

### 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 Merrifield 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  $\alpha$ -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  
AcOH – kwas octowy  
Boc – *t*-butyloksykarbonyl  
DCCI – *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid  
DCM – dichlorometan  
DIC – *N,N'*-diizopropylkarbodiimid  
DIPEA – diizopropyletyloamina  
DMF – *N,N*-dimetyloformamid  
Et<sub>2</sub>O – eter dietylowy  
EtOH – etanol  
Fmoc – 9-fluorenylometoksykarbonyl  
HOBt – 1-hydroksybenzotriazol  
HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa  
MALDI-MS – spektrometria mas z jonizacją przez desorpcję w matrycy  
MeOH – metanol  
*n*-BuOH – *n*-butanol  
NMP – *N*-metylo-2-pirolidon  
*t*Bu – *t*-butyl  
TEA – trietyloamina  
TFA – kwas trifluoroocetowy  
TIPS – triizopropylsilan

## SYNTEZA PEPTYDÓW NA NOŚNIKU STAŁYM METODĄ FMOC/*t*BU

Synteza peptydów na nośniku stałym (żywicy) metodą Fmoc/*t*Bu 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 odszczepianiu 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 mL DMF, 0,5 min.

### B. *Dwuetapowe usunięcie osłony Fmoc:*

1×3 mL 20% piperidyna/DMF z dodatkiem 1% tritonu X-100, 5 min

1×5 mL 20% piperidyna/DMF z dodatkiem 1% tritonu X-100, 15 min

### C. *Przemywanie:*

2×4 mL DCM, 0,5 min

2×4 mL DMF, 0,5 min

2×4 mL DCM, 0,5 min

3×4 mL DMF, 1 min

3×4 mL 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. Przemycanie:

3×4 mL DMF, 1 min

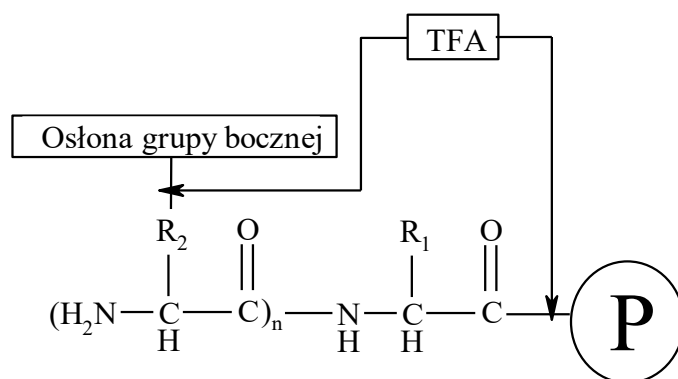
3×4 mL DCM, 1 min

### 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.

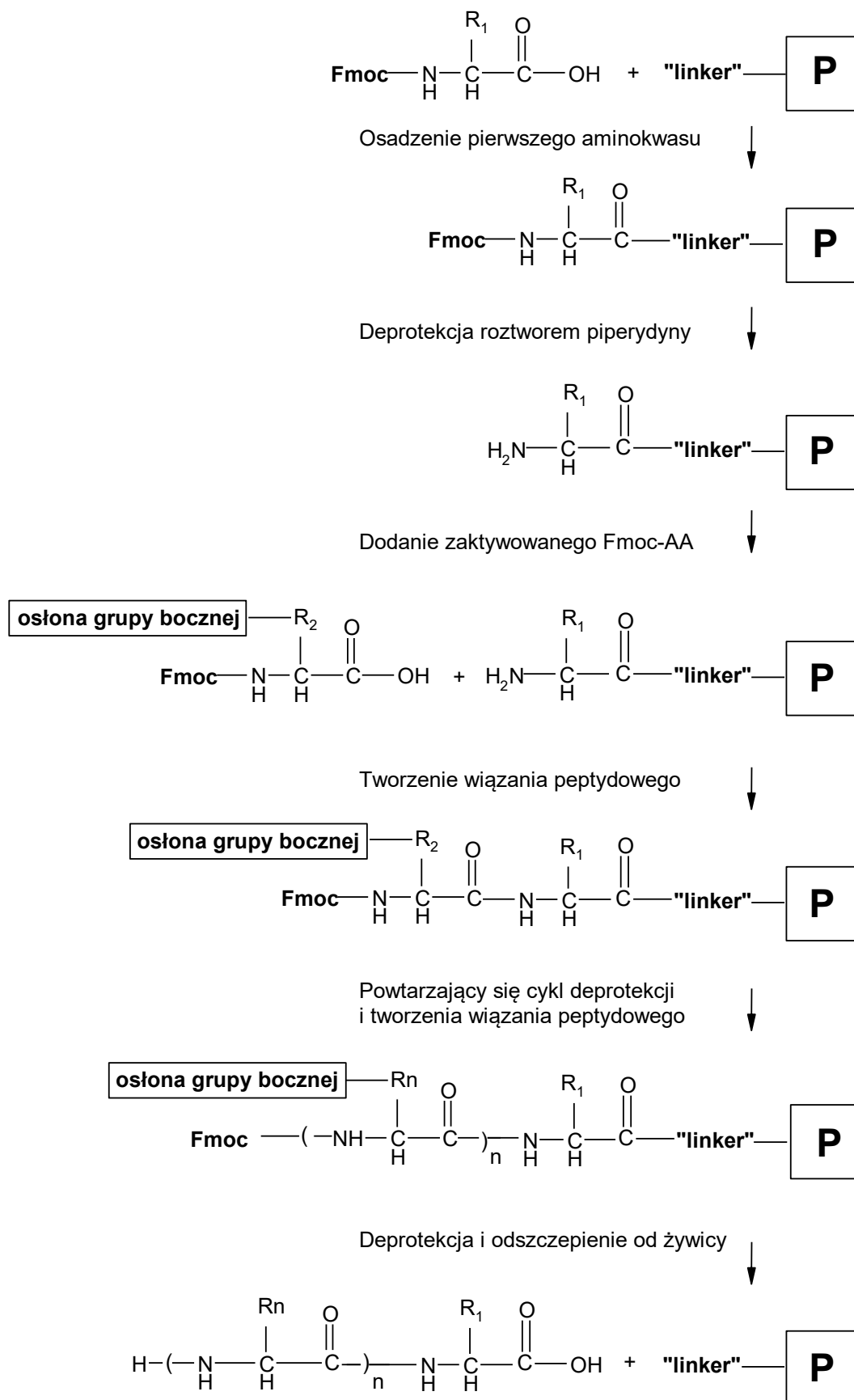
W ostatnim etapie syntezy peptydów usuwana jest osłona Fmoc z grupy  $\alpha$ -aminowej *N*-końcowego aminokwasu według procedury przedstawionej w punktach A-C. Na końcu żywica przemycana jest niewielką ilością EtOH oraz Et<sub>2</sub>O i suszona się w eksykatorze próżniowym nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 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/H<sub>2</sub>O/TIPS (88:5:5:2). Reakcja, z zastosowaniem powyższej mieszaniny, prowadzona jest przez 120 min w temperaturze pokojowej w atmosferze gazu obojętnego (argonu). Po tym czasie żywica jest odsączana i przemycana dwukrotnie niewielkimi ilościami TFA, a następnie z przesączu wytrącany jest peptyd za pomocą zimnego Et<sub>2</sub>O. Wytrącony peptyd jest odsączany i po rozpuszczeniu w wodzie lub 20% AcOH liofilizowany.



Schemat procesu odszczepienia peptydu od żywicy za pomocą TFA

Poszczególne etapy syntezy można przedstawić schematycznie w następujący sposób:



Ogólny schemat syntezy peptydów na nośniku stałym metodą Fmoc/tBu

## Synteza peptydów na nośniku stałym

### 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. = 135]

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

4. Rozpuszczalniki:

DIPEA [1 mM = 174  $\mu$ L]

MeOH

DMF

DCM

EtOH

Piperydyna

EtO<sub>2</sub>

AcOH

*n*-heksan

5. Odczynniki do testu Kaisera

*n*-BuOH – 2 mL

ninhydryna – 50 mg

pirydyna – 5 mL

KCN – 100  $\mu$ L 0,001 M wodnego roztworu

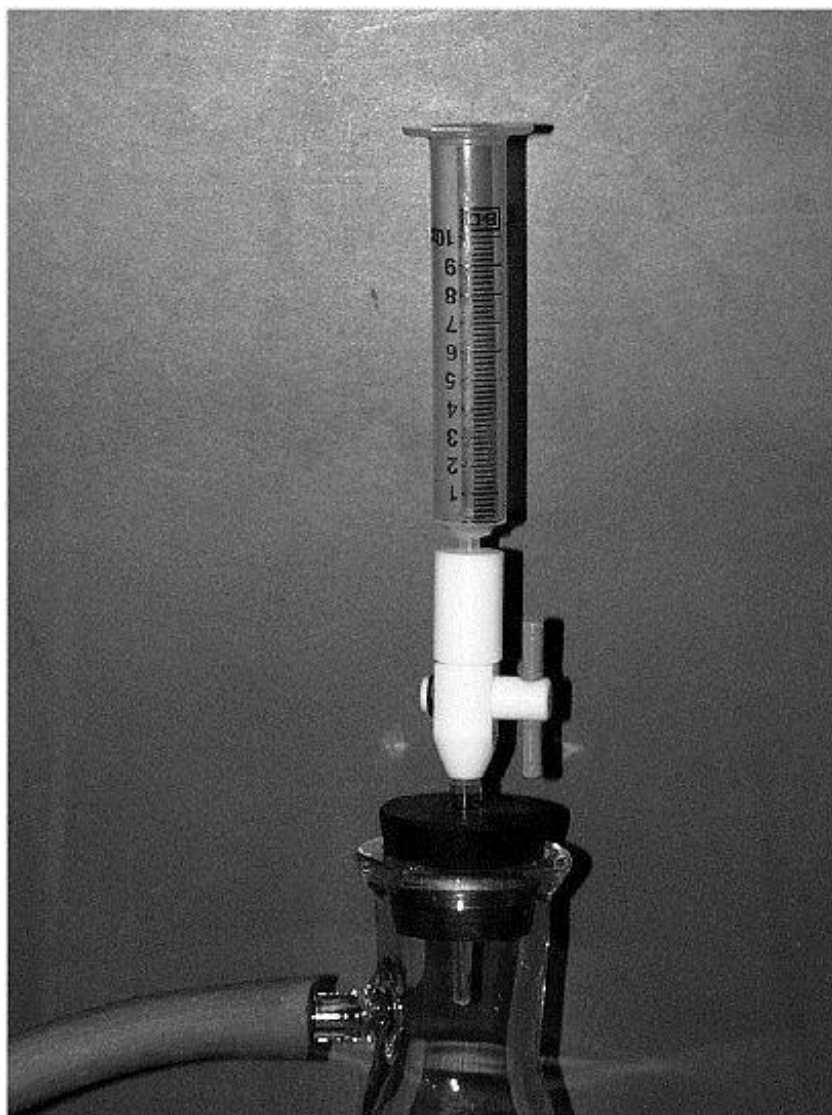
fenol – 4 g

### SPRZĘT LABORATORYJNY:

1. Zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężony ze spektrometrem mas (LC-MS)
2. Waga analityczna
3. Wyrząsarka
4. Wyparka rotacyjna próżniowa
5. Płaszcz grzejny zaopatrzony w stalowy kołnierz i termometr do testu Kaisera
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. Łopatkę dentystyczną
20. Igły lekarskie
21. Balony gumowe
22. Dreny teflonowe oraz typu PEEK
23. Korki teflonowe zaopatrzone w zawory

Zdjęcie przedstawia zestaw do prowadzenia syntezy peptydów 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 łopatki, końcówki do pipet.

Rozpuszczalniki co najmniej na 24 godziny przed użyciem odpowiednio przygotować: DCM zasypać bezwodnym  $MgSO_4$  i  $K_2CO_3$ , wsypując 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 ekcykatorze 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  $\mu L$  0,01 M KCN w wodzie na 5 mL pirydyny)

### 2. Osadzenie pierwszego C-końcowego aminokwasu

Odważyć 2 eq. (0,10 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  $\mu L$ ), a następnie wprowadzić do strzykawki zawierającej 50 mg żywicy wstępnie przemytej DCM (2 $\times$ 3 mL DCM, 2 min). Reakcje prowadzić 1 godzinę, mieszając zawartość strzykawki azotem (balon, ze strzykawką napełnioną azotem z końcówką z drewna PEEK). Po 1 godzinie 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 $\times$ 3 mL DCM : MeOH : DIPEA (17 : 2 : 1; v/v/v), 2 min  
 2 $\times$ 3 mL MeOH, 2 min  
 3 $\times$ 3 mL DMF, 1 min  
 3 $\times$ 3 mL DCM, 1 min

3. Przyłączanie kolejnych reszt aminokwasowych Fmoc-AA:

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

2×3 mL DCM, 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

3×3 mL DMF, 2 min

2×3 mL MeOH, 2 min

2×3 mL DCM, 1 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 DCM. Reakcje prowadzić 1 godzinę, 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

3×3 mL DMF, 2 min

2×3 mL MeOH, 2 min

3×3 mL DCM, 1 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–d

Po usunięciu osłony Fmoc z *N*-końcowego aminokwasu w peptydzie wskazane jest żywicę wysuszyć w eksykatorze próżniowym nad KOH i określić przyrost masy żywicy po zakończeniu syntezy.

5. Odszczepienie peptydu od żywicy

Strzykawkę zawierającą peptydydożywicę 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 drenu 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 mieszaninie suchy lód/aceton i zliofilizować. Po liofilizacji zważyć i określić masę otrzymanego surowego peptydu.

## **B. Analiza LC-MS tripeptydu**

*(ocena czystości i identyfikacja otrzymanego peptydu)*

Niewielką ilość peptydu (10 µL roztworu peptydu rozpuszczonego przed liofilizacją w 10 mL wody) 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 H<sub>2</sub>O z dodatkiem 0,8% 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 desolwatacyjnej 250°C

- temperatura bloku: 300°C
- natężenie przepływu gazu nebulizującego: 1,5 L/min (N<sub>2</sub>)
- natężenie przepływu gazu osuszającego: 15 L/min (N<sub>2</sub>)

**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% Piperydina w DMF	Przemywanie	Test	Acylowanie		Przemywanie	Test
									Metoda	Czas		
3	Fmoc-Gly	297.3	2 eq. 115,3 mg	23.05. 2002	3×4 mL DCM, 2 min	nd	nd	nd	Fmoc-Gly : DIPEA 2eq : 8 eq	1 h	3×4 mL DCM:MeOH:DIPEA (17 : 2 : 1; v/v/v), 2 min 2× 4 mL MeOH, 2 min 3×4 mL DCM, 2 min 2×4 mL DMF, 1 min 3×4 mL DCM, 1 min	nd
2	Fmoc-Phe	387.4	4 eq. 253,4 mg	27.05. 2002	3×4 mL DCM, 2 min	1×4 mL, 5 min 1×4 mL, 10 min	3×4 mL DMF, 2 min 3×4 mL DCM, 2 min 2×4 mL MeOH, 2 min 2×4 mL DCM, 1 min	OK	Fmoc-Phe: DIC : HOBt 4 eq: 4 eg: 4 eq	1h	3×4 mL DMF, 2 min 4×4 mL DCM, 2 min 2×4 mL MeOH, 2 min	OK
1	Fmoc-Gln	368.4	4 eq. 240,9 mg	27.05. 2002	3×4 mL DCM, 2 min	1×4 mL, 5 min 1×4 mL, 10 min	3×4 mL DMF, 2 min 3×4 mL DCM, 2 min 2×4 mL MeOH, 2 min 2×4 mL DCM, 1 min	OK	Fmoc-Gln: DIC : HOBt 4 eq: 4 eg: 4 eq	1 h	3×4 mL DMF, 2 min 4×4 mL DCM, 2 min 2×4 mL MeOH, 2 min	OK
0	nd	nd	nd	27.05. 2002	3×4 mL DCM, 2 min	1×4 mL, 5 min 1×4 mL, 10 min	3×4 mL DMF, 2 min 3×4 mL DCM, 2 min 2×4 mL MeOH, 2 min 2×4 mL DCM, 1 min	OK	nd	nd	nd	nd

