

WPROWADZENIE

Synteza peptydów metodą klasyczną, inaczej zwaną syntezą w roztworze, napotyka szereg trudności. Metoda ta jest bardzo pracochłonna i czasochłonna, ponieważ do zsyntezowania peptydu trzeba przeprowadzić szereg procesów tworzenia wiązania peptydowego, etapów usuwania osłon grup aminowych, a ponadto każdy otrzymany produkt pośredni powinien być oczyszczony i scharakteryzowany. Zwykle najtrudniejszym i najbardziej czasochłonnym elementem każdego etapu syntezy jest proces oczyszczania kolejnych fragmentów tworzonego peptydu. Dodatkowo utrudnienie stanowi obecność produktów ubocznych, często o własnościach zbliżonych do własności produktów głównych, które są trudne do oddzielenia. W 1962 roku Merrefield opracował nową strategię syntezy chemicznej peptydów i białek, która, podobnie jak biosynteza białek, przebiega w innej fazie. Metoda ta polega na tym, że pierwszy aminokwas wiąże się kowalencyjnie swą grupą karboksylową z nierozpuszczalnym polimerem, co ułatwia sączenie, a następnie syntezuje się cały łańcuch peptydowy krok po kroku od C-końca. W tym celu *N*-chroniony aminokwas reaguje z reaktywną grupą polimeru. Ze związanego kowalencyjnie z polimerem aminokwasu usuwa się osłonę grupy α -aminowej i otrzymany aminoacylopolimer przereagowuje z następnym *N*-chronionym aminokwasem. W zasadzie łańcuch peptydowy przedłużany jest krok po kroku we wnętrzu matrycy polimeru. Produkt reakcji związany jest w sposób trwały z nośnikiem, a nadmiar odczynników oraz produkty uboczne reakcji usuwane są za pomocą zwykłego przemywania i sączenia. W ostatnim etapie syntezy rozszczepiane jest wiązanie kowalencyjne między C-końcowym aminokwasem zsyntezowanego łańcucha peptydowego, a grupą na nośniku, z którą był związany. Nierozpuszczalny nośnik można oddzielić od znajdującego się w roztworze polipeptydu przez zwykłe odsączenie. Prostota operacji technicznych (zastąpienie pracochłonnych etapów wytrącania i oczyszczania, niezbędnych w konwencjonalnej syntezie, zwykłym sączeniem) oraz możliwość automatyzacji procesu stanowią bezdyskusyjne zalety tej metody. Znaczną wadę w początkowym etapie rozwoju syntezy na nośniku stanowił problem otrzymywania czystych peptydów. Wynikało to z braku ilościowego przebiegu reakcji przyłączania i odblokowywania aminokwasów na poszczególnych etapach syntezy. Otrzymywane na nośniku stałym produkty końcowe wymagały żmudnego procesu oczyszczania.

LITERATURA:

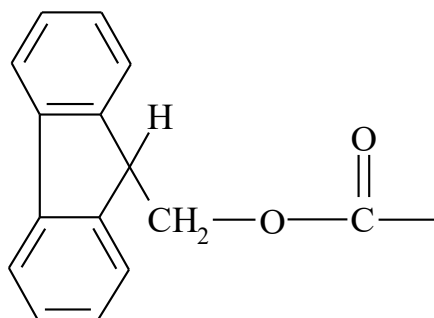
1. Jakubke HD, Jeschkeit H: *"Aminokwasy, peptydy białka"* (1989) wydanie drugie PWN Warszawa
2. Atherton E, Sheppard RC: *"Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach"* (1989) IRL Press Oxford, England
3. Fields GB, Noble RL *"Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids"* (1990) *Int. J. Peptide. Protein. Res.* **35**: 161-214
4. Jones J: *"The Chemical Synthesis of Peptides"* (1994) Clarendon Press, Oxford, England
5. Chan WC, White PD: *"Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach"* (2000) Oxford University Press, Oxford, England
6. Jones J: *"Amino Acid and Peptide Synthesis"* (2002) Oxford University Press, Oxford, England
7. Shawn Doonan: *"Białka i peptydy"* (2008), PWN Warszawa

STOSOWANE SKRÓTY

AA – aminokwas
Acm – acetamidometyl
AcOH – kwas octowy
Boc – *t*-butyloksykarbonyl
Bzl – benzyl
DCCI – *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid
DCM – dichlorometan
DIC – *N,N'*-diizopropylokarbodiimid
DIPEA – diizopropylometyloamina
DMAP – 4-(*N,N*-dimetyloamino)pirydyna
DMF – *N,N*-dimetyloformamid
ESI-MS – spektrometria mas z jonizacją przez elektrorozpylenie
Et₂O – eter dietylowy
EtOH – etanol
Fmoc – 9-fluorenyloksykarbonyl
HATU – heksafluorofosforan 2-(1-*H*-9-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy
HBr – bromowodór
HF – fluorowodór
HOAt – 1-hydroksy-7-azabenzotriazol
HOBt – 1-hydroksybenzotriazol
HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa
*iv*Dde – 1-(4,4-dimetylo-2,6-dioksycykloheksadieno)-3-metylobutyl
MALDI-MS – spektrometria mas z jonizacją przez desorpcję w matrycy
MeOH – metanol
MS – spektrometria mas
n-BuOH – *n*-butanol
NMP – *N*-metylo-2-pirolidon
Dmab – 4{*N*-[1-(4,4-dimetylo-2,6-dioksycykloheksadieno)-3-metylobutyl]-amino}benzyl
Pbf – 2,2,4,6,7-pentametylo-dihydrobenzenofurano-5-sulfonyl
Pmc – 2,2,5,7,8-pentametylochromano-6-sulfonyl
TBTU – tetrafluoroboran 2-(1-*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy
*t*Bu – *t*-butyl
TEA – trietyloamina
TFA – kwas trifluorooctowy
TIPS – triizopropylsilan
Trt – trityl
Z – benzyloksykarbonyl

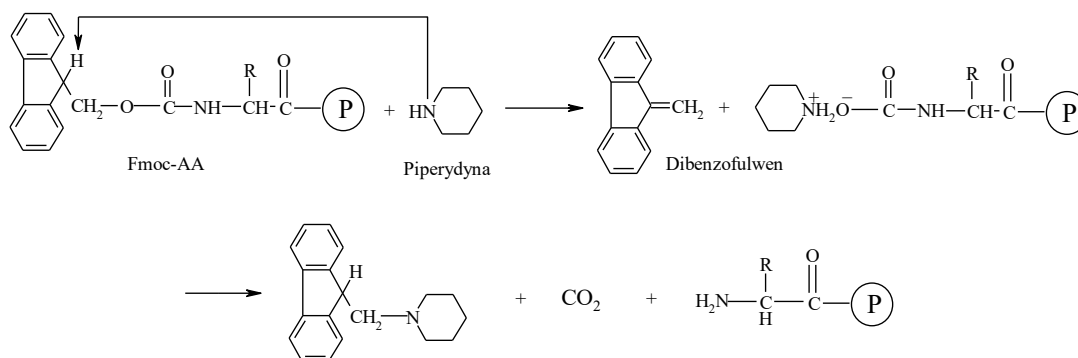
1. Stosowane pochodne aminokwasów

Do syntezy peptydów metodą Fmoc/tBu wykorzystuje się aminokwasy, w których grupy α -aminowe chronione są osłoną typu uretanowego, tj. 9-fluorenylmetoksykarbonylową (Fmoc).



Struktura osłony 9-fluorenylmetoksykarbonylowej (Fmoc)

Osłona Fmoc jest stabilna w środowisku kwaśnym np.: HF, TFA, HBr/AcOH, HBr/nitrometan a labilna w środowisku zasadowym. Proces usuwania osłony Fmoc zachodzi natychmiastowo pod wpływem amin pierwszorzędowych jak: cykloheksyloamina, etanoloamina; drugorzędowych amin jak: piperodyna, piperazyna i powoli pod wpływem amin trzeciorzędowych jak: TEA, DIPEA.



Schemat reakcji usuwania osłony Fmoc z grupy aminowej przy pomocy piperodyny

Stosowane w syntezie peptydów osłony bocznych grup funkcyjnych Fmoc-AA powinny być labilne w środowisku kwaśnym i stabilne w zasadowym. W tym celu stosuje się następujące osłony do ochrony grup funkcyjnych w łańcuchach bocznych Fmoc-AA:

Grupa ochraniająca	AA	Grupa ochraniana	Usuwanie
Boc	Lys	ϵ -aminowa	90% roztwór TFA w DCM (v/v)
	Trp	indolowa	
Fmoc	Lys	ϵ -aminowa	20% roztwór piperydyny w DMF (v/v)
ivDde	Lys	ϵ -aminowa	2% roztwór hydrazyny w DMF (v/v)
Z	Lys	ϵ -aminowa	H ₂ /Pd, HBr/AcOH lub HF
Pbf	Arg	guanidynowa	95% roztwór TFA w DCM (v/v)
Pmc	Arg	guanidynowa	50% roztwór TFA w DCM (v/v)
Bzl/OBzl	Tyr	fenolowa	H ₂ /Pd, HBr/AcOH lub HF
	Ser	β -hydroksylowa	
	Thr	β -hydroksylowa	
	Asp	β -karboksylowa	
	Glu	γ -karboksylowa	
<i>t</i>Bu/O<i>t</i>Bu	Tyr	fenolowa	90% roztwór TFA w DCM (v/v)
	Ser	β -hydroksylowa	
	Thr	β -hydroksylowa	
	Asp	β -karboksylowa	
	Glu	γ -karboksylowa	
ODmab	Asp	β -karboksylowa	2% roztwór hydrazyny w DMF (v/v)
	Glu	γ -karboksylowa	
Acm	Cys	tiolowa	I ₂ w 40% wodnym roztworze AcOH (v/v)
Trt	Gln	amidowa	90% roztwór TFA w DCM (v/v)
	Asn	amidowa	
	Cys	tiolowa	
	His	imidazolowa	

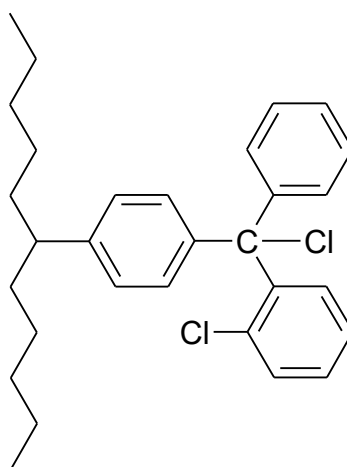
2. Stosowane rozpuszczalniki

Najbardziej rozpowszechnionym rozpuszczalnikiem w syntezie peptydów na nośniku stałym metodą Fmoc jest *N,N*-dimetyloformamid (DMF). Usuwanie osłony Fmoc przebiega sprawniej w polarnym środowisku jak DMF, niż w niepolarnym jak dichlorometan (DCM). Z tego względu do usuwania osłony stosuje się 20% roztwór piperydyny w DMF. Używany w procesie tworzenia wiązania peptydowego DMF musi być czysty, tzn. wolny od amin, gdyż ich obecność powoduje uwalnianie grupy aminowej w Fmoc-AA. Oprócz DMF stosuje się także *N*-metylo-2-pirolidon (NMP), który ma doskonałe własności rozpuszczające i może przyspieszać proces tworzenia wiązania peptydowego, redukując fałdowanie się i agregację rozwijanego łańcucha peptydowego. Dla uzyskania optymalnych warunków syntezy stosuje się jako rozpuszczalnik mieszaninę NMP/DMF (1:1) z dodatkiem 1% tritonu (detergentu).

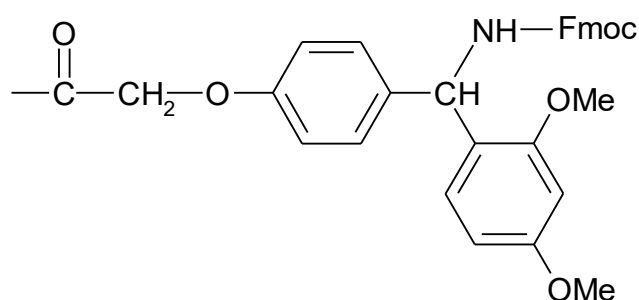
3. Stosowane żywice

Nośnik polimerowy (żywica) powinien być bierny chemicznie, całkowicie nierozpuszczalny w stosowanych rozpuszczalnikach, łatwy do odsączenia, posiadać wystarczającą wytrzymałość mechaniczną oraz wystarczającą ilość grup funkcyjnych. Wybór żywicy zastosowanej do syntezy peptydu zależy również od struktury syntezowanego peptydu (np. od tego, czy syntezowany peptyd ma posiadać wolną grupę karboksylową na C-końcowym aminokwasie, czy też grupę amidową). Najczęściej stosowane są żywice polistyrenowe z przyłączonym labilnym w środowisku kwaśnym łącznikiem (tzw. „linkerem”).

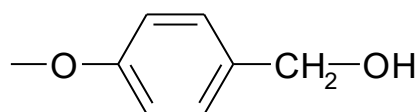
Ponieważ syntezowany w ramach ćwiczeń tripeptyd posiada na C-końcowym aminokwasie wolną grupę karboksylową zastosowano żywicę chloro-(2'-chloro)tritylową (o osadzeniu 0.8 – 1.4 mM/g żywicy) z „linkerem” o następującej strukturze:



Struktura „linkera” stosowanego w żywicy chloro-(2'-chloro)tritylowej do syntezy peptydów z wolną grupą karboksylową na C-końcowym aminokwasie



Struktura „linkera” stosowanego w żywicy Tentagel S RAM do syntezy peptydów z grupą amidową na C-końcowym aminokwasie



Struktura „linkera” stosowanego w żywicy Tentagel S PHB do syntezy peptydów z wolną grupą karboksylową na C-końcowym aminokwasie

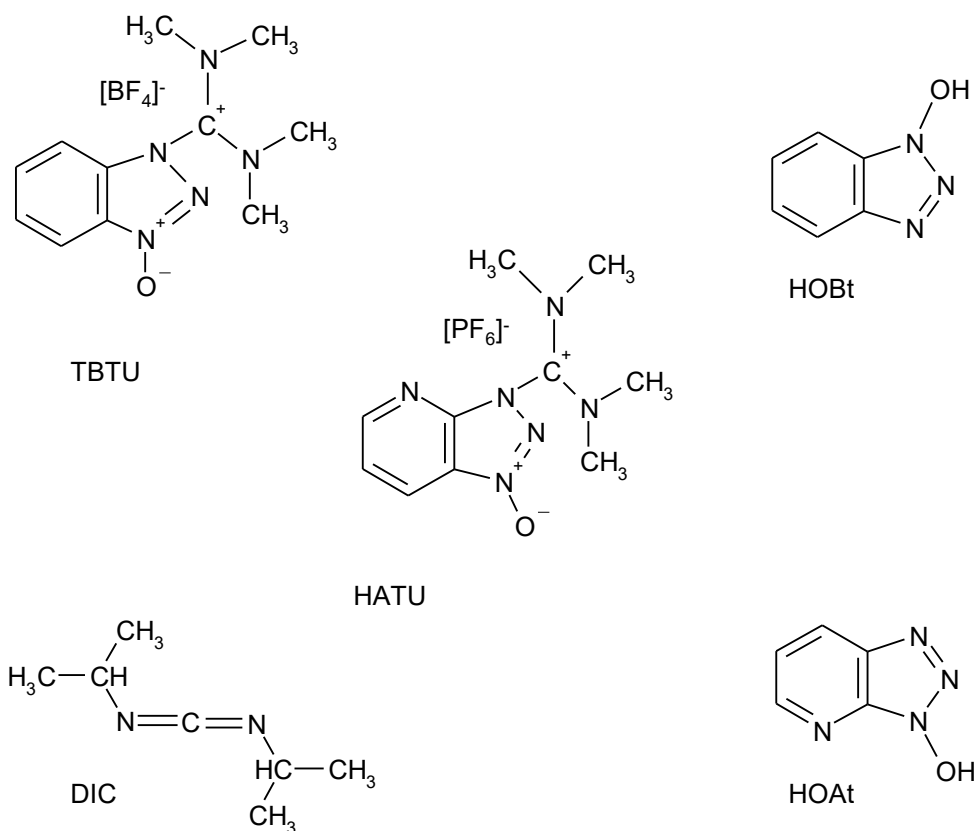
Osadzenie pierwszego aminokwasu przeprowadza się bezpośrednio w naczyniu reakcyjnym. W przypadku żywicy TentaGel S RAM po uprzednim usunięciu osłony Fmoc z „linkera” żywicy za pomocą 20% roztworu piperydyny w DMF oraz zaktywowaniu Fmoc-AA za pomocą odczynników i metod ułatwiających tworzenie wiązania peptydowego opisanych w punkcie 4 (osadzenie pierwszego aminokwasu wymaga utworzenia wiązania amidowego, zaś peptyd po odszczepieniu od żywicy posiada ugrupowanie amidowe na C-końcu).

4. Stosowane odczynniki i metody ułatwiające tworzenie wiązania peptydowego

Reakcja tworzenia wiązania peptydowego należy do grupy reakcji nukleofilowych zachodzących przy spolaryzowanych grupach karbonylowych. Tworzenie wiązania peptydowego możliwe jest dzięki aktywacji grup α -karboksylowych *N*-chronionych aminokwasów. W tym celu najczęściej stosuje się następujące metody:

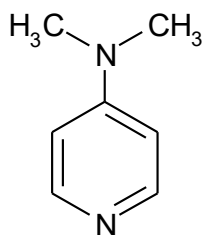
- metody aktywnych pochodnych z zastosowaniem mieszaniny, np.:
 - Fmoc-AA : HOBt : DIC (1 : 1 : 1) w DMF/NMP (1 : 1)
 - Fmoc-AA : HOBt : TBTU : DIPEA (1 : 1 : 1 : 2) w DMF/NMP (1 : 1)
 - Fmoc-AA : HOAt : HATU : kolidyna (1 : 1 : 1 : 2) w DMF/NMP (1 : 1)
- metodę symetrycznych bezwodników otrzymanych z mieszaniny:
 - Fmoc-AA : DIC (2 : 1) w DCM

Wymaga to użycia następujących odczynników aktywujących:



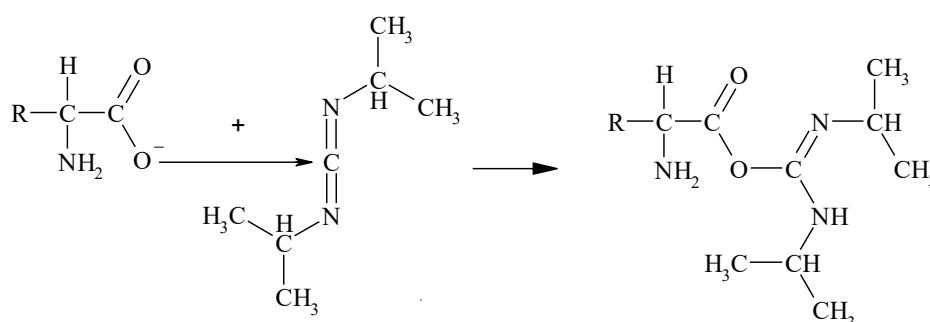
Stosowane w trakcie syntezy peptydów odczynniki ułatwiające tworzenie wiązania peptydowego

Efektywność procesu acylowania wymaga użycie katalizatora – DMAP (4-(*N,N*-dimetyloamino)pirydyna).

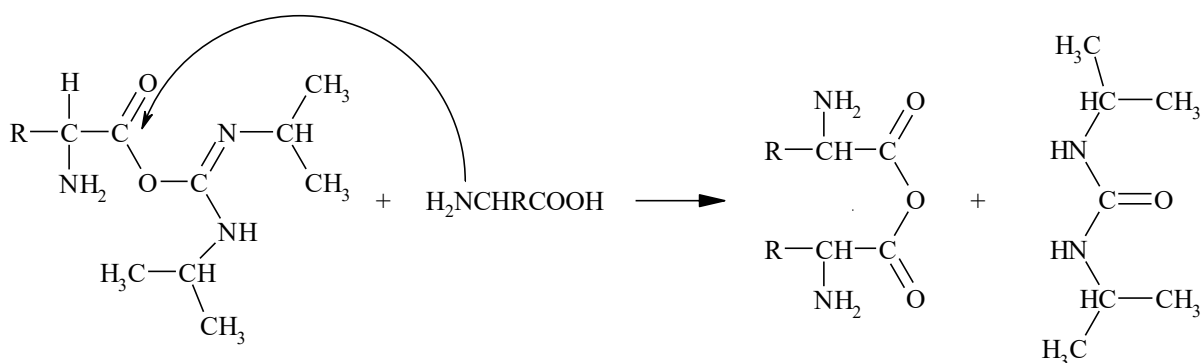


Struktura DMAP

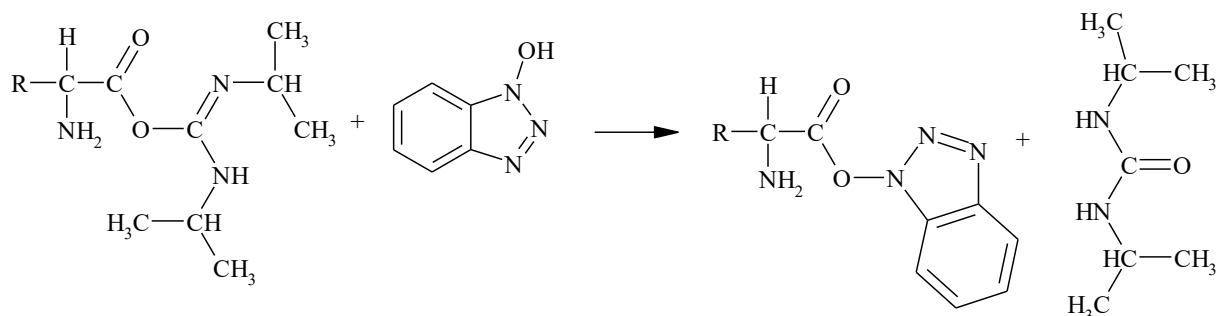
Aktywacja za pomocą metody Fmoc-AA : DIC w proporcjach molowych 1 : 1 przebiega według następującego schematu:



W przypadku gdy aktywacja prowadzona jest metodą Fmoc-AA : DIC (2 : 1) w DCM powstaje symetryczny bezwodnik aminokwasu oraz diizopropylomocznik:

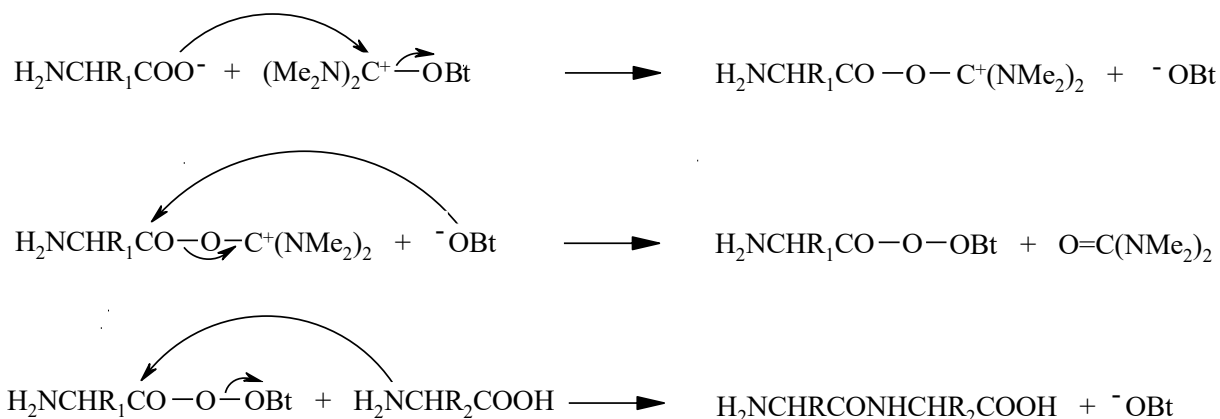


W obecności HOBt – metoda Fmoc-AA : HOBt : DIC (1 : 1 : 1) – powstaje aktywna pochodna (Fmoc-AA-OBt) oraz diizopropylomocznik:



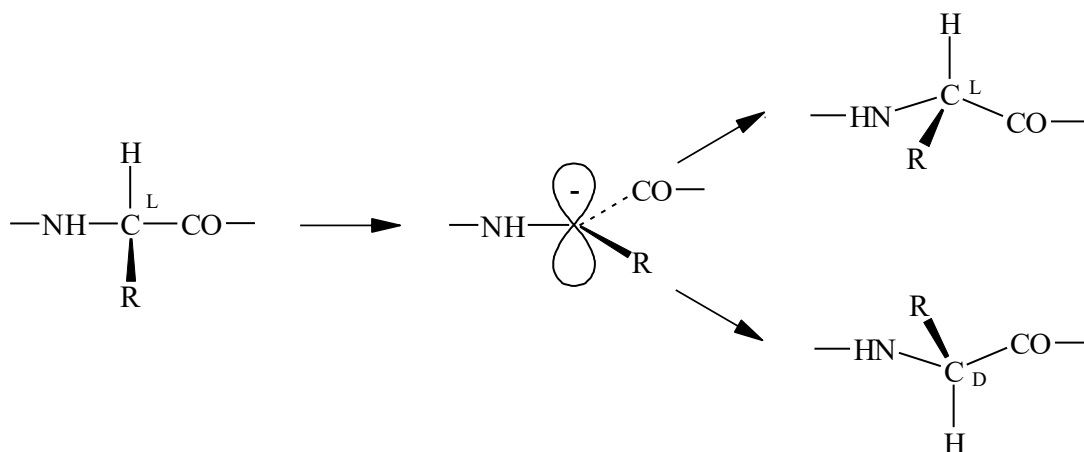
Jako produkt uboczny wydziela się rozpuszczalny w DCM diizopropylomocznik – w odróżnieniu od nierozpuszczalnego dicykloheksylomocznika, podczas aktywacji za pomocą *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCCI).

Według podobnych schematów przebiegają reakcje z zastosowaniem pozostałych metod i odczynników aktywujących. Na przykład w wyniku zastosowania mieszaniny Fmoc-AA : HOBT : TBTU : DIPEA (1 : 1 : 1 : 2) reakcja tworzenia wiązania peptydowego przebiega według następującego schematu:



Dla metody z zastosowaniem mieszaniny Fmoc-AA : HOAt : HATU : kolidyna (1 : 1 : 1 : 2) reakcje przebiegają według identycznego schematu z tą różnicą, że otrzymana aktywna pochodna jest pochodną 1-hydroksy-7-azabenzotriazolu (Fmoc-AA-OAt).

Obecność HOBT lub HOAt, oprócz roli czynnika aktywującego, zapobiega także procesom racemizacji, polegającym na bezpośrednim odszczepieniu H_α od asymetrycznego atomu C.



Schemat procesu racemizacji polegającego na bezpośrednim odszczepieniu H_α od asymetrycznego atomu C

5. Etapy syntezy peptydów na nośniku stałym metodą Fmoc/tBu

Synteza peptydów na nośniku stałym (żywicy) metodą Fmoc/tBu składa się z kilku etapów. Pierwszy etap syntezy stanowi proces przyłączenia C-końcowego aminokwasu do „linkera” żywicy. Kolejny etap stanowi proces wydłużanie łańcucha polipeptydowego polegający na cyklicznym przyłączaniu kolejnych reszt aminokwasowych. Ostatni etap syntezy polega na odszczepiania peptydu od żywicy z jednoczesnym usunięciem grup ochronnych z łańcuchów bocznych aminokwasów.

Przykładowo jeden cykl wprowadzania reszty aminokwasowej podczas wydłużaniu łańcucha peptydowego składa się z następujących etapów:

A. *Przemywanie:*

2×4 cm³ DMF, 0,5 min

B. *Dwuetapowe usunięcie osłony Fmoc:*

1×3 cm³ 20% piperydyna/DMF z dodatkiem 1% Tritonu X-100, 5 min

1×5 cm³ 20% piperydyna/DMF z dodatkiem 1% Tritonu X-100, 15 min

C. *Przemywanie:*

2×4 cm³ DCM, 0,5 min

2×4 cm³ DMF, 0,5 min

2×4 cm³ DCM, 0,5 min

3×4 cm³ DMF, 1 min

3×4 cm³ DCM, 1 min

D. *Potwierdzenie obecności wolnych grup aminowych jednym z testów:*

Kaisera, chloranilowym lub fluorescaminowym

E. *Acylowanie:*

Pierwsza reakcja przyłączania Fmoc-AA prowadzona jest 90 min, z użyciem trzykrotnego molowego nadmiaru chronionego aminokwasu względem osadzenia żywicy.

Drugie acylowanie (w przypadku pozytywnego testu na obecność wolnych grup aminowych) prowadzona jest 60 min, z użyciem dwukrotnego molowego nadmiaru chronionego aminokwasu.

We wszystkich przypadkach acylowanie prowadzone jest w mieszaninie rozpuszczalników DMF : NMP 1 : 1 (v : v) z 1% dodatkiem Tritonu X-100.

F. *Przemywanie:*

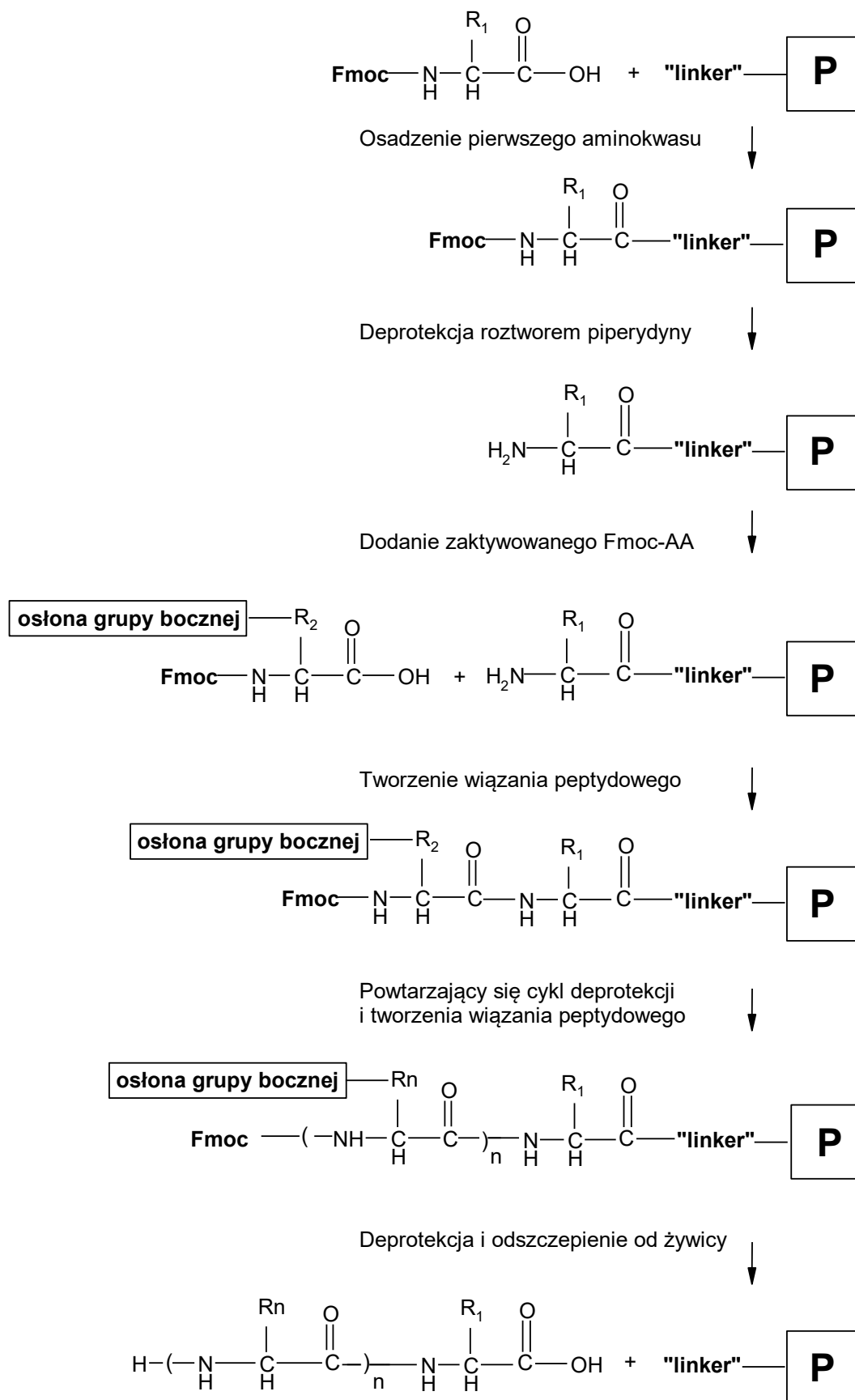
3×4 cm³ DMF, 1 min

3×4 cm³ DCM, 1 min

G. *Monitorowanie reakcji acylowania:*

Test na obecność wolnych grup aminowych (Kaisera, chloranilowy lub fluorescaminowy). Pozytywny wynik testu powoduje powtórne acylowanie począwszy od punktu E. Wynik negatywny kończy proces przyłączania chronionego aminokwasu.

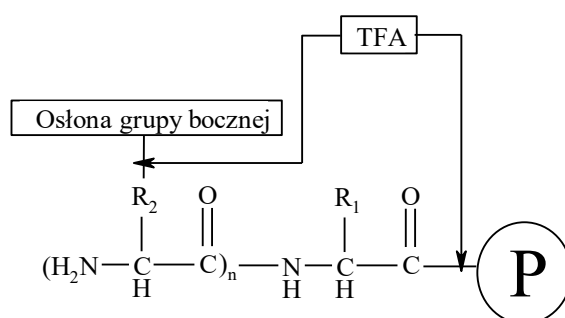
Poszczególne etapy syntezy można przedstawić schematycznie w następujący sposób:



Ogólny schemat syntezy peptydów na nośniku stałym metodą Fmoc/tBu

W ostatnim etapie syntezy peptydów usuwa się osłonę Fmoc z grupy α -aminowej *N*-końcowego aminokwasu według procedury przedstawionej w punktach A-C. Na końcu żywicy przemywa się niewielką ilością EtOH oraz Et₂O i suszy się w eksykatorze próżniowym nad P₂O₅ i NaOH do stałej masy.

Odszczepianie peptydów od żywicy prowadzone jest zwykle z jednoczesnym usunięciem osłon z grup funkcyjnych łańcuchów bocznych aminokwasów, np. z zastosowaniem mieszaniny TFA/Fenol/H₂O/TIPS (88 : 5 : 5 : 2). Reakcję, z zastosowaniem powyższej mieszaniny, prowadzona jest przez 120 min w temperaturze pokojowej w atmosferze gazu obojętnego (argonu). Po tym czasie żywica jest odsączana i przemywana dwukrotnie niewielkimi ilościami TFA, a następnie z przesączu wytrącany jest peptyd za pomocą zimnego Et₂O. Wytrącony peptyd jest odsączany i po rozpuszczeniu w wodzie lub 20% AcOH liofilizowany.



Schemat procesu odszczepienia peptydu od żywicy za pomocą TFA

ODCZYNNIKI:

1. Żywica:

Chloro-(2'-chloro)tritylpolystyrene resin (o osadzeniu grup funkcyjnych 1 mM/g)

2. Fmoc-AA:

Fmoc-Gly [M.cz. = 297,3]

Fmoc-Phe [M.cz. = 387,4]

Fmoc-Gln [M.cz. = 368,4]

Fmoc-Trp [M.cz. = 426,5]

Fmoc-Leu [M.cz. = 353,4]

3. Czynniki aktywujące:

HOBt [M.cz. = 153]

DIC [M.cz. = 126; d = 0,806 g/L; 1mM = 156 μ L]

4. Rozpuszczalniki:

DIPEA [1 mM = 174 μ L]

MeOH

DMF

DCM

EtOH

Piperydyna

EtO₂

AcOH

n-heksan

5. Odczynniki do testu Kaisera

n-BuOH – 2 mL

ninhydryna – 50 mg

pirydyna – 5 mL

KCN – 100 μ L 0,001 M wodnego roztworu

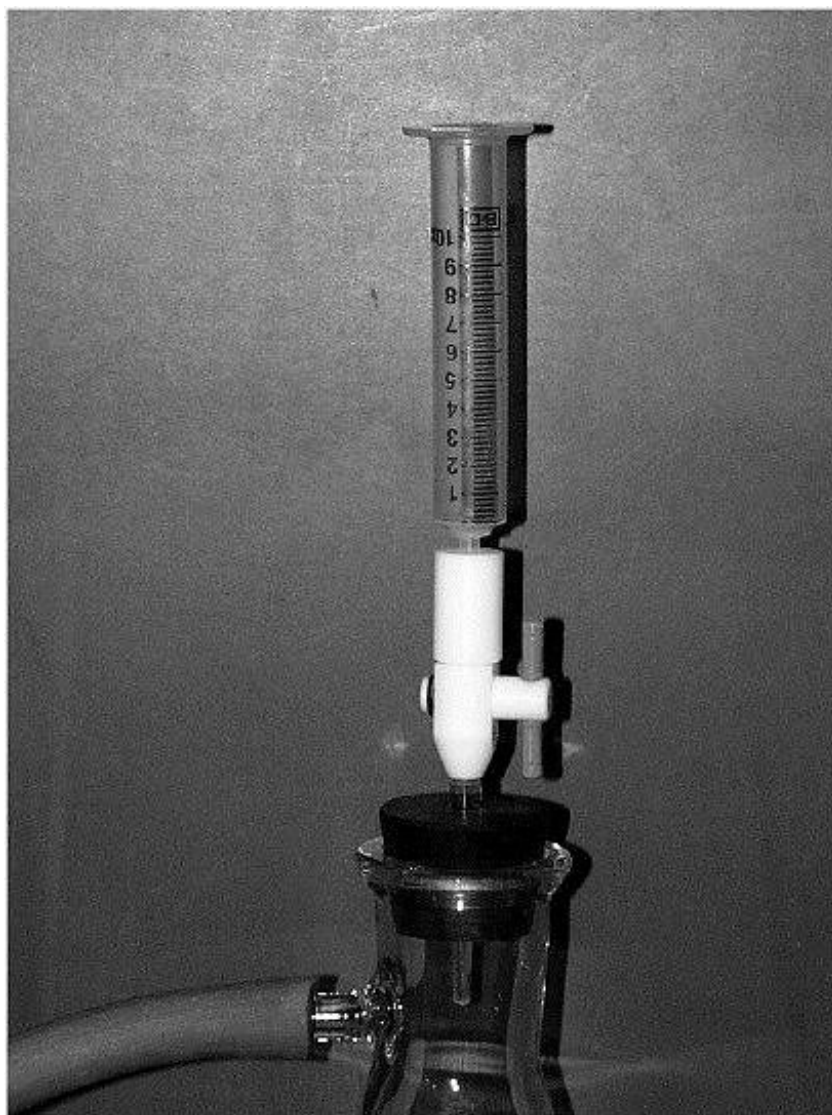
fenol – 4 g

SPRZĘT LABORATORYJNY:

1. Zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężony ze spektrometrem mas (LC-MS)
2. Waga analityczna
3. Wytrząsarka
4. Wyparka rotacyjna próżniowa
5. Płaszcz grzejny zaopatrzony w stalowy kołnierz i termometr do testu Keisera
6. Kolby ssawkowe stożkowe
7. Kolby okrągłodenne

8. Pipety Pasteura
9. Pipety wielomiarowe
10. Cylindry miarowe
11. Lejki
12. Zlewki
13. Kolby stożkowe płaskodenne
14. Ampułki
15. Probówki Eppendorfa
16. Sączki
17. Kolumnienki do ekstrakcji w fazie stałej
18. Kapilary
19. Łopatki dentystyczne
20. Igły lekarskie
21. Balony gumowe
22. Dreny teflonowe oraz typu PEEK
23. Korki teflonowe zaopatrzone w zawory

Zdjęcie przedstawia zestaw do prowadzenia syntezy tripeptydu na nośniku stałym



A. Synteza peptydu o sekwencji określonej przez prowadzącego zajęcia

1. Czynności wstępne – przygotowanie rozpuszczalników i odczynników

W pracy z żywicą, aż do momentu przyłączenia pierwszego Fmoc-AA należy zachować **warunki bezwodne**, bez śladów alkoholi (np. EtOH, MeOH). Związki te powodują wymianę atomów chloru na żywicy na grupę hydroksylową, wtedy nie możliwe jest przeprowadzenie reakcji w opisany sposób. Dlatego należy bezwzględnie pracować w suchych rękawicach, stosować suche szkło i wszystkie używane do syntezy narzędzia typu łopatkę, końcówki do pipet.

Rozpuszczalniki co najmniej na 24 godziny przed użyciem odpowiednio przygotować: DCM zasypać bezwodnym $MgSO_4$ i K_2CO_3 , wysypując do butelki warstwę około 4 cm soli. Przed użyciem niewielkie ilości odsączyć od środków suszących. DMF i DIPEA zasypać sitami molekularnymi typu A4, wyprażonymi w temperaturze $150^\circ C$ przez 3 godziny i ostudzonymi w eksykatorze próżniowym. Stosować bezpośrednio z nad sit, ostrożnie pobierając z butelki pipetą tak aby nie mieszać sit z odczynnikami.

Odczynniki do testu Kaisera należy przygotować w trzech oddzielnych buteleczkach (każda o pojemności około nie większej niż 10 mL) zaopatrzonych w wkraplacz.

Poszczególne buteleczki powinny zawierać:

1. 1 mL roztworu ninhydryny (50 mg ninhydryny na 1 mL *n*-BuOH)
2. 1 mL roztworu fenolu (4 g fenolu na 1 mL *n*-BuOH)
3. 1 mL roztworu KCN (100 μL 0,01 M KCN w wodzie na 5 mL pirydyny)

2. Osadzenie pierwszego C-końcowego aminokwasu

Odważyć 2 eq. (0,1 mM) Fmoc-AA do małej kolby płaskodennej o pojemności 10-20 mL i rozpuścić w minimalnej objętości (około 2-3 mL) świeżo odsączonego z nad sit molekularnych DMF, aż do całkowitego rozpuszczenia Fmoc-AA. Do roztworu dodać 8 eq. (0,4 mM) DIPEA (Uwaga! 1 mM DIPEA = 174 μL), a następnie wprowadzić do strzykawki zawierającej 50 mg żywicy wstępnie przemytą DMF (3×3 mL DMF, 2 min). Reakcję prowadzić 45 minut, mieszając zawartość strzykawki azotem (balon, ze strzykawką napełnioną azotem z końcówką z drenu PEEK). Po 45 minutach do mieszaniny dodać 2 mL MeOH i reakcję prowadzić jeszcze 15 min. Po tym czasie zawartość strzykawki odsączyć i przemyć zgodnie z poniższym opisem:

2×3 mL DCM : MeOH : DIPEA (17 : 2 : 1; v/v/v), 2 min

2×3 mL MeOH, 2 min

6×3 mL DMF, 1 min

3. Przyłączanie kolejnych reszt aminokwasowych Fmoc-AA:

- a) wstępne przemywanie żywicy (jeżeli żywica była przechowywana w lodówce do kolejnych zajęć)

3×3 mL DMF, 1 min

- b) usuwanie osłony Fmoc (deprotekcja)

1×3 mL 20% piperydyna/DMF, 5 min

1×3 mL 20% piperydyna/DMF, 5 min

- c) przemywanie żywicy po deprotekcji

6×3 mL DMF, 2 min

- d) test na obecność wolnych grup aminowych (test ninhydrynowy – Keisera):

roztwór 1. 5% ninhydryna w *n*-BuOH (v/v)

roztwór 2. 80% fenol w *n*-BuOH (v/v)

roztwór 3. KCN w pirydynie (np. 2 mL 0,001 M roztworu KCN w 98 mL pirydyny)

Niewielką ilość żywicy umieścić w szklanej ampułce (wykonanej z bezbarwnego szkła), dodać po 2 krople każdego roztworu i ogrzewać 5 min w temperaturze 100-105°C. Barwa niebieska ziaren żywicy bądź roztworu wskazuje na obecność wolnych grup aminowych (wynik testu pozytywny).

- e) aktywacja i przyłączanie kolejnego Fmoc-AA

Odważyć 4 eq. (0,2 mM) Fmoc-AA do małej kolby płaskodennej o pojemności 10-20 mL i rozpuścić w minimalnej objętości (około 2-3 mL) świeżo odsączonego z nad sit molekularnych DMF, aż do całkowitego rozpuszczenia Fmoc-AA. Do roztworu dodać 4 eq. (0,2 mM) HOBt, a następnie 4 eq. (0,2 mM) DIC (Uwaga! 1 mM DIC = 156 µL). Mieszaninę wprowadzić do strzykawki zawierającej żywicę wstępnie przemytą DMF. Reakcje prowadzić 40 minut, mieszając zawartość strzykawki azotem (balon, ze strzykawką napełnioną azotem z końcówką z drenu PEEK). Po tym czasie zawartość strzykawki odsączyć i przemyć zgodnie z opisem poniżej.

- f) przemywanie żywicy po aktywacji i przyłączeniu Fmoc-AA

6×3 mL DMF, 2 min

- g) test na obecność wolnych grup aminowych (test ninhydrynowy – Keisera)

Barwa niebieska (szara) ziaren żywicy bądź roztworu wskazuje na obecność wolnych grup aminowych. Oznacza to, że proces przyłączania Fmoc-AA nie przebiegł całkowicie i należy go powtórzyć zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3e, a następnie przemyć żywicę zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3f. Negatywny wynik testu ninhydrynowego oznacza, że można przejść do etapu przyłączenia kolejnej reszty aminokwasowej, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.

4. Końcowa deprotekcja – usunięcie osłony Fmoc z *N*-końcowej reszty AA w peptydzie zgodnie z procedurą opisaną w punktach 3a–3d

Po usunięciu osłony Fmoc z *N*-końcowego aminokwasu w tripeptydzie wskazane jest przemyć żywicę za pomocą MeOH i Et₂O oraz wysuszyć w eksykatorze próżniowym nad KOH.

5. Odszczepienie peptydu od żywicy

Strzykawkę zawierającą peptydyżywicę wraz z korkiem teflonowym umieścić w nasadce do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem nałożonej na zważoną i czystą kolbę okrągłodenną o pojemności 100 mL. Do strzykawki wprowadzić 4 mL 50% AcOH w DCM. Reakcje prowadzić 1 godzinę, mieszając zawartość strzykawki azotem (balon, ze strzykawką napełnioną azotem z końcówką z drewna PEEK). Następnie zawartość strzykawki odsączyć i przemyć 3×1 mL 50% AcOH w DCM. Z przesączu odparować DCM i AcOH z dodatkiem *n*-heksanu, do zaniku zapachu kwasu. Do kolby dodać 10 mL wody dejonizowanej a następnie zawartość kolby zamrozić w ciekłym azocie i zliofilizować. Po liofilizacji zważyć i określić masę otrzymanego surowego peptydu.

B. Analiza LC-MS peptydu (*identyfikacja i ocena czystości otrzymanego peptydu*)

Niewielką ilość peptydu (10 µL roztworu peptydu rozpuszczonego przed liofilizacją w 10 mL wody dejonizowanej) przenieść do małej probówki Eppendorfa i rozcieńczyć wodą dejonizowaną do objętości 500 µL (50-krotne rozcieńczenie).

Warunki analizy LC-MS:

- ultra-wysokosprawny (UHPLC) chromatograf cieczowy firmy Shimadzu Nexera X2 wyposażony w dwie pompy wysokociśnieniowe, degazer, autosampler, termostat kolumn, detektor UV z matrycą diodową oraz detektor masowy Shimadzu LCMS-2020
- kolumna: Phenomenex Aeris PEPTIDE XB-C18 100Å (uziarnienie 3,6 µm) o wymiarach 150 × 2,1 mm
- objętość dozowania: 10 µL
- temperatura kolumny: 40°C
- faza ruchoma: gradient 10-70% ACN w H₂O z dodatkiem 0,08% TFA
- natężenie przepływu fazy ruchomej: 0,3 mL/min
- czas analizy: 10 min
- detekcja UV przy długość fali: $\lambda = 226$ nm oraz $\lambda = 254$ nm
- temperatura celi pomiarowej 40°C
- temperatura autosamplera: 4°C
- tryb jonizacji detektora MS: dodatnia ESI
- metoda rejestracji widma: scan (100 – 500 Da)
- napięcie na kapilarze: 4500 V
- napięcie na detektorze: 1100 V
- temperatura linii desolvacyjnej 250°C
- temperatura bloku: 300°C
- natężenie przepływu gazu nebulizującego: 1,5 L/min (N₂)
- natężenie przepływu gazu osuszającego: 15 L/min (N₂)

Protokół z syntezy peptydu:

Rodzaj żywicy:

Osadzenie żywicy: mM/g

Masa strzykawki: g

Masa strzykawki + żywicy: g

Masa żywicy: g

2 eq. = mM

4 eq. = mM

	Fmoc-AA	MW	Ilość Fmoc-AA	Data	Przemywanie wstępne	Deprotekcja 20% Piperidyna w DMF	Przemywanie	Test	Acylowanie		Przemywanie	Test
									Metoda	Czas		
3												
2												
1												
0												

Przykładowy protokół z syntezy tripeptydu Gln-Phe-Gly-OH

Rodzaj żywicy: Chloro-(2'-chlorotrytyl) Polystyrene

Masa strzykawki: 3.0810 g

2 eq. = 0.388 mM

Masa strzykawki + żywicy: 3.28828 g

4 eq. = 654 mM

Osadzenie żywicy: 0.96 mM/g

Masa żywicy: 0.2018 g

	Fmoc-AA	MW	Ilość Fmoc-AA	Data	Przemywanie wstępne	Deprotekcja 20% Piperydyna w DMF	Przemywanie	Test	Acylowanie		Przemywanie	Test
									Metoda	Czas		
3	Fmoc-Gly	297.3	2 eq. 115.3 mg	23.05. 2002	3x 4ml DCM, 2 min	nd	nd	nd	Fmoc-Gly : DIPEA 2eq : 8 eq	1 h	3x4 ml DCM:MeOH:DIPEA (17:2:1), 2 min 2x 4 ml MeOH, 2 min 3x4 ml DCM, 2 min 2x4 ml DMF, 1 min 3x4 ml DCM, 1 min	nd
2	Fmoc-Phe	387.4	4 eq. 253.4 mg	27.05. 2002	3x 4ml DCM, 2 min	1x 4ml, 5 min 1x 4ml, 10 min	3x4 ml DMF, 2 min 3x4 ml DCM, 2 min 2x4 ml MeOH, 2 min 2x4 ml DCM, 1 min	OK	Fmoc-Phe: DIC : HOBt 4 eq: 4 eg: 4 eq	1h	3x4 ml DMF, 2 min 4x4 ml DCM, 2 min 2x4 ml MeOH, 2 min	OK
1	Fmoc-Gln	368.4	4 eq. 240.9 mg	27.05. 2002	3x 4ml DCM, 2 min	1x 4ml, 5 min 1x 4ml, 10 min	3x4 ml DMF, 2 min 3x4 ml DCM, 2 min 2x4 ml MeOH, 2 min 2x4 ml DCM, 1 min	OK	Fmoc-Gln: DIC : HOBt 4 eq: 4 eg: 4 eq	1 h	3x4 ml DMF, 2 min 4x4 ml DCM, 2 min 2x4 ml MeOH, 2 min	OK
0	nd	nd	nd	27.05. 2002	3x 4ml DCM, 2 min	1x 4ml, 5 min 1x 4ml, 10 min	3x4 ml DMF, 2 min 3x4 ml DCM, 2 min 2x4 ml MeOH, 2 min 2x4 ml DCM, 1 min	OK	nd	nd	nd	nd

