

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2199/89
(22) Anmeldetag: 20. 9.1989
(42) Beginn der Patentdauer: 15. 5.1995
(45) Ausgabetag: 27.12.1995

(51) Int.Cl.⁶ : **C07K 1/04**
C07K 1/06

(30) Priorität:
24. 9.1988 GB 8822502 beansprucht.
(56) Entgegenhaltungen:
EP 81408A1

(73) Patentinhaber:
SOCIETE D'EXPANSION SCIENTIFIQUE EXPANSIA
F-75016 PARIS (FR).
(72) Erfinder:
CALAS BERNARD
MONTPELLIER (FR).
MERY JEAN
SAINT GELY DU FESC (FR).
NAHARISOA HANITRA
MONTPELLIER (FR).
FOLLET MICHEL
ARAMON (FR).

(54) PEPTIDSYNTHESE IN DER FESTEN PHASE

(57) Die Erfindung betrifft die Peptidsynthese in der festen Phase.

Festphasenpeptidsynthesen werden mit polyacryli-
schen Harzen (wie solchen, die in der EP 0 079 842 und EP
0 081 408 beschrieben worden sind) mit einem Verfahren
durchgeführt, welches in der Kupplungsprozedur das
Waschen des Harzes mit Wasser und/oder mindestens
einer wässrigen Lösung umfaßt.

AT 400 439 B

Die vorliegende Erfindung betrifft die Peptidsynthese in der festen Phase.

Die in der Beschreibung verwendeten Abkürzungen entsprechen den 1983 herausgegebenen Empfehlungen der IUPAC-IUB gemischten Kommission für die Nomenklatur auf dem Gebiet der Biochemie, wie in Eur.J. Biochem, 138, 9-37 (1984) angeführt. Zusätzlich werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

5	IFA	Trifluoressigsäure
	DCM	Dichlormethan
	DMF	Dimethylformamid
	NMP	N-Methylpyrrolidin
	DMAc	Dimethylacetamid

10 Aminosäuren und ihre Abkömmlinge liegen, wenn nicht anders angegeben, in ihrer L-Konfiguration vor, beispielsweise Ala = L-Alanin, DAla = D-Alanin. Die Bezeichnung (meth)acrylisch wird angegeben, um zwischen acrylisch oder methacrylisch zu unterscheiden.

Die üblichen Methoden für die Peptidsynthese in fester Phase umfassen die folgenden Verfahrensschritte:

- 15 1.- Schutzentfernen der Boc-Gruppe;
- 2.- Waschen;
- 3.- Neutralisation des NH₂ in α -Position;
- 4.- Waschen;
- 5.- Kuppeln und
- 20 6.- Waschen.

Der Schutzentfernungs- und Neutralisationsschritt wird durch Behandlung des Peptidharzes mit TFA und Diisopropyläthylaminlösungen in DCM durchgeführt. Das gleiche Lösungsmittel wird auch für die Zwischenwaschungen verwendet. Unabhängig vom verwendeten Kupplungsmittel (symmetrisches Anhydrid, Dicyclohexylcarbodiimid, Hydroxybenzotriazol, etc.) wird die Kupplungsreaktion entweder in DCM oder DMF 25 ausgeführt.

Als Konsequenz dieser Verfahrensschritte bedarf die Peptidsynthese in der festen Phase großer Mengen von teuren Lösungsmitteln und Reagentien, wie TFA; daher hängen die Kosten des Peptids direkt von den Kosten der in der Synthese verwendete DCM, NMP, DMF, DMAc und TFA ab.

Es ist daher von besonderem Interesse, billigere Lösungsmittel und Reagentien zu finden, um die 30 Herstellungskosten von Peptiden wesentlich zu senken.

Das europäische Patent 0 079 842 der Anmelderin beschreibt polyacrylische Harze, die Copolymere dreier Monomere sind:

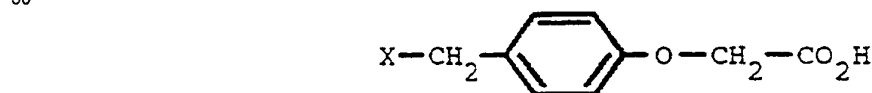
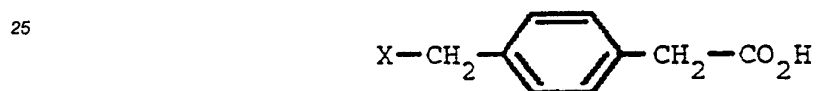
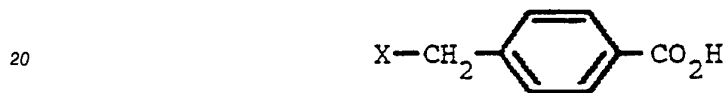
- (i) ein erstes Monomer, das eine Matrix für das Copolymer liefert und eines der folgenden ist
 - 1-(meth)Acryloyl-pyrrolidin,
 - 35 1-(meth)Acryloyl-Piperidin,
 - 1-(meth)Acryloyl-perhydroazepin,
 - 1-(meth)Acryloyl-4-methyl-piperazin,
 - 4-(meth)Acryloyl-morpholin,
 - N,N-Dimethyl-(meth)acrylamid und
 - 40 N,N-Diäthyl-(meth)acrylamid
 - (ii) ein zweites Monomer, welches sich mit dem Copolymer verbindet und eines der folgenden ist
 - N,N'-di(meth)Acryloyl-diaminomethan und
 - N,N'-di(meth)Acryloyl-1,2-diaminoäthan und
 - (iii) ein drittes Monomer, welches das Copolymer aktiviert und eine der folgenden Säuren ist
 - 45 2-(meth)Acrylamido-Essigsäure,
 - 3-(meth)Acrylamido-propionsäure,
 - 4-(meth)Acrylamido-buttersäure,
 - 6-(meth)Acrylamido-Hexansäure,
 - N-(meth)Acryloyl-L-alanin,
 - 50 N-(meth)Acryloyl-L-valin,
 - N-(meth)Acryloyl-L-Leucin,
 - N-(meth)Acryloyl-L-phenylalanin,
 - N-(meth)Acryloyl-L-tyrosin,
 - N-(meth)Acryloyl-L-methionin,
 - 55 N-(meth)Acryloyl-L-lysin und
 - N-(meth)Acryloyl-L-prolin
- oder ein Methylester einer dieser Säuren.

Diese Copolymere haben freie Carboxy oder Methoxycarbonylgruppen, die vom dritten Monomer stammen. Das europäische Patent Nr. 81 408 der Anmelderin beschreibt weiters polyacrylische Harze, in denen diese Gruppen mit Äthylendiamin amidifiziert werden. Es beschreibt auch die Verwendung dieser weiteren polyacrylischen Harze in der Peptidsynthese in fester Phase, doch nur in Verbindung mit den teuren, üblicherweise mit Polystyrenharzen verwendeten Lösungsmitteln, wie es oben diskutiert wurde.

Die Erfindung liefert ein Verfahren zur Peptidsynthese in der festen Phase, umfassend das Anhängen eines ersten Aminosäurerestes an ein polyacrylisches Harz, das Ankuppeln eines oder mehrerer weiterer Aminosäurereste, um das gewünschte Peptid zu formen und das Loslösen des Peptids vom Harz und ist dadurch gekennzeichnet, daß die Kupplungsprozedur das Waschen des Harzes in Wasser und/oder zumindest einer wässrigen Lösung umfaßt.

Das erfindungsgemäße Verfahren nutzt die hydrophilen Eigenschaften, die die polyacrylischen Harze im Gegensatz zu den Polystyrenharzen besitzen, aus. Die polyacrylischen Harze, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, sind vorzugsweise die in den europäischen Patenten 0 079 842 und 0 081 408 die oben diskutiert wurden, beschriebenen.

Der erste Aminosäurerest kann an der Matrix durch den Glycolamidteil befestigt werden (B. Calas und Al., Tetrahedron, 1985, 41, 5331). Frühere Vorschläge mit anderen labilen Bindemitteln, wie beispielsweise



35 worin X für Brom, Chlor oder OH steht, wurden als unbefriedigend befunden.

Das Harz kann dann in Wasser gewaschen werden. Die nächste Aminosäure der Peptidsequenz, die aufgebaut werden soll, kann gemäß der folgenden Prozedur hinzugefügt werden (anwendbar, wenn als Schutzgruppe Boc verwendet wird):

- 40 1.- Waschen: destilliertes Wasser - 2 bis 4 mal jeweils 2 mn;
 2.- Schutzentfernung: HCl (6N) in Wasser - einmal 2mn und noch einmal 30 min;
 3.- Waschen: destilliertes Wasser - 4 bis 6 mal, jeweils 2 mn;
 4.- Neutralisation: 1 Äquivalent Boratpuffer 12,5 mM pH 8,5-9,0 - einmal, 1 bis 2 mn und nocheinmal 2 mn;
 45 5.- Waschen: destilliertes Wasser - 4 bis 6 mal, jeweils 1 bis 2 mn;
 6.- Waschen: zweimal mit DMF, jeweils 1 bis 2mn;
 7.- Kuppeln: Symmetrisches Anhydrid (2 Äquivalente, zweimal in DMF)
 8.- Waschen: DMF oder NMP - zweimal, jeweils 2 min und
 9.- Waschen: destilliertes Wasser - 4 mal, jeweils 2 mn.

50 Der Fortschritt der Kupplungsreaktion kann durch Ninhydrin oder Fluorescamin überprüft werden.

Alternativ kann, wenn die Schutzgruppe Fmoc ist, die Verlängerungsprozedur folgendermaßen ablaufen:

- 1.- Waschen: Destilliertes Wasser - 4 bis 6 mal, jeweils 2 mn;
 2.- Schutzentfernung: Piperidin oder Diäthylamin in Wasser;
 3.- Waschen: Isopropanol, zweimal, jeweils 2 mn; destilliertes Wasser 4 bis 6 mal 2mn;
 55 4.- Gegebenenfalls nochmals Waschen: DMF - einmal, 2 mn;
 5.- Kuppeln: symmetrisches Anhydrid (3 mal im Überschuß in DMF) und
 6.- Waschen: (DMF zweimal, jeweils 2 mn); destilliertes Wasser - 6 mal, jeweils 2 mn.

AT 400 439 B

Wenn die Synthese komplett ist, wird das Peptid von der Matrix durch selektives Abbrechen der Glycolamidbindung durch eine der folgenden Behandlungen erreicht:

- NaOH in Isopropanol,
- NH₃ in Trifluoräthanol oder Methanol oder Äthanol oder Isopropanol,
- 5 - N₂H₄ in DMF und
- CH₃OH in Triäthylamin.

Mit diesem Verfahren wird das Referenzpeptid von Dorman (Leu Ala Gly Val) und LHRH-Analoga mit einer Ausbeute von etwas über 50 % erreicht.

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Beispiele näher erläutert.

10

Beispiel 1

Synthese des DTrp⁶-LHR : pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-DTrp-Leu-Arg-Pro-Gly.

15 5 g eines polyacrylischen Harzes (0,55 mMol NH₂/g), erhalten durch Copolymerisierung des 1-Acryloyl-Pyrrolidins, N,N'-Diacyloyl-1,2-diaminoäthans und Methyl-2-acrylamidoacetats, wie in Beispiel 19 der EP 0 079 842 beschrieben, wurden folgendermaßen behandelt:

1/ Waschen mit DCM (4 mal, jeweils 2 mn)

2/ Neutralisation mit 5 % Diisopropyläthylamin in DCM (2 mal jeweils 2 mn)

20 3/ Waschen mit DMC (4 mal, jeweils 2 mn).

4,29 g (0,0165 Mol) Bromessigsäureanhydrid in 50 ml DCM wurden dem Harz zugefügt. Nach 45 mn Schütteln wurde die DCM-Lösung durch Filtration entfernt und der bromierte Träger folgendermaßen gewaschen:

1/ DCM (4 mal, jeweils 2 mn)

25 2/ DMF (4 mal, jeweils 2 mn)

Das Cesiumsalz des BocGlyOH (4,22 g, 0,0137 Mol), hergestellt gemäß Mery et al. (Int.J.Protein Peptide Res. 1988, 31, 412) wurde in DMF (75 ml) gelöst, diese Lösung wurde dem Harz zugefügt. Die Mischung wurde bei Umgebungstemperatur während zweier Tage geschüttelt. Dann wurde das DMF entfernt und das Polymer folgendermaßen gewaschen:

30 1/ DMF (10 mal, jeweils 2 mn).

2/ Methanol (4 mal, jeweils 2 mn)

3/ DCM (4 mal, jeweils 2 mn)

4/ Diäthyläther (4 mal, jeweils 2 mn)

Das Harz wurde im Hochvakuum in Gegenwart von KOH-Pellets während 12 h getrocknet. Die 35 angebundene Menge an Gly war 0,483 mMol/g, bestimmt durch Aminosäureanalyse nach der Hydrolyse in 6N HCl in evakuierten und versiegelten Röhrchen bei 110° für 24 h.

BocGly-Harz (4,47 g) wurde mit Wasser (4 mal, jeweils 2 mn) gewaschen und die Boc-Gruppe wurde unter Verwendung von 6N HCl in Wasser (2 mal, einmal 2 mn und noch einmal 30 mn) abgespalten. HCl wurde durch Filtern entfernt und das Harz mit Wasser gewaschen (6 mal, jeweils 2 mn). Die Neutralisierung 40 wurde unter Verwendung von Boratpuffer (12,5 mMol, pH 9), durchgeführt, das Harz wurde zweimal mit 50 ml Puffer (jeweils 1 mn) behandelt. Nach Waschen mit Wasser (6 mal, jeweils 2 mn) und DMF (2 mal, jeweils 2 mn) wurde symmetrisches Anhydrid des BocProOH in DMF (50 ml) dem Harz zugefügt.

Die Lösung des symmetrischen Anhydrids wurde folgendermaßen hergestellt: BocProOH (3,55 g, 0,0165 Mol) wurde in 40 ml DMF gelöst, die Lösung wurde auf 0°C gekühlt und Dicyclohexylcarbodiimid 45 (1,69 g, 8,25 mMol) in 10 ml DCM wurden zugefügt. Nach 30 minütigem Rühren bei 0°C und Filtern wurde die Lösung im Hochvakuum ohne Erhitzen verdampft und der Rückstand wurde in DMF gelöst und dem Harz zugefügt. Die Mischung wurde während 30 mn geschüttelt, nach dieser Zeit war der qualitative Ninhydrin-Test von Kaiser und al. (Anal.Biochem. 1970, 34, 575) negativ und zeigte somit eine Kupplungs- ausbeute von über 99,6 % an. Die DMF wurde entfernt und der Träger zweimal mit DMF (jeweils 2 mn) und 50 mit Wasser (4 mal, jeweils 2 mn) gewaschen.

Diese Prozedur wurde verwendet, um die anderen Aminosäuren der DTrp⁶-LHRH Sequenz anzuhängen. Die symmetrischen Anhydride wurden unter Verwendung von: BocArg(Mts)OH (7,52 g, 0,0165 Mol), BocLeuOH (4,11 g, 0,0165 Mol), BocDTrpOH (5,02 g, 0,0165 Mol), BocTyr (2,6 Dichlorobenzyl)OH oder BocTyr (2,6 DCB)OH (7,26 g, 0,0165 Mol), BocSer(Bzl)OH (4,86 g, 0,0165 Mol), BocTrpOH (5,02 g, 0,0165 55 Mol), BocHis (Dinitrophenyl)OH oder BocHis (Dnp)OH (6,94 g, 0,0165 Mol), pyro-GluOH (2,13 g, 0,0165 Mol) hergestellt.

Nach der Aufbringung des pyro-GluOH wurde das Harz mit Methanol (4 mal, jeweils 2 mn), mit Diäthyleäther (4 mal, jeweils 2 mn) gewaschen und im Hochvakuum bei Umgebungstemperatur für 48 h

getrocknet.

Das Peptid-Harz wurde dann mit Thiophenol (10 ml) in DMF (50 ml) behandelt, um die Dinitrophenylgruppe an der Histidin-Seitenkette zu entfernen.

Nach 45 mn Schütteln wurde die Thiophenollösung abgelassen und das Harz mit DMF (4 mal, jeweils 2 mn), DCM (4 mal, jeweils 2mn) und Diäthyläther (4 mal, jeweils 2 mn) gewaschen. Das Harz wurde im Hochvakuum für 12 h getrocknet. Es wurde zweimal (30 mn) bei 0°C mit 50 ml der folgenden, vorgekühlten Lösung behandelt: Trifluormethansulfonsäure (3,6 ml), Anisol (4 ml), Thioanisol (4 ml), Metacresol (4 ml) und Trifluoressigsäure (40 ml). Nach dem Beenden dieses Schutzentfernens wurde das Harz mit DCM (2 mal, jeweils 2 mn), DCM/DMF (50-50) (2 mal, jeweils 2 mn), Diisopropyläthylamin 5 %-ig in DCM (2 mal, jeweils 1 mn), DMF (3 mal, jeweils 2 mn) Isopropanol-Wasser (70-30) (3 mal, jeweils 2 mn) gewaschen. Das Peptidharz wurde dann in einer mit NH₃ gesättigten Trifluoroäthanollösung (250 ml) suspendiert.

Die Mischung wurde für 15 h bei Umgebungstemperatur geschüttelt, die Trifluoroäthanollösung, die das ungeschützte DTrp^f-LHRH enthält, wurde gesammelt und der Träger wurde mit Wasser (4 mal, jeweils 2 mn), Methanol (4 mal, jeweils 2 mn) und Wasser (6 mal, jeweils 2 mn) gewaschen. Die Filtrate wurden vereint, der pH-Wert mit 1N Salzsäure auf etwa 4 gebracht; sie wurden unter Vakuum ohne Erwärmen konzentriert. Der Rückstand wurde auf einer Carboxymethylcellulose-Säule (Wathman CM 52, 10 X 2 cm) mit einem linearen Gradienten von NaCl (10 mM AcONa pH 5,0 bis 10 mM AcONa, 0,15M NaCl pH 5,0) fraktioniert. Passende Fraktionen werden vereint, lyophilisiert und durch Gel-Filtration auf einer Säule (100 X 2,5 cm) mit Sephadex G10 in 10 M HCl entsalzt. Die Peptidfraktion wurde dann mittels HPLC auf einer Säule (270 X 20 mm) von Lichrosorb RP18 (10 µm) unter Verwendung von Trifluoroessigsäure (TFA) 0,01 %-ig in Wasser und Acetonitril als Eluents gereinigt.

Ausbeute: 51 % (bezogen auf die Ausgangsaminogruppe des Trägers).

Aminosäureanalyse: Glu 0,99 (1), Leu 1,0 (1), His 1,0 (1), Trp 1,89 (2), Ser 0,96 (1), Tyr 0,97 (1), Pro 0,99 (1), Gly 1,07 (1).

Für einige Aminosäuren, die in saurem Milieu weniger stabil sind, können die analytischen Werte kleiner sein als die zufolge der Degradation derselben erwarteten Werte.

Das gleiche Verfahren wurde für die folgenden Peptide verwendet:

- Dorman-Peptid: Leu Ala Gly ValOH

Ausbeute = 46,6 %

Gly = 0,96, Ala = 0,94, Val = 1,05, Leu = 1,04

- Laminin: Tyr Ile Gly Ser ArgNH₂

Ausbeute = 35,6 %

Ser = 0,75, Gly = 1,03, Ile = 0,99, Tyr = 1, Arg = 0,99.

- CDC 28 Kinoseprotein des Cellularzyklus der "Pombee"-Stärke

Ausbeute = 44,1 % (Rohpeptid)

Tyr Lys Ala Leu Asp Leu Arg Pro GlyOH

Asp = 1, Gly = 1,08, Ala = 1, Leu = 1,05 x 2, Tyr = 0,99, Arg = 0,99, Lys = 1, Pro = 1.

- Tyrosinphosphatase

Ausbeute = 58,6 % (Rohpeptid)

Cys Ser Asp Ser Glu Lys Leu Asn Leu Asp Ser IleOH

Asp = 0,95 x 3, Ser = 0,58 x 3, Glu = 0,67 Ile = 1,1 Leu = 1,1.

- Oncogen: Phe Arg Gly Thr Leu Arg

Ausbeute = 53,4 %

Phe = 0,97, Arg = 2 x 1,1, Gly = 1,02, Thr = 0,99, Leu = 1.

Beispiel 2

Synthese des Leu-Ala-Gly-Val

1 g polyacrylisches Harz, wie in Beispiel 1 verwendet, wurde folgendermaßen behandelt:

1/ Waschen mit DCM (4 mal, jeweils 2 mn)

2/ Neutralisieren mit 5 %-igem Diisopropyläthylamin in DCM (2 mal, jeweils 2 mn)

3/ Waschen mit DCM (4 mal, jeweils 2 mn)

0,858 g (3,3 mMol) Bromessigsäureanhydrid in 10 ml DCM wurden dem Harz zugefügt. Nach 45 mn schütteln wurde die DCM-Lösung durch Filtern entfernt und der bromierte Träger folgendermaßen gewaschen:

1/ DCM (4 mal, jeweils 2 mn)

2/ DMF (4 mal, jeweils 2 mn)

Das Cesiumsalz von FmocValOH (1,29 g, 2,75 mMol), hergestellt gemäß Mery et al. (Int. J. Peptide Protein Res. 1988, 31, 412) wurde in DMF (15 ml) gelöst und die Lösung dem Harz zugefügt. Die Suspension wurde bei Umgebungstemperatur drei Tage lang geschüttelt. Dann wurde das DMF abgeführt und das Polymer gewaschen:

- 5 1/ DMF (10 mal, jeweils 2 mn)
 2/ Methanol (4 mal, jeweils 2 mn)
 3/ DCM (4 mal, jeweils 2 mn)
 4/ Diäthyläther (4 mal, jeweils 2 mn)

Das Harz wurde im Hochvakuum in Gegenwart von KOH-Pellets während 12 h getrocknet. Die Menge des angebrachten Val betrug 0,492 mMol/g, bestimmt durch Aminosäureanalyse nach Hydrolyse in 6N HCl in evakuierten und versiegelten Röhrchen für 24 h.

FmocVal-Harz (1,1 g) wurde mit Wasser (4 mal, jeweils 2 mn) gewaschen und die Fmoc-Gruppe unter Verwendung von 10 %-igem Piperidin oder Diäthylamin in Wasser (2 mal, jeweils 2 min) abgetrennt. Das Harz wurde dann mit Isopropanol (2 mal, jeweils 2 mn) und mit Wasser (4 mal, jeweils 2 mn) gewaschen.

15 Symmetrisches FmocGlyOH-Anhydrid in DMF (15 ml) wurde dem Träger zugefügt. Die Lösung des symmetrischen Anhydrids wurde folgendermaßen hergestellt:

FmocGlyOH (0,981 g, 3,3 mMol) wurde in DCM (15 ml) gelöst, die Lösung wurde auf 0°C gekühlt und Dicyclohexylcarbodiimid (0,339 g, 1,65 mMol) in DCM (10 ml). Die trübe Mischung wurde für 20 mn bei 0 °C gerührt, der Niederschlag des Dicyclohexylharnstoffs wurde durch Filtration entfernt und das Filtrat bei 20 Raumtemperatur unter Vakuum konzentriert. Der ölige Rückstand wurde in DMF (15 ml) gelöst und die Lösung dem Harz zugefügt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 45 mn geschüttelt, dann war der qualitative Ninhydrintest von Kaiser et al. (Anal. Biochem. 1970, 34, 575), negativ. Das DMF wurde durch Filtration entfernt und der Träger mit DMF (2 mal, jeweils 2 mn) und dann mit Wasser (6 mal, jeweils 2 mn) gewaschen.

25 Diese Prozedur wurde verwendet, um die folgenden Aminosäuren anzubringen: Leu und Ala. Die symmetrischen Anhydride wurden ausgehend von 1,16 g (3,3 mMol) Fmoc-LeuOH und 1,02 g (3,3 mMol) FmocAlaOH hergestellt. Nach vollständigem Durchführen der Synthese wurde der Peptid-Harzadduct mit Isopropanol (4 mal, jeweils 2 mn), Wasser (4 mal, jeweils 2 mn) und Isopropanolwasser (70-30) (4 mal, jeweils 2 mn gewaschen).

30 Das Peptidharz wurde in Isopropanolwasser (70-30) suspendiert und 1,1 ml 1N NaOH wurden zugefügt. Die Mischung wurde bei Umgebungstemperatur für 5 h geschüttelt, die Isopropanolwasserlösung, die das Leu-Ala-Gly-Val enthielt, wurde gesammelt und der Träger mit Wasser (4 mal, jeweils 2 mn), Methanol (4 mal, jeweils 2 mn) und Wasser (4 mal, jeweils 2 mn) gewaschen. Die Filtrate wurden gesammelt. Der pH-Wert wurde mit 1N HCl auf 4 gebracht, die Lösung wurde bei Raumtemperatur unter Vakuum konzentriert.

35 Der Rückstand wurde durch HPLC in einer Säule (250 X 20 mm) von Lichrosorb RP 18 (10 µm) unter Verwendung von TFA 0,1 %-ig in Wasser und Acetonitril als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 54 % (bezogen auf die Ausgangsaminogruppen des Trägers).

Aminosäureanalyse: Leu 1,02 (1), Ala 0,99 (1), Gly 1,1 (1), Val 1,0 (1).

Das gleiche Verfahren wurde für die Synthese der folgenden Peptide verwendet:

40 - Dorman-Peptid: Leu Ala Gly ValOH

Ausbeute = 46,6 %

Gly = 0,93, Ala = 0,91, Val = 1,01, Leu = 1.

- Laminin: Tyr Ile Gly Ser ArgNH₂

Ausbeute = 46,3 %

45 Ser = 0,79, Gly = 1,01, Ile = 0,96, Tyr = 0,89, Arg = 0,93.

- CDC 28 Kinaseprotein vom Cellularzyklus der "Pombee"-Stärke

Ausbeute = 48,6 % (Rohpeptid)

Tyr Lys Ala Leu Asp Leu Arg Pro GlyOH

Asp = 0,97, Gly = 1,02, Ala = 0,98, Leu = 1,02 x 2, Tyr = 0,98, Arg = 0,96, Lys = 1, Pro = 0,97.

50 - Tyrosinphosphatase

Ausbeute = 61,6 % (Rohpeptid)

Cys Ser Asp Ser Glu Lys Leu Asn Leu Asp Ser IleOH

Asp = 0,99 x 3, Ser = 0,63 x 3, Glu = 0,73, Ile = 1,03, Leu = 1.

- Oncogen: Phe Arg Gly Thr Leu Arg

55 Ausbeute = 49,2 %

Phe = 1, Arg = 2 x 1,04, Gly = 1, Thr = 0,96, Leu = 0,98.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Peptidsynthese in der festen Phase, umfassend das Anhängen eines ersten Aminosäure-
 5 rests an ein polyacrylisches Harz, Ankuppeln eines oder mehrerer weiterer Aminosäurereste, um das
 gewünschte Peptid zu formen und Abtrennen des Peptids vom Harz, **dadurch gekennzeichnet**, daß
 die Kupplungsprozedur die Schritte des Waschens des Harzes in Wasser und/oder zumindest einer
 wässrigen Lösung umfaßt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das polyacrylische Harz ein Copolymer von drei der folgenden
 10 Monomere ist:
 (i) ein erstes Monomer, das eine Matrix für das Copolymer liefert und eines der folgenden ist:
 1-(meth)Acryloyl-pyrrolidin,
 1-(meth)Acryloyl-piperidin,
 1-(meth)Acryloyl-perhydroazepin,
 15 1-(meth)Acryloyl-4-methyl-piperazin,
 4-(meth)Acryloyl-morpholin,
 N,N-Dimethyl-(meth)acrylamid und
 N,N-Diäthyl-(meth)acrylamid
 (ii) ein zweites Monomer, welches sich mit dem Copolymer verbindet und eines der folgenden ist:
 20 N,N'-di(meth)Acryloyl-diaminomethan und
 N,N'-di(meth)Acryloyl-1,2-diaminoäthan und
 (iii) ein drittes Monomer, welches das Copolymer aktiviert und das eine der folgenden Säuren ist:
 2-(meth)Acrylamido-Essigsäure,
 3-(meth)Acrylamido-propionsäure,
 25 4-(meth)Acrylamido-buttersäure,
 6-(meth)Acrylamido-hexansäure,
 N-(meth)Acryloyl-L-alanin,
 N-(meth)Acryloyl-L-valin,
 N-(meth)Acryloyl-L-leucin,
 30 N-(meth)Acryloyl-L-phenylalanin,
 N-(meth)Acryloyl-L-tyrosin,
 N-(meth)Acryloyl-L-methionin,
 N-(meth)Acryloyl-L-lysin und
 N-(meth)Acryloyl-L-prolin
 35 oder ein Methylester einer dieser Säuren ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, worin das polyacrylische Harz ein Copolymer gemäß Anspruch 2 ist,
 welches mit Äthylendiamin amidifiziert wurde.
- 40 4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die N-Schutzgruppe, die beim Aminosäure-
 ankuppeln verwendet wird, Boc ist und wobei folgende Kupplungsprozedur verwendet wird:
 1.- Waschen: destilliertes Wasser - 2 bis 4 mal, jeweils 2 mn;
 2.- Schutzentfernung: HCl (6N) in Wasser - einmal 2 mn und ein weiteres Mal 30 mn;
 3.- Waschen: destilliertes Wasser - 4 bis 6 mal, jeweils 2 mn);
 45 4.- Neutralisieren: 1 Äquivalentboratpuffer 12,5 mM pH 8,5-9,0 - einmal 1 bis 2 mn und noch einmal
 1 bis 2 mn;
 5.- Waschen: destilliertes Wasser - 4 bis 6 mal, jeweils 1 bis 2 mn;
 6.- Waschen: DMF - zweimal, jeweils 1 bis 2 mn;
 7.- Kuppeln: symmetrisches Anhydrid (2 Äquivalente, zweimal in DMF)
 50 8.- Waschen: DMF oder NMP - zweimal, jeweils 2 mn und
 9.- Waschen: destilliertes Wasser - 4 mal, jeweils 2 mn.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die beim Aminosäureankuppeln verwendete N-
 Schutzgruppe Fmoc ist und folgende Kupplungsprozedur verwendet wird:
 55 1.- Waschen: destilliertes Wasser - 4 bis 6 mal, jeweils 2 mn;
 2.- Schutzentfernung: Piperidin oder Diäthylamin in Wasser;
 3.- Waschen: Isopropanol, zweimal, jeweils 2 mn; destilliertes Wasser - 4 bis 6 mal, jeweils 2 mn;
 4.- Gegebenenfalls Waschen: DMF - einmal, 2 mn;

AT 400 439 B

- 5.- Kuppeln: symmetrisches Anhydrid (3 mal im Überschuß in DMF) und
- 6.- Waschen: DMF (zweimal, jeweils 2 mn); destilliertes Wasser - 6 mal, jeweils 2 mn.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55