

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Optimalizace robotických syntéz peptidů na pevném nosiči
v mikromolárním měřítku

Ihor Fesina

Diplomová práce

2022

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Optimization of robotic solid phase peptide synthesis in
micromolar scale

Ihor Fesina

Master thesis

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Ihor Fesina**
Osobní číslo: **C20578**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Organická chemie**
Téma práce: **Optimalizace robotických syntéz peptidů na pevném nosiči v mikromolárním měřítku**
Téma práce anglicky: **Optimization of robotic solid phase peptide synthesis in micromolar scale**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši, ve které shrnete strategie pro syntézu peptidů na pevné fázi (SPPS). Zaměřte se též na využití robotických syntetizátorů v této oblasti chemie.
2. Připravte alespoň 3 standardy oligopeptidů, které využijete k optimalizaci syntéz v měřítku 5 až 10 μmol .
3. Proveďte zkoumání procesních parametrů robotického syntetizátoru MultiPep RSi.
4. Proveďte s využitím přístroje MultiPep RSi ověřovací syntézy alespoň dvou peptidů sestávajících z více než deseti aminokyselin. K ověření využijte dříve optimalizované parametry pro měřítko 5 až 10 μmol .
5. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Jiří Váňa, Ph.D.**
Ústav organické chemie a technologie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Aleš Halama, Dr.**
APIGENEX s.r.o.

Datum zadání diplomové práce: **28. února 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc. v.r.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Ihor Fesina

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu práce doc. Ing. Jiřímu Váňovi, Ph.D. za odborné vedení, předání cenných, teoretických i praktických rad a zkušeností. Dále děkuji konzultantovi diplomové práce Ing. Aleši Halamovi, Ph.D. za veškerý čas, pečlivost a vstřícný přístup, které mi věnoval při tvorbě diplomové práce. Velmi děkuji společnosti Apigenex s.r.o. za poskytnutí zázemí, přístrojů a materiálu pro můj výzkum.

Děkují také Ing. Janu Duškovi, Ph.D. za cenné rady, podporu a motivaci. Děkuji ostatním pracovníkům za vytváření přátelské atmosféry v laboratoři a cenné připomínky.

Na závěr bych rád poděkoval Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za finanční podporu která umožnila mé studium na území České republiky.

NÁZEV

Optimalizace robotických syntéz peptidů na pevném nosiči v mikromolárním měřítku

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá optimalizací podmínek robotických syntéz peptidů v mikromolárním měřítku pomocí automatického syntetizátoru MultiPep RSi. K nastavení parametrů robotického syntetizátoru byly využity 4 standardy oligopeptidů. Jako standardy byly syntetizovány a izolovány v čisté formě oligopeptidy: oxytocin, vazopresin, ACP a jeden peptid s *ad hoc* navrženou sekvencí. Standardy byly purifikovány pomocí preparativní HPLC, jejich čistota a chemická struktura byla analyzována pomocí RP-UPLC, HRMS a HPLC-MS analýzy. Syntézy testovacích peptidů byly provedeny na syntetizátorech Symphony a LibertyBlue. Následně bylo provedeno zkoumání řady parametrů robotického syntetizátoru pro syntézu 4 testovacích peptidů za různých procesních podmínek. Na základě získaných poznatků byl navržen optimalizovaný protokol syntézy. Pomocí optimalizovaného postupu byla provedena úspěšná ověřovací syntéza dvou delších peptidů sestávajících z 15 a 21 aminokyselin.

KLÍČOVÁ SLOVA

Peptidy, syntéza na pevné fázi, SPPS, robotická syntéza, optimalizace procesů.

TITLE

Optimization of robotic solid phase peptide synthesis in micromolar scale.

ANNOTATION

This master's thesis deals with the optimization of robotic peptide synthesis conditions in micromolar scale using the automatic synthesizer MultiPep RSi. Four oligopeptide standards have been used to set the parameters of the robotic synthesizer. Oligopeptides: oxytocin, vasopresin, ACP, and one peptide with an *ad hoc* designed sequence have been synthesized and isolated in pure forms. The standards have been purified by preparative HPLC. Purity and chemical structure analysis were provided using RP-UPLC, HRMS and HPLC-MS analysis. Synthesis of the test peptides was performed using Symphony and LibertyBlue synthesizers. A number of robotic synthesizer parameters for the synthesis of the four test peptides under different process conditions have been investigated. Based on the acquired knowledge, an optimized synthesis protocol has been designed. Using an optimized procedure, a successful validation synthesis of two longer peptides consisting of 15 and 21 amino acids has been performed.

KEYWORDS

Peptides, solid phase peptide synthesis, SPPS, robotic synthesis, process optimization.

Seznam zkratek

Acm – acetamidometyl

ACN – acetonitril

AcOH – kyselina octová

ACP – acyl carrier protein

Alloc – allyloxykarbonyl

AMK – aminokyselina

Bn – benzyl

Boc – *tert*-butyloxykarbonyl

Cbz – benzyloxykarbonyl

Da – dalton

DCC – *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid

DCM – dichlormethan

DIC – *N,N'*-diisopropylkarbodiimid

DMAP – 4-dimethylaminopyridin

DMF - dimethylformamid

DMSO - dimetylsulfoxid

DTT - dithiotreitol

EDC – *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid

ESI – elektrosprejová ionizace

Fmoc – 9-fluorenylmetyloxykarbonyl

GLP – glucagon like peptid

HATU – 1-[bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát

HBTU – 3-[bis(dimethylamino)methylum-1-yl]-3*H*-benzotriazol-1-oxid hexafluorofosfát

HCl – kyselina chlorovodíková

HCTU – *O*-(1*H*-6-chlorobenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát

HF – kyselina fluorovodíková

HOAt – 1-hydroxy-7-azabenzotriazol

HOBt – 1-hydroxybenzotriazol

HPLC-MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

ivDde – 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxoclohexyl-1-ylidene)-3-isovaleryl

LPPS – Liquid Phase Peptide Sythhesis – syntéza peptidů v roztoku

MALDI – matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
MBTE – methyl-*terc*-butylether
MS – hmotnostní spektrometrie
OEG – 2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetyl
Oxyma – ethyl 2-kyano-2-(hydroxyimino)acetát
Pbf – 2,2,4,6,7 – pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-
PEG-PS – polyetylglykol-polystyren
pI – izoelektrický bod
Pmc – 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl
p-TsOH – kyselina *p*-toluensulfonová
PyBop – benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinofosfonium hexafluorofosfát
SPPS – Solid Phase Peptide Synthesis - syntéza peptidů na pevném nosiči
*t*Bu – *terc*-butyl
TFA – kyselina trifluoroctová
TIS – triisopropylsilan
t_R – retenční čas
Trt – trityl
UV – ultrafialové záření

Obsah

1	Úvod	13
2	Teoretická část	15
2.1.	Chemické syntézy peptidů	15
2.1.1.	Syntéza peptidů v roztocích (LPPS).....	16
2.1.2.	Syntéza peptidů na pevném nosiči (SPPS).....	18
2.2.	Aminokyseliny a ochranné skupiny	21
2.2.1.	Chránění karboxylové funkční skupiny (C-konec)	23
2.2.2.	Chránění α -aminoskupiny (N-konec).....	24
2.2.3.	Chránění funkčních skupin bočního řetězce.....	25
2.3.	Pevné nosiče.....	26
2.3.1.	Jádra pevných nosičů.....	27
2.3.2.	Linkery s funkčními skupinami.....	28
2.4.	Kondenzační činidla používaná při syntéze peptidů	29
2.5.	Štěpení peptidu z pevného nosiče	33
2.6.	Vedlejší reakce při syntéze peptidu na pevném nosiči.....	35
2.6.1.	Racemizace aminokyselin	35
2.6.2.	Vedlejší reakce probíhající při konstrukci peptidového řetězce.....	36
2.6.3.	Vedlejší reakce probíhající při štěpení peptidu z pevného nosiče.....	37
2.6.4.	Oxidace methioninu a cysteinu	39
2.7.	Modifikace peptidů	40
2.7.1.	Cyklické peptidy.....	40
2.7.2.	Alternativní stavební bloky pro syntézu peptidů.....	41
2.7.3.	Boční řetězce	42
2.8.	Purifikace, izolace a analytické hodnocení peptidů	43
2.9.	Biologicky významné peptidy a peptidová terapeutika	44
2.10.	Robotická syntéza peptidů na pevném nosiči	47

3	Cíl práce.....	50
4	Experimentální část	51
4.1	Charakterizace, rozpouštědla a činidla.....	52
4.2	Obecné metody syntézy peptidů	54
4.2.1	Obecná metoda SPPS na syntetizátoru Symphony	54
4.2.2	Obecná metoda SPPS na syntetizátoru Liberty Blue	54
4.2.3	Obecná metoda cleavage peptidu z resinu.....	55
4.3	Vlastní syntéza standardů peptidů.....	55
4.3.1	Syntéza standardu pep01 (acyl carrier proteinu (ACP)).....	55
4.3.2	Syntéza standardu pep02 (otevřená forma oxytocinu)	55
4.3.3	Syntéza standardu pep03 (otevřená forma vazopresinu).....	56
4.3.4	Syntéza standardu pep04	56
4.3.5	Syntéza standardu pep05	57
4.3.6	Syntéza standardu pep06	57
4.3.7	Syntéza standardu pep07 (cyklická formy oxytocinu)	57
4.3.8	Syntéza standardu pep08 (cyklická forma vazopresinu)	58
4.3.9	Syntéza standardu pep09	58
4.4	Obecné metody syntézy peptidů v mikromolárním měřítku.....	59
4.4.1	Obecná metoda SPPS v mikromolárním měřítku na syntetizátoru MultiPep RSi ...	59
4.4.2	Obecná metoda cleavage peptidu z resinu v mikromolárním měřítku	59
4.5	Syntéza peptidů v mikromolárním měřítku.....	59
4.5.1	Syntéza testovacích peptidů pep01, pep02, pep03, pep04	59
4.5.2	Syntéza peptidu pep05.....	60
4.5.3	Syntéza peptidu pep06.....	61
4.5.4	Syntéza peptidu pep07 (cyklická forma oxytocinu).....	61
4.5.5	Syntéza peptidu pep08 (cyklická forma vazopresinu).....	62
4.5.6	Syntéza peptidu pep10 (γ -endorfin)	62

4.5.7	Syntéza peptidu pep11 (kassinin).....	62
5	Výsledky a diskuse	63
5.1	Testovací parametry	63
5.2	Vliv testovaných parametrů robotické syntézy	64
5.2.1	Vliv času cleavage	64
5.2.2	Vliv aktivačního činidla a báze	66
5.2.3	Vliv přebytku aminokyselin a double couplingu.....	66
5.2.4	Vliv cappingu	67
5.3	Návrh optimální metody robotické syntézy na syntetizátoru MultiPep RSi	69
5.4	Ověření navržené optimální metody syntézou delších peptidů.....	69
5.5	Ostatní syntézy peptidů	71
5.5.1	Syntéza Merriefildova peptidu	71
5.5.2	Syntéza cyklických peptidů	72
5.5.3	Syntéza peptidů obsahujících methionin	73
6	Závěr.....	76
7	Seznam použité literatury	77
8	Přílohy	79

1 Úvod

Peptidy jsou významnými přírodními látkami, které nalezneme v každém živém organismu. Z chemického hlediska se jedná o organické sloučeniny sestávající z řady α -aminokyselin spojených peptidovými vazbami do podoby makromolekul různé velikosti a molekulové hmotnosti. Řetězce sestávající od dvou do deseti α -aminokyselin se označují jako oligopeptidy. Řetězce vytvořené z více než jednoho sta α -aminokyselin se již považují za bílkoviny. Oligopeptidy se vyznačují molekulovými hmotnostními od stovek do nízkých tisíců Da. Nejvyšší molekulové hmotnosti peptidů s maximální délkou řetězce nabývají hodnot kolem deseti tisíc Da. Peptidy mají velmi často důležité biologické funkce a mohou mít i komerční využití. Znamé peptidy nalezneme jako součásti humánních i veterinárních léčiv, složek kosmetických přípravků, řady hormonů, ale třeba i mnoha toxinů v živočišné i rostlinné říši.

Od nástupu inzulínové terapie ve 20. letech 20. století hrají peptidová terapeutika významnou roli v lékařské praxi. Ve Spojených státech a na dalších hlavních trzích je schváleno pro použití v humánní medicíně více než 60 peptidových léků. Více než 170 molekul na bázi peptidů vstoupilo do klinických studií.^[1] Peptidová léčiva již dávno nejsou limitována endogenními lidskými peptidy, zahrnují širší škálu struktur identifikovaných z jiných přírodních zdrojů nebo byly syntetizovány s využitím modelů vytvořených pomocí medicínské chemie.

Prvním syntetickým peptidem byl dipeptid glycidyl glycin syntetizovaný roku 1901 nositelem Nobelovy ceny Emilem Fisherem. S ohledem na obecný význam peptidů došlo v průběhu let k intenzivnímu rozvoji chemie peptidů. Moderním způsobem přípravy peptidů je syntéza peptidů na pevné fázi, kterou poprvé v roce 1963 aplikoval další nositel Nobelovy ceny Robert Bruce Merrifield. Pomocí této strategie lze relativně snadno a rychle připravit modifikované peptidy libovolné délky řetězce a struktury. Významnou výhodou přináší automatizace syntéz s využitím robotických syntetizátorů, které umožňují i paralelní syntézy mnoha strukturně odlišných peptidů současně. Volit lze podle potřeby i různá měřítka robotických syntéz. Pro vyhledávací výzkum nových biologicky aktivních látek jsou dostačující velmi malá měřítka, například syntézy v mikromolárním měřítku, které jednak šetří drahé suroviny, jednak laboratorní čas pro získání rozsáhlých chemických knihoven, tj. souborů nově generovaných chemických struktur a jejich vlastností.

Na příkladu peptidů lze ukázat obrovský rozsah takových knihoven. Pokud kombinujeme 20 přírodních aminokyselin do podoby dipeptidů, získáme chemickou knihovnu sestávající z 20^2 různých dipeptidů, tj. 400 sloučenin. Pokud kombinujeme 20 přírodních aminokyselin do

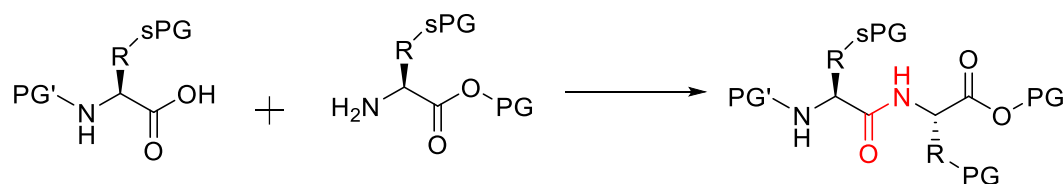
podoby tripeptidů, připravíme knihovnu o 20^3 různých tripeptidů, tedy 8000 sloučenin. K obtížně představitelnému číslu dojdeme v případě peptidů o délce řetězce vytvořeného ze 100 aminokyselin. V tomto případě se dostáváme k číslu 20^{100} peptidů s odlišnou strukturou. V registrech americké chemické společnosti bylo v roce 2018 zaznamenáno “pouhých” 130 milionů organických a anorganických sloučenin a více než 64 milionů proteinů a sekvencí nukleových kyselin. V součtu tak bylo v registrech “pouze” kolem 2×10^8 sloučenin.

Cílem diplomové práce je optimalizace robotických syntéz peptidů na pevném nosiči v mikromolárním měřítku. Práce na syntézách peptidů je plánována s přístrojem MultiPep RSi ve vlastnictví firmy APIGENEX s.r.o., který je provozován v laboratoři centra pro výzkum a vývoj peptidů a malých molekul v Pardubicích Rybitví. Jedná se přitom o jediné zařízení svého druhu v ČR. Nalezené poznatky by v optimálním případě měly přispět k vyšší efektivitě tvorby peptidových knihoven a v konečném důsledku k účinnému vyhledávání kandidátů peptidových terapeutik.

2 Teoretická část

2.1. Chemické syntézy peptidů

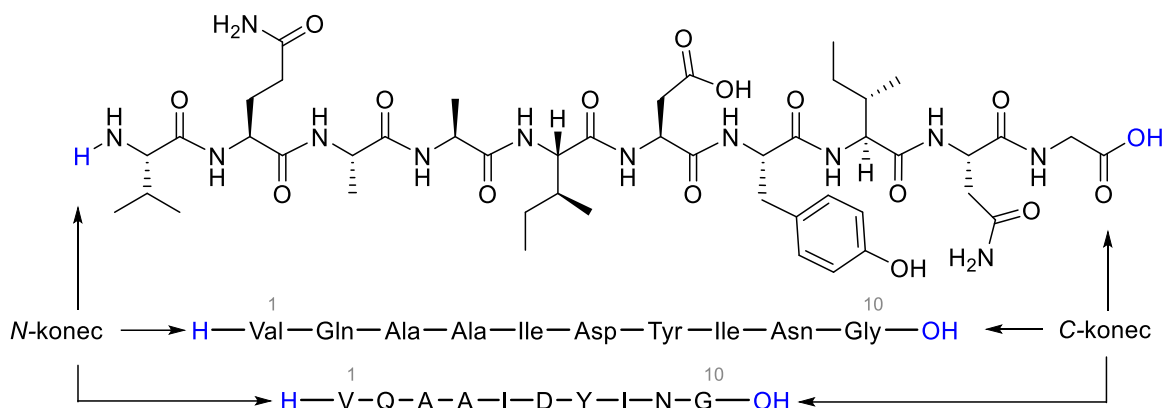
Chemické syntézy peptidů úzce souvisí s pojmem peptidová vazba. V biologických systémech se tato vazba vytváří v procesu proteosyntézy.^[2] V chemické syntéze dochází ke vzniku této vazby při kondenzační reakci, kdy aminoskupina jedné α -aminokyseliny reaguje s karboxylovou skupinou druhé α -aminokyseliny za současného odštěpení molekuly vody. Aby tato kondenzační reakce byla jednoznačná, musejí být vhodně ochráněny jak α -karboxylová skupina první aminokyseliny, tak α -aminoskupina druhé aminokyseliny (Schéma 1). V případě, že některá z aminokyselin obsahuje další funkční skupiny na postranním řetězci, musí být ochráněny i tyto skupiny. Navzájem nezávislé chránění jednotlivých funkčních skupin aminokyselin se označuje jako ortogonální chránění. Bez užití dobře navržené strategie ortogonálního chránění by docházelo k uplatnění všech teoreticky možných reakčních kombinací, tj. ke vzniku směsi mnoha látek. Chemická syntéza peptidů s cílenou strukturou by tak byla prakticky neproveditelná.^[3]



PG – chránící skupina karboxylové funkční skupiny, PG' – chránící skupina α -aminoskupiny,
sPG - chránící skupina funkční skupiny postranního řetězce.

Schéma 1. Vznik peptidové vazby

Konec peptidu s volnou α -aminoskupinou se označuje *N*-konec, opačný konec peptidu ukončený skupinou -COOH, případně -CONH₂ se označuje jako *C*-konec. Peptid se čísluje od *N*- k *C*- konci. Chemickou strukturu peptidu můžeme popsat pomocí konvenčního strukturního vzorce. Pro přehlednost popisu struktury se dává přednost vzorcům, kdy jsou aminokyseliny dle dohodnutých konvencí popsány pomocí třípísmenkových nebo jednopísmenkových kódů. Pro programování robotických syntéz se z praktických důvodů používají kódy jednopísmenkové (Obrázek 1).^[3]



Obrázek 1. Vzorec ACP (Acyl Carrier Protein)

Chemické syntézy peptidů lze kontrolovaně provádět pomocí dvou základních strategií. První se nazývá Syntéza peptidů v roztocích nebo také syntéza peptidů v kapalně fázi (Liquid Phase Peptide Synthesis, ve zkratce **LPPS**). Druhá strategie se nazývá syntéza peptidů na pevném nosiči nebo také Syntéza peptidů na pevné fázi (Solid Phase Peptide Synthesis, ve zkratce **SPPS**).

2.1.1. Syntéza peptidů v roztocích (LPPS)

Vznik amidické vazby, která je obecnější variantou vazby peptidické, tj. vazby mezi karboxylovou skupinou a aminoskupinou, je formálně kondenzační reakce spojená s odštěpením molekuly vody. Při smíchání aminu s karboxylovou kyselinou se nejprve odehrává acidobazická reakce za tvorby amoniové soli. Pro vytvoření amidické vazby v následném kroku musí být překonána velká termodynamická bariéra. Přímá reakce amoniové soli směrem k amidu (Schéma 2) může být dosažena pouze za vysoké teploty (~160-180 °C), což je experimentálně nepraktické a hrozí nežádoucí reakce přítomných funkčních skupin.^[4]

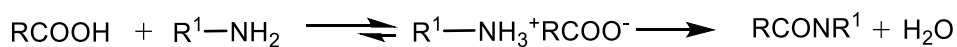


Schéma 2. Amidační reakce

Pro úspěšné překonání termodynamické bariéry směrem k amidu je nutné zvýšit elektrofilitu karboxylové funkční skupiny pro snadnější atak nukleofilní aminoskupiny. Toho lze dosáhnout zavedením elektron akceptorní odstupující skupiny, např. —Hal nebo —OR namísto OH skupiny v původní karboxylové skupině. Amidační reakce je v takovém případě umožněna vhodnou aktivací karboxylové kyseliny (Schéma 3).^[4,5]



Schéma 3. Průběh amidační reakce přes aktivační stupeň

Většina syntéz peptidů v roztocích se provádí směrem od C- k N- konci, přes stupeň deprotektce aminoskupiny, který by měl probíhat za mírných podmínek, aby nedocházelo k nežádoucím vedlejším reakcím. Zbývající ochranné skupiny se odstraňují v posledním kroku syntézy (Schéma 4).^[6,7]

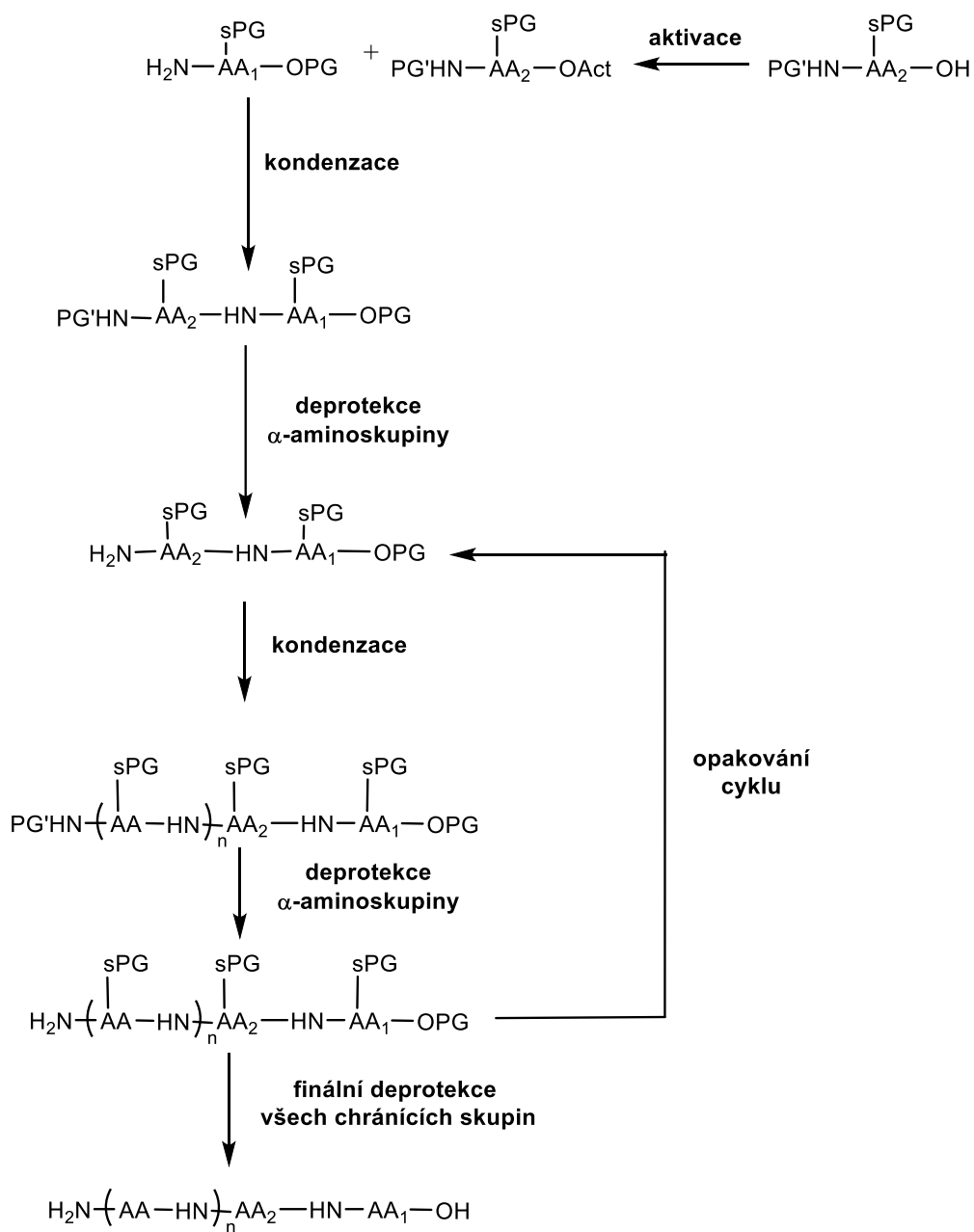


Schéma 4. Strategie syntézy peptidů v roztoku

Provedení syntézy peptidů v roztocích umožňuje izolaci, analýzu a purifikaci meziproductů po každém kroku syntézy. Strategie LPPS dále umožňuje provedení paralelní syntézy, která poskytuje obecně lepší výtěžky než syntézy lineární. LPPS může být provedena v širokém rozsahu měřítek, avšak s rostoucí délkou peptidu neúměrně roste náročnost purifikace, která je doprovázena ztrátou hmoty. Nicméně syntéza v roztoku nachází využití v průmyslovém měřítku k produkci krátkých peptidů (do 15 AMK).^[3,8]

2.1.2. Syntéza peptidů na pevném nosiči (SPPS)

V roce 1963 byl Robertem Merrifildem popsán inovativní přístup pro syntézu peptidů na pevné fázi (SPPS),^[9] který se stal jedním z nejlepších nástrojů pro syntézu peptidů libovolného složení a délky řetězce. Tato technika přinesla autorovi v roce 1984 Nobelovou cenu za *‘Vývoj metodologie chemické syntézy na pevném nosiči’*.^[10]

Syntéza na pevné fázi je založena na zakotvení peptidového řetězce na nerozpustný polymerní nosič. Tato technika má řadu výhod oproti syntéze peptidů v roztocích. Oddělení peptidů od rozpustných reagentů a rozpouštědel se jednoduše provádí filtrací a následně promytí rozpouštědlem, což vyžaduje méně času a práce než zpracování meziproductů syntézy v roztoku. Navíc strategie SPPS využívá stejné, opakující se operace, které lze jednoduše automatizovat pomocí široké škály robotické instrumentace.^[6,9,11]

Po naprogramování aminokyselinové sekvence a zvolení parametrů syntézy mohou stroje automaticky provádět všechny kroky syntézy potřebné k přípravě peptidu. Kromě toho lze měnit přebytek reagentů pro dosažení optimálních výtěžků v každém reakčním kroku. Ztráty meziproductů jsou minimální díky pevnému připojení rostoucího peptidového řetězce na polymerní nosič. Slabou stránkou tohoto přístupu je absence vhodných analytických technik používaných pro kontrolu průběhu reakce.^[6]

Princip SPPS je popsán ve Schématu 5. První aminokyselina je zakotvena na polymerní nosič přes vhodný linker. Veškeré funkční skupiny bočních řetězců používaných aminokyselin musí být ochráněné ‘permanentními’ chránícími skupinami, což znamená, že musí zůstat neporušené za reakčních podmínek během konstrukce celého peptidového řetězce. Dále se provádí selektivní ochránění α -aminoskupiny, na kterou se zavádí další aminokyselina kondenzační reakcí. Mezi jednotlivými kroky se z pevné fáze, která již obsahuje část nebo celý budovaný řetězec peptidu, vymyjí přebytky reaktantů pomocí opakovaných promytí vhodnými rozpouštědly.

Dalším krokem je ochránění chránící skupiny z *N*-konce výsledného dipeptidu a navázání další aminokyseliny přes stupeň její aktivace převedením na aktivní ester. Cykly

sestavající z deprotekcí a kondenzací jsou opakovány do dosažení požadované sekvence. Finálním stupněm syntézy je uvolnění peptidu z nerozpustného pevného nosiče do roztoku a deprotekcí všech ‘permanentních’ chránících skupin. Tento krok se provádí najednou a nazývá se štípání nebo též „cleavage“.^[6]

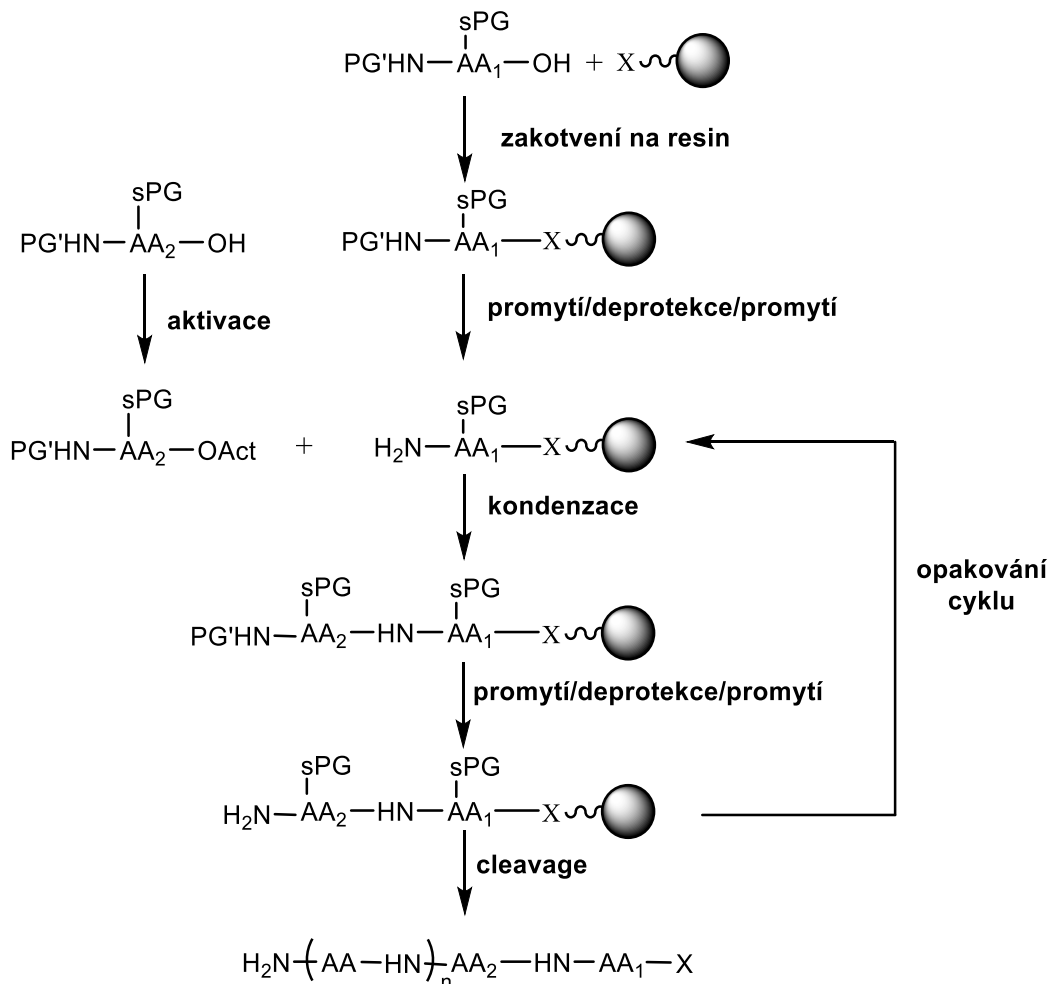


Schéma 5. Strategie syntézy peptidů na pevné fázi. AA-aminokyselina, PG – chránící skupina, sPG – chránící skupina postranního řetězce, OAct – aktivní derivát karboxylové skupiny, ●-resin, X-funkční skupina linkeru.

V závislosti na typu aplikovaného ortogonálního chránění a technického provedení celého procesu SPPS existují dvě základní metodiky. Dříve používaná metoda se označuje jako Boc/Bn SPPS. V současné době dominantní metoda se označuje jako Fmoc/*t*Bu SPPS. Používané značení odkazuje na názvy dočasných *N*-koncových ochranných skupin (Boc/Fmoc chránící α -aminoskupinu) a nejvíce užívaných permanentních ochranných skupin postranních řetězců (Bn/*t*Bu).^[7]

Boc/Bn SPPS metoda byla poprvé použita Merrifieldem. Pro dočasné chránění α -aminoskupiny se používá skupina *tert*-butyloxykarbonyl (Boc), kterou lze odstranit

působením silné kyseliny, zejména TFA. Výsledná trifluoroacetátová sůl se neutralizuje bázi (DIPEA) před kondenzačním stupněm nebo *in situ* během deprotektce. Funkční skupiny postranního řetězce se ochraňují benzyl skupinou (Bn) nebo od benzylu odvozenými permanentními chránícími skupinami. Permanentní ochranné skupiny a vazba peptid polymerní nosič se štěpí kyselinou fluorovodíkovou na konci celé syntézy (Schéma 6).^[12]

Tato metoda je dobře fungujícím nástrojem pro syntézu peptidů a malých proteinů, avšak nutnost použití toxického i korozivního HF a speciálního teflonem potaženého aparátu brání širokému využití tohoto přístupu, zejména v robotických syntézách. Kromě toho mohou extrémní chemické podmínky způsobit nevratné změny ve struktuře peptidů s citlivými sekvencemi. Strategie Boc/Bn také není zcela ortogonální, protože se deprotektce jak dočasných, tak permanentních skupin provádí za obdobných, tj. kyselých podmínek. Přestože se Boc/*t*Bu SPPS používá dodnes, její význam je již pouze okrajový.^[6,7]

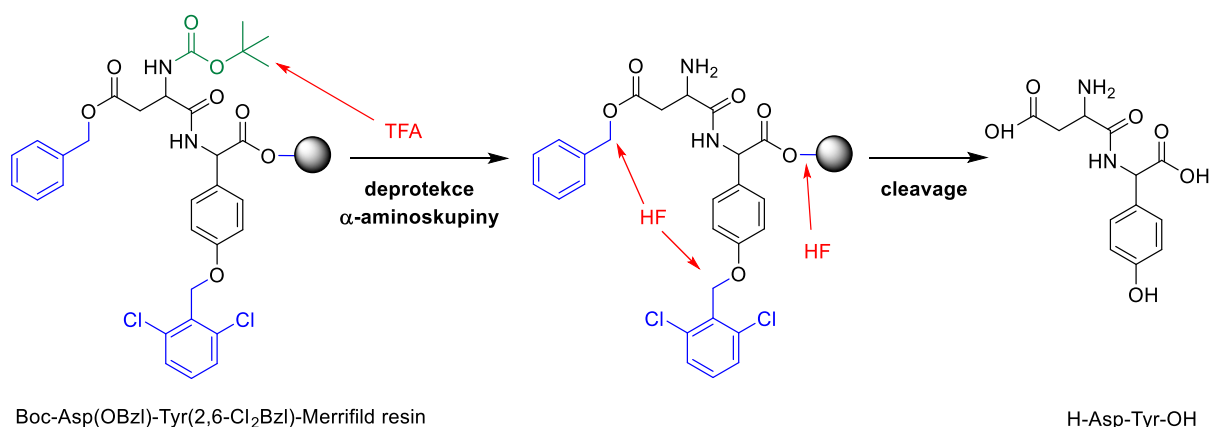


Schéma 6. Princip Boc/Bn SPPS strategie

V 70 letech minulého století byla pro chránění α -aminoskupiny v syntézách peptidů na pevném nosiči použita skupina 9-fluorenylmethoxykarbonyl (Fmoc)^[13]. Deprotektce této skupiny probíhá pomocí nukleofilních bází jako jsou piperidin, morfolin nebo piperazin. Permanentní ochranné skupiny funkčních skupin postranních řetězců a vazba peptid linker jsou labilní vůči kyselinám, a nikoliv vůči nukleofilním bázím (Schéma 7). Tím bylo dosaženo ortogonálního chránění při užití Fmoc versus Boc nebo Trt ochranných skupin. V metodě Fmoc/*t*Bu SPPS se štěpení peptidů z resinu a odchránění permanentních ochranných skupin (Boc, Trt, Pbf) provádí pomocí TFA o koncentraci až 95 % s přidávkem scavengeru. Výhodou této strategie je, že dočasné a permanentní ochranné skupiny jsou ortogonální a odstraňují se zcela odlišnými mechanismy. Není nutno pracovat s kyselinou fluorovodíkovou a není potřeba speciální a drahé teflonové vybavení. Kromě toho eliminace opakujících se kroků acidolýzy dočasných ochranných skupin (Boc v Boc/*t*Bu strategii) umožňuje syntézu peptidů, které jsou

náchylné k vedlejším, kyselým katalyzovaným reakcím. Celkově vzato, toto jsou nejzřetelnější důvody pro popularitu přístupu Fmoc/*t*Bu SPPS, který je aktivně využíván v laboratořích po celém světě.^[3,7]

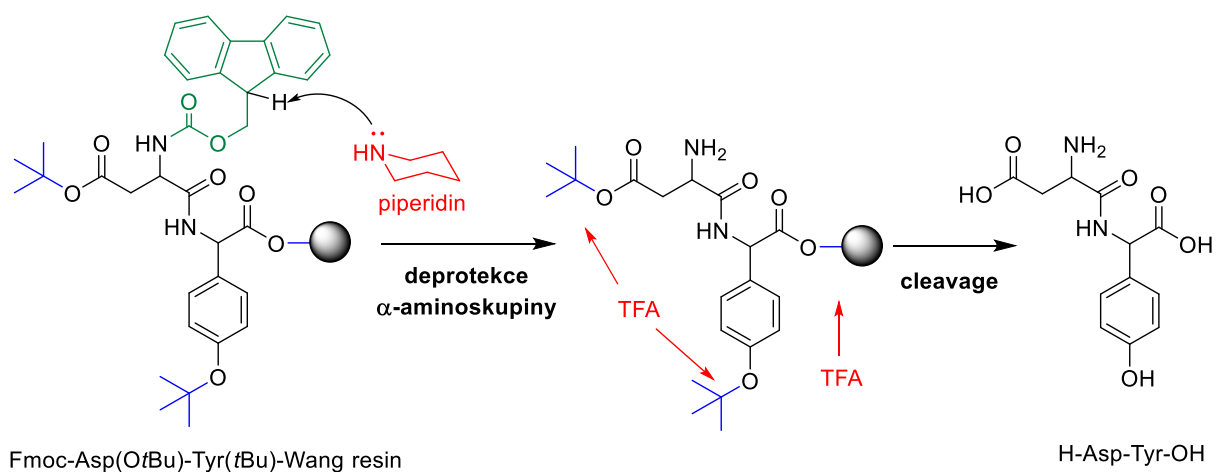
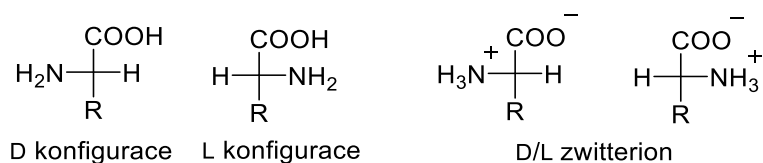


Schéma 7. Princip Fmoc/*t*Bu SPPS strategie

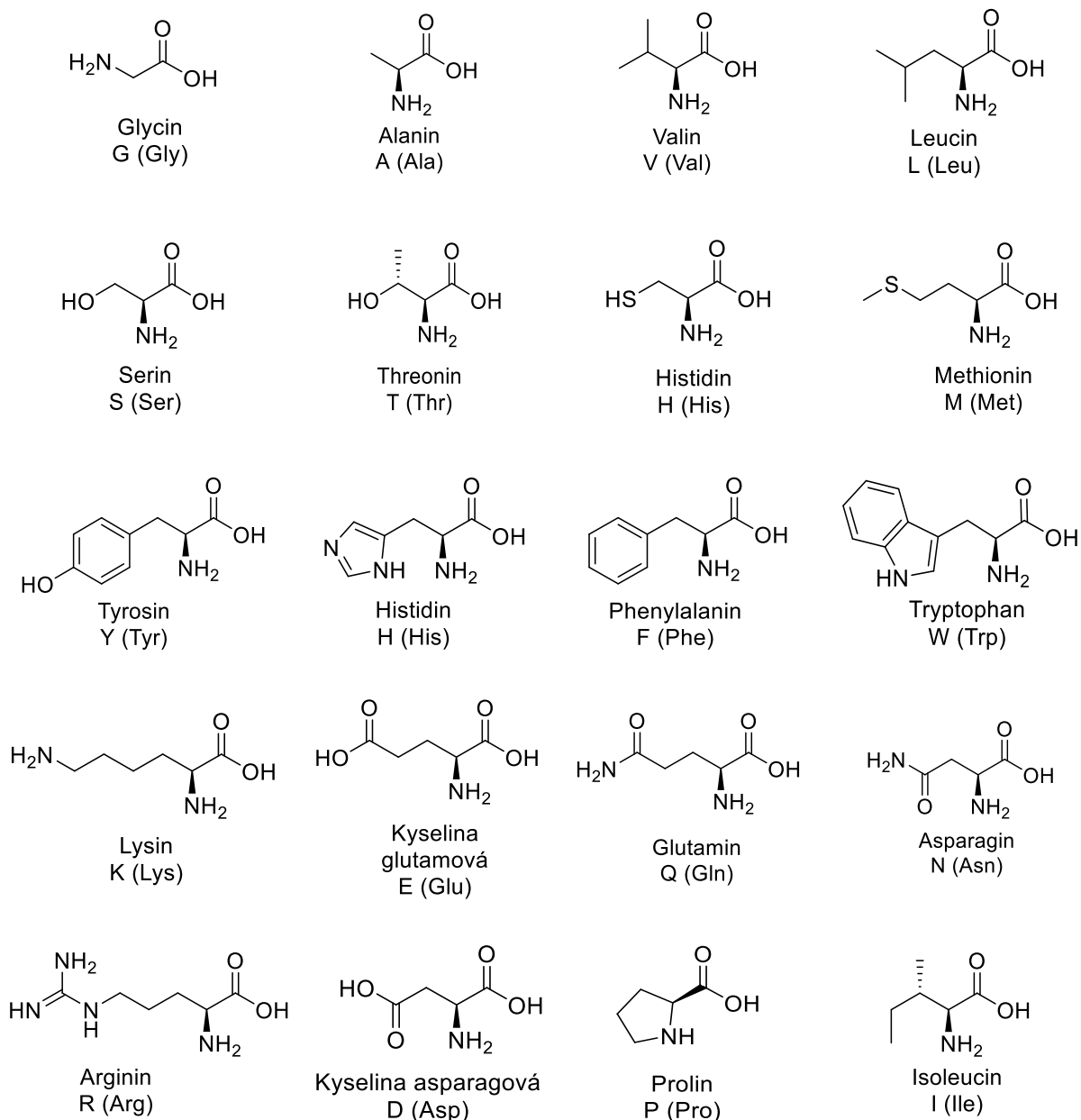
2.2. Aminokyseliny a ochranné skupiny

Aminokyseliny jsou organické sloučeniny, které obsahují aminoskupinu (-NH₂) a karboxylovou funkční skupinu (-COOH). Základními stavebními kameny peptidů a proteinů jsou α-aminokyseliny obsahující aminoskupinu a karboxylovou skupinu navázanou na uhlík v poloze α (Obrázek 2). S výjimkou glycinu mají α-aminokyseliny alespoň jedno asymetrické uhlíkové centrum a mohou tak existovat ve formě dvou enantiomerů, které se obvykle označují L a D. Přírodní aminokyseliny, které jsou součástí živočišných peptidů, mají vždy konfiguraci L. Boční řetězec aminokyselin může být aromatický, alifatický nebo heterocyklický.



Obrázek 2. Vzorce α-aminokyseliny s D a L konfigurací a její vnitřní soli

Hydrolyzami proteinů byl izolován soubor dvaceti L-α-aminokyselin, které se nazývají proteinogenní (Obrázek 3). Tyto aminokyseliny mají kromě svých triviálních názvů označení tří písmennými anebo jedno písmennými symboly.

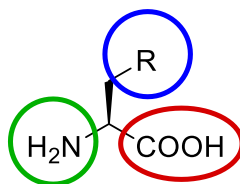


Obrázek 3. Vzorce přírodních L aminokyseliny a jejich označení

V roztocích aminokyselin existuje mezi aminoskupinou a karboxylovou skupinou protonová rovnováha. Hodnota pH, při které se aminokyselina nachází ve formě vnitřní soli, takzvaného zwitterionu, se nazývá isoelektrický bod (pI). Při dosažení isoelektrického bodu ve vodných roztocích vykazují aminokyseliny nejmenší rozpustnost. Isoelektrický bod leží v případě aminokyselin, které mají dvě disociovatelné skupiny, uprostřed hodnot pK pro příslušnou karboxylovou kyselinu $pK(\text{COOH})$ a pro amonnou sůl $pK(\text{NH}_3^+)$ ^[3,14]:

$$pI = \frac{pK(\text{COOH}) + pK(\text{NH}_3^+)}{2}$$

Pro účely syntézy peptidů je nutné používat ve struktuře aminokyselin chránící skupiny, které mají bránit nežádoucím vedlejším reakcím. V aminokyselině musí být ochráněné karboxylová skupina, α -aminoskupina a reaktivní skupiny postranního řetězce (Obrázek 4).^[6,7]



Obrázek 4. Místa chránění ve struktuře α -aminokyselin.

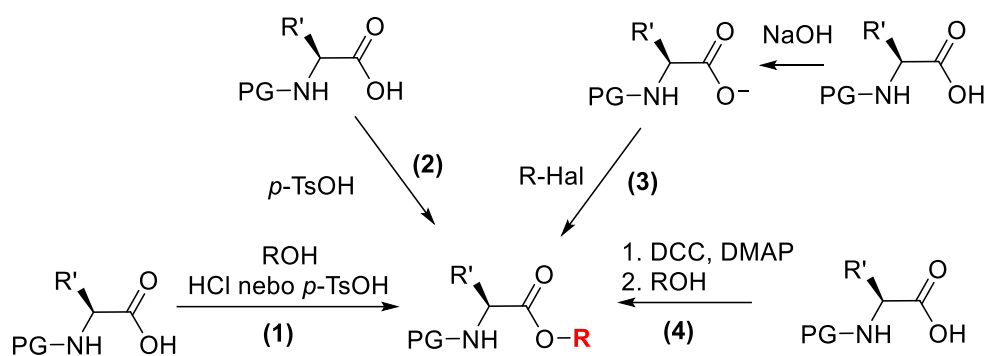
Chránící skupiny musejí splňovat následující požadavky:

- Jednoduché zavedení a selektivní deprotektce.
- Stabilita za reakčních podmínek.
- Ortogonalita – možnost selektivního odchránění jedné funkční skupiny, při zachování jiných chránících skupin.^[7,15]

2.2.1. Chránění karboxylové funkční skupiny (C-konec)

Syntetické strategie SPPS a LPPS se krom jiného liší ve způsobu chránění C-koncové karboxylové kyseliny. V případě SPPS působí zakotvení koncové aminokyseliny na pevný nosič zároveň jako ochrana karboxylové funkční skupiny. Popis běžně používaných pevných nosičů je součástí kapitoly 2.3. V případě syntéz v roztocích se chránění karboxylové skupiny provádí těmito metodami (Schéma 8):

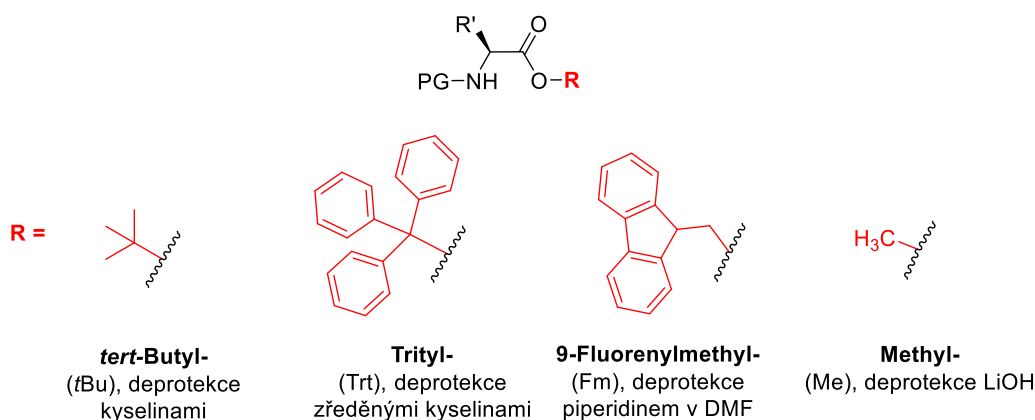
- 1) Převedení aminoskupiny na ester reakcí s alkoholem za kyselé katalýzy (obvykle HCl nebo *p*-TsOH).
- 2) Převedení na *tert*-butyl ester reakcí s isobutenem za kyselé katalýzy (obvykle H₂SO₄ nebo *p*-TsOH).
- 3) Reakce chráněné aminokyseliny s alkyl halogenidem v přítomnosti báze.
- 4) Reakce chráněné aminokyseliny s aktivačním činidlem (DCC) za bazické katalýzy (DMAP) a následné převedení na ester reakcí s alkoholem.



R-ochranná skupina karboxylové skupiny, PG - ochranná skupina α -aminoskupiny

Schéma 8. Chránění karboxylové funkční skupiny aminokyseliny pro LSSP

Chránicí skupiny jsou uvedeny na Obrázku 5.

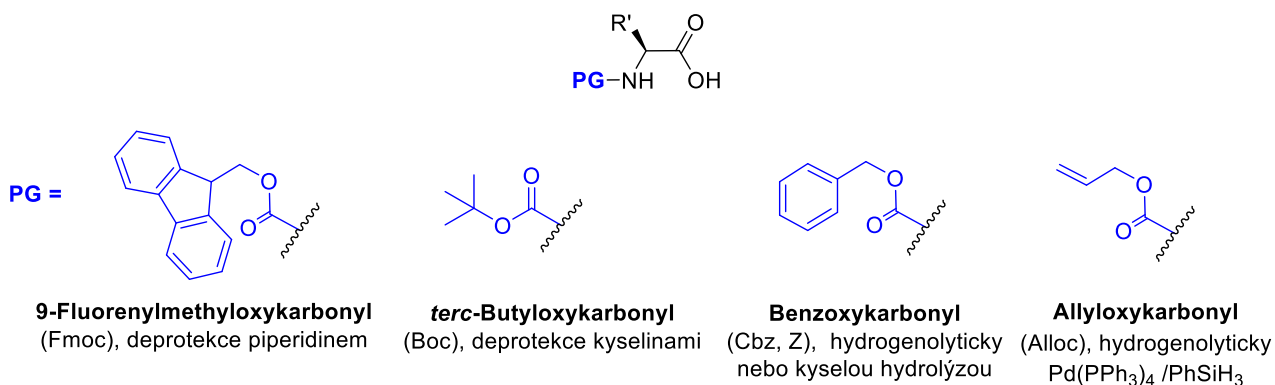


Obrázek 5. Chránicí skupiny pro karboxylovou funkční skupinu

2.2.2. Chránění α -aminoskupiny (*N*-konec)

Protektce α -aminoskupiny je jedním z typických znaků moderní peptidové chemie a je nezbytná k prevenci polymerace aktivované aminokyseliny. Kvůli tomu, že se peptidy běžně syntetizují od *C*- k *N*- konci, tak se aminoskupiny odchráňují vždy před každým kondenzačním stupněm. Proto musí deprotektce probíhat snadno, selektivně a rychle. Během deprotektce aminoskupiny nesmí dojít k odchránění dalších chránících skupin a štěpení peptidové vazby. Chráněná aminokyselina, případně peptid, musí být zároveň dobře rozpustný v běžných rozpouštědlech a vedlejší produkty deprotektce by měly být snadno odstranitelné.

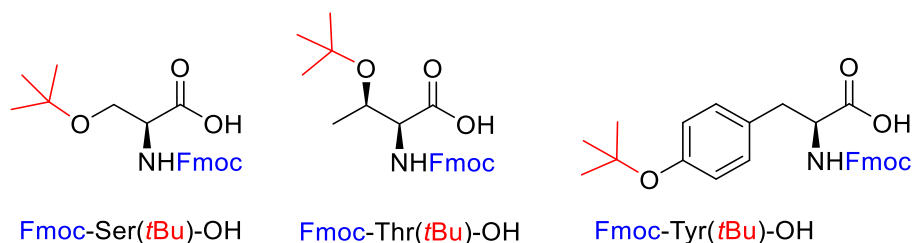
Jako ochranné skupiny α -aminoskupin jsou v případě SPPS běžně využívány 9-florenylmethoxykarbonyl (Fmoc) a *tert*-butyloxykarbonyl (Boc). V syntézách probíhajících v roztocích se například využívají skupiny benzoxykarbonyl (Cbz, Z) a allyloxykarbonyl (Alloc), které jsou znázorněné na Obrázku 6.



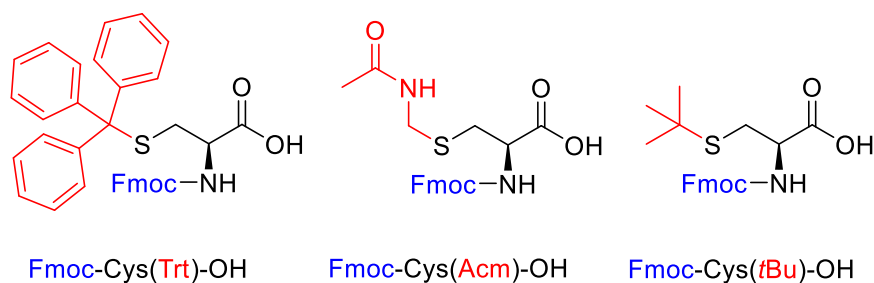
Obrázek 6. Chránící skupiny pro α -aminovou funkční skupinu

2.2.3. Chránění funkčních skupin bočního řetězce

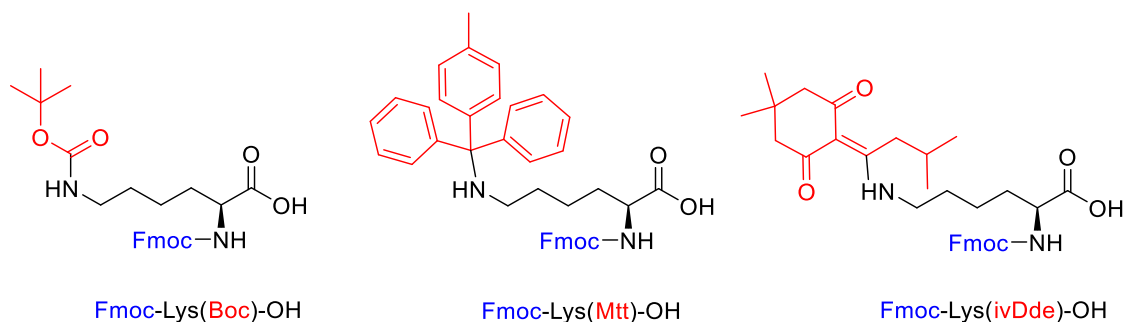
Některé aminokyseliny mají v postranním řetězci reaktivní skupiny, které je třeba ortogonálně chránit po celou dobu konstrukce peptidového řetězce. Jedná se zejména o skupinu -OH v případě aminokyselin serinu, threoninu a tyrosinu (Obrázek 7). Dále o skupinu -NH₂ v případě lysinu (Obrázek 8), -SH v případě cysteinu (Obrázek 9), -COOH v případě kyseliny asparagové a glutamové, -CONH₂ v případě asparaginu a glutaminu (Obrázek 10). Speciální případy chráněných skupin představují aminokyseliny arginin (chránění dusíku guanidinové skupiny), histidin (chránění dusíku imidazolového heterocyklu) a tryptofan (chránění dusíku indolového heterocyklu), viz Obrázek 11.



Obrázek 7. Chránění funkční skupiny -OH na postranním řetězci aminokyselin

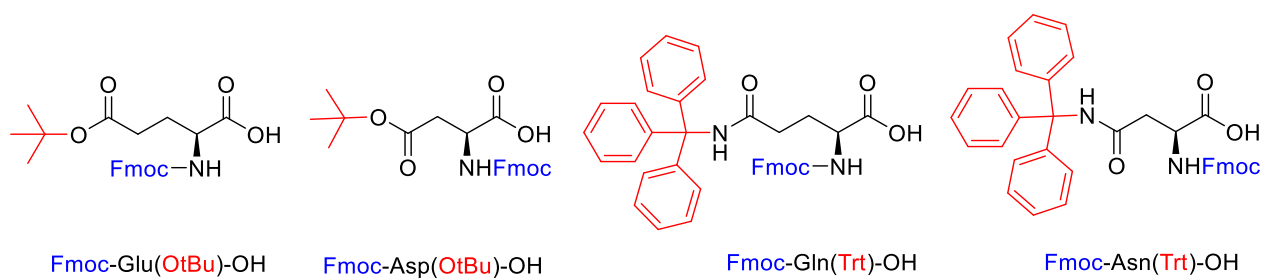


Obrázek 8. Chránění funkční skupiny -SH na postranním řetězci cysteinu

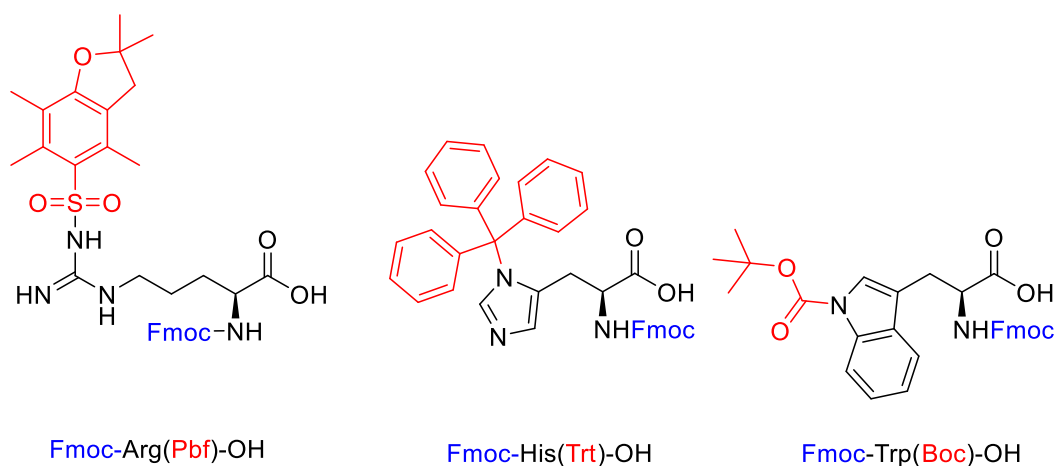


ivDde = 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxoclohexyl-1-ylidene)-3-isovaleryl-

Obrázek 9. Chránění funkční skupiny $-NH_2$ na postranním řetězci lysinu



Obrázek 10. Chránění funkčních skupin $-COOH$ a $-CONH_2$ na postranním řetězci aminokyselin



Pbf = 2,2,4,6,7 - Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-

Obrázek 11. Chránění funkčních skupin Arg, His a Trp

2.3. Pevné nosiče

Merrifield definoval pevný nosič jako ve všech použitých rozpouštědlech nerozpustnou stabilní fyzikální formu, která může být odfiltrována a má funkční skupinu, na kterou lze navázat linker nebo stavební jednotku kovalentní vazbou. Pevnými nosiči jsou pryskyřice, které se nazývají resin / resiny (převzato z anglického jazyka). Resiny jsou používány v podobě inertních polymerních mikrokuliček, které sestávají ze dvou částí, polymerního jádra a

funkčního linkeru. Jádro resinu je obvykle polymer na bázi polyamidu, polystyren-polyetylenglykolu nebo samotného polyetylenglykolu. Názvy resinů jsou obvykle odvozené od typu linkeru nesoucího funkční skupinu, případně od jejich autorů.^[9]

Správně zvolený resin by měl splňovat tyto požadavky:

1. Mechanická a chemická stabilita.
2. Stabilita vůči změně teploty.
3. Funkční skupiny na povrchu musí být dobře solvatovány a přístupné pro reagentie.
4. Možnost navázání aminokyseliny na resin kovalentní vazbou.^[16]

2.3.1. Jádra pevných nosičů

Merrifieldův resin je kopolymer styrenu a divinilbenzenu, který je funkcionalizován chlormetylací. První aminokyselina je navazována esterovou vazbou. Syntéza Merrifieldova resinu je znázorněna na Schéma 9.

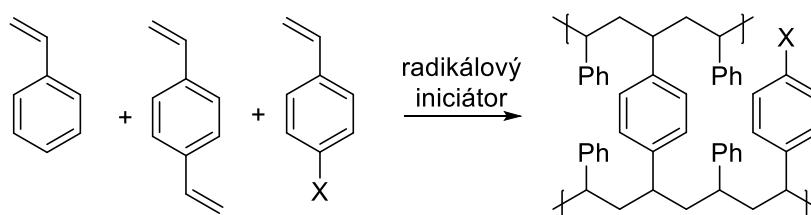
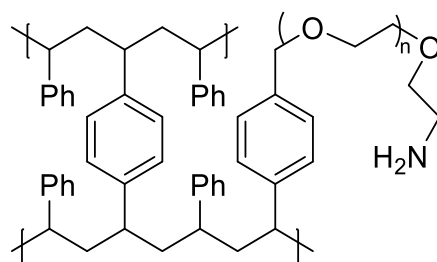


Schéma 9. Syntéza Merrifieldova resinu

Rozsah zesítnění ovlivňuje vlastnosti pryskyřice. Obvykle obsah zesíťovačla je 1-2 %, což zajišťuje hydrofóbnost resinu a jeho bobtnací schopnost. Bobtnání (anglicky swelling) je proces zvětšování objemu pryskyřice v rozpouštědle. Kvantitativně se vyjadřuje v mililitrech rozpouštědla, které dokáže absorbovat 1g resinu [ml/g]. Čím je tento poměr větší, tím více se zvětší objem pryskyřice a tím přístupnější budou aktivní centra pryskyřice.

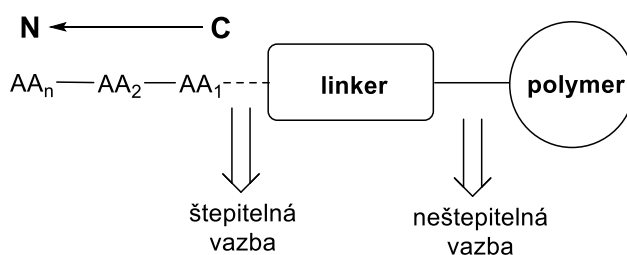
Bylo pozorováno, že rychlost kondenzace při SPPS je pomalejší než v roztoku a stupeň konverze se snižuje s rostoucí délkou peptidu na pevném nosiči. Aby se tento problém vyřešil, byla do pryskyřice začleněna PEG skupina, která prostorově upravuje strukturu a tím zlepšuje kinetiku reakce. Předpokládá se, že PEG segmenty ovlivňují solvatační chování, dielektrické vlastnosti a vznik vodíkových vazeb. Známým zástupcem této skupiny pryskyřic je PEG-PS (Tentagel®, obrázek 12). Širší používání Tentagel resinu omezuje jeho řádově vyšší cena oproti resinům na bázi polystyrenu.^[17]



Obrázek 12. Struktura Tentagelu®

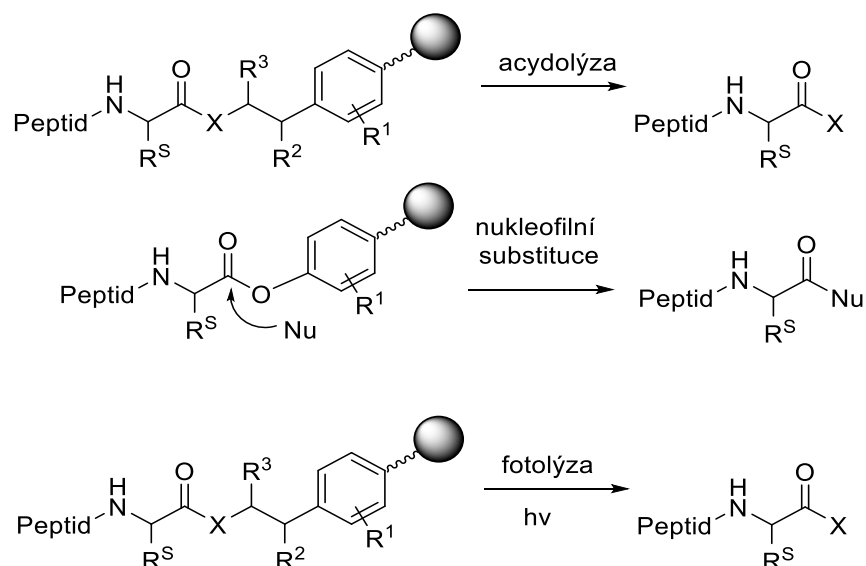
2.3.2. Linkery s funkčními skupinami

Linker je spojovacím článkem mezi jádrem resinu a peptidem. Linker nese funkční skupinu, která umožňuje imobilizaci C-koncové aminokyseliny a posléze celého konstruovaného peptidového řetězce. Koncentrace dostupných funkčních skupin se nazývá substituce a uvádí se v jednotkách mmol/g. Ukotvení peptidu k pevnému nosiči skrze linker je omezeno pouze na dobu syntézy celého peptidového řetězce s cílovou posloupností aminokyselin, které se říká sekvence. Po dosažení plánované sekvence následuje štěpení peptidu z pevného nosiče. Volný peptid se dále zpracovává, linker nebo jeho podstatný fragment zůstává na resinu (Obrázek 13).^[18]



Obrázek 13. Zakotvení peptidu na polymer přes linker

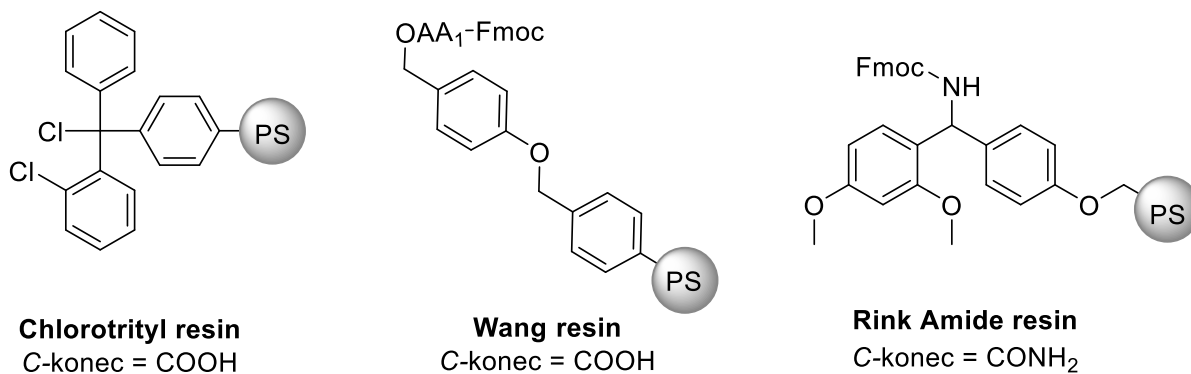
Struktura většiny linkerů je navržena tak, aby bylo možné uvolnit peptid z pevného nosiče působením TFA. Existují linkery, ve kterých je vazba peptid linker štepitelná nukleofily, enzymy nebo světlem. Strukturně odlišné linkery umožňují získat peptidy s C-konci, kterými mohou po odštěpení z polymerního nosiče být vedle karboxylových kyselin a amidů také estery, thioestery, hydrazidy, alkoholy nebo aldehydy, viz Schéma 10.^[19]



● -resin, R^S – boční řetězec, R^1, R^2, R^3 – zbytky závislé na typu linkeru, X = O nebo NH.

Schéma 10. Cleavage reakce pro různé typy linkerů

Komerčně dostupná je široká škála resinů s již navázanými linkery. Na Obrázku 14 jsou uvedeny tři běžně používané linkery a výsledné funkční skupiny C-konce syntetizovaného peptidu. Většinou se po syntéze peptidu získává na C-konci karboxylová kyselina nebo amid. Sulfonamidové a hydrazinové linkery umožňují obdržet různé funkční deriváty v závislosti na podmínkách štěpení.^[18]

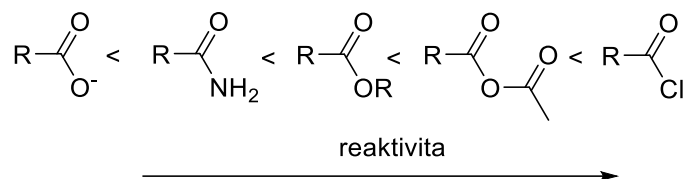


Obrázek 14. Běžné typy pevných nosičů s uvedením struktury linkerů a výslednou funkční skupinou C-konce syntetizovaného peptidu, PS = jádro resinu na bázi polystyrenu.

2.4. Kondenzační činidla používaná při syntéze peptidů

Chemické reakce vedoucí k amidové (peptidové) vazbě mají mimořádný praktický význam. Vazbu nalezneme v řadě léčiv založených na peptidech, ale i ve strukturách nepeptidických. Kondenzační reakce mezi karboxylovou kyselinou a aminem za mírných podmínek neprobíhá. Pro umožnění této reakce musí být karboxylová kyselina nejprve

aktivována. Prakticky to znamená převedení karboxylové kyseliny na reaktivnější funkční derivát. Na obrázku 15 je uvedena reaktivita různých derivátů karboxylové skupiny.^[5]



Obrázek 15. Reaktivita funkčních derivátů karboxylové kyseliny

Jedním z nejjednodušších a neúčinnějších způsobů aktivace karboxylové skupiny je její převedení na chlorid. Karboxylová kyselina může být převedena na acyl chlorid reakcí s SOCl_2 , PCl_3 , POCl_3 , PCl_5 nebo $(\text{COCl})_2$. Použití acyl chloridu má mnoho nevýhod. Během reakce se uvolňuje HCl , který může štípat chránící skupiny labilní v kyselém prostředí. Hrozí též hydrolyza, racemizace a další vedlejší reakce. V těchto případech se do resinu přidává nenukleofilní báze (TEA, DIPEA) aby vznikající HCl byl *in situ* neutralizován. Přebytek báze často vede k racemizaci, viz schéma 11. Reakcí acyl chloridu s triethylaminem odštěpením kyselého α -vodíku je tvořen keten. Keten dál může reagovat s aminem za vzniku amidické vazby, ale za výrazné ztráty optické čistoty (Schéma 11).^[5]

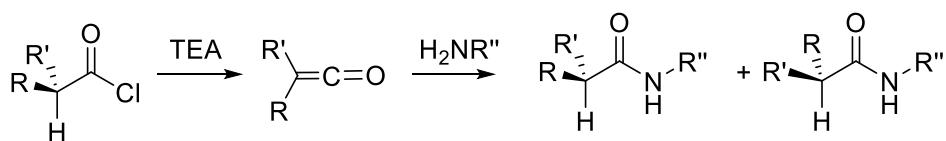
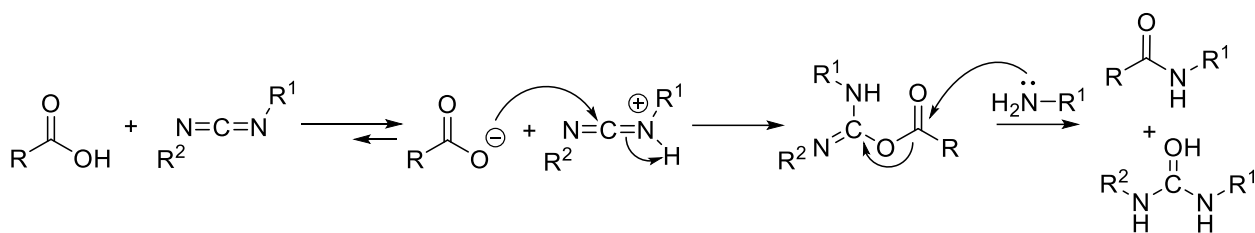


Schéma 11. Vznik racemického amidu přes stupeň tvorby ketenu

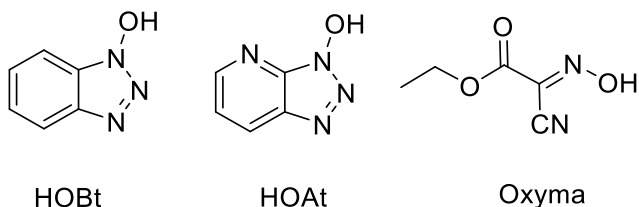
Merrieffild použil jako kondenzační činidlo ve své době dostupný DCC. Aktivovanou karboxylovou skupinu tak převedl na reaktivní *O*-isoacyl močovinu. Z důvodu tvorby kriticky nerozpustné dicyklohexyl močoviny byl DCC později nahrazen vhodnějšími karbodiimidy. Hlavní výhodou nové generace karbodiimidů je dobrá rozpustnost vedlejších produktů kondenzace. Odpovídající močoviny jsou dobře oddělitelné filtrací od pevného nosiče s budovaným peptidem. Mezi zástupce pokročilých karbodiimidů patří 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC) a diisopropylkarbodiimid (DIC), viz Schéma 12.



R^1, R^2 – alkylové zbytky

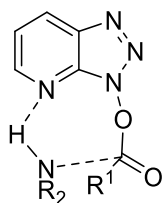
Schéma 12. Preaktivace karboxylové kyseliny karbodiimidem a následná amidační reakce

Pro některé aminokyseliny byla pozorována zvýšená míra racemizace kvůli velké reaktivitě *O*-acylisomočoviny. Aktivovaná aminokyselina může snáze racemizovat za bazických podmínek. Tímto způsobem nejčastěji racemizují histidin a cystein. Pro překonání tohoto problému byla vyvinuta aditiva ke tvorbě méně reaktivních esterů (Obrázek 16).



Obrázek 16. Aditiva pro kondenzační reakce

Prvně použitým kondenzačním aditivem byl 1-hydroxybenzotriazol (HOBt). Později bylo zjištěno, že zavedení dusíku do pozice benzotriazolového jádra přináší několik výhod. Atom dusíku v pozici 7 docílí efekt sousední skupiny za vzniku vodíkového můstku, čímž se posouvá kinetika reakce směrem k produktu kondenzace a současně se zabráňuje nežádoucím reakcím, zejména racemizaci. (Obrázek 17)



Obrázek 17. Efekt sousední skupiny v reakci HOAt esteru s aminem

Je známým faktem, že deriváty benzotriazolu mají explozivní vlastnosti, a proto jsou zařazeny k nebezpečným látkám. Ethyl 2-kyano-2-(hydroxyimino)acetát (Oxyma) se ukázal jako velmi dobře fungující aditivum, které navíc nemá explozivní vlastnosti a ve srovnání s benzotriazolou je i levnější. Oxyma také významně potlačuje racemizaci. Její účinky jsou v tomto parametru lepší než u HOBt a srovnatelné s HOAt. V SPPS se ve značné míře pro kondenzační reakce využívá kombinace DIC/Oxyma (Schéma 13). Jsou pro to důvody ekonomické, procesní i bezpečnostní.

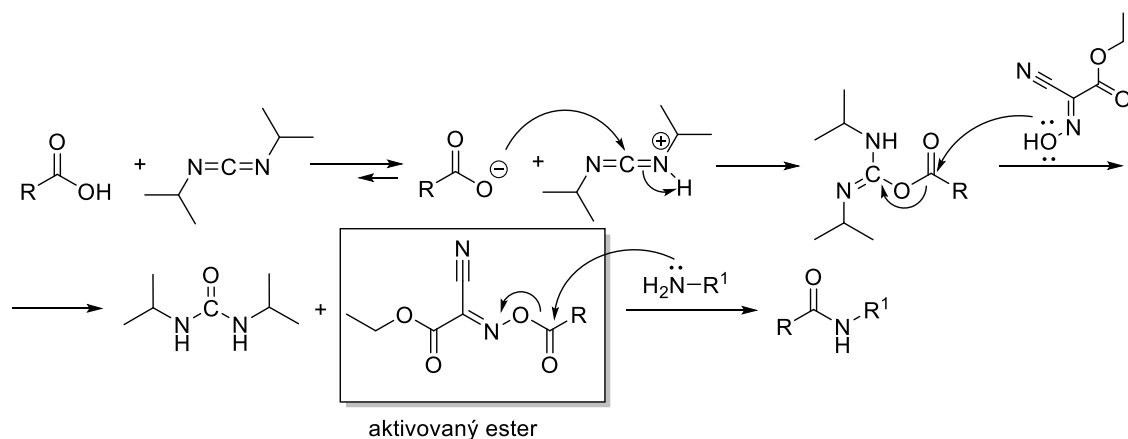
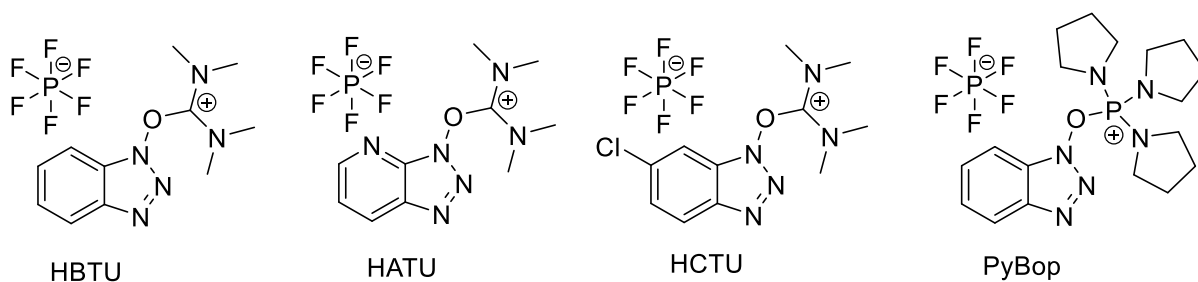


Schéma 13. Amidační reakce s využitím DIC/oxyma

Velmi pokročilá generace aktivačních činidel spojuje do jedné molekuly jak aktivační činidlo, tak aditivum. Ačkoliv tato činidla z technického pohledu fungují velmi dobře a jsou i komerčně dostupná, jsou ve srovnání se strukturně jednoduššími aktivátory nákladnější variantou. Vysoce účinné aktivátory jsou nejčastěji odvozené od hydroxybenztriazolů, zejména se jedná o jejich fosfoniové nebo uronivé soli. Příklady jsou uvedeny na Obrázku 18.



Obrázek 18. Aktivační činidla na bázi uroniových a fosfoniových solí

HATU a HCTU reagují rychleji s menším stupněm epimerizace. Reakce obvykle probíhá s využitím přebytku aktivačního činidla za přítomnosti báze (DIPEA, kolidin, schéma 14).

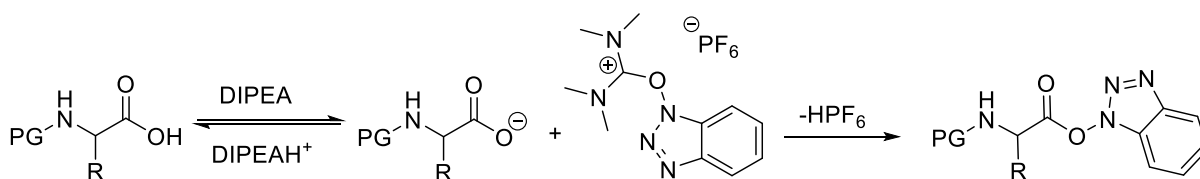
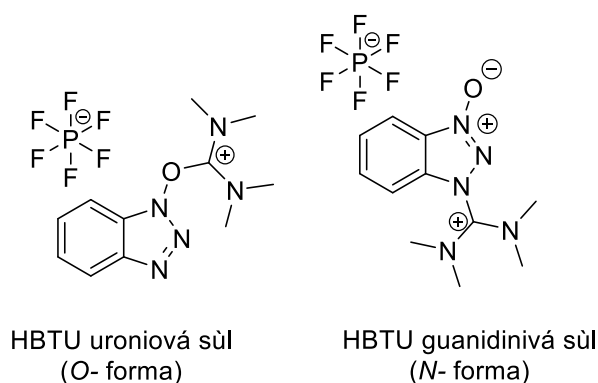


Schéma 14. Aktivace aminokyseliny HBTU za přítomnosti báze

Činidla jako HBTU, HATU a HCTU mohou existovat ve dvou formách. Jednou z nich je forma uroniové soli, druhou formou guanidiniové soli (Obrázek 19).



Obrázek 19. O- a N- formy HBTU

Guanidiniová forma je náchylná k vedlejší reakci, kterou je guanylace N-konce peptidu (Schéma 15). Tato reakce zastavuje růst peptidového řetězce a tím snižuje výtěžky.

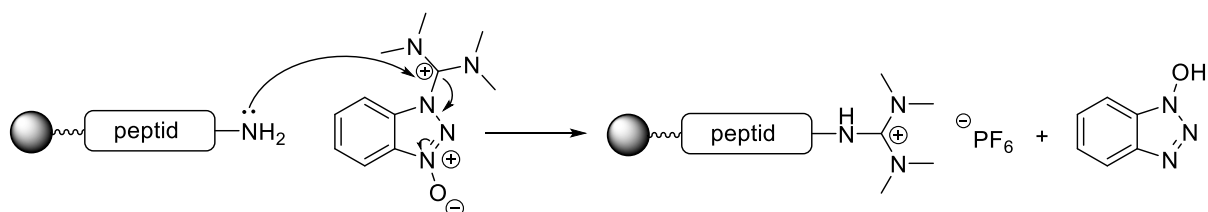


Schéma 15. Vedlejší reakce s HBTU vedoucí k N-guanidovanému peptidu

2.5. Štěpení peptidu z pevného nosiče

Štěpení peptidu z pevného nosiče je proces, při kterém dochází k uvolnění peptidu z resinu a zároveň k ochránění všech chránících skupin bočního řetězce (Schéma 16 a 17). V odborné literatuře se pro tento proces používá anglický výraz „*cleavage*“, kterému v českém jazyce nejvíce odpovídá výraz štěpení. Z chemického hlediska se jedná o celou škálu reakcí, které probíhají současně. Cleavage se vyznačuje zvýšeným rizikem vedlejších reakcí, které je třeba omezit pomocí vhodné volby experimentálních podmínek, zejména se jedná o použití vhodných aditiv, optimalizací reakční doby nebo teploty. Pro přidávání aditiva, jejichž úlohou je potlačovat nežádoucí procesy se v odborné literatuře používá anglický výraz „*scavenger*“.

Roztok činidel používaný pro cleavage se v odborné literatuře nazývá „*cleavage koktejl*“. V případě Fmoc/*t*Bu strategie jsou jak ochranné skupiny, tak i vazba peptid resinu kyselé labilní, proto je hlavní složkou tohoto koktejlu kyselina. Popsána je řada metodik pro provedení deprotektce a štěpení peptidu z resinu. Většina z nich je založena na použití TFA, a liší se zvolenou koncentrací TFA, použitými scavengery, teplotou a reakční dobou.

Některé ochranné skupiny postranních řetězců aminokyselin vytvářejí působením TFA při deprotekcích karboniové ionty a další reaktivní entity. Proto musí být scavengery a reakční podmínky zvoleny tak, aby byly minimalizovány modifikace nebo destrukce citlivých

aminokyselin v peptidovém řetězci (Obrázek 20). Jako scavengery se nejčastěji využívají voda a TIS nebo anisol. Jejich hlavní funkcí je vázání vznikajících karbokationtů a tím zabránění alkylace peptidu (Schéma 18). Scavengery obsahující síru (např. EDT a DTT) mají za úkol vedle zachytávání karbokationtů potlačit oxidaci a dimeraci/polymeraci peptidu obsahujících cystein nebo methionin.^[7,20,21]

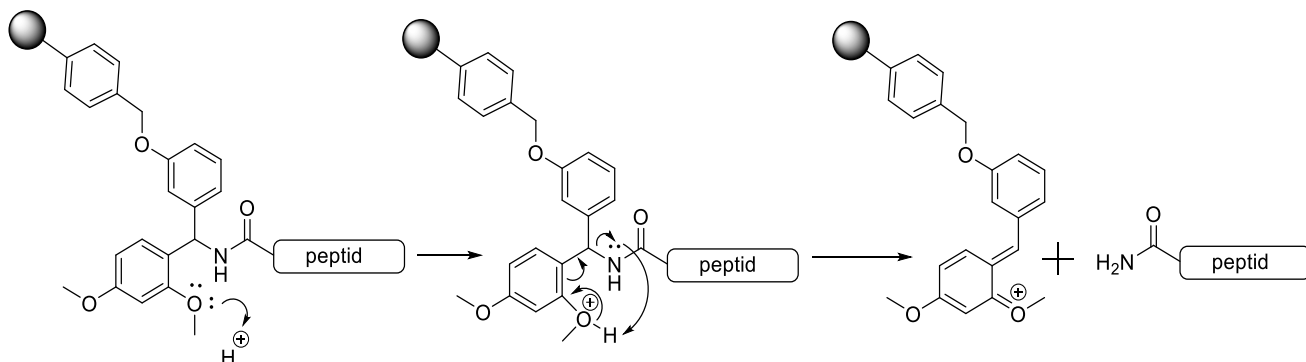


Schéma 16. Mechanismus kyselého odštěpení peptidu z Rink amid resinu

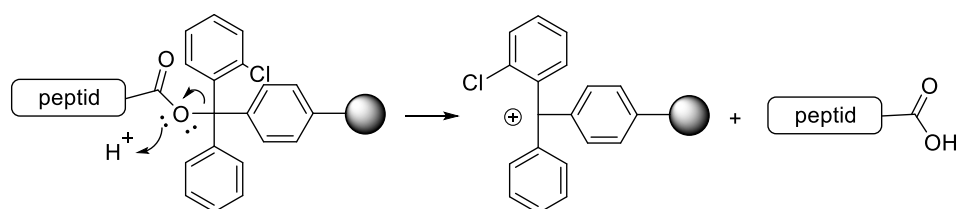
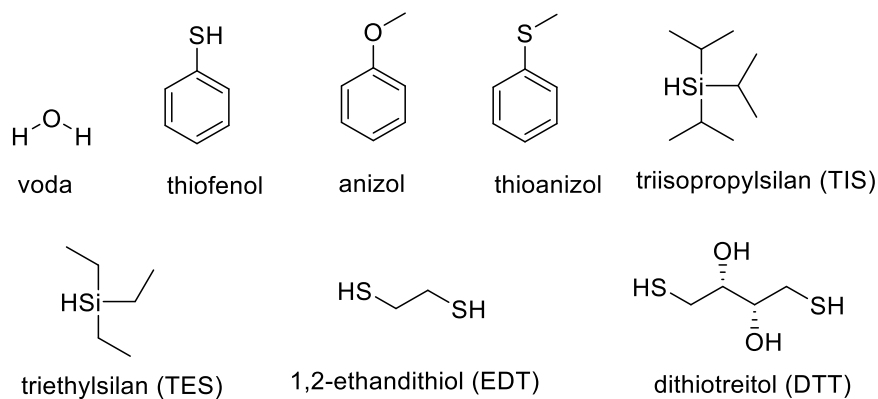


Schéma 17. Mechanismus kyselého odštěpení peptidu z CTC resinu.



Obrázek 20. Příklady scavengerů používaných v SPPS

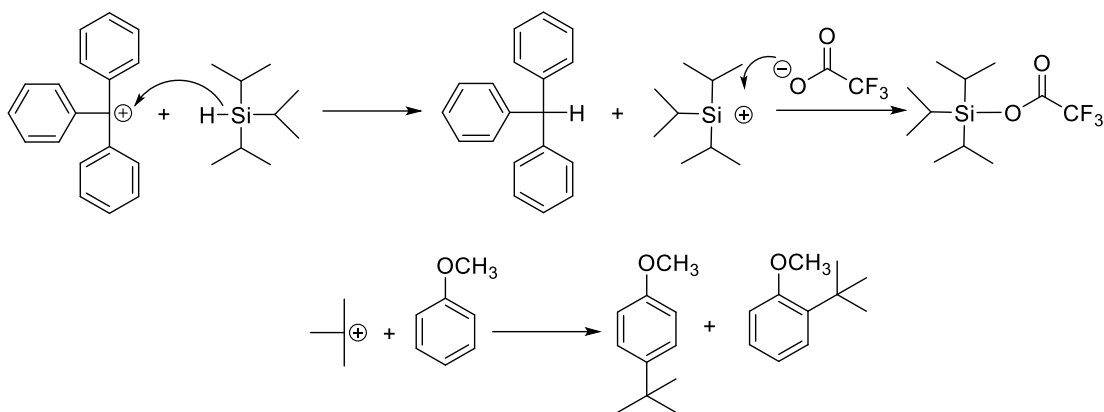


Schéma 18. Příklady zachytu karbokationtů pomocí scavengerů

2.6. Vedlejší reakce při syntéze peptidu na pevném nosiči

Nežádoucí procesy probíhající při SPPS mají za následek jednak nižší výtěžky požadovaného peptidu, jednak nižší čistotu izolovaného surového peptidu. Ve svém důsledku mohou dokonce znemožnit účinnou purifikaci produktu. Za určitou formu nežádoucích procesů lze považovat neúplné konverze při deprotekcích chránících skupin α -aminoskupin a také neúplné konverze kondenzačních reakcí. Obojí vede ke vzniku kratších peptidových řetězců, které kontaminují cílový peptid. Naopak nežádoucí deprotekcí chránících skupin α -aminoskupin probíhající v průběhu kondenzačních reakcí mohou vést k opakovaným kondenzacím za tvorby delších peptidových řetězců. Za další nežádoucí procesy se považují racemizace aminokyselin, vedlejší reakce probíhající při konstrukci peptidového řetězce, vedlejší reakce probíhající při cleavage a oxidační reakce, které se týkají zejména peptidů obsahující methionin a cystein.

2.6.1. Racemizace aminokyselin

Přírodní aminokyseliny kromě glycinu mají chirální centrum s L konfigurací na α -uhlíku. Atom vodíku vázaný na chirální uhlík je vlivem sousední karboxylové skupiny kyselý. Míra kyselosti vodíku se zvyšuje při aktivaci karboxylové skupiny. Odštěpení a zpětné připojení tohoto vodíku má za následek racemizaci α -aminokyseliny (Schéma 19). Rychlost racemizace roste také s rostoucí teplotou, např. při mikrovlnném ohřevu. Extrémně náchylné k racemizaci vlivem báží jsou aminokyseliny histidin a cystein.^[22]

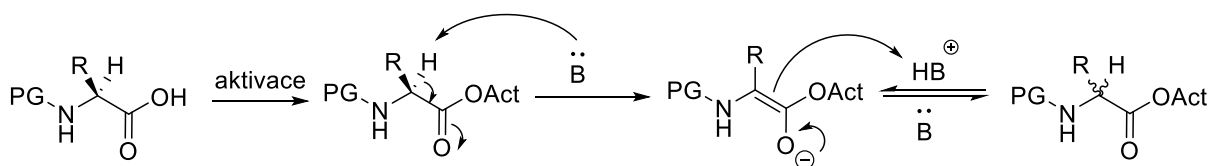


Schéma 19. Báží vyvolaná racemizace aminokyselin během aktivace

Během kondenzační reakce v důsledku intramolekulární cyklizace může být tvořen oxazolin jako intermediát. Oxazolin následně reaguje s aminokyselinou za vzniku epimerního peptidu (Schéma 20). [3,22]

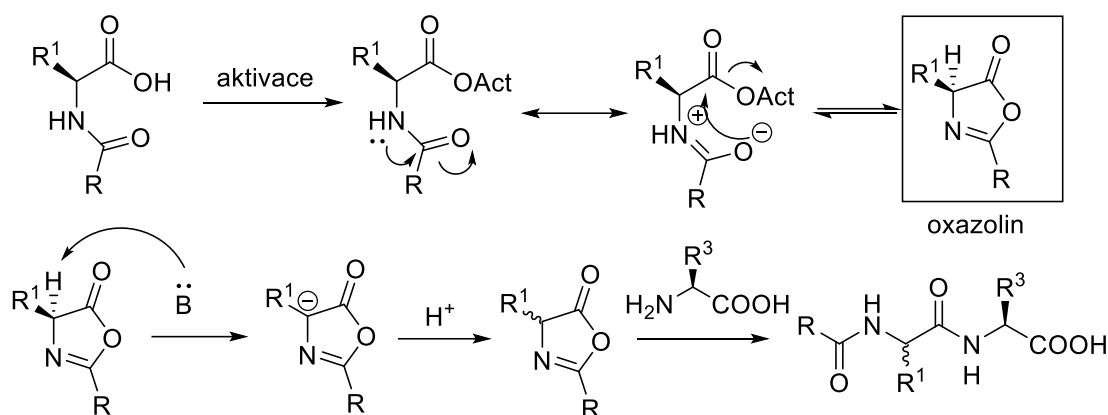


Schéma 20. Bazická racemizace aminokyselin přes stupeň tvorby oxazolinu během aktivace

2.6.2. Vedlejší reakce probíhající při konstrukci peptidového řetězce

Tvorba 2,5-diketopiperazinu (DKP) je jednou z častých vedlejších reakcí, vyskytující se během Fmoc-SPPS. Mechanismus vzniku DKP v procesu syntézy peptidů je znázorněn ve Schématu 21. Nukleofilní atak N^α skupiny z peptidové N -koncové aminokyseliny na karbonylovou funkční skupinu, buď ve formě amidové, nebo esterové skupiny druhé aminokyseliny, vede ke štěpení amidové nebo esterové vazby. N -koncový dipeptid se odštěpí od hlavního řetězce peptidu ve formě 6 členného cyklického derivátu diketopiperazinu.

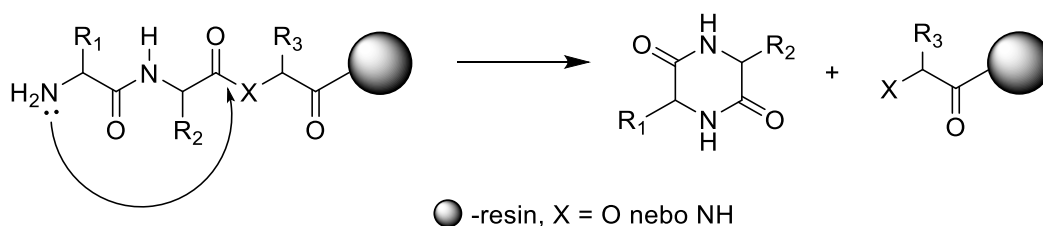


Schéma 21. Vznik diketopiperazinu

Tvorba aspartimidu je extrémně nežádoucí vedlejší reakcí peptidu během Fmoc-SPPS obsahujícím kyselinu asparagovou nebo asparagin. Může být způsobena jak kyselinami, tak i báze. Proto bývá často pozorována ve Fmoc/tBu SPPS, kde se pro deprotektaci Fmoc skupiny používá bazický piperidin. Tvorba aspartimidu je vážným problémem, který má za následek řadu následných vedlejších produktů v závislosti na reakčních podmínkách. Primárně se tvoří

aspartamid reaguje ochotně s nukleofilními činidly, např. piperidinem nebo vodou, za vzniku celé řady následných vedlejších produktů (Schéma 22).

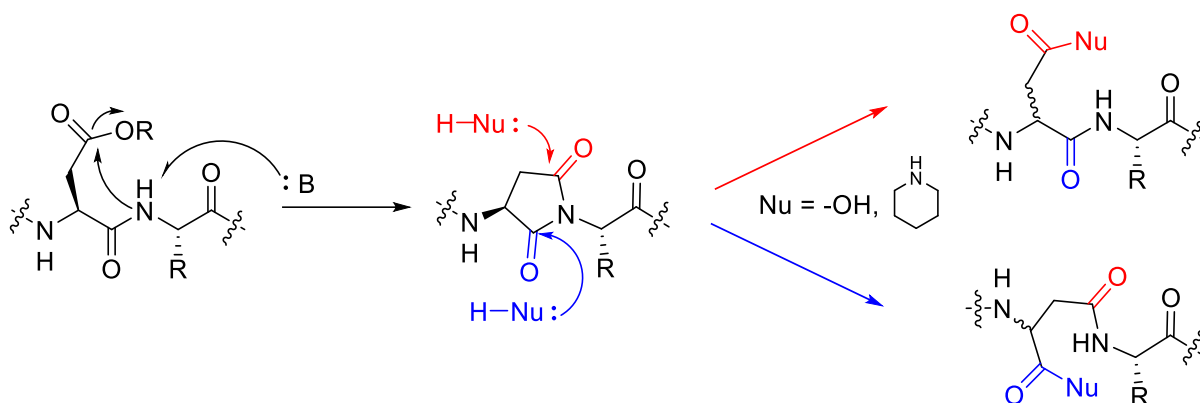


Schéma 22. Vznik aspartamidu a následná reakce s nukleofily

Asparagin vázaný v peptidovém řetězci může v závislosti na podmínkách podléhat vnitřní kondenzaci a vytvořit pyroglutamový cyklus. V takovém případě je znemožněno navázání další aminokyseliny a růst peptidového řetězce se zastaví (Schéma 22).

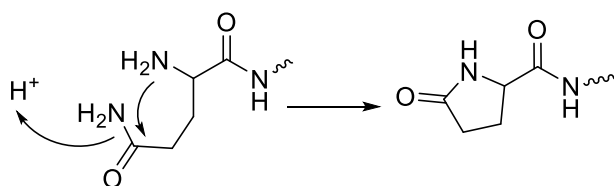


Schéma 23. Vznik pyroglutamového cyklu z asparaginu

2.6.3. Vedlejší reakce probíhající při štěpení peptidu z pevného nosiče

Při štípání peptidu z pevného nosiče může docházet k celému spektru nežádoucích procesů. Dominantním nebezpečím pro kvalitu finálního produktu je tvorba karbokationtů ze zbytků odstupujících chránících skupin jako jsou *t*Bu a Trt. Pro omezení těchto alkylací se do štípacích směsí přidávají scavengery, jejichž úlohou je aktivní vychytávání tvořících se karbokationtů, dříve, než se mohou navázat na peptid. Typické scavengery tohoto typu a mechanismus jejich funkce jsou popsány v kapitole 2.5. Dalším nežádoucím procesem je případná oxidace peptidu, zejména skupin obsahujících síru. Z tohoto důvodu se do štípacích směsí přidávají silná redukční činidla, např. DTT (viz kapitola 2.5.). Specifické problémy související s cleavage procesem vykazují zejména tři aminokyseliny, jmenovitě Trp, Arg a Met.^[7,21,22]

Indolový kruh tryptofanu je za kyselých podmínek během cleavage náchylný k reakci s elektrofilny za vzniku substituovaných derivátů v poloze 2 (Schéma 24). Jako elektrofilny do reakce vstupují zbytky ochranných skupin jako *t*Bu kation nebo zbytek Pbf skupiny.

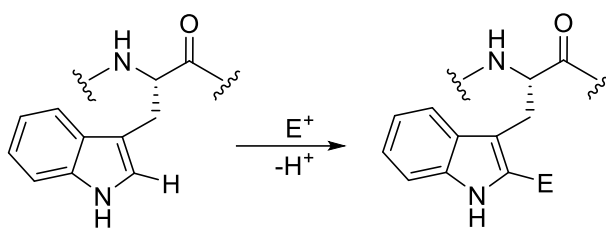


Schéma 24. Elektrofilní substituce indolového kruhu

Zavedení vhodné *N*-chránicí skupiny tryptofanu je účinným způsobem, jak zabránit této reakci. Boc ochranná skupina je nejpoužívanější ochrannou skupinou tryptofanu a bylo potvrzeno, že Boc-chráněný tryptofan nepodléhá vedlejším reakcím v porovnání s neochráněným tryptofanem. *N*-Boc chránicí skupina může být odštěpena během cleavage pomocí TFA ve dvou stupních (Schéma 25). Odchráněním Trp(Boc) fragmentu nejprve vzniká karbamová kyselina. První stupeň je velmi rychlý a stabilita Trp karbamové kyseliny je tak vysoká, že cílový peptid obsahující významný podíl intermediátu může být izolován, což lze snadno indikovat pomocí MS (pík $MH^+ + 44$ *m/z*). Dvou stupňové odchránění je důležité k zabránění vedlejším reakcím tryptofanu. Karboxylová skupina je odstranitelná delším působením slabých kyselin za vzniku cílového peptidu.

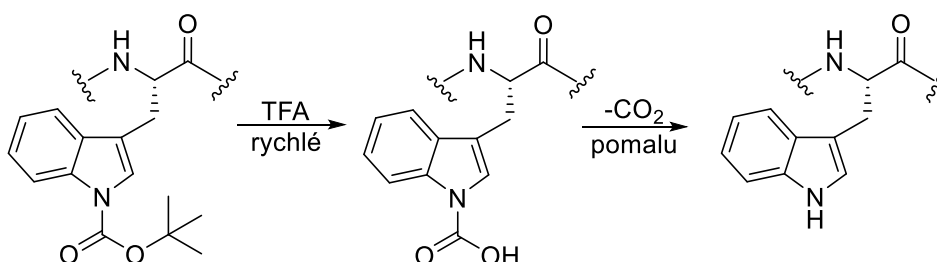


Schéma 25. Dvoustupňové odchránění Trp(Boc) přes stupeň vzniku karbamové kyseliny

V případě methioninu je v průběhu cleavage velmi nežádoucí reakcí navázání elektrofilů na atom síry. Nejčastěji dochází k navázání *t*Bu kationtu, který se tvoří při odchránění některých funkčních skupin (Schéma 26). K nežádoucí alkylaci dochází zejména tehdy, pokud nejsou generované elektrofilny během štípání peptidu z pevného nosiče zcela zachyceny scavengery. Tato reakce je do jisté míry reverzibilní a metionin může být zpětně získán zahřátím v zředěném roztoku AcOH na teplotu 60-65 °C.^[22]

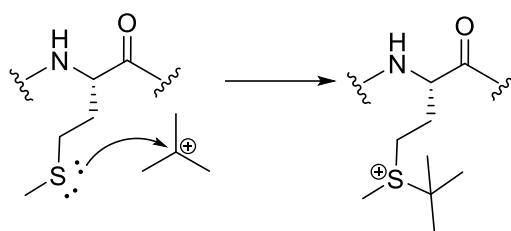


Schéma 26. Reakce metioninu v peptidovém řetězci s *t*Bu kationtem za vzniku *S-tert*-butyl sulfoniové soli

V případě argininu je třeba na postranním řetězci v průběhu SPPS chránit guanidinovou funkční skupinu. Pro tento účel se používají zejména dvě chránící skupiny, jmenovitě 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc) a 2,2,4,6,7-pentamethyldihydro-benzofuran-5-sulfonyl (Pbf). Obě chránící skupiny se vyznačují pomalým průběhem deprotektce, zejména ve srovnání s běžně užívanými skupinami jako jsou Trt, Boc a *t*Bu. Pro kompletní odblokování argininu při cleavage je třeba prodloužit reakční dobu, popřípadě zvýšit reakční teplotu. Jako standardní chránící skupina argininu se prosadila skupina Pbf, která se za běžných podmínek cleavage odbourává přibližně dvakrát rychleji než skupina Pmc (Schéma 27).^[23]

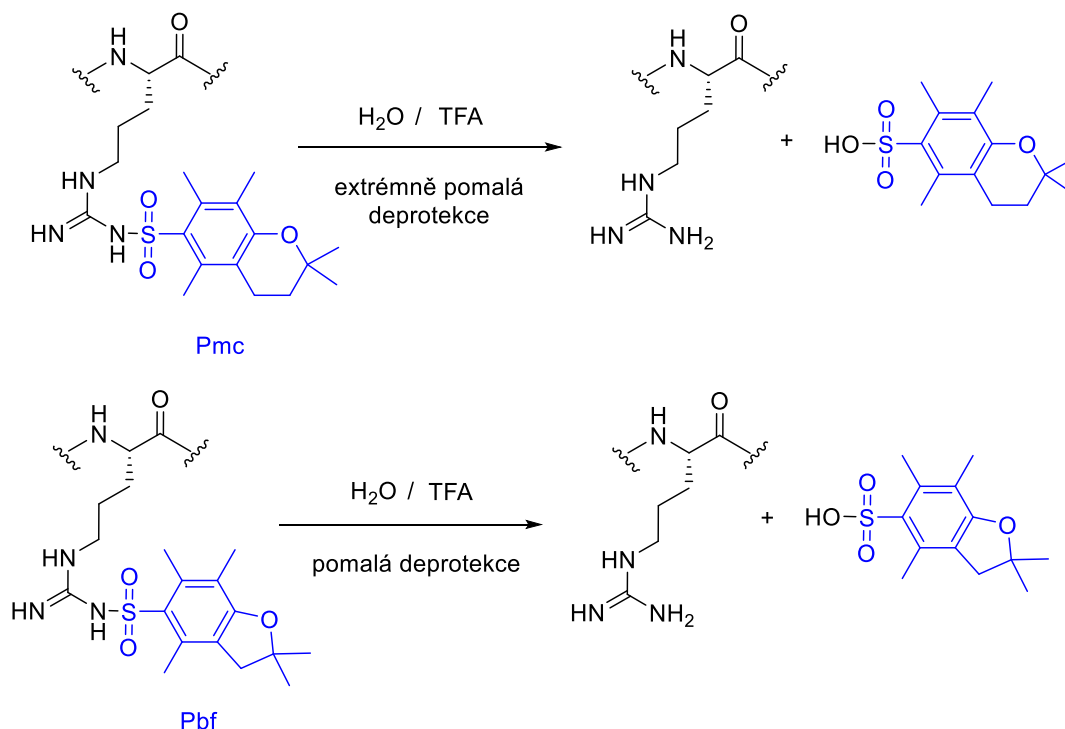


Schéma 27. Odchránění Pmc a Pbf chránících skupin argininu

2.6.4. Oxidace methioninu a cysteinu

Sulfidová skupina metioninu a thiolová skupina cysteinu jsou náchylné k oxidaci. V případě metioninu se tvoří příslušný sulfoxid. V případě cysteinu může dojít ke vzniku inter-

nebo intra- molekulárních S-S můstků. K oxidaci síry může docházet v průběhu tvorby peptidového řetězce, ale i za kyselého štípaní peptidu z pevného nosiče. Proto musí cleavage koktejl obsahovat látky zabraňující oxidaci např. EDT nebo DTT. Jako oxidační činidlo může působit např. vzdušný kyslík, DMSO nebo jod. Těchto činidel se využívá i při cílených oxidacích, např. při budování S-S můstků při modifikacích peptidových struktur.^[6]

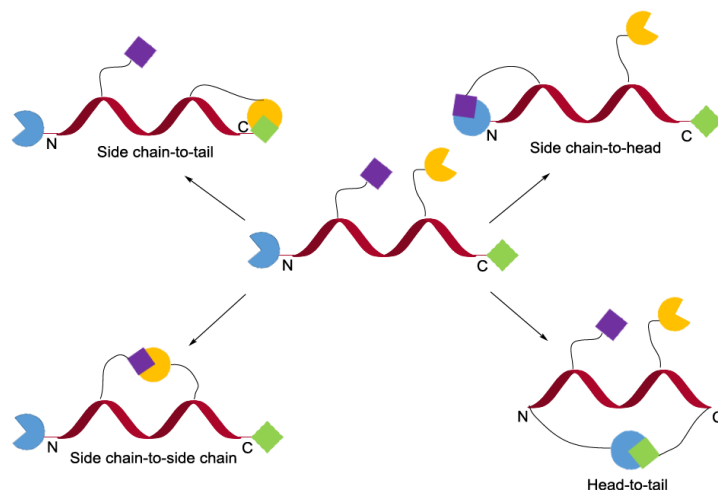
2.7. Modifikace peptidů

Modifikace peptidů mohou mít řadu podob i důvodů. Velmi často se jedná o tvorbu cyklických struktur, užití neobvyklých stavebních bloků (např. nepřirodních aminokyselin) nebo zavedení bočných řetězců, např. s využitím koncové aminokyseliny lysinu nebo alkylací merkaptoskupiny u cysteinu. Takto upravené peptidy obvykle mají výrazně odlišné vlastnosti ve srovnání s peptidy nemodifikovanými.

2.7.1. Cyklické peptidy

Peptidové makrocykly jsou konformačně rigidní syntetické peptidy, které jsou obecně navrženy s cílem zvýšení biologické účinnosti. Důležitým faktorem je to, že cyklické peptidy jsou odolnější vůči enzymatické degradaci než jejich lineární varianty, což je významným příslibem terapeutického potenciálu této třídy molekul. Existuje mnoho cyklických peptidů s různými biologickými aktivitami. Oktreotid, kalcitonin, cyklosporin A, nisin, polymixin a kolistin jsou známé peptidové makrocykly, které se používají jako terapeutické látky

V závislosti na funkčních skupinách peptidu existují čtyři obecné metody cyklizace: spojení N a C konce (*head to tail*); spojení boční funkční skupiny a C-konce (*side chain to head*); spojení postranního řetězce a N-konce (*side chain to tail*); nebo spojení dvou postranních řetězců (*side chain to side chain*), viz Obrázek 21. Z těchto čtyř způsobů cyklizace se nejčastěji využívá cyklizace C- a N- konce, které se spojují peptidovou vazbou a cykly mezi postranními řetězci které se spojují reakce tvoření disulfidových vazeb, laktamizací, alkyn-azid [3+2] cykloadice a metateze s uzavřením kruhu. Jednoduchou, ale v praxi velmi často používanou cyklizační reakcí v chemii peptidů je tvorba intramolekulárních S-S můstků, viz oxytocin (Schéma 28).^[19]



Obrázek 21. Různé způsoby makrocyklizace peptidů^[19]

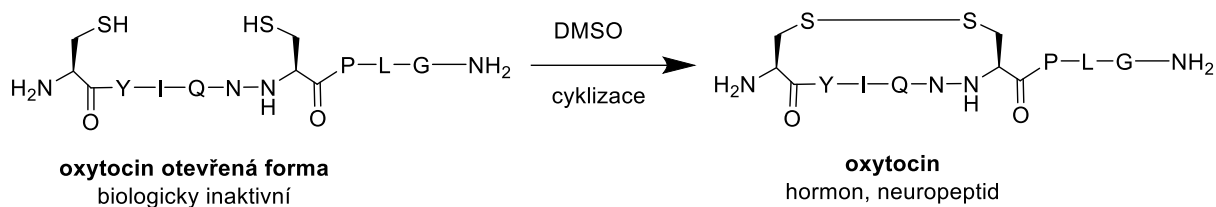
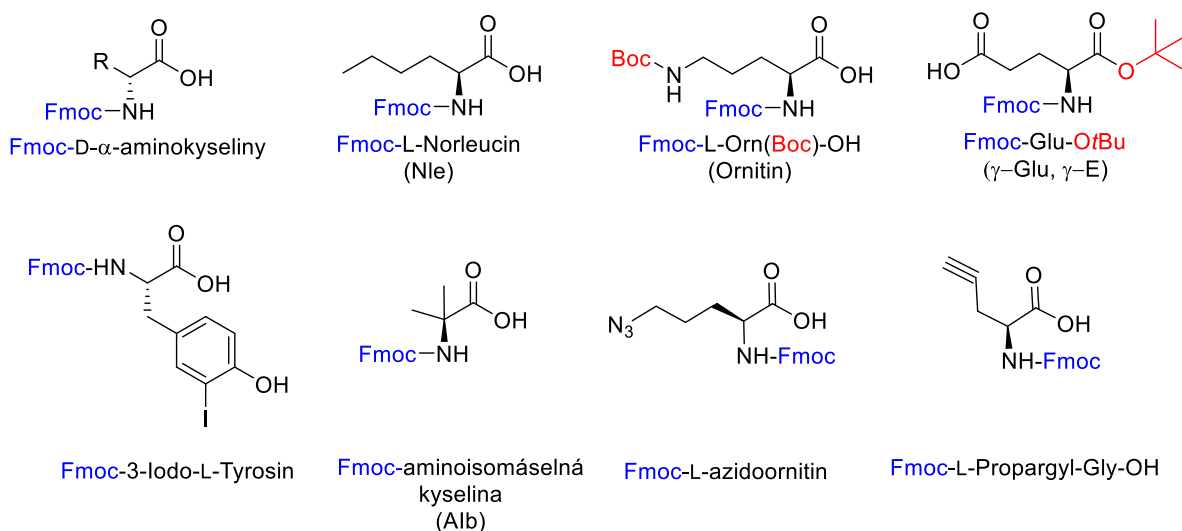


Schéma 28. Oxidativní uzavření S-S můstku za vzniku hormonu oxytocinu

2.7.2. Alternativní stavební bloky pro syntézu peptidů

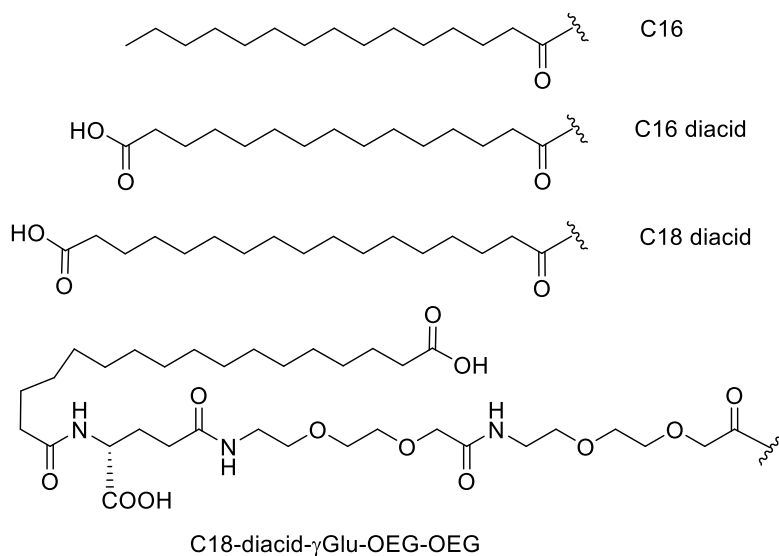
Přírodní peptidy se až na několik výjimek skládají z L-aminokyselin. V syntetických peptidech je možné jednu či více L-aminokyselin nahradit jiným stavebním blokem. Jejich užití může mít řadu výhod a měnit vlastnosti modifikovaných peptidů, např. terapeutické účinky. Jednou z možností takové modifikace je záměna L-aminokyseliny jejím D-isomerem. D-isomery se v sekvencích zapisují stejným kódem jako přírodní aminokyseliny, ale pro odlišení se používají malá písmena. Vedle D-aminokyselin je dostupná celá řada jiných stavebních bloků, které se používají v SPPS. Na Obrázku 22 je uvedeno několik komerčně dostupných nestandardních stavebních bloků s Fmoc chráněnou aminoskupinou.



Obrázek 22. Příklady alternativních stavebních bloků pro syntézu peptidů

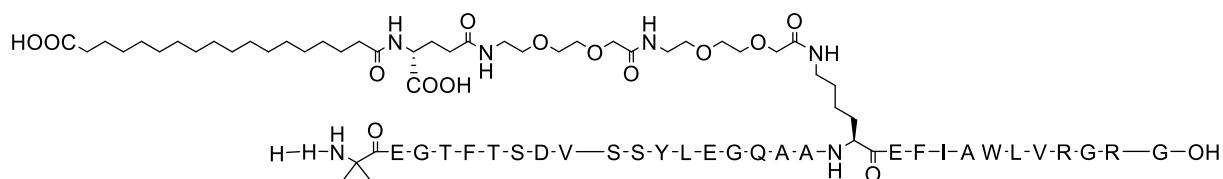
2.7.3. Boční řetězce

Zavedení bočního řetězce (obrázek 23) k základní peptidové sekvenci může vhodně modulovat vlastnosti nově vzniklého peptidu. K danému účelu se zejména využívá koncová aminoskupina lysinu. V případě terapeutických peptidů přináší zavedení bočního řetězce řadu výhod. Zvyšuje se tak chemická stabilita při zachovávání vysoké účinnosti, dosahují se lepší formulační vlastnosti, vhodně se modulují transportní jevy či délka terapeutického účinku (depotní formy). Zavedení bočního řetězce obvykle hraje kritickou roli při orálním podávání peptidových léčiv, čímž se zachová terapeutický efekt peptidů a proteinů i při parenterálních aplikacích. [24]



Obrázek 23. Modifikace bočního řetězce

Při studiu vlastností peptidů s bočními řetězci se jako velmi vhodné řešení ukázala modifikace účinné sekvence pomocí strukturního fragmentu C18-diacid- γ -Glu-OEG-OEG-. Tento fragment se hojně využívá k modifikacím terapeutických peptidů (Obrázek 24).^[24]



Obrázek 24. Semaglutid, lék k léčbě *diabetes melitus* 2. typu

2.8. Purifikace, izolace a analytické hodnocení peptidů

Surový peptid po štípání z pevného nosiče je třeba zbavit nečistot, zejména různých kratších či delších peptidových sekvencí, které mohou být podobné sekvenci plánovaného peptidu. Dále nečistot souvisejících s vedlejšími reakcemi přímo na cílové sekvenci a v neposlední řadě zbytků pocházejících z chránících skupin, použitých činidel a scavengerů. Po vyčištění cílového peptidu je třeba produkt analyzovat a izolovat v pevném skupenství.^[21]

Standardně se purifikace i analytické hodnocení peptidů provádí pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC). V chromatografické separaci probíhající v režimu reverzní fáze je hydrofobní molekula zachycena stacionární fází obsahující C4, C8 nebo C18 alkylové ligandy. Jako mobilní fáze se používají vodné roztoky organických rozpouštědel, často se jedná o směsi vody a acetonitrilu v různém poměru, který se může měnit s časem dle definované gradientové eluce. pH mobilní fáze bývá upraveno pomocí přídavku TFA, AcOH nebo amonných solí. Retenční čas závisí jak na polaritě separované molekuly, tak na složení a průtoku mobilní fáze a na použité stacionární fázi. Purifikace pomocí RP-HPLC má omezení týkající se vysoce polárních nebo naopak velmi nepolárních peptidů. Prvně zmíněné na stacionární fázi zachytí jen slabě nebo vůbec. Druhé z kolony naopak neeluují. Při práci v preparativním modu se zachycují separované frakce ve sběrači frakcí. Po analytickém vyhodnocení se posléze zpracovávají pouze ty frakce, které obsahují cílový peptid o požadované čistotě, např. 95 % a vyšší. Limitujícími faktory pro purifikaci peptidů pomocí HPLC jsou obvykle spotřeba rozpouštědel, časová náročnost procesu purifikace, nákladné strojové vybavení a drahý spotřební materiál. Velmi přínosné je spojení separační techniky HPLC nebo UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) s citlivými UV nebo MS detektory. Toto spojení umožňuje hodnotit jak chemickou čistotu, tak chemickou strukturu analyzovaného peptidu.

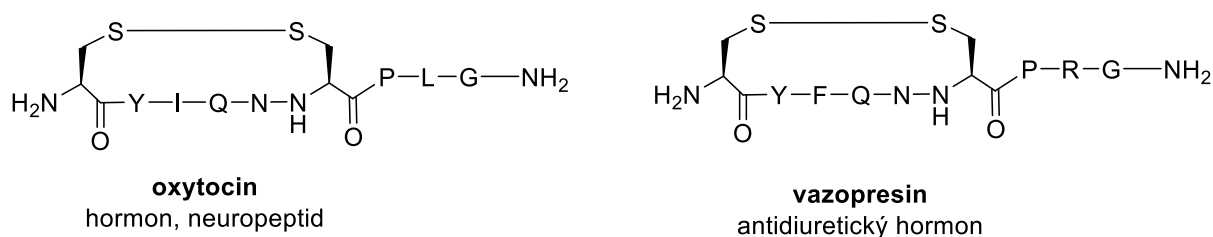
Pro detekci peptidů je vhodnou metodou UV spektroskopie. Nízkovlnná UV detekce je velmi citlivá metoda pro detekci peptidů, neboť peptidová vazba silně absorbuje v oblasti 200-220 nm. Aminokyseliny obsahující jiné chromoforní skupiny, nejčastěji aromatický kruh, více přispívají k absorpci s maximem v oblasti 220-250 nm. UV detekce bývá limitována absorbcí použitých rozpouštědel. Obvykle se pro detekci peptidů volí měření při vlnové délce 214 nm. Hmotnostní spektrometrie se stala nepostradatelným nástrojem pro analýzu struktury proteinů a peptidů díky své rychlosti, citlivosti. Pomocí této metody se určuje poměr hmotnosti molekuly a jejího náboje uděleného při ionizaci analytu (zkratka m/z). Vysoko rozlišovací hmotnostní spektroskopie (HRMS) je schopna měřit molekulové hmotnosti peptidů a někdy i proteinů s přesností na 0,01 %. Revoluci v MS analýze peptidů a proteinů a jiných biomolekul způsobily dvě techniky „měkké ionizace“. Jsou to technika laserová desorpce/ionizace za pomoci matrice (MALDI) a technika elektrostatické ionizace (ESI). Pokrok dosažený v této oblasti byl v roce 2002 oceněn udělením Nobelovy ceny chemikům Koichi Tanaku a Johnu Fennemu.^[10] Výhodou měkkých ionizačních technik je to, že nedochází k fragmentaci molekulárního iontu $[M+H]^+$ a lze tak poměrně přesně zjistit jejich skutečnou molekulovou hmotnost. Dochází též ke vzniku vícenásobně nabitých iontu $[M+H_n]^{n+}$ a ve spektru jsou pak pozorovány sady signálů odpovídající právě těmto iontům.^[25]

Pro izolaci purifikovaného peptidu v pevném skupenství se dominantně používá lyofilizace. Tato metoda sušení se někdy označuje jako sušení mrazem, vymražení, vakuové sušení či mrazová sublimace. Lyofilizace je založena na sublimaci zmrzlé vody, případně i organických s vodou mísitelných rozpouštědel, při nízkém tlaku a teplotě. Odpařované rozpouštědlo přestupuje z pevného skupenství přímo do plynného, aniž by došlo k přeměně na kapalnou fázi. Při sušení se pracuje s hluboce zmrazeným produktem. Při lyofilizaci nedochází k poškození sušeného materiálu, které hrozí při vyšších teplotách využívaných při klasickém sušení. Výsledkem je lyofilizát, tj. peptid v pevném stavu, který se vyznačuje nízkým obsahem zbytkových rozpouštědel. V závislosti na množství sušeného materiálu trvá získání lyofilizovaného peptidu několik hodin až dní.^[26]

2.9. Biologicky významné peptidy a peptidová terapeutika

Peptidy mohou mít významné biologické funkce. Mezi peptidy se známou strukturou tak nalezneme řadu hormonů, přírodních toxinů, peptidových terapeutik a účinných složek některých kosmetických přípravků. Velmi známým zástupcem biologicky aktivních peptidů je hormon inzulin, který snižuje hladinu krevního cukru a který se více jak 100 let používá v léčbě

diabetu. Inzulin je strukturně složitá makromolekula, která se skládá ze dvou peptidických řetězců (označovaných jako A a B), které jsou spojeny disulfidickými můstky a které dohromady mají 51 aminokyselin. Za objasnění biochemické podstaty insulínu byla v roce 1958 biochemikovi Fredericku Sangerovi udělena Nobelova cena. Příklady dalších peptidových hormonů jsou vazopresin a oxytocin, (Obrázek 25) Oba hormony se využívají i v humánní medicíně.^[27] Za objasnění struktury oxytocinu obdržel biochemik Vincent du Vigneaud v roce 1955 Nobelovu cenu.^[10]

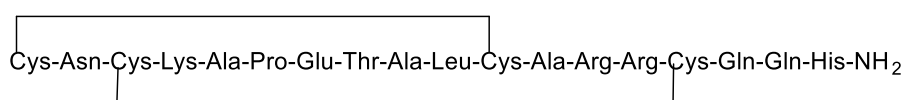


Obrázek 25. Vzorce peptidových hormonů oxytocinu a vazopresinu

Peptidové toxiny nalezneme v mnoha přírodních zdrojích, zejména v živočišné říši. Velmi často jsou součástí toxinů bezobratlých, např. pavouků nebo hmyzu, ale i obratlovců zejména hadů (kobry a mamby). Příklady struktur dvou hlavních složek jedu včely medonosné jsou melittin (obsah 40-60 % v sušině včelího jedu) a neurotoxin apamin (obsah 2-3 % v sušině včelího jedu) (Obrázek 26) ^[28]

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Th-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂

melittin



apamin

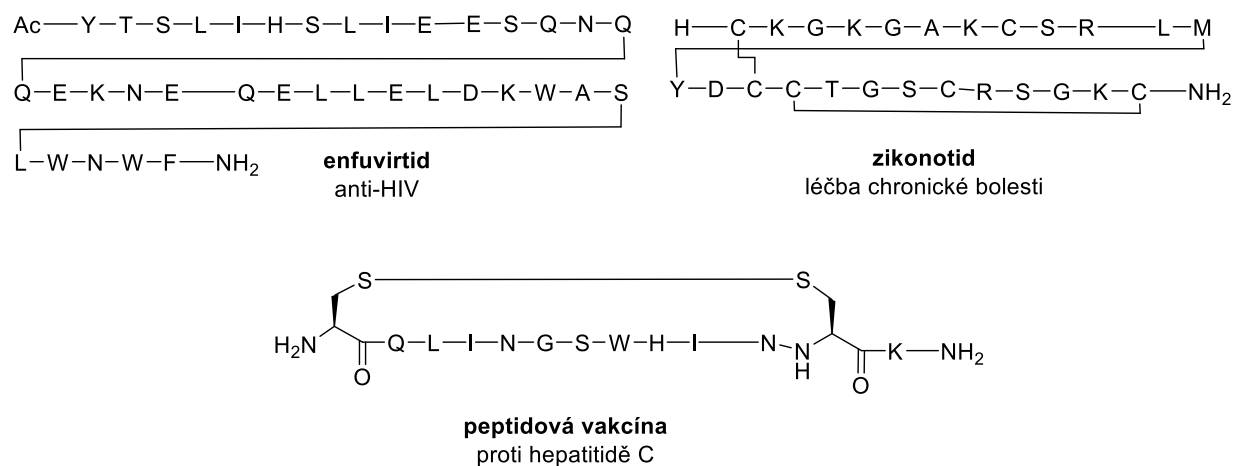
Obrázek 26. Vzorce peptidových toxinů melittinu a apaminu

Vývoj peptidových léčiv vstoupil do nové éry ve 21. století, k čemuž přispěl pokrok ve strukturální a rekombinantní biologii, v nových syntetických a analytických postupech. Od roku 2000 bylo celosvětově schváleno celkem 33 neinzulínových peptidových léčiv. Navíc tyto peptidové léky již nejsou pouhými analogy hormonů nebo peptidů složených pouze z přírodních aminokyselin. Například enfuvirtid (Obrázek 27) je 36-aminokyselinový biomimetický peptid napodobující proteiny viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) používaný v kombinační terapii pro léčbu HIV. Zikonotid (Obrázek 27) je neurotoxický peptid

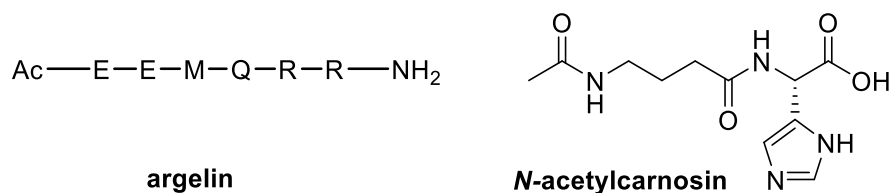
odvozený od jedu homolice *conus magus*, který byl schválen v roce 2004 a používá se k léčbě silné chronické bolesti. Teduglutid je analog glukagon like peptidu 2 (GLP-2) používaný k léčbě syndromu krátkého střeva a vyrábí se pomocí kmene *Escherichia coli* modifikovaného technologií rekombinantní DNA. Semaglutid (Obrázek 24) je chemicky syntetizovaný analog lidského glucagon like peptidu 1 (GLP-1) tvořený připojením C-18 dikarboxylové mastné kyseliny se „spacerem“ kyseliny glutamové a OEG na lyzinový zbytek (pozice 26 v sekvenci), který působí jako agonista receptoru GLP-1 při léčbě *diabetes mellitus* 2. typu. Peptidová léčiva se uplatňují v široké škále terapeutických skupin, např. v oblasti urologie, respiračních nemocí, bolesti, onkologie, normalizace metabolismu, kardiovaskulárních chorob a v antimikrobiálních aplikacích. V současnosti je více než 170 peptidů ve fázi aktivního klinického vývoje a ještě větší počet v preklinických studiích.^[1]

Naprostá většina vakcín proti infekčním nemocem sestává z inaktivovaných nebo živých atenuovaných patogenů. Existují však podjednotkové vakcíny, které obsahují pouze části patogenu povahy proteinu nebo peptidů. Peptidové vakcíny mají určité výhody, jako je vysoká specifická, dobrá bezpečnost a snadnější výroba. Příkladem je vakcína proti hepatitidě C (Obrázek 27). Ve vývoji jsou i peptidové vakcíny proti SARS-CoV-2.^[29]

Peptidy jsou důležité složky v mnoha kosmetických produktech, především v aplikacích péče o pokožku. Peptidy mají různé kosmetické výhody a každý peptid použitý v kosmetických produktech má specifickou aktivitu; např. při zpevnění pokožky, proti vráskám, proti podráždění pokožky a snížení pigmentace. (Obrázek 28).^[30]



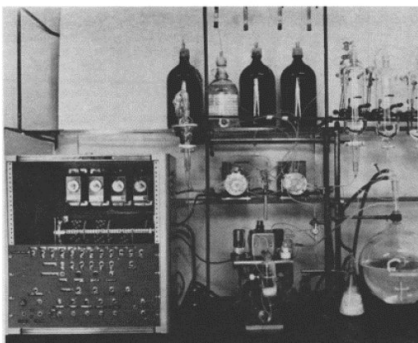
Obrázek 27. Příklady struktur terapeutických peptidů



Obrázek 28. Příklady struktur peptidů používaných v kosmetice

2.10. Robotická syntéza peptidů na pevném nosiči

Základní myšlenkou Merrifieldova přístupu SPPS bylo vyvinout rychlejší, jednodušší a automatizovaný přístup k chemické syntéze peptidů. V roce 1965 prezentoval první návrh stroje pro robotickou syntézu peptidů v odborném časopise. Tento syntetizátor měl jednu reakční nádobu a další nádoby pro aminokyseliny, rozpouštědla a reakční činidla. První stroj byl navržen pro metodiku Boc/Bz SPPS (Obrázek 29)^[31].



Obrázek 29. Merrifieldův stroj pro automatickou syntézu peptidů

Zavedení Fmoc/*t*Bu strategie v SPPS usnadnilo konstrukci nové generace peptidových syntetizátorů, protože již nebylo třeba pracovat s korozivní TFA v krocích odchránění *N*-koncové aminokyseliny. Syntézy peptidů mohou být provedeny v paralelním uspořádání ve více reakčních nádobách současně. V současnosti je komerčně dostupné velké množství automatizovaných peptidových syntetizátorů pro Fmoc-SPPS s různými technickými parametry, např. s možností mikrovlnného nebo infračerveného ohřevu a monitorovacími mechanismy (například UV detekce).



Obrázek 30. Robotické syntetizátory firem CEM a GyrosProteinTechnologies

(a) Liberty Blue™ (CEM), **(b)** SymphonyX (GyrosProteinTech.)

Liberty Blue (Obrázek 30 (a)) je automatický peptidový syntetizátor s možností mikrovlnného ohřevu v reakční cele. Podle informace od výrobce (CEM) se jedná o nejprodávanější peptidový syntetizátor na světě. Vyznačuje se velmi krátkou dobou cyklu (4 min pro 100 μmol scale) a významnou redukcí rozpouštědel dosahovanou na základě vysoce účinné syntézy peptidů v pevné fázi (HE-SPPS). Systém pracuje pouze s jedinou reakční celou, pracuje s inertní atmosférou dusíku a plynný dusík se používá též k míchání suspenze resinu. Syntetizátor umožňuje velmi rychlou syntézu jednoho peptidu v měřících od 100 μmol do maximálních 5000 μmol v závislosti na délce peptidového řetězce.^[32]

Symphony X (GyrosProteinTech., Obrázek 30 (b)) je první peptidový syntetizátor na světě s plně nezávislými kanály. To znamená, že je možné spouštět různé peptidové sekvence, měřítka syntéz a protokoly na více reaktorech najednou bez rizika křížové kontaminace. Při maximálním využití se jedná o 12 různých sekvencí ve 24 reaktorech. V porovnání s LibertyBlue je délka cyklu mnohem delší, což je však vyváženo paralelizací syntéz. Systém pracuje s inertní atmosférou dusíku a plynný dusík se používá též k míchání suspenze resinu, teplota v reakční nádobce není aktivně řízena. Syntetizátor umožňuje paralelní syntézu až 12 strukturně odlišných peptidů v měřících od 50 μmol do maximálních 500 μmol v závislosti na délce peptidového řetězce.^[33]



Obrázek 31. Robotický syntetizátor MultiPep RSi firmy CEM (dříve Intavis) pro paralelní syntézu velkého počtu peptidových sekvencí ve velmi malých měřících syntéz (2-10 μmol).

MultiPep RSi (Obrázek 31) je modernějším automatizovaným paralelním syntetizátorem peptidů ve velmi malém měřítku. Vyznačuje se flexibilitou pro paralelní syntézy velkého množství peptidů pomocí různých modů. Základní uspořádání umožňuje syntézu velké knihovny peptidů v měřítku 2-10 μmol pomocí destičky s 96 reakčními pozicemi. Najednou je možné použít až 4 destičky pro paralelní syntézu až 384 peptidů. Jiné uspořádání syntetizátoru pracuje s mini-kolonami (0,25 a 0,5 ml) pro paralelní syntézu až 48 peptidů. V nejmenších měřících syntéz MultiPep RSi umožňuje syntézu tisíce imobilizovaných peptidů na celulózových membránách v podobě malých teček. Tyto membrány mají 600 reakčních pozic, ve kterých může být připravena plánovaná sekvence peptidu. Přístroj dokáže pracovat se čtyřmi membránami současně, tj. v tomto uspořádání může být současně připraveno až 2400 peptidů pro vysokovýkonné screeningové aplikace.^[34] Na rozdíl od ostatních syntetizátorů se míchání aminokyselin, aktivátorů a aditiv provádí před přidáním k resinu ve zkumavce pro míchání reagentů (tzv. preaktivace), nikoliv přímo k resinu v reakční nádobě, kde probíhají kondenzační reakce. Přístroj nepracuje pod inertní atmosférou, reagenty v reakční nádobce nejsou aktivně míchány (difuze) a reakční teplota není aktivně řízena.

3 Cíl práce

Z literatury i teoretické části této práce vyplývá, že peptidy jsou velice perspektivními látkami vykazující širokou škálu biologických aktivit. Moderním a účinným způsobem přípravy peptidů je syntéza na pevné fázi. Tento přístup může být automatizován a na trhu je dostupné velké množství robotických syntetizátorů. Experimentální část je zaměřená na optimalizace podmínek robotických syntéz peptidů na syntetizátoru MultiPep RSi v měřítku 5 μmol . Procesní podmínky byly zkoumány na příkladu syntéz 4 peptidů. Následně byl navržen optimalizovaný postup robotické syntézy. Tento postup byl ověřen úspěšnou syntézou dvou delších peptidů sestávajících z 15 a 21 aminokyselin.

4 Experimentální část

Za účelem optimalizace podmínek robotické syntézy peptidů na syntetizátoru MultiPep RSi byla navržena sada testovacích peptidů, která zahrnuje peptidy o různé délce sekvencí (9 – 12 AMK), včetně přítomnosti problematických aminokyselin (Cys, Trp, Arg). K ověření účinnosti robotické syntézy byly vybrány dva delší přírodní peptidy, čímž se robotická syntéza stala citlivější k detekci případných chyb a tyto chyby by se měly projevit výrazněji v čistotě surových peptidů. Peptid pep05 byl izolován z bobu obecného (*vicia faba*), je sestaven z 15 AMK a vykazuje antimikrobiální účinky. Pep06 je peptid izolovaný z kůže amfíbie, sestává z 21 aminokyselin a jedná se o inhibitor enzymu cholinesterazy.^[35,36] Vyhodnocovacím kritériem byla čistota crude peptidu podle UPLC analýzy. Ke kontrole molekulových hmotností a porovnání retenčních časů produktů připravených pomocí různých robotických syntetizátorů byly syntézy těchto peptidů provedeny také na syntetizátorech LibertyBlue a Symphony za standardních podmínek.

Následně byla zkoušena syntéza peptidů pep10 a pep11 obsahujících Met, a cyklizace peptidů pep02 a pep03 s vytvářením S-S můstků, které vedly k peptidům pep07 a pep08. Byl syntetizován pep09 k porovnání výsledků současné SPPS syntézy s historicky první SPPS syntézou provedenou Merrieffieldem. Veškeré syntetizované peptidy jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Syntetizované peptidy, jejich kódy a sekvence

	Kód	Název	Sekvence
Peptidy k testování procesních podmínek			
1.	pep01	acyl carrier protein	H-VQAAIDYING-NH ₂
2.	pep02	otevřená forma oxytocinu	H-CYIQCPHG-NH ₂
3.	pep03	otevřená forma vazopresinu	H-CYFQCPRG-NH ₂
4.	pep04		H-HGAILSWAILSG-NH ₂
Peptidy k ověření účinnosti optimálních podmínek			
5.	pep05	peptid z bobu obecného	H-EEYDEEKEQGEEIR-OH
6.	pep06	peptid z kůže amfíbie	H-TKPTLLGLPLGAGPAAGPGKR-NH ₂
Další připravené peptidy			
7.	pep07	cyklická forma oxytocinu	H-CYIQCPHG-NH ₂
8.	pep08	cyklická forma vazopresinu	H-CYFQCPRG-NH ₂
9.	pep09	Merrieffildův tetrapeptid	H-LAGV-OH
10.	pep10	γ-endorfin	H-YGGFMTSEKSQTPLVTL-OH
11.	pep11	kassinin	H-DVPKSDQFVGLM-NH ₂

V praxi je syntéza surového peptidu prvním krokem, na který následuje krok automatizované purifikace peptidu s izolací jednotlivé čisté složky. V rámci diplomové práce peptidy nebyly izolovány, a proto výtěžky vyhodnocovány nebyly.

4.1 Charakterizace, rozpouštědla a činidla

Komerční chemikálie a rozpouštědla byly zakoupeny od firem Sigma Aldrich, Merck, Fluorochem; demineralizovaná voda od firmy Fagron; resiny od firem Gyros protein a Heicheng; aminokyseliny od firmy CSBio (Shanghai) Ltd. Syntéza peptidů byla provedena na automatických syntetizátorech MultiPep RSi, Liberty Blue a Symphony.

Hmotnostní spektroskopie MALDI byla provedena na přístroji MALDI LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) s použitím dusíkového laseru (337 nm, 60 Hz, 8–20 μ J). Spektra byla měřena v režimu pozitivních iontů s rozlišením 100 000 při $m/z = 400$. Jako matrice byla použita kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (α -CHCA). Výsledné spektrum tvoří průměr ze všech měření.

Analýza UPLC byla provedena na přístroji Acquity (Waters, Milford, Massachusetts, USA) s UV-Vis detektorem s diodovým polem Tunable ($\lambda = 214$ nm) a kolony BEH C18 (2,1 x 50 mm 1,7 μ m). Byla použita gradientová eluce ACN/voda obsahující jako aditivum 0,05 % kyseliny trifluoroctové (Tabulka 2 a Tabulka 3).

Tabulka 2. Gradientová eluce pro UPLC analýzu (2-60)

Čas (min)	Průtok (ml/min)	Složení mobilní fáze (%)	
		A = voda (0,05% TFA)	B = ACN (0,05% TFA)
0	0,45	98	2
0,5	0,45	98	2
4	0,45	40	60
4,5	0,45	0	100
5	0,45	0	100

Tabulka 3. Gradientová eluce pro UPLC analýzu (5-60)

Čas (min)	Průtok (ml/min)	Složení mobilní fáze (%)	
		A = voda (0,05% TFA)	B = ACN (0,05% TFA)
0	0,45	95	5
0,5	0,45	95	5
4	0,45	40	60
4,5	0,45	0	100
5	0,45	0	100

Hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC byla provedena na přístroji SFC Prep 15 (Waters, Milford, Massachusetts, USA) s UV-Vis detektorem s diodovým polem ($\lambda = 214$ nm),

kolonou Kinetex XB-C18 (4,6 x 100 mm, 5 μ m) a Waters SQD 2 MS detektorem s ESI ionizací. Byla použita gradientová eluce ACN/voda obsahujících jako aditivum 0,1 % kyseliny trifluoroctové (Tabulka 4). Spektra byla měřena v režimu pozitivních iontů v rozmezí 2-3072 m/z .

Tabulka 4. Gradientová eluce pro HPLC-MS

Čas (min)	Průtok (ml/min)	Složení mobilní fáze (%)	
		A = voda (0,1% TFA)	B = ACN (0,1% TFA)
0	1,5	95	5
8	1,5	40	60
9.50	1,5	0	100

Preparativní HPLC byla prováděna na systému puriFlash 5.250 (Interchim, Montlucon, France) s UV detekcí ($\lambda = 214$ nm) s použitím kolony Kinetex EVO-C18 (21,2 x 150 mm, 5 μ m). Byla použita gradientová eluce ACN/voda obsahující jako aditivum 0,05 % kyseliny trifluoroctové (Tabulka). Čistota každé frakce byla analyzovaná UPLC. Spojeny byly frakce s vyhovující čistotou.

Tabulka 5. Gradientová eluce pro preparativní HPLC purifikace

Čas (min)	Průtok (ml/min)	Složení mobilní fáze (%)	
		A = voda (0,05% TFA)	B = ACN (0,05% TFA)
0	30	95	5
5	30	95	5
45	30	75	25

Lyofilizace produktu byla provedena pomocí přístroje Christ Alpha 2-4 LSC plus a pumpy VaccumBrand GMBH + CO KG za tlaku 0,01 Mbar. K odstředění peptidů byla využita centrifuga 5415 D (Eppendorf, Hamburg, Germany).

4.2 Obecné metody syntézy peptidů

4.2.1 Obecná metoda SPPS na syntetizátoru Symphony

Peptidy byly připraveny pomocí Fmoc SPPS strategie s využitím ochráněných aminokyselin (Tabulka 6). Jako polymerní nosiče byly použity: Ring Amid resin, Wang resiny s preloadovanou první aminokyselinou. Suchý resin byl navážen do reaktoru a nabobtnán DMF. Deprotekce Fmoc bylo dosaženo 2x10 minutovou reakcí s 20% piperidinem v DMF (55 ekv.) v reaktoru s resinem. Kondenzace aminokyselin byla provedena přidáním 0,3M roztoku požadované aminokyseliny (10 ekv.) v 0,35M roztoku oxyma (11,67 ekv.) v DMF, 1,5M kolidinu (12 ekv.) v DMF, 1,5M DIC (12 ekv.) v DMF po dobu 2 hodin. V případě aminokyseliny Arg byl proveden double coupling. Po dokončení syntézy byl resin promyt DMF, DCM, MeOH, a Et₂O, sušen v exsikátoru přes noc.

4.2.2 Obecná metoda SPPS na syntetizátoru Liberty Blue

Peptidy byly připraveny pomocí Fmoc SPPS strategie s využitím ochráněných aminokyselin (Tabulka 6). Jako polymerní nosiče byly použity: Ring Amid resin, Wang resiny s preloadovanou první aminokyselinou. Suchý resin byl navážen do kádinky, nabobtnán DMF a přenesen do reaktoru. Deprotekce Fmoc bylo dosaženo 3 minutovou reakcí s 20% piperidinem (24 ekv.) v DMF s mikrovlnným zahřevem na 90 °C. Kondenzační reakce byla provedena přidáním 0,3M roztoku požadované aminokyseliny (4 ekv.) v 0,35M roztoku oxyma (4,7 ekv.) v DMF, kolidinu (4 ekv.) v DMF, DIC (4 ekv.) v DMF po dobu 6 minut za ohřevu mikrovlnami na teplotu 90 °C. V případě aminokyseliny Arg byl proveden double coupling. Po dokončení syntézy byl resin promyt DMF, DCM, MeOH, a Et₂O, sušen v exsikátoru přes noc.

Tabulka 6. Ochráněné aminokyseliny pro Fmoc-SPPS robotickou syntézu peptidu

Aminokyselina	Kód	Aminokyselina	Kód
Fmoc-Ala-OH	A	Fmoc-Leu-OH	L
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	R	Fmoc-Lys(Boc)-OH	K
Fmoc-Asn(Trt)-OH	N	Fmoc-Met-OH	M
Fmoc-Asp(<i>t</i> Bu)-OH	D	Fmoc-Phe-OH	F
Fmoc-Cys(Trt)-OH	C	Fmoc-Pro-OH	P
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Q	Fmoc-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	S
Fmoc-Asp(<i>t</i> Bu)-OH	E	Fmoc-Thr(<i>t</i> Bu)-OH	T
Fmoc-Gly-OH	G	Fmoc-Trp(Boc)-OH	W
Fmoc-His(Trt)-OH	H	Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH	Y
Fmoc-Ile-OH	I	Fmoc-Val-OH	V

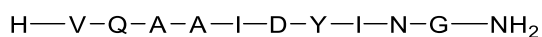
4.2.3 Obecná metoda cleavage peptidu z resinu

K reaktoru s resinem byl přidán cleavage koktejl (10x objem vůči hmotnosti resinu) složení: TFA/TIS/H₂O/DTT (90:5:2,5:2,5) pokud peptid obsahoval Cys nebo Met, nebo TFA/TIS/H₂O (92,5:5:2,5) pokud peptid tyto snadno oxidovatelné aminokyseliny neobsahoval. Resin se míchal na třepačce po dobu 1,5 hod. Následně byla provedena filtrace, resin byl promyt malým množstvím TFA. Získaný filtrát byl míchán po dobu 1,5 hod. Následně byl peptid vysrážen ochlazeným Et₂O (10x objem vůči objemu TFA). Peptid byl filtrován, promyt třikrát Et₂O a sušen v exsikátoru přes noc.

Čistota peptidu byla analyzovaná UPLC a identita byla potvrzená hmotnostní analýzou HPLC-MS případně MALDI-HRMS.

4.3 Vlastní syntéza standardů peptidů

4.3.1 Syntéza standardu **pep01** (acyl carrier proteinu (ACP))

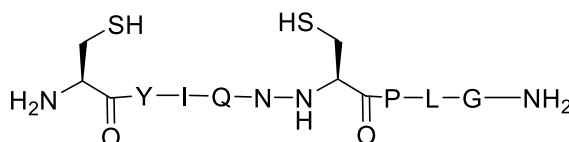


Syntéza byla provedena na syntetizátoru Librety Blue podle obecné metody v měřítku 0,25 mmol. Byl použit Ring Amid resin (0,76 g; loading = 0,33 mmol/g). Po sušení resinu bylo 1,13 g peptidu na resinu. Následně byl proveden cleavage podle obecné metody s využitím 11,3 ml cleavage koktejlu, bylo získáno 0,28 g surového peptidu. Surový peptid byl rozpuštěn v 5% roztoku ACN/voda a čištěn pomocí preparativní HPLC s gradientovou elucí ACN/voda (Tabulka 3). $t_R = 26$ min. Po lyofilizaci bylo získáno 0,16 g peptidu. Výtěžek: 54,44 %.

Čistota peptidu podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) 99,26 %. $t_R = 2,160$ min.

HRMS (MALDI, m/z): pro C₄₇H₇₅N₁₃O₁₅ vypočteno [M+H]⁺ 1062,55784; [M+Na]⁺ 1084,53978; nalezeno [M+H]⁺ 1062,55318 ($\Delta = 4,49$ ppm); [M+Na]⁺ 1084,5372502 ($\Delta = -2,34$ ppm).

4.3.2 Syntéza standardu **pep02** (otevřená forma oxytocinu)



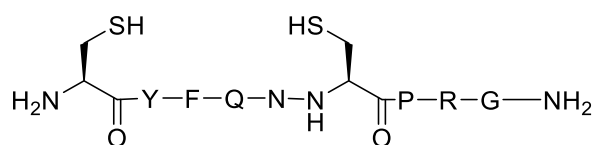
Syntéza byla provedena na syntetizátoru Librety Blue podle obecné metody v měřítku 0,25 mmol. Byl použit Ring Amid resin (0,758 g; loading = 0.33 mmol/g). Po sušení resinu bylo získáno 1,23 g peptidu na resinu. Následně byl proveden cleavage podle obecné metody

s využitím 12,3 ml cleavage koktejlu, bylo získáno 0,25 g surového peptidu. Surový peptid byl rozpuštěn v 5% roztoku ACN/voda a čištěn pomocí preparativní HPLC s gradientovou elucí (Tabulka 3). $t_R = 23$ min. Lyofilizací spojených frakcí bylo získáno 0,15 g peptidu. Výtěžek: 53,45%.

Čistota peptidu podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) 94,57 %. $t_R = 2,270$ min.

HRMS (MALDI, m/z): pro $C_{43}H_{68}N_{12}O_{12}S_2$ vypočteno $[M+H]^+$ 1009,45939; $[M+Na]^+$ 1031,44133; nalezeno $[M+H]^+$ 1009,454688 ($\Delta = -4,66$ ppm); $[M+Na]^+$ 1031,437363 ($\Delta = -3,846$ ppm).

4.3.3 Syntéza standardu **pep03** (otevřená forma vazopresinu)



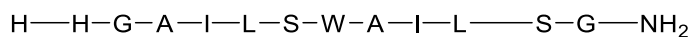
Syntéza byla provedena na syntetizátoru Librety Blue podle obecné metody v měřítku 0,25 mmol. Byl použit Ring Amid resin (0,758 g; loading = 0,33 mmol/g). Po sušení resinu bylo získáno 1,4 g peptidu na resinu. Následně byl proveden cleavage podle obecné metody s využitím 14 ml cleavage koktejlu, bylo získáno 0,28 g surového peptidu.

Surový peptid byl rozpuštěn v 5% roztoku ACN/voda a čištěn pomocí preparativní HPLC s gradientovou elucí (Tabulka 3). $t_R = 35$ min. Lyofilizací spojených frakcí bylo získáno 0,129 g peptidu. Výtěžek: 43,0 %.

Čistota peptidu podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) 96,58 %. $t_R = 1,913$ min.

HRMS (MALDI, m/z): pro $C_{46}H_{67}N_{15}O_{12}S_2$ vypočteno $[M+H]^+$ 1086,46078; $[M+Na]^+$ 1108,44272; nalezeno $[M+H]^+$ 1086,45378 ($\Delta = 6,44$ ppm); $[M+Na]^+$ 1108,43429 ($\Delta = 7,6$ ppm).

4.3.4 Syntéza standardu **pep04**

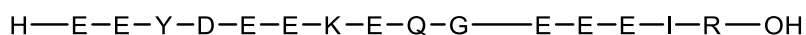


Syntéza byla provedena na syntetizátoru Librety Blue podle obecné metody v měřítku 0,25 mmol. Byl použit Ring Amid resin (0,76 g; loading = 0,33 mmol/g). Po sušení resinu bylo získáno 1,14 g peptidu na resinu. Následně byl proveden cleavage podle obecné metody s využitím 11,4 ml cleavage koktejlu, bylo získáno 0,31 g surového peptidu. Surový peptid byl rozpuštěn v 5% roztoku ACN/voda a čištěn pomocí preparativní HPLC s gradientovou elucí ACN/voda (gradient 5-25, Tabulka 5). $t_R = 26$ min. Po lyofilizací bylo získáno 0,1 g peptidu. Výtěžek: 47,8 %.

Čistota peptidu podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) 94 %. $t_R = 2,16$ min.

HRMS (MALDI, m/z): pro $C_{57}H_{90}N_{16}O_{14}$ vypočteno $[M+H]^+$ 1223,68972; $[M+Na]^+$ 1245,67166; nalezeno $[M+H]^+$ 1223,68030 ($\Delta = 7,7$ ppm); $[M+Na]^+$ 1245,66113 ($\Delta = 8,45$ ppm).

4.3.5 Syntéza standardu **pep05**



Syntéza byla provedena na syntetizátoru Symphony podle obecné metody v měřítku 0,15 mmol. Byl použit Fmoc-Arg-Wang resin (0,5 g; loading = 0,3 mmol/g). Po sušení resinu bylo získáno 1 g peptidu na resinu. Následně byl proveden cleavage podle obecné metody s využitím 10 ml cleavage koktejlu, bylo získáno 0,3 g peptidu. Výtěžek: 98,4 %.

Čistota peptidu podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) 93,16 %. $t_R = 1,529$ min.

HRMS (MALDI, m/z): pro $C_{78}H_{118}N_{20}O_{36}$ vypočteno $[M+H]^+$ 1911,80904; nalezeno $[M+H]^+$ 1911,80066 ($\Delta = -4,38$ ppm).

4.3.6 Syntéza standardu **pep06**



Syntéza byla provedena na syntetizátoru Symphony podle obecné metody v měřítku 0,15 mmol. Byl použit Rink Amid resin (0,455 g; loading = 0,33 mmol/g). Po sušení resinu bylo získáno 0,85 g peptidu na resinu. Následně byl proveden cleavage podle obecné metody s využitím 8,5 ml cleavage koktejlu, bylo získáno 0,24 g peptidu. Výtěžek: 76,8 %.

Čistota peptidu podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) 89,14 %. $t_R = 2,320$ min.

HRMS (MALDI, m/z): pro $C_{89}H_{155}N_{27}O_{23}$ vypočteno $[M+Na]^+$ 1993,16813; nalezeno $[M+Na]^+$ 1993,15713 ($\Delta = -12,12$ ppm).

4.3.7 Syntéza standardu **pep07** (cyklická formy oxytocinu)



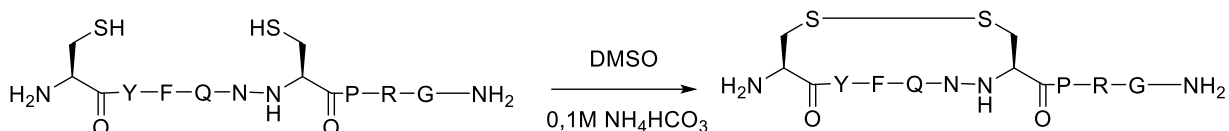
0,13 g Oxytocinu otevřené formy bylo rozpuštěno v 6,5 ml DMSO (100 mg peptidu – 5 ml DMSO) a následně bylo přidáno 130 ml vodného roztoku 0,1M NH₄HCO₃ (100 mg peptidu – 100 ml pufru). Reakce byla míchaná za laboratorní teploty. Průběh reakce byl sledován pomocí HPLC-MS. Úplná konverze produktu byla dosažena mícháním roztoku přes noc. Výsledný roztok byl ředěn 2% ACN ve vodě na čtyřnásobný objem. Následně byl roztok

okyselen na pH 4 a čištěn pomocí preparativní HPLC (Tabulka 5). $t_R = 35$ min. Lyofilizací spojených frakcí bylo získáno 0,09 g peptidu. Výtěžek: 69,2 %.

Čistota peptidu podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) 98 %. $t_R = 2,21$ min.

HRMS (MALDI, m/z): pro $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$ vypočteno $[M+H]^+$ 1007,44374; $[M+Na]^+$ 1029,42568; nalezeno $[M+H]^+$ 1007,43918 ($\Delta = -4,53$ ppm); $[M+Na]^+$ 1029,421 ($\Delta = -4,2$ ppm).

4.3.8 Syntéza standardu **pep08** (cyklická forma vazopresinu)



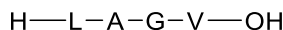
0,13 g Vazopresinu otevřené formy bylo rozpuštěno v 6,5 ml DMSO (100 mg peptidu – 5 ml DMSO) a následně bylo přidáno 130 ml vodného roztoku 0,1M NH_4HCO_3 (100 mg peptidu – 100 ml pufru). Reakce byla míchaná za laboratorní teploty. Průběh reakce byl sledován pomocí HPLC-MS. Úplná konverze produktu byla pozorována mícháním přes noc. Výsledný roztok byl naředěn ACN vodou na 2% roztok ACN. Následně roztok byl okyselen na pH 4. A čištěn pomocí preparativní HPLC s gradientovou elucí (gradient 5-25, Tabulka 5).

Analýza frakce byla provedena pomocí HPLC-MS a UPLC. Spojením frakce a lyofilizace bylo získáno 0,08 g produktu. Výtěžek: 61,5 %.

Čistota peptidu podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) 98,41 %. $t_R = 1,920$ min.

HRMS (MALDI, m/z): pro $C_{46}H_{65}N_{15}O_{12}S_2$ vypočteno $[M+H]^+$ 1084,44513; $[M+Na]^+$ 1106,42707; nalezeno $[M+H]^+$ 1084,438031 ($\Delta = 6,53$ ppm); $[M+Na]^+$ 1106,41897 ($\Delta = 7,32$ ppm).

4.3.9 Syntéza standardu **pep09**



Syntéza byla provedena na syntetizátoru Symphony podle obecné metody v měřítku 0,25 mmol. Byl použit Fmoc-Val-Wang resin (0,83 g; loading = 0,3 mmol/g). Po sušení resinu bylo získáno 0,85 g peptidu na resinu. Následně byl proveden cleavage podle obecné metody s využitím 8,5 ml cleavage koktejlu, bylo získáno 0,05 g peptidu. Výtěžek: 42,4 %.

Čistota peptidu podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) 93,16 %. $t_R = 1,836$ min.

HRMS (MALDI, m/z): pro $C_{16}H_{30}N_4O_5$ vypočteno $[M+H]^+$ 359,22890; $[M+Na]^+$ 381,21084; nalezeno $[M+H]^+$ 359,22825 ($\Delta = 1,81$ ppm); $[M+Na]^+$ 381,20995 ($\Delta = -2,3$ ppm).

4.4 Obecné metody syntézy peptidů v mikromolárním měřítku

4.4.1 Obecná metoda SPPS v mikromolárním měřítku na syntetizátoru MultiPep RSi

15,15 mg Rink amid resinu (5 μ mol, loading = 0,33 mmol/g) bylo naváženo do vialky. Resin byl nabobtnán DMF a přenesen pipetou do očíslované reakční pozice racku 8x12. Deprotekce Fmoc bylo dosaženo 2x8 minutovou reakcí s 20% piperidinem (45 ekv.) v DMF. Následně byl resin promyt DMF. Kondenzační reakce byla provedena přidáním roztoku preaktivované aminokyseliny do příslušné reakční pozice. Preaktivace byla provedena předchozím smícháním 0,3M roztoku požadované aminokyseliny v DMF báze (kolidin nebo NMM) v DMF a aktivačního činidla (HCTU nebo DIC/oxyma) po dobu 15 min. Kondenzační reakce byly provedeny v modu single nebo double. Po kondenzační reakci byl v některých případech proveden capping pomocí roztoku Ac₂O (0,5M, 20 ekv.) a kolidinu (0,5M, 20 ekv.) v DMF po dobu 15 min. Přesné reakční podmínky a výsledky jsou uvedeny v kapitole 3.5.1 a Tabulce 7. Po dokončení syntézy byl resin promyt DMF, DCM, MeOH, a Et₂O, sušen v exsikátoru přes noc.

4.4.2 Obecná metoda cleavage peptidu z resinu v mikromolárním měřítku

K suchému resinu bylo přidáno 200 μ l cleavage koktejlu o složení: TFA/TIS/H₂O/DTT (90:5:2,5:2,5) pokud peptid obsahoval Cys nebo Met, nebo TFA/TIS/H₂O (92,5:5:2,5) pokud peptid tyto snadno oxidovatelné aminokyseliny neobsahoval. Po 1 hod od přidavku činidla byla provedena filtrace. Získaný filtrát byl ponechán reagovat dále po dobu 1 hod. Následně byl přidán 1 ml ochlazeného MTBE (4 °C) a vysrážený peptid byl ponechán v lednici přes noc. Následně byl peptid odstředěn, promyt MTBE a sušen v exsikátoru přes noc.

Čistota surového peptidu byla analyzovaná UPLC a identita byla potvrzena analýzou HPLC-MS. Syntéza peptidu byla pro každý testovaný parametr provedena čtyřikrát. V Tabulka je uvedena průměrná hodnota chemické čistoty surového peptidu ze čtyř opakování syntézy při shodných podmínkách provedení.

4.5 Syntéza peptidů v mikromolárním měřítku

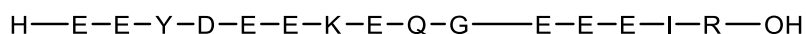
4.5.1 Syntéza testovacích peptidů pep01, pep02, pep03, pep04

Testovací syntéza byla provedena pro každý peptid čtyřikrát podle obecné metody (kapitola 4.4.1) na syntetizátoru MultiPep RSi s následným cleavage podle obecné metody (kapitola 4.4.2) s využitím různých parametrů. Parametry a čistoty získaných peptidů jsou uvedené v Tabulce 7.

Tabulka 7. Výsledky syntézy peptidů na syntetizátoru MultiPep RSi v závislosti na zvolených podmínkách provedení. Přebytky počítány na množství použitého resinu a jeho loadingu.

Experiment	Přbytek aminokyselin, ekv.	Aktivační činidla	Přbytek aktivčního činidla, ekv.	Báze	Přbytek bází, ekv.	Double coupling	Capping	Doba cleavage, h	Čistota surového peptidu, %			
									pep01 (ACP)	pep02 (otevřená forma oxytocinu)	Pep03 (otevřená forma vazopresinu)	pep04
1.	5	HCTU	5	NMM	6	Ano	Ne	2	86,4±1,145	74,55±3,8	58,63±2,5	-
2.	5	DIC	7	kolidin	7,5	Ano	Ne	2	88,34±0,6	75,33±4,12	81,625±1,25	-
		Oxyrna	5,8									
3.	5	DIC	7	kolidin	7,5	Ano	Ano	3	91,36±2,06	87,45±3,93	90,45±0,29	91,16±0,61
		Oxyrna	5,8									
4.	5	DIC	7	kolidin	7,5	Ano	Ne	3	92,25±0,57	81,6± 6,36	90,23±1,27	91,75±1,1
		Oxyrna	5,8									
5.	5	HCTU	5	NMM	6	Ano	Ne	3	85,21±1,15	82,3±0,64	80,69±2,76	82,65±2,35
6.	5	HCTU	5	NMM	6	Ano	Ano	3	85,67±1,32	81,89±0,91	84,44±1,69	83,85±1,71
7.	5	DIC	7	kolidin	7,5	Ano	Ne	3	88,40±1,7	72,86±3,1	86,18±1,77	85,91±1,24
		Oxyrna	5,8									
8.	4	DIC	5,6	kolidin	6	Ano	Ne	3	83,34±3,19	64,62±2,54	85,35 ± 4,45	84,78±2,93
		Oxyrna	4,7									
9.	3	DIC	4,2	kolidin	4,5	Ano	Ne	3	82,3±1,42	78,86±4,97	86,85±3,98	84,44±1,56
		Oxyrna	3,5									
10.	2	DIC	2,8	kolidin	3	Ano	Ne	3	79,22±4,56	54,07±4,92	86,0±4,5	62,21±5,98
		Oxyrna	2,3									
11.	1,5	DIC	2,1	kolidin	2,25	Ano	Ne	3	14,21±2,62	27,12±7,36	31,59±3,2	4,58± 2,0
		Oxyrna	1,75									
12.	4	DIC	5,6	kolidin	6	Ne	Ne	3	21,82±1,44	22,82±0,54	34,24±8,06	3,14± 0,5
		Oxyrna	4,7									
13.	5	DIC	7	kolidin	7,5	Ne	Ne	3	61,92±6,08	48,43±3,73	67,39±2,57	12,07±1,69
		Oxyrna	5,8									
14.	1,5	DIC	2,1	kolidin	2,25	Ano	Ano	3	68,57±3,36	71,65±1,14	72,36±1,71	53,30±3,02
		Oxyrna	1,75									

4.5.2 Syntéza peptidu pep05



Syntéza byla provedena na syntetizátoru MultiPep RSi podle obecné metody 3.4.1 za podmínek experimentu 8 (Tabulka 7) v měřítku 5 μmol . Byl použit Fmoc-Arg-Wang resin (16,7 mg; loading = 0,3 mmol/g).

Čistota surového peptidu podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) 80,28 %. $t_R = 1,532$ min.

HPLC-MS (m/z): pro $\text{C}_{78}\text{H}_{118}\text{N}_{20}\text{O}_{36}$ vypočteno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1911,81 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 956,41 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 637,94 nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 191,18 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 956,62 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 638,51.

4.5.3 Syntéza peptidu **pep06**

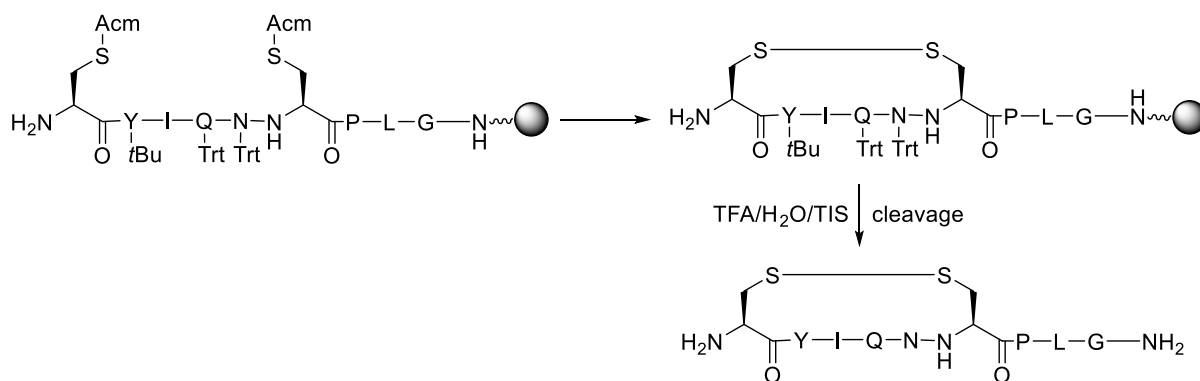


Syntéza byla provedena na syntetizátoru MultiPep RSi podle obecné metody podmínek experimentu 8 (Tabulka 7) v měřítku 5 μmol . Byl použit Rink amid resin (15,15 mg; loading = 0,33 mmol/g).

Čistota peptidu podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) 71,77 %. $t_R = 2,314$ min.

HPLC-MS (m/z): pro $\text{C}_{89}\text{H}_{155}\text{N}_{27}\text{O}_{23}$ vypočteno $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 986,10 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 657,73 nalezeno $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 986,76 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 658,30

4.5.4 Syntéza peptidu **pep07** (cyklická forma oxytocinu)



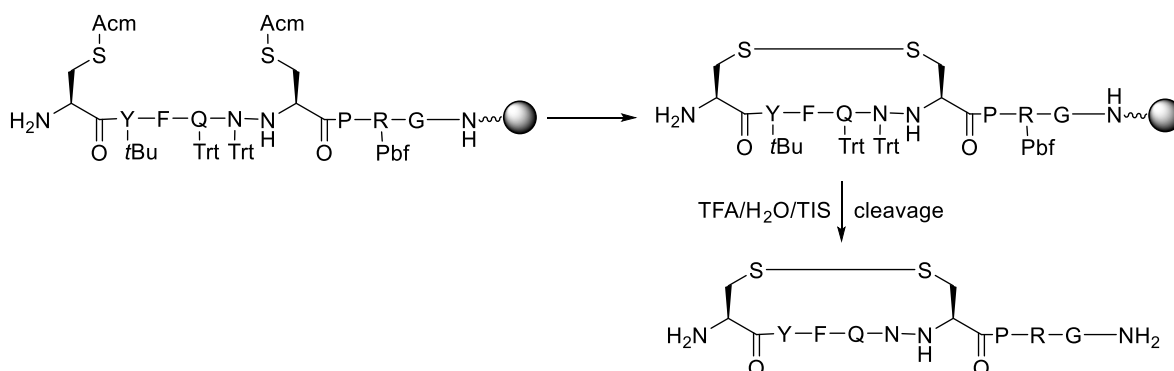
Syntéza byla provedena na syntetizátoru MultiPep RSi podle obecné metody, za podmínek experimentu 8 (Tabulka 7) v měřítku 5 μmol . Byl použit Rink Amid resin (15,15 mg; loading = 0,33 mmol/g). Byl použit Acm ochráněný cystein (Fmoc-Cys(Acm)-OH). Peptid na resinu byl sušen přes noc v exsikátoru.

Peptid na resinu byl nabobtnán DMF, a následně byl přidán nasycený roztok I_2 v 2% AcOH/H₂O po dobu 1 hod. Následně byl resin odfiltrován, promyt DMF, DCM a DMF. Byl přidán nasycený roztok I_2 v 2 % AcOH/H₂O po dobu 1 hod. Resin byl promyt 3x DMF, 2x 2% roztokem kyseliny askorbové v DMF, 3x DMF a 3x DCM. Resin byl sušen v exsikátoru přes noc.

Cleavage byl proveden koktejlem neobsahujícím DTT aby nedošlo k redukci S-S vazby. Syntéza byla opakována čtyřikrát a poskytovala peptidy o čistotě podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2): $28,22 \pm 3,26$ % $t_R = 2,32$ min.

HPLC-MS (m/z): pro $\text{C}_{43}\text{H}_{66}\text{N}_{12}\text{O}_{12}\text{S}_2$ vypočteno $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 504,23 nalezeno $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 504,67.

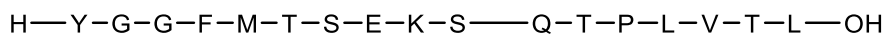
4.5.5 Syntéza peptidu **pep08** (cyklická forma vazopresinu)



Syntéza byla provedena na syntetizátoru MultiPep RSi analogicky jako syntéza oxytocinu cyklické formy. Syntéza byla provedena čtyřikrát a poskytovala peptidy o čistotě podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) $30,1 \pm 2,42\%$, $t_R = 2,32$ min.

HPLC-MS (m/z): pro $C_{46}H_{65}N_{15}O_{12}S_2$ vypočteno $[M+2H]^{2+}$ 542,73 nalezeno $[M+2H]^{2+}$ 543,18.

4.5.6 Syntéza peptidu **pep10** (γ -endorfin)

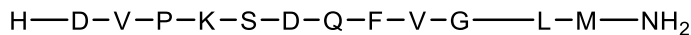


Syntéza byla provedena na syntetizátoru MultiPep RSi podle obecné metody podmínek experimentu 8 (Tabulka 7) v měřítku 5 μ mol. Byl použit Fmoc-Arg-Wang resin (16,7 mg; loading = 0,3 mmol/g).

Čistota peptidu podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) 19,10 %, $t_R = 2,394$ min.

HPLC-MS (m/z): pro $C_{83}H_{131}N_{19}O_{27}S$ vypočteno $[M+2H]^{2+}$ 929,97 nalezeno $[M+2H]^{2+}$ 930,59.

4.5.7 Syntéza peptidu **pep11** (kassinin)



Syntéza byla provedena na syntetizátoru MultiPep RSi podle obecné metody podmínek experimentu 8 (Tabulka 7) v měřítku 5 μ mol. Byl použit Rink amid resin (15,15 mg; loading = 0,33 mmol/g).

Čistota peptidu podle UPLC (gradient 2-60, Tabulka 2) 37,73 %, $t_R = 3,022$ min.

HPLC-MS (m/z): pro $C_{59}H_{95}N_{15}O_{18}S$ vypočteno $[M+2H]^{2+}$ 666,78; nalezeno $[M+2H]^{2+}$ 668,31.

5 Výsledky a diskuse

5.1 Testovací parametry

Byly zkoumány kritické parametry robotické syntézy čtyř peptidů na přístroji Multi pep RSi. Pro testy byly použity následující oligopeptidy: otevřená forma oxytocinu, otevřená forma vazopresinu, ACP a peptidu s *ad hoc* navrženou sekvencí (o délce 12 aminokyselin). Hodnotícím kritériem byla čistota surových peptidů stanovená pomocí UPLC. Výsledky byly porovnány pro různé nastavení podmínek syntéz na přístroji Multi pep RSi a také s výsledky syntéz na jiných robotických syntetizátorech.

Testované parametry robotické syntézy:

- Kondenzační činidlo
- Báze
- Capping
- Přebytek aminokyselin
- Použití modu single coupling nebo double coupling

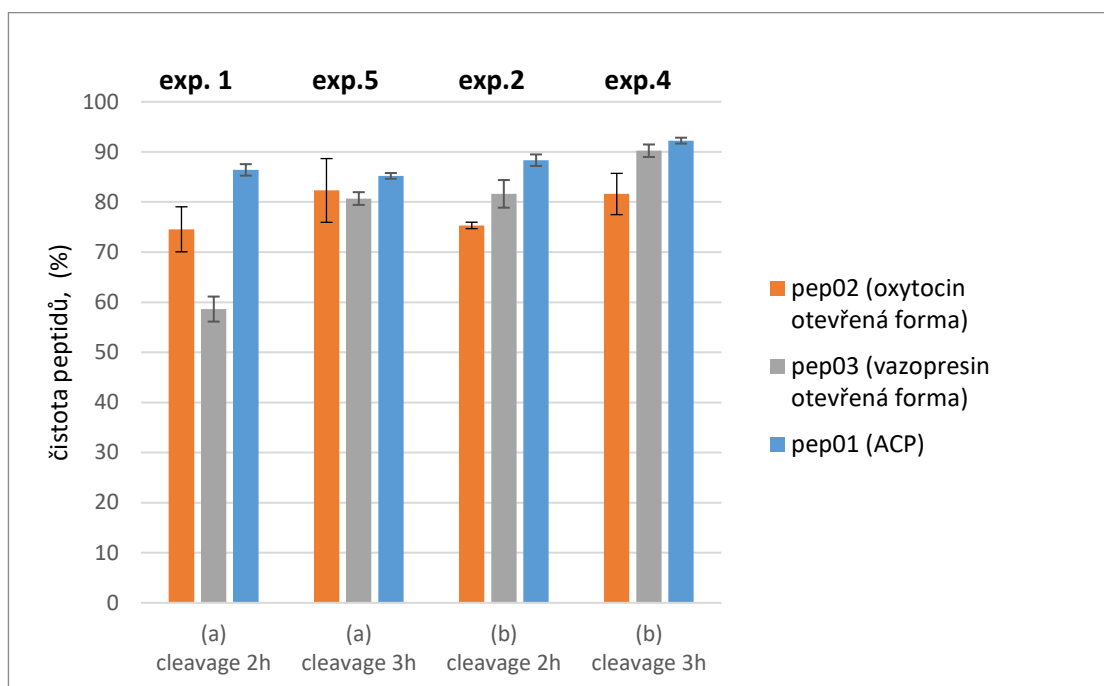
Cappingem se nazývá acylace nezreagované koncové α -aminoskupiny peptidu po kondenzační reakci. Tím se zastavuje růst peptidu s chybnou sekvencí.

Single coupling mód znamená přidavek aminokyseliny najednou během kondenzačního stupně, v módu double coupling se aminokyselina dávkuje dvakrát. Po kondenzační reakci s první dávkou se resin promývá a přidává se druhá dávka aminokyseliny. Díky tomu může být dosažen vyšší stupeň konverze.

Dále byla testována doba cleavage, která přímo nesouvisí s robotickou syntézou, ale se zpracováním produktů a má vliv na hodnotící kritérium.

5.2 Vliv testovaných parametrů robotické syntézy

5.2.1 Vliv času cleavage

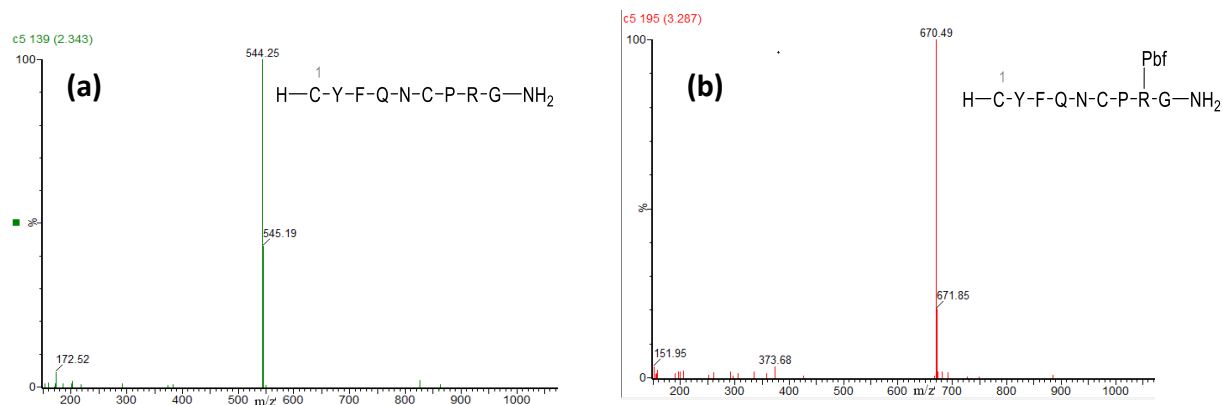


Graf 1. Závislost čistoty peptidu, (%) na době cleavage za podmínek syntézy:

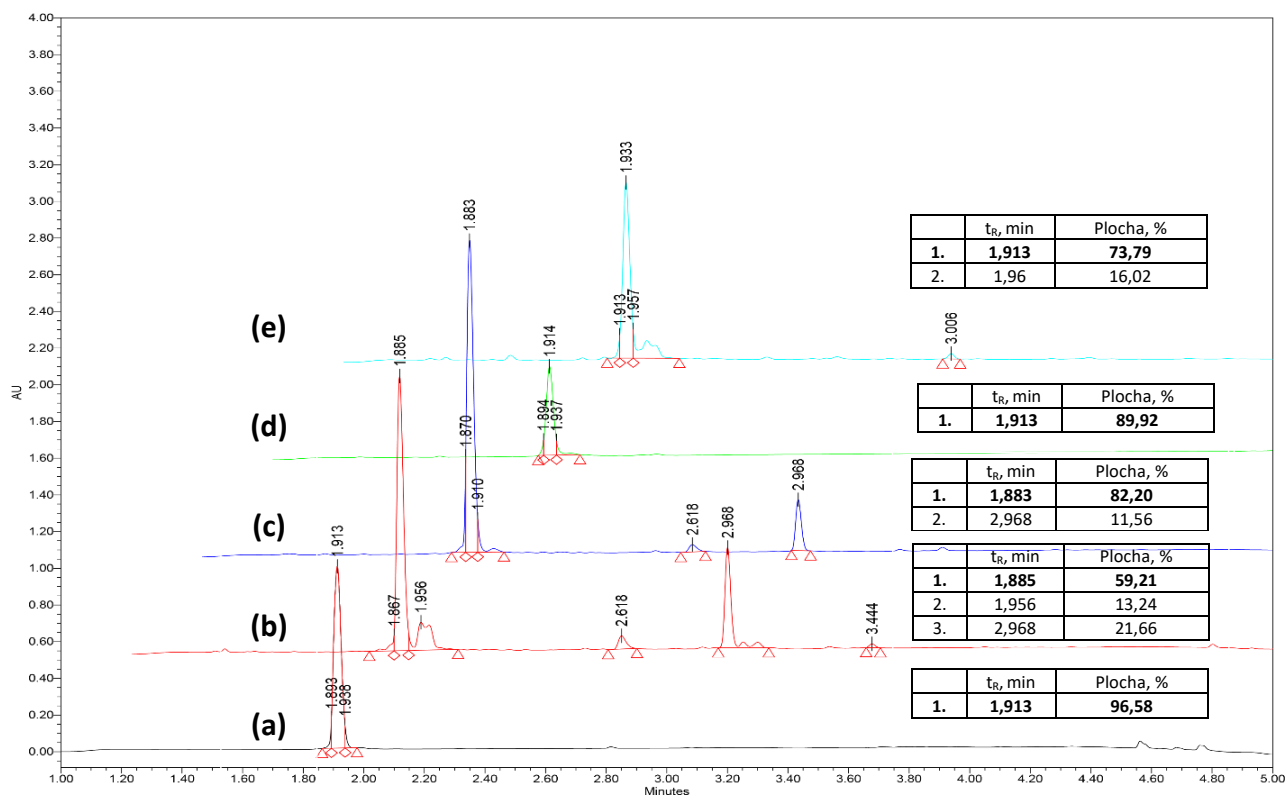
(a) 5 ekv. AMK, 5 ekv. HCTU, 6 ekv. NMM

(b) 5 ekv. AMK, 7 ekv. DIC, 5,8 ekv. oxyma, 7,5 ekv. kolidinu

V experimentech 1 a 2 byl peptid na resinu podroben běžnému dvouhodinovému cleavage procesu. V případě otevřené formy peptidu vazopresinu byl při analýze čistoty surové formy (Obrázek 33 **(b)** a **(c)**) pozorován kromě píku peptidu $t_R = 1,9$ min pík významné nečistoty $t_R = 2,97$ min. Z hmotnostních spekter pro obě látky byl zjištěn rozdíl hmot 252,48 Da, což odpovídá chránicí skupině Pbf aminokyseliny argininu. (Obrázek 32). Na základě tohoto pozorování byl učiněn závěr, že 2 hod nestačují k úplnému odchránění všech funkčních skupin (podle UPLC obsah nečistoty 14 až 30 % viz Obrázek 33). V následujících experimentech 4 a 5, které byly provedeny za stejných podmínek syntézy, byla doba cleavage prodloužena na 3 hod. V těchto případech již otevřená forma vazopresinu téměř neobsahovala původně pozorovanou majoritní nečistotu, (Obrázek 33 **(d)** a **(e)**).



Obrázek 32. MS-spektrum odpovídající pep03 (vazopresin otevřená forma) (a), Pb-ochráněnému pep03 (b). Jako hlavní pík jsou pozorovány signály odpovídající iontům $[M+2H]^{2+}$.



Obrázek 33. UPLC analýzy pep02 (otevřená forma vazopresinu):

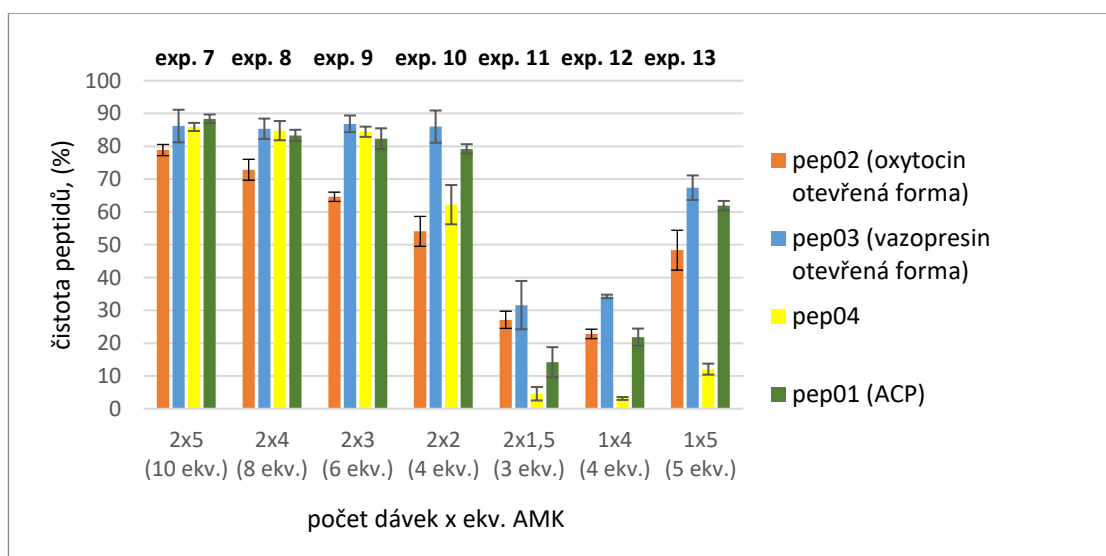
- (a) standard syntetizovaný na Liberty Blue a purifikovaný pomocí HPLC
- (b) crude peptid připravený na MultiPep RSi za podmínek experimentu 1, 2h cleavage
- (c) crude peptid připravený na MultiPep RSi za podmínek experimentu 2, 2h cleavage
- (d) crude peptid připravený na MultiPep RSi za podmínek experimentu 4, 3h cleavage
- (e) crude peptid připravený na MultiPep RSi za podmínek experimentu 5, 3h cleavage

5.2.2 Vliv aktivačního činidla a báze

Pro porovnání vlivu kombinace aktivačního činidla a báze byly provedeny experimenty 1, 2, 4 a 5. Rozdíl v čistotě získaných surových peptidů byl pozorován zejména u otevřené formy vazopresinu (Graf 1). V případě kombinace HCTU a NMM použité v experimentu 1 (Obrázek 33 (b)) a experimentu 5 (Obrázek 33 (e)) byl pozorován vedle píku otevřené formy vazopresinu (hlavní pík $t_R = 1,9$ min) i pík nečistoty ($t_R = 1,96$ min) v poměru 3:1 až 4:1. Podle analýzy HPLC-MS mají obě složky stejné hmotnostní spektrum, což znamená, že pozorovaným vedlejším produktem je epimer vazopresinu. V případě kombinace DIC a oxymy pro aktivaci karboxylové skupiny a kolidinu jako báze k epimeraci výrazně nedocházelo, což je zřejmé z výsledků experimentů 2 a 4 (Obrázek 33 (c) a (d)). Tento výsledek patrně souvisí s nižší bazicitou kolidinu. Získaný poznatek vedl k rozhodnutí v dalších syntézách využívat pouze směs DIC/oxyma k preaktivaci aminokyselin a kolidin jako bázi.

5.2.3 Vliv přebytku aminokyselin a double couplingu

Dosáhnout vysokého stupně konverze během kondenzačních reakcí a tím minimalizovat vznik vedlejších produktů napomáhá použití velkých přebytků aminokyselin, obvykle se jedná o 10 ekvivalentů. V experimentech 7 - 13 byla provedena syntéza v módu single coupling nebo double coupling s využitím různých přebytků aminokyselin. V případě double couplingu peptid je podroben kondenzační reakci, následně se resin promývá DMF a přidává se další dávka aktivované aminokyseliny. Tím je dosaženo větší konverze. Výsledek syntéz je možné nalézt v Grafu 2. Přebytky aminokyselin počítány na množství použitého resinu a jeho loadingu.

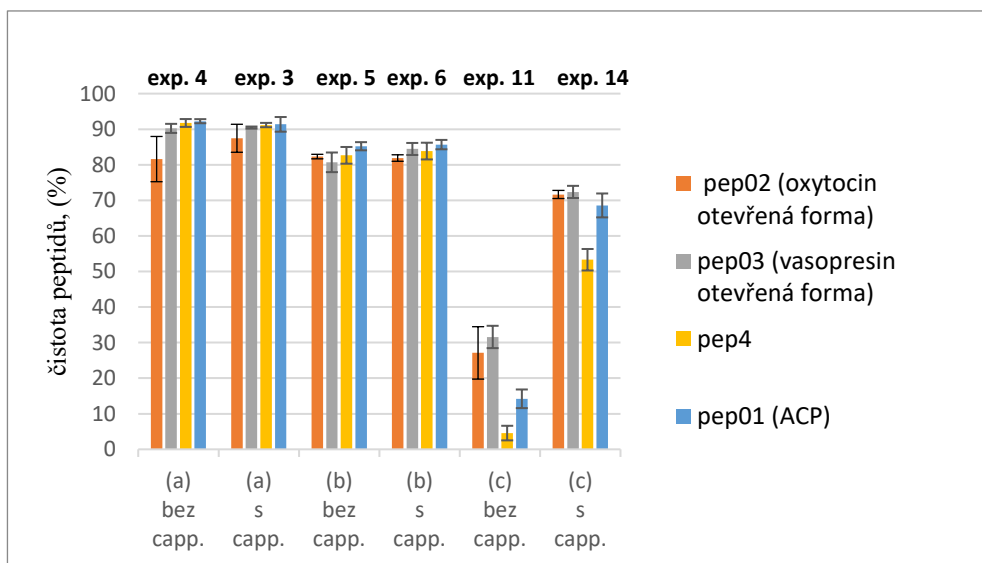


Graf 2. Závislost čistoty peptidu, (%) na přebytku aminokyselin a módu single coupling nebo double coupling

Podle grafu je vidět, že v módu double coupling byly získány peptidy o srovnatelné čistotě při využití přebytků aminokyselin (2-5 ekv). V případě otevřené formy oxytocinu se snížením přebytku čistota surového peptidu klesala, což může souviset s tím, že tento peptid obsahuje Arg, který je obecně problémovou aminokyselinou a relativně hůř kondenzuje. Použití přebytků 1,5 ekvivalentu bylo dosaženo surových peptidů o nízké čistotě.

Výsledky syntéz peptidů v módu single coupling jsou v porovnání s módem double coupling výrazně horší. Jako důkaz je možné uvést čistoty surových peptidů v experimentech 10 a 12, Graf 2. Při dávkování 4 ekv. AMK metodou double coupling (2 dávky po 2 ekv.) byly získány surové peptidy o vyšší čistotě než při dávkování 4 ekvivalenty najednou. Takový výsledek může souviset s krátkou reakční dobou kondenzačního stupně, který není dostačující k úplné konverzi reakce v módu single coupling. V experimentech 7, 8, 9, 10 je vidět, že s přidáváním dalších ekvivalentu AMK již nedochází k tak výraznému posunu v čistotě peptidů. Pro tuto sadu peptidů je proto možné prohlásit, že při využití módu double coupling se jako ideální jeví použití 4-6 ekv. AMK při kondenzačním stupni. Oproti syntéze na Symphony (kapitola 4.2.1) to představuje úsporu mezi 40-60 % AMK.

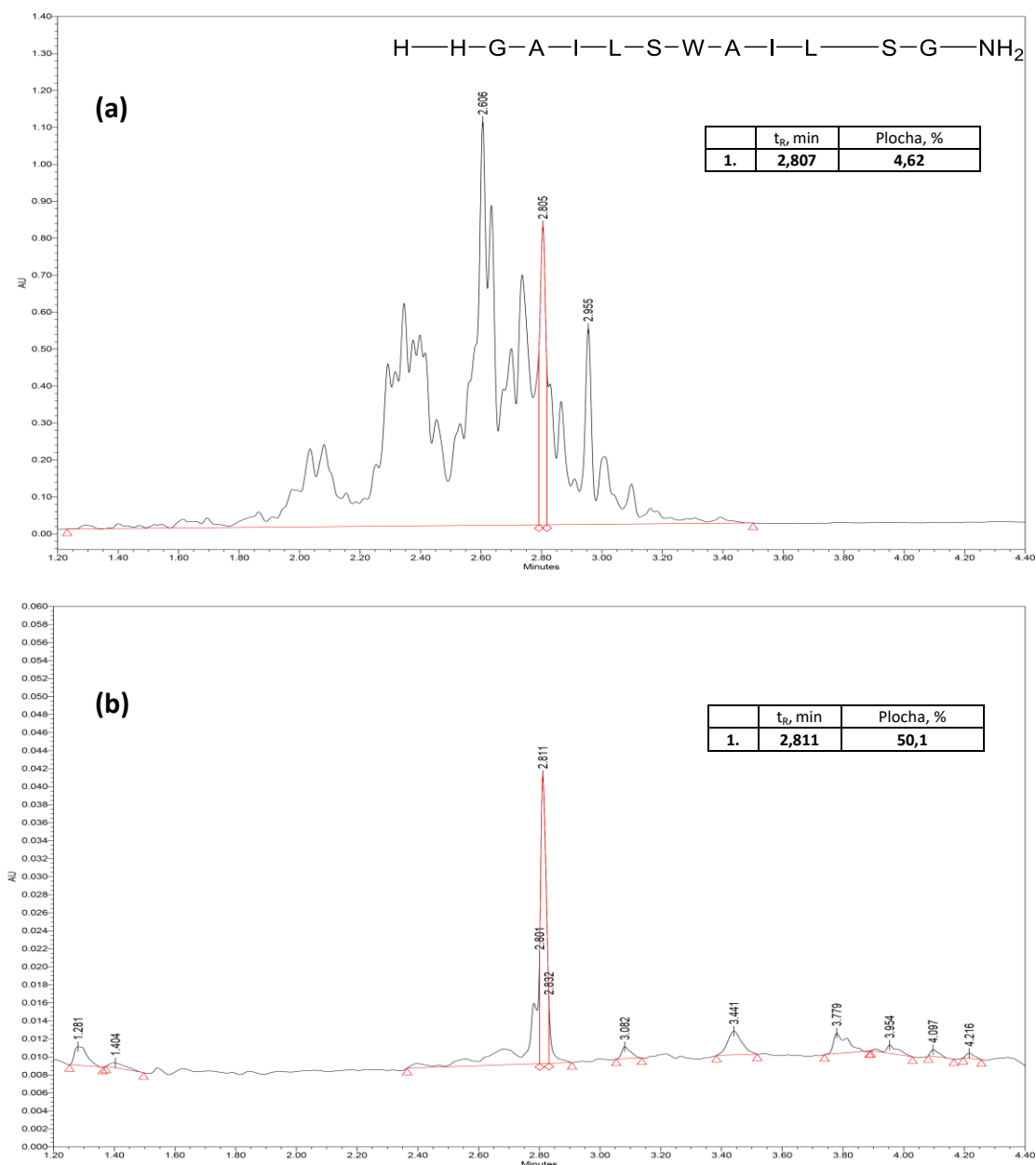
5.2.4 Vliv cappingu



Graf 3. závislost čistoty peptidu, % na cappingu za podmínek:

- (a) 5 ekv. AMK, 5 ekv. HCTU, 6 ekv. NMM, double coupling mód
- (b) 5 ekv. AMK, 7 ekv. DIC, 5,8 ekv. oxymy, 7,5 ekv. Kolidinu, double coupling mód
- (c) 1,5 ekv. AMK, 2,1 ekv. DIC, 1,75 ekv. oxymy, 7,5 ekv. kolidinu

Capping byl použit v experimentech 3, 6 a 14 a výsledek porovnán s experimenty 4, 5 a 11, 14 které byly provedeny bez cappingu. Ostatní podmínky zůstaly shodné. Rozdíl v čistotách crude peptidů byl pozorován pouze v případě použití velmi malého přebytku aminokyselin (2 x 1,5 ekv.). Z provedených experimentů vyplývá, že při využití velkých přebytků aminokyselin a aktivačních činidel je konverze kondenzačních reakcí velmi vysoká, a proto nemá capping na čistotu surových peptidů významný vliv. Naopak, v případě použití velmi malých přebytků aminokyselin (2 x 1,5 ekv.) je vliv cappingu na čistotu surových peptidů velmi pozitivní.



Obrázek 34. UPLC analýzy peptidu pep04:

- (a)** crude peptid připravený na MultiPep RSi za podmínek experimentu 11, bez cappingu
(b) crude peptid připravený na MultiPep RSi za podmínek experimentu 14, s cappingem

5.3 Návrh optimální metody robotické syntézy na syntetizátoru MultiPep RSi

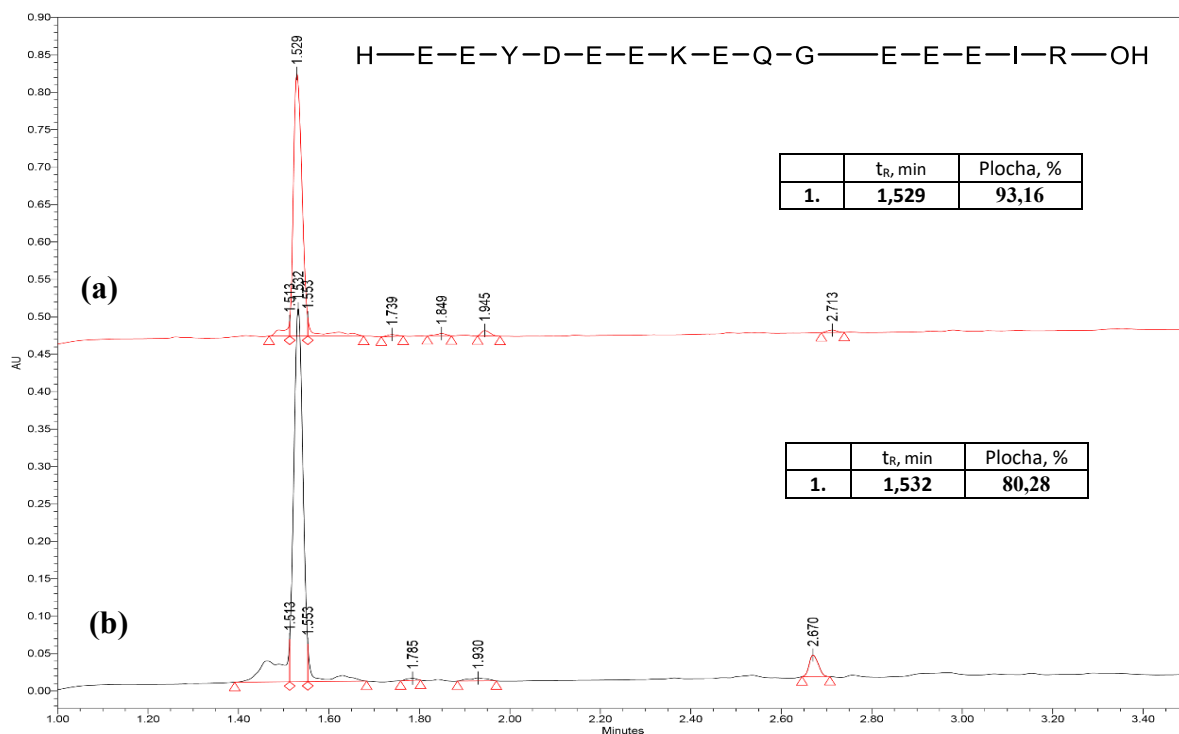
Na základě experimentů 1-14 byly pro syntézu peptidů na syntetizátoru MultiPep RSi navrženy jako optimální následující reakční podmínky:

- kondenzační činidlo a aktivátor: DIC a oxyma (1M roztok v DMF);
- báze: kolidin;
- přebytek aminokyselin: 3-4 ekv.;
- kondenzační mód: double;
- capping: Ne.

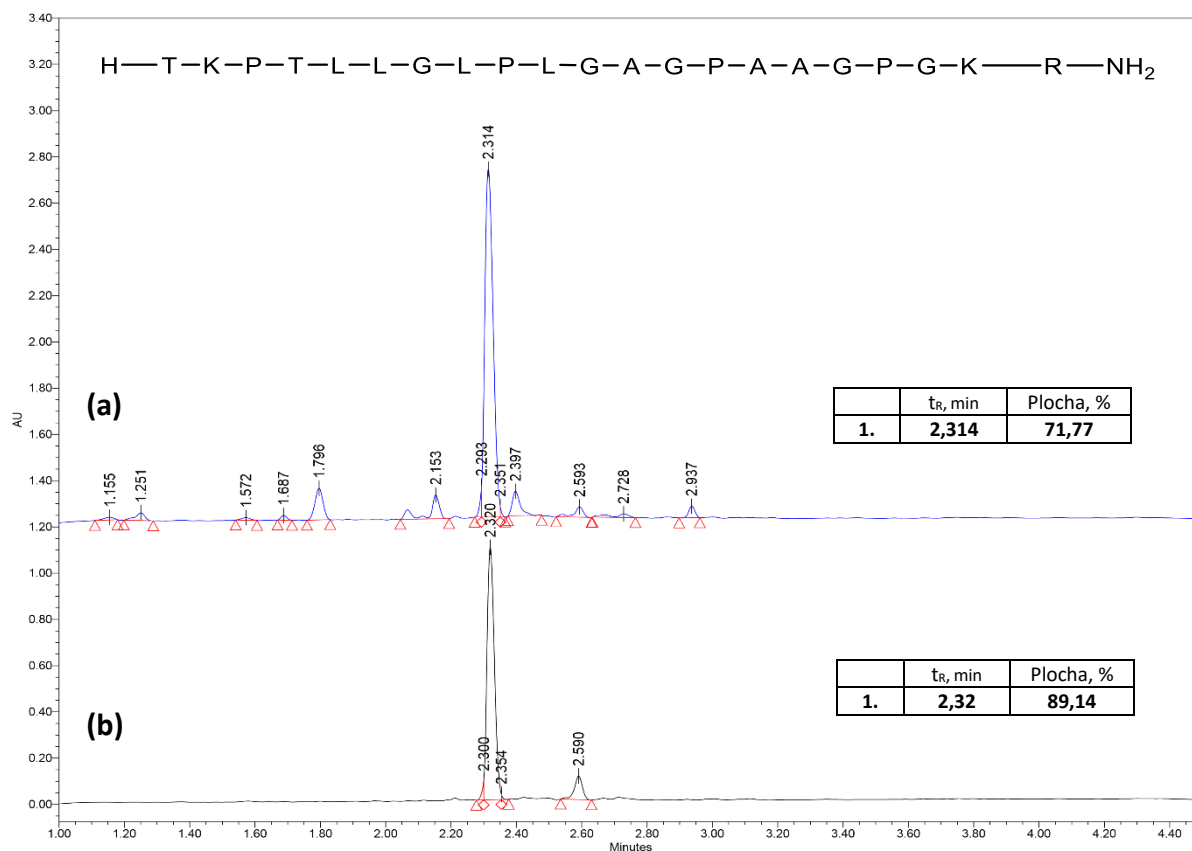
Pro cleavage je doporučeno prodloužení reakční doby ze 2 h na 3 h. Tento parametr nesouvisí primárně s nastavením syntetizátoru, ale má vliv na vyhodnocovací kritérium, což je čistota surových peptidů.

5.4 Ověření navržené optimální metody syntézou delších peptidů

Výsledné optimalizované podmínky použité pro ověřovací syntézy jsou kombinací dosažených výsledků s ohledem na standardní provedení a ceny vstupních materiálů, zejména kondenzačních činidel. Pomocí navržené optimální metody byla provedena ověřovací syntéza dvou peptidů v mikromolárním měřítku. Syntetizovány byly peptidy pep05 (15 AMK) a pep06 (21 AMK). Čistota připravených surových peptidů byla porovnána s výsledky syntéz stejných peptidů na syntetizátoru Symphony (Obrázek 35, Obrázek 36).



Obrázek 35. UPLC chromatogram peptidu pep06 připraveného na syntetizátoru Symphony (a) a MultiPep RSi (b)

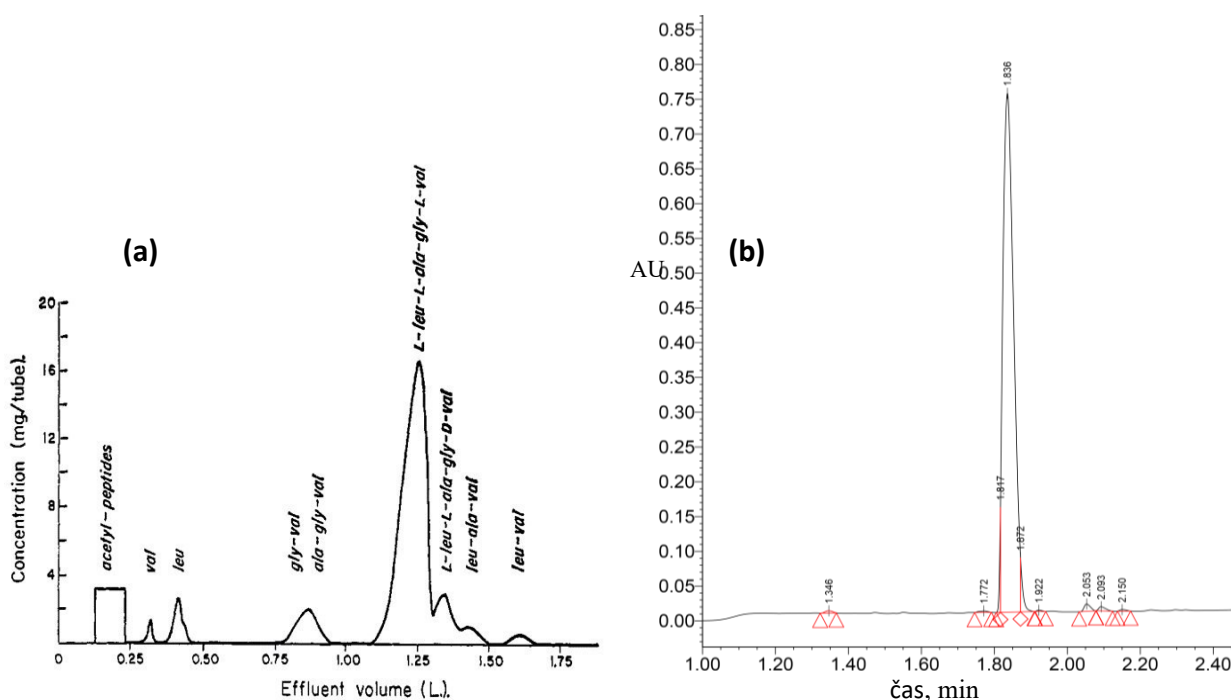


Obrázek 36. UPLC chromatogram peptidu pep05 připraveného na syntetizátoru MultiPep RSi (a) a Symphony (b)

5.5 Ostatní syntézy peptidů

5.5.1 Syntéza Merriefildova peptidu

Na přístroji Symphony byla provedena syntéza tetrapeptidu NH₂-LAVG-OH na kterém Merriefild představil nový přístup SPPS ke spolehlivé syntéze peptidů v roce 1963. Za tento objev dostal v roce 1986 Nobelovou cenu. Na Obrázku 37 je možné porovnat čistoty surového peptidu. 60 let vývoje metodiky v moderním odvětví je velmi znát. SPPS syntéza takového tetrapeptidu již není žádnou výzvou pro peptidového chemika.



Obrázek 37. UPLC chromatogram crudu tetrapeptidu pep09:

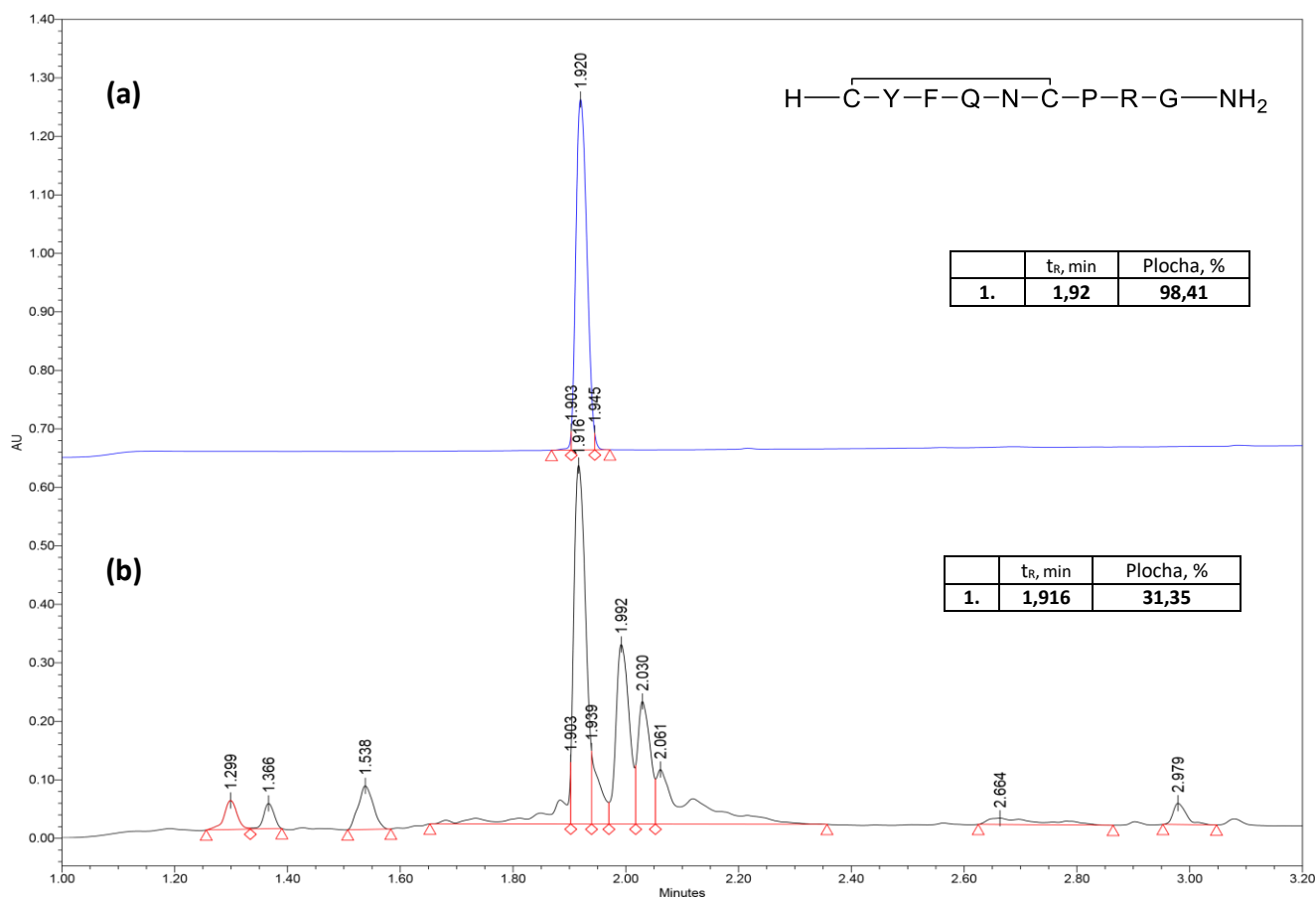
(a) připraveného Merriefieldem v roce 1963^[9]

(b) připraveného na syntetizátoru Symphony v roce 2022

5.5.2 Syntéza cyklických peptidů

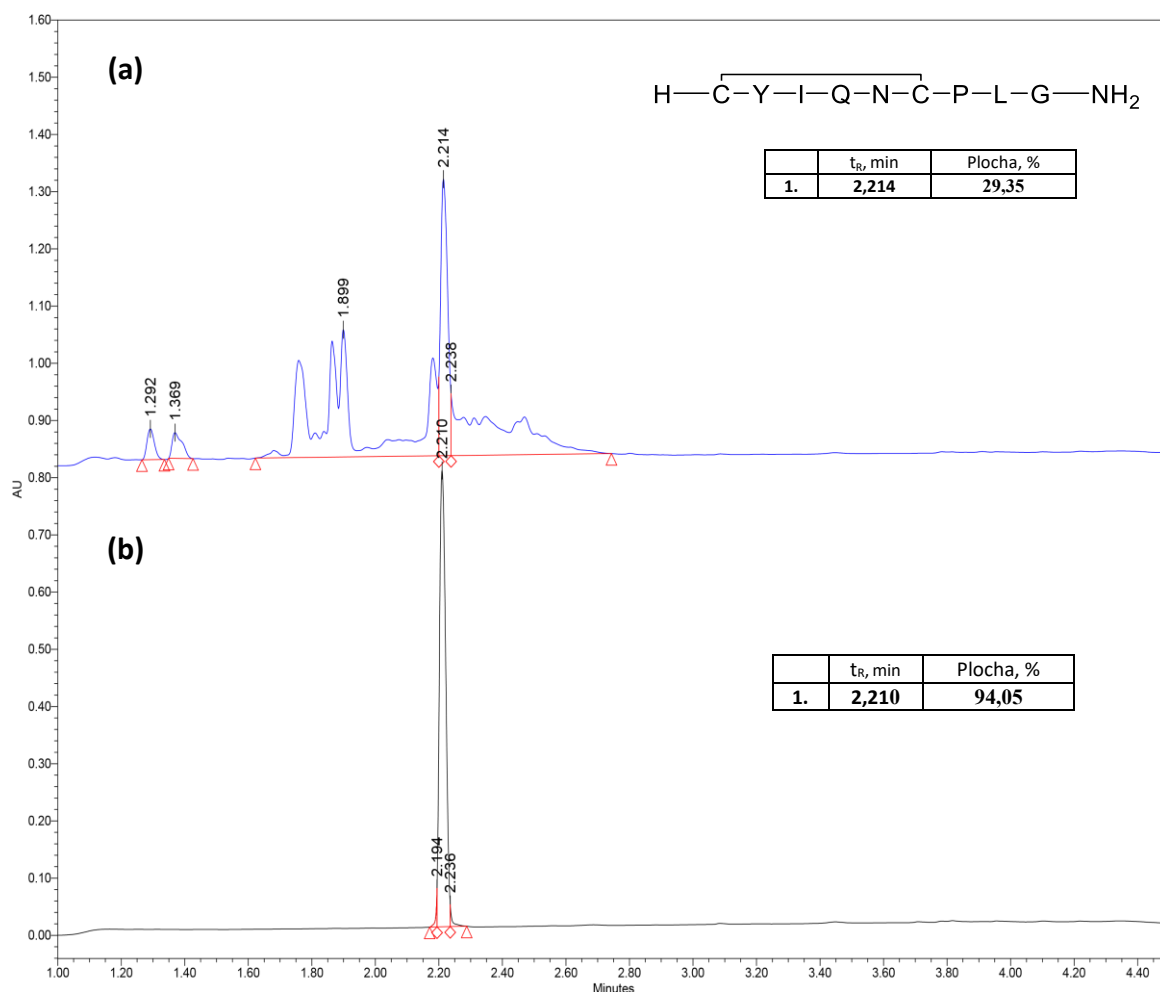
Cyklizace spojená se vznikem S-S můstků mezi cysteiny je rutinní reakce s dobře propracovaným postupem. Obvykle se provádí reakcí s DMSO v kyselém nebo bazickém pufru v roztoku a poskytuje peptidy o vysoké čistotě. V případě SPPS v mikromolárním měřítku se předpokládá provedení simultánní syntézy velkého množství peptidů, a proto by měl být použitý postup automatizovatelný. Bylo rozhodnuto provést v mikromolárním měřítku cyklizace pep2 a pep3 (otevřených forem oxytocinu a vazopresinu) ještě na resinu s využitím nasyceného roztoku I₂ v 2% AcOH a následně podrobit cyklický peptid cleavage. Na Obrázcích 37 a 38 jsou porovnány standardy cyklických forem připravených běžným postupem se surovými produkty připravenými v mikromolárním měřítku.

Cyklizací na resinu byly získány peptidy o srovnatelně nižší čistotě, však hlavní složkou směsi je požadovaný produkt, který by mohl být separován.



Obrázek 37. UPLC analýzy pep08 (cyklická forma vazopresinu):

- (a)** standard syntetizovaný na Liberty Blue a purifikovaný pomocí HPLC
- (b)** crude peptid připravený na MultiPep RSi



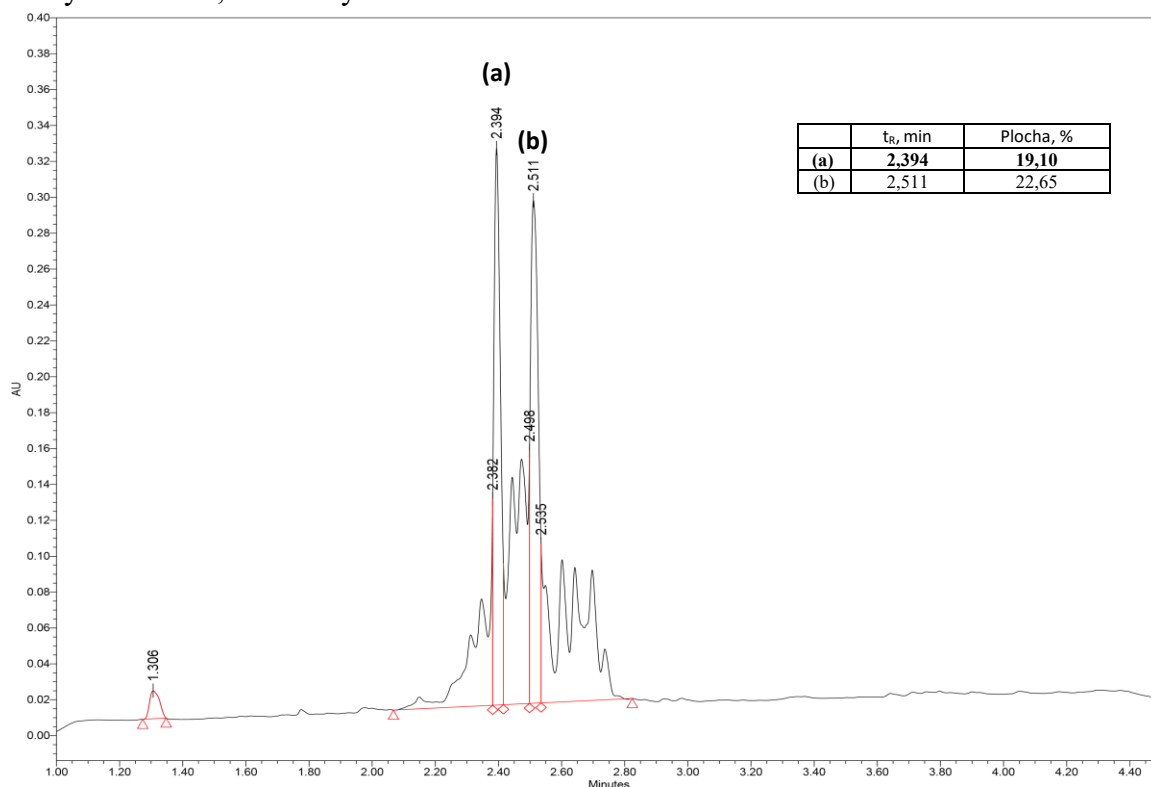
Obrázek 38. UPLC analýzy pep09 (cyklická forma oxytocinu):

- (a) crude peptid připravený na MultiPep RSi
- (b) standard syntetizovaný na Liberty Blue a purifikovaný pomocí HPLC

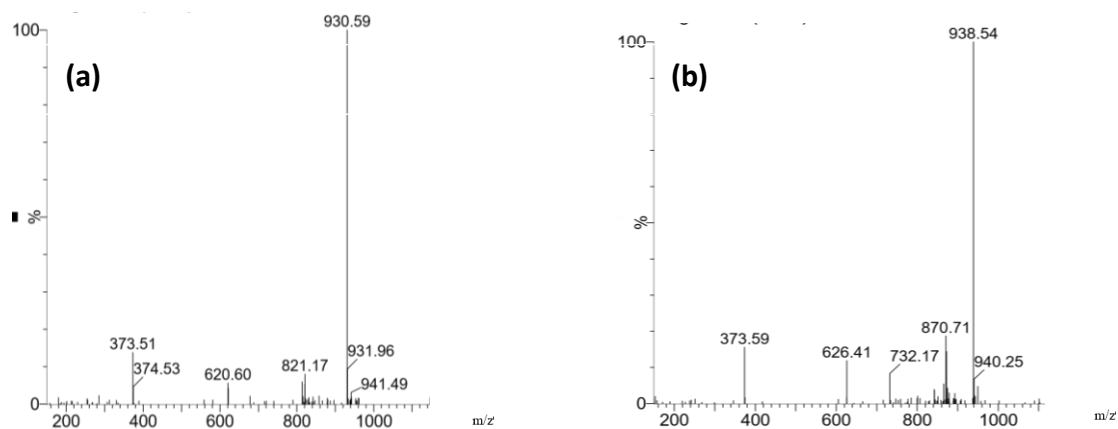
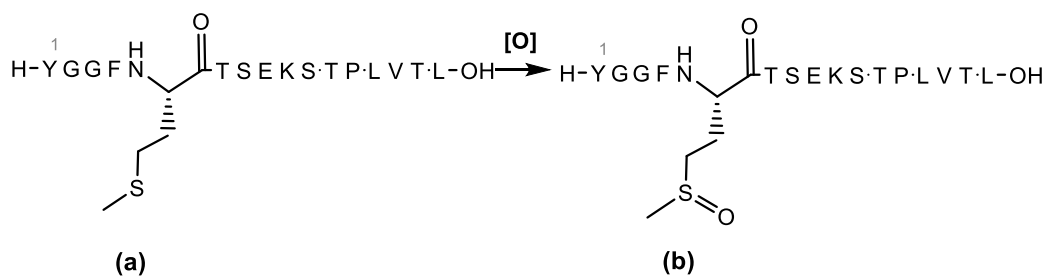
5.5.3 Syntéza peptidů obsahujících methionin

Byla provedena syntéza dvou peptidů pep10 a pep11 obsahujících snadno oxidovatelnou aminokyselinu methionin. V obou případech jsou na UPLC chromatogramech (Obrázek 39 a Obrázek 41) vidět dvě hlavní složky v poměru 1:1 pro pep10 a 2:1 pro pep11. Podle HPLC analýzy molekulových hmotností složek o nižší retenci odpovídají teoretické molekulové hmotnosti požadovaných peptidů, viz Obrázky 40 a 42. Druhé složky mají molekulové hmotnosti o 16 Da vyšší, což odpovídá oxidaci methylsulfanylskupiny na sulfoxid. Tento děj může být vysvětlen tím, že se syntéza pomocí MultiPep RSi odehrává za přítomnosti vzduchu. Při odsávání přebytků reagensů po každém reakčním kroku dochází zároveň k částečné oxidaci metioninu vzdušným kyslíkem. Přičemž u delšího peptidu pep10 oxidace proběhla ve větší míře.

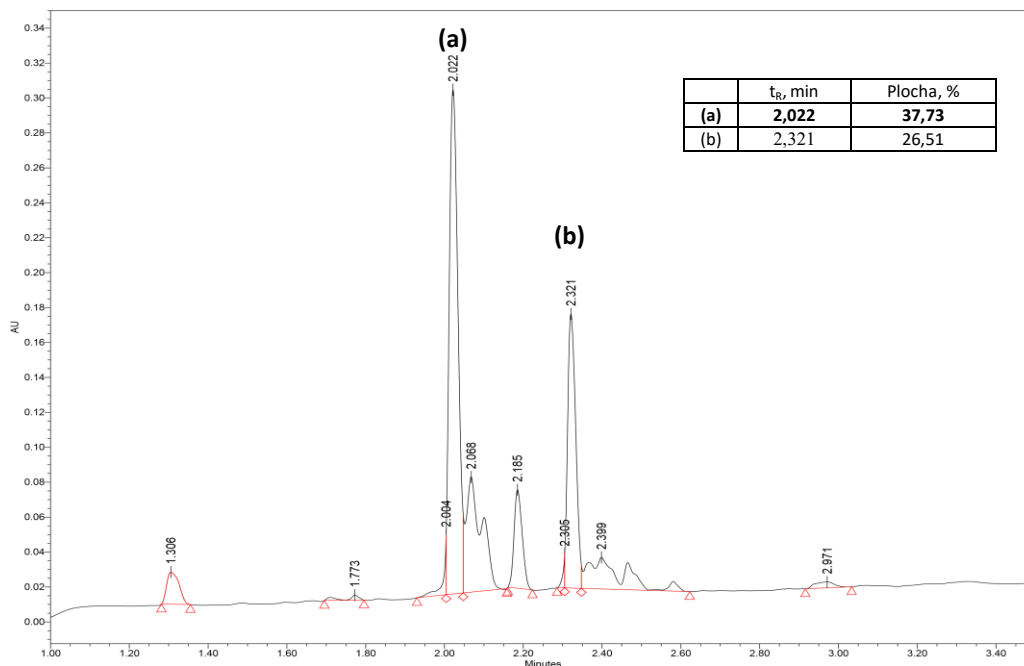
Fakt, že syntetizátor MultiPep RSi nepracuje pod inertní atmosférou jako je tomu u jiných syntetizátorů, vede k vyšší míře rizika nežádoucích oxidací.



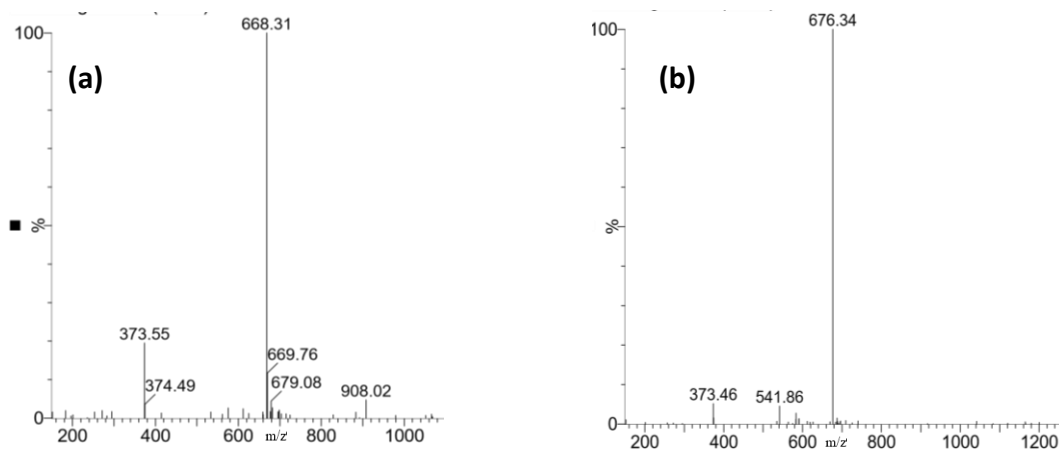
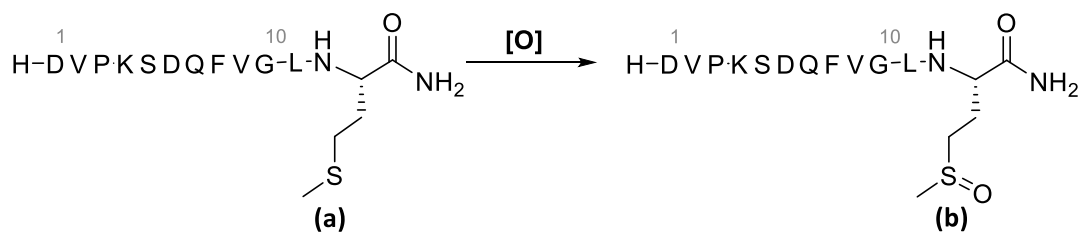
Obrázek 39. UPLC analýza pep10. Pík (a) odpovídá pep10, pík (b) - oxidované formě pep10.



Obrázek 40. Schéma oxidace a MS-spektra odpovídající pep10 (a) a oxidované formě pep10 (b). Jako hlavní pík jsou pozorovány signály odpovídající iontům $[M+2H]^{2+}$.



Obrázek 41. UPLC analýza pep11. Pík (a) odpovídá pep11, pík (b) - oxidované formě pep11.



Obrázek 42. Schéma oxidace a MS-spektra odpovídající pep11 (a) a oxidované formě pep10 (b). Jako hlavní pík jsou pozorovány signály odpovídající iontům $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

6 Závěr

Byly syntetizovány a vyčištěny standardy 4 oligopeptidů, které byly následně použity pro nalezení optimálních podmínek nastavení syntetizátoru MultiPep RSi. Testováno bylo 5 vybraných parametrů v 14 experimentech, přičemž každý experiment byl čtyřikrát zopakován za stejných podmínek provedení. Jako vyhodnocovací kritérium byla použita čistota syntetizovaných surových peptidů pomocí UPLC. Ze získaných dat byly vybrány optimální podmínky nastavení syntetizátoru a provedeny ověřovací syntézy na peptidech o délce 15 a 21 aminokyselin. Úspěšné provedení ověřovacích syntéz prokázalo správné nastavení robotického syntetizátoru pro automatickou syntézu peptidů v měřítku 5 μ mol.

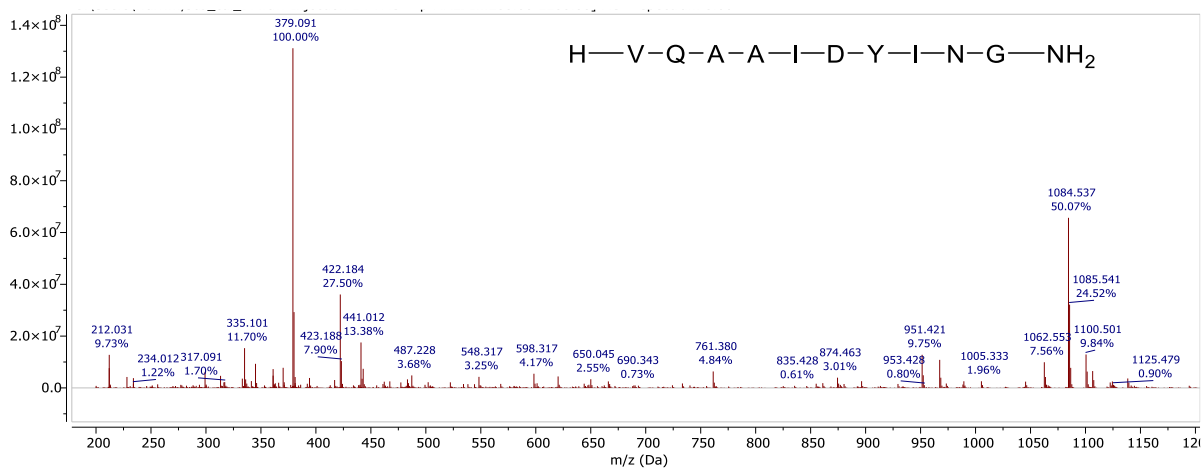
Z optimalizací vyplynulo několik výhod a dvě slabá místa testovaného syntetizátoru. Jako slabá místa je možné uvést nemožnost míchání v průběhu reakcí a práce pod vzdušnou atmosférou se zvýšeným rizikem nežádoucích oxidačních reakcí. Na druhé straně syntetizátor přináší mnoho výhod, zejména rozsáhlou paralelizací syntéz a úsporu ve spotřebě činidel a rozpouštědel. Pomocí provedených optimalizací bylo dosaženo vysoké spolehlivosti provedení syntéz peptidů. Byla ověřena v praxi možnost použití levnějšího kondenzačního činidla a úspory 20-40 % množství aminokyselin oproti dříve používané spotřebě. Nalezena byla báze, která nezpůsobuje nadměrnou epimeraci produktu. V neposlední řadě byl prokázán zanedbatelný vliv cappingu na kvalitu připravených surových peptidů. Vynechání cappingu vede k úspoře experimentálního času. Vzhledem k dosaženým poznatkům existuje předpoklad využití nalezené optimalizované metody pro přípravu rozsáhlých knihoven peptidů v mikro molárním měřítku.

7 Seznam použité literatury

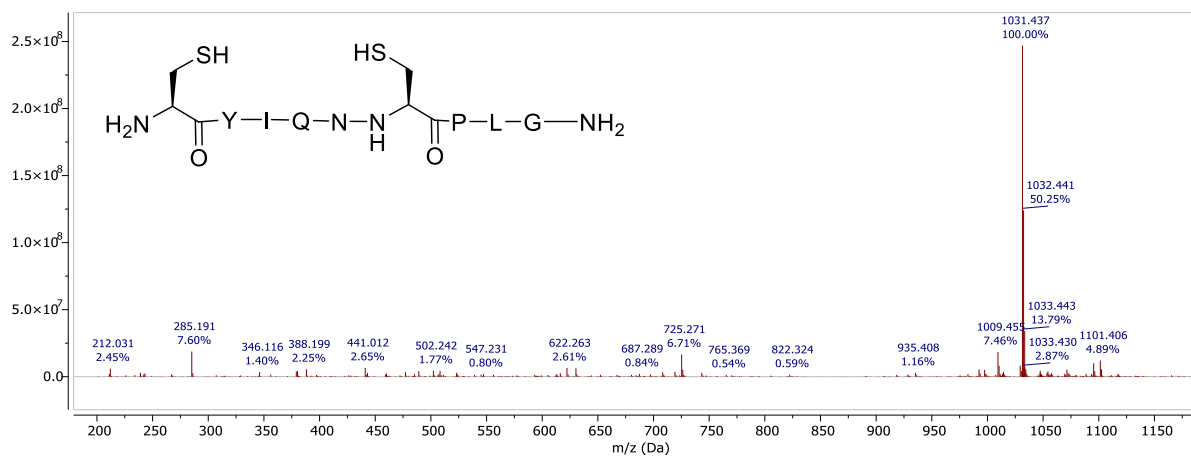
- [1] Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G., Wang, X., Wang, R., Fu, C., *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2022**, 7, 48.
- [2] Lucas-Lenard, J., Lipmann, F., *Annual Review of Biochemistry* **1971**, 40, 409–448.
- [3] Moustafa, G. O., Mohamed, F. H., *Egyptian Journal of Chemistry* **2022**, 65, 439–457.
- [4] Montalbetti, C. A. G. N., Falque, V., *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827–10852.
- [5] Dunetz, J. R., Magano, J., Weisenburger, G. A., *Organic Process Research & Development* **2016**, 20, 140–177.
- [6] Palomo, J. M., *RSC Advances* **2014**, 4, 32658–32672.
- [7] Isidro-Llobet, A., Álvarez, M., Albericio, F., *Chemical Reviews* **2009**, 109, 2455–2504.
- [8] Thayer, A. M., *Chemical & Engineering News Archive* **2011**, 89, 21–25.
- [9] Merrifield, R. B., *J Am Chem Soc* **1963**, 85, 2149–2154.
- [10] “Nobel laureates with their contribution in biomedical engineering,” Dostupné online z webu: <https://bme.iiita.ac.in/NobelandBiomedicalEngineering.pdf>, [cit. 2022-05-01].
- [11] Malik, L., Tofteng, A. P., Pedersen, S. L., Sørensen, K. K., Jensen, K. J., *Journal of Peptide Science* **2010**, 16, 506–512.
- [12] Gregg B. Fields, **2001**, Kapitola v knize: *Side Reactions in Peptide Synthesis*, John Wiley, **2001**, 18.1.1-18.1.9
- [13] Becker, H. Dieter., *Chemical Reviews* **1993**, 93, 145–172.
- [14] Butterworth, P. J., *Cell Biochemistry and Function* **2005**, 23, 293–294.
- [15] Wong, C.-H., Zimmerman, S. C., *Chemical Communications* **2013**, 49, 1679.
- [16] B. Yan, A. W. C., V knize: *Optimization of solid-phase combinatorial synthesis*, CRC Press, **2001**.
- [17] Alshanski, I., Bentolila, M., Gitlin-Domagalska, A., Zamir, D., Zorsky, S., Joubran, S., Hurevich, M., Gilon, C., *Organic Process Research & Development* **2018**, 22, 1318–1322.
- [18] Shelton, P. T., Jensen, K. J. *Methods Mol Biol*, **2013**, 1047, 23–41.
- [19] Knauer S., Aqueous solid-phase peptide synthesis (ASPPS): A novel concept of peptide synthesis, **2020**, 1-65.
- [20] Lundt, B. F., Johansen, N. L., Vølund, A., Markussen, J., *International Journal of Peptide and Protein Research* **2009**, 12, 258–268.
- [21] Fields, G. B., Angeletti, R. H., Carr, S. A., Smith, A. J., Stults, J. T., Williams, L. C., Young, J. D., **1994**, 501–507.
- [22] Yang, Y., Kapitola v knize: *Side Reactions in Peptide Synthesis*, Elsevier, **2016**, 1–31.
- [23] Carpino, L. A., Shroff, H., Triolo, S. A., Mansour, E.-S. M. E., Wenschuh, H., Albericio, F., *Tetrahedron Letters* **1993**, 34, 7829–7832.
- [24] Østergaard, S., Paulsson, J. F., Kofoed, J., Zosel, F., Olsen, J., Jeppesen, C. B., Spetzler, J., Ynddal, L., Schleiss, L. G., Christoffersen, B. Ø., Raun, K., Sensfuss, U., Nielsen, F. S., Jørgensen, R., Wulff, B. S., *Scientific Reports* **2021**, 11, 21179.
- [25] Work T.S., W. E., V knize: *Methods for the detection of peptides*, **1981**.
- [26] Henry, C. M. P., V knize: *Lyophilization of Biopharmaceuticals*, AAPS, Arlington, **2004**.
- [27] Roopasree B, Joseph J, Mukkadan JK., *MOJ Anat & Physiol*. 2019;6(4):128–133
- [28] Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., Tempst, P., *The EMBO Journal* **1989**, 8.
- [29] Malonis, R. J., Lai, J. R., Vergnolle, O., *Chemical Reviews* **2020**, 120, 3210–3229.

- [30] “Cosmetics peptides,” Dostupné online z webu: <https://www.bachem.com/knowledge-center/white-papers/peptides-in-cosmetics/>, [cit. 2022-05-01].
- [31] Merrifield, R. B., *Science* **1979**, *150*, 178–185.
- [32] “Liberty Blue, automated Microwave Peptide Synthesizer,” Dostupné online z webu: <https://cem.com/liberty-blue/>, [cit. 2022-05-01].
- [33] “Symphony X,” Dostupné online z webu: <https://www.gyrosproteintechnologies.com/pti-symphony-x>, [cit. 2022-05-01].
- [34] “MultiPep2,” Dostupné online z webu: <https://cem.com/en/multipep2> , [cit. 2022-05-01].
- [35] López-García, G., Dublan-García, O., Arizmendi-Cotero, D., Gómez Oliván, L. M., *Molecules* **2022**, *27*, 1343.
- [36] Siano, A., Garibotto, F. F., Andujar, S. A., Baldoni, H. A., Tonarelli, G. G., Enriz, R. D., *Journal of Peptide Science* **2017**, *23*, 236–244.

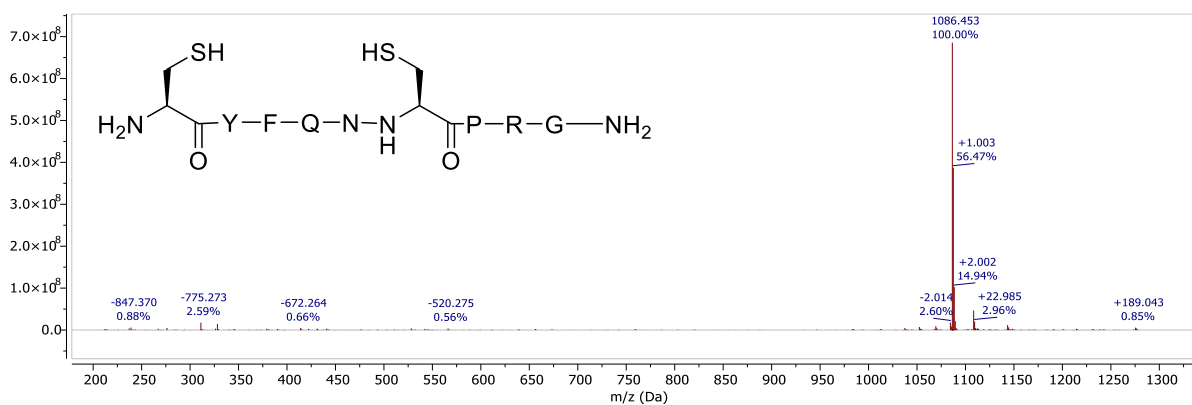
8 Přílohy



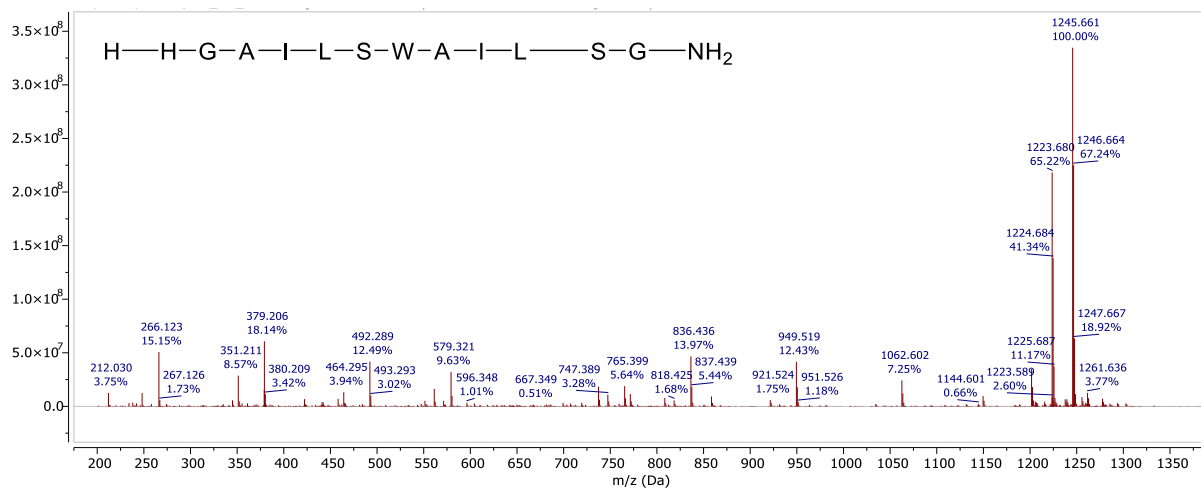
Příloha 1. MALDI-HRMS spektrum standardu peptidu pep01



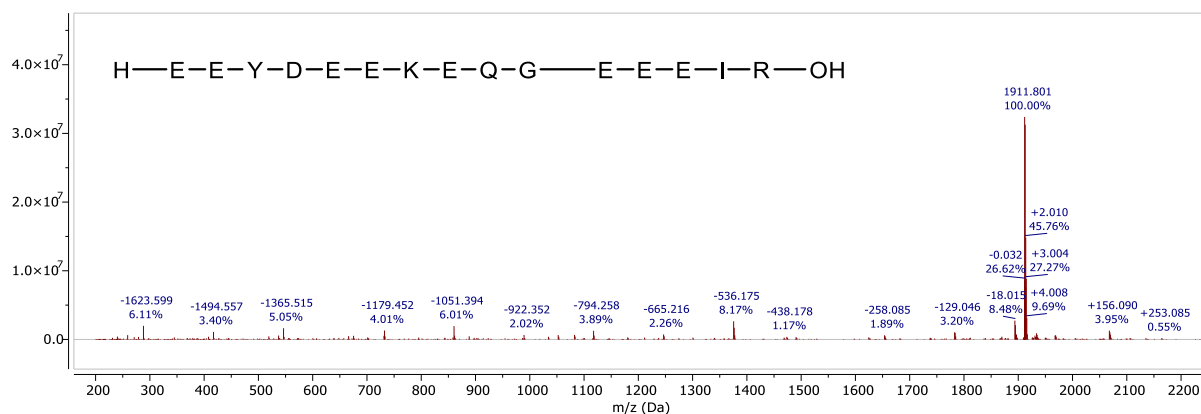
Příloha 2. MALDI-HRMS spektrum standardu peptidu pep02



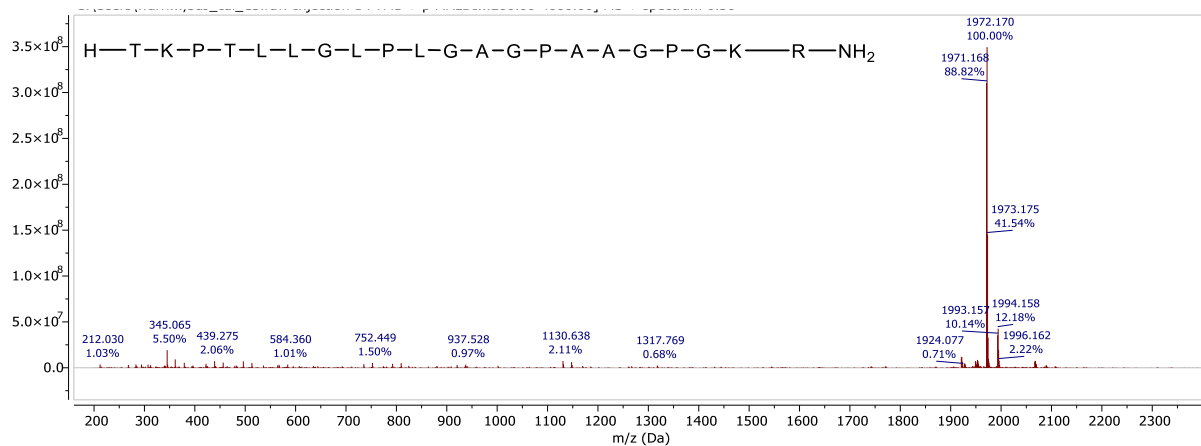
Příloha 3. MALDI-HRMS spektrum standardu peptidu pep03



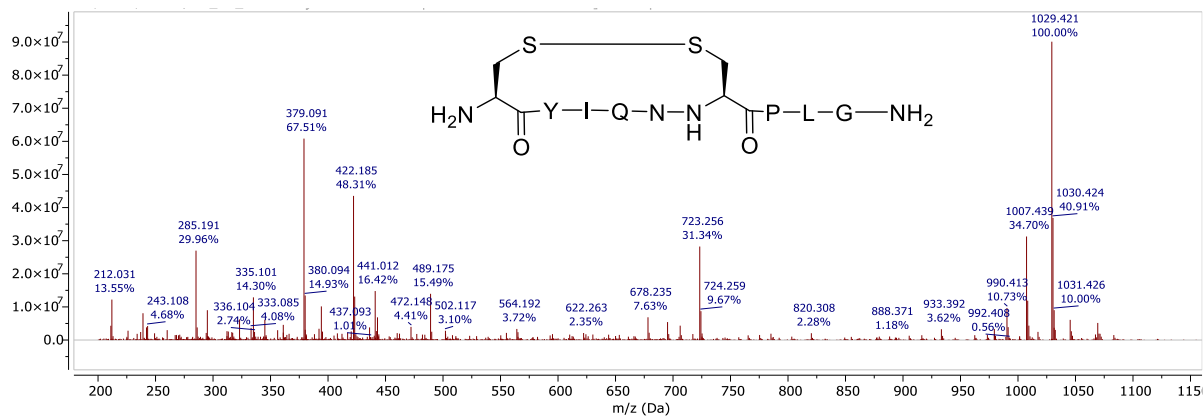
Příloha 4. MALDI-HRMS spektrum standardu peptidu pep04



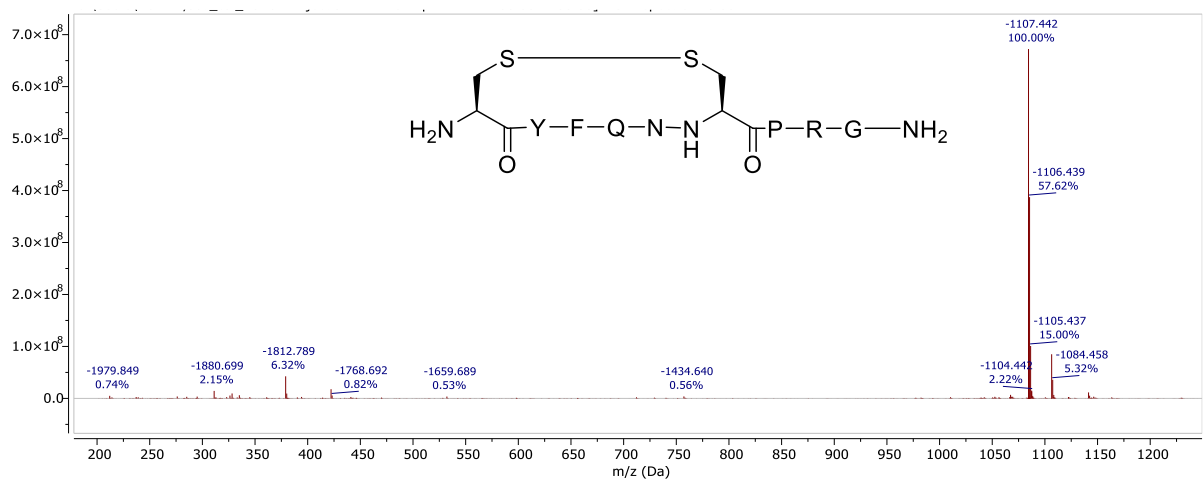
Příloha 5. MALDI-HRMS spektrum standardu peptidu pep05



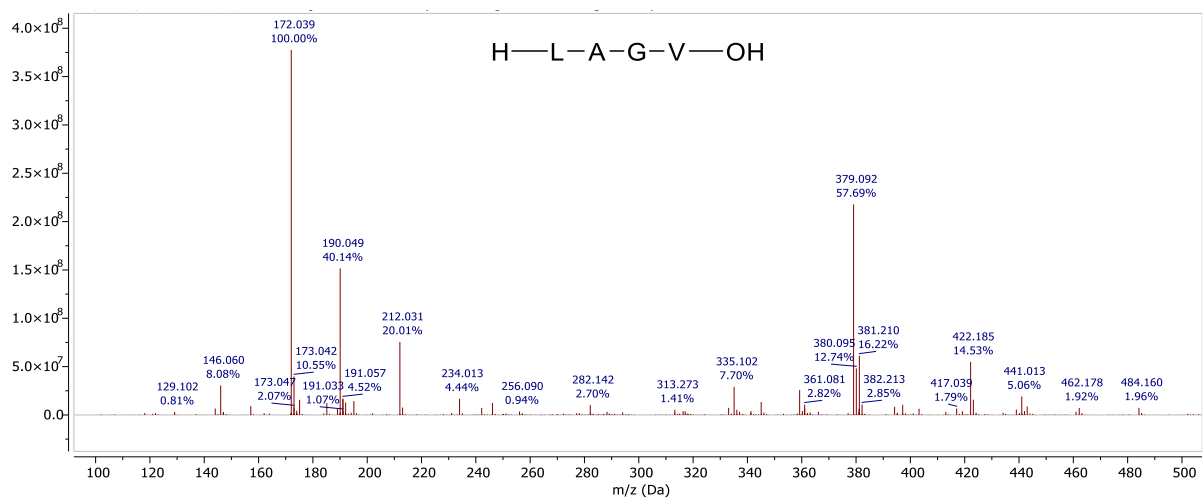
Příloha 6. MALDI-HRMS spektrum standardu peptidu pep06



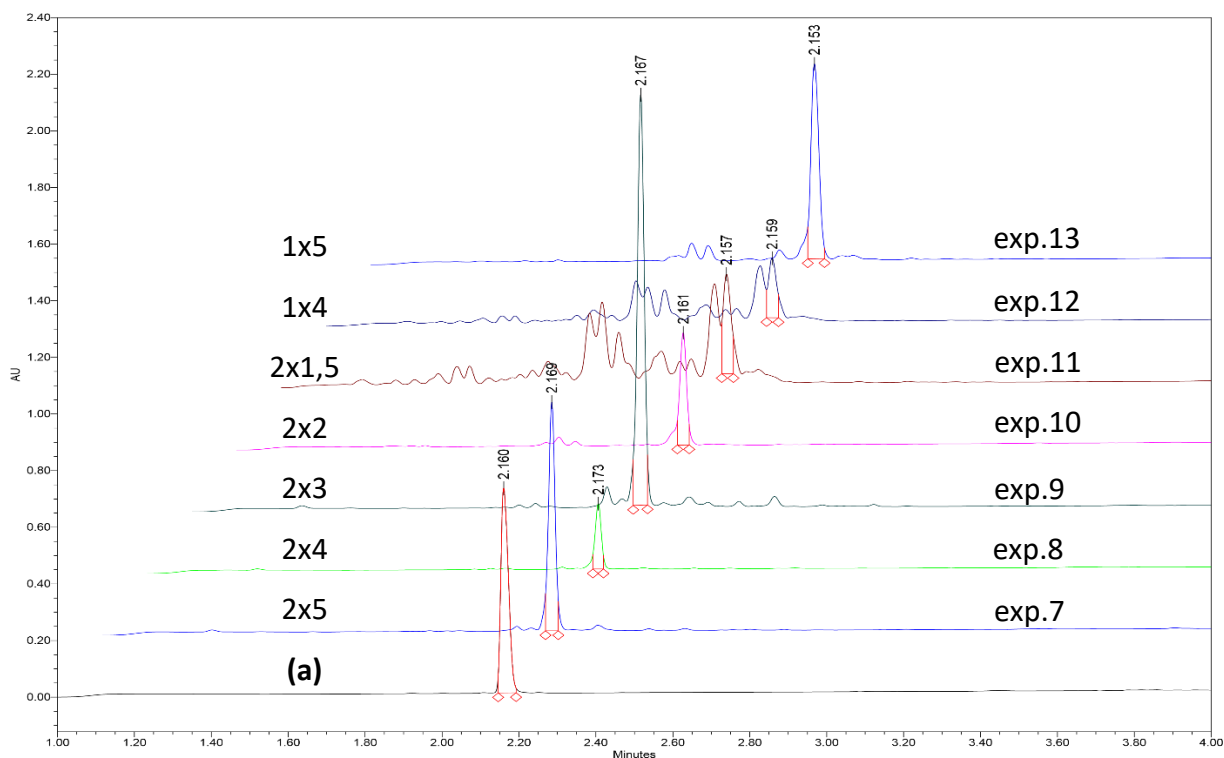
Příloha 7. MALDI-HRMS spektrum standardu peptidu pep07



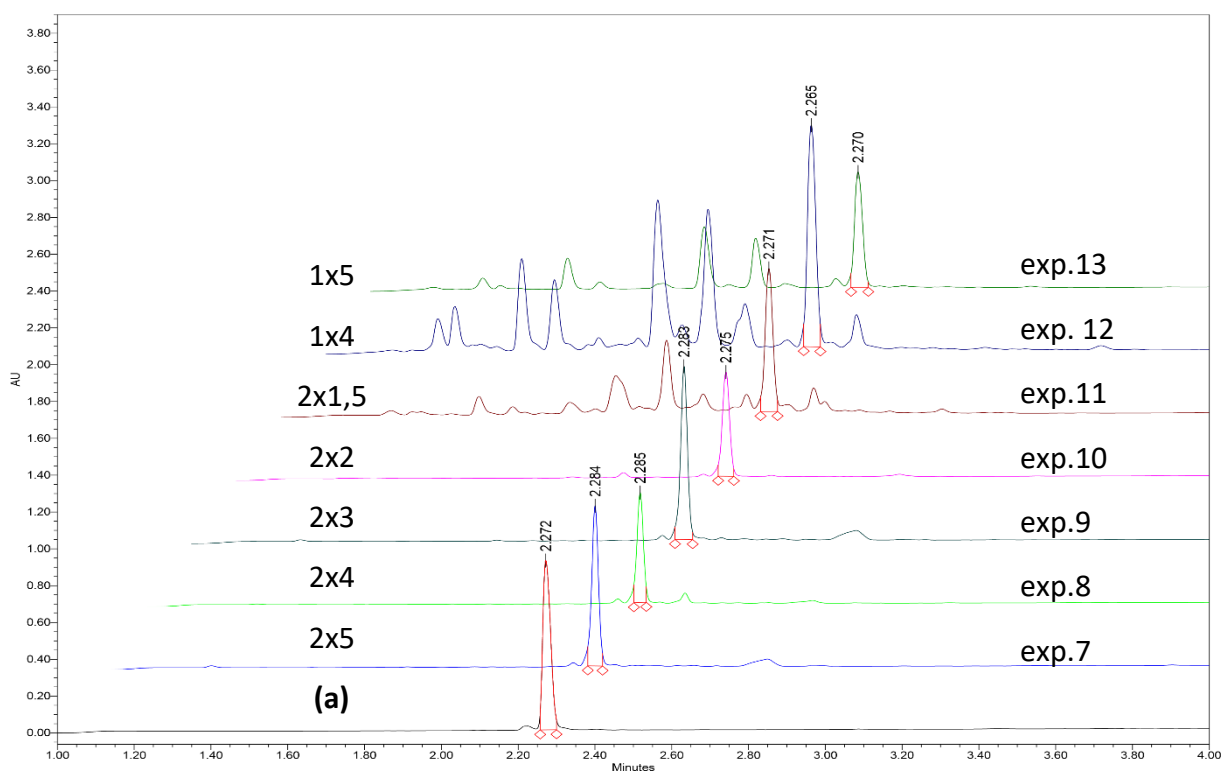
Příloha 8. MALDI-HRMS spektrum standardu peptidu pep08



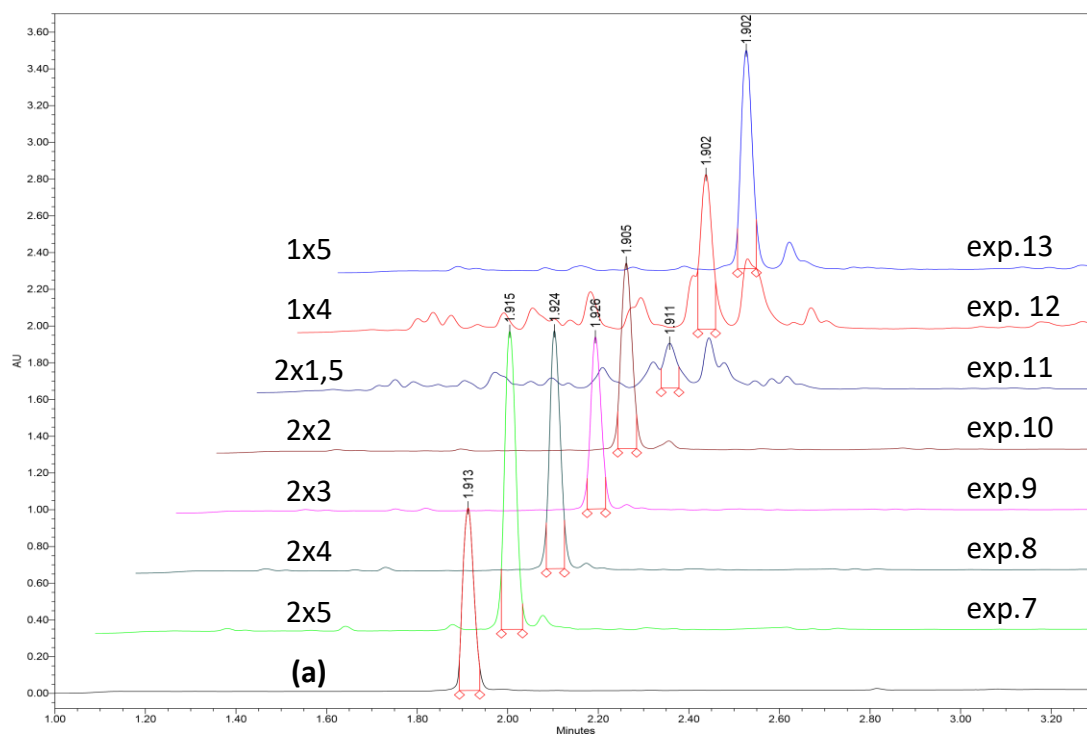
Příloha 9. MALDI-HRMS spektrum peptidu pep09



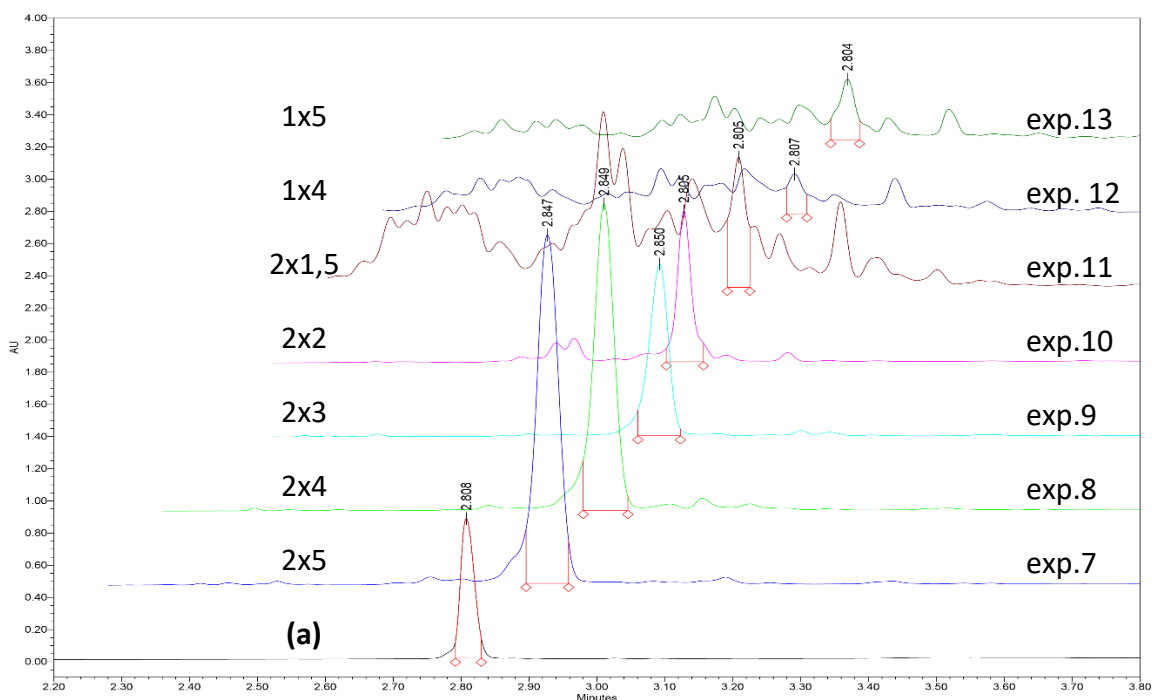
Příloha 10. UPLC analýzy peptidu pep01 připraveného na Liberty Blue **(a)**, a na Multiprep RSi za podmínek experimentu 7-13 (Tabulka 7, kapitola 4.5.1) v závislosti na počtu dávek x přebytku aminokyselin během amidačního stupně



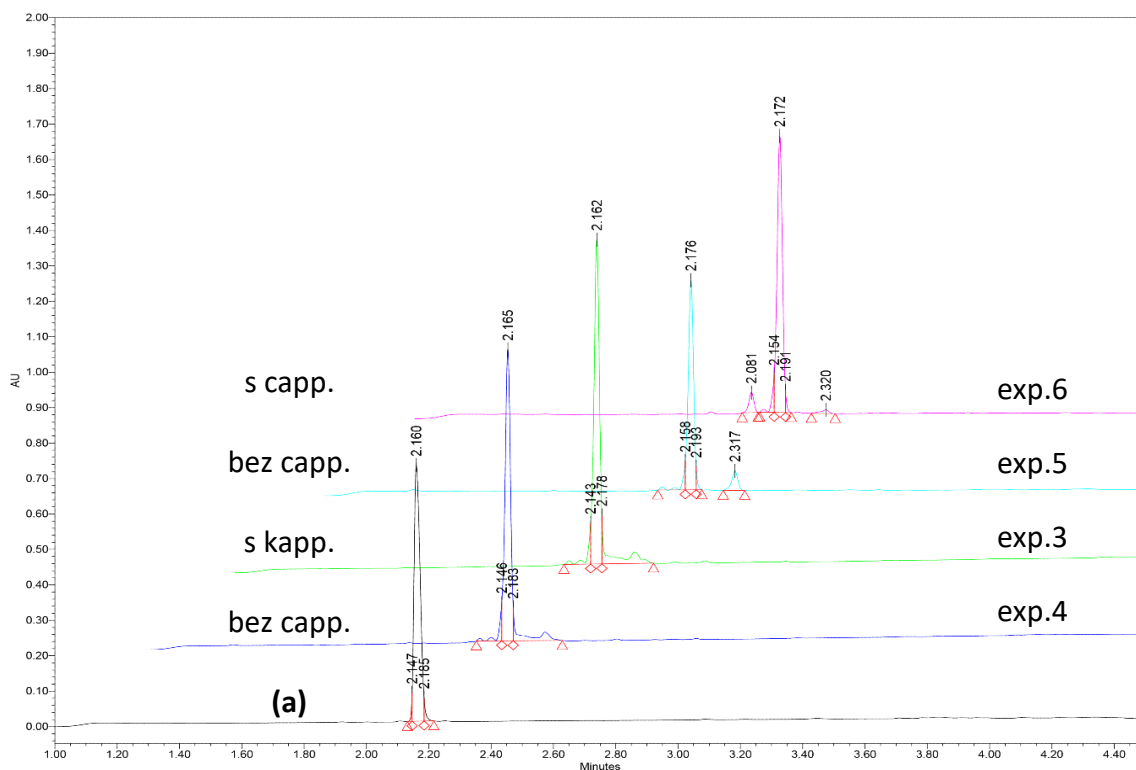
Příloha 11. UPLC analýzy peptidu pep02 připraveného na Liberty Blue **(a)**, a na Multiprep RSi za podmínek experimentu 7-13 (Tabulka 7, kapitola 4.5.1) v závislosti na počtu dávek x přebytku aminokyselin během amidačního stupně



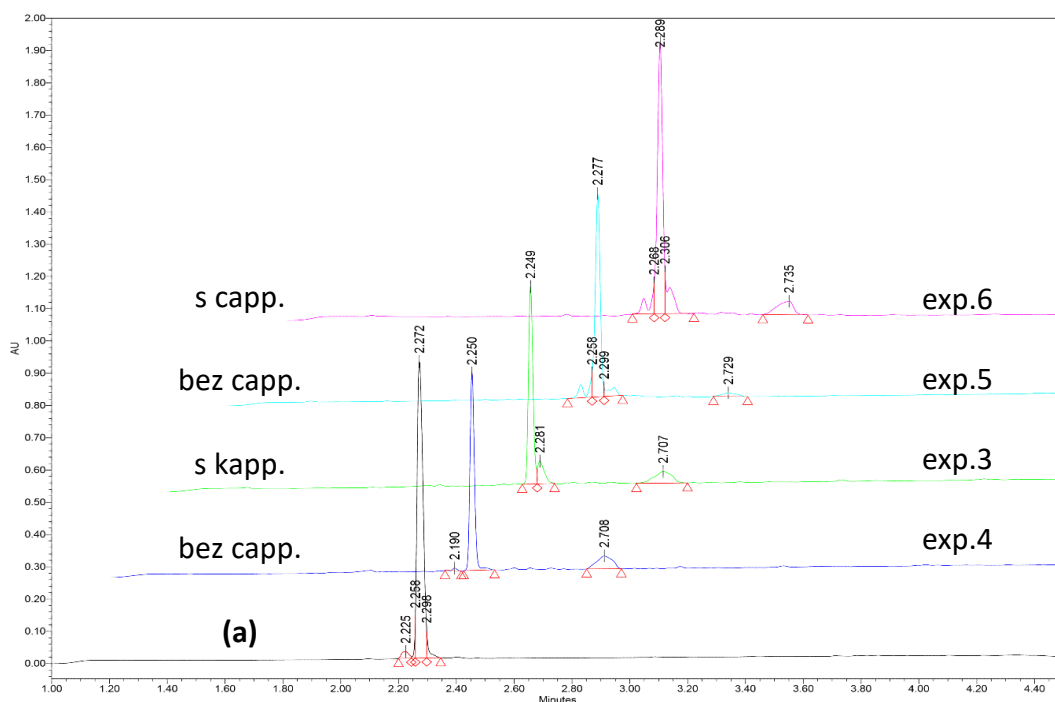
Příloha 12. UPLC analýzy peptidu pep03 připraveného na Liberty Blue (a), a na Multipep RSi za podmínek experimentu 7-13 (Tabulka 7, kapitola 4.5.1) v závislosti na počtu dávek x přebytku aminokyselin během amidačního stupně



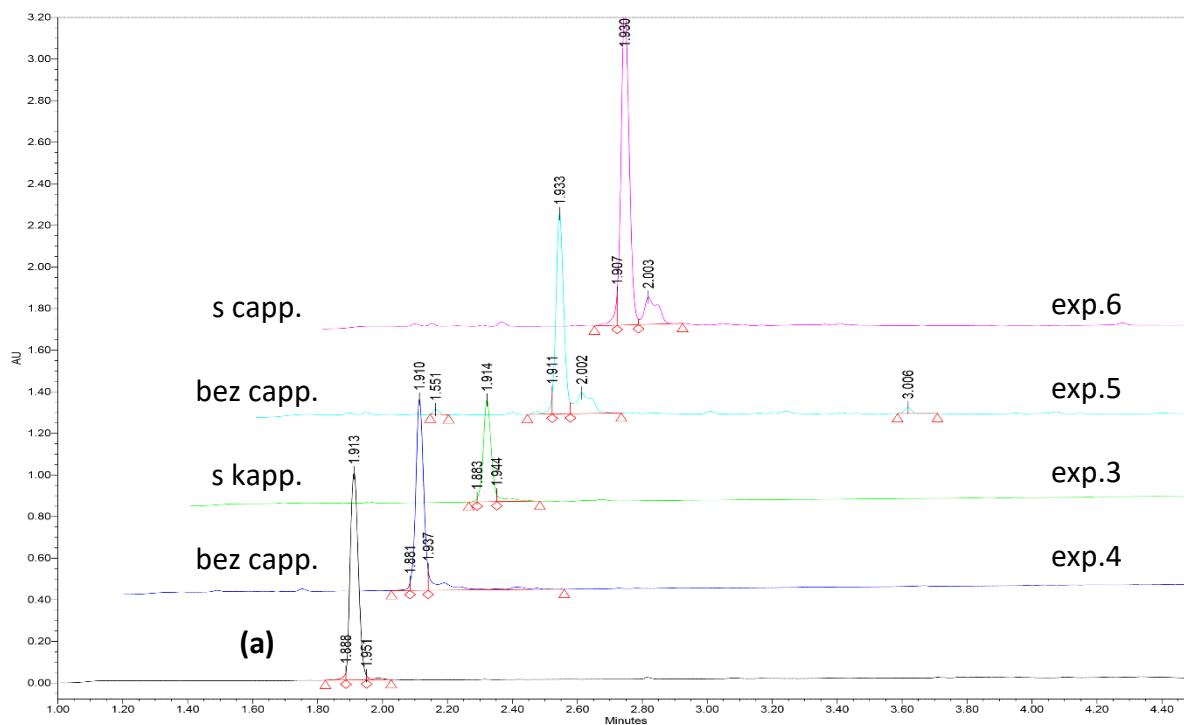
Příloha 13. UPLC analýzy peptidu pep04 připraveného na Liberty Blue (a), a na Multipep RSi za podmínek experimentu 7-13 (Tabulka 7, kapitola 4.5.1) v závislosti na počtu dávek x přebytku aminokyselin během amidačního stupně



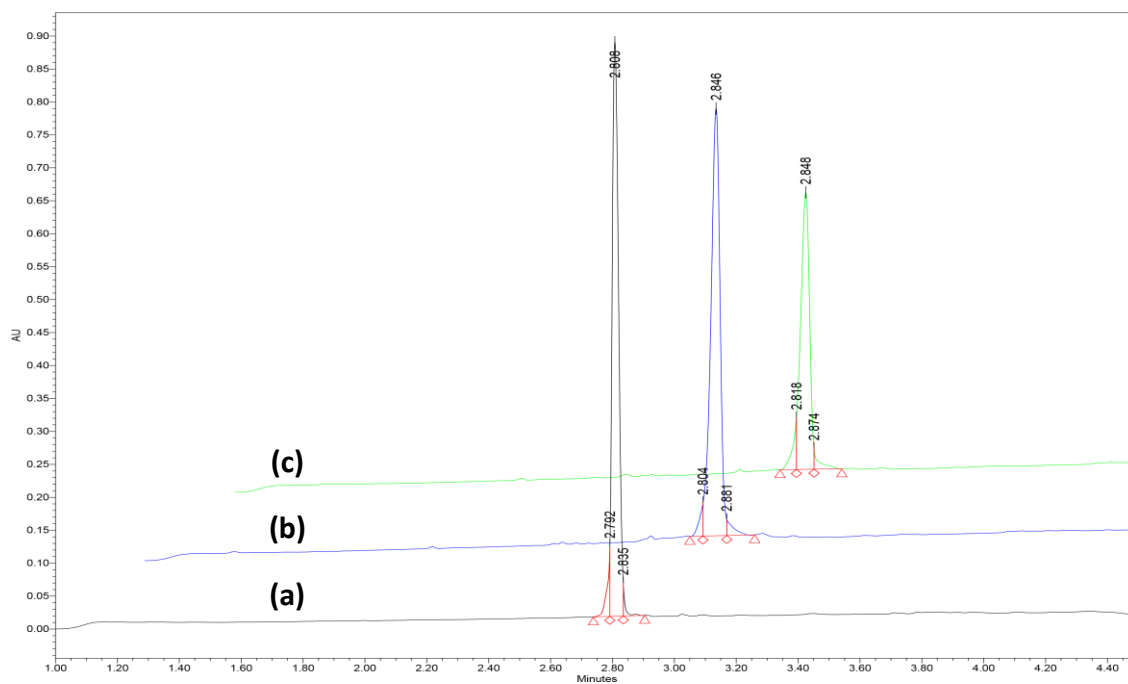
Příloha 14. UPLC analýzy peptidu pep01 připraveného na Liberty Blue **(a)**, a na Multi pep RSi za podmínek experimentu 4, 5 bez cappingu a experimentu 3, 6 s cappingem (Tabulka 7, kapitola 4.5.1)



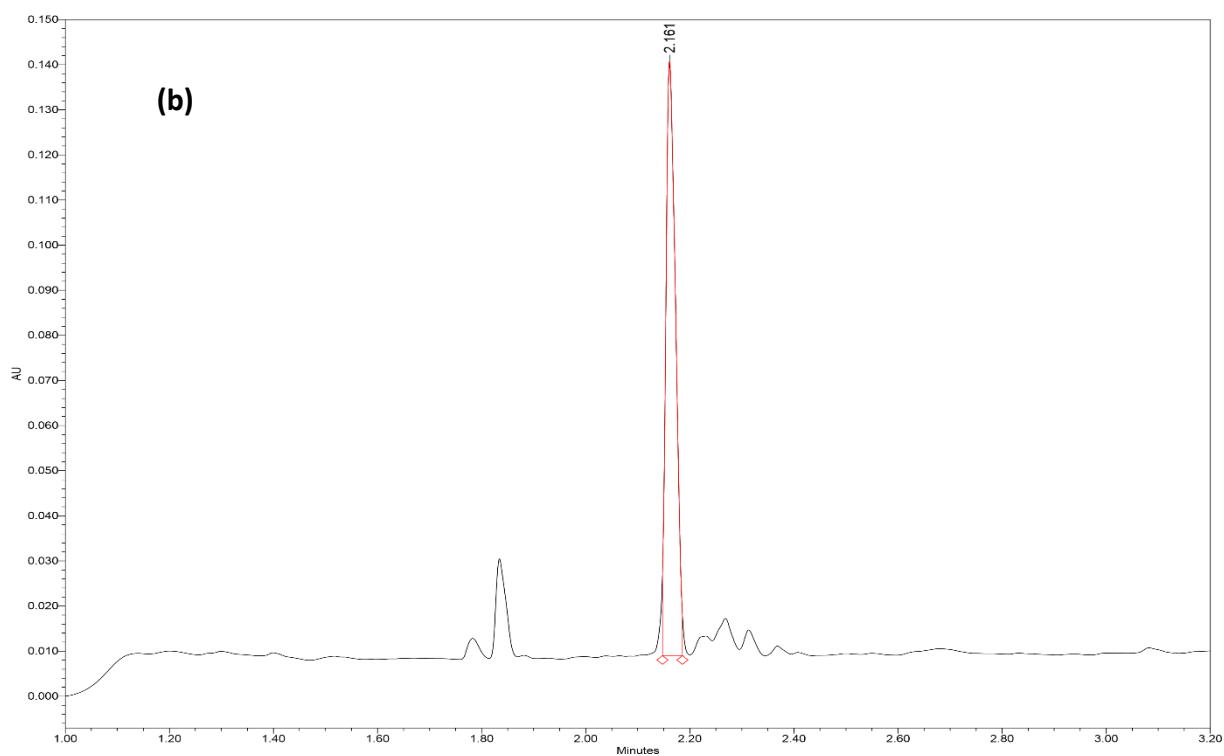
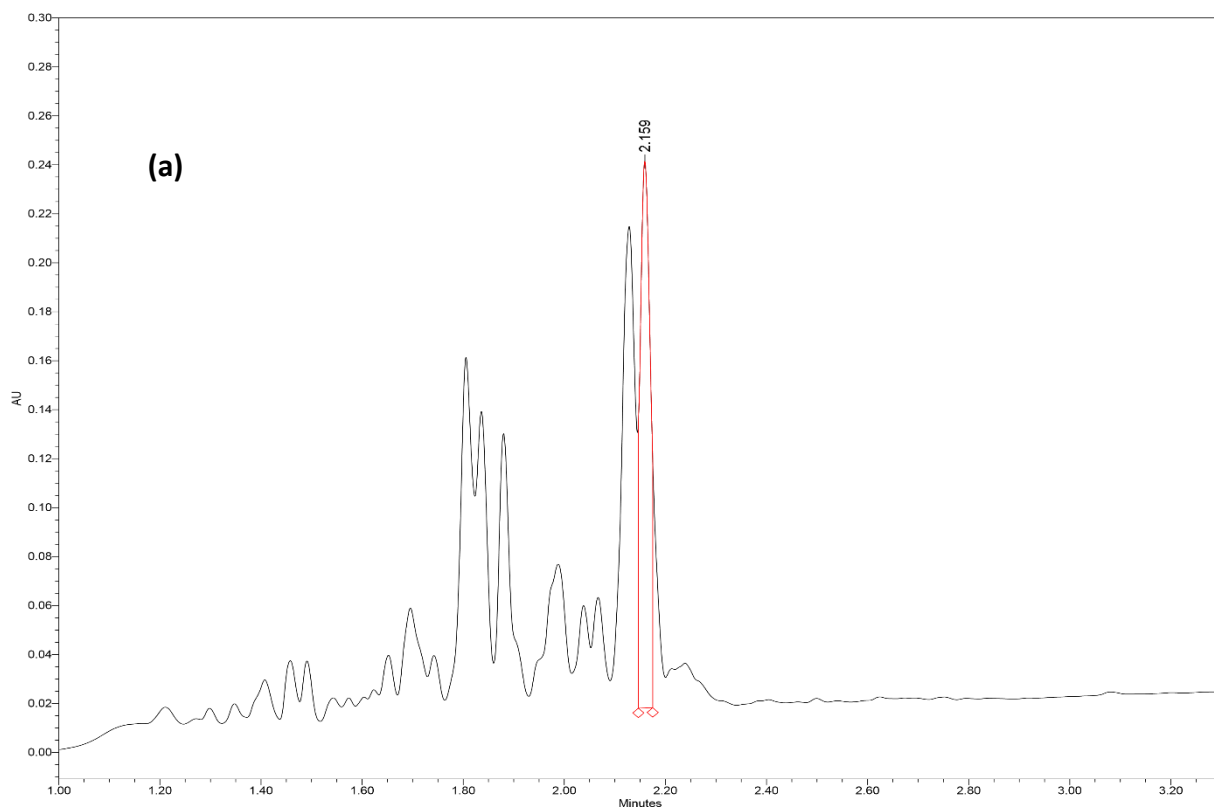
Příloha 15. UPLC analýzy peptidu pep02 připraveného na Liberty Blue **(a)**, a na Multi pep RSi za podmínek experimentu 4, 5 bez cappingu a experimentu 3, 6 s cappingem (Tabulka 7, kapitola 4.5.1)



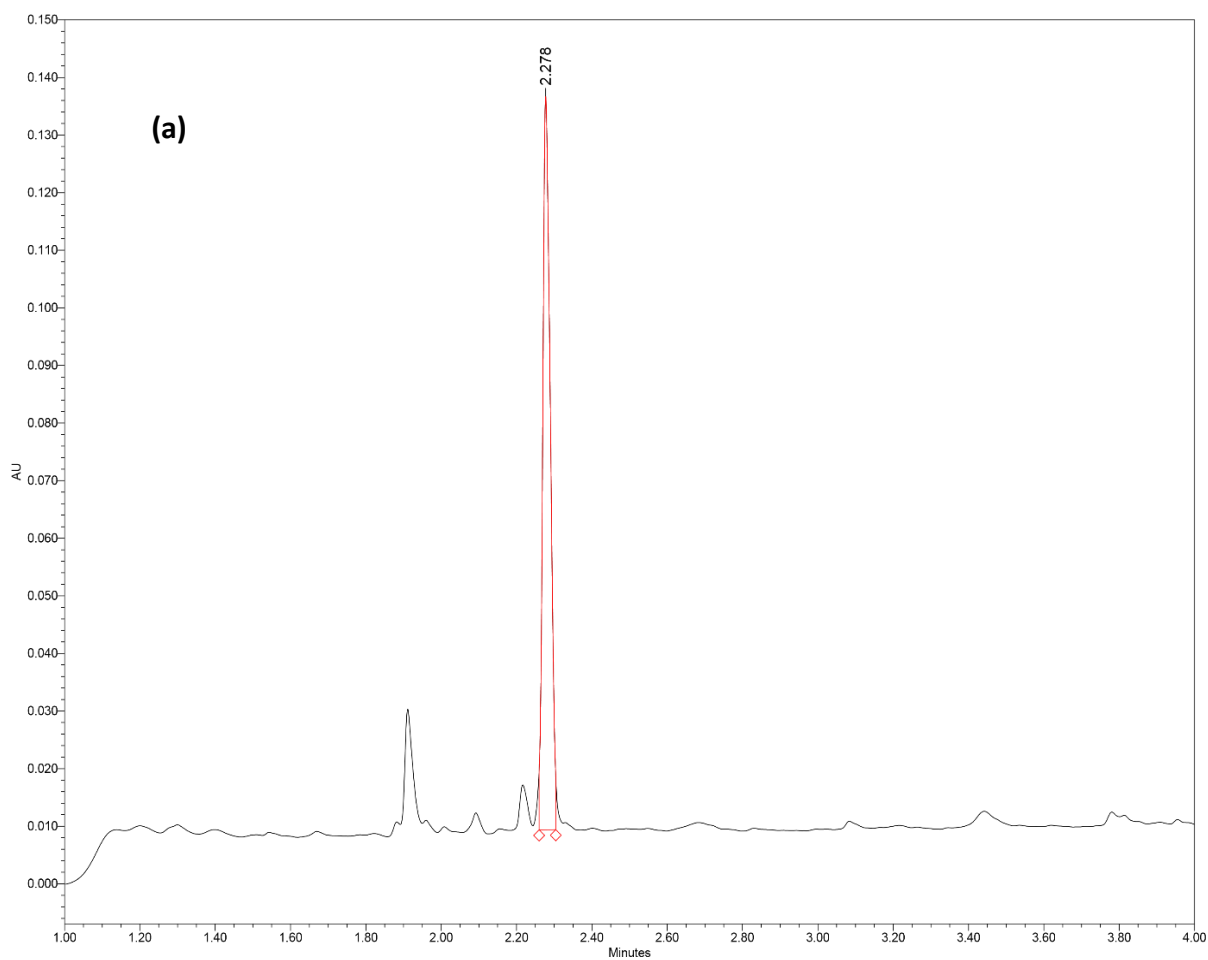
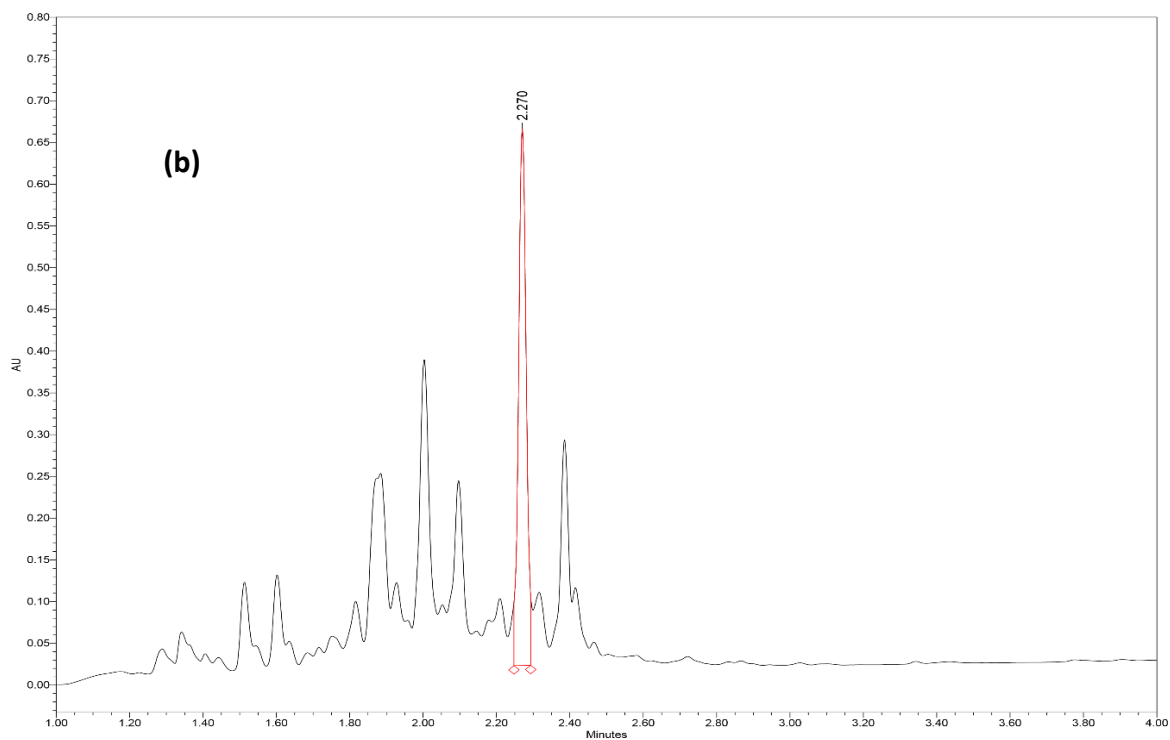
Příloha 16. UPLC analýzy peptidu pep03 připraveného na Liberty Blue **(a)**, a na Multiprep RSi za podmínek experimentu 4, 5 bez cappingu a experimentu 3, 6 s cappingem (Tabulka 7, kapitola 4.5.1)



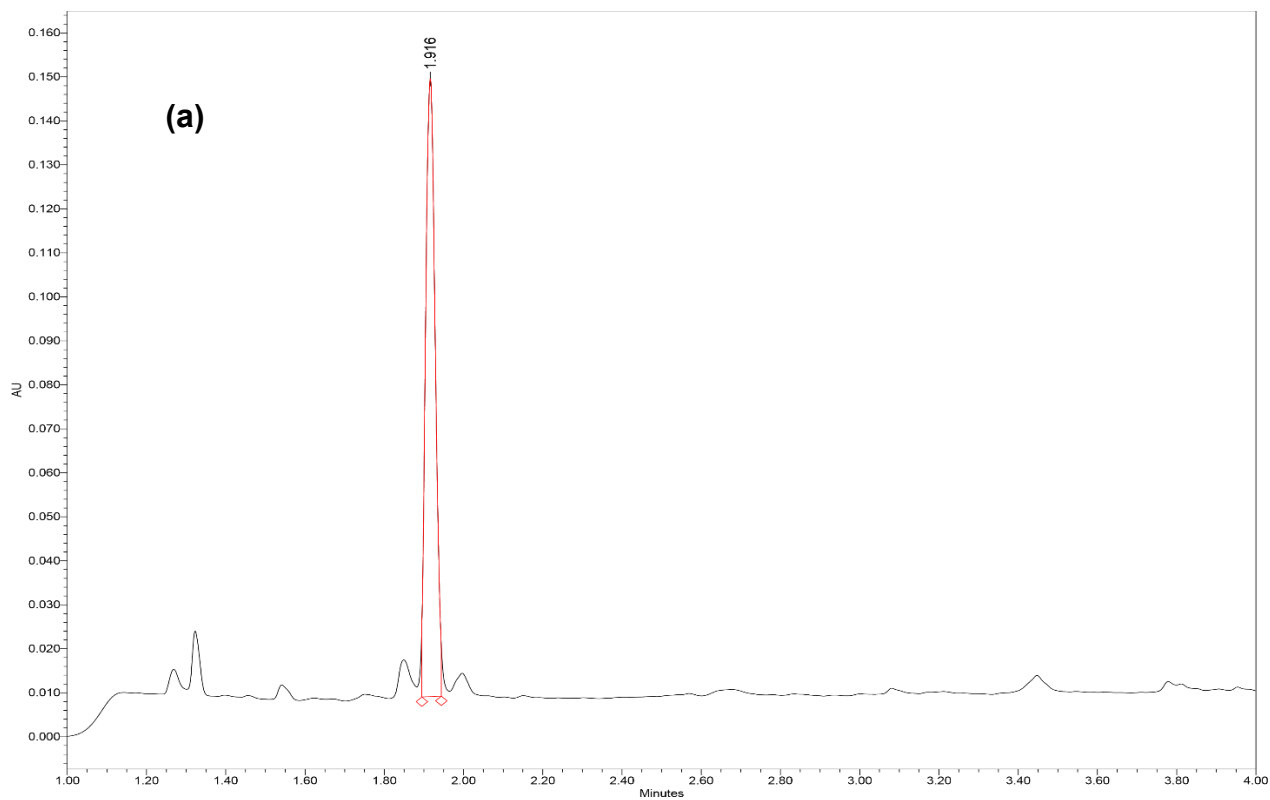
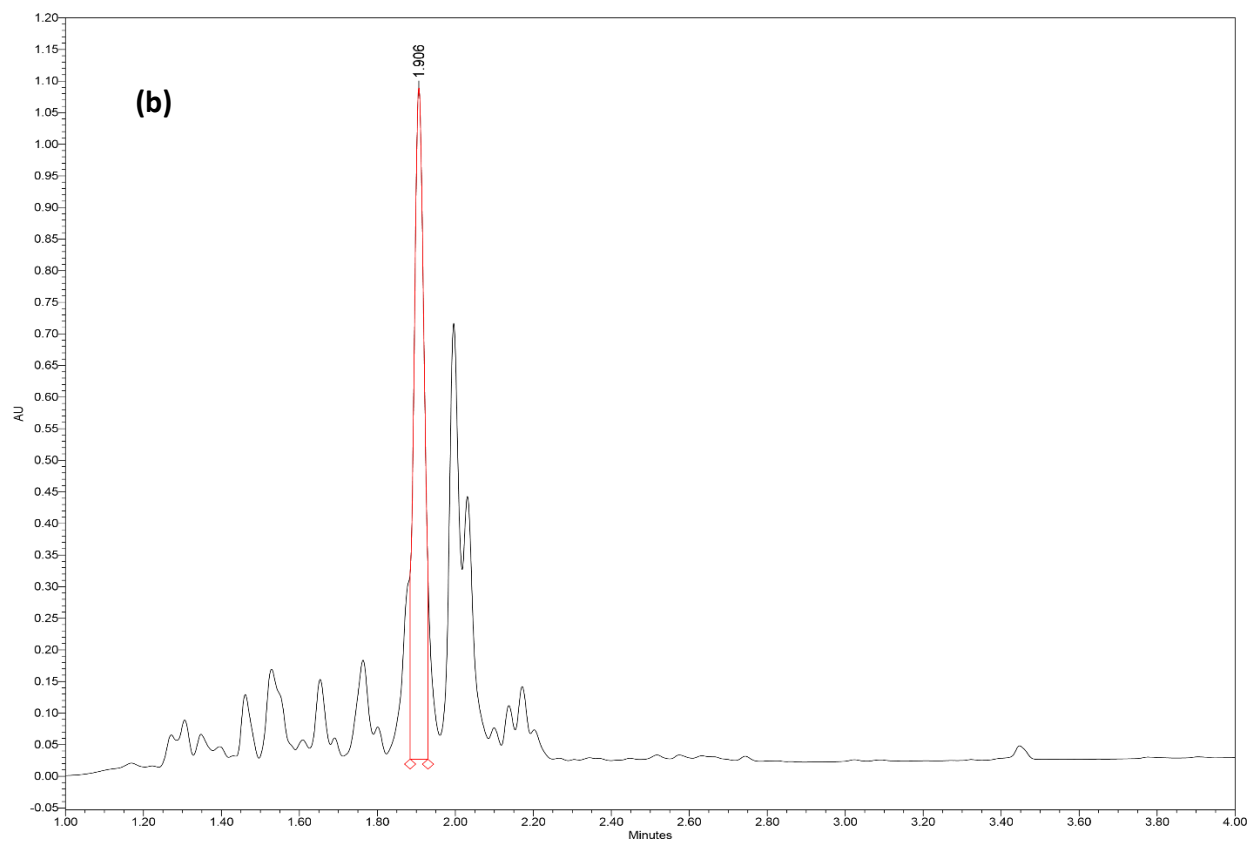
Příloha 17. UPLC analýzy peptidu pep04 připraveného na Liberty Blue **(a)**, a na Multiprep RSi za podmínek experimentu 4 bez cappingu **(b)** a experimentu 3 s cappingem **(c)** (Tabulka 7, kapitola 4.5.1)



Příloha 18. UPLC analýzy peptidu pep01 připraveného na MultiPep RSi za shodných podmínek experimentu 11 bez cappingu **(a)** a experimentu 13 s cappingem **(b)** (Tabulka 7, kapitola 4.5.1)



Příloha 19. UPLC analýzy peptidu pep02 připraveného na MultiPep RSi za shodných podmínek experimentu 11 bez cappingu (a) a experimentu 13 s cappingem (b) (Tabulka 7, kapitola 4.5.1)



Příloha 20. UPLC analýzy peptidu pep03 připraveného na MultiprepRSi za shodných podmínek experimentu 11 bez cappingu **(a)** a experimentu 13 s cappingem **(b)** (Tabulka 7, kapitola 4.5.1)