Phosphat, 0,25 N NaOH

H-ALTKYGFYGCYGRLEEKGCADRKNILA-OH

Beispiel 10: Zweigerichtete sequenzielle native chemische Festphasenligation

[0145] Dieses Beispiel veranschaulicht eine der Ausführungsformen des zweigerichteten Ansatzes zur Festphasen-Proteinligation, wobei mit einem ersten Peptidsegment begonnen wird, das an die Festphase gebunden ist, worin das erste Peptidsegment ein "Mittelstück" des gewünschten Zielproteins ist, d. h. das erste Peptidsegment, gebunden an die Festphase, wird für Ligationen sowohl am N-terminalen Cystein als auch am C-terminalen Thioester verwendet.

[0146] Beginnend bei einem der Mittelstücke des Zielproteins wird ein spaltbarer Linker der Seitenkette eines der Aminosäurereste des Mittelstücks zugesetzt. Die Seitenkette jedes beliebigen Aminosäurerestes mit einer schützbaaren funktionellen Gruppe kann verwendet werden, umfassend vorzugsweise Asparaginsäure oder Glutaminsäure. Am meisten bevorzugt wird ein Lysin-Aminosäurerest verwendet. Beispielsweise kann ein spaltbares CAM-Ester-Handle oder jede andere Carbonsäure-Schutzgruppe angepasst werden, um das erste Peptidsegment an die Festphase über die Seitenkette von Asparagin- oder Glutaminsäure zu binden. Fachleuten werden die notwendigen chemischen Verfahren zur Durchführung dieses Schritts durchwegs bekannt sein.

[0147] Beispielsweise wird die Synthese eines ersten Peptidsegments, das über eine innere Aminosäure an die Festphase zu binden ist, in [Fig. 25C](#) dargestellt. Beginnend mit einer geeigneten Festphase (Thioester- oder Thiosäure-bildend) wird das erste Peptidsegment unter Verwendung herkömmlicher Boc-Arbeitsvorschriften synthetisiert, bis der ausgewählte Lysinrest erhalten wird. Unter Verwendung von Boc-Chemieverfahren wird ein Lysin, dessen Seitenkette mit einer Fmoc-Gruppe (Boc-Lys(Fmoc)OC) Amin-geschützt ist, an der geeigneten Stelle während schrittweiser Festphasen-Peptidsynthese inseriert, woraufhin kontinuierliche Synthese am Ende des ersten Peptidsegment durchgeführt wird. Die Fmoc-Schutzgruppe wird am Ende der schrittweisen Peptidsynthese entfernt, und der spaltbare Handle wird an das Seitenkettenamin gebunden (Schritt B aus [Fig. 25C](#)).

[0148] Dieses Verfahren ist jenem aus [Fig. 24](#) sehr ähnlich, wobei folgende Unterschiede bestehen: die Lävulinsäure in Schritt 4 wird durch den spaltbaren Handle ersetzt, und das 20%ige Piperidin, das verwendet wird, um die Fmoc-Gruppe zu spalten (auch ein Teil von Schritt 4), wird durch eine sehr viel geringere Konzentration einer anderen Base wie beispielsweise 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), z. B. 1–2 Äquivalente DBU in DMF, ersetzt. Der Grund dafür sind die Mittel-Peptidsegmente, die, unabhängig davon, ob sie Thiosäuren oder Thioester bei der Spaltung von Harz bilden, mit dem Harz durch einen Thioester verbunden sind, der in Gegenwart von 20%igem Piperidin gespalten werden würde.

[0149] Für dieses bestimmte Verfahren wird das MSC-Handle bevorzugt, wobei jedoch auch andere spaltbare Handles verwendet werden können. Die Bindung eines Lysinrests an das Seitenketten-Amin und weiters die Modifikation des Linkers mit einer geeigneten funktionellen Gruppe, die in der Lage ist, mit einer entsprechenden Gruppe am Festphasenligationsharz zu reagieren, entsprechen allgemein den Darstellungen in [Fig. 17A](#), mit der Ausnahme, dass das Amin des MSC-Handles mit einer Fmoc- anstelle einer Boc-Gruppe geschützt sein sollte. Da die Bindung an das Peptidsegment über einen inneren Aminosäurerest erfolgt, würde die N-terminale Aminosäure Boc-geschützt sein, und es ist für die N-terminale Aminogruppe und die Aminogruppe des MSC-spaltbaren Handles nicht möglich, durch dieselbe Gruppe geschützt zu sein. Das Entfernen der Fmoc-Gruppe am MSC-spaltbaren Handle würde also unter Verwendung von DBU anstelle von Piperidin erfolgen müssen. Wie in [Fig. 17A](#) gezeigt ist Lävulinsäure zum Binden an den Linker mit einer entsprechenden Aminoxyacetylgruppe am festen Träger bevorzugt ([Fig. 17B](#)).

[0150] Zwei Versionen des ersten Peptidsegment, das an das Harz zu binden ist, werden nachstehend beschrieben.

[0151] Erste Version. Das erste Peptidsegment weist ein ungeschütztes N-terminales Cystein und eine C-terminale Thiosäure auf ([Fig. 25A](#)). Das zweite Peptidsegment (Schritt 2 in [Fig. 25A](#)), das an das erste Peptidsegment zu ligieren ist, ist ein Peptid mit einem C-terminalen Thioester und gegebenenfalls einem geschützten N-terminalen Cystein (sofern zusätzliche C- zu N-Terminus-Ligationen erwünscht sind), worin der C-terminale Thioester in der Lage ist, mit dem N-terminalen Cys des ersten Peptidsegments (d. h. in Richtung C- zu N-Terminus) zu reagieren. Dieser Schritt kann, sofern erwünscht, mit zusätzlichen Peptidsegmenten, die in C- zu N-Terminus-Richtung zugesetzt werden, mehrfach wiederholt werden, mit der Maßgabe, dass die inneren hinzukommenden Peptidsegmente jeweils ein geschütztes N-terminales Cystein aufweisen, das gemäß den Standard-Verfahrensschritten von nativen chemischen Festphasenligationen in Richtung C- zu N-Terminus, die in [Fig. 21](#) beschrieben werden, entschützt wird (das Endpeptidsegment, das am N-Terminus des resultierenden Produktes zuzusetzen ist, benötigt kein N-terminales Cystein). Nach Abschluss der Ligation wird die C-terminale Thiosäure des resultierenden Festphasen-gebundenen Peptids (d. h. Ligationsprodukt aus erstem und zweitem Peptidsegment) mit Bromessigsäure zu einem Thioester umgesetzt (wie in Tabelle 1 für Ligationen in Richtung vom N- zum C-Terminus erläutert und in Schritt 3 von [Fig. 25A](#) dargestellt wird). Der nächste Schritt (Schritt 4 in [Fig. 25A](#)) umfasst die Ligation des Festphasen-gebundenen Peptids an ein drittes Peptidsegment mit einem N-terminalen Cys. Dieser Schritt kann gegebenenfalls wiederholt werden, um zusätzliche, um, sofern gewünscht, zusätzliche hinzukommende Peptidsegmente in Richtung N- zu C-Terminus hinzuzufügen, mit der Maßgabe, dass die inneren hinzukommenden Peptidsegmente jeweils ein ungeschütztes N-terminales Cystein und eine C-terminale Thiosäure umfassen, wobei nach Abschluss der Ligation und vor Zusatz des nächsten Peptidsegment die Thiosäure zu Thioester umgesetzt wird. Das End-Peptidsegment, das dem C-Terminus des resultierenden Produktes zuzusetzen ist, erfordert keine C-terminale Thiosäure.

[0152] Fachleuten wird bekannt sein, dass mehrfache Ligationen nachfolgend in beiden Richtungen durchgeführt werden können, sofern die geeigneten Schutzgruppen und andere geeignete chemische Verfahren am Mittelstück oder dem Festphasen-gebundenen Peptid zum Einsatz kommen. Diese zusätzlichen Schritte sind mit den Verfahren für die Einzelrichtungen identisch, d. h. N-terminales ungeschütztes Cys plus C-terminaler Thioester für die N- zu C-Richtung und N-terminales Cys(ACM) plus C-terminaler Thioester für die C- zu N-Ter-

minus-Richtung. Unter der Annahme, dass MSC-Linker verwendet werden, würde die Spaltung des Vollängenprodukts vom Harz in basischer Lösung (pH 12–14) erfolgen, wie in Schritt 6 in Tabelle 1 gezeigt wird. Der bevorzugte Ansatz besagt jedoch, zuerst alle Ligationsschritte, die für eine Richtung erforderlich sind, abzuschließen, bevor die Ligationsschritte für die andere Richtung erfolgen. Solange das Festphasen-gebundene Peptid entweder ein geschütztes N-terminales Cystein oder eine C-terminale Thiosäure aufweist, können Ligationen in beiden Richtungen durchgeführt werden, mit der Maßgabe, dass die geeigneten Verfahren, wie hierin beschrieben, eingesetzt werden. Hat das Festphasen-gebundene Peptid sowohl ein ungeschütztes N-terminales Cystein als auch einen C-terminalen Thioester, führen alle Versuche, es an ein zusätzliches hinzukommendes Peptidsegment zu ligieren, zu einer Zyklisierung des Festphasen-gebundenen Peptids.

[0153] Zweite Version. Die zweite Version dieses Schemas umfasst das Beginnen mit Ligation in Richtung N- zu C-Terminus, gefolgt von Ligation in der entgegengesetzten Richtung, wie in [Fig. 25B](#) gezeigt wird. Das erste an das Harz zu bindende Peptidsegment umfasst ein vorübergehend geschütztes N-terminales Cys und einen C-terminalen Thioester. Die Ligation eines zweiten Peptidsegment an das erste Peptidsegment erfolgt dann in Richtung N- zu C-Terminus. Jede darauf folgende Ligation in Richtung C- zu N-Terminus würde zuerst das Entfernen der Schutzgruppe erfordern.

[0154] Außer in Bezug auf das Anbinden des ersten Peptidsegment an den festen Träger kombiniert dieses Vorgehen lediglich die Verfahren für Ligationen in Richtung N- zu C-Terminus und C- zu N-Terminus (zuvor beschrieben).

Verweise

- S. Funakoshi et al., Chemoselective one-step purification method for peptides synthesized by the solid-phase technique, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 88: 6981–6985 (Aug. 1991).
- S. Funakoshi et al., Affinity purification method using a reversible biotinylating reagent for peptides synthesized by the solid-phase technique, *J. Chromatog.* 638: 21–27 (1993).
- M. Mutter et al., Pseudo-prolines (psi Pro) for accessing inaccessible peptides, *Pept. Res.* 8 (3): 145–153 (1995).
- M. Baca et al., Chemical ligation of cysteine-containing peptides: synthesis of a 22 kDa tethered dimer of HIV-1 protease, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (7): 1881–1887 (1995).
- J. Camarero et al., Chemical Ligation of Unprotected Peptides Directly From a Solid Support, *J. Peptide Res.* 51: 303–316 (1998).
- L. Canne et al., Total Chemical Synthesis of a Unique Transcription Factor-Related Protein: cMyc-Max, *J. Am. Chem. Soc.* 117: 2998–3007 (1995).
- C. Cho et al., An Unnatural Biopolymer, *Science* 261: 1303–1305 (1993).
- P. Dawson et al., Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation, *Science* 266: 776–779 (1994).
- N. Fotouhi et al., *J. Org. Chem.* 54: 2803–2817 (1989).
- G. Barany and R. B. Merrifield, A New Amino Protecting Group Removal by Reduction. Chemistry of the Dithiasuccinoyl (Dts) Function, *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (22): 7363–7365 (1977).
- C. Hennard and J. Tam, Sequential Orthogonal Coupling Strategy for the Synthesis of Biotin Tagged β Defensin, Abstract P118, Fifteenth American Peptide Symposium, June 14–19, 1997.
- C. Hyde et al., Some difficult sequences made easy, A study of interchain association in solid-phase peptide synthesis, *Int. J. Peptide Protein Res.* 43: 431–440 (1994).
- W. Lu et al., *Biochemistry*, 36 (4): 673–679 (1997).
- C.-F. Liu and J. Tam, Peptide segment ligation strategy without use of protecting groups, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 6584–6588 (1994).
- C.-F. Liu and J. Tam, Chemical ligation approach to form a peptide bond between unprotected peptide segments. Concept and model study, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (10): 4149–4153 (1994). Schnolzer et al., *Science* 256: 221–225 (1992).
- Rose et al. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 30–34 (1994).
- Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6584–6588 (1994).
- Dawson et al. *Science* 266: 77–779 (1994).
- PCT/US95/05668, WO 96/34878
- Sakakibara S., *Biopolymers (Peptide Science)*, 37: 17–28 (1995).
- Tam et al., *PNAS USA*, 92: 12485–12489 (1995).
- T. Muir, A Chemical approach to the construction of multimeric protein assemblies, *Structure* 3: 649–652 (1995).
- R. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis: The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149–2154 (1963).

H. Muramatsu et al., Localization of Heparin-Binding, Neurite Outgrowth and Antigenic Regions in Midkine Molecule, Biochem. And Biophys. Res. Commn. 203 (2): 1131–1139 (1994).
PCT/US94/07222, WO 95/00846, Published January 5, 1995.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines assemblierten Peptids in Richtung vom N-Terminus zum C-Terminus, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:
 - a) Ligieren eines Peptidsegments mit einem N-terminalen Cystein und einer C-terminalen Thiosäure an ein an eine Festphase gebundenes Peptidsegment, das einen C-terminalen Thioester aufweist, um ein an eine Festphase gebundenes Peptidsegment zu bilden, das eine C-terminale Thiosäure aufweist; und
 - b) Überführen der C-terminalen Thiosäure des an eine Festphase gebundenen Peptids in einen C-terminalen Thioester, um ein an eine Festphase gebundenes assembliertes Peptid zu bilden, das einen C-terminalen Thioester aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, worin das an eine Festphase gebundene Peptidsegment eine Festphase umfasst, die über einen Linker an das Peptidsegment gebunden ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, worin der Linker ein spaltbarer Linker ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, das außerdem die Freisetzung des assemblierten Peptids von der Festphase durch Spalten des spaltbaren Linkers umfasst.
5. Verfahren nach Anspruch 1, das außerdem das Ligieren des an eine Festphase gebundenen assemblierten Peptids, das einen C-terminalen Thioester aufweist, an ein Peptidsegment, das ein N-terminales Cystein und eine andere C-terminale Gruppe als eine Thiosäure aufweist, umfasst, um ein an eine Festphase gebundenes assembliertes Peptid zu bilden, das eine andere C-terminale Gruppe als eine Thiosäure aufweist.
6. Verfahren nach Anspruch 5, worin das an eine Festphase gebundene assemblierte Peptidsegment eine Festphase umfasst, die über einen Linker an das Peptidsegment gebunden ist.
7. Verfahren nach Anspruch 6, worin der Linker ein spaltbarer Linker ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, das außerdem die Freisetzung des assemblierten Peptids von der Festphase durch Spalten des spaltbaren Linkers umfasst.
9. Verfahren zur Herstellung eines assemblierten Peptids in Richtung vom C-Terminus zum N-Terminus, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:
 - a) Ligieren eines ersten Peptidsegments an ein zweites Peptidsegment, wobei das erste Peptidsegment ein ungeschütztes N-terminales Cystein und eine C-terminale Gruppe aufweist, die über einen an die C-terminale Gruppe angrenzenden Linker an eine Festphase gebunden ist, und das zweite Peptidsegment ein geschütztes N-terminales Cystein und einen ungeschützten C-terminalen Thioester aufweist;
 - b) Entfernen der Schutzgruppen des geschützten N-terminalen Cysteins des zweiten Peptidsegments; und
 - c) Ligieren eines dritten Peptidsegments, das einen ungeschützten C-terminalen Thioester aufweist, an das ungeschützte N-terminale Cystein des zweiten Peptidsegments, um ein assembliertes Peptid zu bilden.
10. Verfahren nach Anspruch 9, worin das dritte Peptid ein geschütztes N-terminales Cystein umfasst und worin die Schritte b) und c) einmal oder mehrmals mit einem oder mehreren zusätzlichen Peptidsegmenten wiederholt werden, die mit der Entfernung der Schutzgruppen und der Ligation zur Herstellung eines assemblierten Peptids kompatibel sind.
11. Verfahren nach Anspruch 9, worin der Linker ein spaltbarer Linker ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, das außerdem die Freisetzung des assemblierten Peptids von der Festphase durch Spalten des spaltbaren Linkers umfasst.
13. Verfahren nach Anspruch 12, worin der Linker ein spaltbarer Linker ist.
14. Verfahren nach Anspruch 13, das außerdem die Freisetzung des assemblierten Peptids von der Festphase durch Spalten des spaltbaren Linkers umfasst.

15. Set zur Herstellung von assemblierten Polypeptiden, umfassend:

- a) ein erstes ungeschütztes Peptidsegment, das einen Thioester am C-Terminus und am N-Terminus aufweist, worin das erste ungeschützte Peptidsegment über einen Linker an eine Festphase gebunden ist, der ein spaltbare Gruppierung umfasst;
- b) eine Gruppe zweiter ungeschützter Peptidsegmente, die jeweils eine Thiosäure an ihrem C-Terminus und ein Cystein an ihrem N-Terminus aufweisen, worin jedes der zweiten ungeschützten Peptidsegmente dieselbe Anzahl an Aminosäuren aufweist; und
- c) eine oder mehrere Gruppen unterschiedlicher ungeschützter Peptidsegmente, die jeweils einen Thioester an ihrem C-Terminus und einen Cysteinrest an ihrem N-Terminus aufweisen, worin jedes der Mitglieder der Gruppe dieselbe Anzahl an Aminosäuren aufweist.

16. Set nach Anspruch 15, worin die Gruppe zweiter ungeschützter Peptidsegmente aus Peptiden mit derselben Länge, aber unterschiedlichen Aminosäuresequenzen besteht.

17. Set nach Anspruch 15, worin die Gruppe zweiter ungeschützter Peptide im Wesentlichen aus identischen Peptiden besteht.

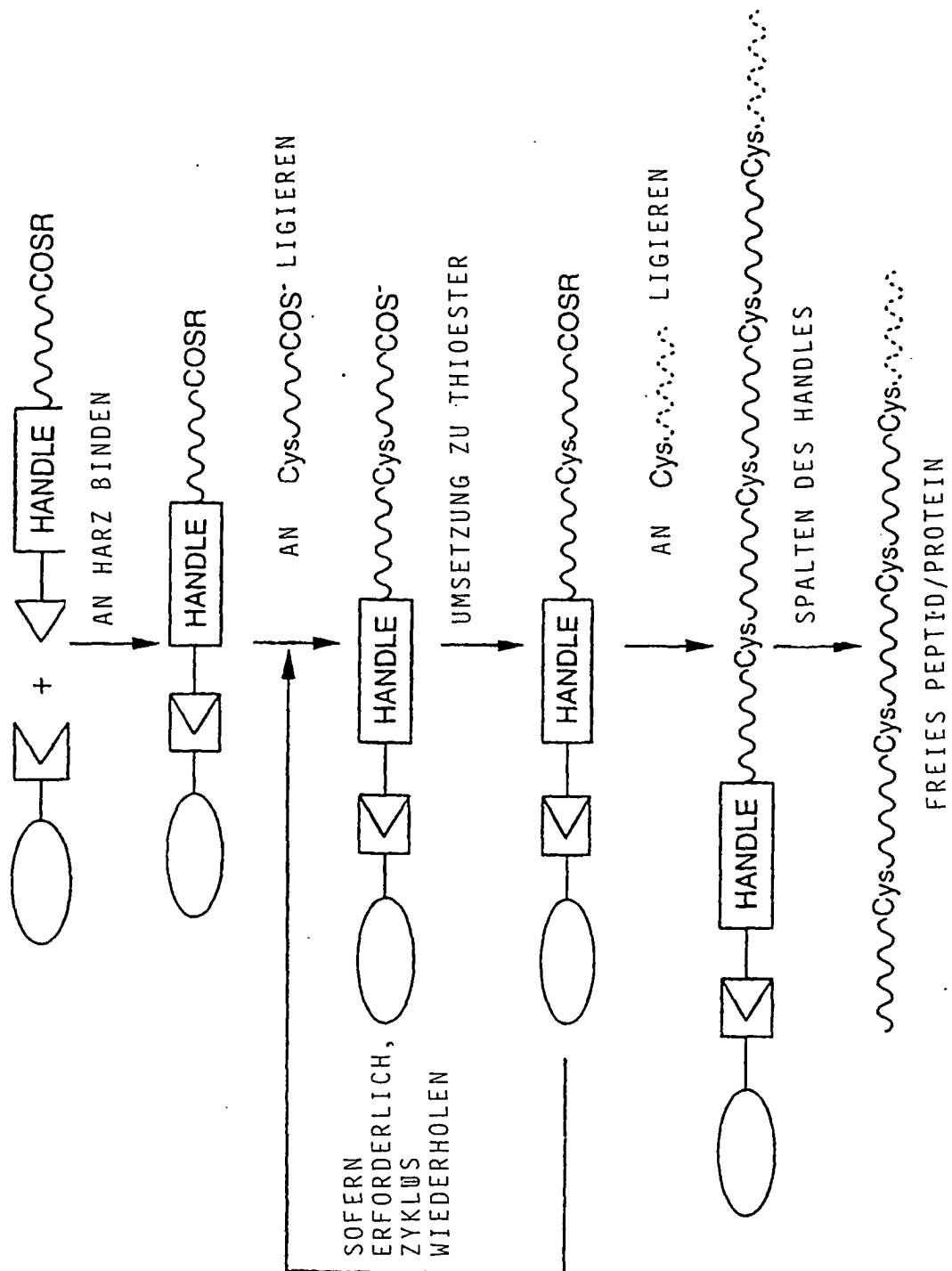
18. Set nach Anspruch 15, worin die eine oder mehreren Gruppen unterschiedlicher ungeschützter Peptide zumindest eine Gruppe von Peptiden mit derselben Länge, aber unterschiedlichen Aminosäuresequenzen umfasst.

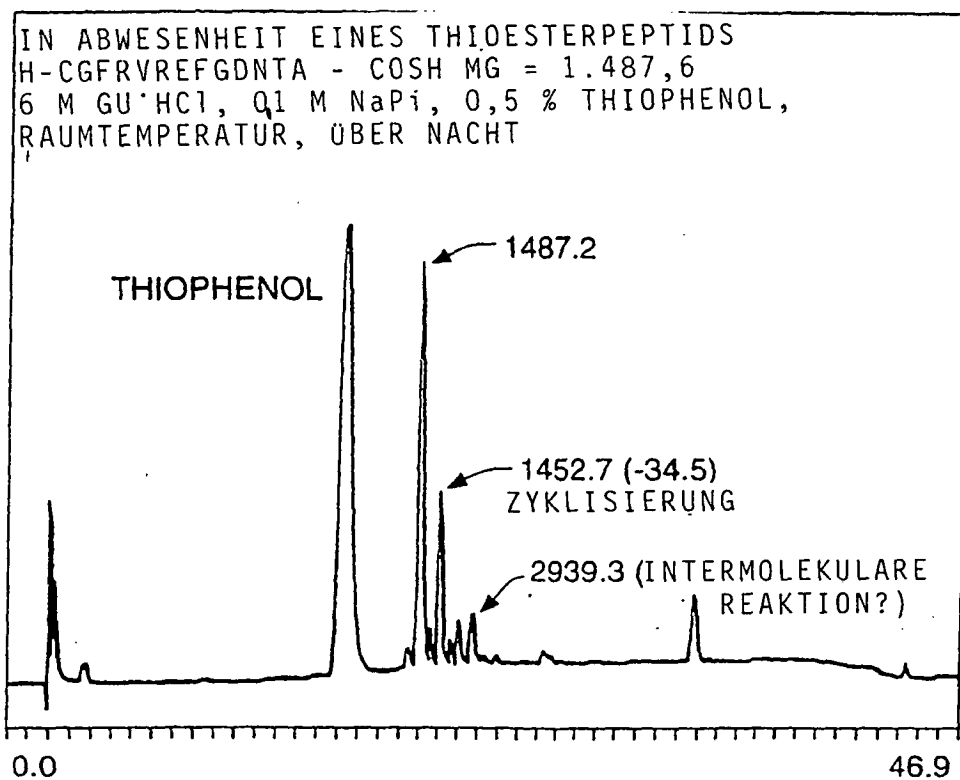
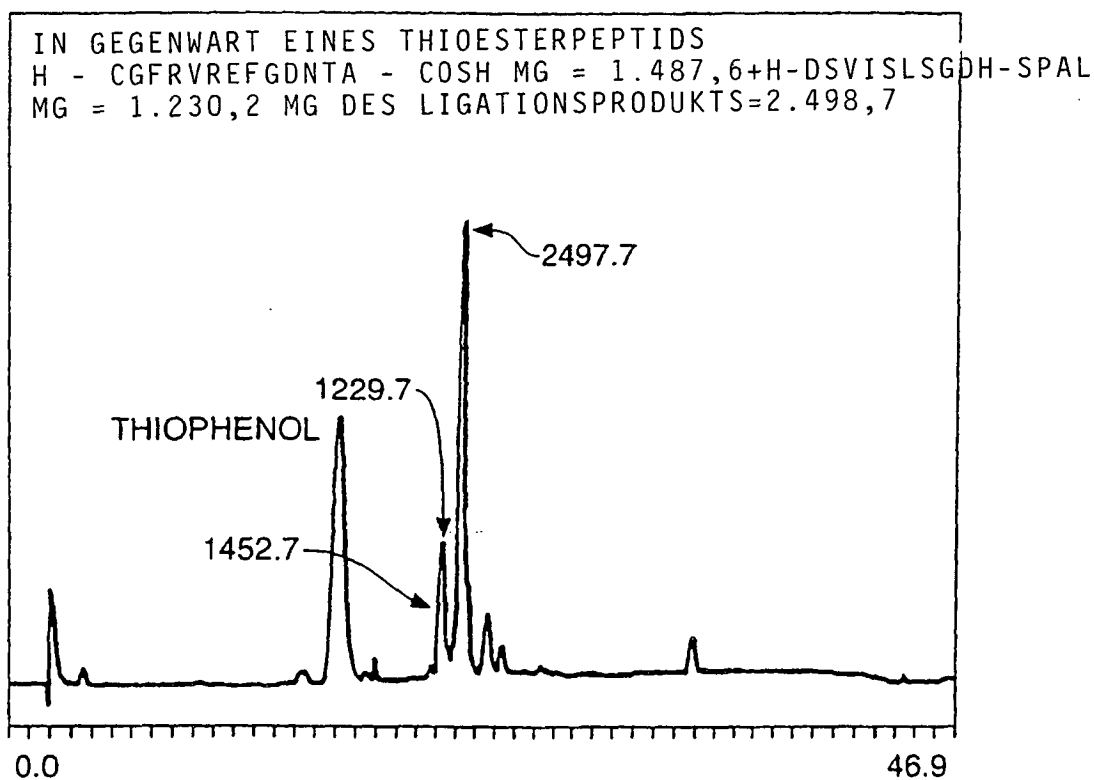
19. Gerät zur Herstellung assemblierter Polypeptide, umfassend:

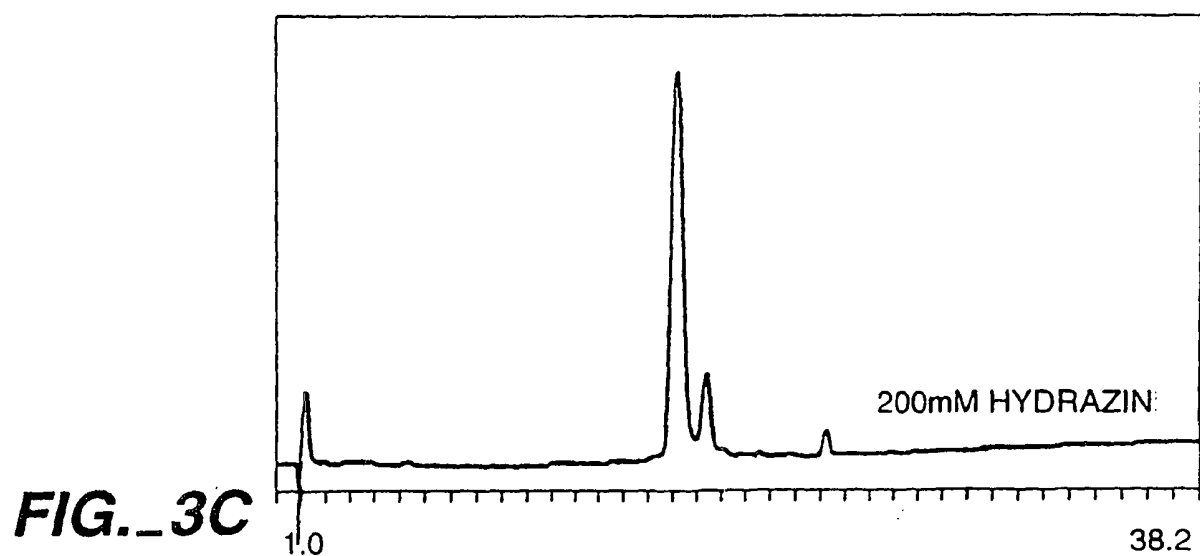
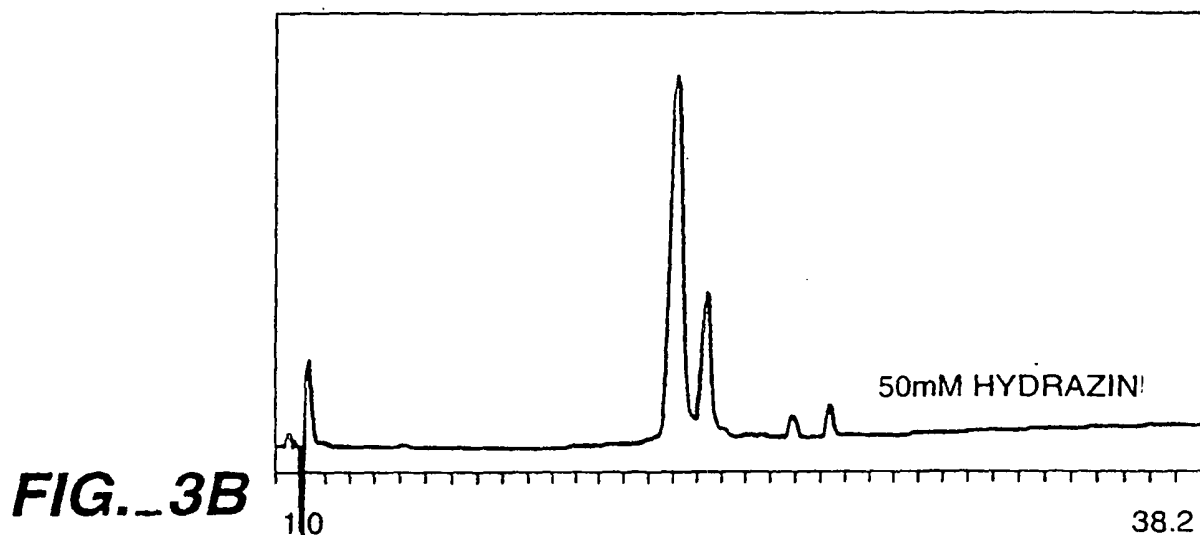
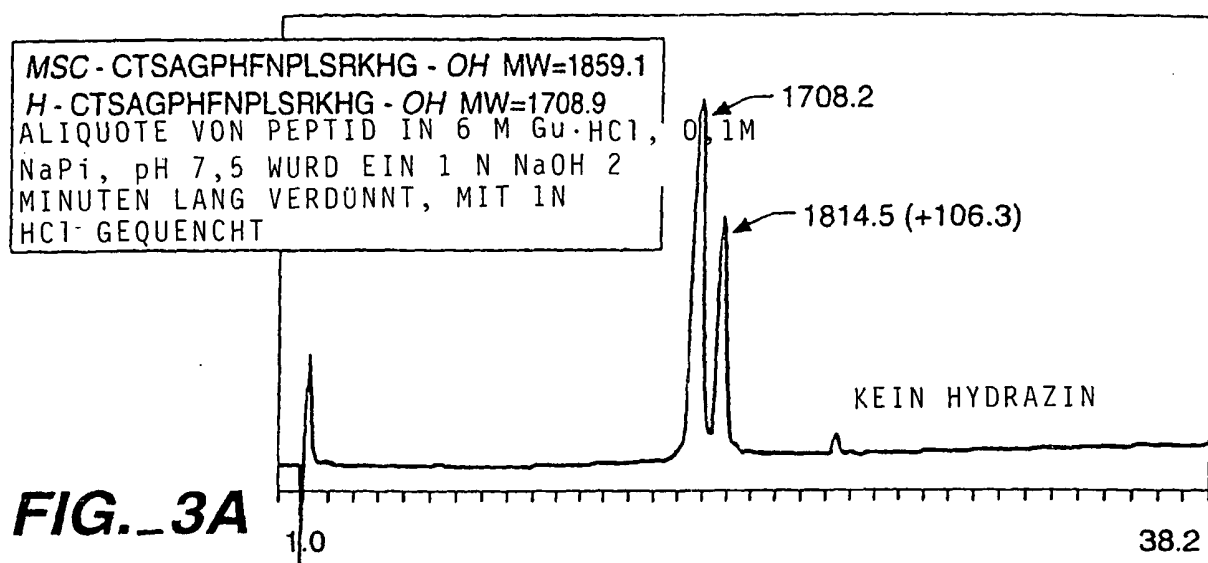
- a) einen festen Träger, an den ein erstes ungeschütztes Peptid, das einen Thioester an seinem C-Terminus und einen spaltbaren Linker an seinem N-Terminus aufweist, gebunden ist, worin das ungeschützte Peptid über einen Linker an den festen Träger gebunden ist;
- b) eine Gruppe zweiter ungeschützter Peptide, die jeweils eine Thiosäure an ihrem C-Terminus und einen Cysteinrest an ihrem N-Terminus aufweisen; und
- c) eine oder mehrere Gruppen unterschiedlicher ungeschützter Peptide, die jeweils eine Thiosäure an ihrem C-Terminus und einen Cysteinrest an ihrem N-Terminus aufweisen.

Es folgen 31 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

**FIG. 1**

**FIG._2A****FIG._2B**



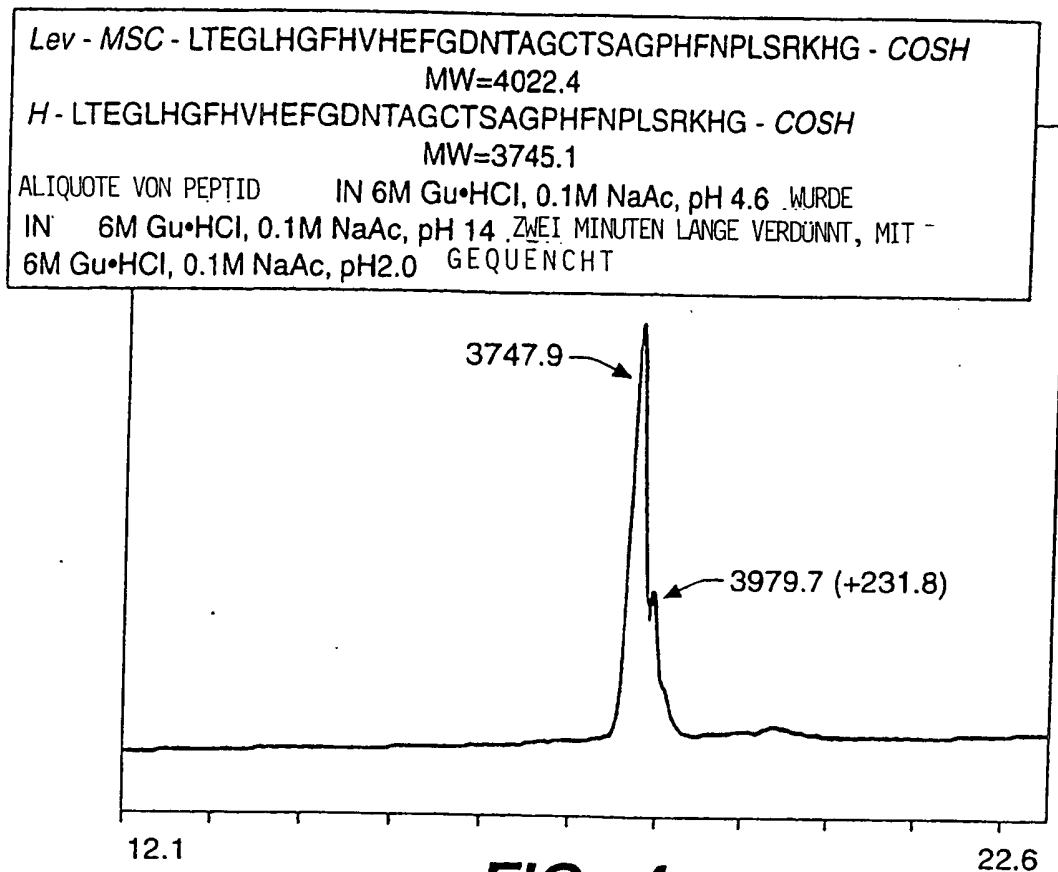


FIG._4

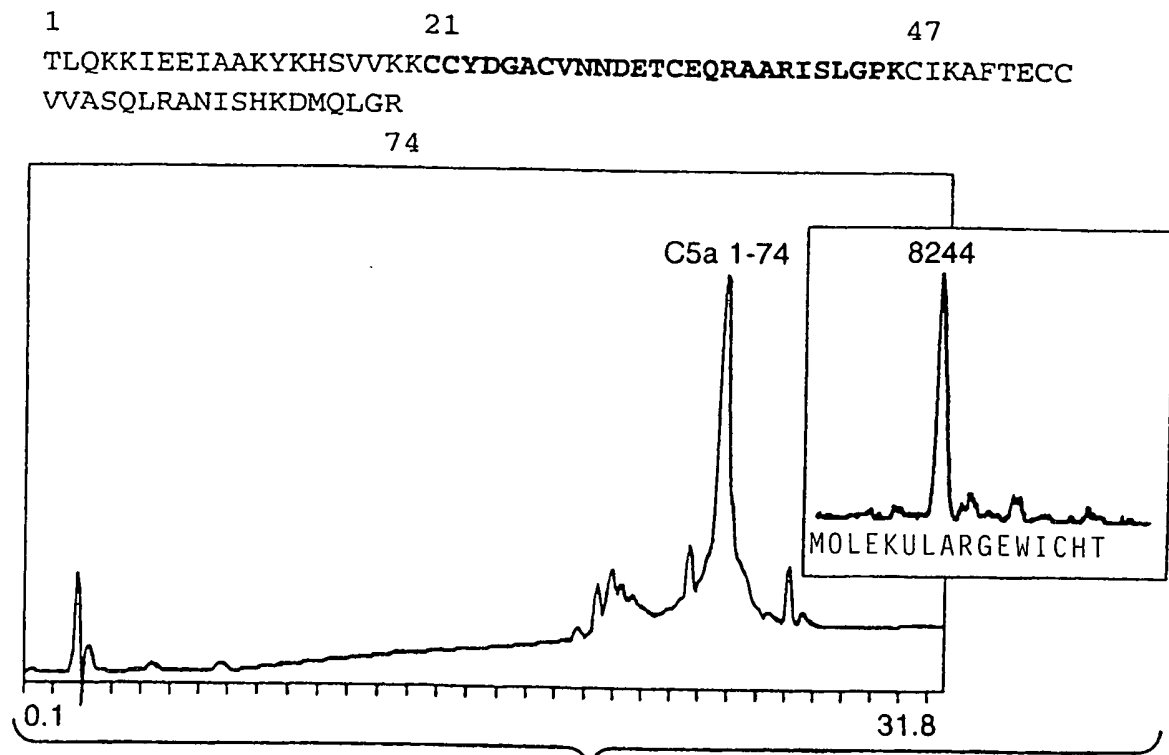
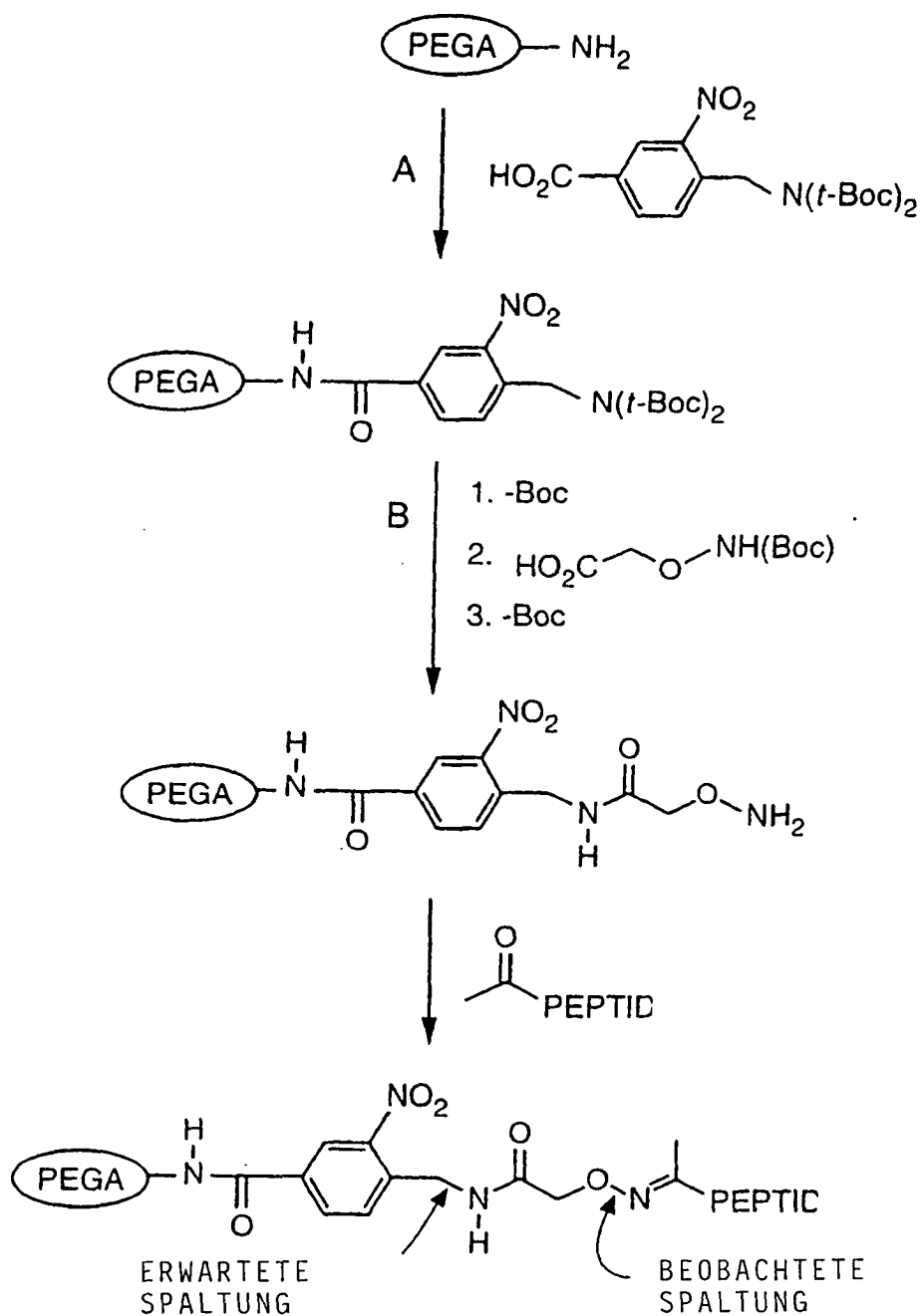
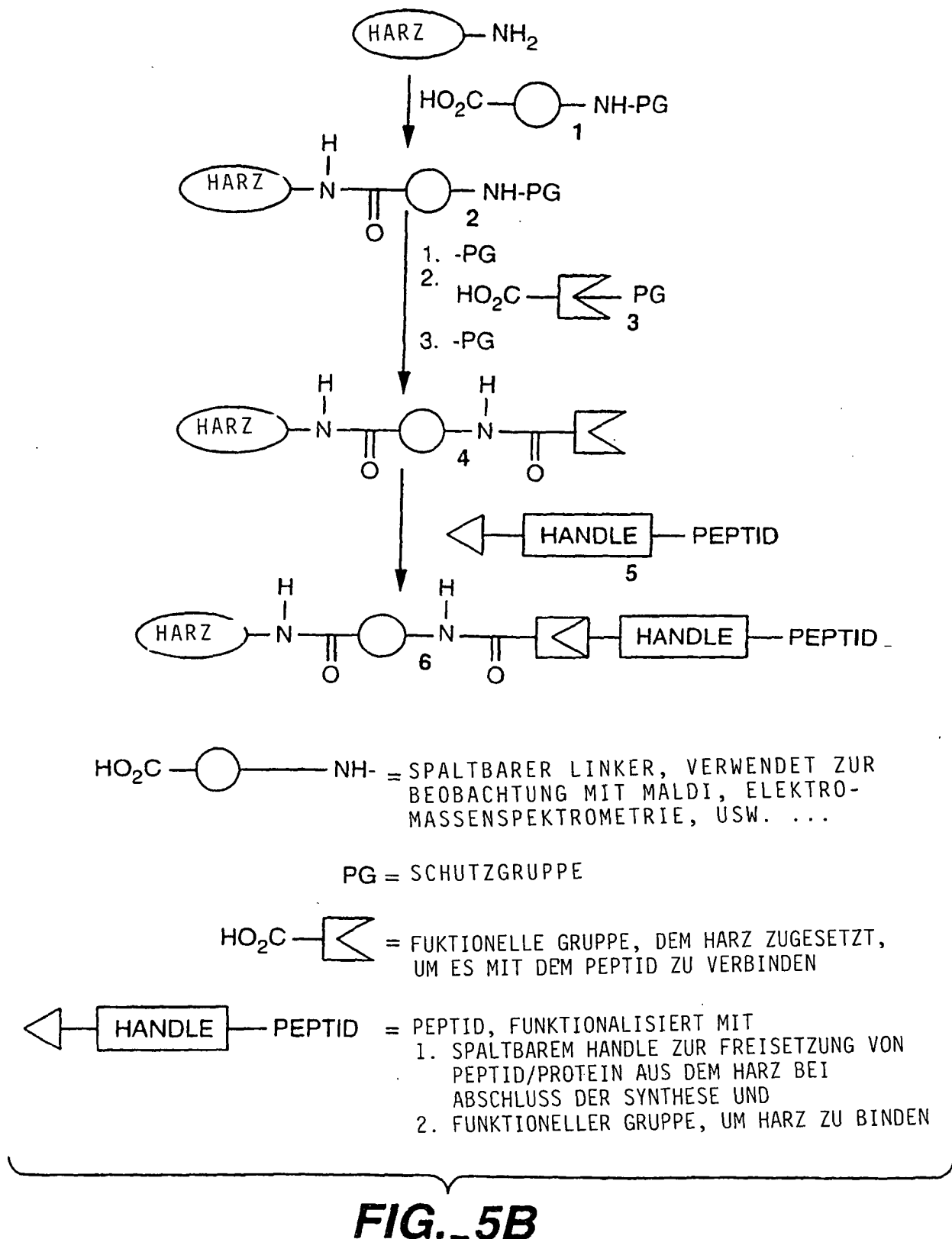
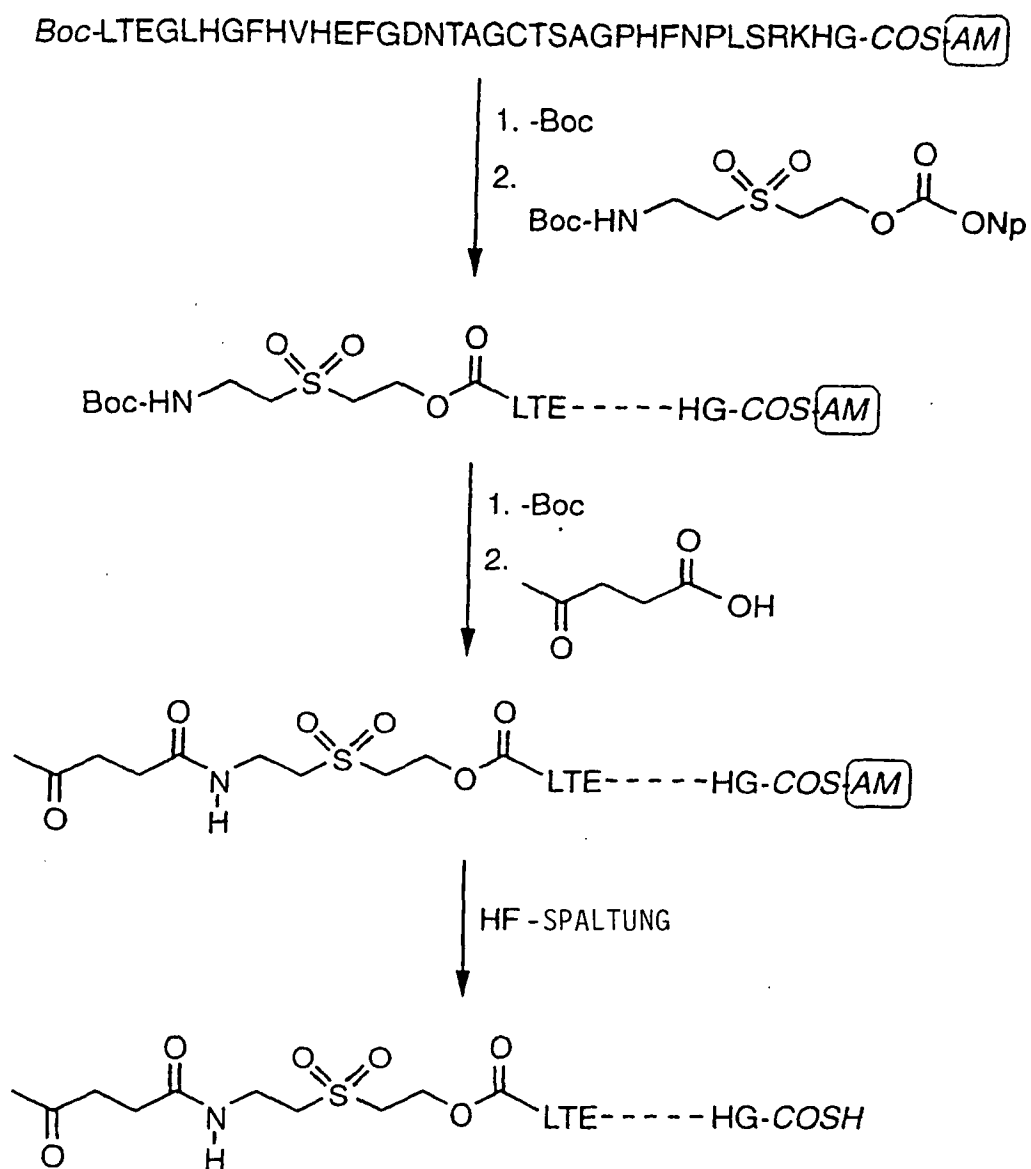


FIG._26

**FIG. 5A**



**FIG._6**

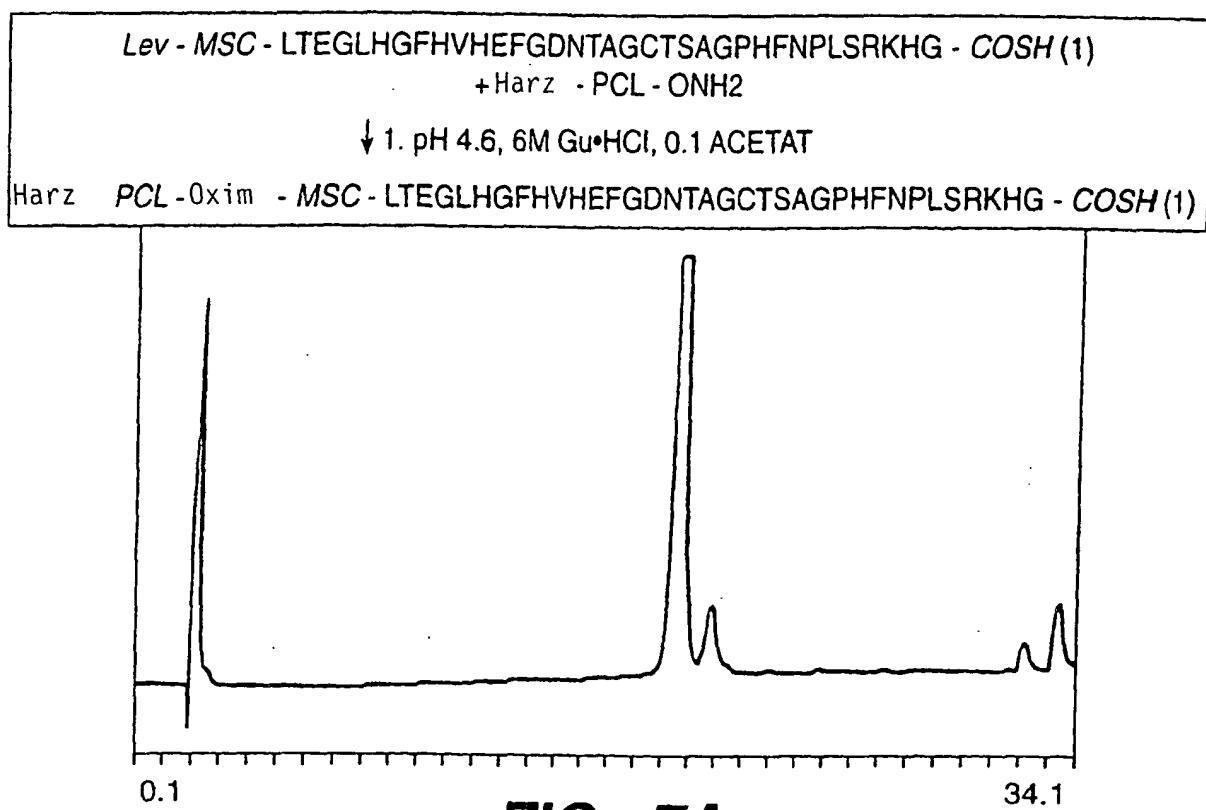


FIG._7A

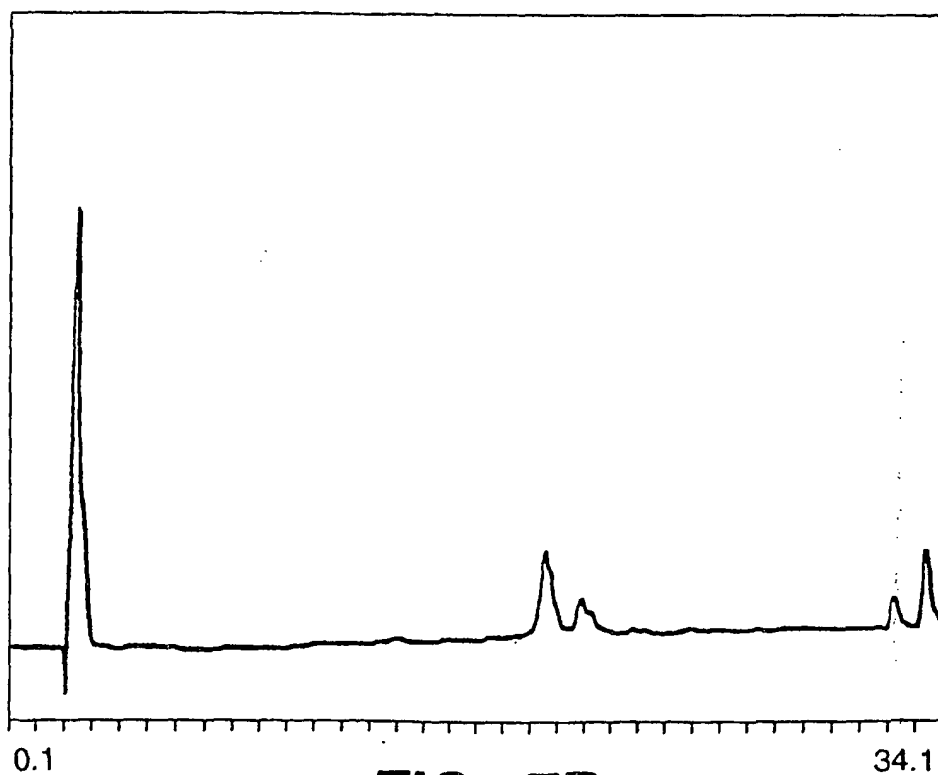


FIG._7B

Lev - MSC - LTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHG - COSH(1)
+ Harz - PCL - ONH₂
↓ 1. pH 4.6, 6M Gu•HCl, 0.1 ACETAT
Harz - PCL - Oxim - MSC - LTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHG - COSH(1)

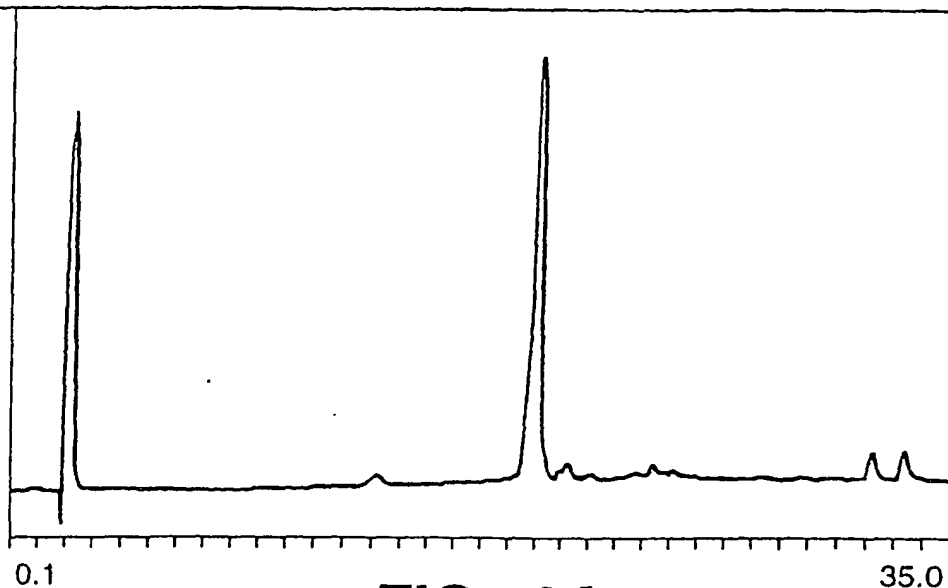


FIG._8A

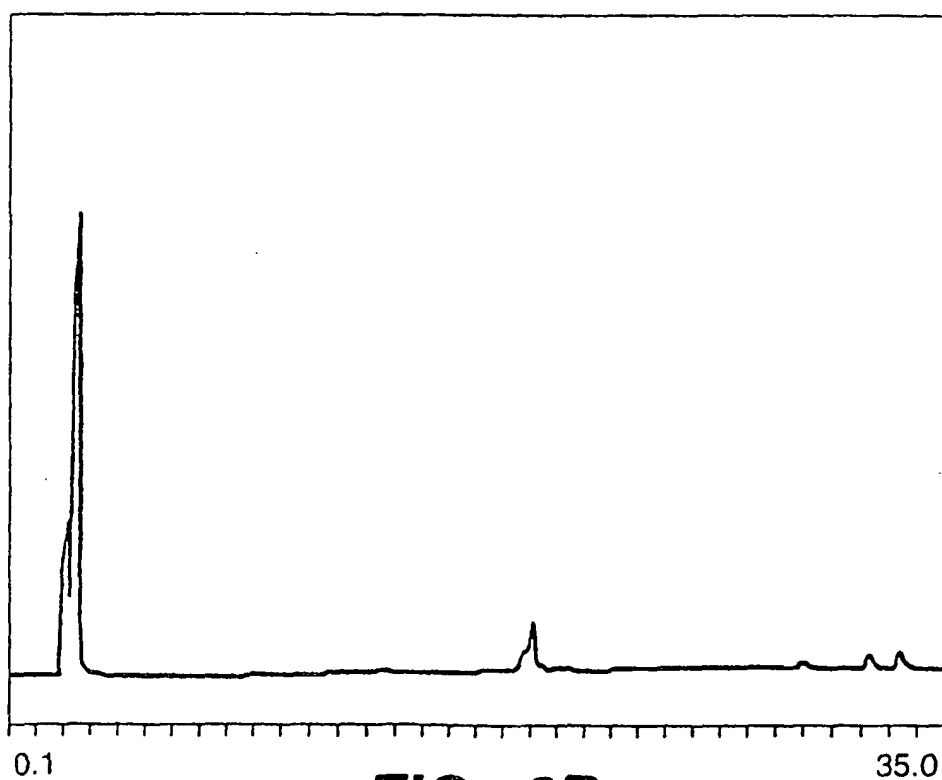


FIG._8B

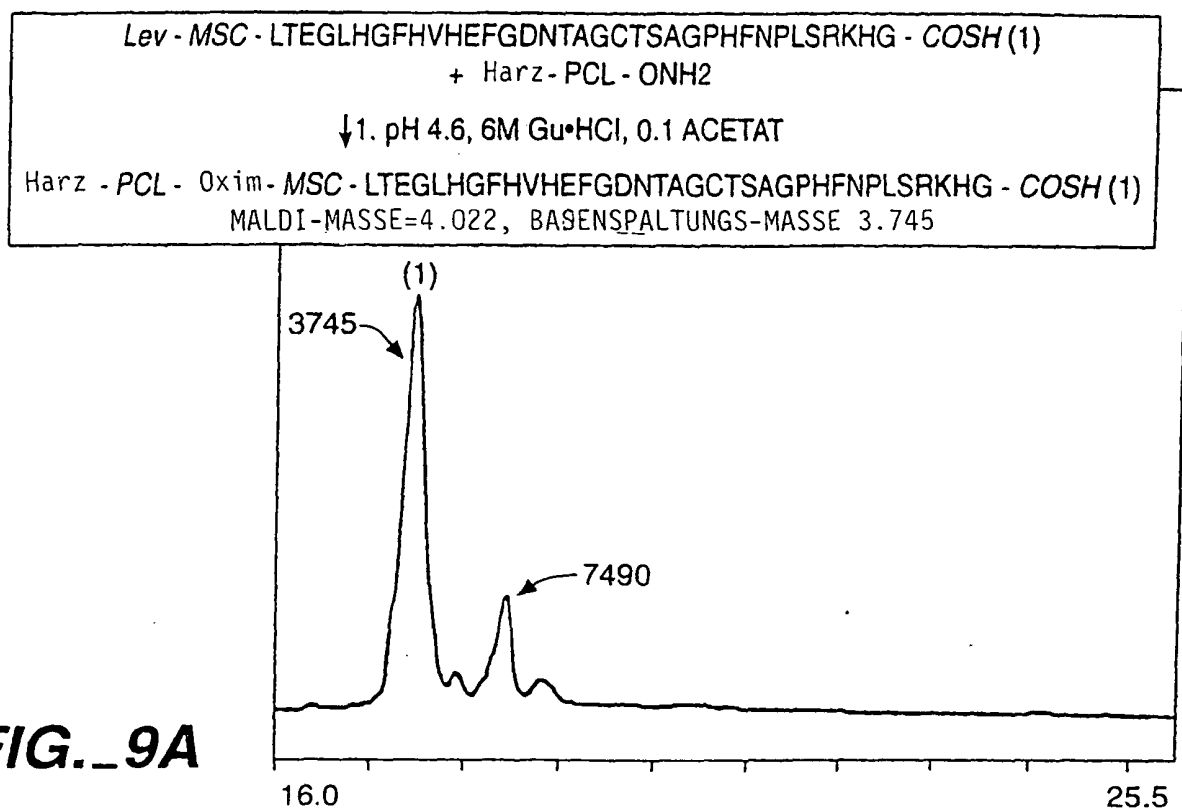


FIG._9A

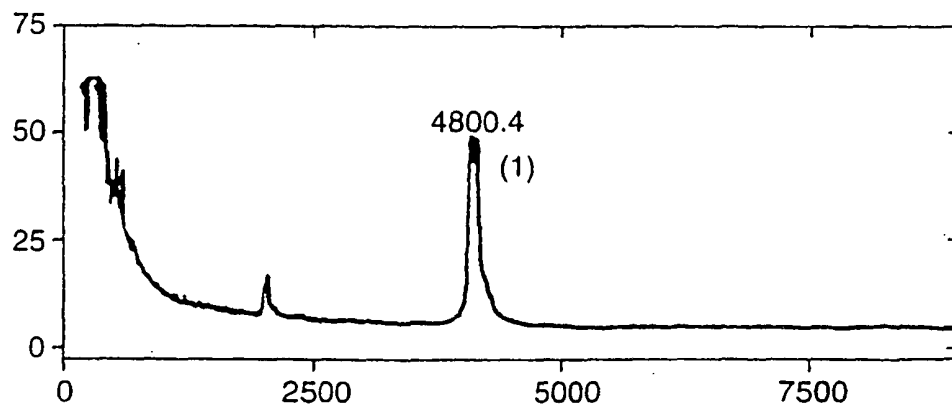


FIG._9B

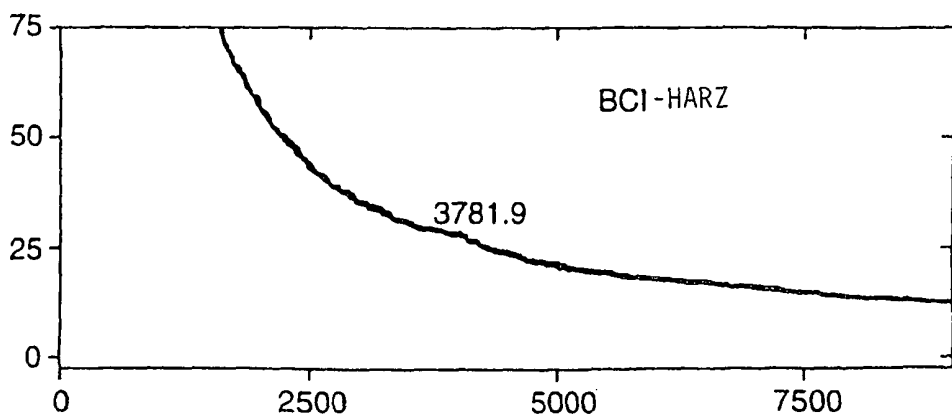


FIG._9C

Harz . PCL - Oxim - MSC - LTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHG - COSAc (1)
 MALDI-MASSE 4.080, BASENSPALTUNGS-MASSE=3:729
 + H - CGFRVREFGDNTA - COSH (2)
 ↓ 3. pH 7.5, 6M Gu•HCl, 0.1M PHOSPHAT , 0.5% THIOPHENOL
 Harz . PCL - Oxim - MSC - LTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHGCGFRVREF -
 GDNTA - COSH (1+2)
 MALDI-MASSE 5.476, BASENSPALTUNGS-MASSE=5.199

FIG._10A

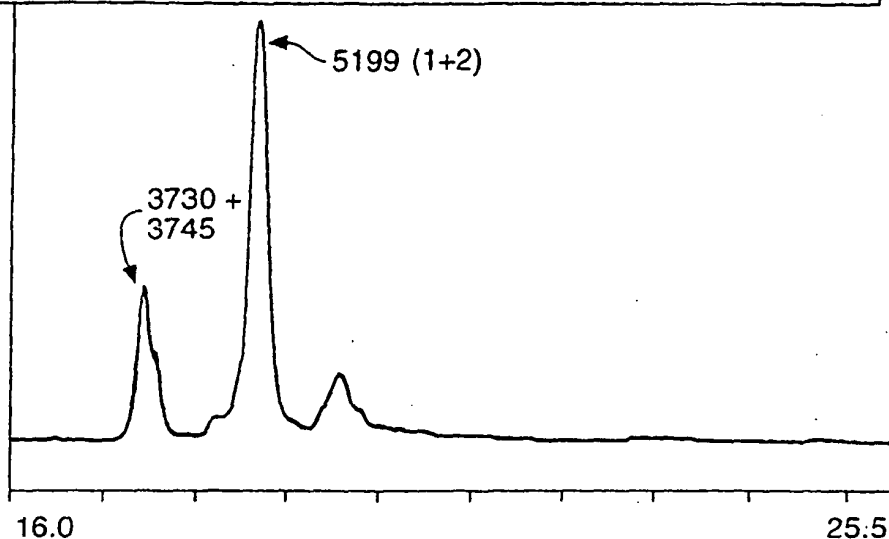


FIG._10B

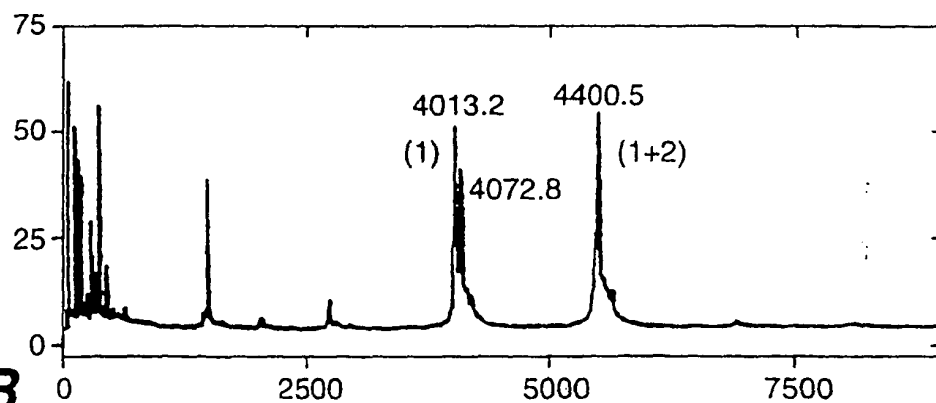


FIG._10C

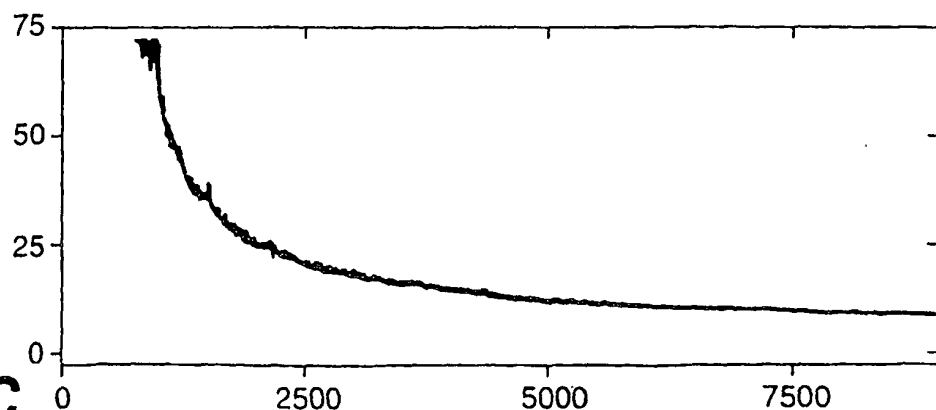


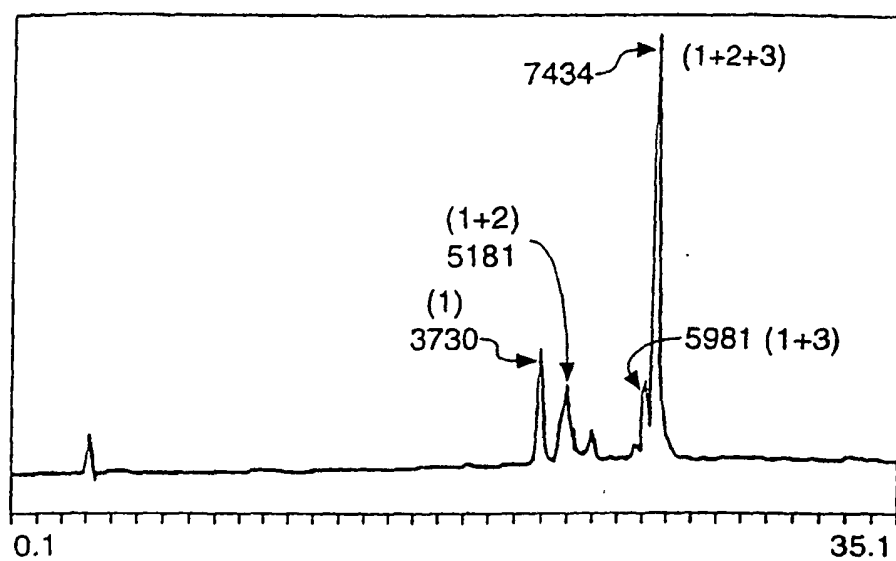
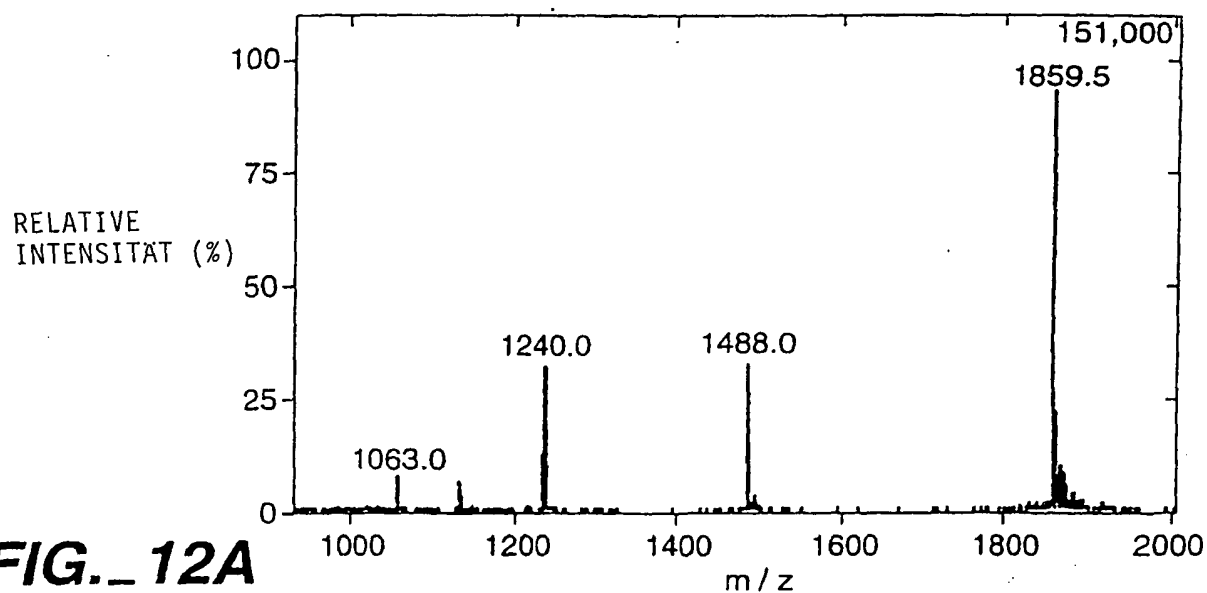
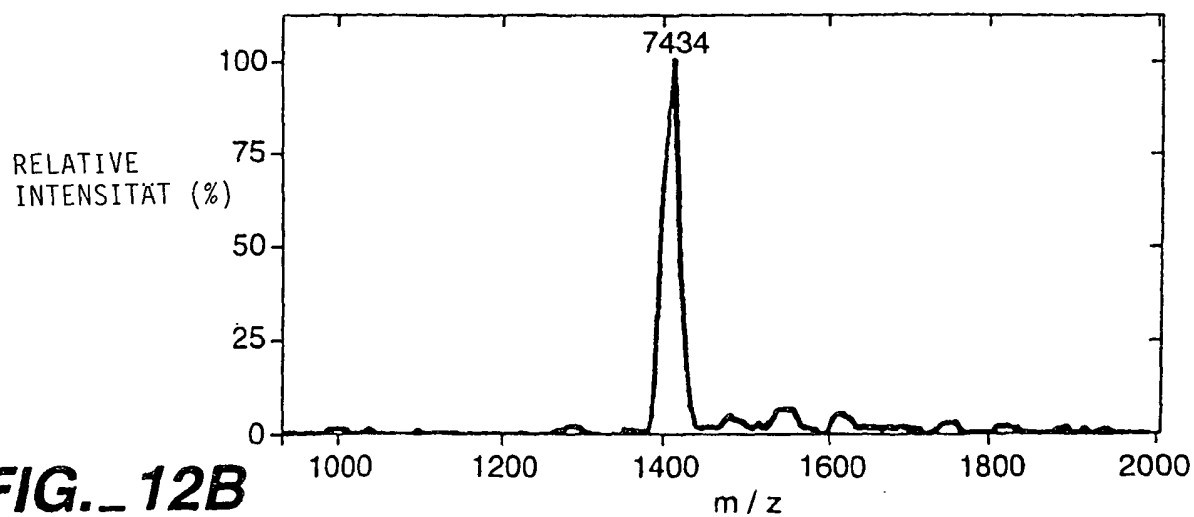
FIG._11**FIG._12A****FIG._12B**

FIG._13

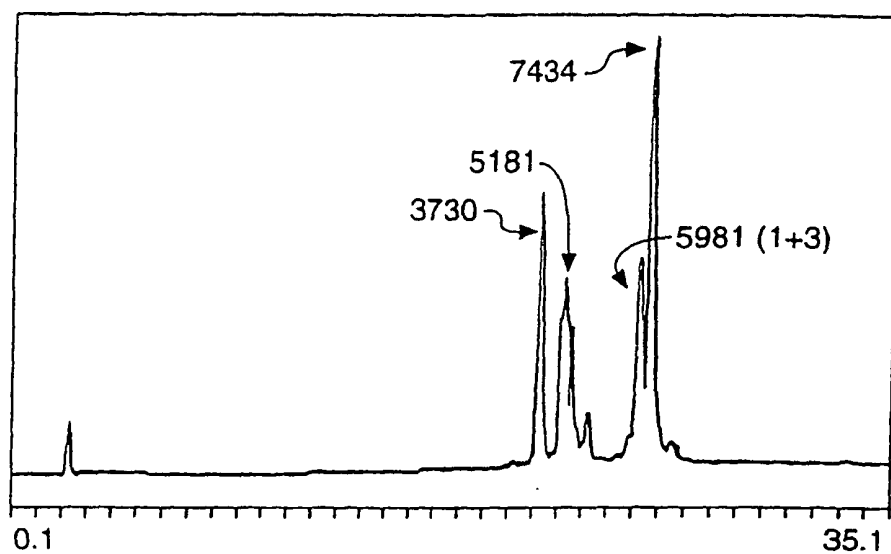


FIG._14A

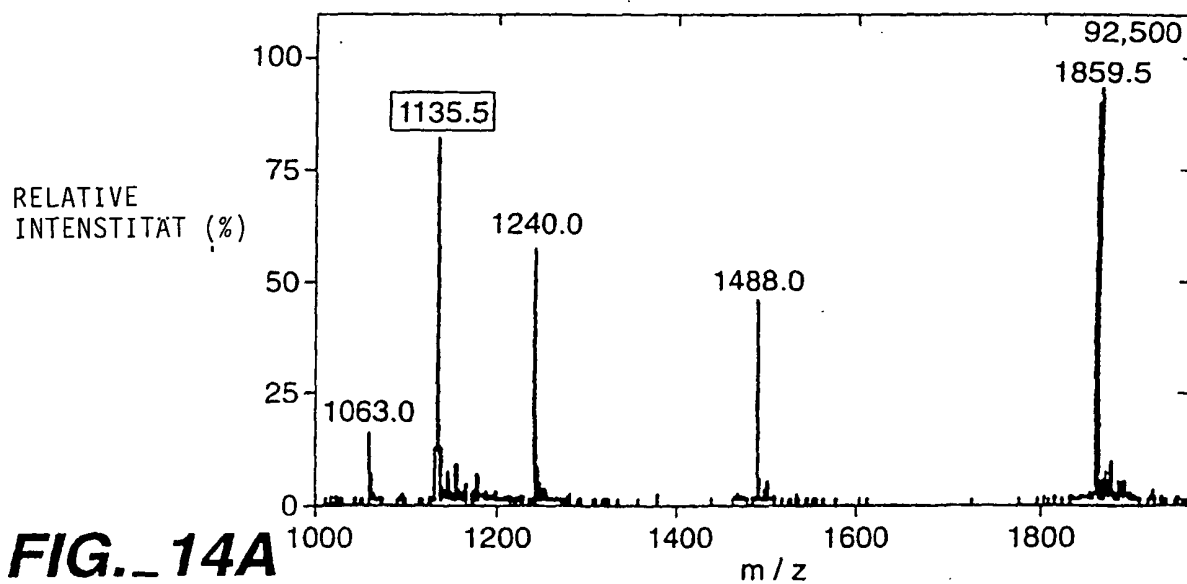


FIG._14B

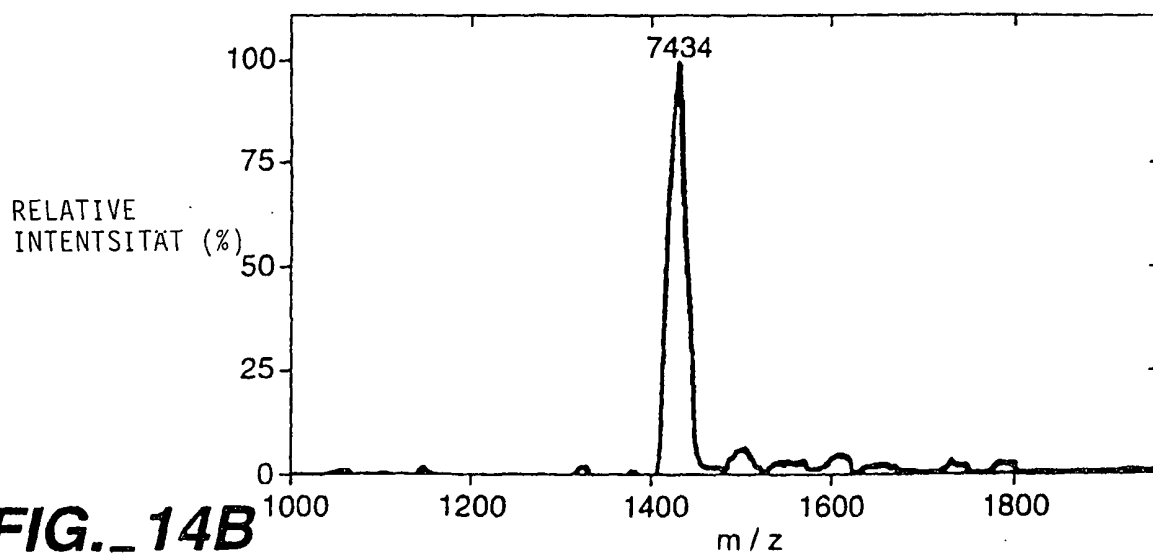


FIG._15A

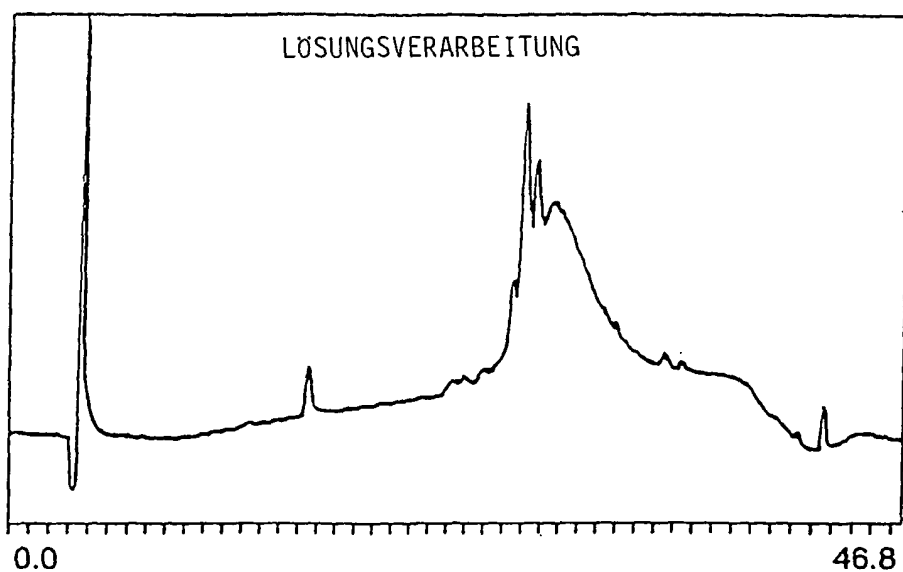


FIG._15B

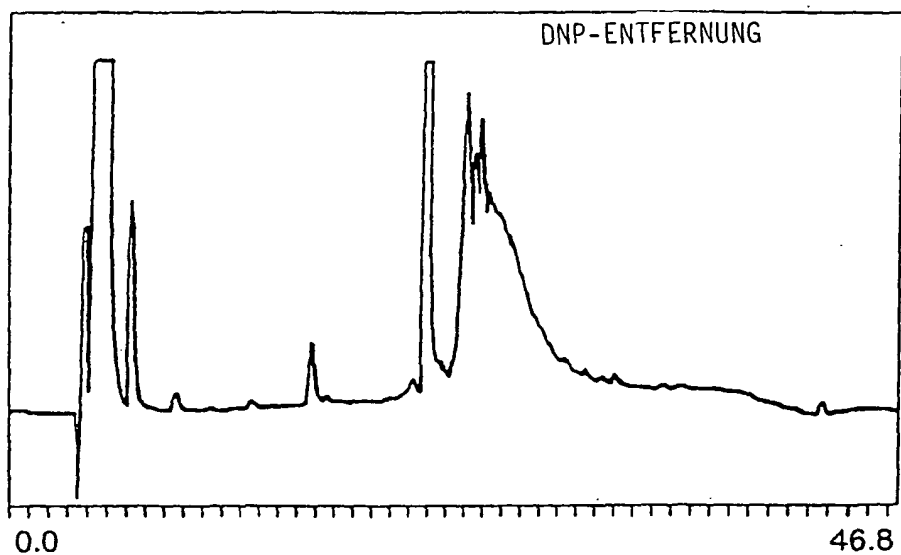
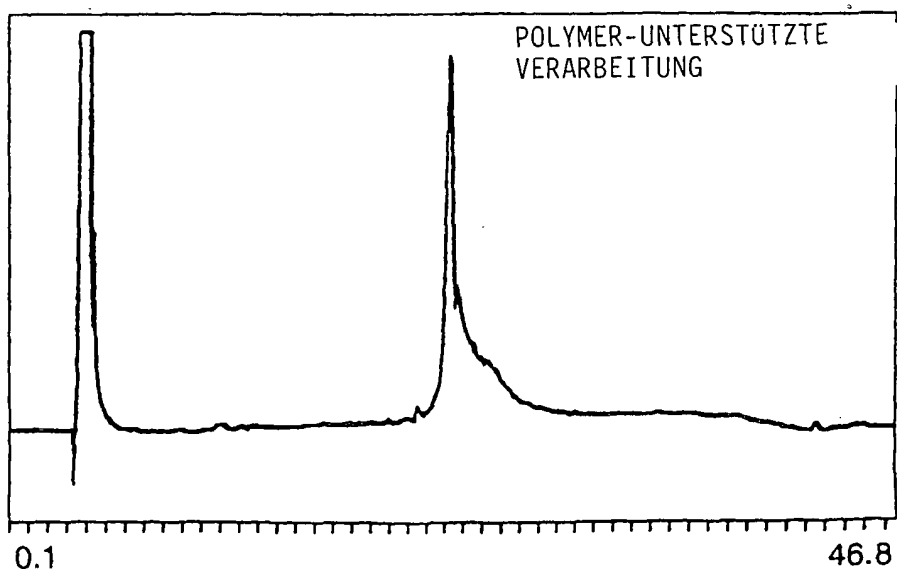


FIG._15C



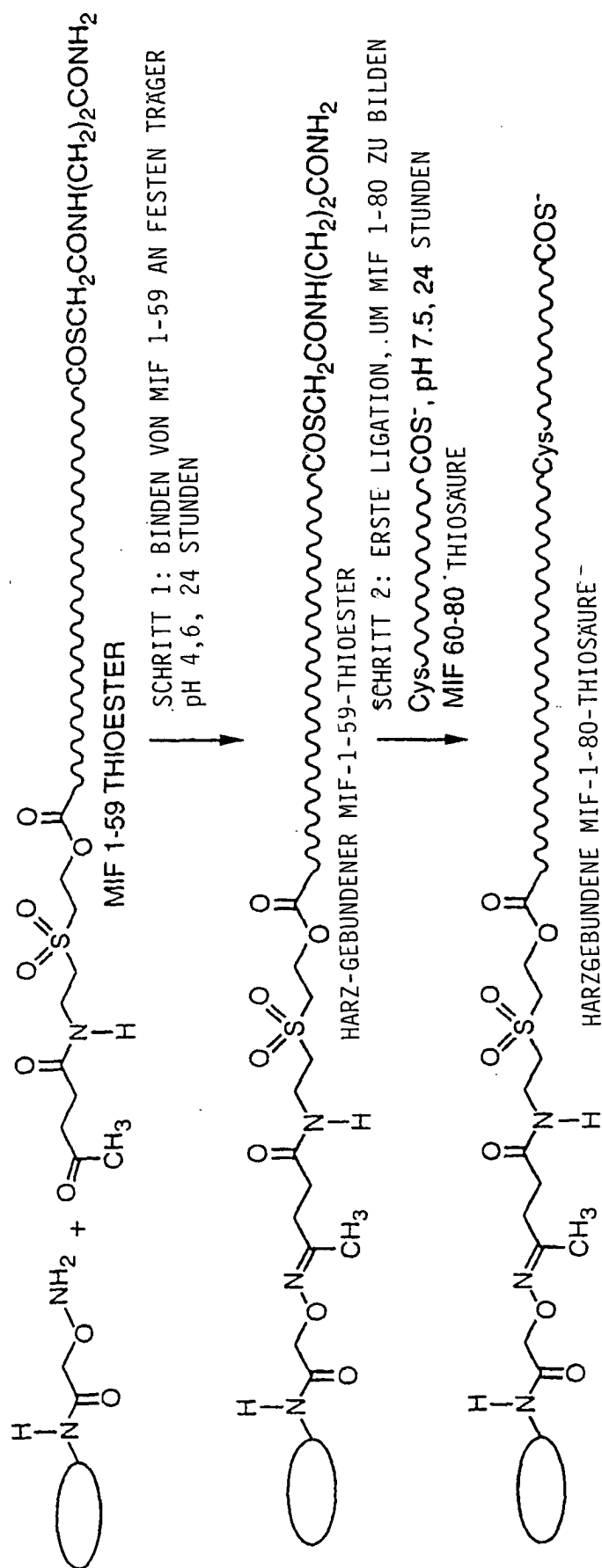
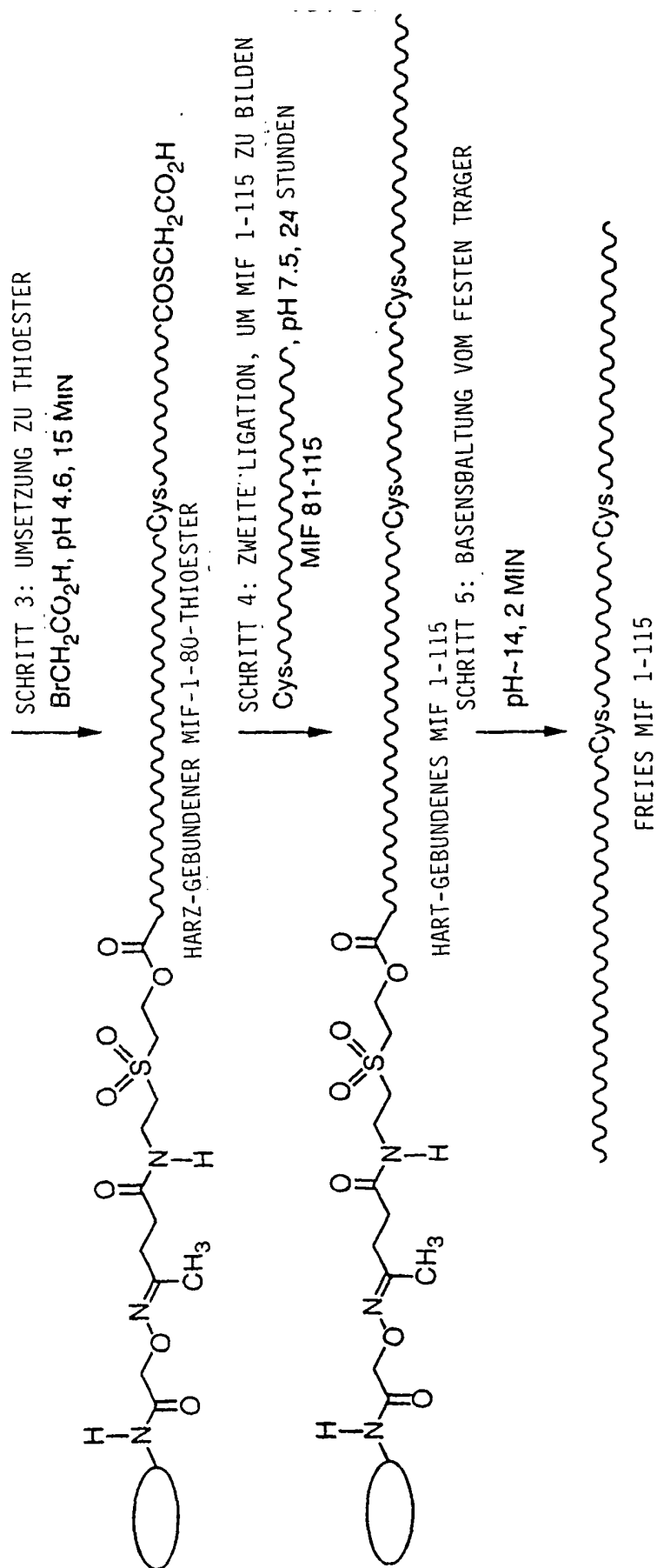
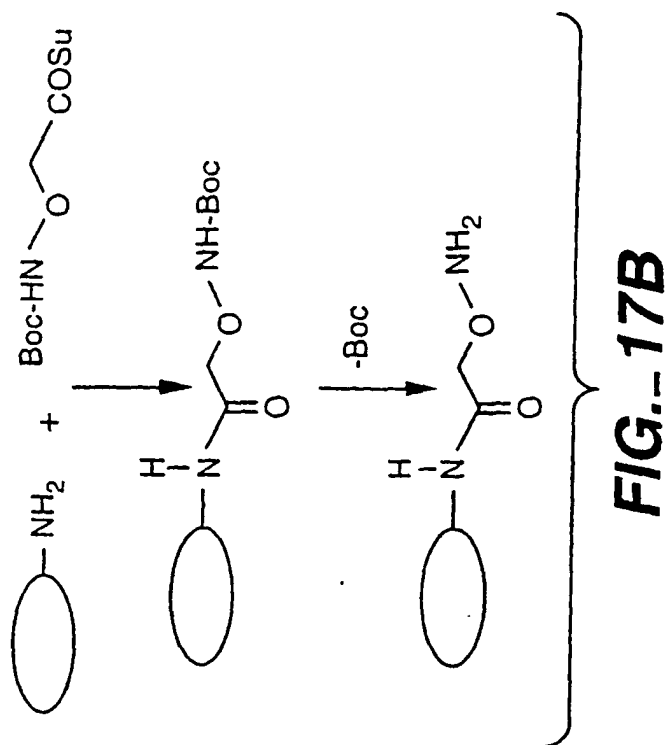
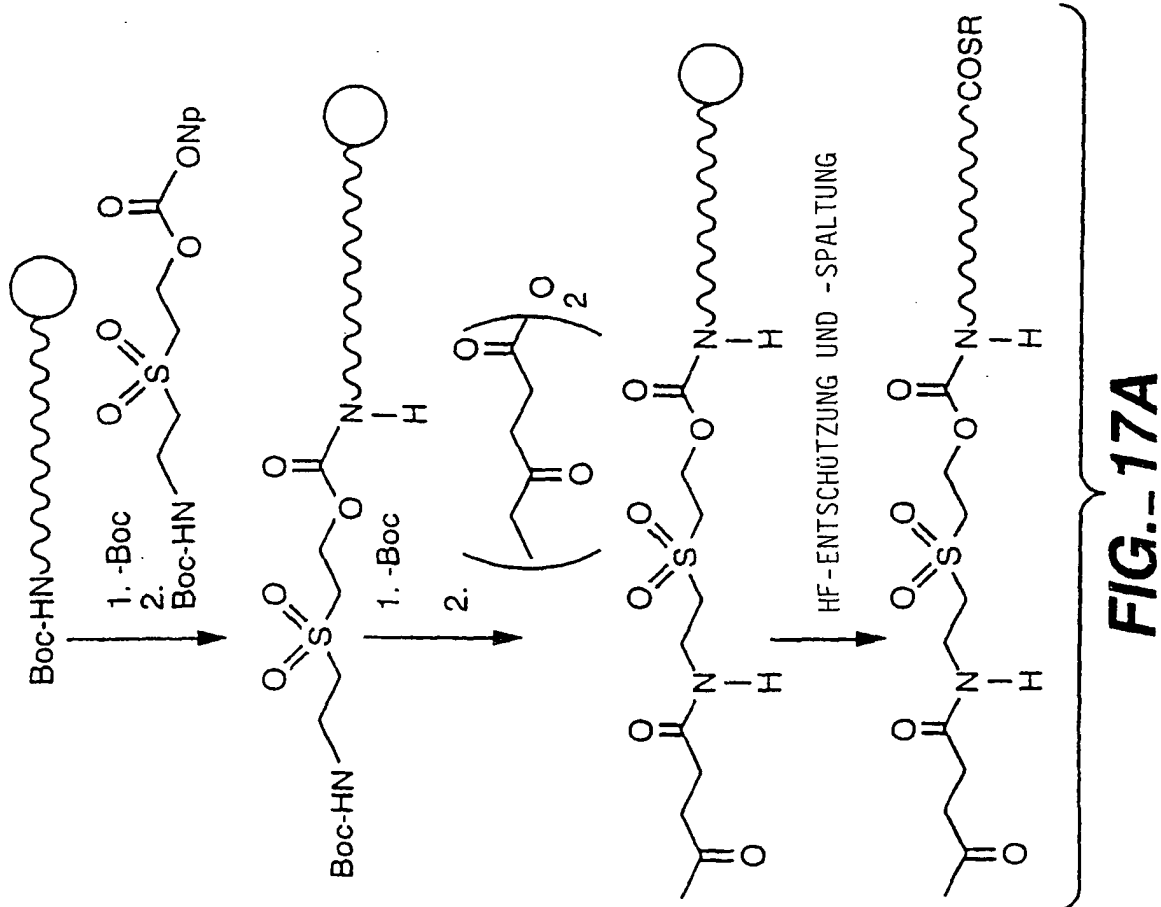
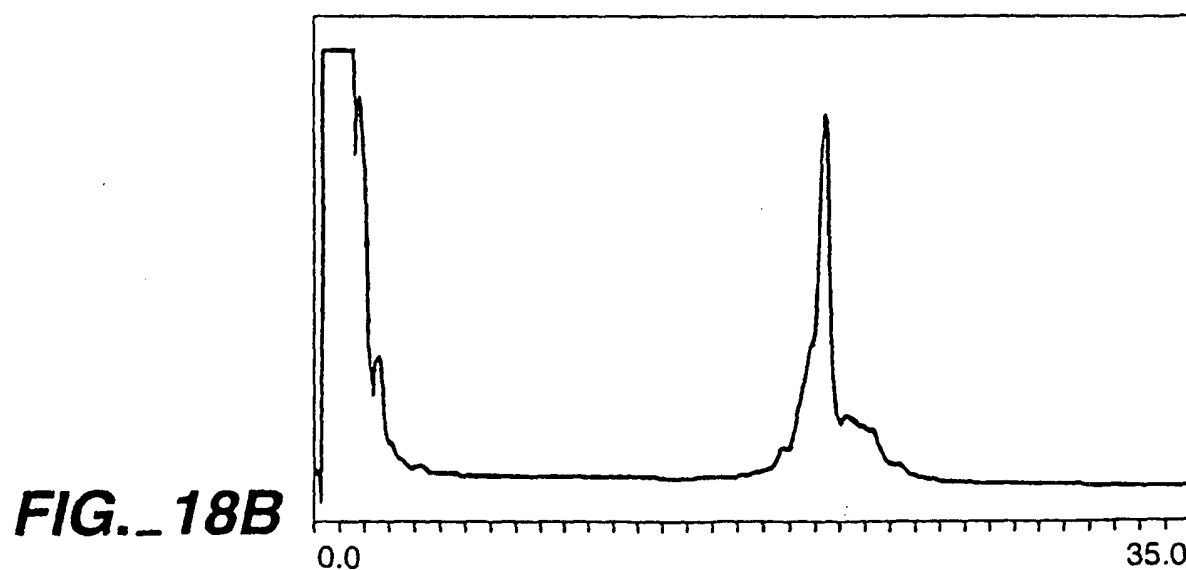
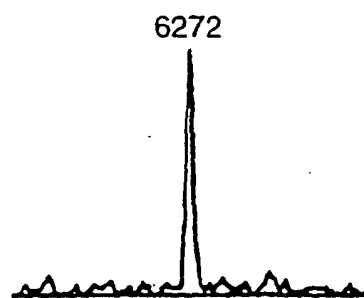
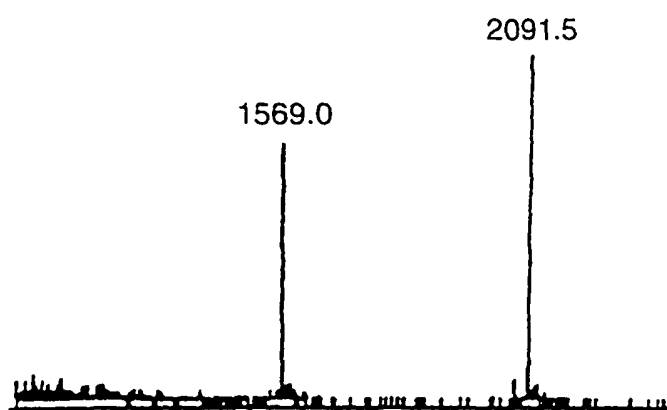
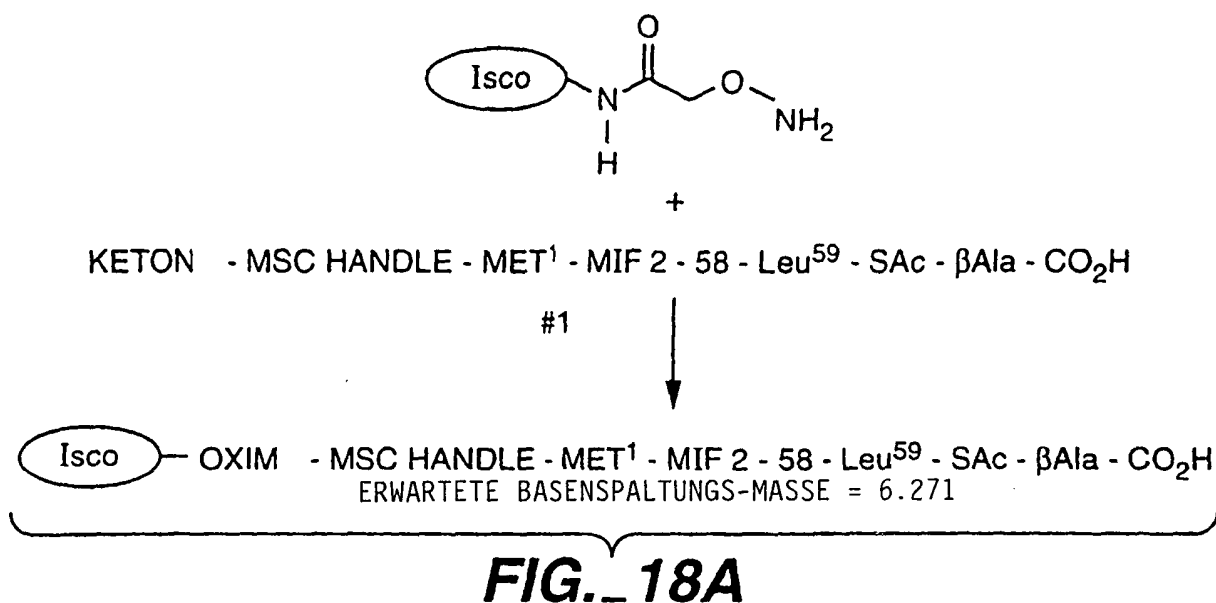
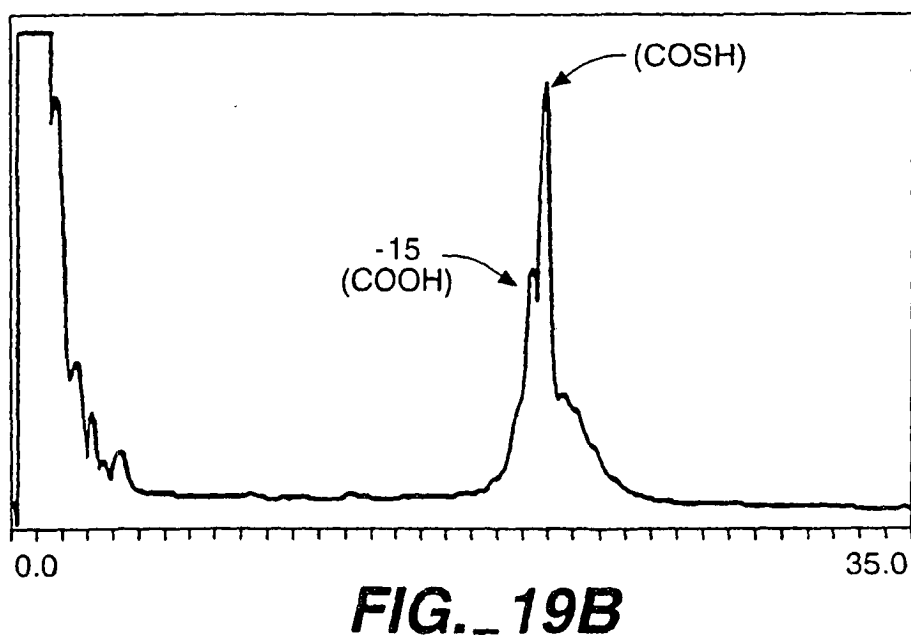
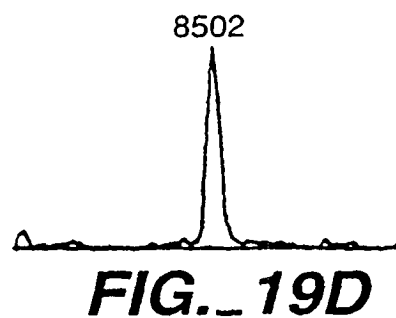
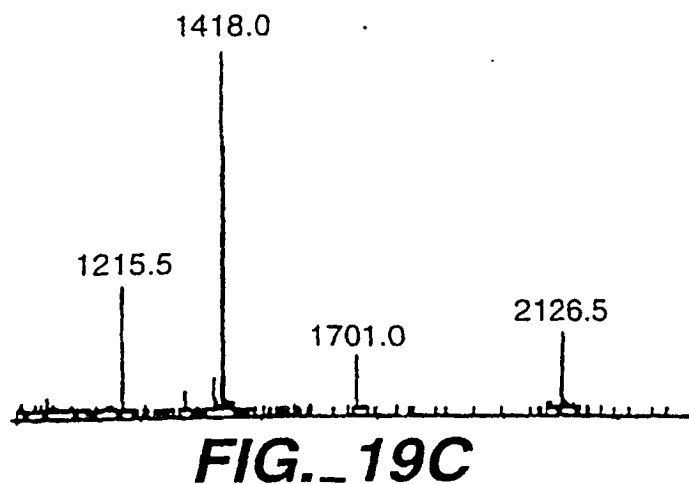
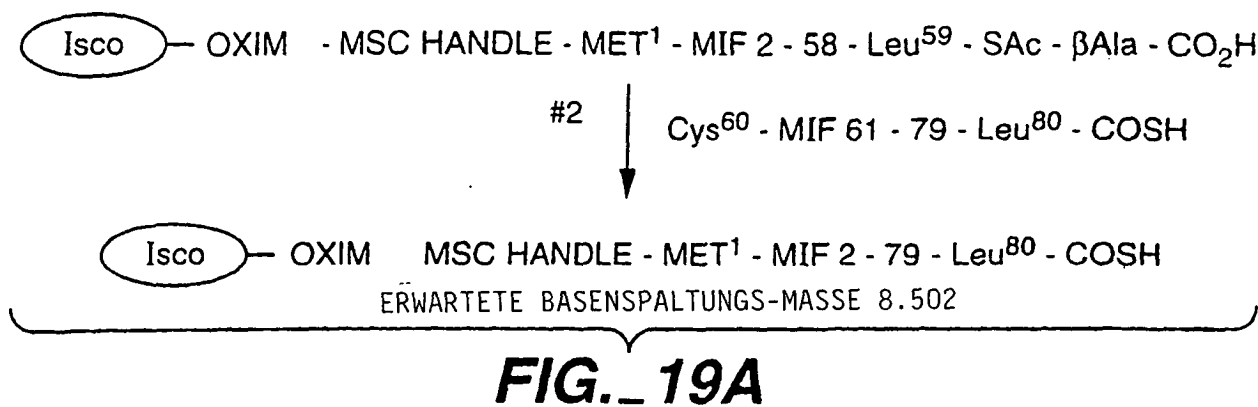


FIG. 16A

**FIG. 16B**







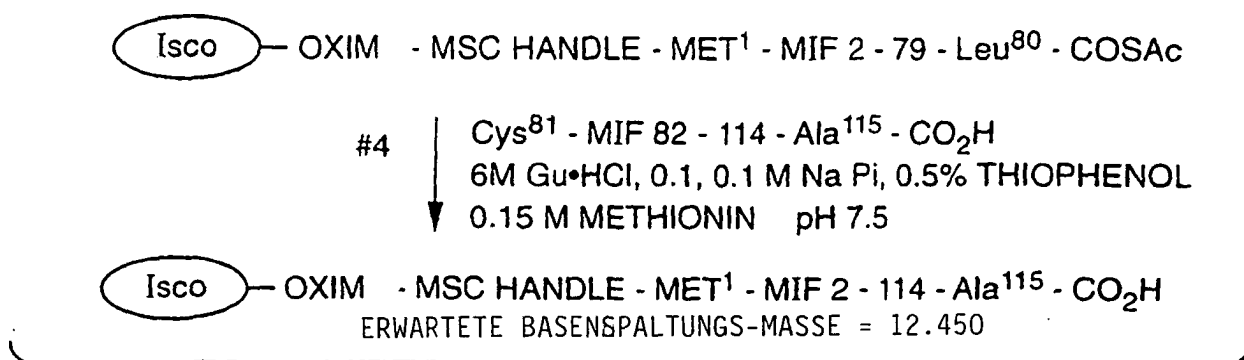


FIG._20A

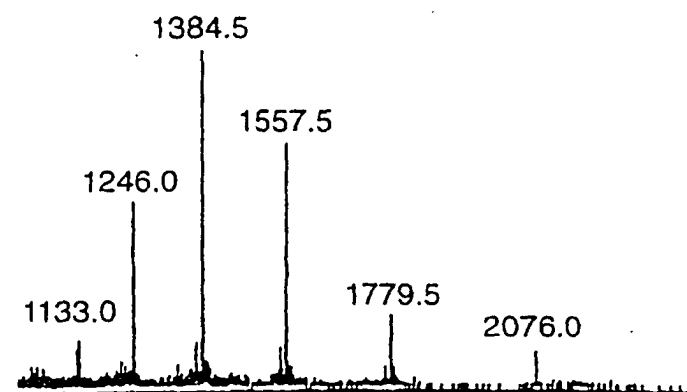


FIG._20C

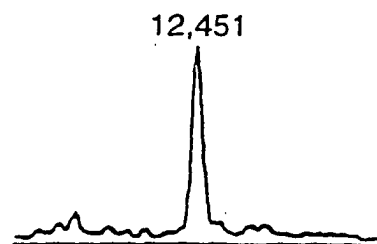


FIG._20D

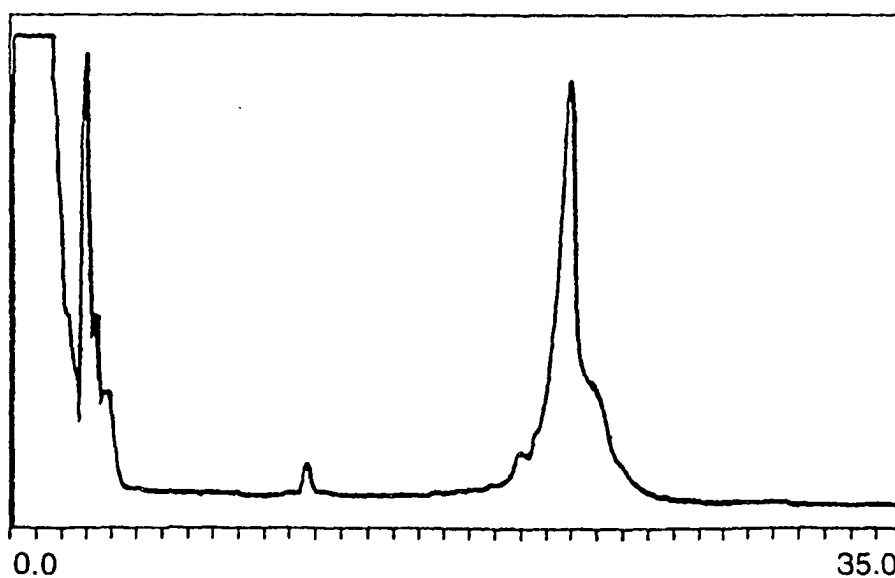
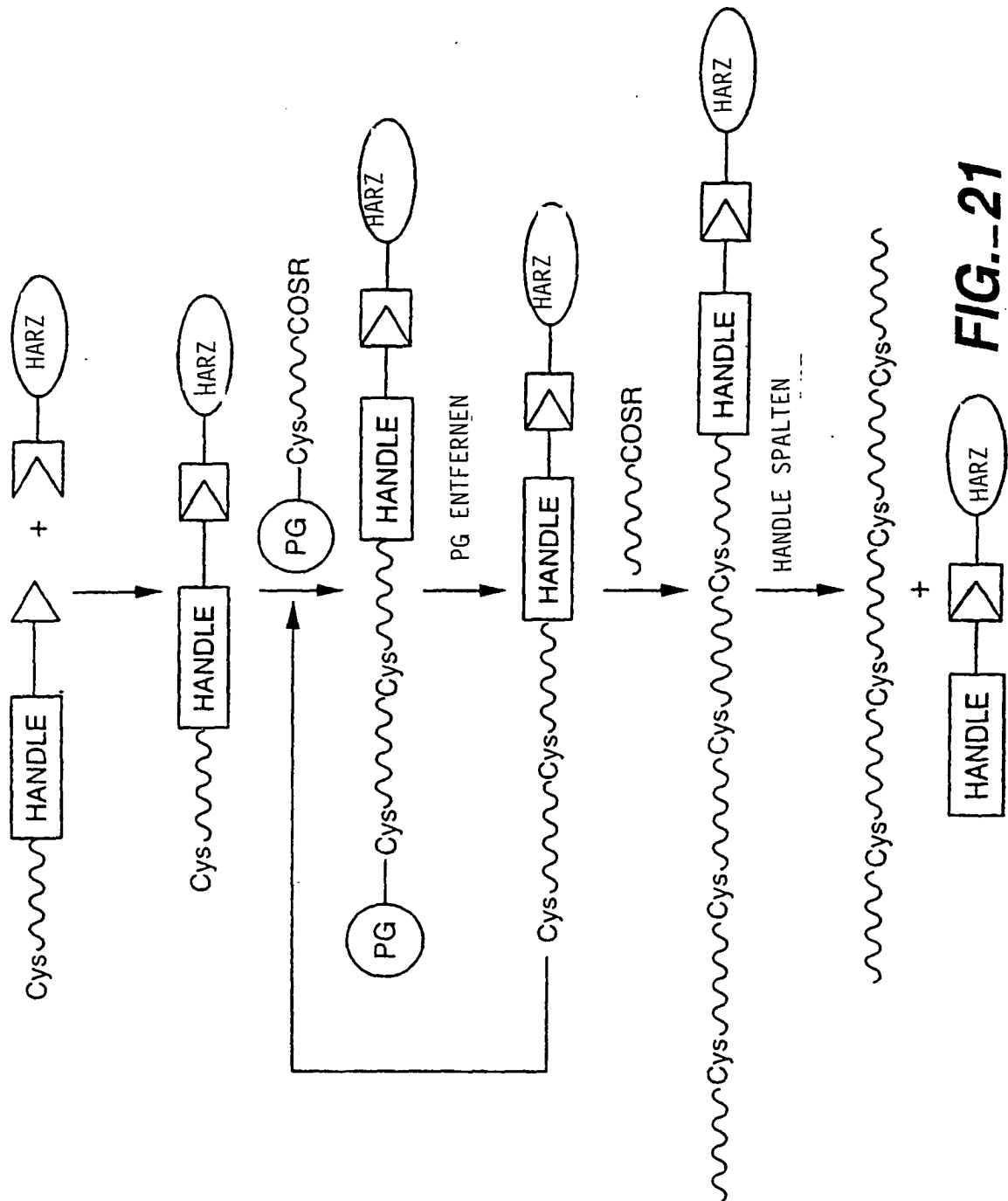
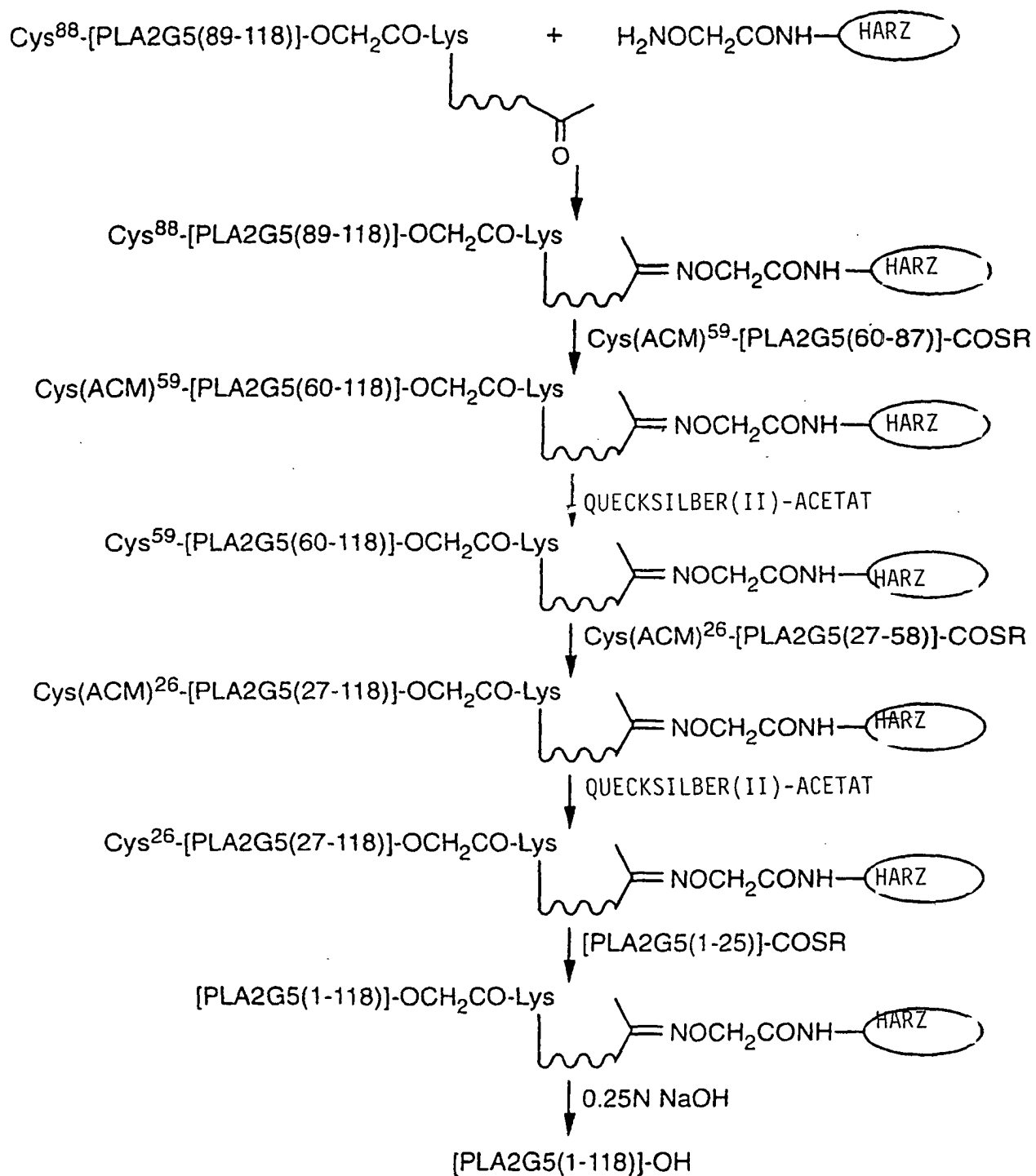
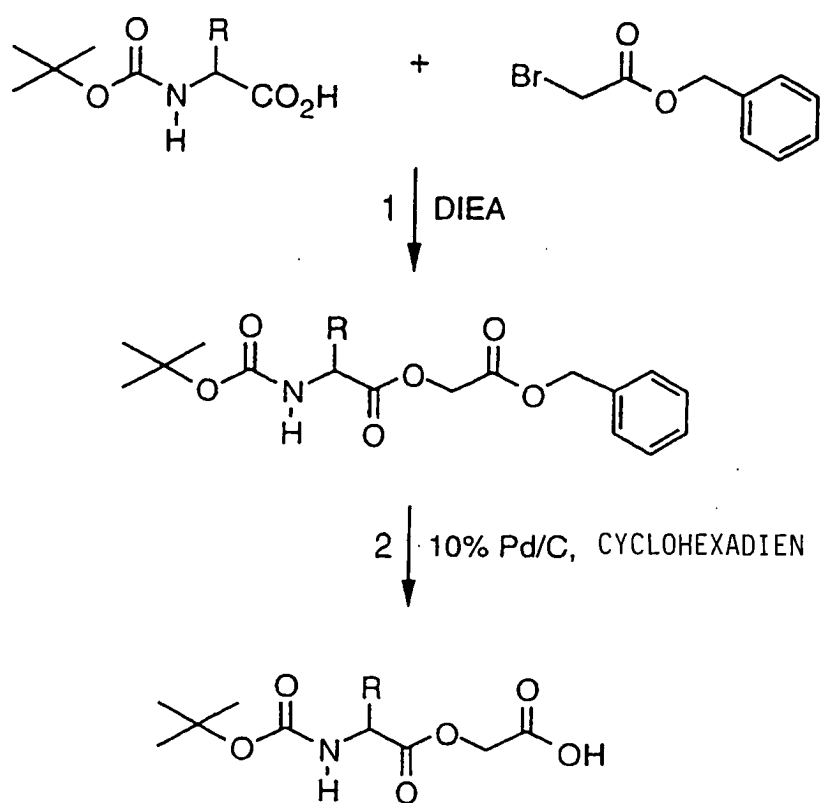


FIG._20B



**FIG._22**

**FIG. 23**

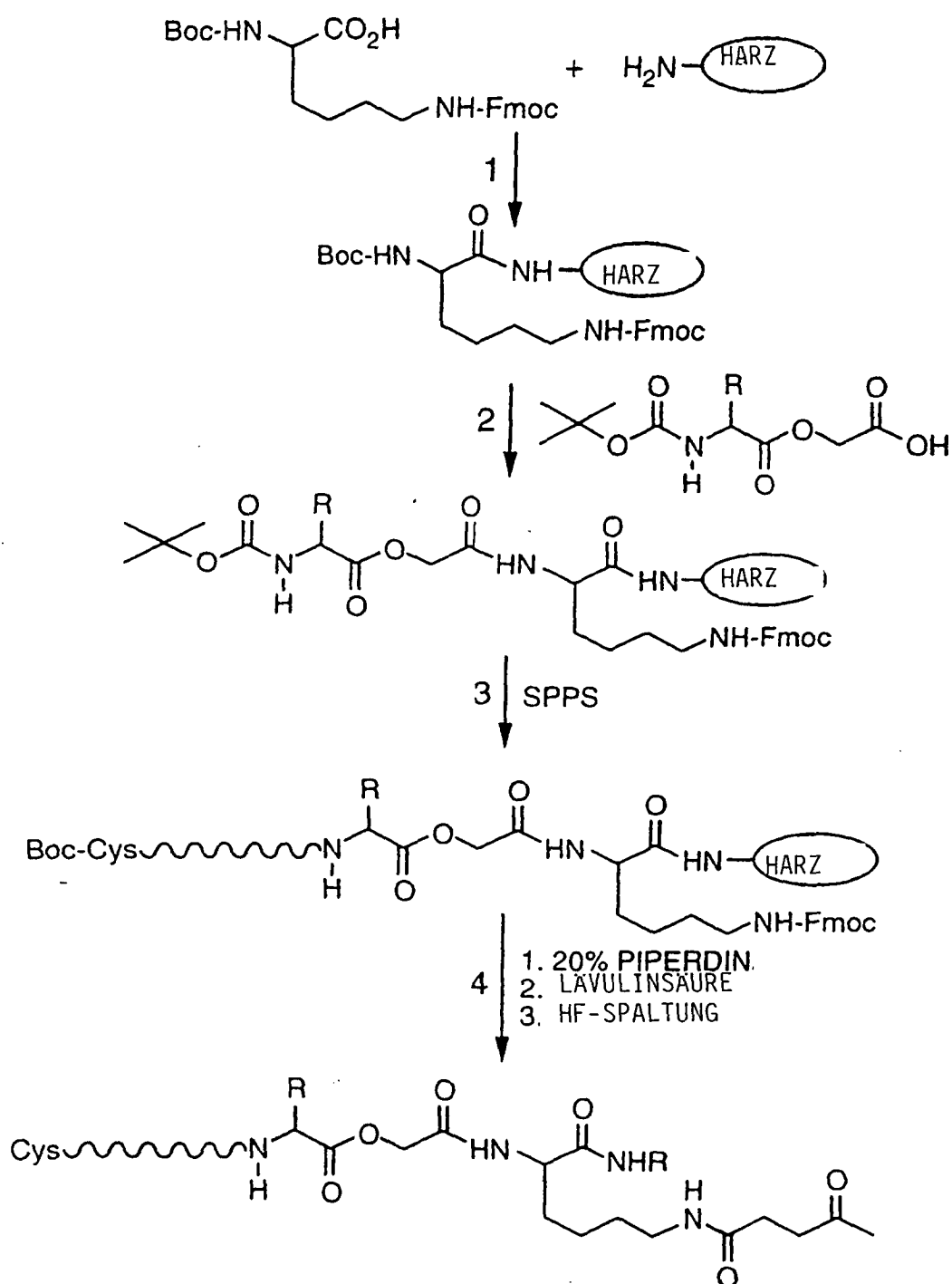


FIG. 24

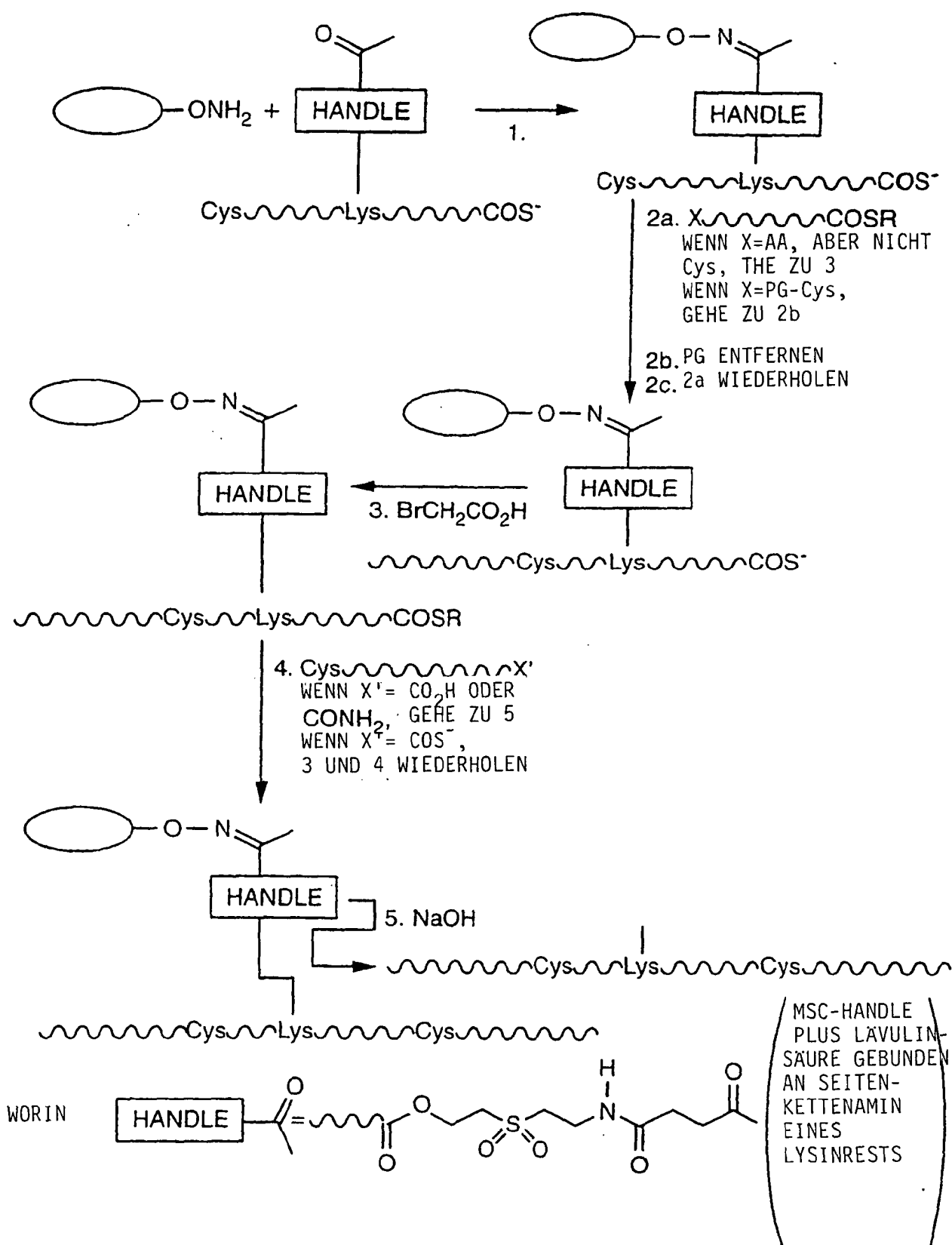


FIG. 25A

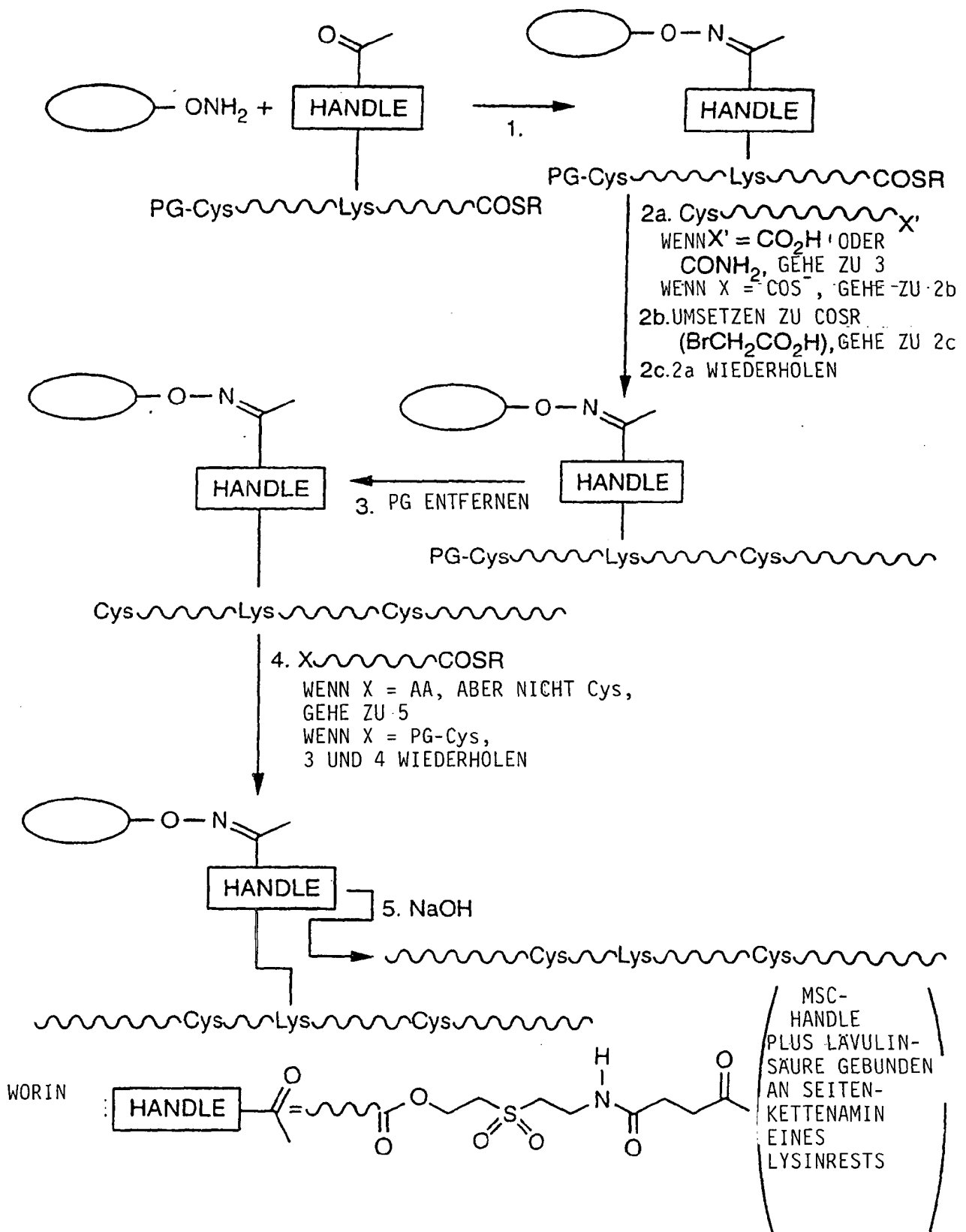
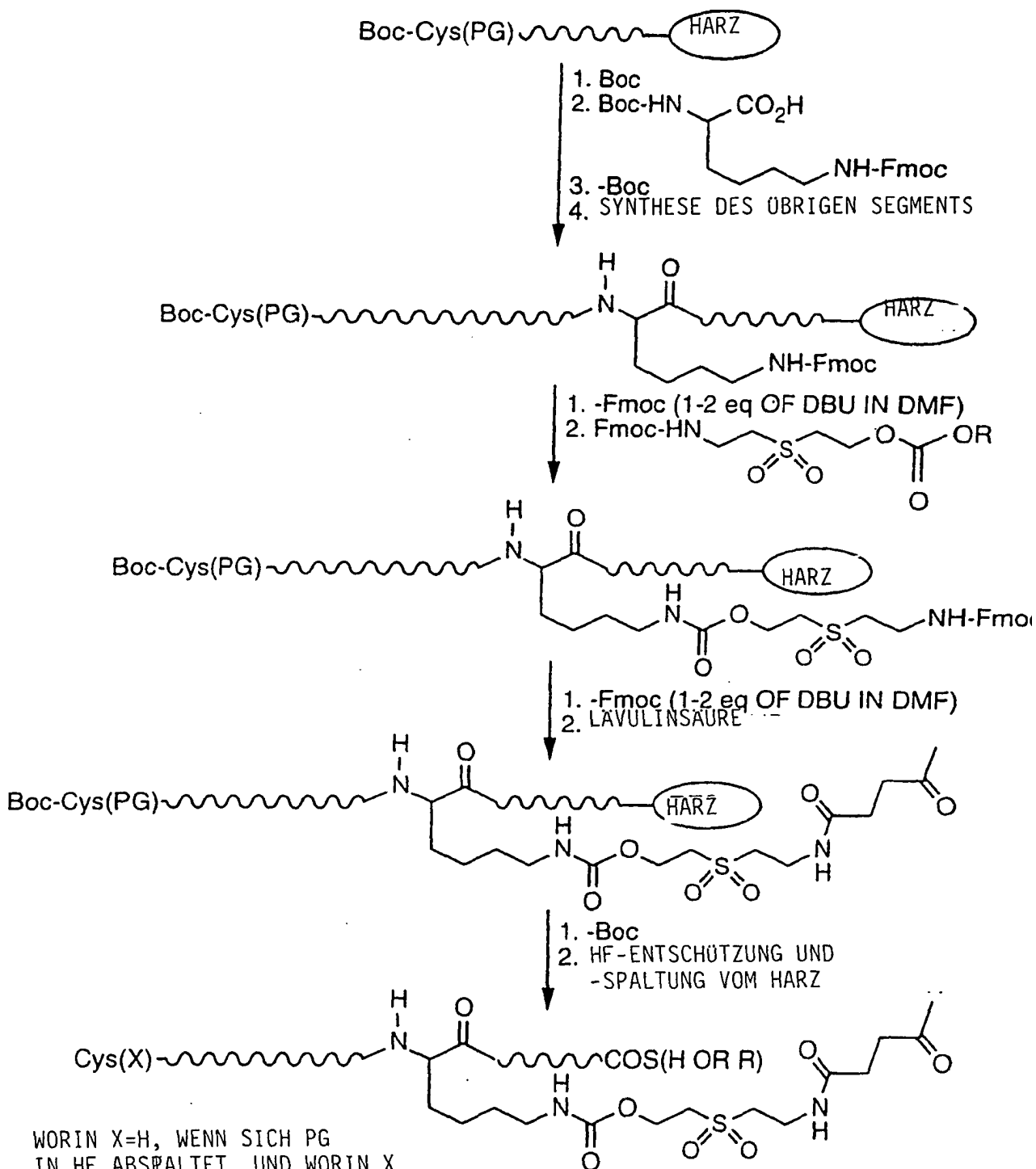


FIG. 25B



WORIN X=H, WENN SICH PG
 IN HF ABSPALTET, UND WORIN X
 PG BLEIBT, WENN PG
 GEGENÜBER HF STABIL IST

FIG. 25C

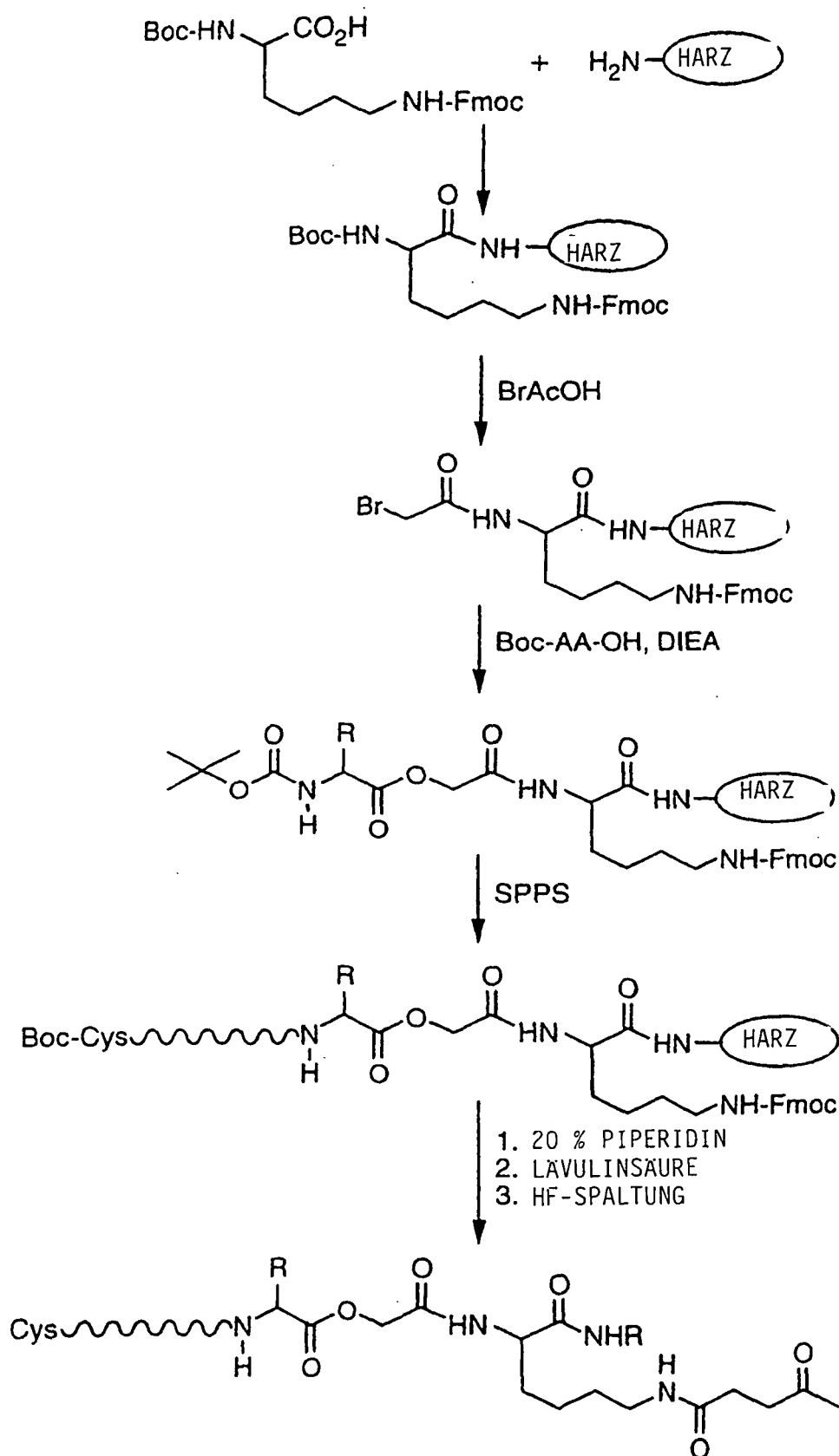


FIG. 27

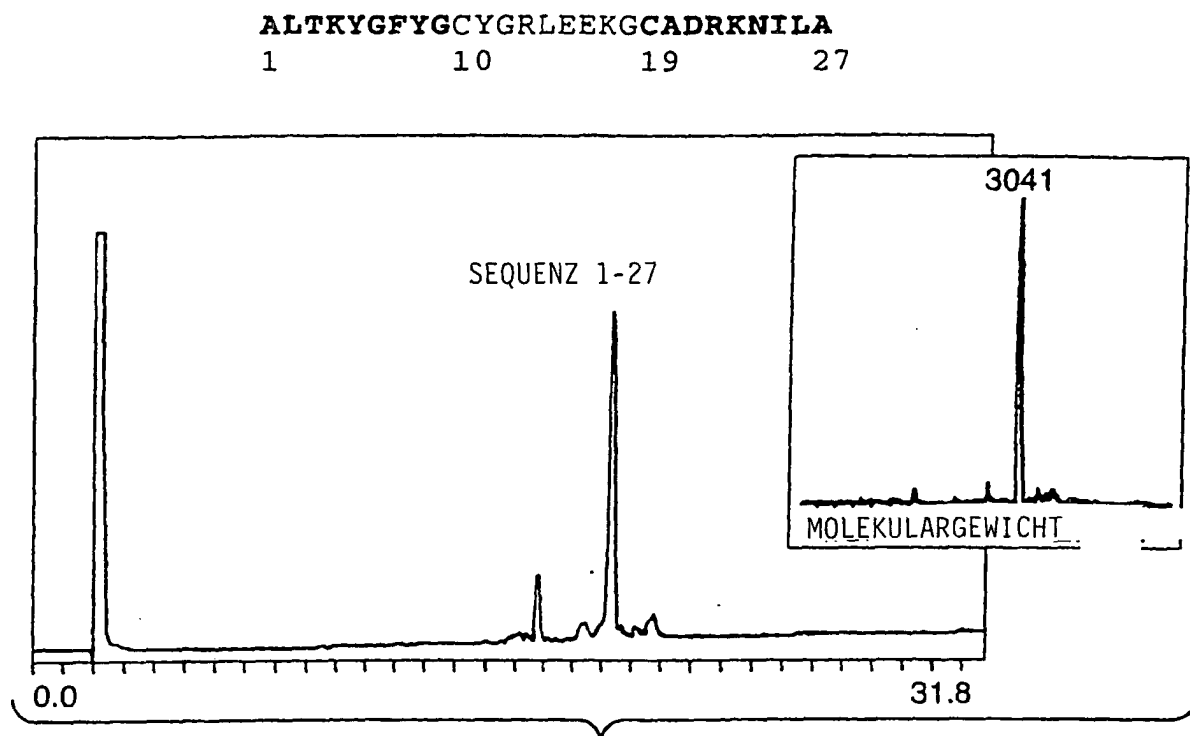


FIG._28

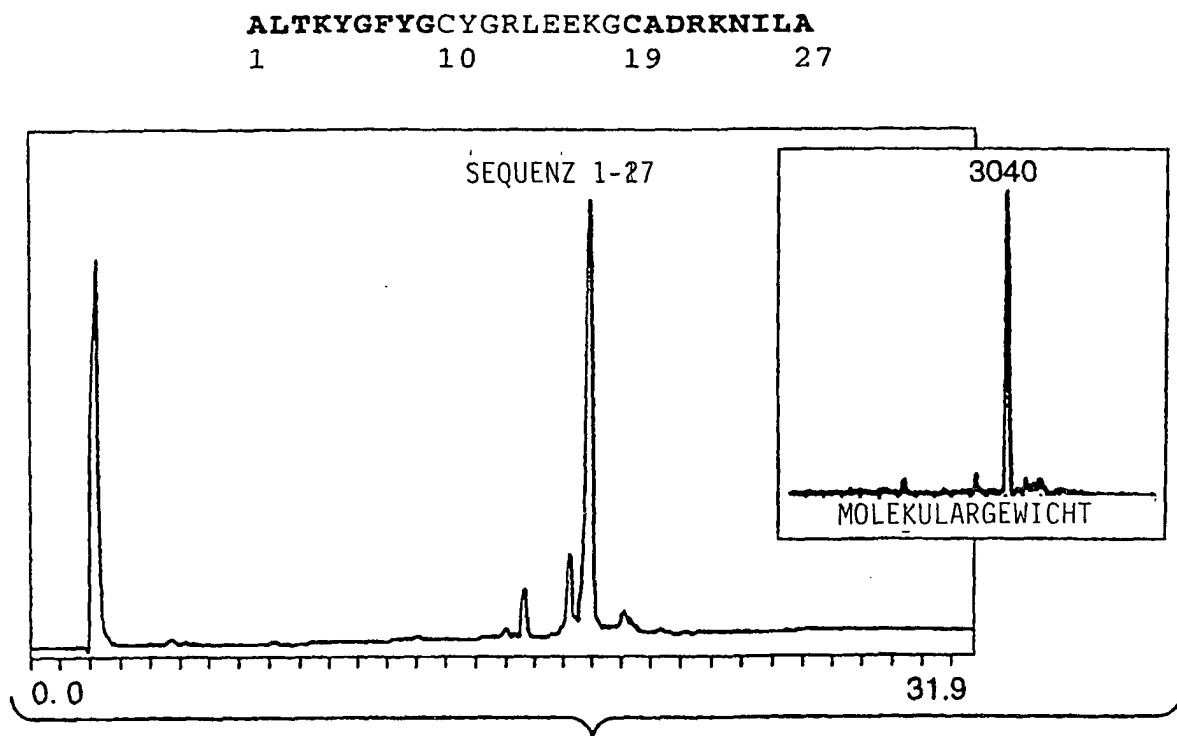
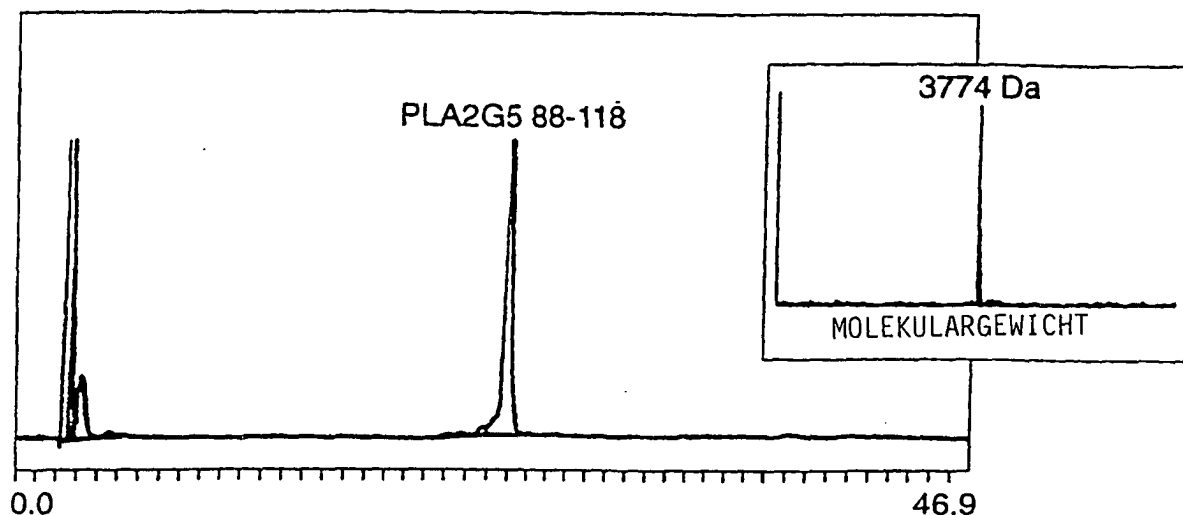


FIG._29

1 26 59
 GLLDLKSMIEKVTGKNALTNYGIFYG**CYCGWGGRGTP**KDGTDWCCWAHDHCYGRLEEKGC
 NIRTQSYKYRFAWGVVTCEPGPFCHVNL**CACDRKL**VYCLKRNLRSYN**PQYQYFP**NILCS
 88 118



1 26 59
 GLLDLKSMIEKVTGKNALTNYGIFYG**CYCGWGGRGTP**KDGTDWCCWAHDHCYGRLEEKGC
 NIRTQSYKYRFAWGVVTCEPGPFCHVNL**CACDRKL**VYCLKRNLRSYN**PQYQYFP**NILCS
 88 118

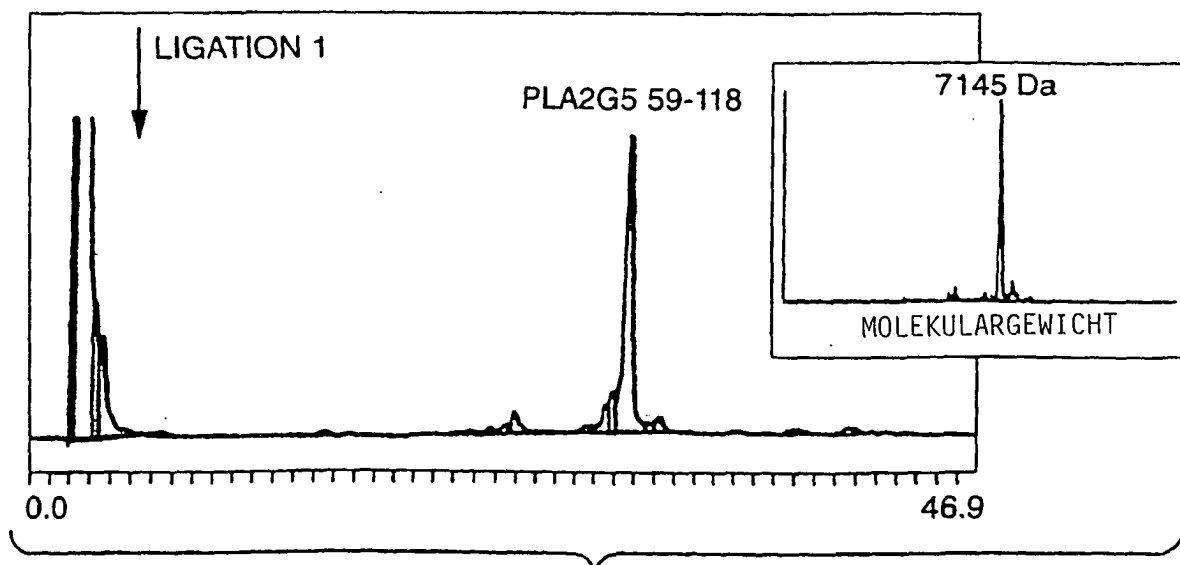
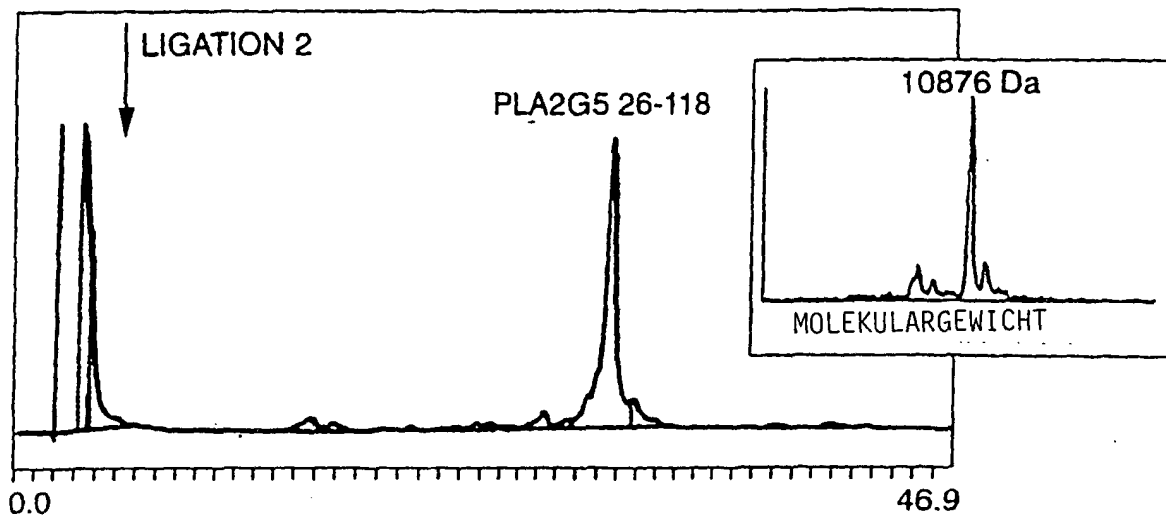


FIG._30A

1 26 59
 GLLDLKSMIEKVTGKNALTNYGFGYGCYCGWGGRGTPKDGTDWCCWAHDHCYGRLEEKGC
 NIRTQSYKYRFAWGVVTCEPGPFCHVNL**CACDRKLVYCLKRN**LSYNPQYQYFPN**ILCS**
 88 118



1 26 59
 GLLDLKSMIEKVTGKNALTNYGFGYGCYCGWGGRGTPKDGTDWCCWAHDHCYGRLEEKGC
 NIRTQSYKYRFAWGVVTCEPGPFCHVNL**CACDRKLVYCLKRN**LSYNPQYQYFPN**ILCS**
 88 118

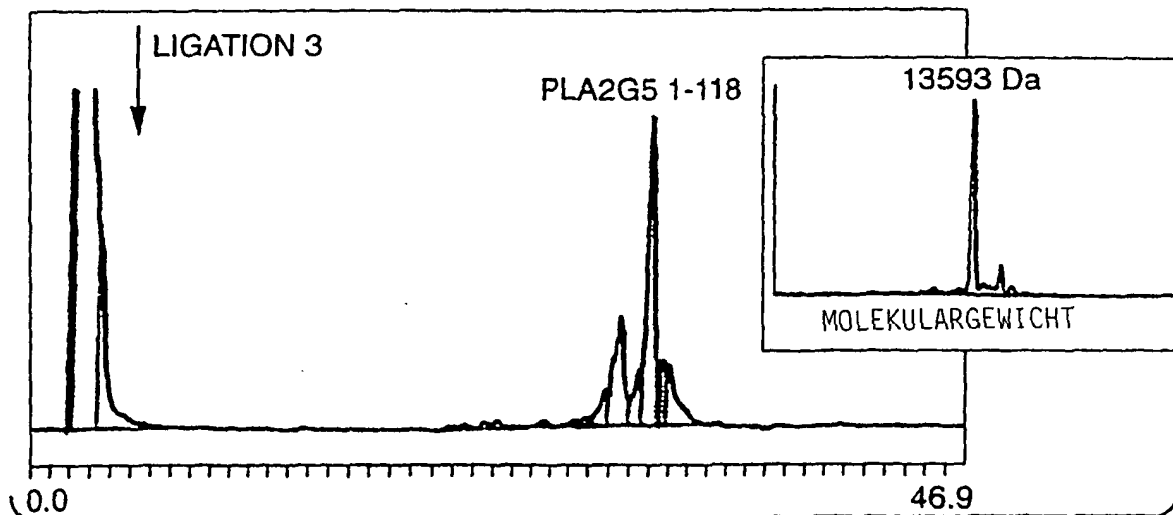


FIG._30B

FIG._30A

FIG._30 **FIG._30B**