



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 301279

(13) B1

(51) Int Cl<sup>6</sup> C 07 K 17/06, 17/08, 1/04

## Patentstyret

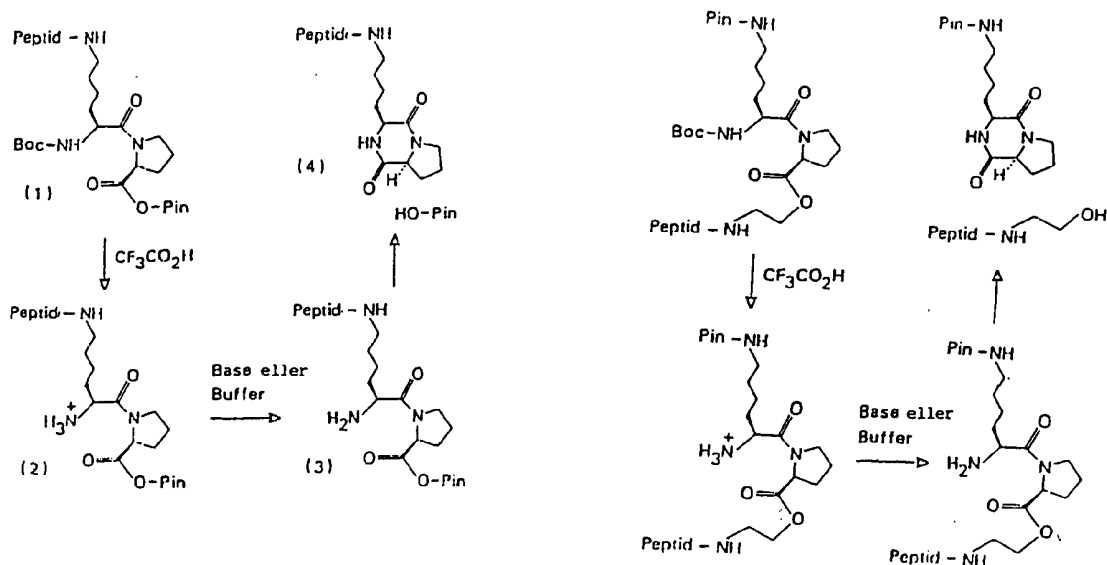
|                   |                                                                                     |                                      |                          |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| (21) Søknadsnr    | 913186                                                                              | (86) Int. inng. dag og søknadsnummer | 16.02.90, PCT/AU90/00062 |
| (22) Inng. dag    | 15.08.91                                                                            | (85) Videreføringsdag                | 15.08.91                 |
| (24) Løpedag      | 16.02.90                                                                            | (30) Prioritet                       | 17.02.89, AU, 2788/89    |
| (41) Alm. tilgj.  | 15.08.91                                                                            |                                      |                          |
| (45) Meddelt dato | 06.10.97                                                                            |                                      |                          |
| (73) Patenthaver  | Coselco Mimotopes Pty Ltd, Corner Duerdin and Martin Streets, Clayton, Vic 3168, AU |                                      |                          |
| (72) Oppfinner    | Hendrik Mario Geysen, Menzies Creek, Vic, AU                                        |                                      |                          |
| (74) Fullmektig   | J.K. Thorsens Patentbureau AS, 0134 OSLO                                            |                                      |                          |

(54) Benevnelse **Immobiliserte peptid-faststoffbærerpreparater, og fremgangsmåter for fremstilling av peptider**

(56) Anførte publikasjoner US 3988307

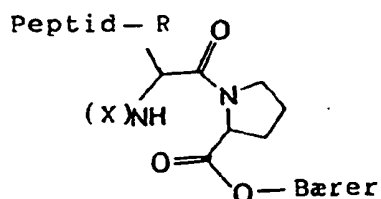
(57) Sammendrag

En fremgangsmåte for separering av minst en bindende entitet fra en blanding av bindende entiteter, omfattende trinnene med å bringe blandingen av bindende entiteter i kontakt med et immobilisert peptid idet peptidet bindes spesifikt til den nevnte spesifikke bindende entitet, og komplekset av immobilisert peptid/spesifikk bindende entitet separeres fra blandingen av bindende entiteter. Et immobilisert peptid-faststoffbærerpreparat omfattende en spaltbar link mellom peptidet og den faste bærer, og en fremgangsmåte for fremstilling av et peptid fra et immobilisert peptid-faststoffbærerpreparat er også omhandlet.



Den foreliggende oppfinnelse vedrører et immobilisert peptid-faststoffbærerpreparat, som er kjennetegnet ved at det omfatter en forbindelse med den generelle formel:

5

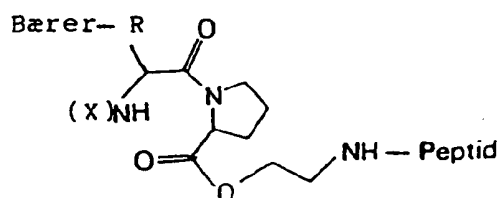


10

hvor X er en beskyttelsesgruppe og R er en aminosyresidekjede som har en funksjonell gruppe.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også et immobilisert peptid-faststoffbærerpreparat, som er kjennetegnet ved at det omfatter en forbindelse med den generelle formel:

20

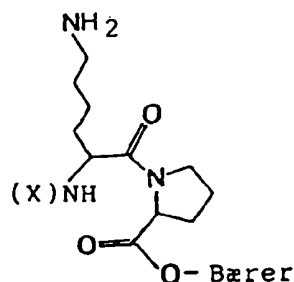


hvor X er en beskyttelsesgruppe og R er en aminosyresidekjede som har en funksjonell gruppe.

Videre vedrører den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av et peptid, som er kjennetegnet ved at den omfatter trinnene med:

(1) tilveiebringelse av en bærer med formel:

35



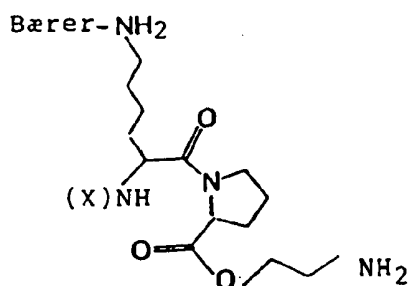
hvor X er en beskyttelsesgruppe,

- (2) syntetisering av et peptid knyttet til  $\epsilon$ -aminogruppen av lysin
- (3) fjerning av X for å tilveiebringe en avbeskyttet  $\alpha$ -aminogruppe av lysin og
- (4) behandling av nevnte avbeskyttede  $\alpha$ -aminogruppe med en mild base.

Videre vedrører den foreliggende oppfinnelse også en

fremgangsmåte for fremstilling av et peptid, som er kjennetegnet ved at det omfatter trinnene med:

- (1) tilveiebringelse av en bærer med formelen:



hvor X er en beskyttelsesgruppe,

- (2) syntetisering av et peptid knyttet til den fri aminogruppen
- (3) fjerning av X for å tilveiebringe en avbeskyttet  $\alpha$ -aminogruppe av lysin og
- (4) behandling av nevnte avbeskyttede  $\alpha$ -aminogruppe med en mild base.

I internasjonal patentsøknad PCT/AU84/00039 åpenbares en

metode for samtidig syntese av store antall peptider. Denne metode er basert på fastfasesyntesen av peptider på polyetylenstaver eller nåler som faste bærere. I denne nevnte patentsøknad påpekes det at teknikken vil være nyttig for systematisk bestemmelse av de kontinuerlige antigeniske determinanter av forskjellige antigener ved syntetisering av samtlige av de overlappende peptider som kunne fremstilles fra sekvensen av antigenet og deretter teste for peptidets evne til å binde til en bindende entitet som f.eks. et antistoff. Det åpenbares faktisk en metode for en

systematisk og meget hurtig bestemmelse av de kontinuerlige B-celleepitoper av et antigen.

Etterfølgende forskning under anvendelse av denne metode har  
5 ført til videre utviklinger som øker brukbarheten av peptider syntetisert på inerte staver eller lignende bærere. Disse videre utviklinger vedrører modifikasjoner av den tidligere oppfinnelse som utvider dens anvendelse ved systematiske undersøkelser innen immunologiområdet. I grunntrekkene til-  
10 later modifikasjonene av den tidligere oppfinnelse to forskjellige sluttresultater: eluering av den bindende entitet fra peptid-faststoffbærerkomplekset og høsting av peptidet fra den faste bærer.

15 Generelt menes med uttrykket "bindende entitet" som anvendt i denne fremstilling et makromolekyl som binder spesifikt til et annet molekyl. Eksempler på slike "bindende entiteter" inkluderer antistoffer som reagerer med det antigen som induserte dem, cellulære reseptorer som reagerer med sin  
20 ligand, f.eks. insulinreseptorer på celleoverflater som binder insulin, og enzymer som binder til deres substrat. Likeledes kan en bindende entitet spesifikt reagere med et inhiberende molekyl som forhindrer dets normale funksjon fra å utføres, f.eks. enzyminhibitorer, antibiotika som penicil-  
25 lin, og antagonister for cellulære reseptorer. I denne fremstilling har imidlertid "bindende entitet" generelt en mer begrenset mening og i denne sammenheng menes den spesifikke binding til et peptid eller et annet molekyl som ble syntetisert på den faste bærer eller stav som nevnt ovenfor.

30

Den foreliggende oppfinnelse muliggjør, som et første aspekt, separering av komplekse blandinger av bindende entiteter i et stort antall individuelle og høyspesifikke bindende entiteter. I den tidligere patentsøknad ble antiserum fjernet  
35 fra et peptidstavkompleks under betingelser som ødela integriteten av alle reagerende antistoffer. Dette tillot peptidstavpreparatene å bli anvendt i videre tester. Den foreliggende oppfinnelse muliggjør fjernelse, under mildere betingelser, av den bindende entitet som bandt spesifikt til

hvert av peptidene bundet til staver eller andre faste bærere. Ved denne metode opprettholdes integriteten av de bindende entiteter og de kan anvendes for videre tester.

- 5 I samsvar med dette første aspekt muliggjøres en metode for separering av minst en spesifikk bindende entitet fra en blanding av bindende entiteter, omfattende trinnene med: (i) den nevnte blanding av bindende entiteter bringes i kontakt med et immobilisert peptid hvori det nevnte peptid spesifikt  
10 binder til den nevnte spesifikke bindende entitet, og (ii) separering av det immobiliserte peptid/spesifikke bindende entitetskompleks fra blandingen av bindende entiteter. Om ønsket kan den spesifikke bindende entitet deretter gjenvinnes, f.eks. ved eluering, eller på annen måte fjernes fra det  
15 immobiliserte peptid/spesifikke bindende entitetskompleks.

I det immobiliserte peptid-faststoffbærerpreparat, hvori peptidet er immobilisert på en fast bærer, kan den faste bæreren være f.eks. en polyetylenstav eller nål som tidligere  
20 beskrevet.

Det innses selvfølgelig at hvor mer enn en spesifikk bindende entitet skal separeres fra blandingen av bindende entiteter, bringes ytterligere immobiliserte peptider i kontakt med  
25 blandingen, hvor peptidene i disse ytterligere preparater spesifikt binder til de ytterligere spesifikke bindende entiteter som skal separeres.

Den grunnleggende modifisering av metoden i den tidligere  
30 patentsøknad er at etter peptidstavkompleksene (f.eks. i en 12 x 8 matriks) er blitt omsatt med den spesielle bindende entitet av interesse, blir de grundig vasket i fosfatbufret saltløsning eller en annen passende vaskevæske. Peptidstav/-bindende entitetskomplekset kan så anbringes i en eluerende  
35 oppløsning som er blitt fordelt i mikrotiterplater. Således blir hvert peptidstav/bindende entitetskompleks anbragt i elueringsløsning fullstendig separat fra et hvilket som helst annet. På denne måte vil hver brønn i mikrotiterplaten inneholde en oppløsning av den bindende entitet som reagerer

spesifikt til et kjent peptidstavkompleks. Det innses at de strengere betingelser som beskrevet i den tidligere patent-søknad om ønsket fremdeles kan utøves på peptidstavkomplekset for å sikre at alle reagerende bindende entiteter er blitt  
5 fjernet, og således tillate peptidstavkomplekset å anvendes for undersøkelse av andre bindende entitetspreparater.

Den anvendte elueringsløsning kan ha en hvilken som helst av de sammensetninger som er kjent for fagkyndige på området.  
10 F.eks. kan oppløsninger med høy eller lav pH, oppløsninger med høye eller lave ionestyrker eller oppløsninger som kombinerer disse egenskaper anvendes for å maksimalisere elueringen av de bindende entiteter fra peptidstavkomplekset.

15 Alternativt kan syntesen av selve peptidene modifiseres for å skape peptider som tillater at den bindende entitet kan fjernes fra peptidstavkomplekset under mer milde betingelser for å minimalisere eller unngå skade på eller denaturering av den bindende entitet. Et eksempel på dette vil være at det i  
20 peptidet, ved amino- eller karboksyenden eller begge, innlemmes en rest som endrer en av dets grunnleggende fysikalsk-kjemiske egenskaper under veldefinerte betingelser. Et eksempel på en slik rest er aminosyren histidin. Denne aminosyre har en sidekjede som har et nitrogenatom som kan  
25 motta et  $H^+$ -atom til å danne et imidazoliumion. pK ved denne reaksjon er 6,00. Et hvilket som helst peptid som har et ytterligere histidin innlemmet i seg vil således endre dets ladningsegenskaper med en endring i pH mellom 7,0 og 5,0. Med den høyere pH vil det være effektivt nøytralt, ved pH 5  
30 vil det ha en positiv ladning. En endring i pH vil derfor fundamentalt endre affiniteten for interaksjonen mellom den bindende entitet og det stavkoblede peptid. En bindende entitet som bandt til peptidet ved en nøytral pH ( $pH = 7,0$ ) ville således forventes å binde med mye lavere affinitet ved  
35 pH 5,0. Faktisk vil endring av pH av oppløsningen over et snevert område nær nøytralitet "bryte løs" den bindende entitet fra peptidet hvortil den er bundet. Det erkjennes at dette eksempel ikke er begrensende til å gjelde innlemmelse av histidin som den eneste rest som kunne anvendes, og heller

ikke til inklusjon av rester som bare endrer den elektrostatiske status av deres sidekjede med pH i den oppløsning hvori de er anbragt.

- 5 En ytterligere modifisering av syntesemetoden som kan anvendes for med hell å eluere bindende entiteter fra et kompleks under milde betingelser, involverer syntese av peptider med forskjellige lengder på den ene stav. Dette kan passende gjøres ved å modifisere koblingstrinnet i syntese-
- 10 prosedyren. Typisk vil antallet aktive synteseseter på en stav være av størrelsesorden hundretalls nanomol. Dersom det er ønskelig å syntetisere peptidene med lengde fra tetrapeptider til oktapeptider i omtrent like mengder på hver av stavene, kan dette oppnås ved en metode som følger: De
- 15 første fire rester vil bli syntetisert ved metoden beskrevet i internasjonal patentsøknad PCT/AU84/00039. Etterfølgende koblinger av rester til det voksende peptid gjennomføres med en blanding av den aktiverte aminosyre og et "beskyttende" middel som vil forhindre en hvilken som helst aminogruppe
- 20 hvormed det reagerer fra å ta noen ytterligere del i etterfølgende syntesesykluser. I dette eksempel, for koblingen av den femte aminosyre (fra karboksyenden) ville en blanding av den aktuelle aktiverte aminosyre og koblingsmiddel i molart forhold 4:1 bli anvendt. Dette ville sikre at omtrent 20 %
- 25 av syntesesetene ville bli "beskyttet" og at peptidene allerede syntetisert på disse spesielle seter ville forbli som tetrapeptider. En passende "beskyttende" reagens ville være eddiksyreanhydrid som ville reagere med fri aminogrupe for acetylering av disse. Ved koblingstrinnet av den sjette
- 30 syntesesyklus ville det molare forhold mellom aktivert aminosyre og "beskyttende" middel bli øket til 3:1 for å sikre at ytterligere 20 % av syntesesetene ble "beskyttet" og ville forbli som pentapeptider under de resterende syntesesykluser. Under etterfølgende syntesesykluser blir forholdet
- 35 mellom aktuell aktivert aminosyre og "beskyttende" middel redusert til 2:1, 1:1 og i sluttsyklusen 1:0 (ikke noe "beskyttende" middel er nødvendig i den endelige syklus av syntesen). Forholdene i dette eksempel er åpenbart selektert for å sikre at 20 % av de opprinnelige synteseseter inakti-

veres, slik at de langt fra er i stand til å delta i de etterfølgende peptidforlengelsessykluser som det her gjelder, i hver syklus. På denne måte ville staver som har like mengdeandeler av tetra-, penta-, hekso-, hepta- og okta-peptidversjoner av parental-oktapeptidet fremstilles. 5 Tetrapeptidversjonen ville være karboksyende-tetrapeptidet av oktapeptidet, pentapeptidet ville være karboksyende-pentapeptidet av oktapeptidet osv. Det er klart at å endre konsentrasjonen av den "beskyttende" oppløsning ved hvert 10 trinn av synteseprosedyren vil tillate at mengdeandelen av hver spesiell lengde av peptider kan varieres etter ønske. En spesiell bindende entitet vil binde til forskjellige lengder av peptider med forskjellige affiniteter. Et molekyl som binder meget sterkt til et spesielt oktapeptid vil 15 således elueres fra en pentapeptidversjon av den samme epitop under mildere betingelser som minimaliserer en hvilken som helst irreversibel skade som er gjort på den bindende entitet. Det erkjennes at dette aspekt vil omfatte alle metoder som forhindrer etterfølgende tilsetning av en rest 20 til et peptid, og er ikke begrenset til acetylering av aminoenden av et peptid. Det er klart at en rest som kan fremtvinge en strukturendring i peptidet (beskrevet som en "løsbrytnings"-rest i det foregående) også kan innlemmes i syntesen.

25

Oppløsningene av bindende entiteter som fremstilles ved hjelp av dette første aspekt er effektivt en fraksjonering av den opprinnelige komplekse blanding av bindende entiteter. Hver av disse oppløsninger representerer de bindende entiteter som 30 reagerer spesifikt med et kjent peptid. Hver av oppløsningene er monospesifikk. Den komplekse blanding av anti-stoffer som representerer et dyrs polyklonale respons til et antigen kan således fraksjoneres i oppløsninger som er effektivt monospesifikke. I dette henseende opptrer disse 35 oppløsninger lik monoklonale antistoffer. Der er imidlertid to vesentlige fordeler med disse preparater fremfor monoklonale antistoffer. Ved fremstilling av monoklonale anti-stoffer er epitopen til hvilken det monoklonale antistoff responderer tilfeldig lykketreff. I praksis må et stort

antall kloner fremstilles og screenes for å oppnå ønskede spesifisiteter. Monospesifikke antistoffpreparater fremstilt ved hjelp av metodene omhandlet heri har epitoper definert av selve prosessen. For det annet kan monospesifikke antistoffpreparater fremstilles fra antisera fra hvilke som helst species, mens derimot monoklonale antistoffer i praksis er begrenset hovedsakelig til murine antistoffer.

Oppløsningene av bindende entiteter som fremstilles i samsvar med dette første aspekt kan anvendes ved nøytraliserings-  
tester med virus og toksiner for direkte å bestemme hvilke fraksjoner er involvert ved nøytraliseringsprosessen. De kan anvendes i ytterligere bindingsstudier for klart å indikere forholdene av det fraksjonerende peptid og ytterligere  
ligander. Fraksjonene kan anvendes ved agglutinasjonstester. De kan dermed anvendes i hvilke som helst av de tester som er kjent for de fagkyndige på området for å bestemme regionene av et antigen som er viktige ved uttrykking av en nyttig biologisk funksjon, f.eks. antigenet som induserer sitt  
antistoff. Å nå det mål å være i stand til å fremstille syntetiske peptider for bruk i vaksiner eller som agonister og antagonister av reseptorer hjelpes sterkt av den direkte bestemmelse av de peptider som er spesifikt assosiert med spesielle biologiske funksjoner som omhandlet i denne  
fremstilling.

Ved et andre aspekt muliggjør den foreliggende oppfinnelse syntese av peptider, og spesielt metoder for spalting av et immobilisert peptid fra en stav eller nål eller annen fast bærer hvorpå det er blitt syntetisert. Dette oppnås ved å innføre en spaltbar link i peptid-faststoffbærerpreparatet mellom bæreren og peptidet. Denne link tilveiebringer det sete hvor spalting vil foregå etter syntesen og avbeskyttelsen av sidekjedene av peptidene er blitt gjennomført. Det  
erkjennes at slike spesielle grupper behøver å selekteres omhyggelig. Mange av de teknikker som er utviklet for spalting i konvensjonell peptidsyntese vil være uegnet for bruk i dette system. De er enten for farlige å anvende unntagen av de mest dyktige teknikere (et eksempel er den

tradisjonelle bruk av hydrogenfluorid som et spaltingsmiddel) eller de krever omhyggelig rensing for å fjerne ubrukt reaktant og biprodukter fra reaksjonen, eller begge deler. Ideelt bør de endelige peptidholdige oppløsninger være i stand til å anvendes direkte ved en varietet av biologiske tester uten rensing og uten at noen restgiftighet eller innhold av andre komponenter som kan forstyrre testen.

I samsvar med dette andre aspekt tilføyes en spaltbar link under syntesen mellom den faste bærer og det ønskede peptid, foretrukket mellom den faste bærer og karboksyenden av peptidet.

Dette aspekt inkluderer bruk av en esterlink, en prolinrest og en bifunksjonell aminosyrerest som en slik egnet spaltbar link, og kjemien for å utnytte denne spaltbare link drar fordel av et spesielt besværlig problem innen peptidsyntesen. I prinsippet, når prolin syntetiseres med karboksyenden av et peptid som bygges opp på en fast bærer, og en ytterligere aminosyre med en beskyttet  $\alpha$ -aminosyregruppe deretter syntetiseres derpå, vil etter fjernelse av den  $\alpha$ -aminobeskyttende gruppe og nøytralisering prolinet spontant ringsluttet til å danne diketopiperazin og avspaltes fra den faste bærer. Denne reaksjon er illustrert i fig. 1a.

En utførelsesform av dette aspekt utnytter den reaksjon som er illustrert i fig. 1a, ved initialt å tilsette prolin til den faste bærer via en esterlink. Hvor den faste bærer er en behandlet polyetylenstav eller nål som omhandlet i den tidligere internasjonale patentsøknad PCT/AU84/00039, har staven eller nålen foretrukket overgangs- eller linkerrester, som f.eks.  $\beta$ -alanin eller heksametylendiaminrester, tilsatt før syntesen av peptidet derpå. Deretter tilføyes en bifunksjonell aminosyre til prolinet. Et eksempel på en slik bifunksjonell aminosyre som ville være forlikelig med kjemien av Fmoc-metoden for peptidsyntese er  $\alpha$ -BOC,  $\epsilon$ -Fmoc-lysin, hvor BOC og Fmoc er de beskyttende grupper t-butyloksykarbonyl, henholdsvis 9-fluorenylmetyloksykarbonyl. En variasjon av denne bifunksjonelle aminosyre som er forlikelig med

BOC-kjemien ved peptidsyntese er  $\alpha$ -Z,  $\epsilon$ -BOC-lysin, hvor Z er den beskyttende gruppe benzyloksykarbonyl. Det bemerkes at i begge tilfeller beskytter den vanlige beskyttende gruppe, Fmoc, henholdsvis BOC, snarere  $\epsilon$ -aminogruppen enn  $\alpha$ -aminogruppen, og videre beskytter den beskyttende gruppe som beskytter  $\epsilon$ -aminogruppen (BOC henholdsvis Z) nå  $\alpha$ -aminogruppen. Etter tilføyelse av denne aminosyre fortsetter syntesen av peptidet på vanlig måte. Peptidet vil imidlertid nå være knyttet til  $\epsilon$ -aminogruppen av lysinet i stedet for den vanlige  $\alpha$ -aminogruppe. Etter avbeskyttelse av sidekjedene vil  $\alpha$ -aminogruppen av lysinet inntil prolinet være i form av  $H_3N^+$ -ionet som kan nøytraliseres under meget milde basiske betingelser. Ved nøytral reaksjon vil prolinet spontant ringsluttet og avspaltet fra den faste bærer som illustrert i fig. 1a. Dette vil etterlate peptidet i oppløsning med gruppen  $-NH-(CH_2)_4$ -diketopiperazinet knyttet til dets karboksyende.

Egnede forbindelser som kan anvendes til å danne esterlinken mellom prolinresten og overgangs- eller linkerrestene på den faste bærer inkluderer, men er ikke begrenset til, de følgende og deres derivater: N-acetylserin,  $HO-CH_2-CH(NH.Ac)-COOH$ , glykolsyre,  $HO-CH_2-COOH$ , melkesyre,  $HO-CH(CH_3)-COOH$ , og p(hydroksymetyl)benzosyre,  $HO-CH_2-C_6H_4-COOH$ .

Alternativt kan den bifunksjonelle aminosyre knyttes til den faste bærer (gjennom linkerrestene) før prolinet. På nytt, hvor den bifunksjonelle aminosyre er lysin gjennomføres tilknytningen gjennom  $\epsilon$ -aminosyren for å tillate  $\alpha$ -aminosyren å delta i ringslutningstrinnet ved slutten av syntesen. Denne blir så omsatt med prolin som har fått sin karboksygruppe forestret, f.eks. med Fmoc etanolamin eller serin. Peptidsyntesen blir så gjennomført som vanlig. Etter sidekjede-avbeskyttelse av peptidet blir  $\alpha$ -aminogruppen på lysinet knyttet direkte til den faste bærer forsiktig nøytralisert og prolindelen undergår ringslutning og avspaltning av peptidet. Ved denne variant forblir diketopiperazinet på den faste bærer og peptidet har en gruppe avledet fra den forestrende gruppe ved sin karboksyende, f.eks. gruppen  $-NH-$

$(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$  hvor den forestrende gruppe er etanolamin.  
Reaksjonen er illustrert i fig. 1b.

- Under noen forhold kan det være uønsket å ha den relativt  
5 store diketopiperazindel ved karboksyenden av det avspaltede  
peptid som vist i fig. 1a. Ved en ytterligere utførelsesform  
av dette aspekt omfatter den spaltbare link en esterlink  
mellom karboksygruppen av den terminale aminosyre og linker-  
restene på den faste bærer som beskrevet i det foregående.
- 10 Egnede forbindelser for å danne en slik esterlink er be-  
skrevet i det foregående. Etter syntese av det ønskede  
peptid og sidekjede-avbeskyttelse kan peptidet avspaltes fra  
den faste bærer ved esterlinkeren. F.eks. vil forsåpning med  
base avspalte peptidet med en  $\text{-COOH}$ -gruppe ved sin karboksy-  
15 ende, og de resulterende peptidoppløsninger vil bare behøves  
å nøytraliseres før biologisk testing kan utføres. En  
alternativ spaltingsmetode er å anvende metylamin i etanol  
og/eller vann. Dette vil resultere i avspaltede peptider  
hvis karboksyendegruppe var  $\text{-CO-NH-CH}_3$ . Denne metode har den  
20 fordel at spaltingsmidealet er flyktig og vil bli fjernet fra  
peptidoppløsningen ved frysetørking. Peptidene kan da opp-  
løses i en hvilken som helst ønsket buffer for bruk ved  
biologisk testing.
- 25 De fagkyndige på området vil erkjenne at den spaltbare link  
og spaltingskjemien kan modifiseres til å gi forskjellige  
endegrupper som ønsket på karboksyenden av de avspaltede  
peptider.
- 30 Når polyetylenstaver eller nåler som beskrevet i den oven-  
nevnte internasjonale patentsøknad anvendes som den faste  
bærer, kan mengden av polypeptid syntetisert på hver stav  
eller nål være av størrelsesorden 100 nmol (omtrent 0,07 mg  
for et heksapeptid). Denne mengde er tilstrekkelig til å  
35 gjennomføre systematiske undersøkelser i et stort antall  
systemer. Disse inkluderer f.eks. undersøkelser av T-  
celleepitoper, hormonstudier hvori peptidene anvendes som  
agonister eller antagonist av hormoner, enzyminhibering og  
tester for mulige nye antibiotika.

Peptidene syntetisert i samsvar med dette aspekt kan også innlemmes i andre molekyler. F.eks., hvis spalting gjennomføres i nærvær av en aktivert bærer (som f.eks. nøkkelhull-albuskjellhemocyanin - keyhole limpet haemocyanin - et protein som er velkjent for de fagkyndige på området for å indusere utmerkede immunologiske responser i forsøksdyr) kan da et sett av antistoffsera fremstilles ved å injisere de peptidaktiverede bærerproteinpreparater (med eller uten bruk av et hjelpestoff som f.eks. Freund's adjuvans) i dyr og deretter samle serum fra disse. På denne måte kan et stort antall antiserer fremstilles som så kan anvendes i hvilke som helst av de vanlige immunologiske tester, f.eks. nøytralisasjons- og bindingsanalyser. Den samme prosess kan anvendes for å kombinere peptidet med et monoklonalt antistoff. F.eks. frembringer trinnet med konjugasjon av et peptid som etterligner en epitop med et monoklonalt antistoff som spesifikt reagerer med humane erytrocytter (røde blodlegemer eller hRBC) et modifisert monoklonalt antistoff som kan anvendes som et diagnostisk middel spesifikt for binding av entiteter som reagerer spesifikt med epitopen. Ved anvendelse i en diagnostisk test blir pasientens hRBC dekket med peptidet ved blanding med det modifiserte monoklonale antistoff. Hvis pasienten har antistoffer som binder til epitopen vil hans/hennes hRBC klumpe seg sammen på grunn av at antistoffene vil binde med peptidet etter ligningen av epitopen (dette gir en indikasjon på tidligere eksponering for epitopen) som lett kan sees av relativt uøvede teknikere. Det er klart at peptidet kombinert med et slikt monoklonalt antistoff vil selekteres slik at det er spesifikt for en spesiell tilstand, f.eks. HIV-1 (humant immunosuppressivt virus, type 1) eller HBsAg (human heptatitt B virus, overflateantigen).

Den foreliggende oppfinnelse illustreres ved de etterfølgende utførelseseksempler.

#### EKSEMPEL 1

Aminoendene av kapsidproteinet av potyvirusgruppen av plantevirus er blitt vist å være spesifikke for stammer av disse

virus. Alle de overlappende oktapeptider som kunne fremstilles fra de spesifikke regioner av kapsidproteinet ble syntetisert for tre stammer av potyvirus. Stammene, og sekvensene (under anvendelse av enkeltbokstavkoden for aminosyrene) hvorpå syntesene var basert er:

Johnson gressmosaikkvirus (JGMV), rester 1 til 97:

```

      1  SGNEDAGKQK SATPAANQTA SGDGPAAQTT ATADNKPSSD
10    41  NTSNAQGTSQ TKGGGESGGT NATATKKDKD VDVGSTGTFV
      81  IPKLKKVSPK MRLPMVS

```

Soyabønnemosaikkvirus, stamme N (SMV-N), rester 1 til 57:

```

15    1  SGKEKEGDM ADKDPKKSTS SSKGAGTSSK DVNVGSKGKV
      41  VPRLQKITRK MNLPMVE

```

Vannmelonmosaikkvirus, stamme 2 (WMMV2), rester 1 til 66:

```

      1  SGKEAVENLD TGKDSKKDTS GKGDKPQNSQ TGQGSKEQTK
20    41  IGTVSKDVNV GSKGKEVPRL QKITKK

```

Hver serie av oktapeptider ble syntetisert og omsatt med et antiserum som på forhånd var vist å utvise en grad av spesifisitet for en av stammene av potyvirus. Antistoffene ble eluert under sure betingelser og hver antistofffraksjon ble testet for binding til kapsidproteinet av de forskjellige stammer av potyvirus. Fig. 2, 3 og 4 representerer reaksjonen med den spesifikke region av kapsidproteinet av henholdsvis stammene JGMV, SMV-N og WMMV2. I hver av disse figurer gir a) absorbens i en ELISA-test med serum dyrket mot den homologe stamme, de andre subfigurer oppsummerer reaksjonen av elueringsmiddelet (av reaksjonen mellom peptidene av virusstammen og det homologe antiserum) med kapsidproteinet av forskjellige stammer, b) gir resultatet av binding av elueringsmiddelet med JGMV-kapsidproteinet, c) gir bindingen med SMV-N kapsidproteinet og d) gir bindingen med WMMV2 kapsidproteinet.

Disse resultater viser at fraksjonering av antistoff-preparater muliggjøres ved den foreliggende oppfinnelse. De illustrerer videre at antistofffraksjonene, etter eluering, ikke bare bibeholder men ofte øker deres spesifisitet.

- 5 Videre forklarer de tydelig den observasjon at mens stammen JGMV har liten kryssreaksjon med den ene eller den andre av de andre to stammer er der noe kryssreaksjon mellom SMV-N og WMMV2. I tillegg har fraksjoneringen ført til fremstilling av antisera for å skjelne mellom de to kryssreagerende
- 10 stammer av potyvirus på grunn av at antiserum som reagerer med peptidet <sup>34</sup>GSKEQTKI (i WMMV-II sekvensen) reagerer sterkt med WMMV-II kapsidprotein og ikke har noe binding til SMV-N stammen.

#### 15 EKSEMPEL 2

Sett av staver ble syntetisert med det følgende peptid:  
 $\alpha$ -Z,  $\epsilon$ -DNP lysyl-prolin knyttet til serinoverganger ved hjelp av syntesemetoden beskrevet detaljert i internasjonal patent-søknad PCT/AU84/00039. DNP er dinitrofenylgruppen og er en

20 kromofor hvormed spaltingshastigheten av peptidet kan måles. Stavene ble så eksponert for 0,05 % NaOH oppløsning og den optiske densitet målt ved 405 nm. Resultatene av dette forsøk er gitt i tabell 1 og viser at peptidet avspaltes fra stavene under forholdsvis milde betingelser, dvs. ubufret

25 0,05 % NaOH oppløsning.

**TABELL 1**  
**Rate av peptidavspalting**

| 30 | Tid     | Optisk densitet<br>Middel | sa    | % fullføring |
|----|---------|---------------------------|-------|--------------|
|    | 0 min   | 0.064                     | 0.002 | 0%           |
|    | 5 min   | 0.138                     | 0.016 | 23%          |
| 35 | 15 min  | 0.284                     | 0.007 | 47%          |
|    | 30 min  | 0.420                     | 0.015 | 70%          |
|    | 60 min  | 0.569                     | 0.079 | 95%          |
|    | 90 min  | 0.579                     | na    | 97%          |
|    | 120 min | 0.600                     | 0.046 | 100%         |

- 40
- sa = standard avvik  
na = ikke analysert

De ovenstående resultater viser at større peptider syntetisert på stavene med lysyl-prolinspaltingsgruppen tilsvarende kan fjernes fra stavene under forholdsvis milde betingelser.

5

**EKSEMPEL 3**

Alle overlappende dekaeptidsekvenser som kunne fremstilles fra MPB70-proteinet av Mycobacterium bovis BCG ble syntetisert på staver med en spaltbar link. Dette protein er en  
10 hovedkomponent av BCG og er kjent å stimulere T-celler. Hvert peptid ble spaltet fra sin stav og individuelt testet for sin evne til å bevirke proliferasjon i et T-cellepreparat. Dette ble målt ved produksjon av  $\gamma$ -interferon som frigis når T-cellene stimuleres. Sekvensen av proteinet er:

15

```
1  GDLVGP GCAE YAAANPTGPA SVQGMSQDPV AVAASNNPEL
41  TTLTAALSGQ LNPQVNLVDT LNSGQYTVFA RTNAAF SKLP
81  ASTIDELKTN SLLTSILTY HVVAGQTSPA NVVGTRQTLQ
121 GASVTVTGQG NSLKVG NADV VCGGVSTANA TVYMIDSVLM
161 PPA
```

20

Stavene ble podet og BOC-heksametylendiamin koblet til dem under anvendelse av metodene beskrevet i internasjonal patentsøknad PCT/AU84/00039. Deretter kobles Fmoc-serin-(t-butyl) til staven under anvendelse av vanlig Fmoc-kjemi.  
25 Serinet ble avbeskyttet under anvendelse av piperidin/dimetylformimid (DMF) for å fjerne Fmoc-gruppen på vanlig måte.  $\alpha$ -aminogruppen av serinet ble så acetyllert med henstand i en eddiksyreanhydridoppløsning bestående av 40 ml trietylen, 80 ml eddiksyreanhydrid i 200 ml DMF i 90 minutter. Stavene  
30 ble så vasket tre ganger i metanol og fikk tørke. t-butylgruppen på hver serin-sidekjede ble så fjernet med trifluoreddiksyre (TFA) i 50 minutter og fikk tørke i luft og ble anbragt under vakuum. BOC-prolinet ble koblet til den fri -OH-gruppe av serinet. Det symmetriske anhydrid av  
35 prolinet ble fremstilt. 3,48 g BOC-prolin-OH ble tilsatt til 1,67 g N,N'-dicykloheksylkarbodiimid (DCC) i 100 ml diklorometan (DCM) og fikk reagere i 20 minutter ved romtemperatur. Materialet ble filtrert og inndampet til tørrhet. Resten ble oppløst i 150 ml DMF og umiddelbart før kontakten med stavene

ble 1,5 g dimetylamino­pyridin (D­MAP) og 157 mg DCC tilsatt til oppløsningen. Stavene fikk reagere i 24 timer for å la forestringsreaksjonen gå til fullføring. De ble så vasket i metanol.  $\alpha$ -BOC-­lysin ( $\epsilon$ -Fmoc) ble så koblet til prolinet

5 under anvendelse av vanlig Fmoc-kjemi. Etter kobling og vasking ble Fmoc-beskyttelsesgruppen fjernet fra  $\epsilon$ -aminogruppen av lysinet på vanlig måte (piperidin i DMF). Deretter ble aminosyren av peptidene koblet under anvendelse av vanlig Fmoc-kjemi. Etter fullført syntese ble sidekjedene avbeskyt-

10 tet med en oppløsning av TFA:fenol:etandit­iol (95:2,5:2,5). Stavene ble så vasket med TFA i fem minutter og gitt to vaskinger i metanol i ett minutt. De ble så satt bort i fosfatbufret saltløsning (pH 5,0) i 48 timer. Hver stav fikk så stå i spaltingsoppløsning i fire timer med leilighetsvis

15 omrøring. Spaltingsoppløsningen var 0,08 % NaOH, 0,01 % fenolrødt (som en indikator) i avluftet destillert vann. Hver stav ble anbragt i 150  $\mu$ l fordelt i en polystyren mikro-titerplate. Stavene ble så fjernet fra platene og 20  $\mu$ l fosfatbufret saltløsning (pH 7,2) tilsatt til hver brønn i

20 platen. Peptidoppløsningen ble lagret frosset inntil bruk.

Resultatene oppnådd ved T-celleproliferasjonstesten er illustrert i fig. 5. Tre regioner i sekvensen identifisert som signifikante stimulatorer av T-celler var:

25  $^{10}$ SVQGMSQDPVA  
 $^{12}$ TNAAFSKLPASTID  
 $^{18}$ ATVYMIDSVLMP

Alle peptidene fra 9-mer til 12-mer lengden av MPB70-

30 sekvensen omkring disse regioner ble syntetisert på staver og deretter spaltet på samme måte som beskrevet i det foregående. Disse peptidpreparater ble på nytt testet for deres evne til å stimulere T-celleproliferasjon. Resultatene er gitt i fig. 6. Disse resultater viser at T-celleprolifera-

35 sjon kan reprodusbart stimuleres ved hjelp av peptider syntetisert i oppfinnelsens sammenheng. De illustrerer også at store antall peptider kan anvendes i slike tester for systematisk å studere varianter av det stimulerende peptid.

**EKSEMPEL 4**

Testpeptidet VQAAIDYING, velkjent for de fagkyndige på området (tilsvarende restene 65-74 i acylbærerproteinet av *Escherichia coli*) ble syntetisert på nåler. En stabil esterlink ble innført ved å syntetisere en separat forbindelse, Fmoc-Pro-Lact-OH.

Trietylamin (7 ml, ekvivalent med 50 mmol) og 10 g fenacylbromid (= 50 mmol) ble tilsatt til en omrørt oppløsning av L-melkesyre (5,4 g av en 85 % vandig oppløsning, ekvivalent med 50 mmol). Etter 40 timer ved romtemperatur ble reaksjonsblandingen ekstrahert med 100 ml varmt vann. Den organiske fase ble så sekvensmessig vasket med de følgende vandige oppløsninger: 10 % sitronsyre, 7 % natriumbikarbonat og til slutt med mettet NaCl-oppløsning (saltlake). Den organiske fase ble så tørket. Avdamping av løsningsmiddelet ga en gummi som krystalliserte ved henstand. Faststoffet ble trituret med 50 ml eter og samlet ved filtrering. 3,47 g utbytte av fenacyllaktat (Lac-OPa) var 68 % av det teoretiske for dette trinn.

Fmoc-prolin ble så koblet til fenacyllaktatet. 2,06 g (10 mmol) dicykloheksylkarbodiimid ble tilsatt til en 4°C oppløsning av Fmoc-Pro-OH (3,37 g, 10 mmol), fenacyllaktat (2,08 g, 10 mmol) og dimetylaminopyridin (240 mg, 2 mmol) i 50 ml diklormetan. Reaksjonsblandingen ble filtrert etter 22 timer og filtratet inndampet. Den resulterende gummi ble oppløst i 100 ml etylacetat og vasket sekvensmessig med følgende vandige oppløsninger: 10 % sitronsyre, to ganger i 4 % natriumhydroksyd, 10 % sitronsyre og til slutt saltlake. Den organiske oppløsning ble inndampet og ga produktet som 4,36 g av en gul gummi. Dette material ble anvendt uten ytterligere rensing.

Fmoc-Pro-Lac-OPa ble så omdannet til dicykloheksylamin (DCHA) saltet. Råproduktet ble oppløst i 30 ml etylacetat og 100 ml iseddik og 30 ml vann ble tilsatt. 6 g sink ble tilsatt til oppløsningen og suspensjonen omrørt i 16 timer ved romtemperatur og deretter filtrert. Den gummi som ble oppnådd etter

inndamping av filtratet ble fordelt mellom 150 ml etylacetat og 200 ml vann. Den organiske fase ble sekvensmessig vasket med følgende vandige oppløsninger: saltlake, 10 % sitronsyre, saltlake. Den blekgule olje oppnådd etter inndamping ble oppløst i 50 ml eter. En oppløsning av 2,00 g dicykloheksylamin (11 mmol) i 50 ml lett petroleumseter (40 til 60°C fraksjon) ble sakte tilsatt til eteroppløsningen og det ble dannet et hvitt bunnfall som ble krystallinsk ved henstand. Dette ble samlet ved filtrering og vasket med 50 ml eter tre ganger og til slutt lufttørket. Utbyttet av 4,46 g Fmoc-Pro-Lac-OH.DCHA oppnådd var 95 % av det teoretiske. Denne forbindelse er stabil og kan lagres inntil nødvendig for anvendelse.

Før kovalent kobling til nålene må imidlertid forbindelsen omdannes til den fri syre. Det er klart at den anvendte mengde vil avhenge av antallet nåler som skal kobles. En typisk prosedyre er som følger. 20,0 g Fmoc-Pro-Lac-OH.DCHA (ekvivalent med 34,02 mmol) ble fordelt mellom 300 ml etylacetat og 500 ml 10 % vandig sitronsyre. Den organiske fase ble så vasket sekvensmessig med de følgende vandige oppløsninger: 200 ml 10 % sitronsyre og 200 ml saltlake. Oppløsningen ble så tørket med vannfritt natriumsulfat og til slutt filtrert og inndampet til å gi en klar gummi. Denne ble oppløst i 1008 ml dimetylformamid sammen med hydroksybenzotriazol (9,135 g, ekvivalent med 67,4 mmol) og 7,56 g DCC (36,5 mmol) og 150 µl av oppløsningen fordelt i hver brønn av 63 reaksjonsbrett. Nålene ble neddykket i oppløsningen i 16 timer i forseglede poser ved 20°C. Etter kobling ble nålene vasket i 15 minutter med metanol og lufttørket. Alle ureagerede amingrupper på nålen ble beskyttet ved acetylering med eddiksyreanhydrid. Etter vasking ble nålene tørket og lagret til de trengtes. På denne måte ble 6048 nåler koblet. Det erkjennes at koblingen av Fmoc-Pro-Lac-OH-delen til nålen anvender standard kjemi med fastfasepeptidsyntese.

Under anvendelse av de vanlige Fmoc-kjemitrinn kobles  $\alpha$ -BOC-lysin ( $\epsilon$ -Fmoc) til nålene. I angjeldende eksempel ble Fmoc-

5  $\beta$ -alanin deretter koblet til det voksende peptid til å virke  
 som en overgangsentitet mellom det ønskede peptid og den  
 store diketopiperazingruppe i det spaltede peptid. De  
 resterende aminosyrer i sekvensen ble så koblet til det  
 voksende peptid under anvendelse av de vanlige Fmoc-kjemi-  
 metoder ved peptidsyntese. Peptidene ble sidekjede-avbeskyt-  
 tet med trifluoreddiksyre:fenol:etanditiol (95:2,5:2,5  
 volum/vekt/volum) i seks timer ved romtemperatur. Nålene ble  
 så lufttørket i 15 minutter. De ble så ultralydbehandlet i  
 10 0,1 % HCl i metanol/vann (1:1) i 15 minutter og deretter  
 vasket i pH 3 citratfosfatbuffer i fem timer. Peptidene ble  
 avspaltet ved at de ble neddykket i pH 7, 0,1 M fosfatbuffer  
 (150  $\mu$ l pr. brønn) i 16 timer med forsiktig omrøring under en  
 nitrogenatmosfære ved romtemperatur.

15

Fig. 7 viser HPLC-analysen av peptidoppløsningen og viser at  
 testpeptidet, hvorav ett notorisk er vanskelig å syntetisere,  
 ble fremstilt med bedre enn 90 % renhet. Denne figur viser  
 også massespektrografiet av peptidoppløsningen og viser at  
 20 det ønskede peptid faktisk ble syntetisert. De spaltede  
 peptidoppløsninger fra hydrolysatet av en enkelt nål ble også  
 underkastet aminosyreanalyse og ga det typiske resultat vist  
 i tabell 2.

25

TABELL 2

Aminosyreanalyse av Ac-VQAAIDYING- $\beta$ -cyklo (KP)

| 30 | Aminosyre                   | Relativ<br>funnet | Molart forhold<br>ventet |
|----|-----------------------------|-------------------|--------------------------|
|    | Asparaginsyre (D)           | 1,62              | 2                        |
|    | Glutaminsyre (E)            | 0,78              | 1                        |
|    | Glycin (G)                  | 0,52              | 1                        |
| 35 | $\beta$ -alanin ( $\beta$ ) | 1,41              | 1                        |
|    | Alanin (A)                  | 2,08              | 2                        |
|    | Prolin (P)                  | 1,37              | 1                        |
|    | Tyrosin (Y)                 | 1,14              | 1                        |
|    | Valin (V)                   | 1,02              | 1                        |
| 40 | Isoleucin (I)               | 2,22              | 2                        |
|    | Lysin (K)                   | 0,83              | 1                        |

Dette eksempel illustrerer oppnåelse av det forventede peptid med utmerket renhet og viser også at reagenser som forenkler rutinesyntesen av mange forskjellige peptider lett kan fremstilles. Lignende resultater (med passende modifika-

5 sjoner av vektene av reagens for å ta hensyn til de forskjellige molekulvekter) er oppnådd ved å erstatte melkesyren med glykolsyre og p(hydroksymetyl)benzosyre ved tildannelse av den stabile esterlink.

#### 10 EKSEMPEL 5

Hvert overlappende deka-peptid som kunne fremstilles fra sekvensen av  $\beta$ -kjeden av humant choriongonadotrofin (hCG) ble syntetisert under anvendelse av serin som esterlink som beskrevet i eksempel 3. Sekvensen av hCG er:

15           1 SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT  
          41 MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV  
          81 SYAVALSCQC ALCRRSTTDC GGPKDHPLTC DDPRFQDSSS  
         121 SKAPPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQ

20 80 ml konsentrert tetanustoksoid (1190 Lf/ml og proteinkon-  
sentrasjon 8,74 mg/ml) ble dialysert mot pH 6,66 0,1 M  
fosfatbuffer. 222 mg 6-maleimido kapronsyre-N-hydroksy-  
succinimidester (MCS) ble oppløst i 6 ml dimetylformamid  
(DMF). Til den dialyserte tetanustoksoidoppløsning ble med

25 kontinuerlig omrøring ved romtemperatur tilsatt 1,5 ml av  
MCS-oppløsning. 15 minutter senere ble ytterligere 1,5 ml av  
denne oppløsning tilsatt. 15 minutter senere ble igjen den  
resterende MCS-oppløsning tilsatt. Omrøring fortsatte i  
ytterligere en time. Den resulterende oppløsning ble så

30 dialysert over natten mot pH 7,2, 0,1 M fosfatbuffer hvortil  
det var blitt tilsatt natriumetylendiamintetraeddiksyre  
(EDTA) til en sluttkonsentrasjon på 10 mM. Denne resul-  
terende oppløsning ble fortynnet til 47 % av sin opprinnelige  
styrke med pH 7,2, 0,1 M fosfatbuffer til å gi en slutt-

35 konsentrasjon av MCS-grupper på 1,083  $\mu$ mol/ml. Peptider ble  
avspaltet fra nålene med 150  $\mu$ l/nål av denne oppløsning og  
direkte koblet til MCS-aktivert tetanustoksoid.

Mus ble så vaksinert med peptid/tetanustoksoidpreparatene. Peptidpreparatene ble emulgert i fullstendig Freund's adjuvans og ble hvert injisert intraperitonealt i par av mus. En boosterdose av angjeldende peptidpreparat i ufullstendig  
5 Freund's adjuvans ble gitt 17 døgn senere. Blodprøver ble tatt 21 døgn etter den andre inokulasjon.

Fig. 8 viser resultatet ved testing av blodprøven mot peptidet hvormed musene var vaksinert. Sera ble fortynnet  
10 1/100.000 for testing. Således er prøve 30 en sammenslåing av sera fra de to mus som var blitt vaksinert med peptidet NTTICAGYCP koblet til tetanustoksoidet, og ble funnet å reagere svært sterkt med peptidet NTTICAGYCP.

15 Dette illustrerer at oppfinnelsen muliggjør bestemmelse av regioner av en sekvens som blir potensielle kandidater for en syntetisk peptidvaksine.

#### **EKSEMPEL 6**

20 Dette eksempel illustrerer at oppfinnelsen muliggjør oppnåelse av spaltbare peptider uten behov for å ha diketopiperazingruppen ved karboksyenden av peptidet.

Fmoc- $\beta$  Ala-Glyc-OH:DHCA ble fremstilt under anvendelse av  
25 metoden beskrevet i eksempel 4 med unntagelse av at glykolsyre erstattet melkesyre og Fmoc- $\beta$ -alanin erstattet Fmoc-prolin. Vekter ble innstilt til å ta hensyn til de forskjellige molekylvekter. Denne forbindelse ble koblet til nålene som beskrevet i eksempel 4. Peptidet PGPSDTPILP ble  
30 syntetisert på nålen og dets sidekjeder avbeskyttet som beskrevet tidligere. Peptidet ble avspaltet fra nålen med 150  $\mu$ l 0,3 % NaOH-oppløsning i to og en halv time ved romtemperatur. Etter avspaltingen ble oppløsningen nøytralisert med HCl. Fig. 9a er HPLC-analysen av denne  
35 oppløsning og viser at peptidet ble syntetisert med utmerket renhet.

På en lignende måte ble kromoforen DNP og  $\beta$ -alanin koblet til Fmoc-Pro-Lac-nåler fremstilt som beskrevet i eksempel 4.

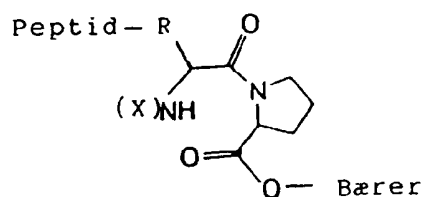
Avspalting fra nålen foregikk ved reaksjon med 150  $\mu$ l av en 50:50 blanding av mettet metylamin i etanol og vann ved romtemperatur i to og en halv time til å gi DNP- $\beta$  Ala-Pro-NH-CH<sub>3</sub>. Oppløsningen ble inndampet til tørrhet for å fjerne  
 5 overskudd av metylamin. Fig. 9b er HPLC-analysen av spaltingsproduktet og viser på nytt at det har utmerket renhet.

# PATENTKRAV

10

1. Immobilisert peptid-faststoffbærerpreparat,  
 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en  
 forbindelse med den generelle formel:

15



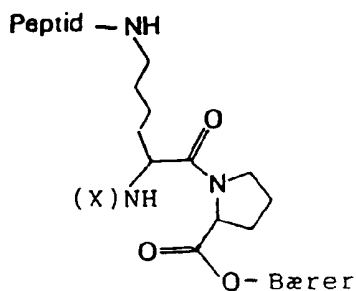
20

hvor X er en beskyttelsesgruppe og R er en aminosyre-  
 sidekjede som har en funksjonell gruppe.

25

2. Immobilisert peptid-faststoffbærerpreparat som angitt i  
 krav 1,  
 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en  
 forbindelse med den generelle formel:

30



35

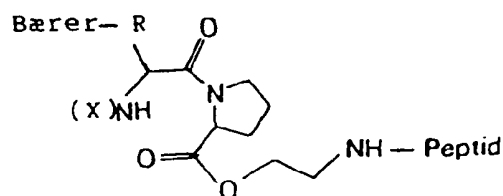
3. Preparat som angitt i krav 1 eller 2,  
 k a r a k t e r i s e r t v e d at prolinresten er  
 knyttet til nevnte faststoffbærer ved en esterlink.

4. Preparat som angitt i krav 3,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte esterlink er  
dannet fra N-acetylserin, glykolsyre, melkesyre eller p-  
hydroksymetylbenzosyre.

5

5. Immomibilisert peptid-faststoffbærerpreparat,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en  
forbindelse med den generelle formel:

10



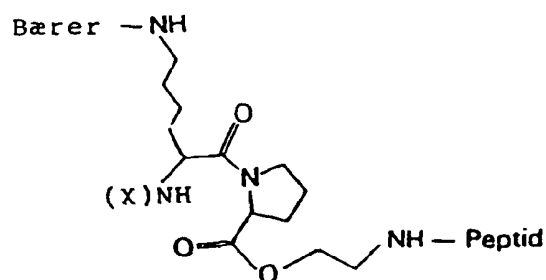
15

hvor X er en beskyttelsesgruppe og R er en aminosyre-  
sidekjede som har en funksjonell gruppe.

6. Immomibilisert peptid-faststoffbærerpreparat som angitt i  
20 krav 5,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en  
forbindelse med den generelle formel:

25



30

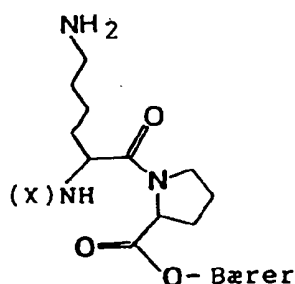
7. Preparat som angitt i ett eller flere av de foregående  
krav,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at tilknytningen til  
nevnte faststoffbærer ytterligere inkluderer linker- eller  
35 overgangsrester.

8. Preparat som angitt i krav 7,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte linker- eller  
overgangsrester er  $\beta$ -alanin- eller heksametylendiaminrester.

9. Preparat som angitt i ett eller flere av de foregående krav,  
karakterisert ved at X er en t-butyloksy-  
karbonyl-beskyttelsesgruppe.

10. Fremgangsmåte for fremstilling av et peptid,  
karakterisert ved at den omfatter trinnene  
med:

- (1) tilveiebringelse av en bærer med formel:

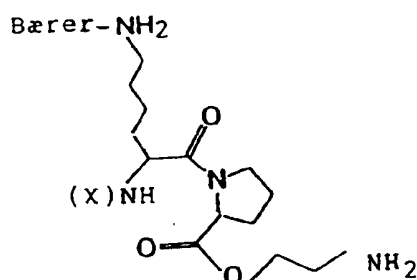


hvor X er en beskyttelsesgruppe,

- (2) syntetisering av et peptid knyttet til  $\epsilon$ -aminogruppen  
av lysin  
(3) fjerning av X for å tilveiebringe en avbeskyttet  $\alpha$ -  
aminogruppe av lysin og  
(4) behandling av nevnte avbeskyttede  $\alpha$ -aminogruppe med en  
mild base.

11. Fremgangsmåte for fremstilling av et peptid,  
karakterisert ved at det omfatter trinnene  
med:

- (1) tilveiebringelse av en bærer med formelen:



hvor X er en beskyttelsesgruppe,

- (2) syntetisering av et peptid knyttet til den fri aminogruppen
- (3) fjerning av X for å tilveiebringe en avbeskyttet  $\alpha$ -aminogruppe av lysin og
- 5 (4) behandling av nevnte avbeskyttede  $\alpha$ -aminogruppe med en mild base.

12. Fremgangsmåte som angitt i krav 10,  
karakterisert ved at prolinresten knyttes  
10 til nevnte faststoffbærer ved en esterlink.

13. Fremgangsmåte som angitt i krav 12,  
karakterisert ved at nevnte esterlink dannes  
fra N-acetylserin, glykolsyre, melkesyre eller p-hydrokso-  
15 metylbenzosyre.

14. Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av kravene  
10 - 13,  
karakterisert ved at lysin- eller prolin-  
20 resten knyttes til bæreren via linker- eller overgangsrester.

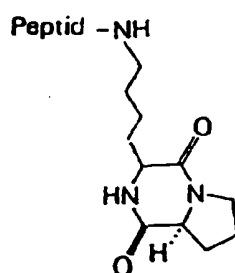
15. Fremgangsmåte som angitt i krav 14,  
karakterisert ved at nevnte linker- eller  
overgangsrester er  $\beta$ -alanin- eller heksametylendiaminrester.

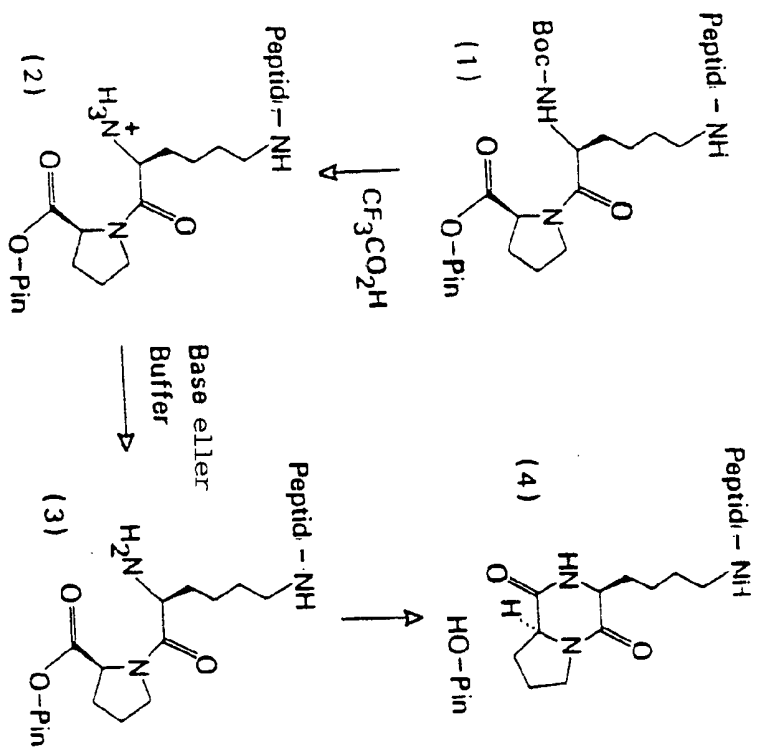
25

16. Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av kravene  
10 - 15,  
karakterisert ved at X er en t-butyloksykar-  
bonyl-beskyttelsesgruppe.

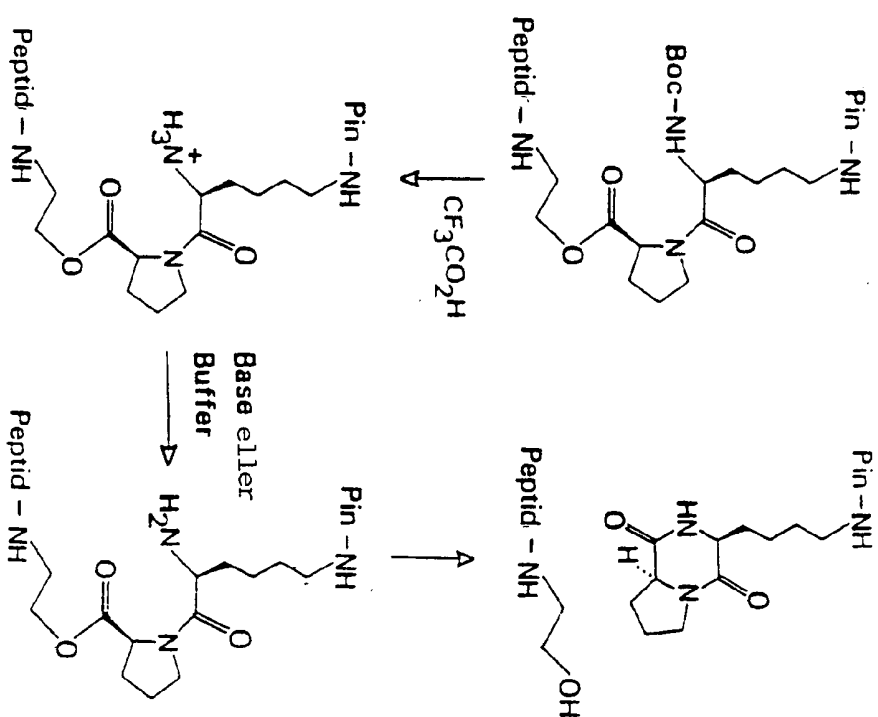
30

17. Fremgangsmåte som angitt i krav 10,  
karakterisert ved at peptidet har formel:





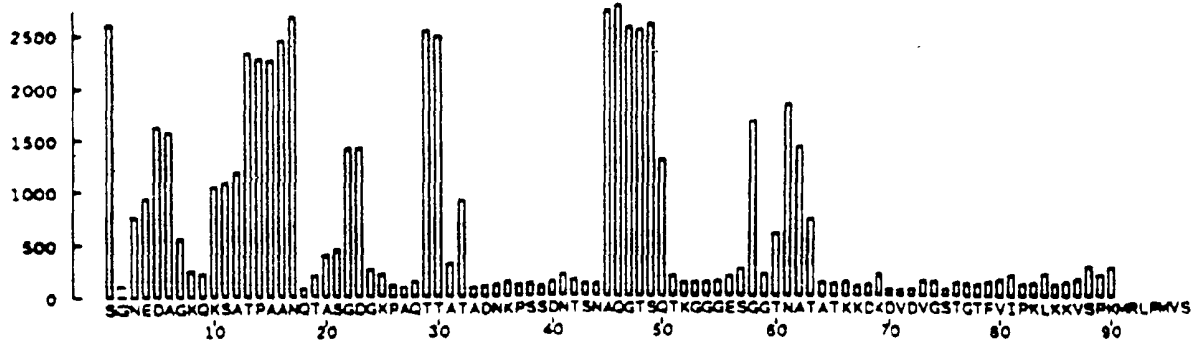
FIGUR 1a



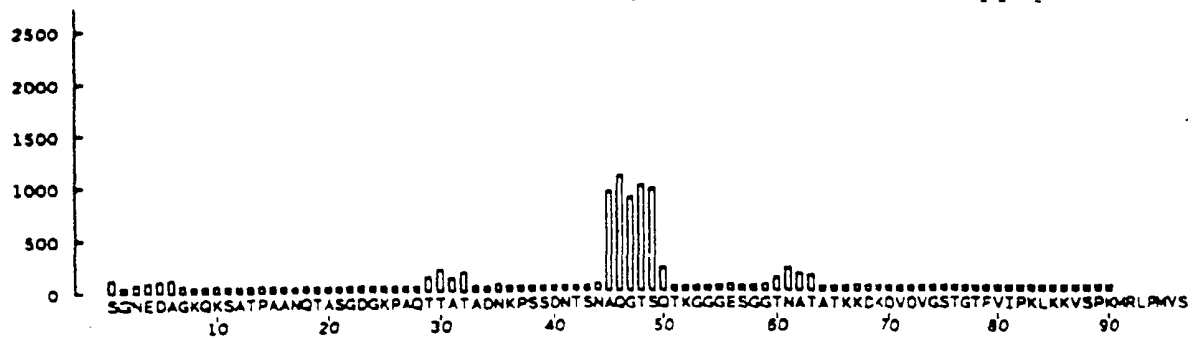
FIGUR 1b

301279

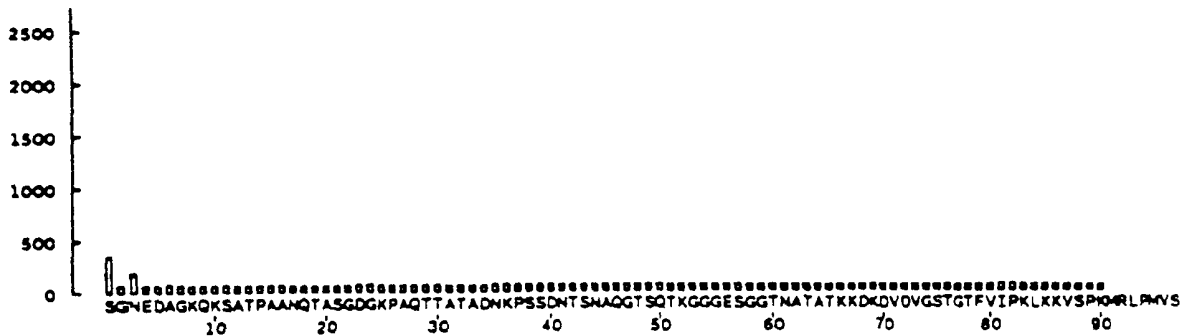
2a Reaksjon med anti-Johnson gressmosaikk virusserum



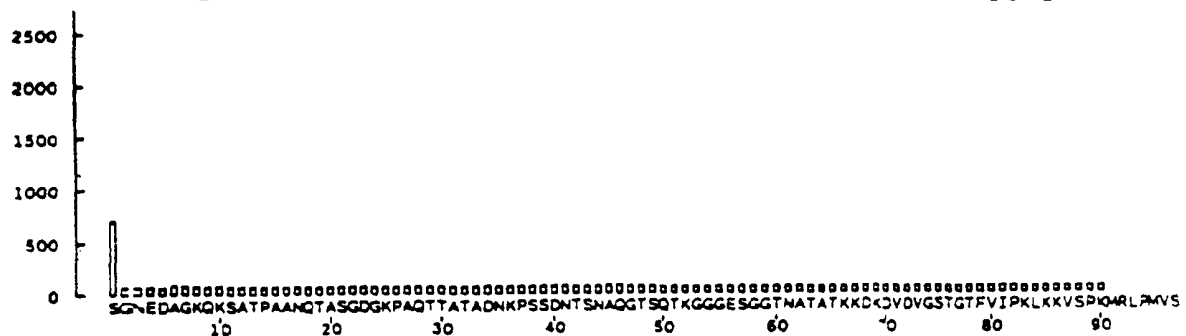
2b Reaksjon med Johnson gressmosaikkvirus kappeprotein



2c Reaksjon med soyabønnemosaikkvirus - N-kappeprotein



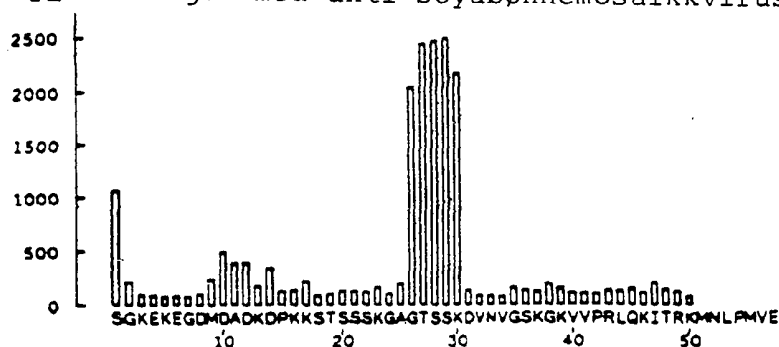
2d Reaksjon med vannmelom mosaikkvirus II kappeprotein



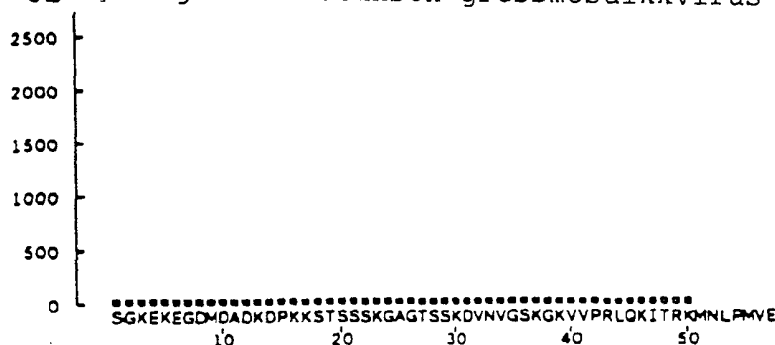
FIGUR 2

301279

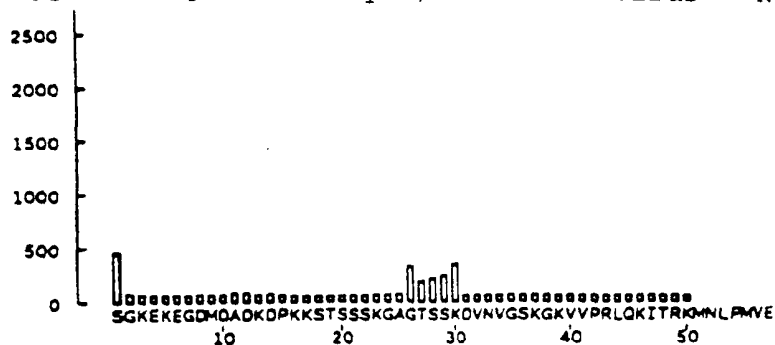
3a Reaksjon med anti-soyabønnemosaikkvirus - N serum



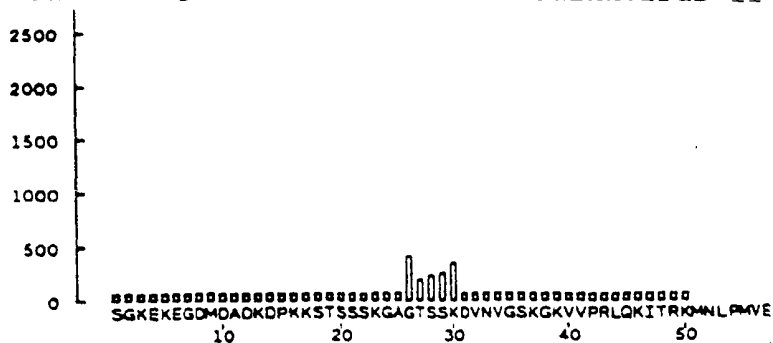
3b Reaksjon med Johnson gressmosaikkvirus kappeprotein



3c Reaksjon med soyabønnemosaikkvirus - N kappeprotein



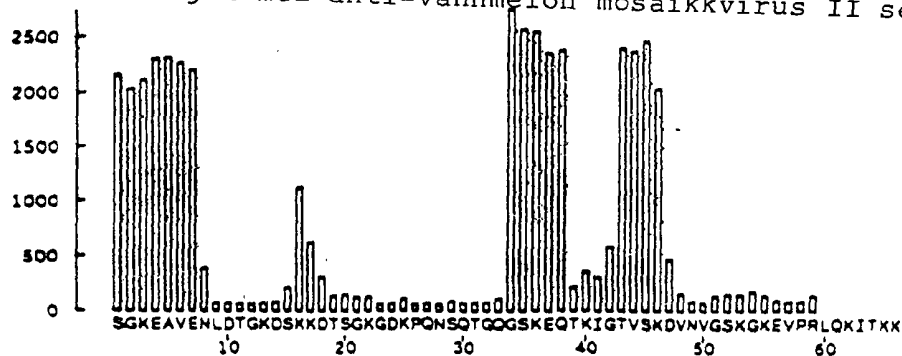
3d Reaksjon med vannmelon mosaikkvirus II kappeprotein



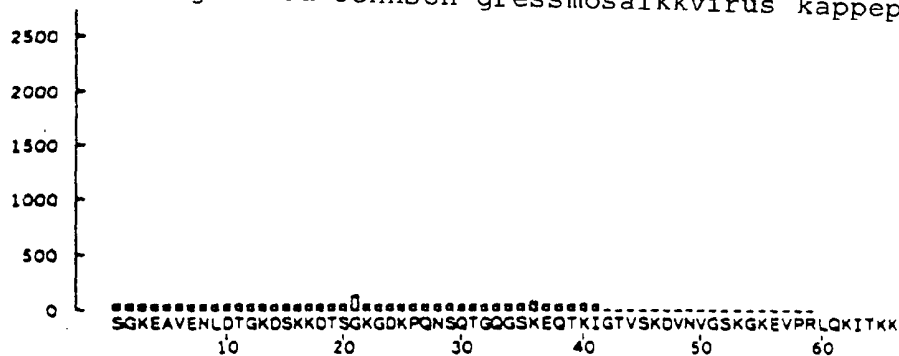
FIGUR 3

301279

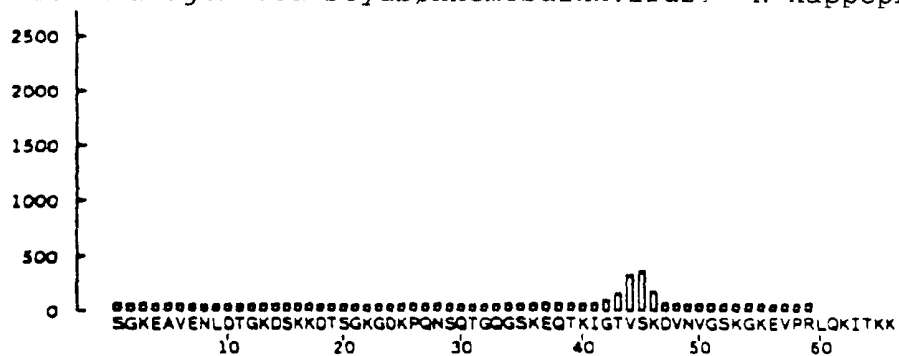
## 4a Reaksjon med anti-vannmelon mosaikkvirus II serum



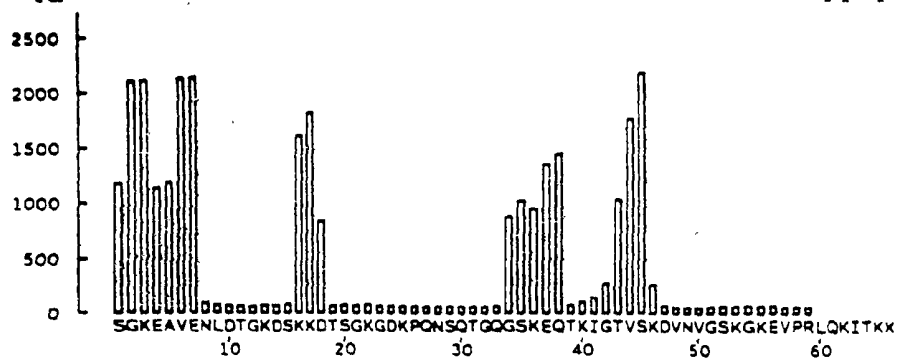
## 4b Reaksjon med Johnson gressmosaikkvirus kappeprotein



## 4c Reaksjon med soyabønnemosaikvirus - N kappeprotein



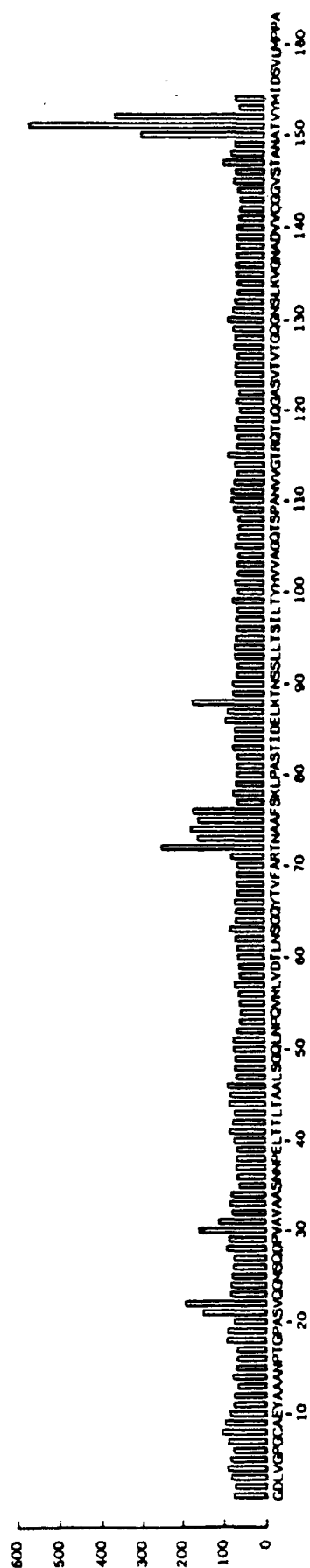
## 4d Reaksjon med vannmelon mosaikkvirus II kappeprotein



FIGUR 4

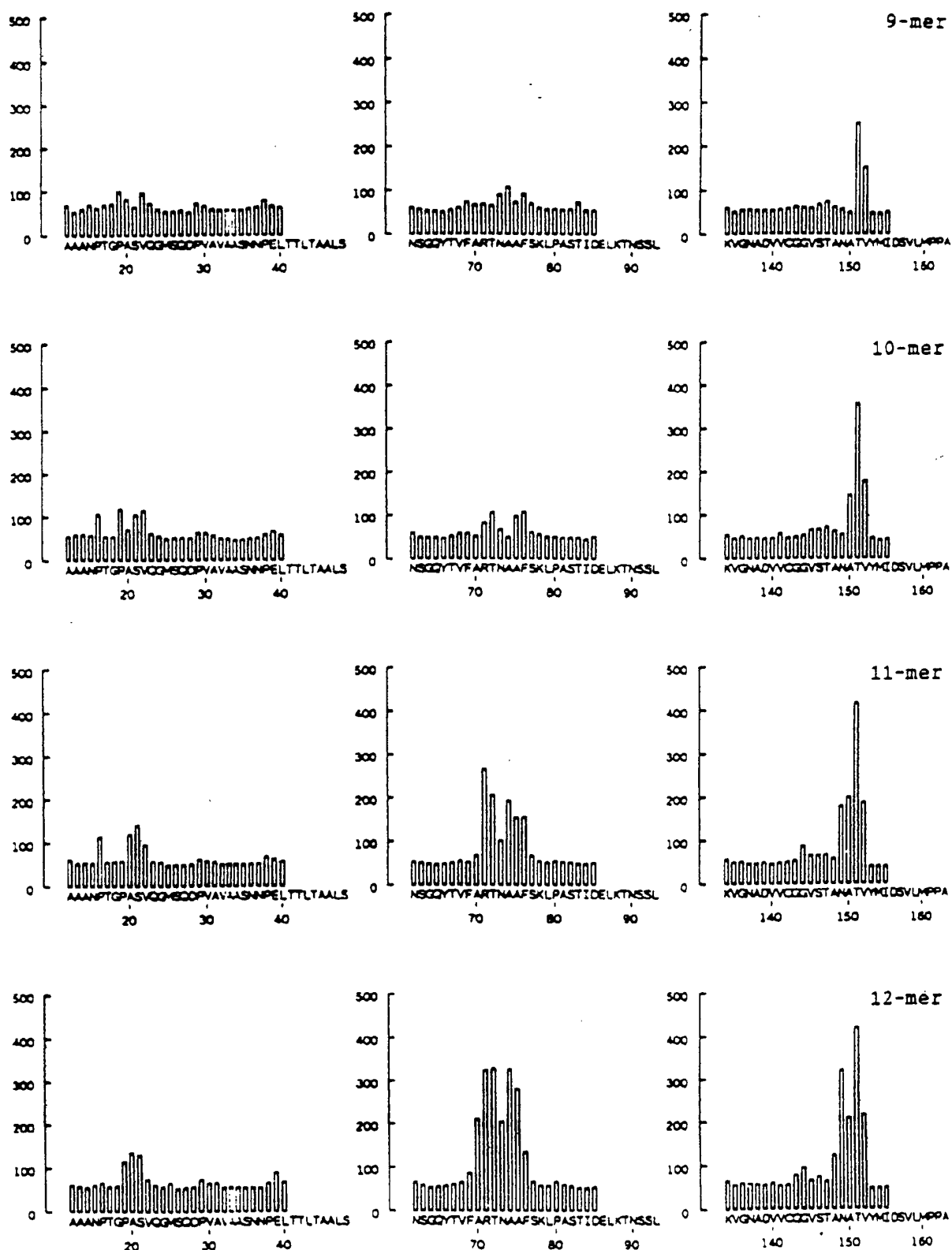
FIGUR 5

301279

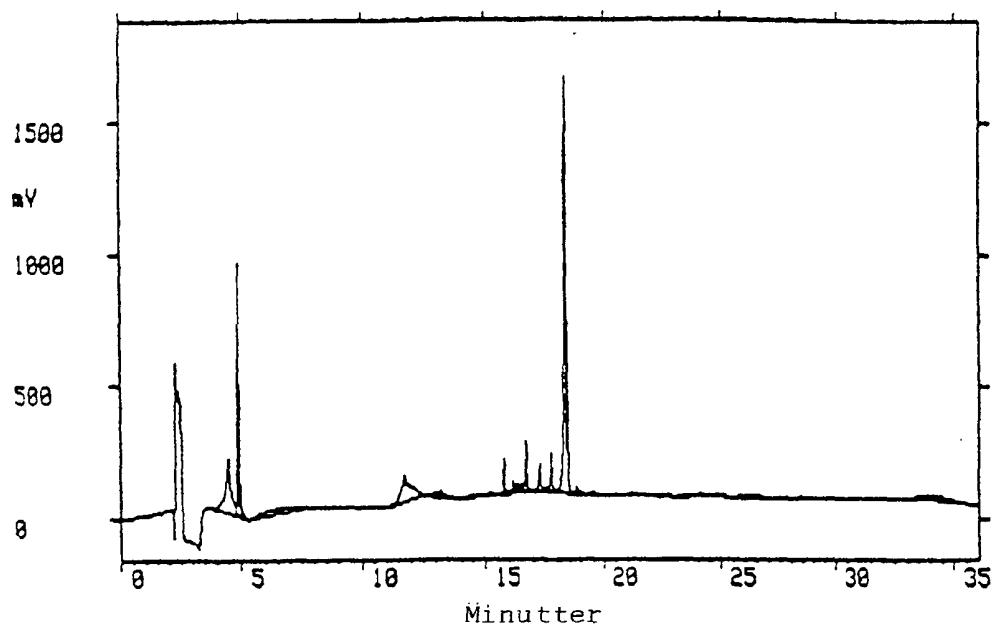


FIGUR 6

301279

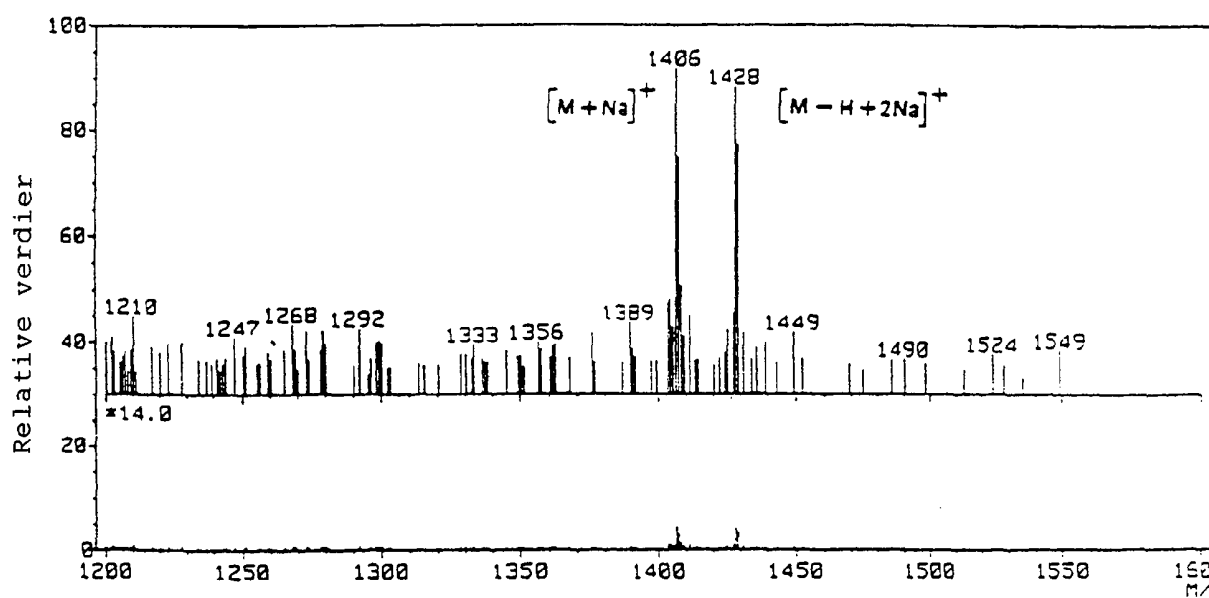


301279



FIGUR 7a HPLC analyse

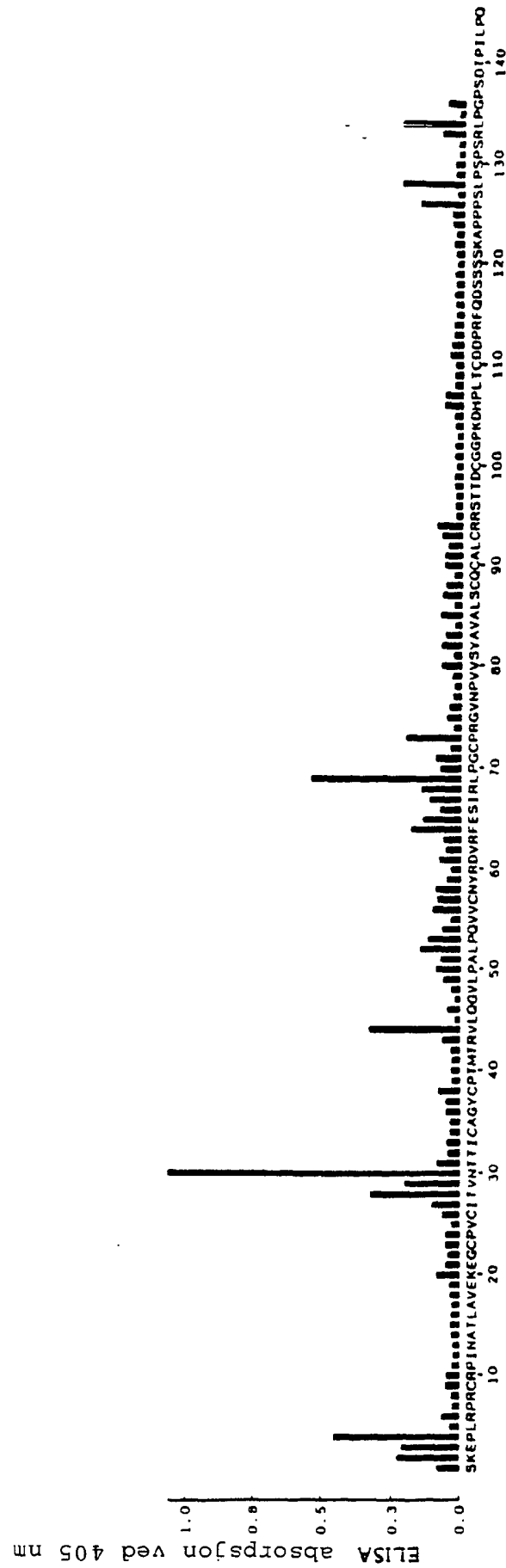
Ac-VQAAIDYING-B-cyklo (KP)



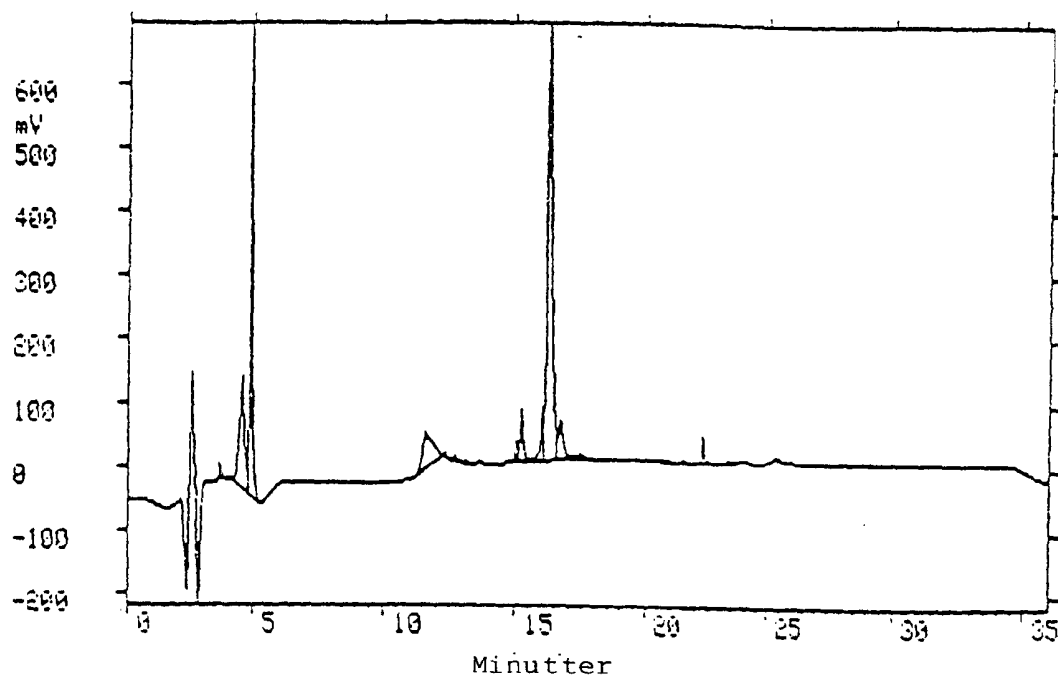
FIGUR 7b Massespektrum

FIGUR 8

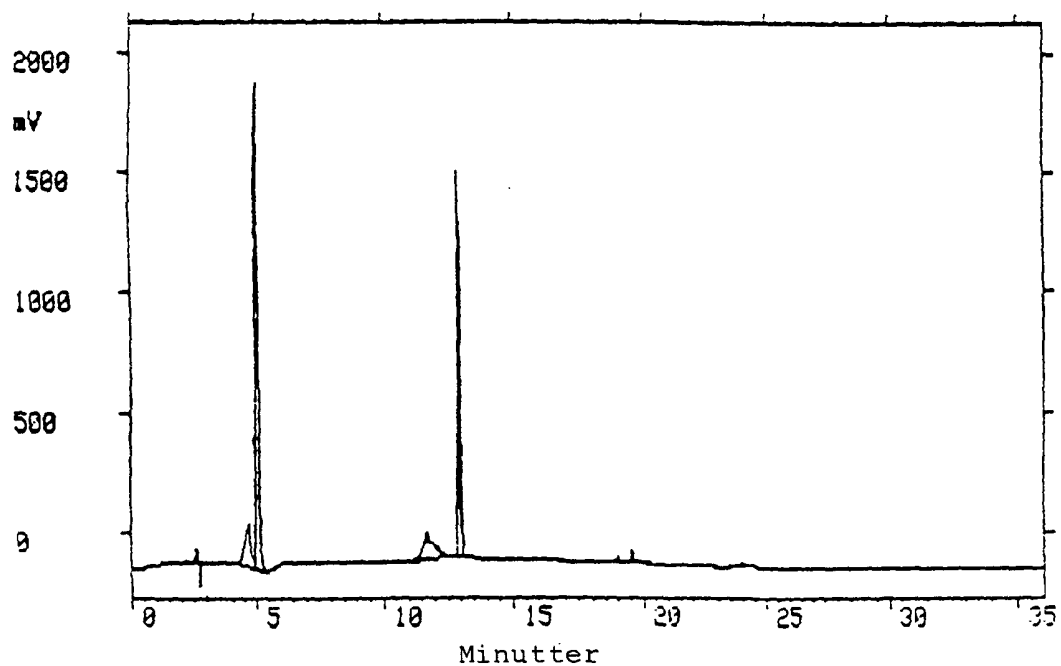
301279



301279



FIGUR 9a HPLC analyse av basespalting



FIGUR 9b HPLC av metylaminspalting