

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C07K 1/04, C07H 21/00 B01J 19/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/04366 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. März 1992 (19.03.92)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP91/01529 (22) Internationales Anmeldedatum: 12. August 1991 (12.08.91) (30) Prioritätsdaten: P 40 27 675.9 31. August 1990 (31.08.90) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : FRANK, Ronald [DE/DE]; GÜLER, Sinan [TR/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). (74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw. ; Bereiteranger 15, D-8000 München 90 (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AT, AT (europäisches Patent), AU, BB, BE (europäisches Patent), BF (OAPI Patent), BG, BJ (OAPI Patent), BR, CA, CF (OAPI Patent), CG (OAPI Patent), CH, CH (europäisches Patent), CI (OAPI Patent), CM (OAPI Patent), DE, DE (europäisches Patent), DK, DK (europäisches Patent), ES, ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GA (OAPI Patent), GB, GB (europäisches Patent), GN (OAPI Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, KP, KR, LK, LU, LU (europäisches Patent), MC, MG, ML (OAPI Patent), MR (OAPI Patent), MW, NL, NL (europäisches Patent), NO, RO, SD, SE, SE (europäisches Patent), SN (OAPI Patent), SU ⁺ , TD (OAPI Patent), TG (OAPI Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR THE RAPID SYNTHESIS OF SUBSTRATE-BOUND OR FREE PEPTIDES OR OLIGONUCLEOTIDES, FLAT MATERIAL SYNTHESIZED IN THIS WAY AND THE USE OF SUCH MATERIAL (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SCHNELLEN SYNTHESE VON TRÄGERGEBUNDENEN ODER FREIEN PEPTIDEN ODER OLIGONUCLEOTIDEN, DAMIT HERGESTELLTES FLACHMATERIAL, DESSEN VERWENDUNG SOWIE VORRICHTUNG ZUR DURCHFÜHRUNG DES VERFAHRENS (57) Abstract The invention concerns a method for the rapid synthesis of substrate-bound or free peptides, apparatus for carrying out the method, a flat material with peptides prepared by the method bound to it, and a use of this material. (57) Zusammenfassung Die Erfindung richtet sich auf ein Verfahren zur schnellen Synthese von trägergebundenen oder freien Peptiden, eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens, ein Flachmaterial mit daran gebundenen, nach dem Verfahren hergestellten Peptiden und auf eine Verwendung des Flachmaterials.		

+ BESTIMMUNGEN DER "SU"

Die Bestimmung der "SU" hat Wirkung in der Russischen Föderation. Es ist noch nicht bekannt, ob solche Bestimmungen in anderen Staaten der ehemaligen Sowjetunion Wirkung haben.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

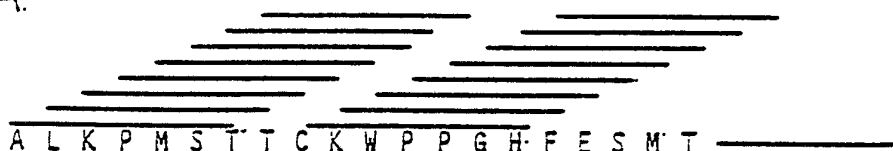
Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU ⁺	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

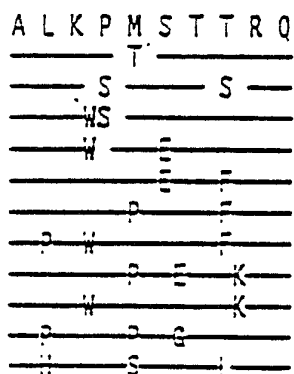
Verfahren zur schnellen Synthese von trägergebundenen oder freien Peptiden oder Oligonucleotiden, damit hergestelltes Flachmaterial, dessen Verwendung sowie Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens

Proteine spielen eine entscheidende Rolle in praktisch allen biologischen Prozessen wie enzymatische Katalyse, Transport und Speicherung, koordinierte Bewegung, mechanische Stützfunktion, Immunschutz, Nervenreizleitung und Kontrolle von Wachstum und Differenzierung. Proteine sind aufgebaut aus einer oder mehreren linearen Polypeptidketten. Ihre vielfältigen Funktionen bewirken sie durch dreidimensionale Faltung und Assoziation dieser Ketten. Faltung und 3D-Struktur ist determiniert durch die Aminosäureprimärsequenz der Ketten. Die Vielfalt an Proteinstrukturen in der Natur wird erzeugt durch Kombination von zwanzig Aminosäurebausteinen. Kurze Partialsequenzen (Oligopeptide) können zum gewissen Teil die lokale Struktur und Funktion einer Sequenz im Gesamtproteinverband imitieren. Oligopeptide wiederum können durch chemische Synthesen hergestellt werden. Synthetische Oligopeptide sind somit ein wichtiges Hilfsmittel bei der Struktur-funktionsanalyse von Proteinen.

A.



B



- 2 -

Aufgrund der Größe und Komplexität der Proteine werden für systematische Studien sehr viele Peptide gebraucht.

- A) Lokalisierung einer funktionellen Region innerhalb einer längeren Proteinkette durch überlappende Peptide (vgl. M. Z. Atassi, Eur. J. Biol. 145, 1-20 (1984); H. M. Geysen, R. H. Meloen und S. J. Barteling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3998 (1984)).
- B) Entschlüsselung der für die Funktion essentieller Aminosäurereste durch Substitutionsanalyse (vgl. R. A. Houghton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5131 (1985); H. M. Geysen, R. H. Meloen, und S. J. Barteling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3998 (1984)).

Biologische Testreaktionen wie enzymatische Umsetzung und Antikörperbindung sind sehr sensitiv, so daß nur geringe Mengen (ng bis µg) Peptidsubstrate ausreichen. Für eine schnelle, einfache Durchführung solcher Tests ist es vorteilhaft, daß das Peptidsubstrat an einem festen Trägermaterial immobilisiert ist und leicht aus der Reaktionslösung entfernt werden kann. Die Reaktion mit dem Peptid kann dann entweder in der verbleibenden Reaktionslösung oder durch nachfolgende Analyse des trägergebundenen Materials quantitativ vermessen werden.

Der Umfang, mit dem solche systematischen Untersuchungen durchgeführt werden können, hängt im wesentlichen von der Schnelligkeit der Peptidsynthese und von der technischen/chemischen Konzeption des Trägers ab. Schnelle Peptidsynthesen können nach dem von Merrifield entwickelten Prinzip der schrittweisen Synthese an fester Phase durchgeführt werden (R. B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1963)).

Im folgenden wird ein Verfahren beschrieben, mit dem vorteilhaft sehr viele (mehrere Hundert) immobilisierte Oligopeptide pro Arbeitstag in einer für Testzwecke ausreichenden Menge und an ei-

- 3 -

nem geeigneten Träger- bzw. Flachmaterial hergestellt werden können.

Dazu wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur schnellen Synthese von trägergebundenen oder freien Peptiden vorgesehen, bei dem man von einem oder von mehreren funktionalisierten Trägern ausgeht und Schritt für Schritt entsprechend den vorgegebenen Aminosäuresequenzen die gewünschten Peptide nach einem geeigneten Syntheseverfahren synthetisiert, dadurch gekennzeichnet, daß man

- Flachmaterial als Träger verwendet
- zur Kopplung kleine Aliquots einer Lösung der gewünschten Aminosäure oder des gewünschten Di- oder Oligopeptids in Form ihrer aktivierten Derivate punkt- oder strichförmig auf den Flächenträger aufträgt,
- die Kopplungsreaktion in der sich durch Benetzung ausbildenden Reaktionsfläche durchführt und
- gegebenenfalls das fertige Peptid mit Hilfe einer geeigneten Abspaltungslösung vom Flächenträger abtrennt.

Gemäß einer speziellen Ausführungsform synthetisiert man mehrere bis sehr viele verschiedene Peptide auf einem Flachmaterial gleichzeitig nebeneinander auf einander nicht berührenden, punkt- oder strichförmigen Reaktionsflächen.

Gemäß einer weiteren speziellen Ausführungsform setzt man als Flachmaterial eine poröse oder nicht poröse Folie, Membran oder ein solches Papier ein, welche für die Kopplung von Aminosäuren oder Peptiden geeignete, chemisch reaktionsfähige Funktion aufweisen.

Als Trägermaterial wird ein mechanisch stabiles, gegenüber den eingesetzten Reagenzien und Lösungsmitteln chemisch inertes Flachmaterial eingesetzt. Dieses kann porös oder nicht porös und nach Belieben auf einer Unterlage aufgebracht oder selbsttragend sein. Einsetzbar sind z. B. Folien, Platten, Membranen, Papiere. Wesentlich ist, daß das Flachmaterial chemisch reaktionsfähige Gruppen (Funktionen) trägt, an die die C-terminalen Bausteine

- 4 -

für den Peptidaufbau (geeignet geschützte Aminosäuren, Di- oder Oligopeptide) kovalent verknüpft werden können.

Vorteilhafterweise ist das Trägermaterial, welches für die chemische Synthese eingesetzt wird, auch für den Einsatz in den biologischen Testreaktionen geeignet. Die hergestellten Peptide können so ohne Isolierung und nachfolgender Immobilisierung direkt eingesetzt werden, wenn die Verknüpfung zwischen Peptid und Trägermaterial so gewählt wurde, daß sie stabil gegen alle chemischen Reaktionen während der Peptidsynthese ist.

Wenn das Trägermaterial porös ist, steht auch dessen innere Oberfläche für die Synthese zur Verfügung. Waschoperationen können dann auch dadurch erfolgen, daß man Lösungen durch das Material durchsaugt. Nichtporöses Trägermaterial hat eine sehr viel geringere Oberfläche. Waschoperationen können durch einfaches Abspülen erfolgen.

Für die Peptidsynthese nach dem beanspruchten Verfahren eignen sich z. B. Flachmaterialien aus Cellulose (tragen Hydroxylfunktionen und können direkt eingesetzt werden), Glas oder Kunststoffen wie Polyethylen, Polypropylen und Teflon, and deren Oberfläche geeignete chemische Funktionen eingeführt wurden, z. B. durch Pfropfpolymerisation von Acrylsäure oder deren Derivaten. Die Funktionalisierung der Oberflächen kann ferner beispielsweise durch Einführung von Aminopropylgruppen, Glycin- oder Diglycinankergruppen erfolgen.

Die Größe der jeweiligen Reaktionsfläche hängt von dem auf dem Träger aufgetragenen Volumen, den absorbativen Eigenschaften des Trägermaterials und der Flüchtigkeit des Lösungsmittels ab. In Abhängigkeit vom gewählten Träger, beispielsweise der spezifischen Funktionalität eines Papierträgers, wird die jeweilige Größe des Flüssigkeitsvolumens selbstverständlich auch vom gewählten Maßstab der Peptidsynthese abhängen. Die Größe des jeweiligen Flüssigkeitsvolumens bestimmt auch den minimalen Abstand zwischen zwei Reaktionsflächen und damit mittelbar die An-

- 5 -

zahl von Reaktionsflächen, die auf einem vorgegebenen Träger vorgesehen werden können; vgl. beispielsweise **Tabelle 2**.

Je nach Ausführungsform und chemischer Vorbehandlung des Trägers kann die flächenspezifische Beladung mit reaktiven Funktionen in einem weiten Bereich variiert werden (z. B. 1 pmol bis 1 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$).

Spezielle Beispiele für einsetzbare Papier sind Whatman Chr1, Whatman 540 und Whatman 3MM. Whatman 540 ist Whatman Chr1 wegen seiner höheren mechanischen Stabilität vorzuziehen. Die Größe des Papierbogens als auch die Anordnung der Reaktionsflächen bzw. Flecken, bzw. Tüpfel kann frei gewählt werden. Immunologen werden das Format einer Mikrotiterplatte für 8x Tüpfel bevorzugen. In diesem Fall kann man eine Standardmikrotiterplatte wählen, bei der kleine Löcher in die Zentren der Vertiefungen eingebohrt sind und diese Standardmikrotiterplatten als Vorlage verwenden, um Papierbögen (8,5 x 12,5 cm) auszuschneiden und die Tüpfelpositionen mit einem Bleistift vorzeichnen.

Die Peptide werden dann schrittweise und entsprechend der vorbestimmten Sequenzen nach bekannten Festphasenpeptidsynthesemethoden (E. Wünsch et al. in Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, 4. Auflage, Band 15 (E. Müller, Herausgeber), Thieme, Stuttgart, 1974; G. Barany, R. B. Merrifield in The Peptides, Vol. 2 (E. Gross, U. Meienhofer, Eds; Academic Press, New York, 1970, p. 1) an den Oberflächenfunktionen aufgebaut. Vorzugsweise wird nach der Fmoc/tBu-Methode verfahren (C.-D. Chang, U. Meienhofer, Int. J. Peptide Protein Res. 11, 246 (1978); E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard, B. J. Williams, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 537 (1978). Neben den zwanzig essentiellen Aminosäuren können auch beliebige modifizierte und nicht natürliche Aminosäuren eingebaut werden.

Die für den chemischen Aufbau der Peptide notwendigen Aminosäurebausteine (geeignet geschützte und aktivierte Aminosäurederivate) werden als konzentrierte Lösungen (0.1 bis 0.3 M) in einem

geeigneten Lösungsmittel mit vorzugsweise hohem Siedepunkt und geringer Verdampfungsgeschwindigkeit (z. B. N-Methyl-pyrrolidion, Kp. 203 °C) in kleinen verschließbaren Gefäßen vorgegeben.

Die Verknüpfung von Aminosäuren zu Peptiden erfolgt schrittweise, beginnend mit dem C-terminalen Ende und gegebenenfalls parallel für viele Peptide durch zyklische Ausführung von jeweils den gleichen zwei Reaktionsschritten. Die Verknüpfung sei beispielsweise folgendermaßen erläutert:

- 1) Peptidbindungsbildung: Ein Aliquot (0.1 bis 10 µl) der aktivierten Aminosäurelösung wird auf einen vorbestimmten Punkt oder Strich auf dem Flächenträger aufgegeben. Durch Benetzung bildet sich eine durch das aufgetragene Volumen begrenzte Reaktionsfläche (Fleck) aus. Wenn parallel viele verschiedene Peptide auf einer entsprechend großen Trägerfläche synthetisiert werden sollen, werden die Auftragsorte in einem Abstand gesetzt, daß keine Überschneidung der Reaktionsflächen möglich wird. Reaktionszeit ist beispielsweise 5 bis 30 Minuten. Danach wird der Träger in einem geeigneten, verschließbaren Gefäß oder auf einer Filtriervorrichtung mehrfach beispielsweise mit Dimethylformamid (DMF) gewaschen. Die Auftragsorte können durch Markierung auf dem Träger festgelegt werden (z. B. Bleistiftmarkierungen auf Cellulosepapier). Mittels eines Farbindikators (z. B. Bromphenol Blau; V. Krchnak, J. Vagner, P. Safar, M. Lebl, Collect. Czech. Chem. Commun. 53,2542 (1988) können aber auch direkt die freien Aminofunktionen auf der Reaktionsfläche sichtbar gemacht werden, so daß eine andere Markierung nicht notwendig ist.
- 2) Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe: Der Träger wird dazu mit genügend Abspaltungslösung behandelt. Bei vorzugsweiser Durchführung der Fmoc/tBu-Methode wird die Fmoc-Schutzgruppe mit beispielsweise 20-proz. Piperidin in DMF abgespalten. Nach beispielsweise 2 bis 10 Minuten wird mehrfach mit DMF gewaschen. Gegebenenfalls wird dann mit einer Lösung des Farbindikators behandelt, bis die Reaktionsflächen sicht-

- 7 -

bar werden. Dann wird mehrfach beispielsweise mit Ethanol gewaschen und an der Luft (gegebenenfalls mit einem Fön von max. 40 °C getrocknet.

Sind alle Peptidsequenzen fertiggestellt, werden vorzugsweise die N-terminalen Aminogruppen beispielsweise durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid blockiert. Dazu kann der Träger mit Acetylierungslösung (z. B. 5-proz. Essigsäureanhydrid und 5-proz. Diisopropylethylamin in DMF) behandelt und danach mehrfach mit DMF und Ethanol gewaschen werden.

Danach können die Schutzgruppen an den Aminosäureseitenketten durch geeignete Säurebehandlung (entsprechend der gewählten Synthesemethode) abgespalten werden. Dazu wird der Träger mit Abspaltungslösung behandelt. Gemäß einer speziellen Ausführungsform unter Verwendung der Fmoc/tBu-Methode (siehe die folgende Liste der verwendeten Aminosäurederivate) wird z. B. für 10 Minuten mit 50-proz. Trifluoressigsäure (TFA), 5-proz. Anisol und 1-proz. Thioanisol in Dichlormethan behandelt. Danach wird der Träger mehrfach mit Dichlormethan, dann DMF und dann Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Abspaltung der Schutzgruppen kann auch durch Behandeln mit 50-proz. TFA und 2-proz. Triisobutylsilan in DCM im Verlauf von etwa 60 min. erfolgen, wonach man beispielsweise mit DCM, DMF und Ethanol wäscht.

Die Peptide sind jetzt als immobilisierte Substrate für den biologischen Einsatz fertiggestellt. Hierzu kann der Träger mit den daran kovalent gebundenen Peptiden als Ganzes z. B. mit einer Testreaktionslösung behandelt werden, oder die einzelnen Reaktionsflächen können durch Zerschneiden des Blattes getrennt und individuell behandelt werden.

Der einfachste Weg, Peptide auf die beschriebene Weise an Trägern aufzubauen ist der, die entsprechenden C-terminalen Aminosäurebausteine direkt mit den reaktiven Funktionen auf der Trägeroberfläche über stabile Amid- oder Esterbindungen zu verknüpfen. Gemäß spezielleren Ausführungsformen kann zunächst ein

- 8 -

sog. bifunktionelles Linkerreagenz (vgl. E. Atherton et al. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 538-546 (1981)) an die Trägerfunktionen geknüpft werden. Das wiederum daran aufgebaute Peptid kann dann entsprechend der chemischen Natur der Peptid-Linker-Bindung z. B. unter geeigneten Reaktionsbedingungen mit C-terminaler Carboxyl- oder Carboxamidgruppe abgespalten werden und in löslicher Form für Testzwecke eingesetzt werden (labiler Linker!). Das Linkerreagenz kann aber auch als ein Abstandshalter (Spacer) eingesetzt werden, um die Zugänglichkeit des Peptids für große Reaktionspartner wie Antikörper oder Enzyme zu erhöhen (stabiler Linker!).

Bei der Verwendung von Papierträgern kann man zweistufig vorgehen.

Erste Stufe (A): Es wird eine gleichmäßige Verteilung von reaktiveren Aminofunktionen vorgesehen. Dazu werden üblicherweise die Hydroxylgruppen der Cellulose mit einem N-Fmoc-geschützten Aminosäurederivat verestert und anschließend durch Behandlung mit 20-proz. Piperidinlösung in DMF die Aminogruppen freigesetzt.

Zweite Stufe (B): Es wird eine weitere N-Fmoc-Aminosäure an die eingeführten Aminofunktionen punkt- oder strichförmig angehängt. Danach werden alle restlichen Aminofunktionen durch Acetylierung blockiert und Fmoc abgespalten.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde auch Fmoc-Glycin für beide Derivatisierungsstufen verwendet. Jedoch wurden nicht unbeträchtliche Mengen des Gly-Gly-Anker bei der Fmoc-Entschützung und bei längerer Lagerung verloren, vermutlich in Folge einer Diketopiperazinbildung. Ferner scheint das Gly-Gly-Ende der Peptide die Antikörperbindung zu stören, auch scheinen einige Sera unspezifisch an Ac-Gly-Gly zu binden. Fmoc- β -Ala ist die bessere Wahl. β -Alanin ist eine unübliche Aminosäure, die in natürlichen Proteinen nicht vorliegt, wobei der β -Ala- β -Ala-Anker keiner Diketopiperazinbildung unterliegt und der Abstandshalter ver-

größert wird. Getrocknete Flachmaterialien, die mit Flecken von β -Ala- β -Ala derivatisiert und mit BPB angefärbt worden waren, zeigten nach mehrmonatiger Lagerung bei -20°C keinen Verlust an Aminosäurefunktionen. Für längere Lagerungen bei Temperaturen bis zu 30°C ist ein Fmoc-geschützter Anker noch stabiler. Zur Erläuterung sei auf **Figur 6** verwiesen. Diese Figur zeigt eine typische Anordnung von Flecken auf einem Papierblatt (β Ala- β -Ala-Anker mit BPB angefärbt). Das Format war dabei einer für 96 Flecken vorgesehenen Mikrotiterplatte angepaßt.

Das vorgestellte Verfahren weist gegenüber dem Stand der Technik (Geysen et al. 1984; Frank und Krause, Deutsche Patentanmeldung P 39 35 572.1) folgende Vorteile auf:

- äußerst einfache Handhabung; für die chemischen Kopplungen der Aminosäurederivate zu Peptiden müssen nur kleine Volumina der aktivierten Aminosäurelösungen auf den Flächenträger aufgetüpfelt werden;
- noch kleinere Reaktionsvolumina sind möglich, z. B. 0.1 bis 1 μl , wodurch ein noch sparsamerer Verbrauch an den teuren Aminosäurederivaten erzielt wird;
- die Träger wie Cellulose- oder Glasfaserpapiere sind leicht zugänglich oder im Handel zu beziehen;
- der Synthesemaßstab einzelner Peptide kann wegen der variablen flächenspezifischen Beladung mit reaktiven Funktionen innerhalb eines weiten Bereichs gewählt werden;
- die Pipettierschritte (insbesondere bei automatischer Durchführung) können extrem schnell ausgeführt werden, so daß noch mehr Peptide pro Zeiteinheit hergestellt werden können.

Das vorstehend beschriebene Verfahren kann in entsprechender Weise auch zur schnellen Synthese von trägergebundenen oder freien Oligonucleotiden herangezogen werden. Zum Chemismus und

- 10 -

zur Abwicklung von Oligonucleotidsynthesen kann beispielsweise auf das europäische Patent 84 100 059.9 verwiesen werden.

Das vorliegend beschriebene Verfahren kann auch automatisiert werden. Hierzu können für das Aliquotieren und Auftüpfeln der aktivierten Aminosäurelösungen bzw. Nucleotidlösungen sowie das Aufgeben der anderen Wasch- und Reaktionslösungen Pipettierautomaten eingesetzt werden. Der Flächenträger muß dann auf einer geeigneten Wasch- oder Filtriervorrichtung montiert werden.

Im Handel erhältliche x/y-programmierbare TLC-Spotter oder Pipetten-Arbeitsstationen sind geeignete Vorrichtungen zur automatischen Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Volumina bis herab zu 10 nl können präzise an jeder gewünschten Stelle aufgetragen werden, wobei mehrere tausend Peptide auf einem gut handhabbaren Flachmaterialträger synthetisiert werden können. Damit liegt man 2 Größenordnungen unter der litographischen Technik von Fodor et al., Science, 251, 767-773 (1991). Selbst in den kleinsten Flüssigkeitsmengen (etwa 10 nl) wird jedes Peptid in nmol-Mengen gebildet, die zur Isolation und erschöpfenden Charakterisierung ausreichen.

Ausführungsbeispiel 1:

Analyse eines immunogenen Teilabschnittes (CMV26) des 36/40K-Proteins vom Cytomegalie-Virus. **Figur 1:** Aminosäureprimärsequenz des klonierten, immunogenen Teilabschnittes CMV26. Davon abgeleitet wurden überlappende, um jeweils eine Aminosäure verschobene Dekapeptidsequenzen. **Figuren 2 A - C:** Liste aller zu synthetisierenden Dekapeptide mit der zugeordneten Nummerierung und Vorschrift für die simultane, parallele Durchführung der Aminosäurekopplungen.

Flächenförmiger Träger: Ein 5,5 x 10,5 cm großes Blatt Cellulosepapier (Chr1 oder 540, Whatman, England) wurde ausgeschnitten. Danach wurden 50 Punkte im Abstand von 1 cm mit Bleistift darauf

- 11 -

markiert. Das Blatt wurde in ein zylinderförmiges, mit Schliffstopfen verschließbares Glasgefäß gegeben und mit 1 ml einer Lösung von

0,2 M Fmoc-Glycin
0,3 M Hydroxybenzotriazol (HOBt)
0,24 M Diisopropylcarbodiimid (DIC)
0,2 M N-Methylimidazol (MeIm)
in DMF

für 3 Stunden bei Raumtemperatur behandelt, anschließend dreimal mit je 10 ml DMF gewaschen, dann für 10 Minuten mit 20-proz. Piperidin in DMF behandelt (Abspaltung der Fmoc-Gruppe), danach dreimal mit je 10 ml DMF und zweimal mit je 10 ml Ethanol (abs) gewaschen und mit einem Fön getrocknet. Die quantitative Bestimmung der so an die Hydroxylgruppen des Cellulosepapiers veresterten Menge an Glyc : (freie Aminogruppen) ergab 0.2 bis 0.3 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$.

Das Blatt wurde in eine flache Schale aus Glas oder Polyethylen gelegt. Dann wurden je Aliquots (1 μl) einer Lösung von 0.3 M Fmoc-Glycin, 0,45 M HOBt, 0.36 M DICD in N-Methyl-pyrrolidinon (MPD) auf die vormarkierten Punkte des Papiers aufgetragen und die Schale mit einer Glasscheibe zugedeckt. Nach 20 Minuten wurde das Blatt in den Glaszylinder gegeben und dreimal mit je 10 ml DMF gewaschen. Dann wurden alle noch auf dem Papier vorhandenen freien Aminogruppen der ersten Glycinkopplung durch Acetylierung blockiert. Dazu wurde für 10 Minuten mit 3 ml 5-proz. Essigsäureanhydrid und 5-proz. Diisopropylethylamin in DMF behandelt. Anschließend wurde dreimal mit je 10 ml DMF gewaschen, dann mit 20-proz. Piperidin in DMF behandelt und wieder dreimal mit DMF gewaschen. Danach wurden 3 ml 0.3-proz. Bromphenol Blau (BPB) in DMF zugegeben, wodurch die Reaktionsflächen der 2. Glycinkopplung blau anfärben. Es wurde dann zweimal mit je 10 ml Ethanol gewaschen und getrocknet.

- 12 -

Der so vorbehandelte Celluloseflächenträger bietet an den markierten Reaktionsflächen Diglycinankergruppen mit freien primären Aminofunktionen für den Aufbau von Peptiden an. Die 49 in **Figur 2A** aufgeführten Dekapeptide wurden fortlaufend nummeriert und an den entsprechend nummerierten Reaktionsflächen wie voranstehend beschrieben simultan-parallel synthetisiert. Die Verteilung der aktivierten Aminosäurelösungen wurde anhand der in **Figur 2B** und **2C** gezeigten Liste ausgeführt.

Synthesemethode: Fmoc/tBu-Methode

Verwendete Aminosäurederivate:

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

Alle Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten (-) mit Ausnahme von (Butthio) an Cys können mit 20- bis 50-proz. TFA in Dichlormethan abgespalten werden. Die Butthio-Gruppe kann dann an-

schließlich mit z. B. Dithiothreitol (DTT) oder Dithioerythritol (DTE) entfernt werden.

Die Aktivierung der Aminosäurederivate kann nach Standardmethoden erfolgen, z. B. durch 1,5-fachen Überschuß von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 1,2-fachen Überschuß an Diisopropylcarbodiimid (DIC) in N-Methylpyrrolidinon für eine Stunde. Andere Aktivierungsmethoden beispielsweise mit symmetrischen Anhydriden, Pentafluorphenolester oder BOP sind ebenso möglich. Entsprechend dem vorausberechneten Verbrauch wurden 0.2 bis 1 ml Lösungen angesetzt. Es wurden Aliquots von 1 µl aufgetragen. Die mit BPB blau gefärbten Reaktionsflächen zeigten nach 5 bis 20 Minuten einen Farbumschlag nach Gelb, was einen vollständigen Umsatz der freien Aminogruppen anzeigte. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 20-proz. Piperidin in DMF über 5 Minuten durchgeführt. Endacetylierung der fertigen Peptide wurde durch Behandlung mit 5-proz. Essigsäureanhydrid, 5-proz. Diisopropylethylamin in DMF über 10 Minuten erreicht. Die Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten wurden mit 20-proz. TFA und 1-proz. Triisobutylsilan in Dichlormethan über 20 Minuten abgespalten und der Träger anschließend mit je 10 ml Portionen dreimal mit Dichlormethan, dreimal mit DMF und dreimal mit Ethanol gewaschen und getrocknet.

Mit diesen Peptiden wurde z. B. die sequenzspezifische Bindung von anti-CMV26 Antikörpern in einem Kaninchenserum durch einen Farbtest nachgewiesen.

Figur 3: Schematische Darstellung des Farbtests. Die oberflächengebundenen Peptide (P) werden mit dem Kaninchen-anti-CMV26-Serum inkubiert, überschüssiges Serum abgewaschen, und danach mit einem anti-Kaninchen-Antikörper aus der Ziege, welcher kovalent mit dem Enzym β -Galactosidase verknüpft ist, inkubiert. Nur wenn die anti-CMV26-Antikörper das Peptid binden können, wird über den zweiten Antikörper das Enzym gebunden. Dieses kann dann durch seine Aktivität bei der Spaltung von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid nachgewiesen werden, wobei sich

- 14 -

in Gegenwart eines milden Oxidationsmittels wie Kaliumhexacyanoferrat(III) ein in Wasser und Alkohol unlöslicher blauer Indigofarbstoff bildet.

Figur 4: Fotografie des flachen Celluloseträgers nach dem Farbttest. Die Peptide an den Reaktionsflächen 11 bis 16 und 30 bis 33 reagieren positiv.

Durch Behandlung des Trägers mit Detergenzien (wie Harnstoff, Natriumdodecylsulfat und Mercaptoethanol) können die gebundenen Antikörper wieder abgelöst werden. Der Indigofarbstoff kann mit DMF abgewaschen werden. Danach kann der Träger mit den immobilisierten Peptiden erneut eingesetzt werden. Dies kann mehrfach wiederholt werden, solange keine Reaktionsbedingungen angewandt werden, welche die Peptide ablösen oder zerstören. Nach mehr als zehn Antikörperbindungstests mit dem gleichen Träger wurden einige Reaktionsflächen ausgeschnitten und die Peptide mit 1M NaOH abgelöst. Die CMV26-Gly-Gly-Peptide ließen sich in der HPLC-Analyse als auch durch FAB-Massenspektroskopie eindeutig nachweisen.

Ausführungsbeispiel 2:

Analyse des gleichen immunogenen Teilabschnittes (CMV26) des 36/40K-Proteins vom Cytomegalie-Virus.

Flächenträger: Ein 5,5 x 10,5 cm großes Blatt Glasfaserpapier (QM-A, Whatman, England) wurde ausgeschnitten; danach wurden 50 Punkte im Abstand von je 1 cm mit Bleistift darauf markiert. Das Blatt wurde in einem Erlenmeyerkolben (250 ml) mit Schliff mit 50 ml 2-proz. Aminopropyl-triethoxysilan in abs. Toluol über Nacht im Rückfluß gekocht. Anschließend wurde jeweils mit Portionen von 10 ml dreimal mit Toluol und dreimal mit Aceton gewaschen und 1 Stunde bei 110 °C getrocknet. Die quantitative Bestimmung der so eingeführten Aminopropylgruppen (freie Aminogruppen) ergab 30 bis 50 nmol/cm².

Alle weiteren chemischen Operationen wurden genauso durchgeführt, wie im Ausführungsbeispiel 1 für Cellulosepapier nach der ersten Glycinkopplung beschrieben wurde. Das Ergebnis des Antikörperbindungstests war identisch.

Die Ausführungsbeispiele 1 und 2 belegen einen wichtigen Anwendungsaspekt für die durch das beanspruchte Verfahren hergestellten Flachmaterialien mit den daran gebundenen Peptiden. Sie können für diagnostische Zwecke in der Human- und Veterinärmedizin zum sehr spezifischen Nachweis von bakteriellen und viralen Infektionen eingesetzt werden. Solche Infektionen führen durch Immunreaktionen des befallenen Organismus zur Bildung von Antikörpern gegen virale oder bakterielle Proteine. Mit virus- oder bakterienspezifischen Peptiden können solche Antikörper im Serum nachgewiesen und damit auch die Art und Subklasse des Erregers bestimmt werden. Für das Auffinden der spezifischen Peptide kann wiederum das gleiche Verfahren eingesetzt werden, indem (wie in den Ausführungsbeispielen gezeigt) Serien von an Flachmaterial gebundenen Peptiden hergestellt und getestet werden.

Ausführungsbeispiel 3:

Es wurden vier zu CMV26 in Beziehung stehende Oligopeptide durch punktförmige Synthese auf Papierträgern mit Boc-Lys-Pro-Derivatisierung synthetisiert und von den Trägern mit Hilfe von Diketopiperazin-bildung abgespalten. Einzelheiten sind **Figur 5 A-B** und **Tabelle 1** zu entnehmen. Es zeigen:

Figur 5 A: HPLC-Spuren der rohen Peptide;

Figur 5 B: FAB-Massenspektrum von Peptid 15 (auf Basis positiver Ionen);

Tabelle 1: tabellarische Angaben zu den synthetisierten Peptiden.

Peptid Nr.	Sequenz	Molekularmasse ^{a)}		Aminosäureanalyse ^{b)}						Menge	
		(theor.)	[M+H] ⁺	D	S	G	A	L	P	K	[nmol]
14	Ac-G-G-S-L-S-S-DKP	755.4	756.4	-	2.88	1.98	-	1.00	x	x	66
15	Ac-G-S-L-S-S-L-DKP	811.4	812.4	-	2.90	0.97	-	2.00	x	x	52
16	Ac-S-L-S-S-L-A-DKP	825.4	826.4	-	2.90	-	0.99	2.00	x	x	51
17	Ac-L-S-S-L-A-N-DKP	852.4	853.4	0.89	1.98	-	1.00	2.00	x	x	57
R	Ac-DKP	268.2	267.2	-	-	-	-	-	x	x	ca. 75

- 17 -

- (a) Ac-DKP wurde beim FAB-Massenspektrum nur als (M-H)⁻ auf Basis negativer Ionen ermittelt.
- (b) Der DKP-Anteil wurde unter Standardhydrolysebedingungen nicht vollständig abgebaut; x bedeutet, daß Pro und Lys in gleichen Mengen vorlagen, allerdings nicht äquimolar in Bezug auf die Aminosäurereste in der Peptidkette.

Ausführungsbeispiel 4:

Es wurde von Hand mit Volumina bis herunter zu 0,1 µl mit einer gewöhnlichen Mikropipette getüpfelt, die mit einer Polypropylen- spitze versehen war. Einige typische Daten, die bei der Verwendung von zwei verschiedenen Papierqualitäten ermittelt wurden, sind in der folgenden Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Beziehung zwischen Tüpfelvolumen, Fleckengröße und Funktionalität.

A: Whatmann 540			B: Whatman 3 MM vorbehandelt		
Volumen	Durchmesser	β-ala- Anker	Volumen	Durchmesser	β-ala- Anker
[µl]	[mm]	[µmol]	[µl]	[mm]	[µmol]
0.1	3	0.02	1	4	0.10
0.5	5	0.07	5	7	0.45
1.0	7	0.13	10	10	0.85
2.0	9	0.25	20	14	1.70
5.0	12	0.60	50	22	4.40

Werte sind ± 5%

Ausführungsbeispiel 5:

Es werden alle 16 Dinucleosidmonophosphate der allgemeinen Formel N_2pN_1 hergestellt, wobei man sich hinsichtlich des Chemismus an das europäische Patent 84 100 059.9 sowie Frank et al. in Nucleic Acids Res., 11 (1983) 4365-4377 und für den verwendeten Träger an Ausführungsbeispiel 1 anlehnt, wobei noch auf folgende Einzelheiten hingewiesen werden soll.

Als flächenförmigen Träger verwendet man Whatman 540-Papier mit Di- β -Ala-Ankern gemäß Ausführungsbeispiel 1. Der erste Startbaustein N_1 wird jeweils als 5'-DMTr-Nucleosid-3'-succinat eingesetzt (in NMP) und in Analogie zu Ausführungsbeispiel 1 durch Tüpfeln an die Aminoanker gekoppelt (mit DIC und HOBT). Die Succinate sind ein Beispiel für einen labilen Linker. Danach wird ein aus dem angeführten Stand der Technik bekannter Capping-Schritt vorgenommen. Die Abspaltung der DMTr-Gruppe kann mit 3-proz. Dichloressigsäure in Dichlormethan erfolgen. Zur Kopplung wird der zweite Baustein N_2p als 5'-DMTr-Nucleosid-3'-o-Chlorphenylphosphat (mit MSNT in Pyridin) unter einem Argonkissen aufgetüpfelt, um Luftfeuchtigkeit auszuschließen. Die DMTr-Gruppe wird wie vorstehend angegeben abgespalten.

Die Flecken werden ausgestanzt, jeweils mit 30-proz. wässrigem Ammoniak behandelt und die Überstände auf ihre Reaktionsprodukte (Dinucleosidmonophosphate) durch FAB-Massenspektroskopie gemäß Grotjahn et al in Nucleic Acids Res., 10 (1982) 4671-4678 untersucht.

Patentansprüche

1. Verfahren zur schnellen Synthese von trägergebundenen oder freien Peptiden, bei dem man von einem oder von mehreren funktionalisierten Trägern ausgeht und Schritt für Schritt entsprechend den vorgegebenen Aminosäuresequenzen die gewünschten Peptide nach einem geeigneten Syntheseverfahren synthetisiert, dadurch **gekennzeichnet**, daß man

- Flachmaterial als Träger verwendet
- zur Kopplung kleine Aliquots einer Lösung der gewünschten Aminosäure oder des gewünschten Di- oder Oligopeptids in Form ihrer aktivierten Derivate punkt- oder strichförmig auf den Flächenträger aufträgt,
- die Kopplungsreaktion in der sich durch Benetzung ausbildenden Reaktionsfläche durchführt und
- gegebenenfalls das fertige Peptid mit Hilfe einer geeigneten Abspaltungslösung vom Flächenträger abtrennt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß man mehrere bis sehr viele verschiedene Peptide auf einem Flachmaterial gleichzeitig nebeneinander auf einander nicht berührenden, punkt- oder strichförmigen Reaktionsflächen synthetisiert.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß als Flachmaterial eine poröse oder nicht poröse Folie, Membran oder ein solches Papier eingesetzt wird, welche für die Kopplung von Aminosäuren oder Peptiden geeignete, chemisch reaktionsfähige Funktion aufweisen.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Flachmaterial aus Cellulose, Glas oder organischen Polymeren besteht und seine Oberfläche geeignete chemische Funktionen aufweist.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Funktionalisierung der Oberflächen durch Einführung von Aminopropylgruppen, Glycin- oder Diglycinankergruppen erfolgt.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch **gekennzeichnet**, daß man das zur synthetisierende Peptid (a) C-terminal direkt mit dem Flachmaterial verknüpft oder (b) mit dem Flachmaterial über einen Linker verknüpft aufbaut.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß die flächenspezifische Beladung mit reaktiven Funktionen 1 pmol bis 1 μ mol pro cm^2 beträgt.

8. Verfahren zur schnellen Synthese von trägergebundenen oder freien Oligonucleotiden, bei dem man von einem oder von mehreren funktionalisierten Trägern ausgeht und Schritt für Schritt entsprechend den vorgegebenen Nucleotidsequenzen die gewünschten Oligonucleotide nach einem geeigneten Syntheseverfahren synthetisiert, dadurch **gekennzeichnet**, daß man

- Flachmaterial als Träger verwendet
- zur Kopplung kleine Aliquots einer Lösung des gewünschten Nucleotids oder des gewünschten Di- oder Oligonucleotids in Form ihrer aktivierten Derivate punkt- oder strichförmig auf den Flächenträger aufträgt,
- die Kopplungsreaktion in der sich durch Benetzung ausbildenden Reaktionsfläche durchführt und
- gegebenenfalls das fertige Oligonucleotid mit Hilfe einer geeigneten Abspaltungslösung vom Flächenträger abtrennt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch **gekennzeichnet**, daß man mehrere bis sehr viele verschiedene Oligonucleotide auf einem Flachmaterial gleichzeitig nebeneinander auf einander nicht

berührenden, punkt- oder strichförmigen Reaktionsflächen synthetisiert.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch **gekennzeichnet**, daß als Flachmaterial eine poröse oder nicht poröse Folie, Membran oder ein solches Papier eingesetzt wird, welche für die Kopplung von Nucleotiden geeignete, chemisch reaktionsfähige Funktion aufweisen.

11. Verfahren nach Anspruch 8, 9, oder 10, dadurch **gekennzeichnet**, daß man sich der Maßnahmen von Anspruch 4, 5 oder 7 bedient.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch **gekennzeichnet**, daß man das zu synthetisierende Oligonucleotid (a) 3'-terminal direkt mit dem Flachmaterial verknüpft oder (b) mit dem Flachmaterial über einen Linker verknüpft aufbaut.

13. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 oder 8, **gekennzeichnet** durch einen Pipettierautomaten mit montiertem Flächenträger.

14. Flachmaterial mit daran gebundenen Peptiden, hergestellt nach einem der Ansprüche 1 bis 7.

15. Flachmaterial mit daran gebundenen Oligonucleotiden, hergestellt nach einem der Ansprüche 8 bis 12.

16. Verwendung des Flachmaterials nach Anspruch 14 für mikrobiologische und insbesondere diagnostische Zwecke in der Human- und Veterinärmedizin zum spezifischen Nachweis von bakteriellen und viralen Infektionen.

17. Verwendung des Flachmaterials nach Anspruch 15 für Hybridisierungszwecke.

1/12

Figur 1

CMV26 (36/40K protein)

ARGSIEGRGKSRGGGGGSSLSSLANAGGLHDDGPGLDNDLMNEPMGLGGLGGGGGGGKKHLDPSTCSQAC

2/12

A:CMV26PEP

		Len	M.W.	Protection/ Modification
1- 1A	TEGRGKSRGG	10	1015.6	
2- 2A	EGRGKSRGGG	10	959.6	
3- 3A	GRGKSRGGGG	10	887.6	
4- 4A	RGKSRGGGGG	10	887.6	
5- 5A	GKSRGGGGGG	10	788.5	
6- 6A	KSRGGGGGGG	10	788.5	
7- 7A	SRGGGGGGGS	10	747.4	
8- 8A	RGGGGGGGSL	10	773.5	
9- 9A	GGGGGGGSLS	10	704.4	
10- 10A	GGGGGGSLS	10	734.4	
11- 11A	GGGGGSLSSL	10	790.5	

12- 12A	GGGGSLSSIA	10	804.5	
13- 13A	GGGSLSSIAN	10	861.5	
14- 14A	GGSLSSIANA	10	875.5	
15- 15A	GSLSSIANAG	10	875.5	
16- 16A	SLSSIANAGG	10	875.5	
17- 17A	LSSIANAGGL	10	901.6	
18- 18A	SSIANAGGLH	10	925.6	
19- 19A	SIANAGGLHD	10	953.6	
20- 20A	IANAGGLHDD	10	981.5	
21- 21A	ANAGGLHDDG	10	925.5	
22- 22A	NAGGLHDDGP	10	951.5	

23- 23A	AGGLHDDGPG	10	894.5	
24- 24A	GGLHDDGPGL	10	936.5	
25- 25A	GLHDDGPGLD	10	994.5	
26- 26A	LHDDGPGLDN	10	1051.6	
27- 27A	HDDGPGLDND	10	1053.5	
28- 28A	DDGPGLDNDL	10	1029.5	
29- 29A	DGPGLDNDLM	10	1045.5	
30- 30A	GPGLDNDLMN	10	1044.5	
31- 31A	PGLDNDLMNE	10	1116.6	
32- 32A	GLDNDLMNEP	10	1116.6	
33- 33A	LDNDLMNEPM	10	1190.6	

5/12

34- 34A	DNDIMNEPMG	10	1134.5	
35- 35A	NDIMNEPMGL	10	1132.6	
36- 36A	DIMNEPMGLG	10	1075.6	
37- 37A	IMNEPMGLGG	10	1017.6	
38- 38A	MNEPMGLGGL	10	1017.6	
39- 39A	NEPMGLGGLG	10	943.5	
40- 40A	EPMLGLGGLGG	10	886.5	
41- 41A	PMGLGGLGGG	10	814.5	
42- 42A	MGLGGLGGGG	10	774.5	
43- 43A	GLGGLGGGGG	10	700.4	
44- 44A	LGGLGGGGGG	10	700.4	

6/12

45- 45A	GGGCGGGGGG	10	644.4	
46- 46A	GLGGGGGGGG	10	644.4	
47- 47A	LGCGGGGGGK	10	715.5	
48- 48A	GGGGGGGGKK	10	730.5	
49- 49A	GGGGGGGGKH	10	810.5	

7/12

Cycle 0

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

Cycle 1

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

Cycle 2

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

Cycle 3

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

8/12

Cycle 4

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

Cycle 5

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

Cycle 6

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

9/12

Cycle 7

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

Cycle 8

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

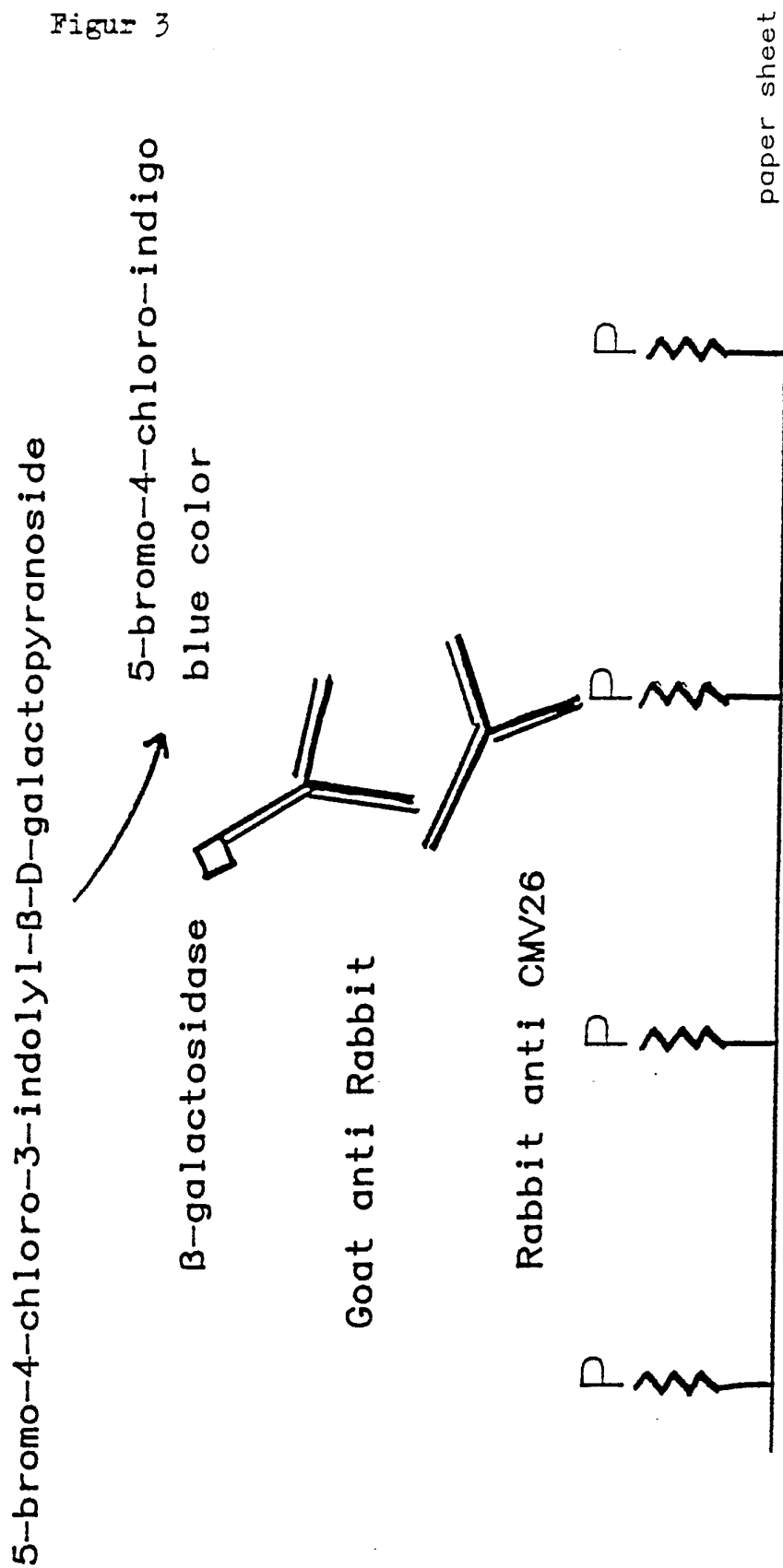
(18/18)

Cycle 9

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

10/12

Figur 3



11/12

Fig. 4

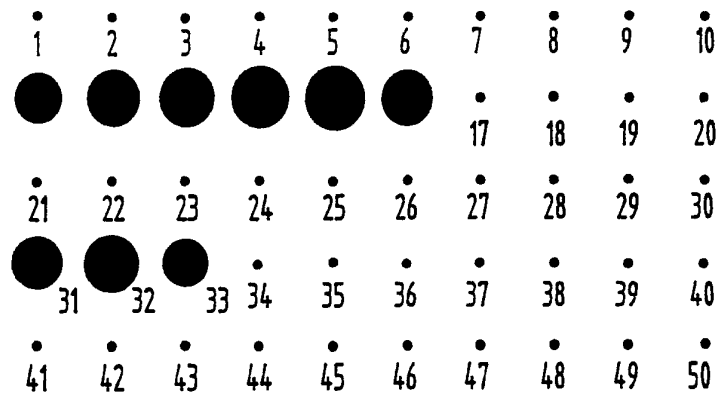


Fig. 6

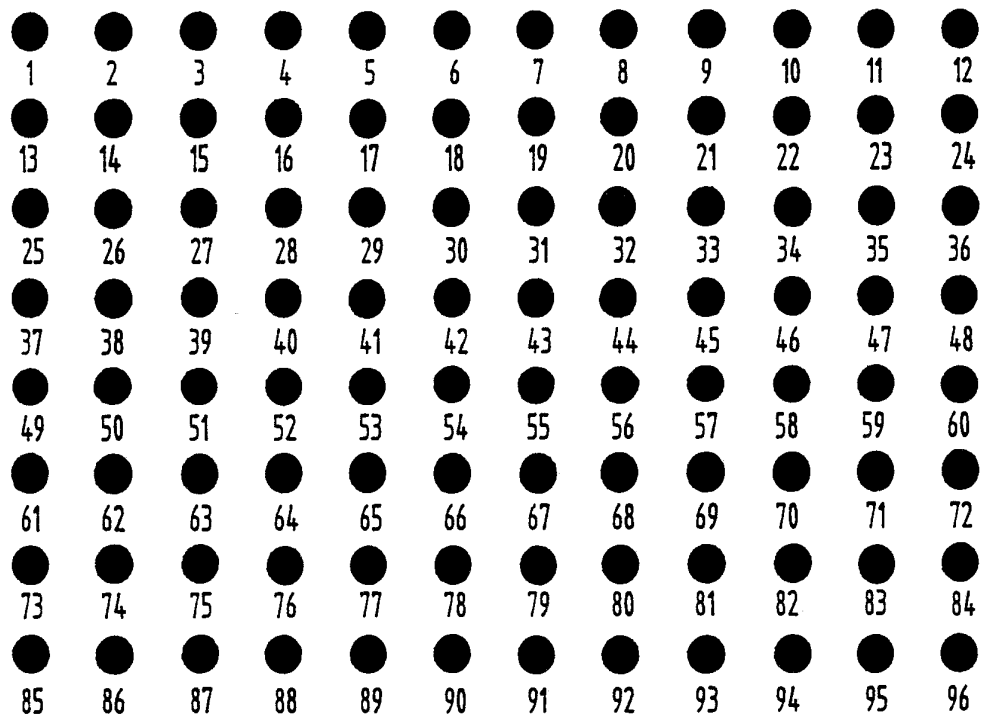


Fig. 5A

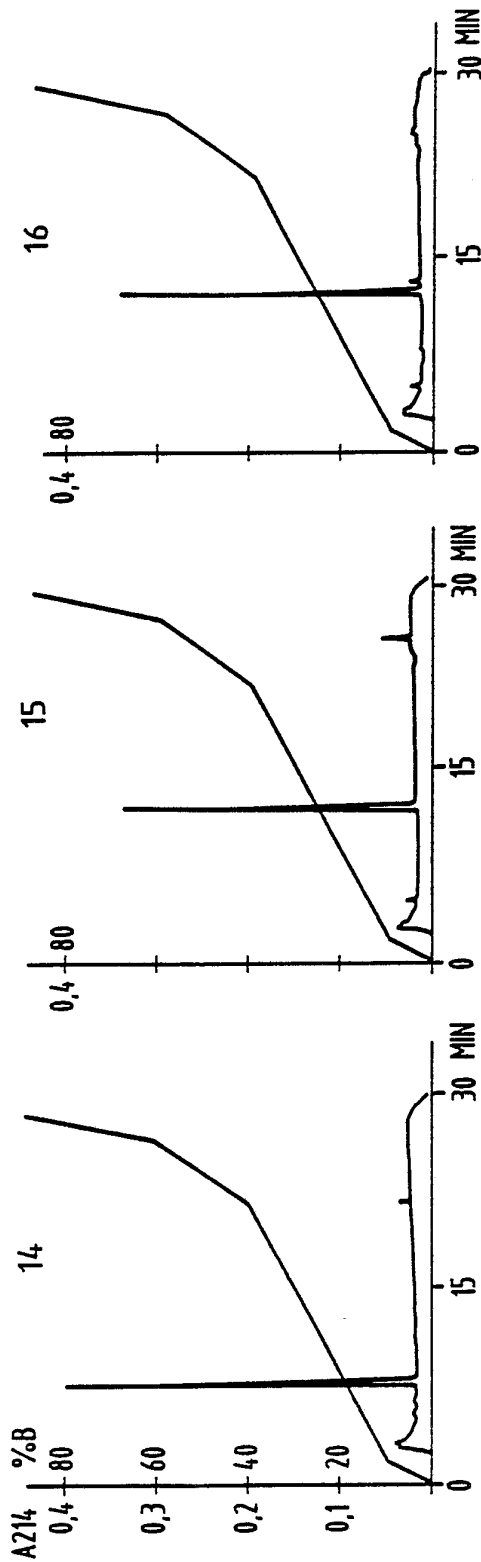
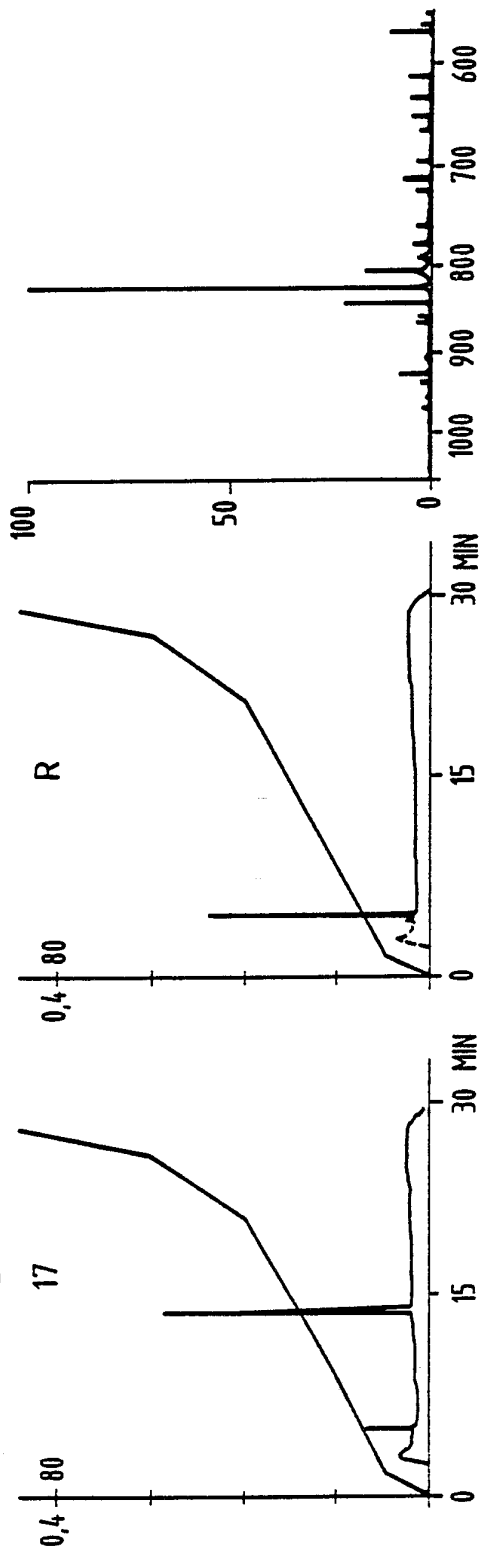


Fig. 5B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/01529

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁵	C 07K 1/04 C 07 H 21/00	B 01 J 19/00
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. ⁵	C 07 K C 07 H	B 01 J
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	Chemical Abstracts, Volume 112, No. 21, 21 May 1990 Columbus, Ohio, US; see page 792, abstract No. 199140e, & DD, A, 272855 (AKADEMIE DER WISSEN- SCHAFTEN DER DDR) 25 October 1989	1-7, 13 14, 16

A	Chemical Abstracts, Volume 108, No. 19, 9 May 1988, Columbus, Ohio, US; see page 694, abstract No. 167891b, & SU, A, 1318600 (ALL-UNION SCIENTIFIC- RESEARCH INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY) 23 June 1987	8-12, 13, 15, 17

A	EP, A, 0260634 (GBF) 23 March 1988, see the whole document	1-7, 13, 14, 16

A	EP, A 0114599 (GBF) 1 August 1984, see the whole document	8-12, 13, 15, 17

A	Collection of Czechoslovak Chemical Communications, Volume 54, No. 6, June 1989, Academia Nakladatelstvi Ceskoslovenske, Prag, TS; J. Eichler et al.: "Appli- cation of cellulose paper as support material in simultaneous solid phase peptide synthesis", pages 1746-1752, see the whole article	1-7, 13, 14, 16

[*] Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
14 November 1991 (14.11.91)	17 December 1991 (17.12.91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
P,X	Chemical Abstracts, Volume 115, No. 17, 1991, Columbus, Ohio, US; R. Frank et al.: "Facile and rapid "spot-synthesis" of large numbers of peptides on membrane sheets", see abstract No. 183884b, & Pept. 1990, Proc. Eur. Pept. Symp. 21st, Meeting date 1990, 151-2 ---	1-7,13, 14,16

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9101529

SA 50188

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 10/12/91
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0260634	23-03-88	DE-A- 3631662	24-03-88
		JP-A- 63190899	08-08-88

EP-A- 0114599	01-08-84	DE-A- 3301833	26-07-84
		CA-A- 1221649	12-05-87
		JP-A- 59172500	29-09-84
		US-A- 4689405	25-08-87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 91/01529

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.C1.5 C 07 K 1/04 C 07 H 21/00 B 01 J 19/00		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.C1.5	C 07 K C 07 H B 01 J	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ^o	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	Chemical Abstracts, Band 112, Nr. 21, 21. Mai 1990, Columbus, Ohio, US; siehe Seite 792, Zusammenfassung Nr. 199140e, & DD, A, 272855 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) 25. Oktober 1989 ---	1-7,13, 14,16
A	Chemical Abstracts, Band 108, Nr. 19, 9. Mai 1988, Columbus, Ohio, US; siehe Seite 694, Zusammenfassung Nr. 167891b, & SU, A, 1318600 (ALL-UNION SCIENTIFIC-RESEARCH INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY) 23. Juni 1987 ---	8-12,13 ,15,17
A	EP,A,0260634 (GBF) 23. März 1988, siehe das ganze Dokument ---	1-7,13, 14,16
A	EP,A,0114599 (GBF) 1. August 1984, siehe das ganze Dokument ---	8-12,13 ,15,17
-/-		
^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
14-11-1991		17. 12. 91
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
EUROPAISCHES PATENTAMT		Daniëlle van der Haas

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	Collection of Czechoslovak Chemical Communications, Band 54, Nr. 6, Juni 1989, Academia Nakladatelství Československé, Prag, TS; J. Eichler et al.: "Application of cellulose paper as support material in simultaneous solid phase peptide synthesis", Seiten 1746-1752, siehe den ganzen Artikel ---	1-7,13, 14,16
P,X	Chemical Abstracts, Band 115, Nr. 17, 1991, Columbus, Ohio, US; R. Frank et al.: "Facile and rapid "spot-synthesis" of large numbers of peptides on membrane sheets", siehe Zusammenfassung Nr. 183884b, & Pept. 1990, Proc. Eur. Pept. Symp. 21st, Meeting Date 1990, 151-2 -----	1-7,13, 14,16

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9101529

SA 50188

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 10/12/91

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0260634	23-03-88	DE-A- 3631662 JP-A- 63190899	24-03-88 08-08-88
EP-A- 0114599	01-08-84	DE-A- 3301833 CA-A- 1221649 JP-A- 59172500 US-A- 4689405	26-07-84 12-05-87 29-09-84 25-08-87