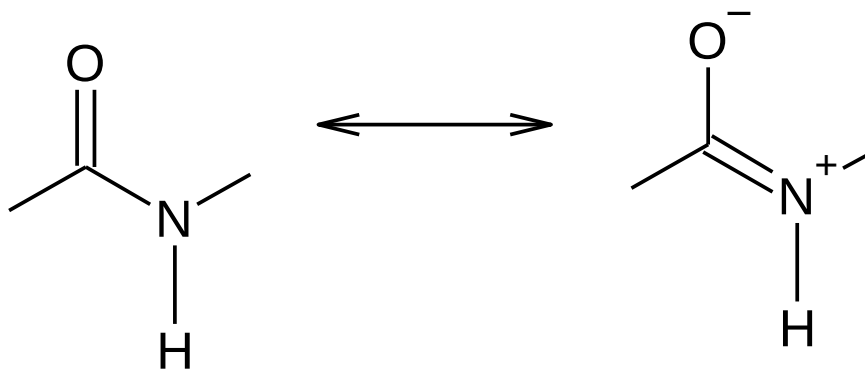
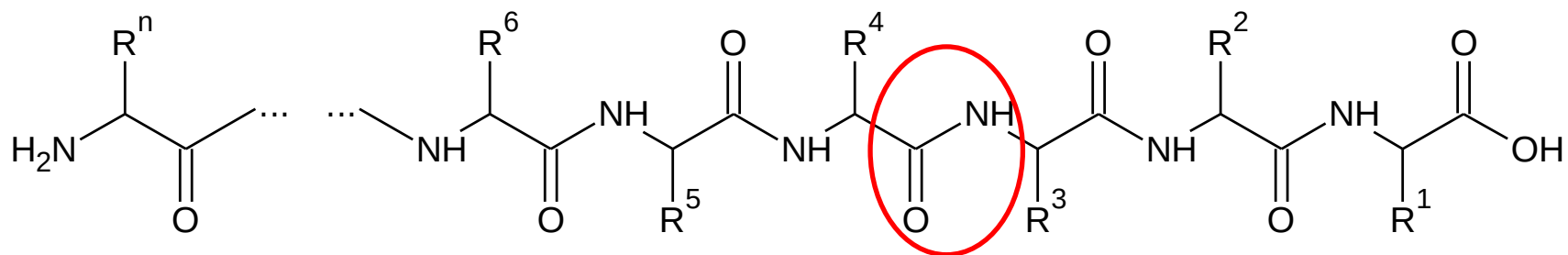


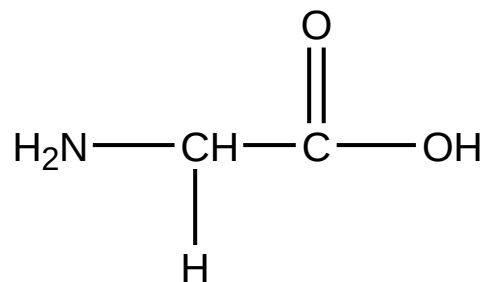
Chemiczna synteza peptydów i peptydomimetyków na dużą skalę

Literatura:

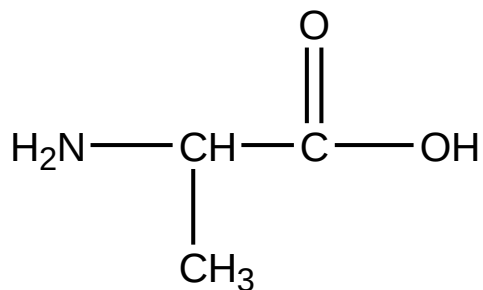
1. Andesson L. *et al.*: „*Large scale synthesis of peptides*”, Biopolymers (Peptide Science), **55**, 227–250 (2000);
2. Chandru S., Simerska P., Toth I.: „*Chemical Methods for Peptide and Protein Production*” *Molecules*, **18**, 4373-4388 (2013);
3. Guzman F., Barberis S., Illanes A.: „*Peptide synthesis: chemical or enzymatic*”, Electronic Journal of Biotechnology, **10**, 279-314(2007)
4. Bhaskara Reddy K. M. *et al.*: „*Large Scale Solid Phase Synthesis of Peptide Drugs: Use of Commercial Anion Exchange Resin as Quenching Agent for Removal of Iodine during Disulphide Bond Formation*”, International Journal of Peptides, 1-8(2012).



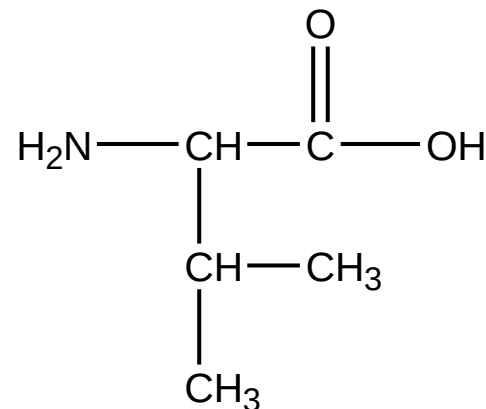
Aminokwasy kodowane



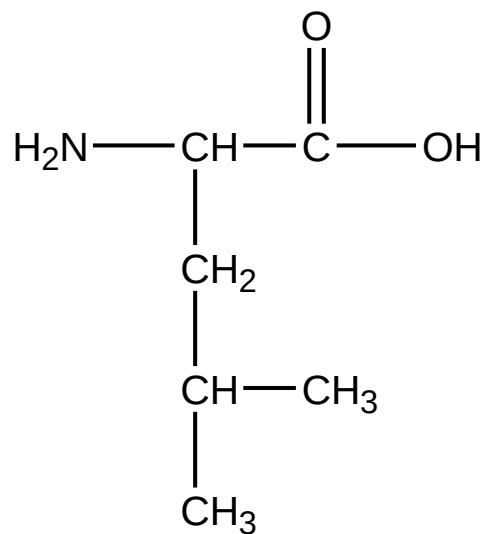
Gly, G



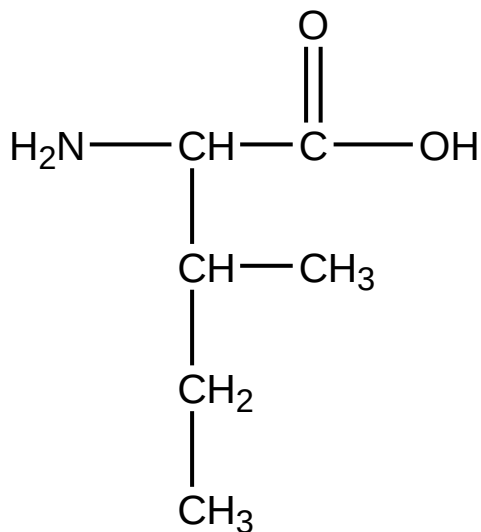
Ala, A



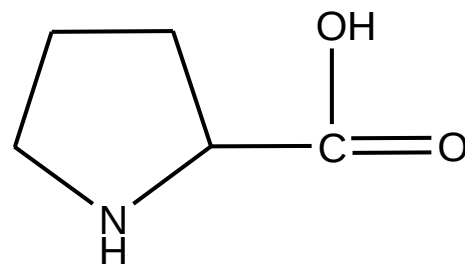
Val, V



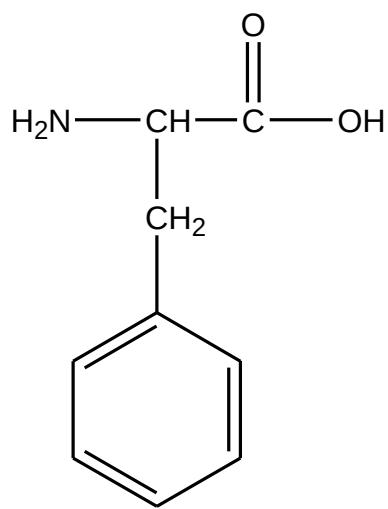
Leu, L



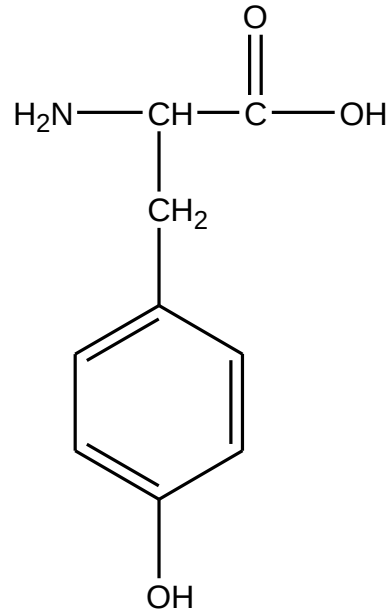
Ile, I



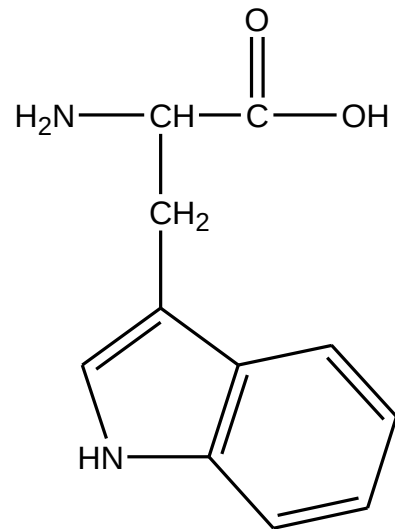
Pro, P



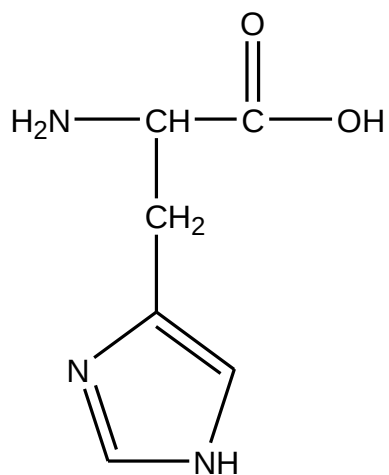
Phe, F



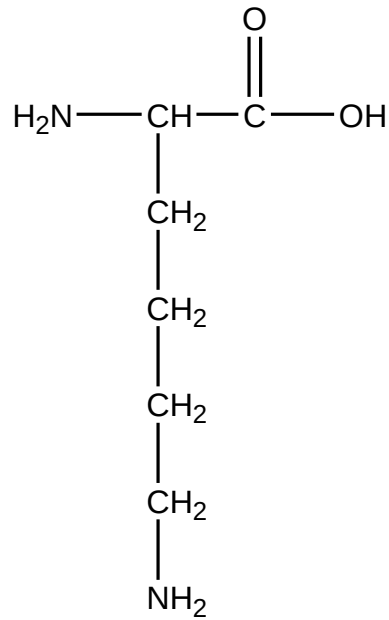
Tyr, Y



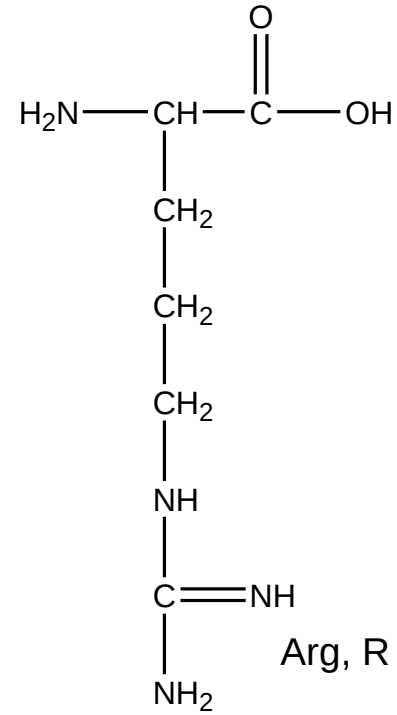
Trp, W



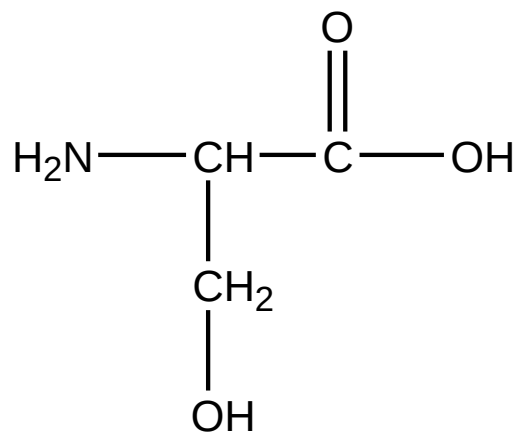
His, H



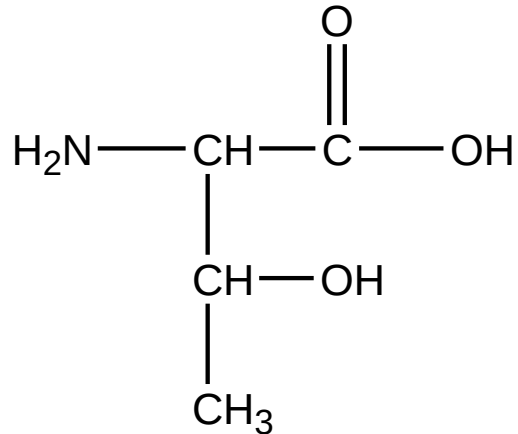
Lys, K



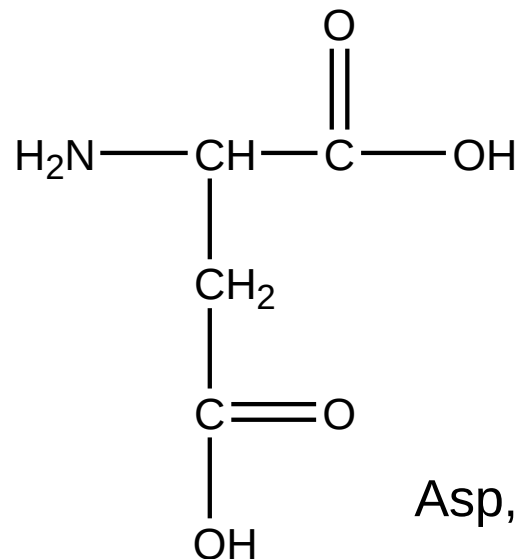
Arg, R



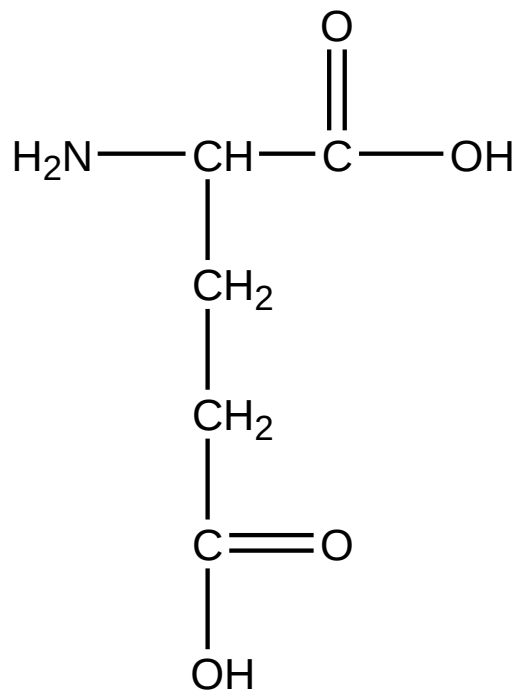
Ser, s



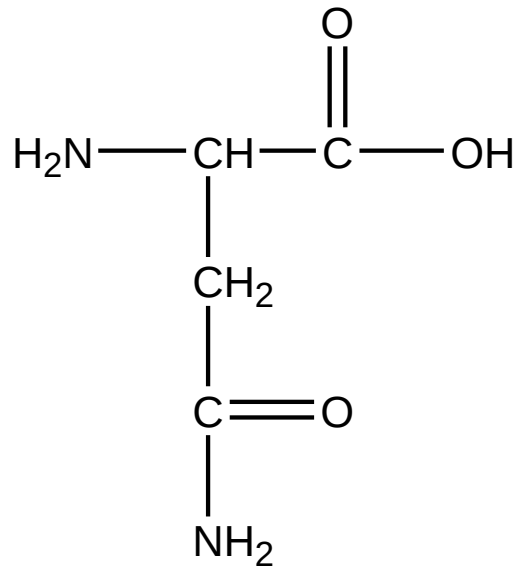
Thr, T



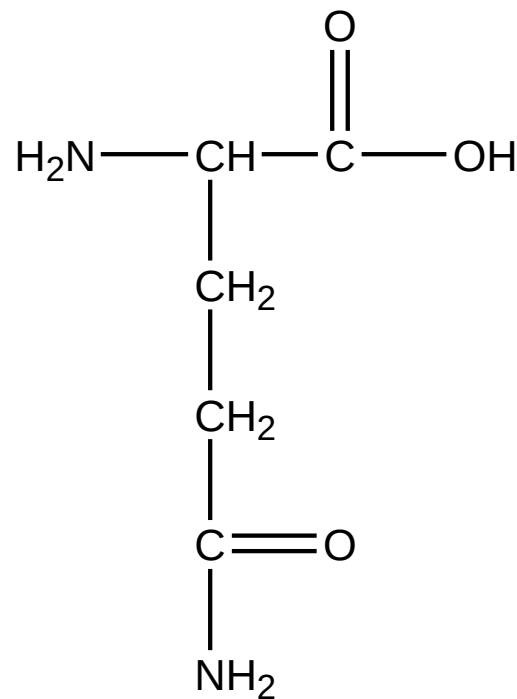
Asp, D



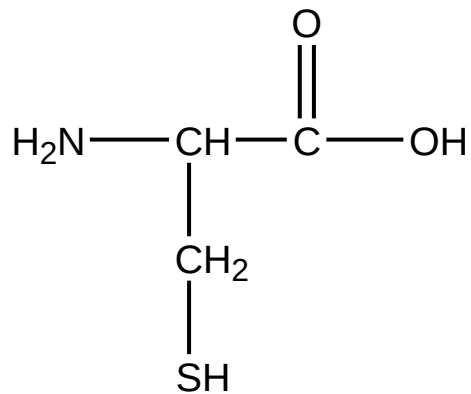
Glu, E



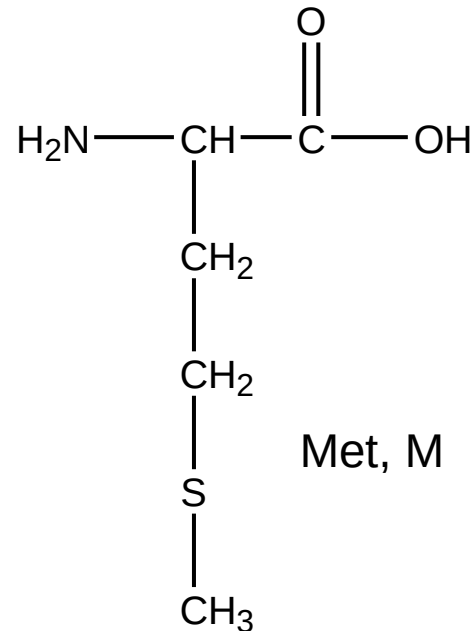
Asn, N



Gln, Q

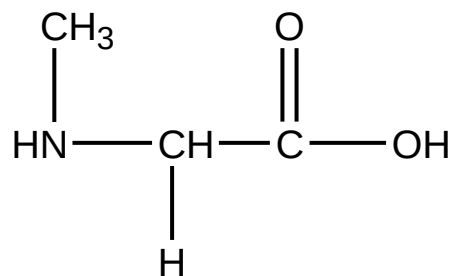


Cys, C

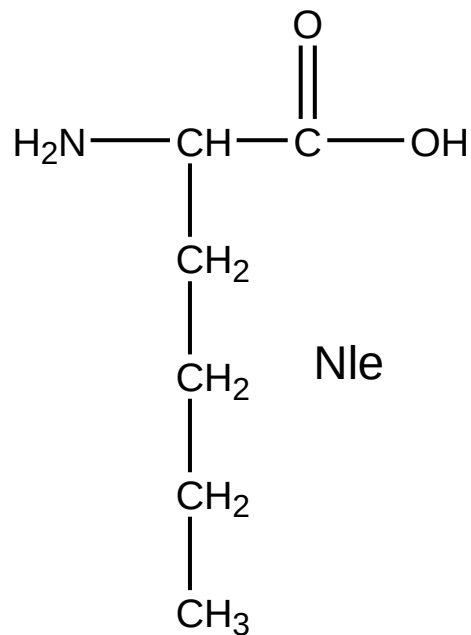


Met, M

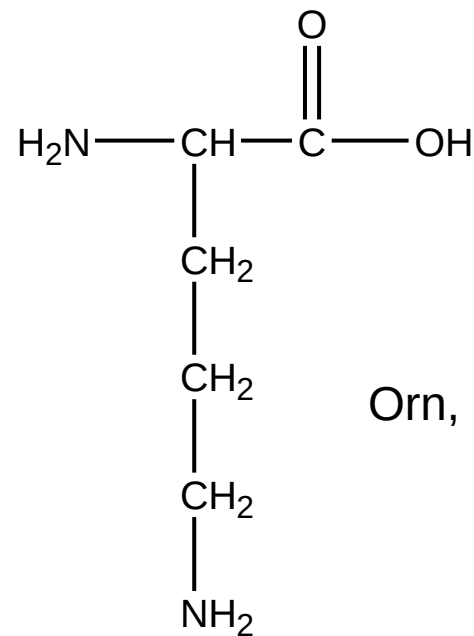
Częściej spotykane aminokwasy niebiałkowe:



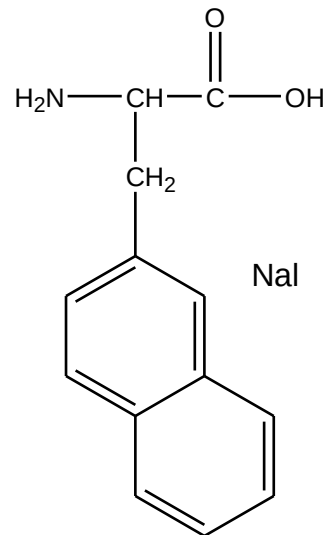
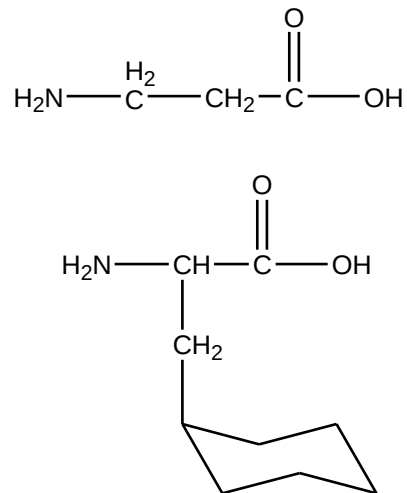
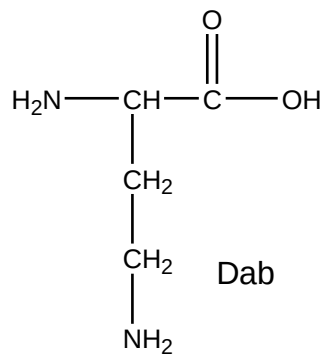
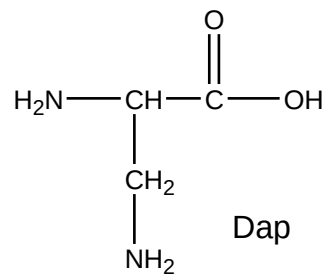
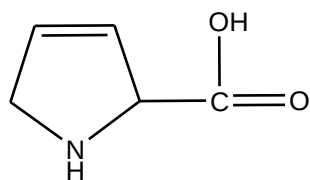
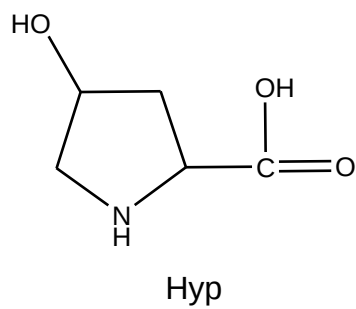
Sar



Nle



Orn, O



Metody pozyskiwania peptydów:

- ekstrakcja ze źródeł naturalnych;
- rekombinacja;
- semisynteza;
- synteza enzymatyczna;
- **synteza chemiczna.**

Zalety chemicznej syntezy peptydów:

- możliwość wprowadzenia reszt aminokwasów niekodowanych, z nietypowymi łańcuchami bocznymi;
- możliwość modyfikacji szkieletu peptydowego (np. wprowadzenie mimetyków wiązania peptydowego, przeniesienie łańcucha bocznego z węgla α na atom azotu itp.)

Chemiczna synteza peptydów

```
graph TD; A[Chemiczna synteza peptydów] --> B[Synteza w roztworze (metoda klasyczna)]; A --> C[Synteza na nośniku stałym (SPPS)];
```

Synteza w roztworze
(metoda klasyczna)

Synteza na nośniku stałym
(SPPS)

Peptyd	Ilość reszt aminokwasowych	Metoda
Oksytocyna	9	C
<u>Analogi wazopresyny:</u>		
Pitressin	9	C
Lypressin	9	C
Desmopressin	9	C, SPPS
Terlipressin	12	C, SPPS
Atosiban	9	C
ACTH(1-24)	24	C
Insulina	51	E, S, R
Glukagon	29	E, SPPS, R
Sekretyna	27	E
<u>Kalcytoniny</u>		
ludzka	32	C
łososiowa	32	C, SPPS
węgorzowa	32	C, SPPS
Dicarba-węgorzowa (Elcatonin)	31	C, SPPS

C – metoda klasyczna; SPPS – synteza na nośniku stałym; E – ekstrakcja; S – semisynteza; R - rekombinacja

Peptyd	Ilość reszt aminokwasowych	Metoda
LH-RH <u>i analogi:</u>	10	C, SPPS
Leuprolide	9	C
Deslorelin	9	SPPS
Triptolerin	10	SPPS
Goserelin	10	SPPS
Buserelin	9	SPPS
PTH(1-34) (hormon paratyroidowy)	34	SPPS
<u>Czynnik uwalniający kortykotropinę:</u>		
ludzki	41	SPPS
owczy	41	SPPS
GRF(1-29)	29	SPPS
Somatostatyna <u>i analogi:</u>	14	C, SPPS
Lanreotide	8	SPPS
Octreotide	8	C

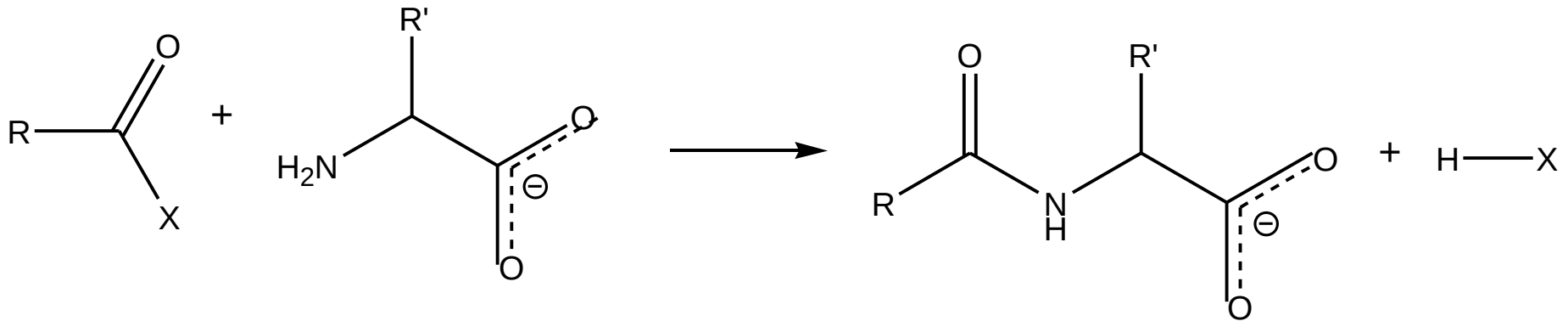
Peptyd	Ilość reszt aminokwasowych	Metoda
TRH	3	C
Thymosin α -1	28	SPPS
Thymopoetin (TP-5)	5	C
Cyclosporin	11	E
Integrilin	7	C

Etapy syntezy peptydu

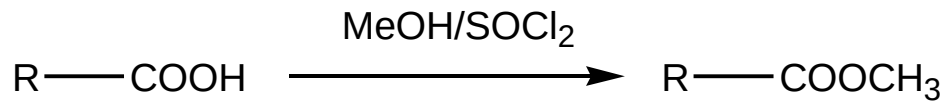
1. Dobór grup osłonowych i ich wprowadzenie na grupy funkcyjne aminokwasów:
 - osłona grupy karboksylowej składnika C-końcowego;
 - osłona grupy α -aminowej składnika N-końcowego;
 - osłona grup funkcyjnych łańcuchów bocznych.
2. Tworzenie wiązania peptydowego – aktywacja i sprzęganie.
3. Wyodrębnianie uzyskanego produktu (i ewentualnie jego oczyszczanie).
4. Usunięcie osłony z N- (najczęściej) lub C-końca uzyskanego produktu.
5. Przedłużanie łańcucha peptydowego o kolejną resztę aminokwasową lub fragment syntezowanej sekwencji, izolacja i ewentualne oczyszczanie produktu
6. Powtarzanie czynności z pkt. 4 i 5, aż do uzyskania pełnej sekwencji.
7. Usunięcie osłon, ewentualne tworzenie mostków disulfidowych i oczyszczanie produktu końcowego

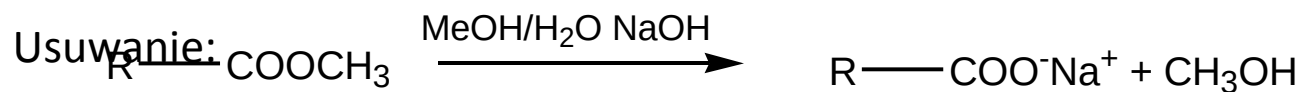
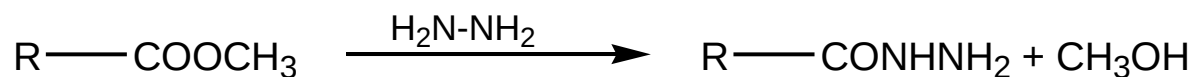
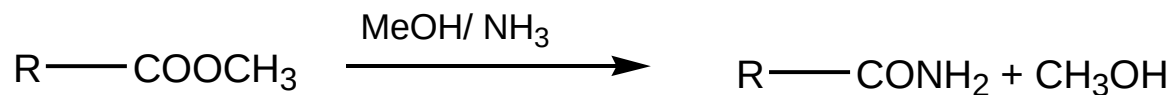
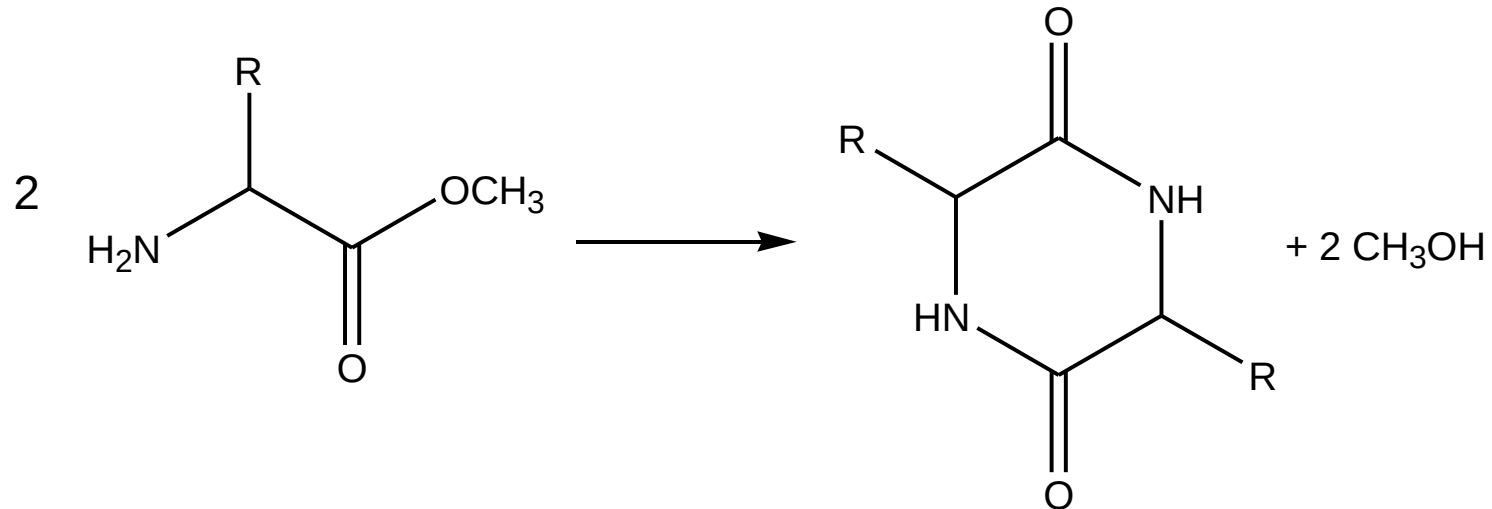
Ośłony grupy karboksylowej

Ośłona przez tworzenie soli:



Estry metylowe (-OMe):



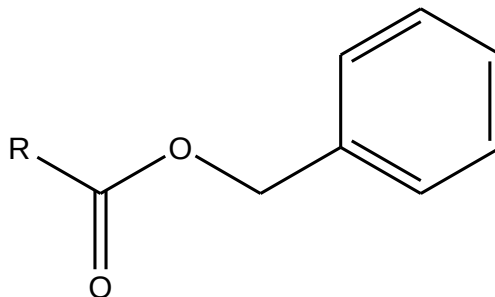


Uwaga:

w trakcie usuwania estrów metylowych przez hydrolizę może zachodzić racemizacja niektórych reszt aminokwasowych (C-terminalna Cys) oraz częściowy rozkład peptydów zawierających resztę seryny.

Estry benzyłowe i pochodne

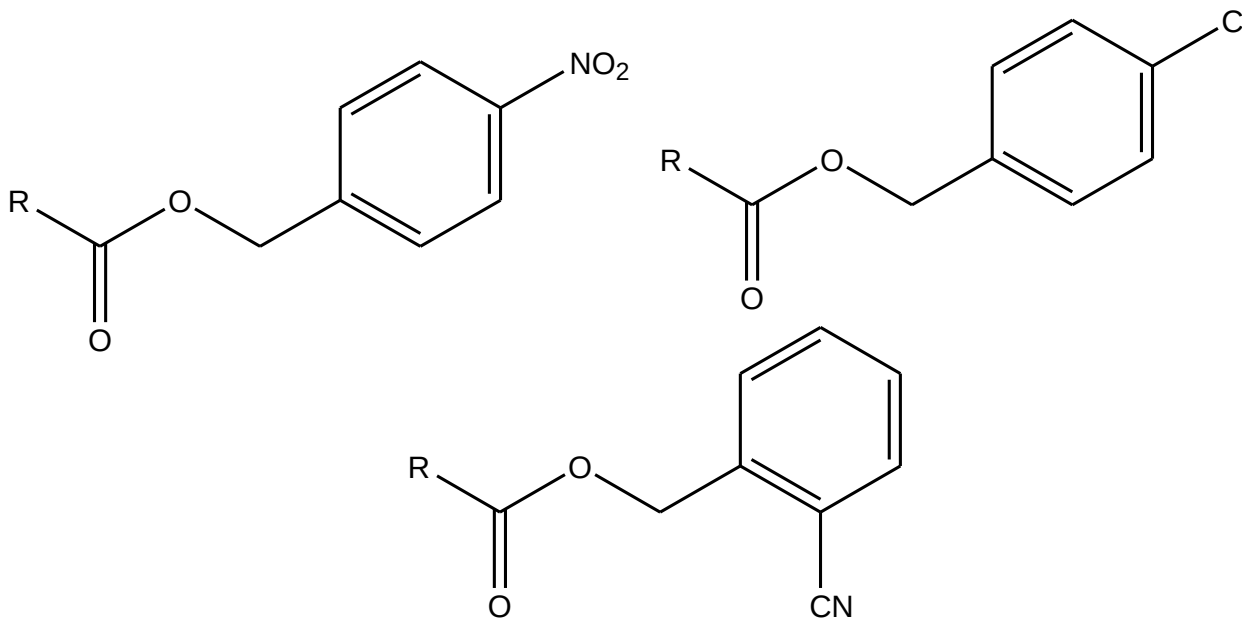
Estry benzyłowe (OBzl)



Usuwanie:

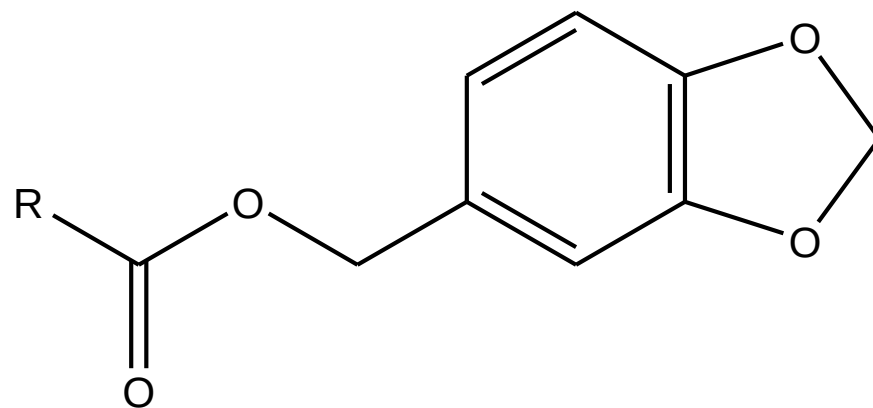
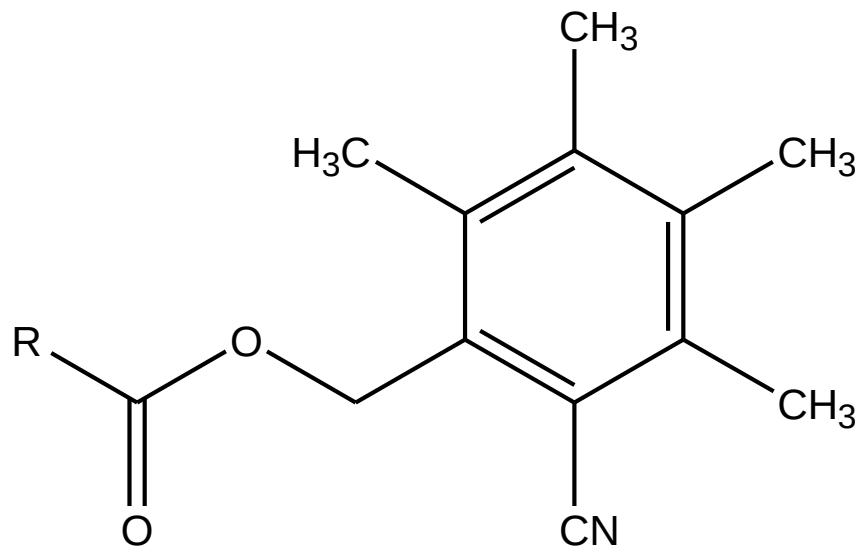
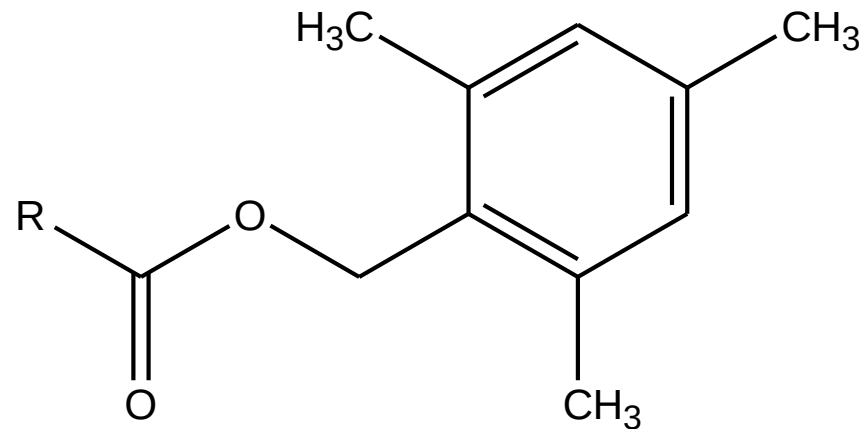
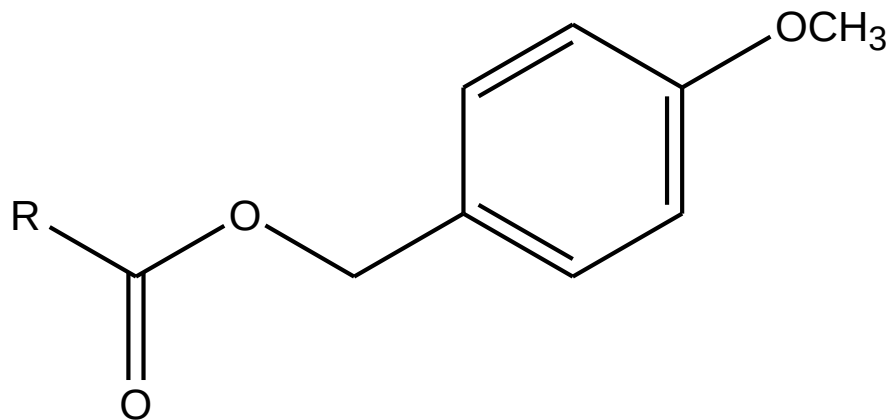
- acydoliza (HBr/AcOH, ciekły HF, TFMSA) - tworzenie kationu benzyłowego;
- redukcja sodem w ciekłym amoniaku, katalityczna wodoroliza

Estry typu benzyłowego bardziej stabilne w środowisku kwaśnym

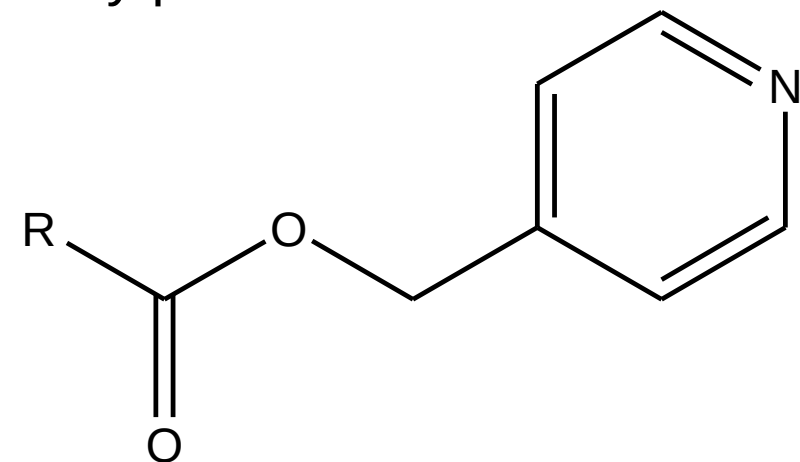


-usuwane głównie metodami redukcyjnymi

Estry typu benzyłowego bardziej podatne na acydolizę

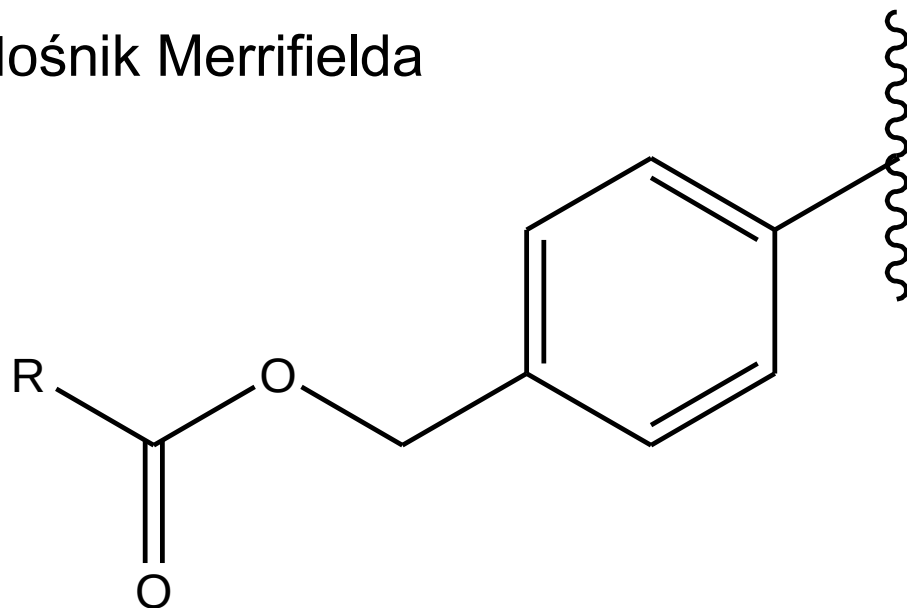


Estry pikolilowe:



- Stabilne w środowisku kwaśnym;
- Ze względu na zasadowy charakter pierścienia pirydynowego, mogą być oczyszczane za pomocą chromatografii jonowymiennej;
- Usuwane metodami redukcyjnymi.

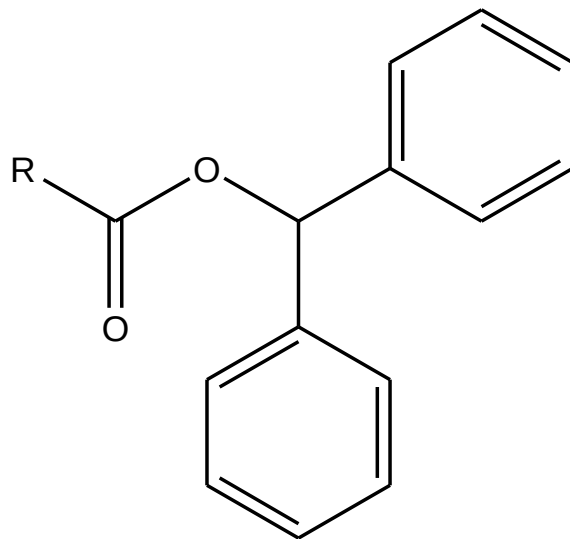
Nośnik Merrifielda



Usuwanie (odszczepianie peptydu od nośnika):

- amonoliza, hydrazynoliza, transestryfikacja;
- ciekły HF, TFMSA, HBr/TFA

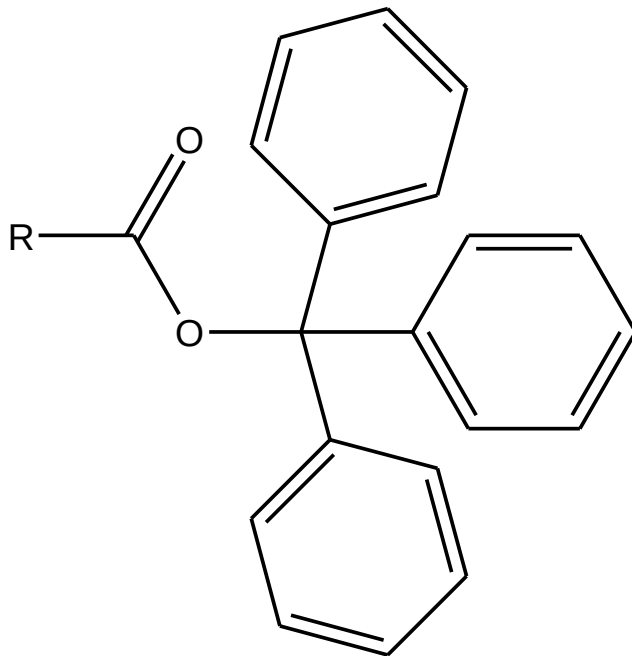
Estry benzhydrylowe



Odszczepianie:

- TFA w temperaturze pokojowej;
- wodoroliza, inne metody redukcyjne.

Estry tritylowe (Trt)



Wprowadzanie:

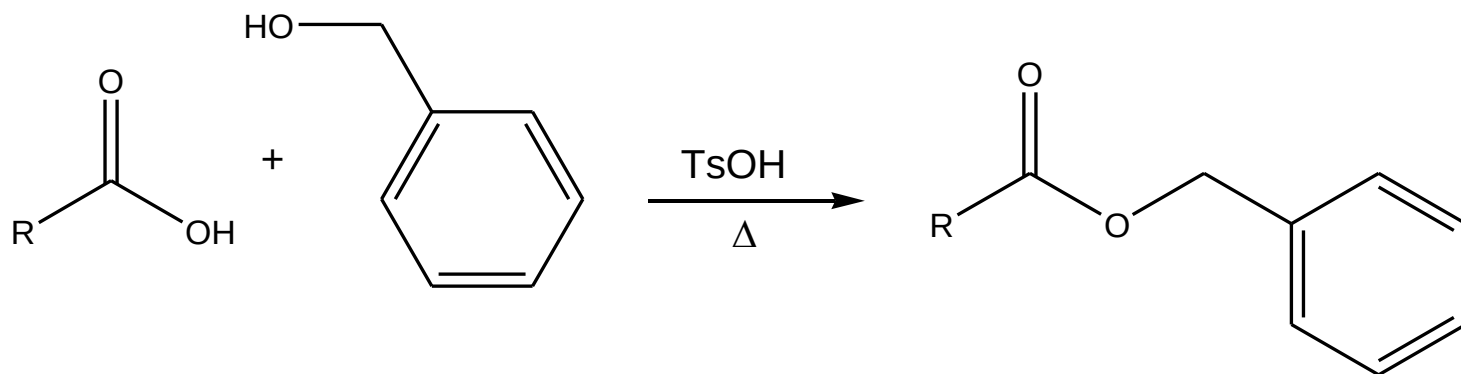
- działanie chlorkiem trifenylometylu (tritylu) na sole kwasów karboksylowych

Usuwanie:

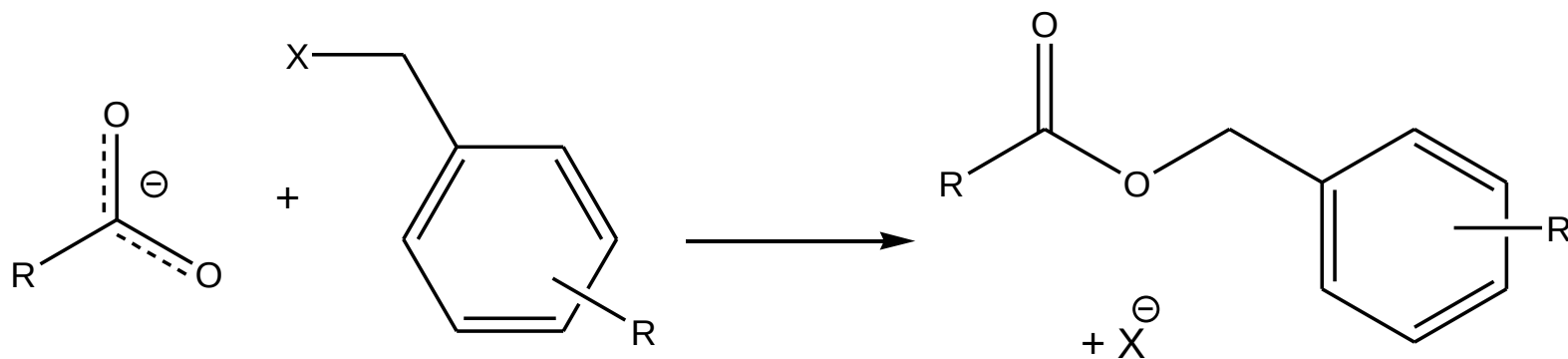
- działanie rozcieńczonymi lub słabymi kwasami np. :
1% TFA/CH₂Cl₂, AcOH itp.

Otrzymywanie estrów typu benzyłowego

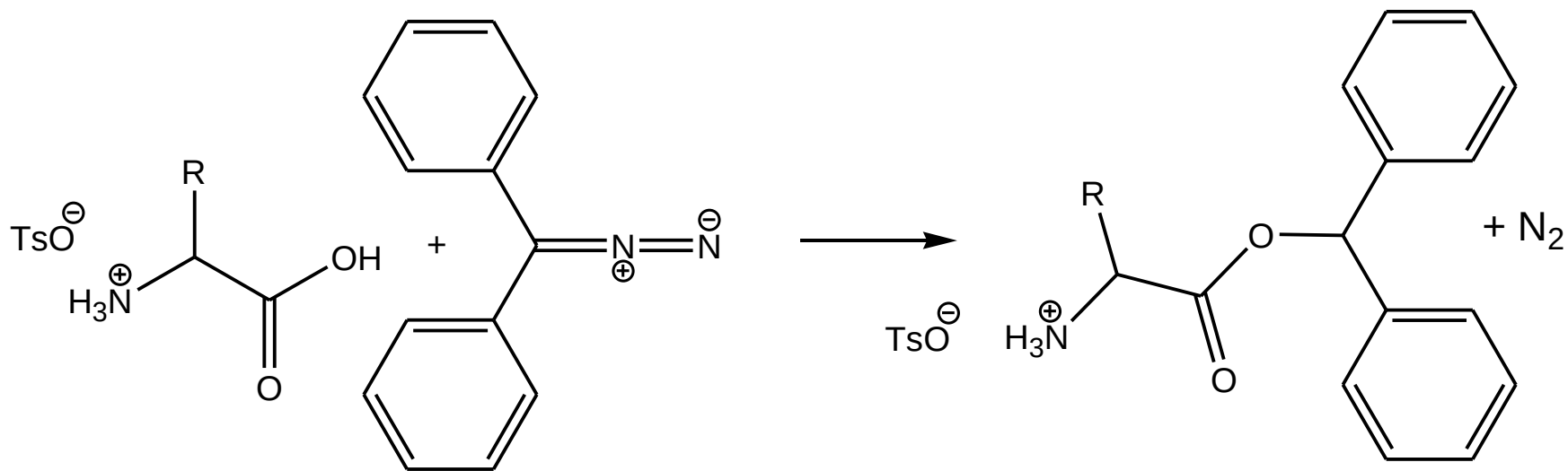
Bezpośrednia estryfikacja w środowisku kwaśnym:



Reakcje substytucji nukleofilowej:



Estry benzhydrylowe - reakcja z difenyldiazometanem:



-estryfikacja z użyciem alkoholu, DMAP i odczynnika aktywującego, np. DCC

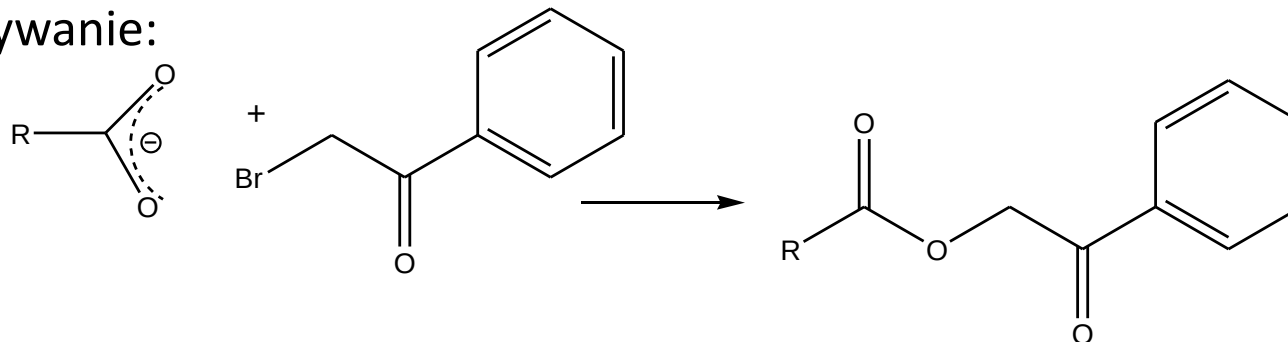
Inne metody usuwania:

-zmydlanie;

-transestryfikacja z użyciem dimetyloaminoetanolu, a następnie hydroliza.

Estry fenacylowe (Pa, Pac)

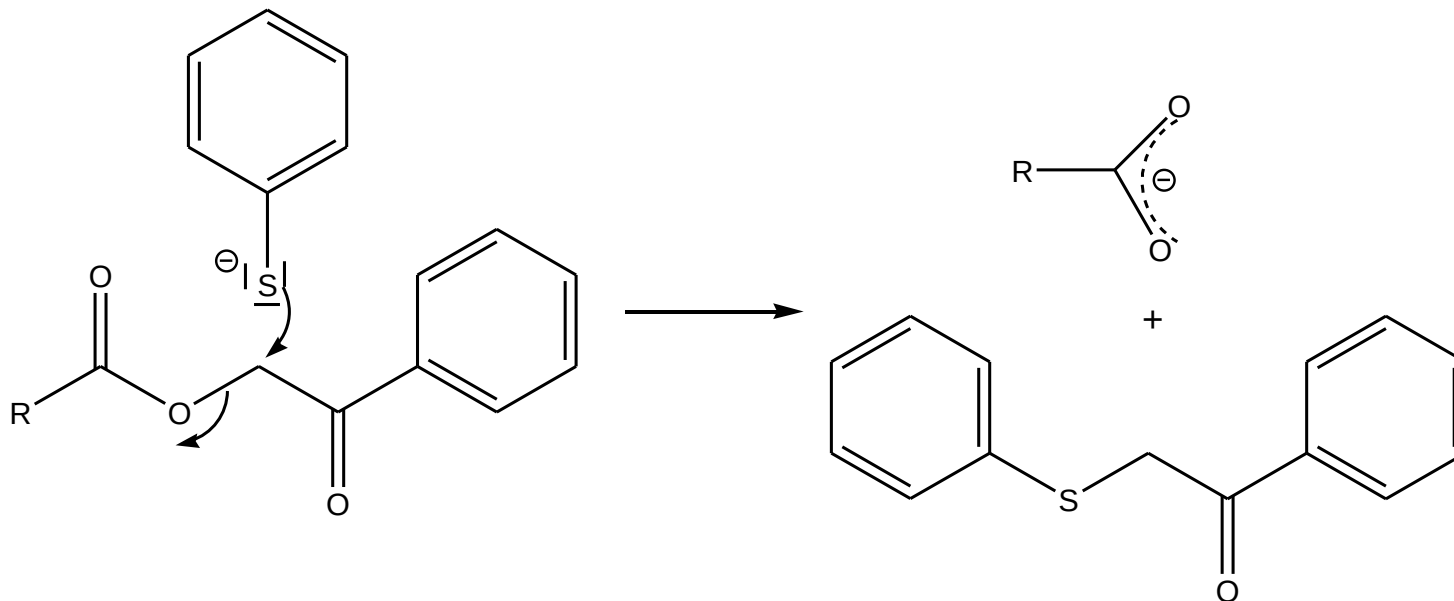
Otrzymywanie:



- Stabilne w środowisku kwaśnym, łącznie z ciekłym HF;

Usuwanie:

- działanie tiofenolanem sodowym:



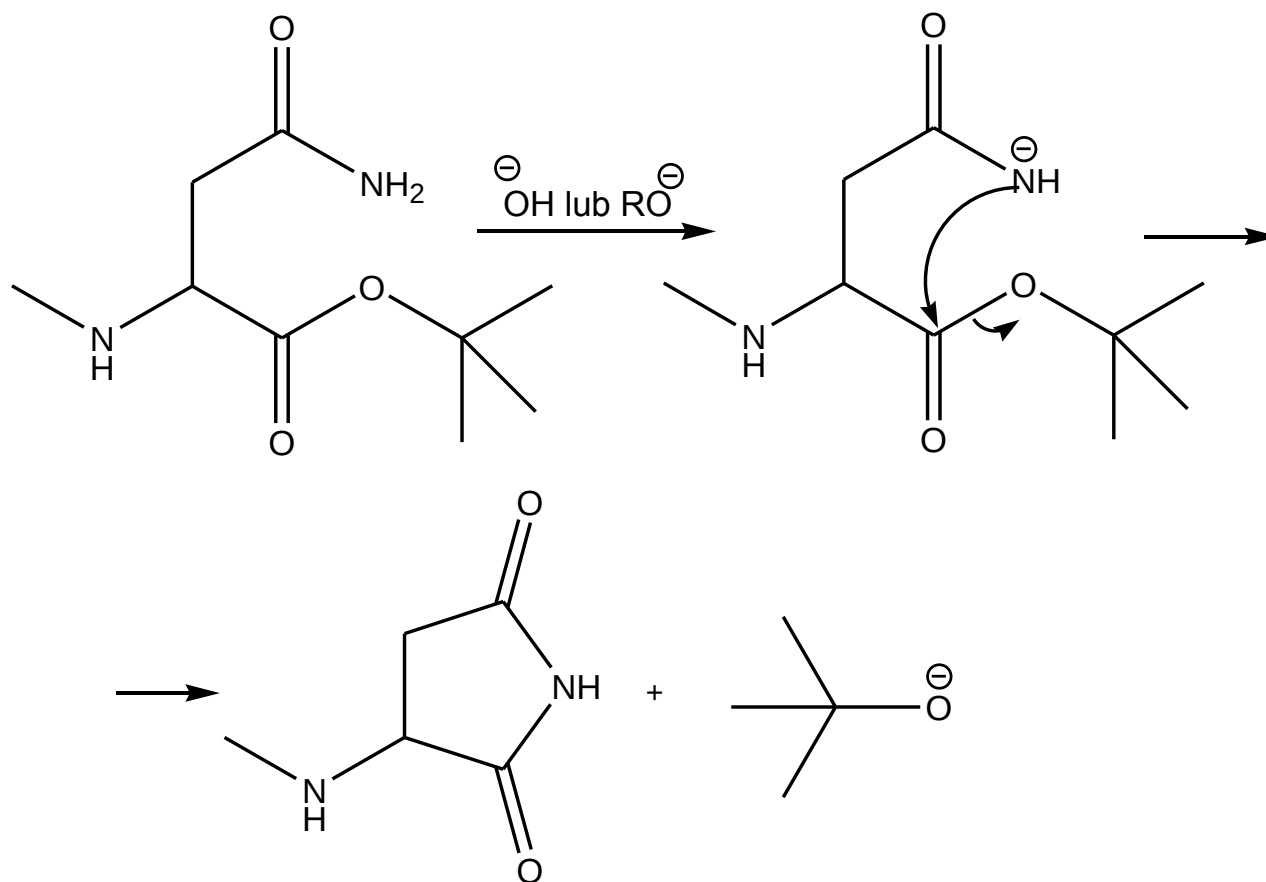
- Redukcja Zn/AcOH;
- Katalityczna wodoroliza – tylko częściowe usunięcie na skutek biegnącej konkurencyjnie redukcji grupy karbonylowej;
- Fotoliza.

reakcje uboczne związane z estrami fenacylowymi:

- łatwe tworzenie diketopiperazyn;
 - Tworzenie pochodnych sukcyimidu, jeżeli ester ten został użyty do osłony łańcucha bocznego reszty Asp;
 - Tworzenie reszty kwasu piroglutaminowego w przypadku osłony grupy karboksylowej reszty Glu
-
- Estrы 4-bromofenacylowe –łatwiej krystalizują od estrów fenacylowych. Bardziej podatne na atak nukleofilowy.
 - Estrы ftalimidometylowe – mniej reaktywne od fenacylowych

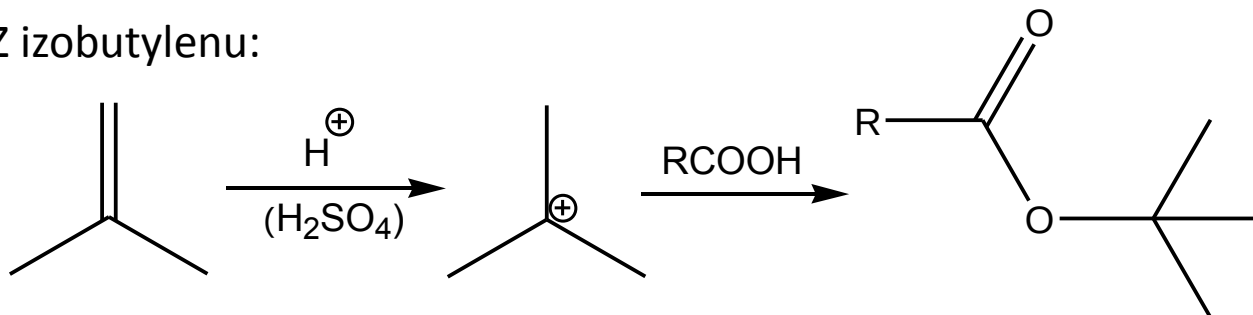
Estry *tert*-butylowe (Bu^t)

- Mało podatne na atak nukleofilowy. Mogą być np.. destylowane w stanie wolnym (z nieprotonowaną grupą aminową);
- Wykazują dużą odporność na działanie wodnych roztworów zasad (hydroliza możliwa jest w przypadku użycia KOH i eteru koronowego 18c6 w środowisku niewodnym).

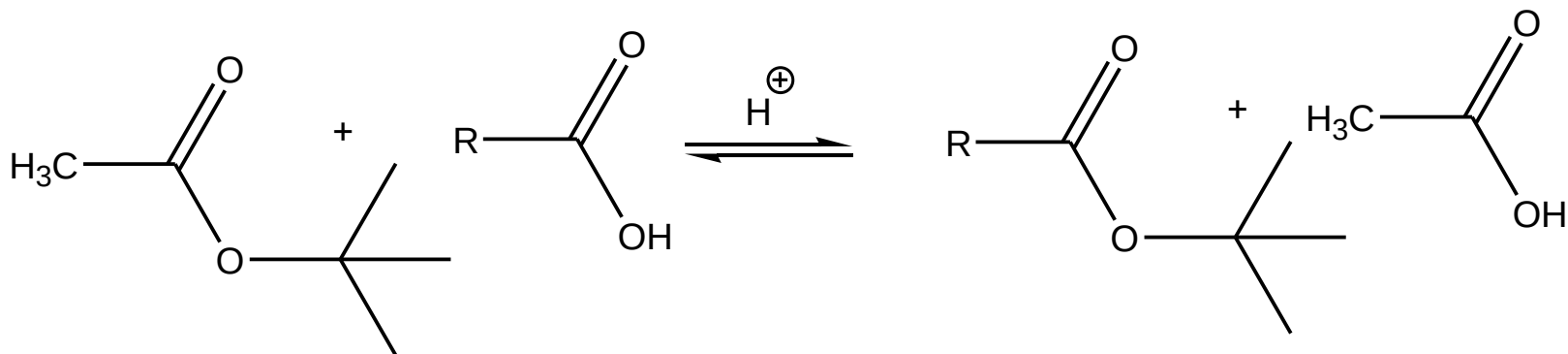


Otrzymywanie estrów *tert*-butylowych

Z izobutyleny:



Przez transestryfikację



- Z alkoholu *tert*-butylowego i aminokwasu w obecności POCl_3 ;
- Z alkoholu *tert*-butylowego, przy zastosowaniu DMAP i odczynnika aktywującego (np. DCC)

Usuwanie estrów *tert*-butylowych

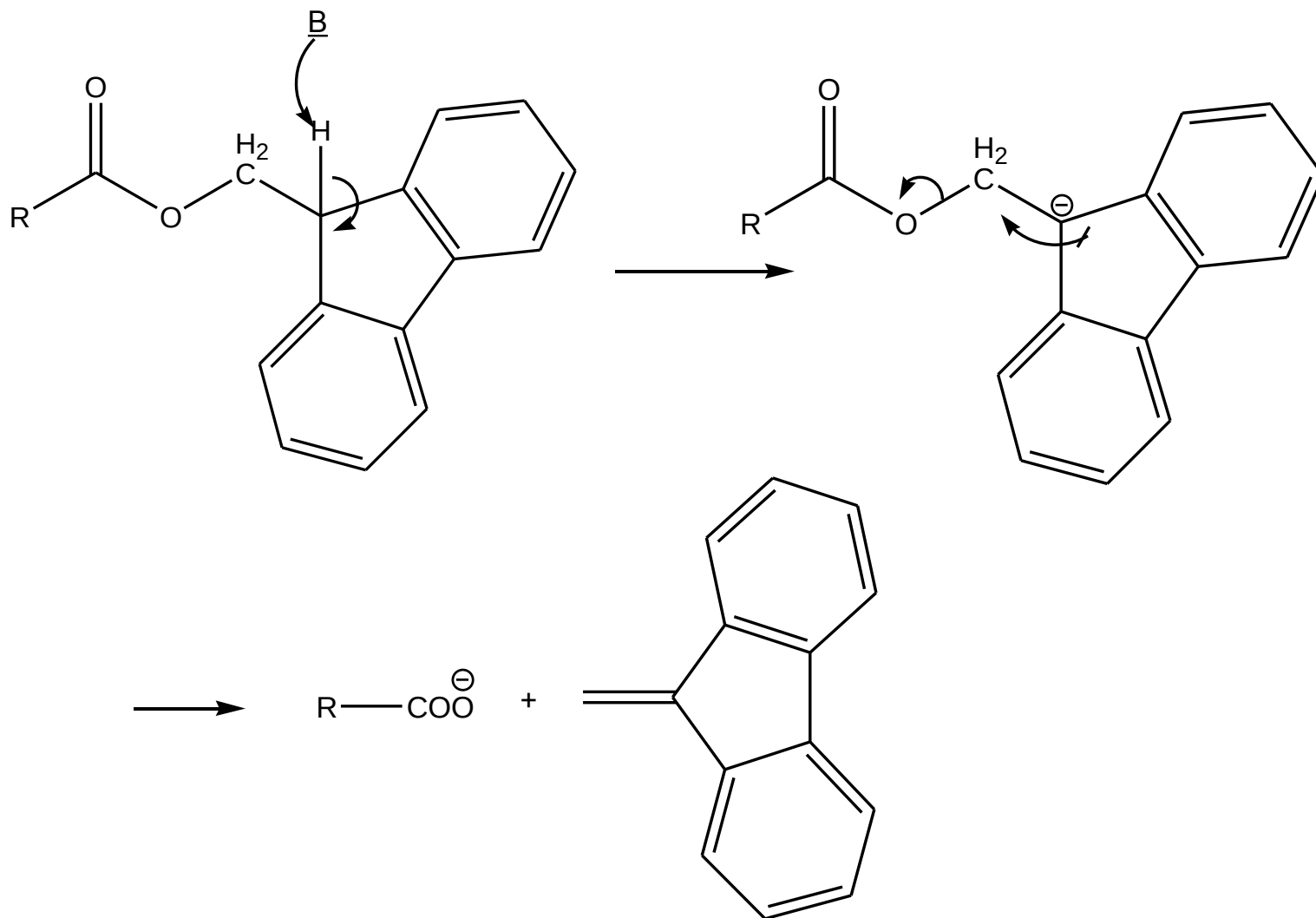
Acydoliza:

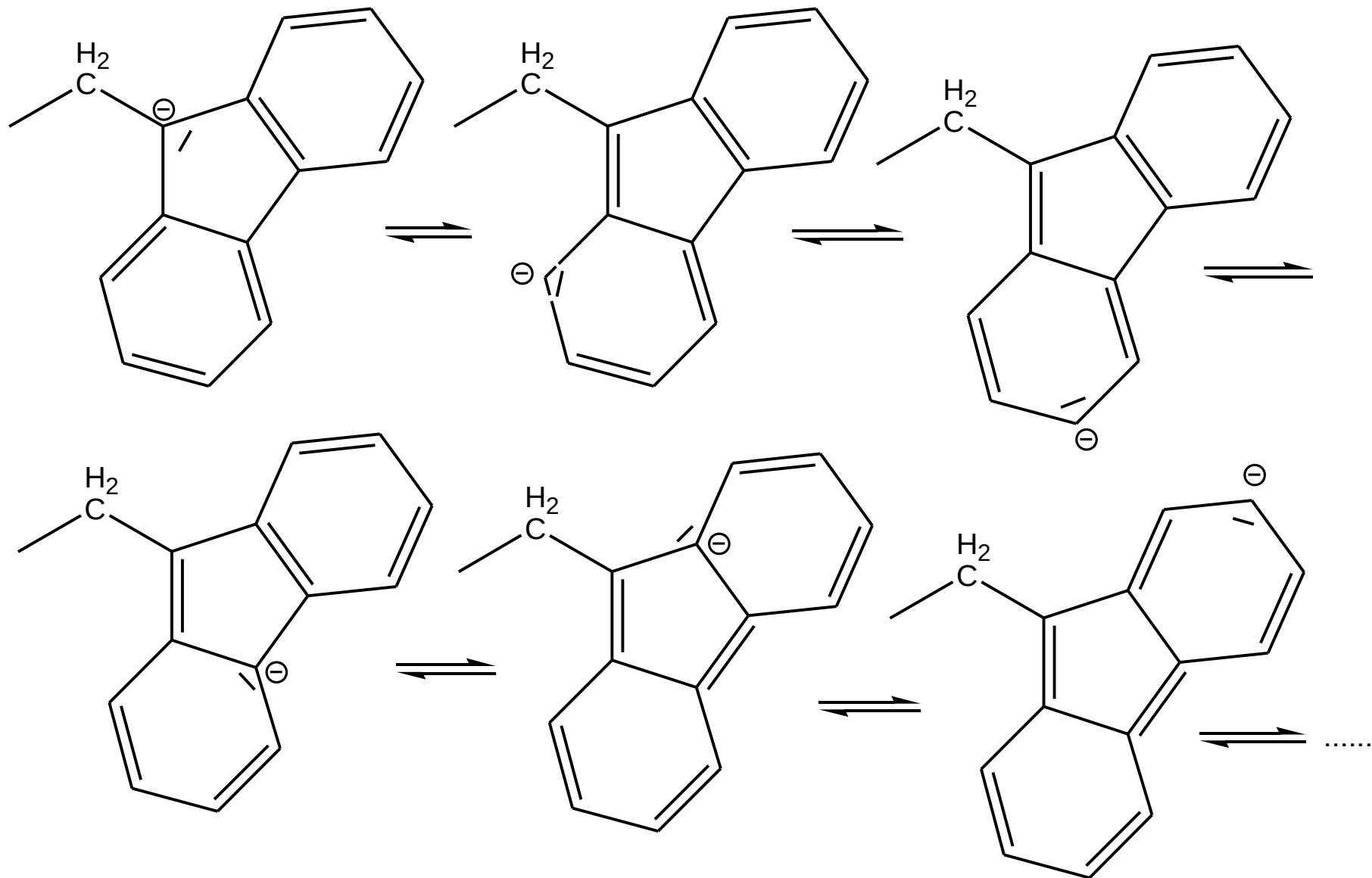
- działanie 1,3N HCl/AcOH, 4N HCl/dioksan, roztwory kwasu siarkowego w dioksanie, TFA, (w tym roztwory powyżej 40% obj. w chlorku metylenu), TFMSA, HBr/AcOH, HBr/TFA, TFMSA, ciekły HF itp.

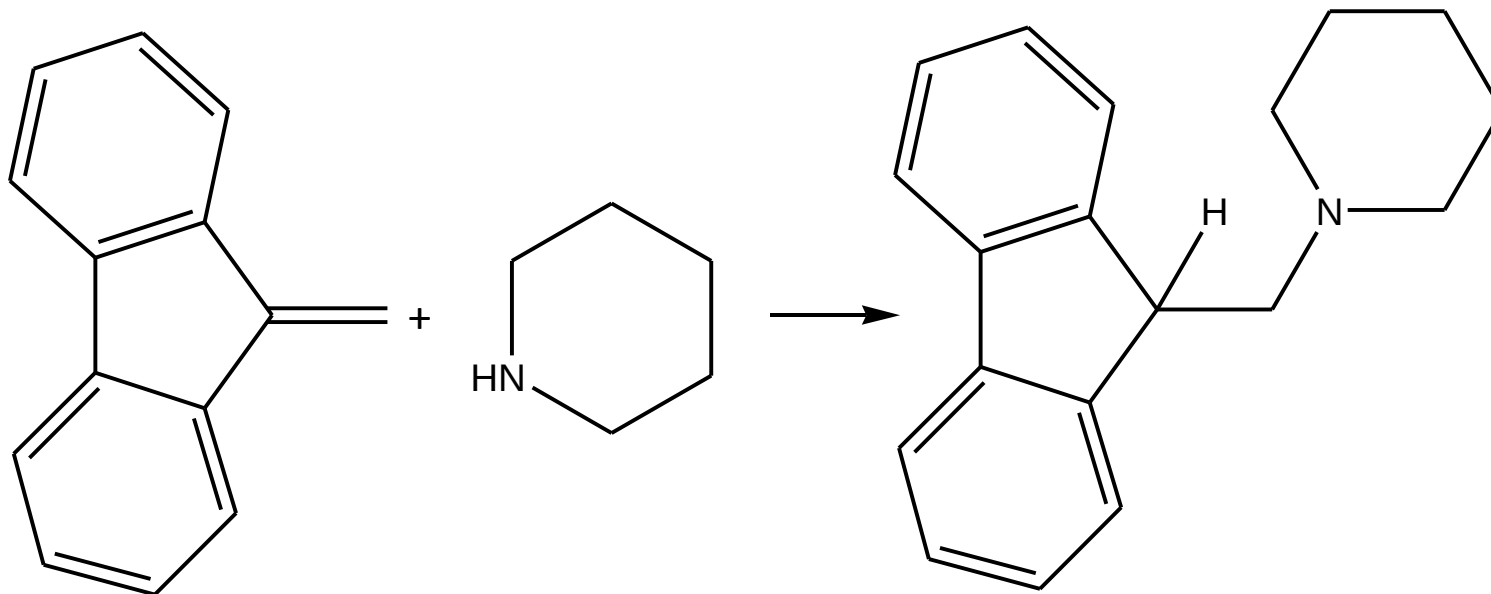
Uwaga:

Podobnie jak w przypadku usuwania estrów typu benzyłowego, podczas acydolizy estrów *tert*-butylowych powstają stosunkowo trwałe karbokationy, mogące reagować z grupami funkcyjnymi wrażliwych aminokwasów (Tyr, Trp, Met, Cys).

Estry fluorenylometylowe (FI)



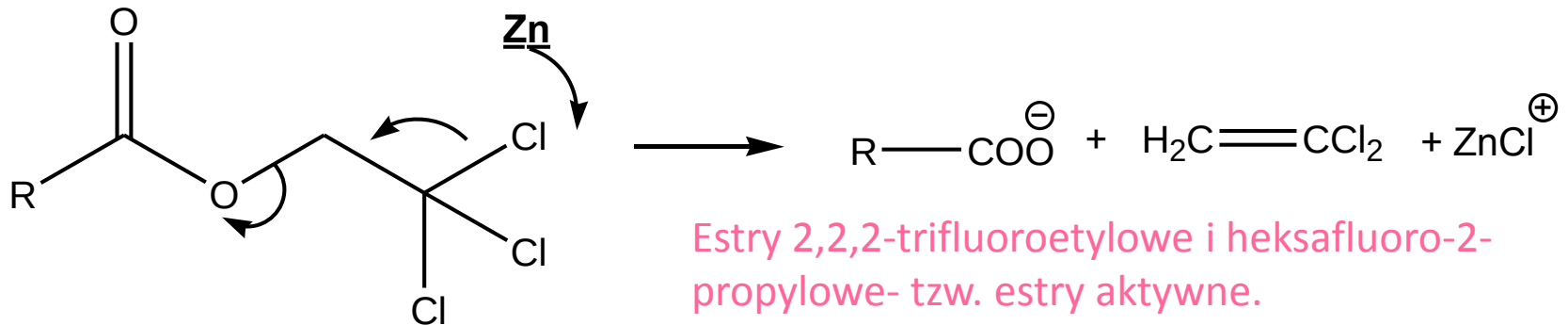




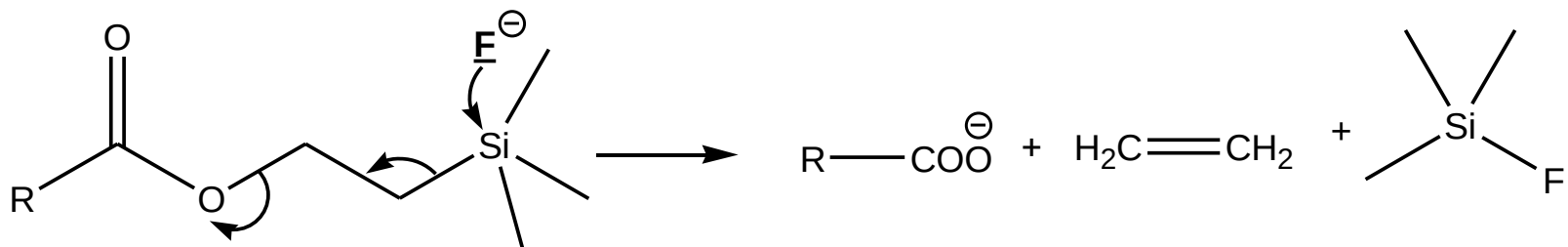
Do usuwania najczęściej używane są „miękkie” zasady, takie jak piperydyna, pirolidyna, DBU itp. Estry te mogą być rozszczepiane przez silne zasady, takie jak KOH itp.

Inne estry odszczepiane przez β -eliminację

Estry 2,2,2-trichloroetylowe:

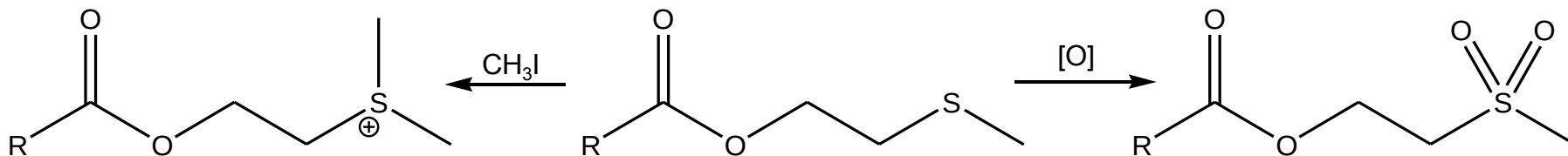


Estry 2-trimetylosililoetylowe:



Usuwane najczęściej roztworem fluorku tetrabutylamonowego w DMF

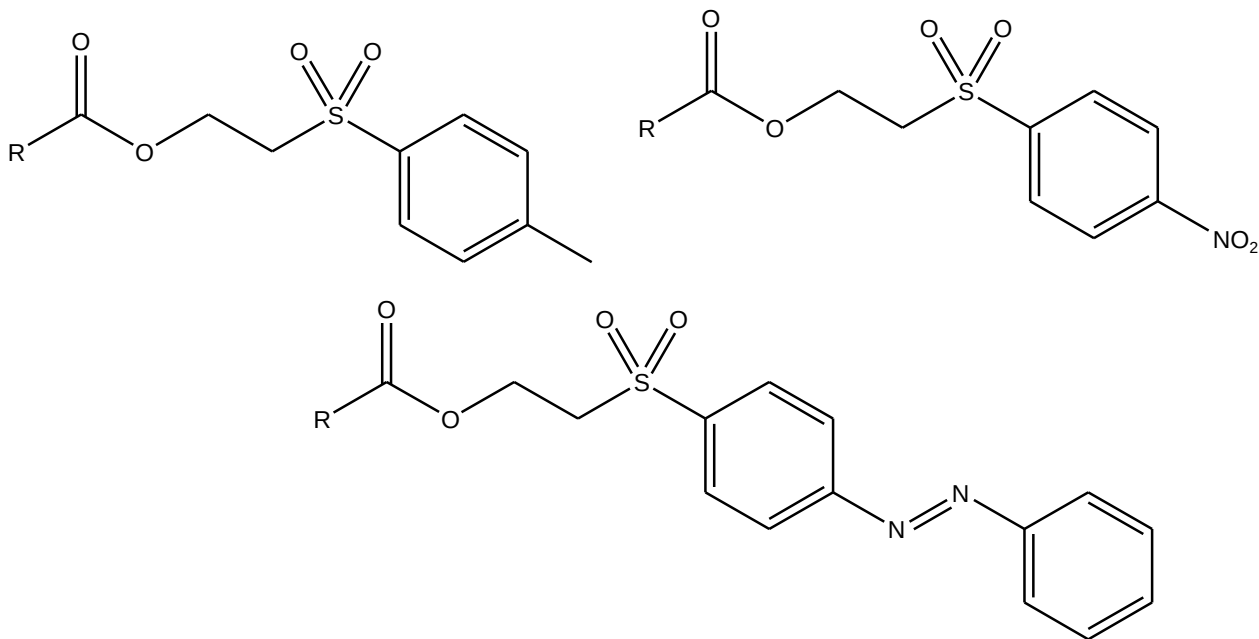
Estry 2-metylotioetylowe

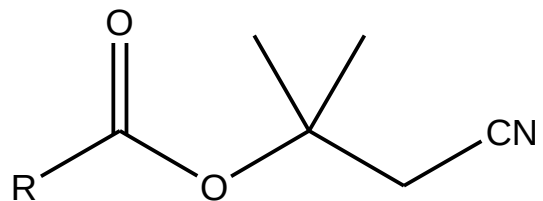
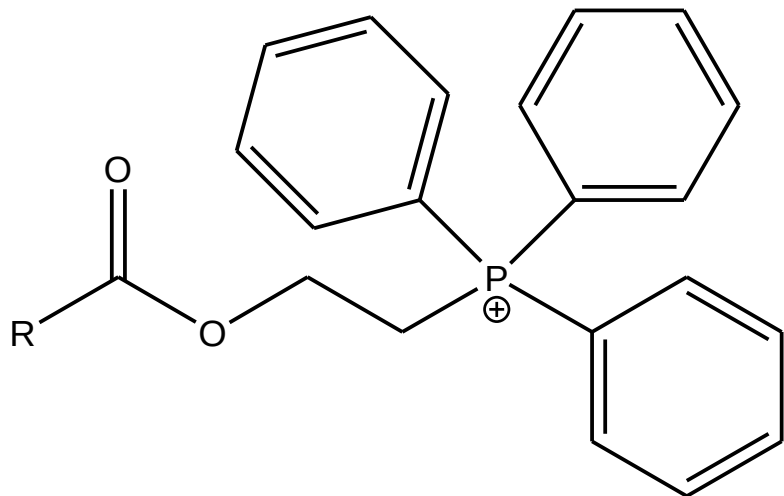


Usuwanie:

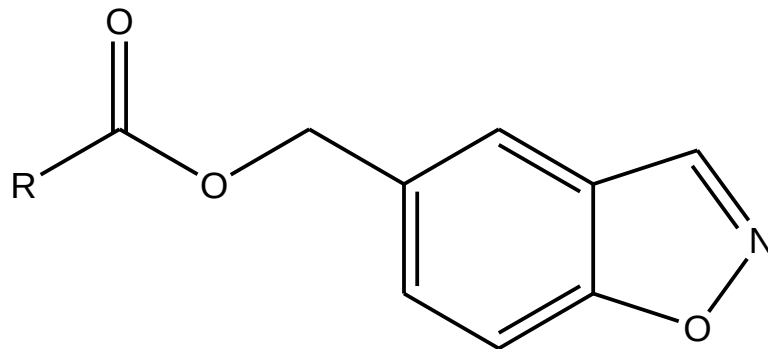
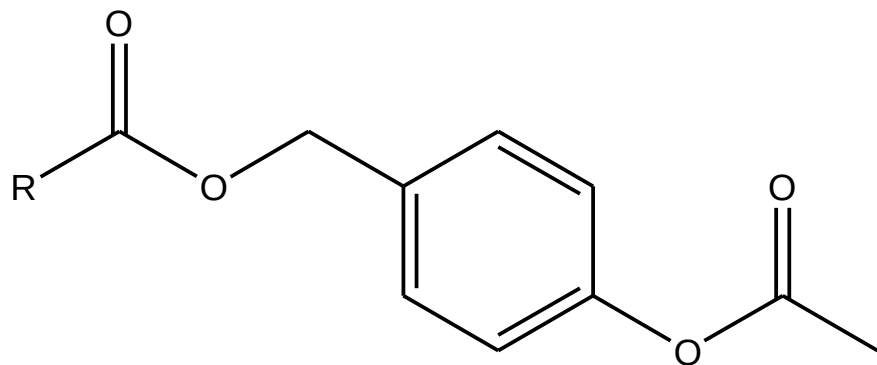
β-eliminacja w środowisku zasadowym, po uprzednim zalkilowaniu lub utlenieniu atomu siarki

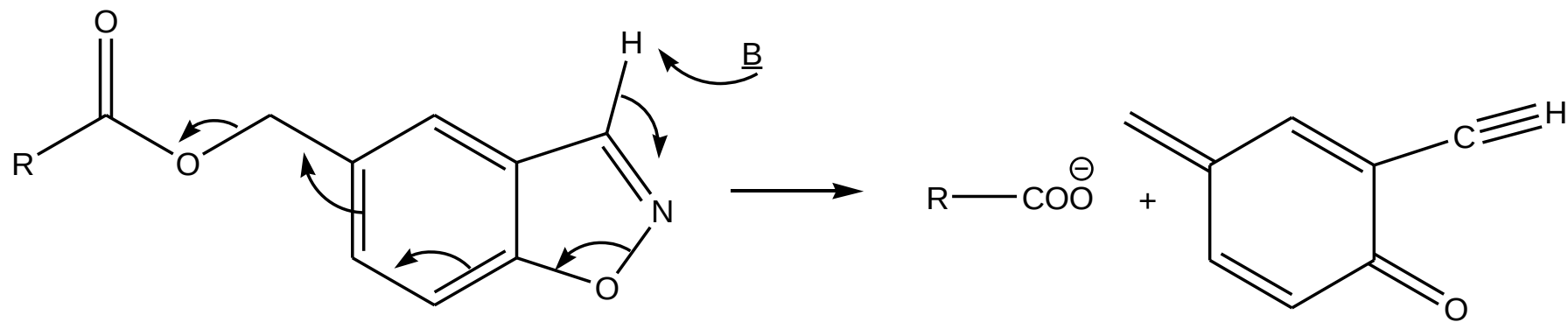
Inne estry tego typu



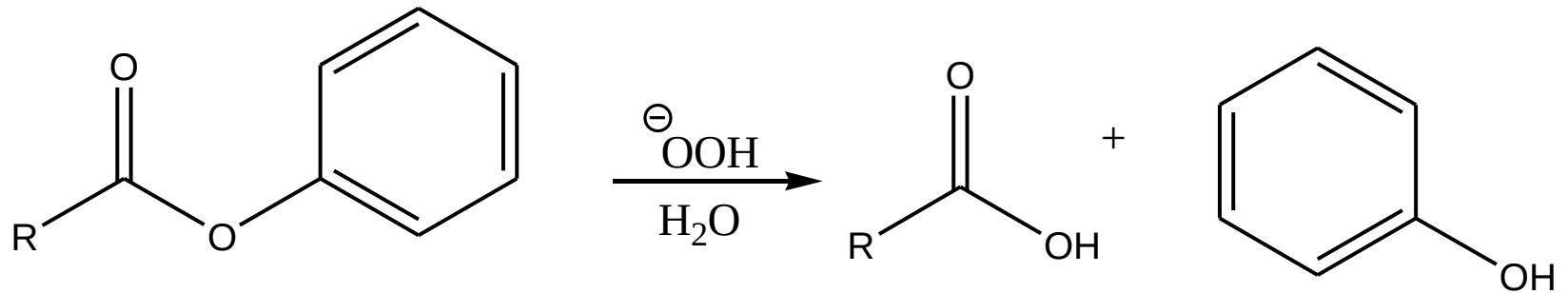


Estry typu benzylowego, odszczepiane przez eliminację:

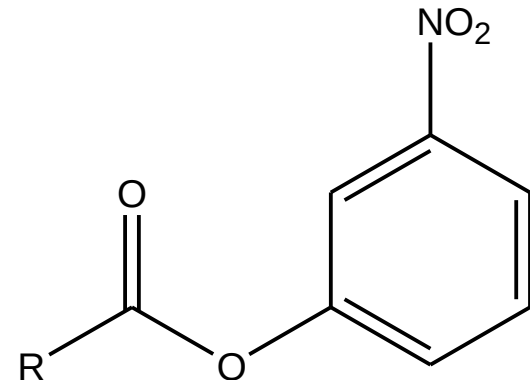
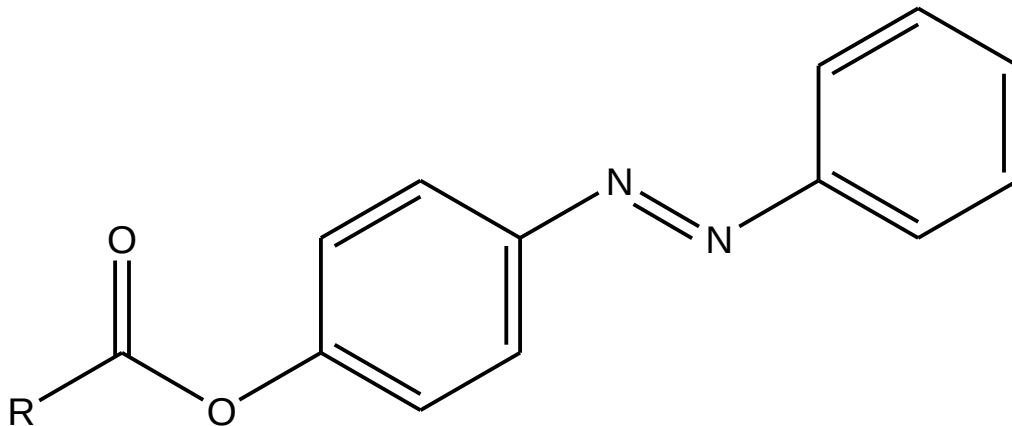


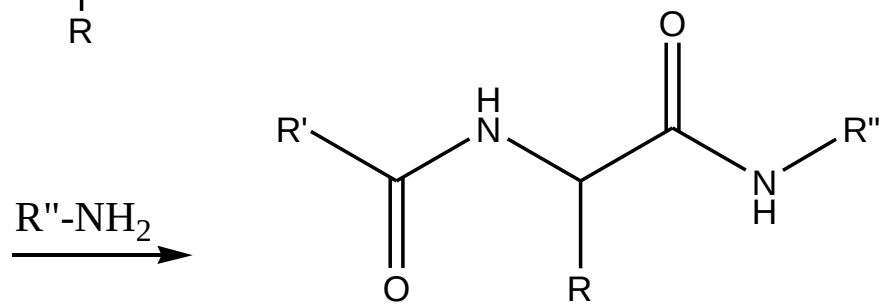
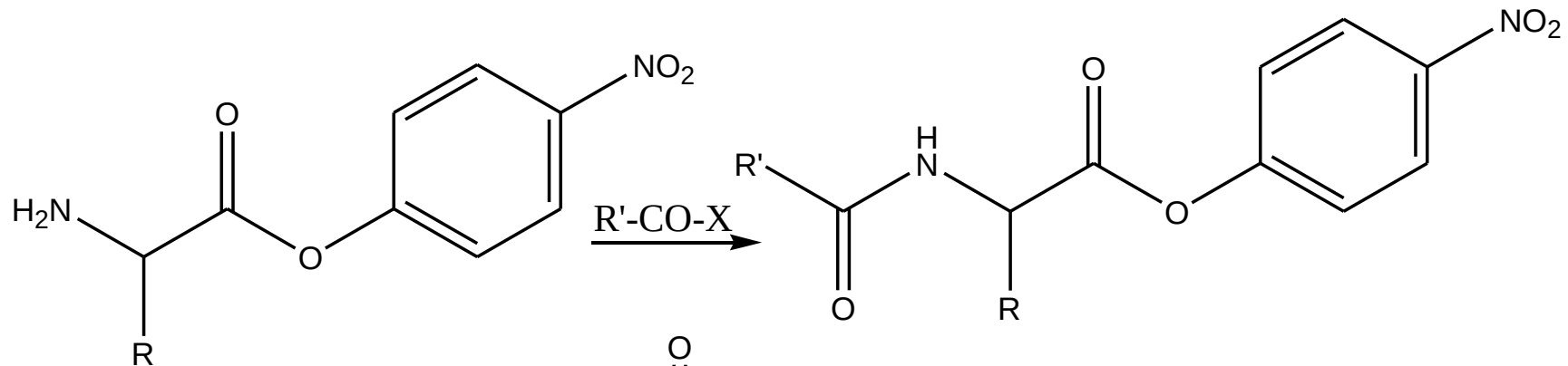
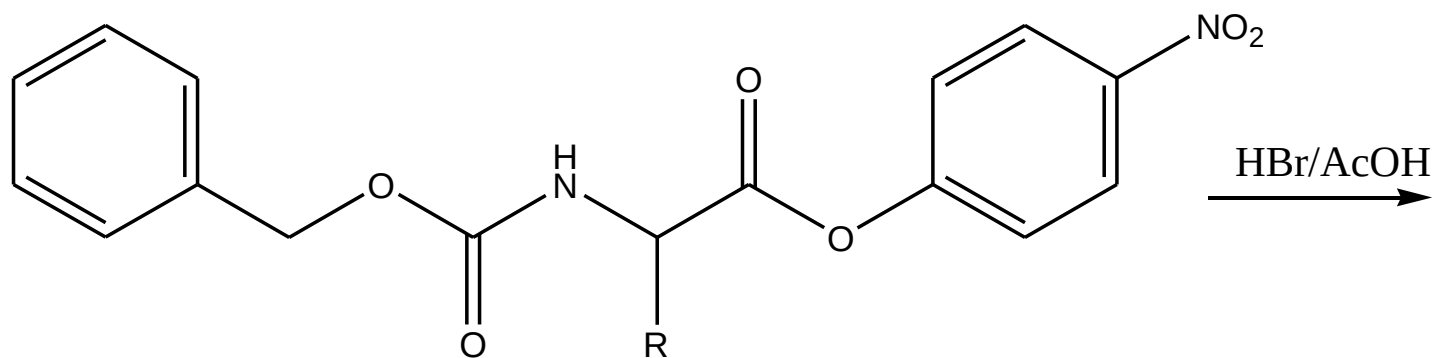


Estry arylowe

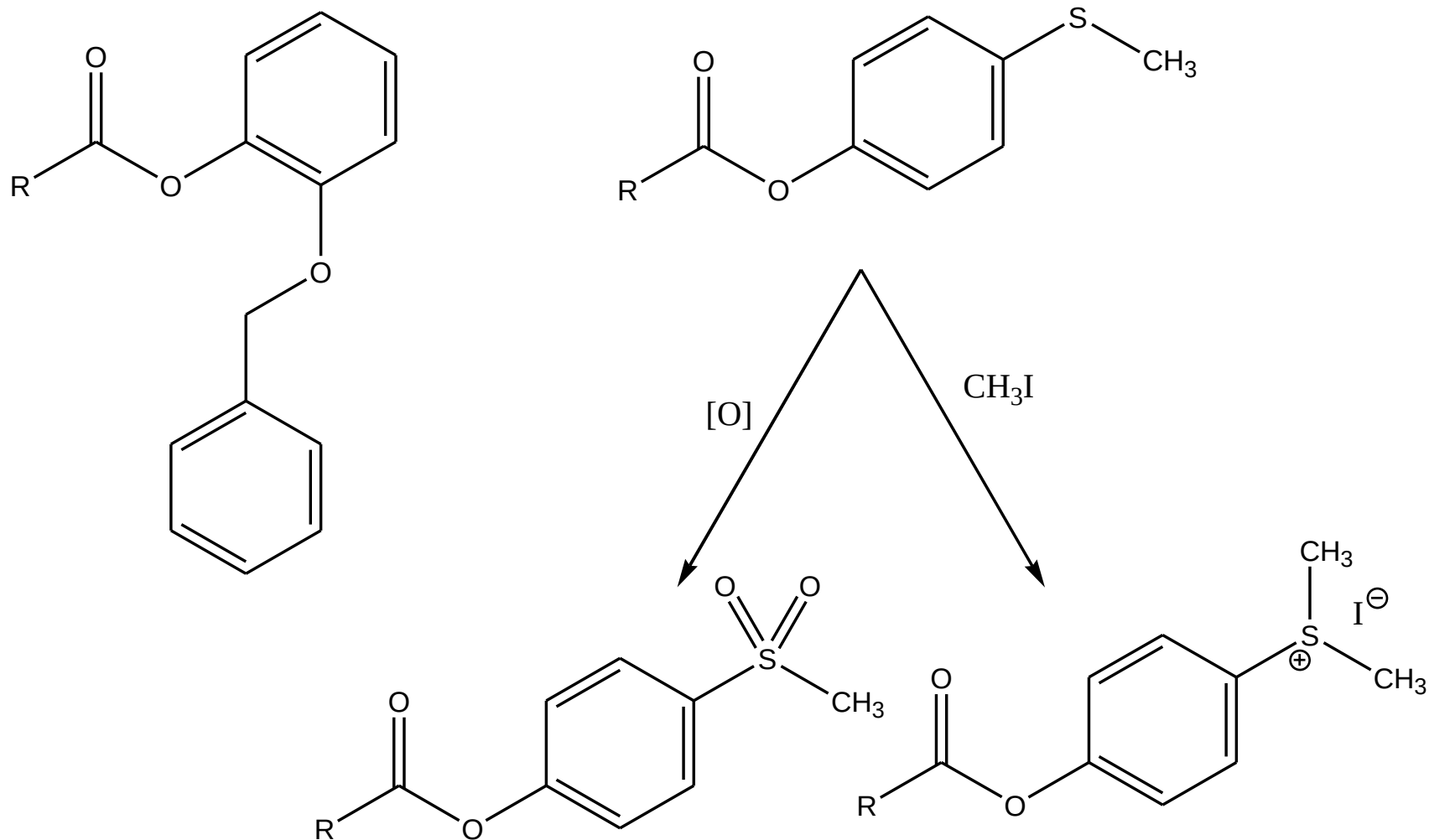


- usuwane w łagodnych warunkach zasadowych;
- bardzo podatne na atak nukleofilowy.

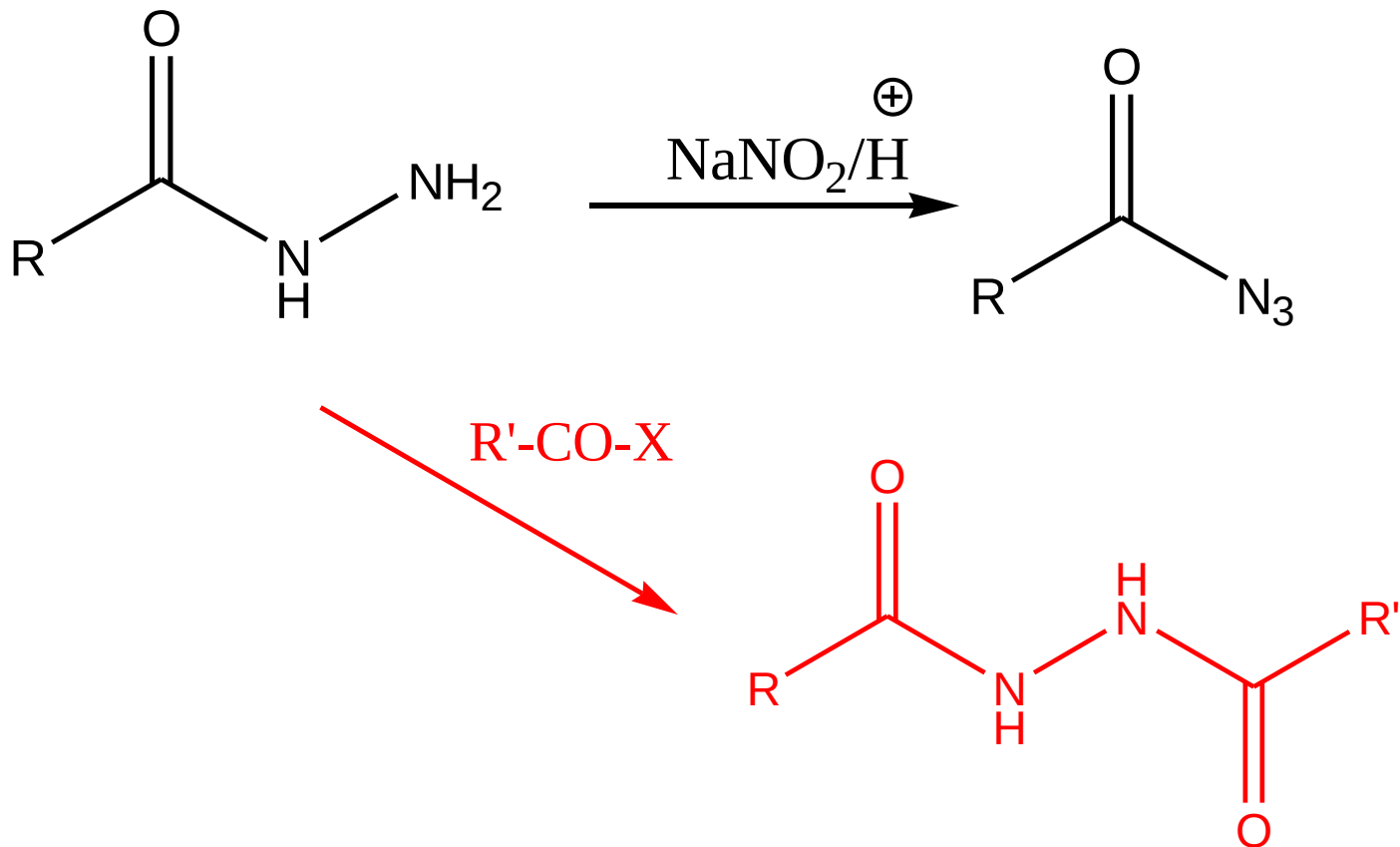


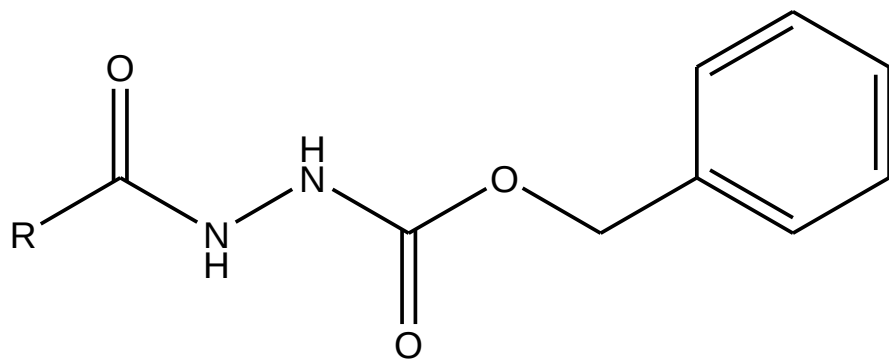
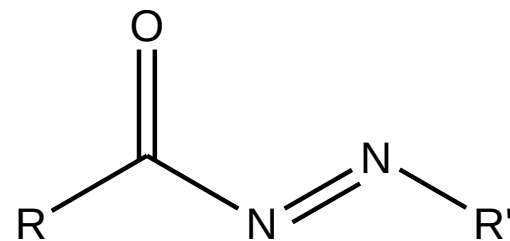
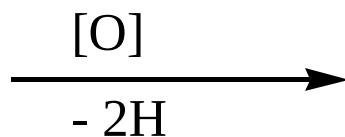
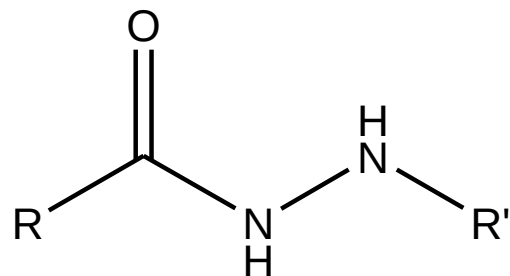
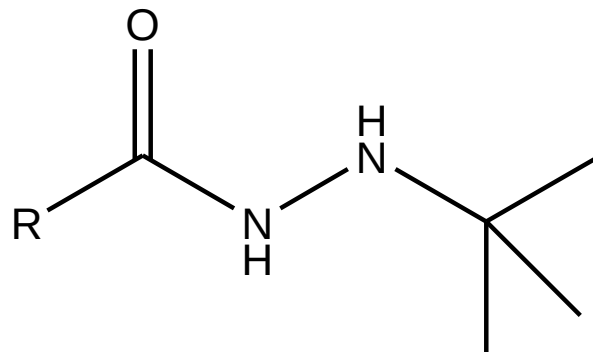
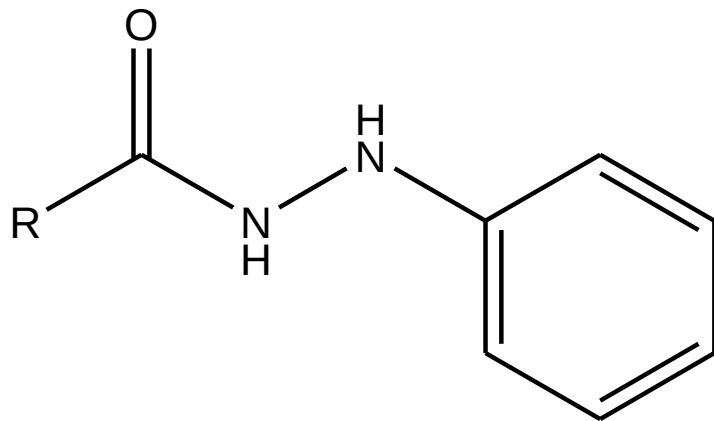


Estry 2-benzylloksyfenylowe i 4-metylotiofenylowe



Ostona z zastosowaniem hydrazydów





oraz pochodne Boc, Tfa, For,
Trt itp.

Ostony grupy aminowej

Rola oston grupy aminowej:

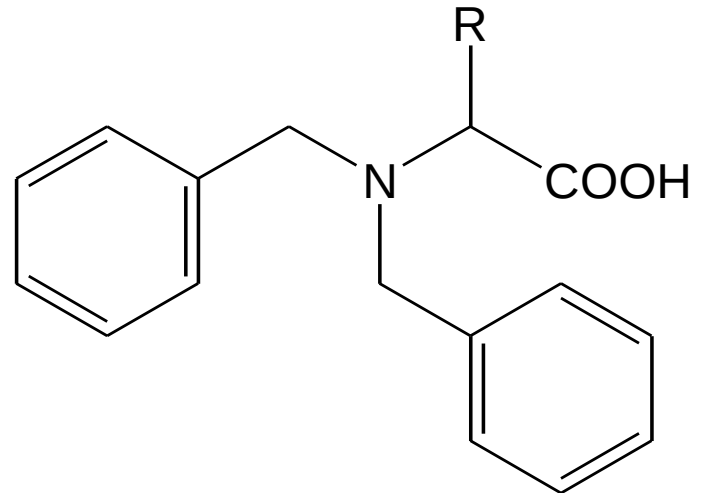
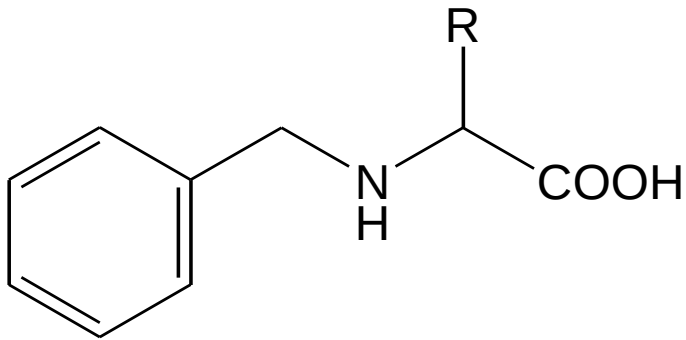
- zmniejszenie nukleofilowości;
- zmniejszenie zasadowosci;
- zapobieganie racemizacji.

Główne typy oston grupy aminowej:

- typu alkilu (alkilidenu);
- typu acylu;
- typu uretanu;
- inne

Ostony typu alkilu

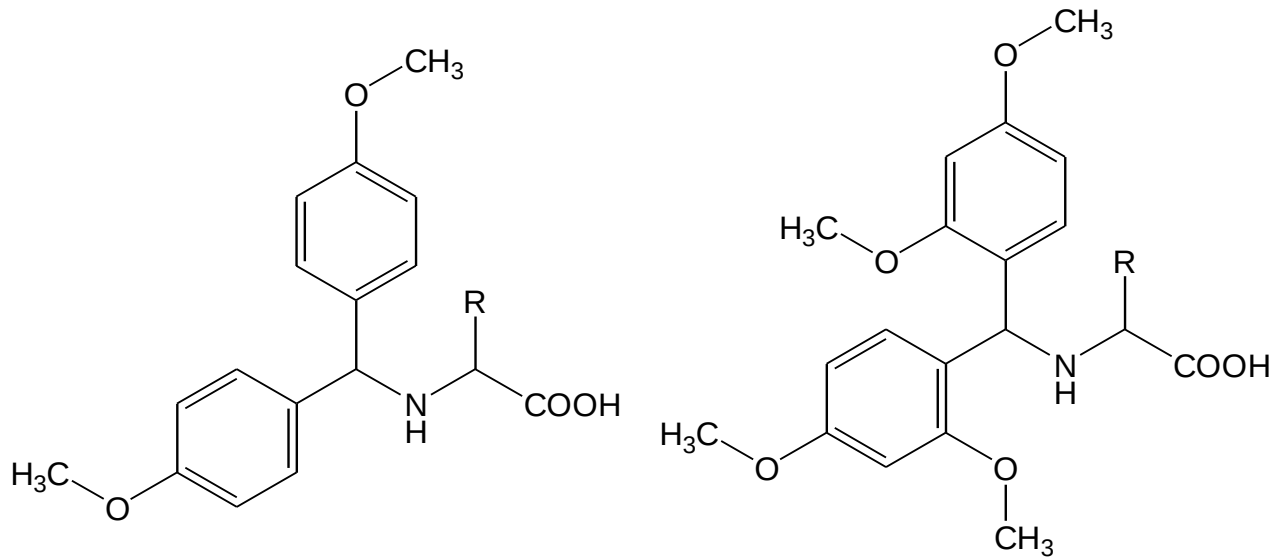
Benzył



- Nie powoduje zaniku właściwości zasadowych (i nukleofilowych) azotu;
- Usuwany metodami redukcyjnymi (H_2/Pd , Na/NH_3)

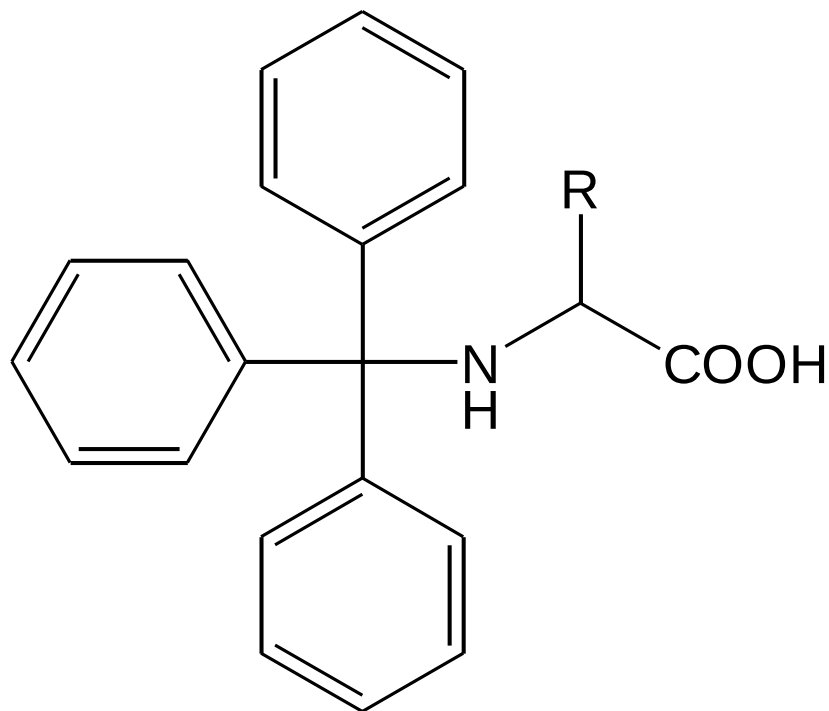
Pochodne benzhydrylu

di-4-metoksyfenylometyl i di- 2,4-dimetoksyfenylometyl.



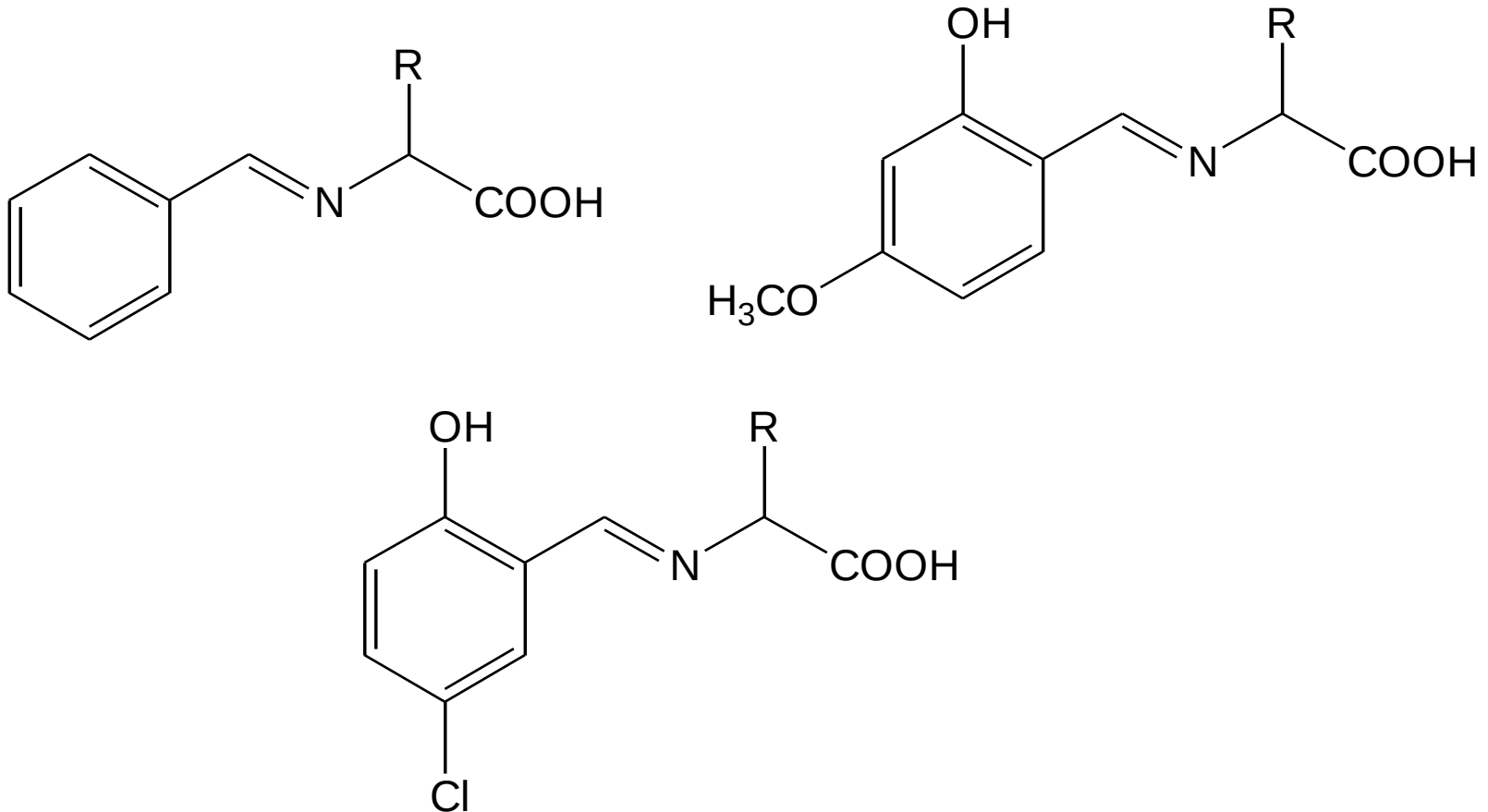
-usuwane acydolitycznie, podatne również na redukcję (wodorolizę).

N-trityloaminokwasy



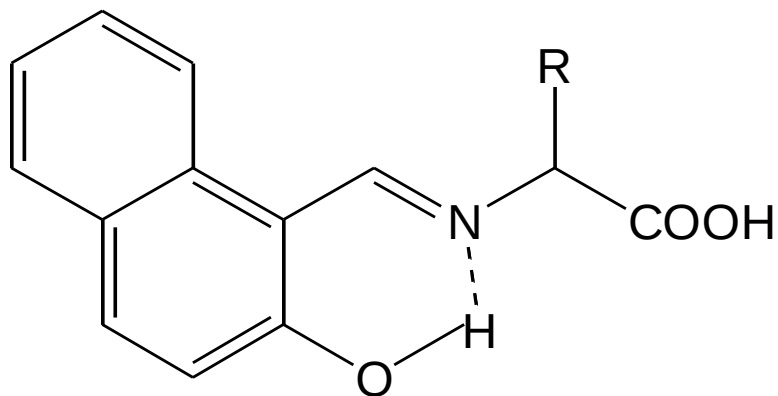
- bardzo duże zawady steryczne, powodujące trudności w acylowaniu Trt-aminokwasami;
- usuwane słabymi kwasami np. 80% AcOH, a nawet HOBt;
- ulegają wodorolizie (powoli).

Pochodne alkilidenowe (zasady Schiffa)

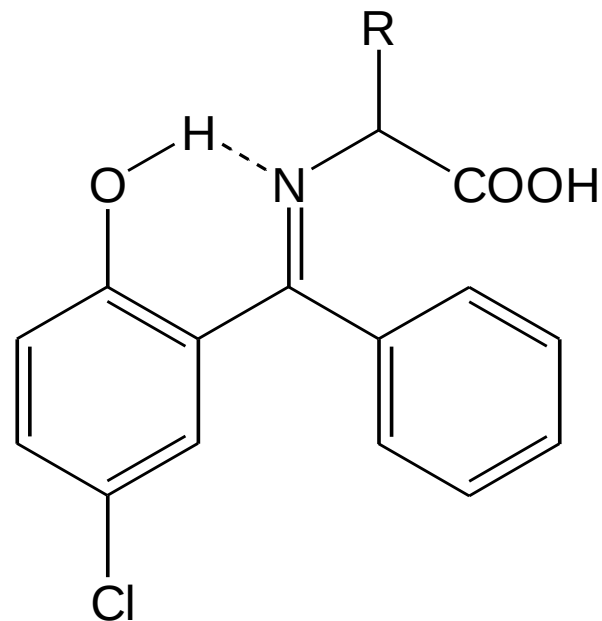


ulegają rozszczepieniu w łagodnie kwasowych warunkach.

Aldiminy stabilizowane przez wiązanie wodorowe

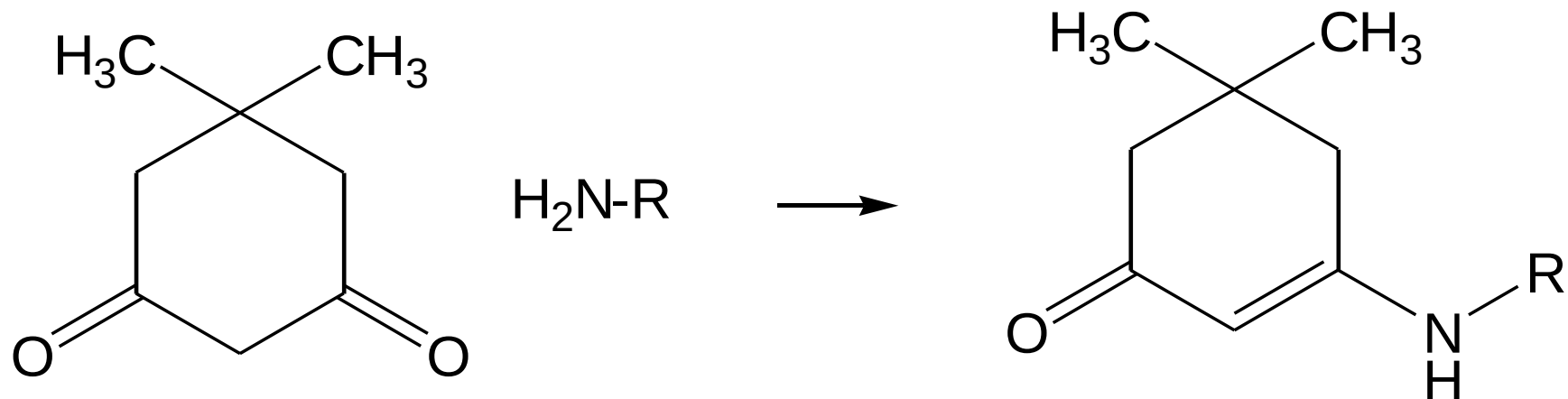


poch. 2-hydroksy-1-naftaldehdu



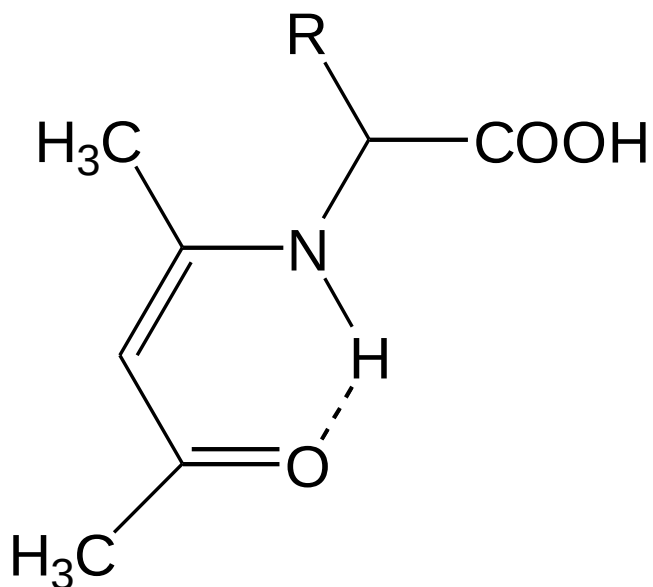
poch. 2-hydroksy-5-chlorobenzofenonu

Pochodne 1,1-dimetylocykloheksano-3,5-dionu (dimedonu).



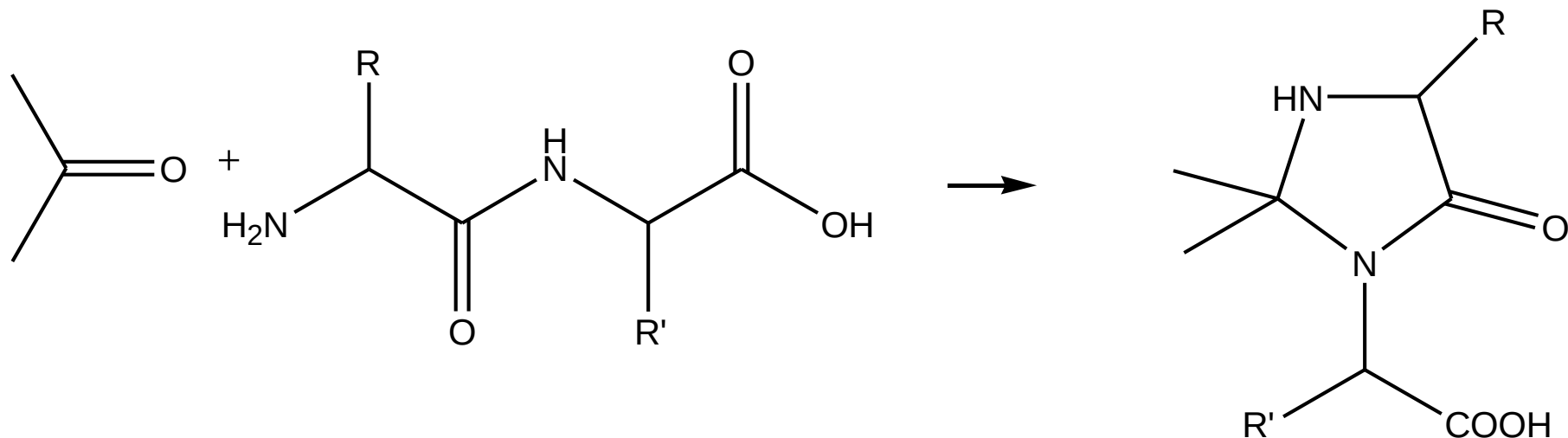
usuwanie osłony – $\text{Br}_2/\text{H}_2\text{O}$ – nie nadaje się do peptydów zawierających reszty Tyr, Trp i Met.

Pochodne związków 1,3-dikarbonylowych (benzoiloacetonu, acetyloacetonu i estrów kwasu acetylooctowego).



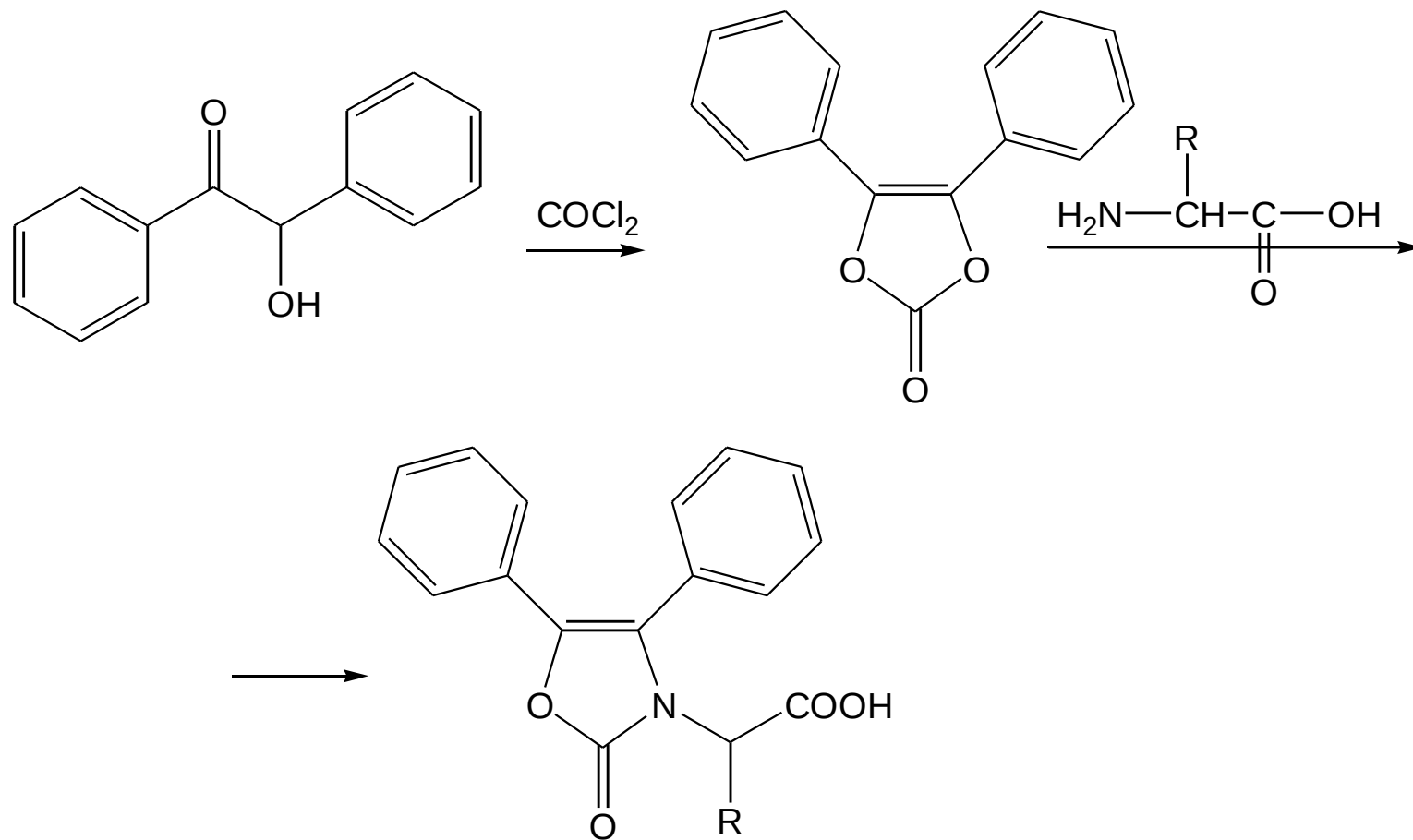
- stabilizowane przez wiązanie wodorowe;
- używane do otrzymywania półsyntetycznych penicylin;
- rozszczepiane wodnymi roztworami kwasu octowego.

Pochodne acetonu (poch. izopropylidenowe dipeptydów).



- usuwanie przez słabe kwasy, lecz w drastycznych warunkach.

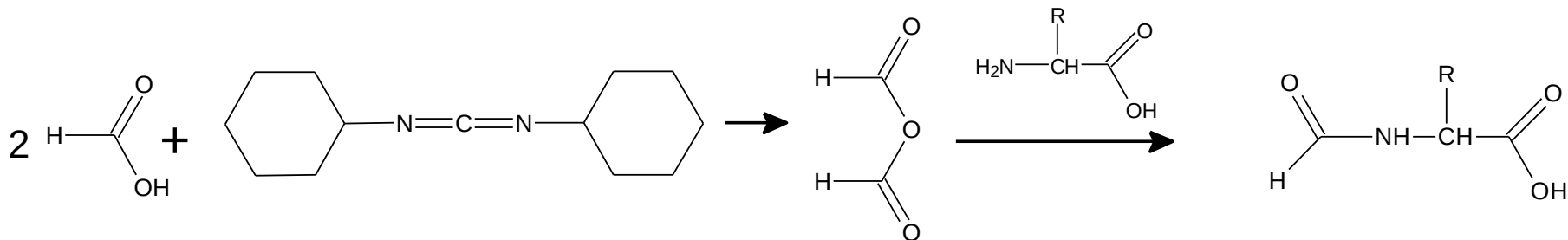
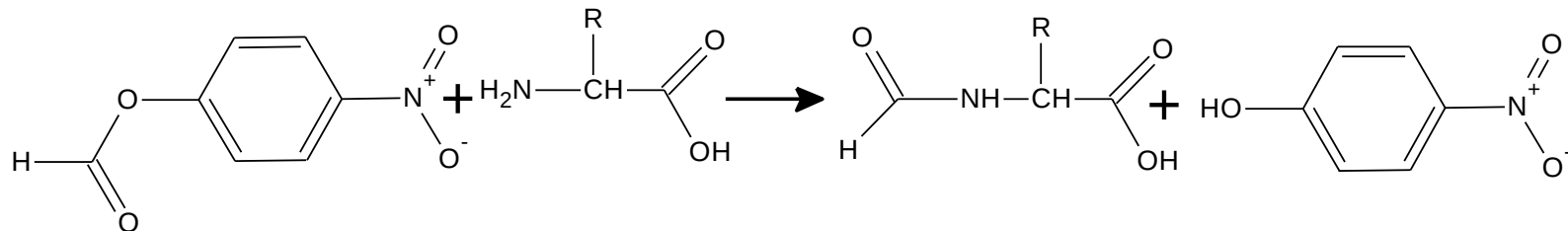
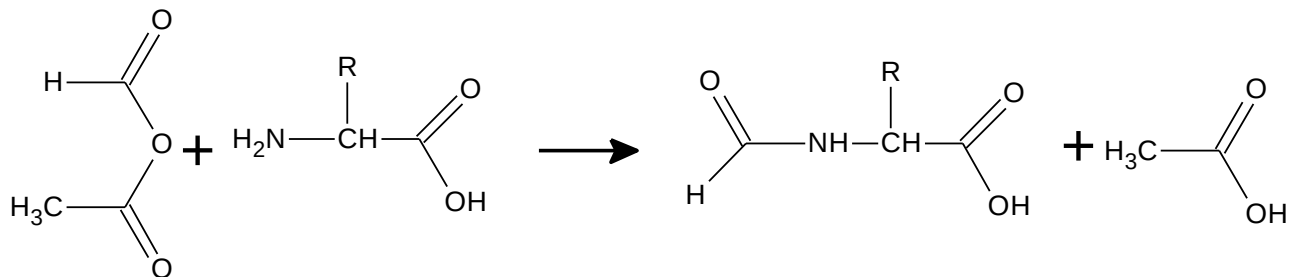
Pochodne benzoiny.



- otrzymane oksazolinony fluoryzują przy naświetlaniu UV;
- usuwanie osłony – redukcja Na/NH_3 lub wodoroliza katalityczna.

Ostony typu acylu.

Formyl (For).



- Usuwanie.
- hydroliza katalizowana kwasami;
- utlenianie H_2O_2 ;
- działanie nukleofilami (octan hydrazyny, anilina i jej pochodne itp.)
- katalityczne wodorowanie.
- Wady:
- promocja racemizacji;
- niskie wydajności reakcji acylowania formyloaminokwasami i powstawanie licznych produktów ubocznych.

Trifluoroacetyl (Tfa).

- Otrzymywanie:
- działanie bezwodnikiem trifluoroacetylowym w kwasie trifluorooctowym na aminokwas;
- użycie reaktywnych estrów kwasu trifluorooctowego.

Usuwanie:

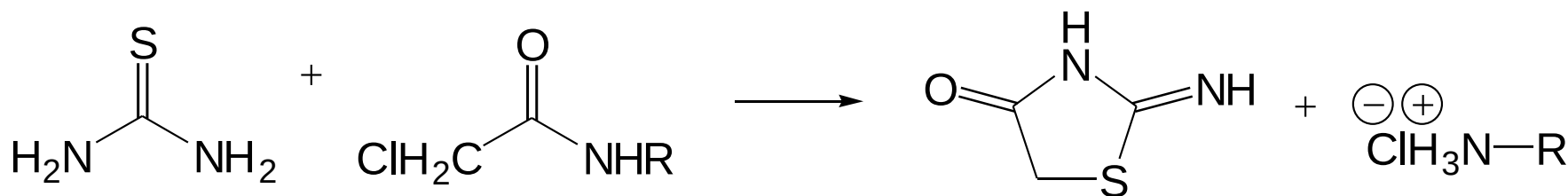
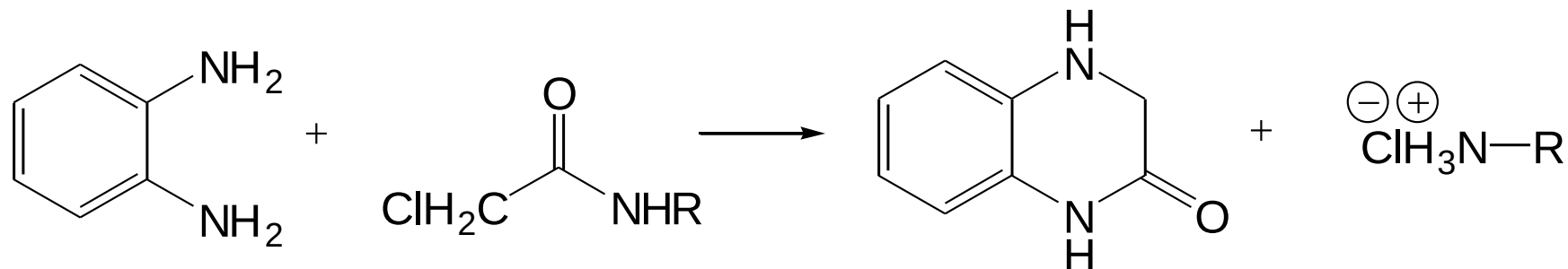
- hydroliza zasadowa (wodne roztwory wodorotlenków, wodny roztwór piperidyny);
- redukcja borowodorkiem sodowym.

Wady:

- promocja racemizacji powoduje ograniczenie zastosowania tej grupy do osłony grup funkcyjnych łańcuchów bocznych.

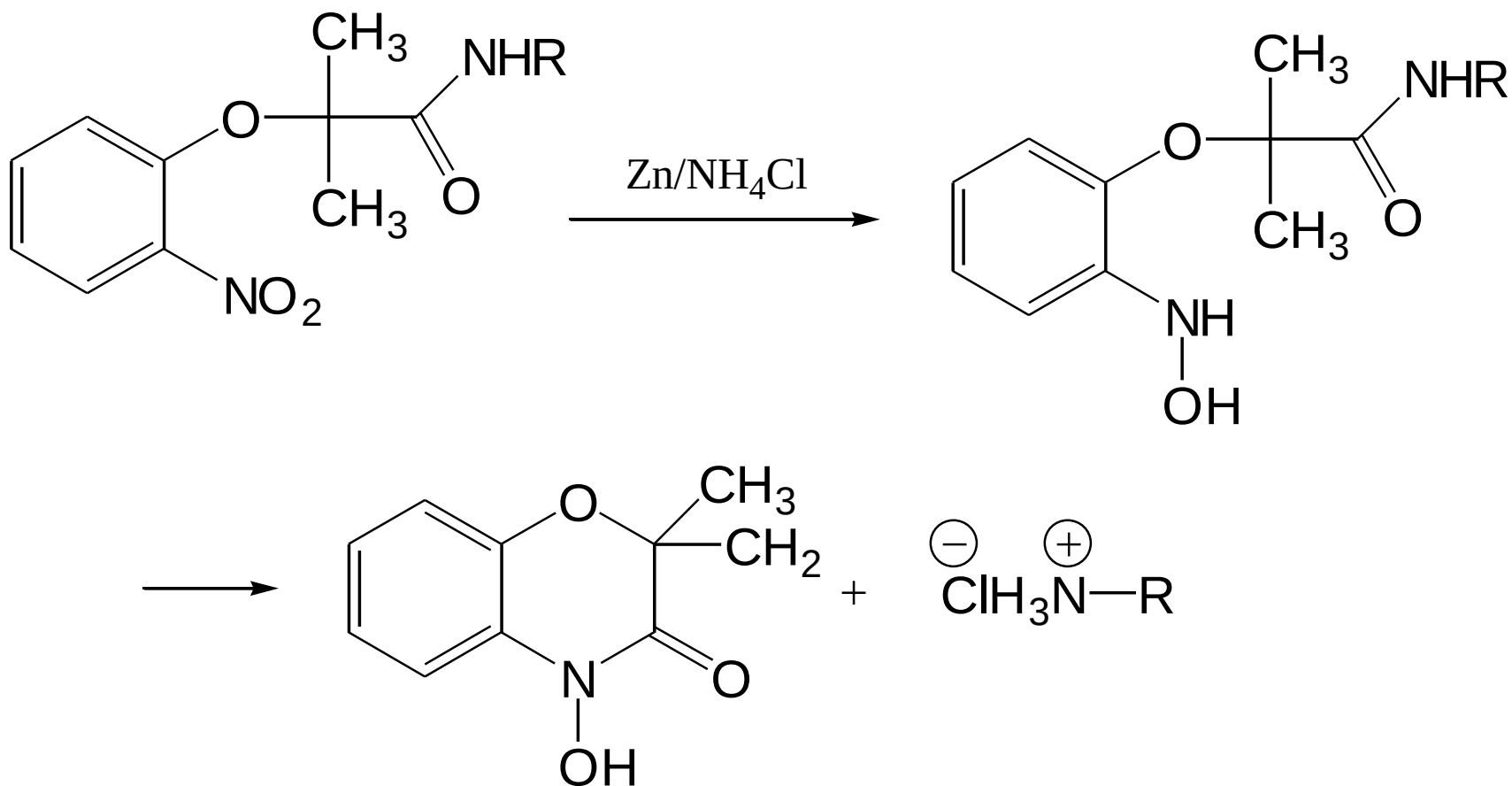
Chloroacetyl.

Uzuwanie:

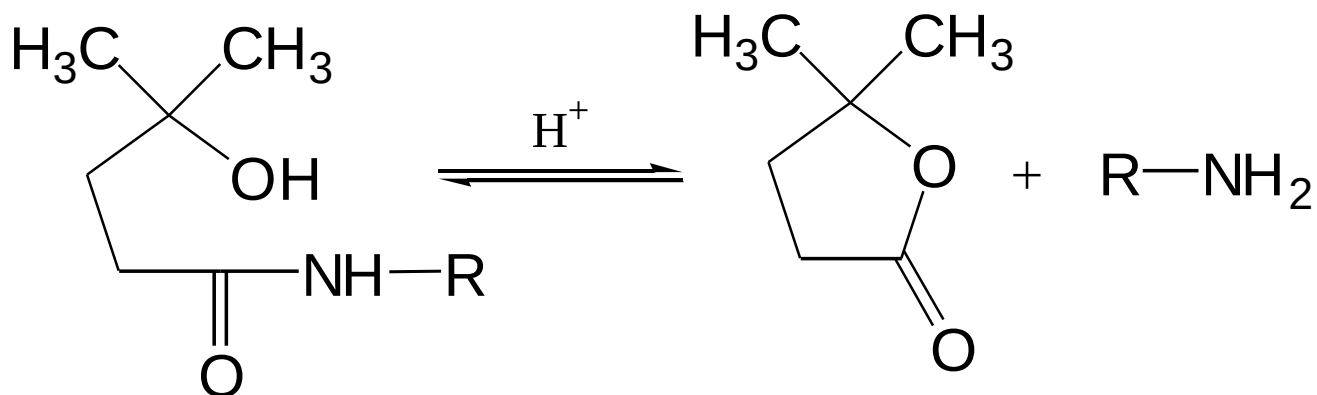


i N-podstawione tiomoczniki

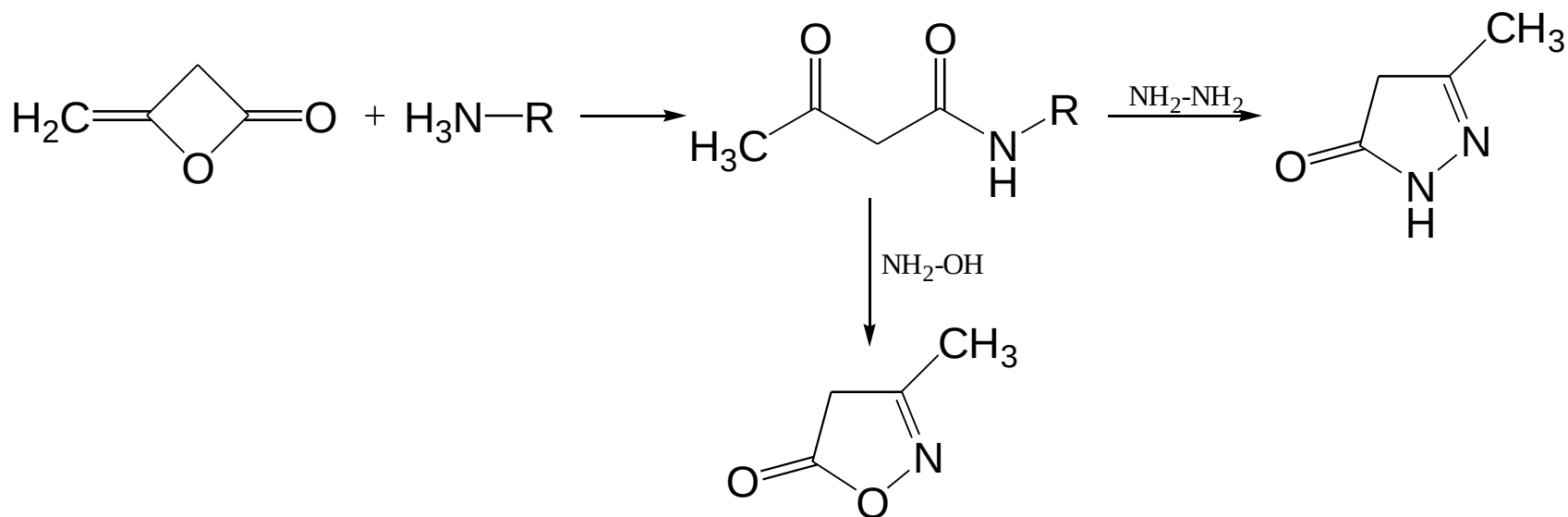
Grupa o-nitrofenoksyacetylowa i jej pochodne.



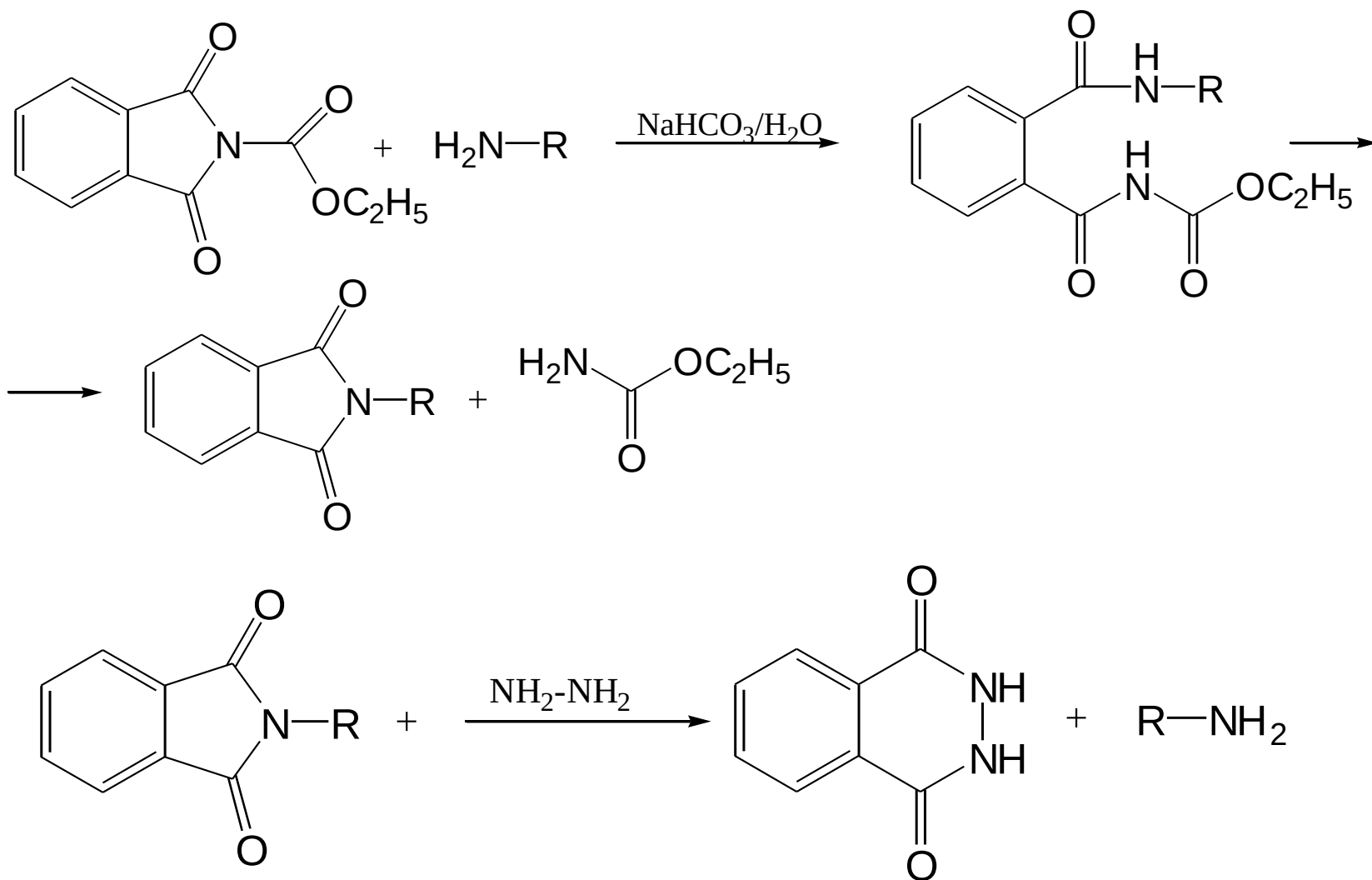
4-hydroksy-4-metylopentanoil



Acetyloacetyl

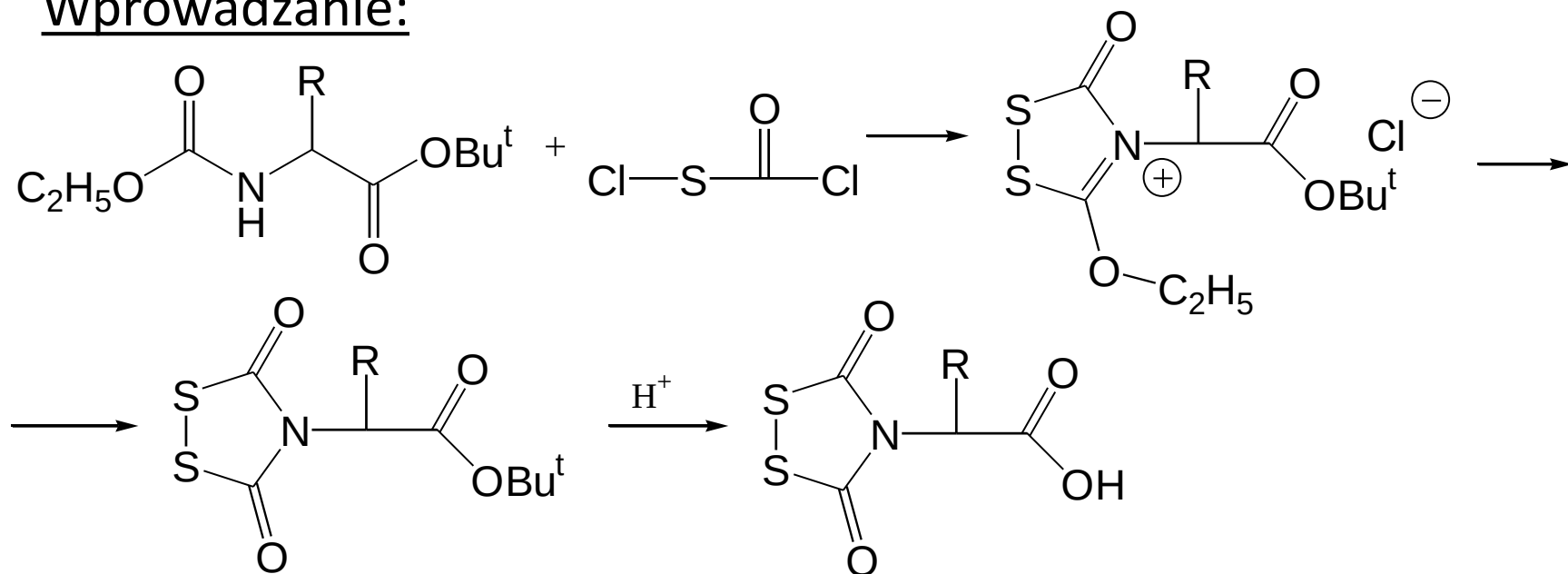


Ftalil (Pht).



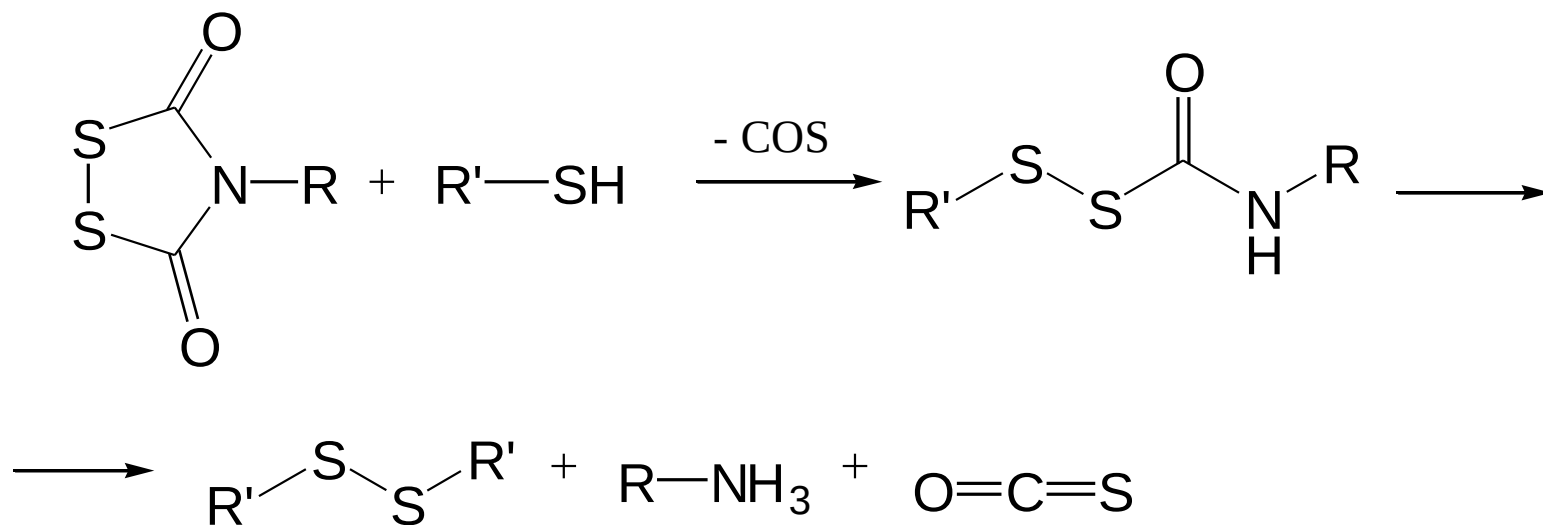
Ditiasukcynyl (Dts).

Wprowadzanie:



Usuwanie:

- działanie tiolami;
- odporna na działanie kwasów i fotolizę.



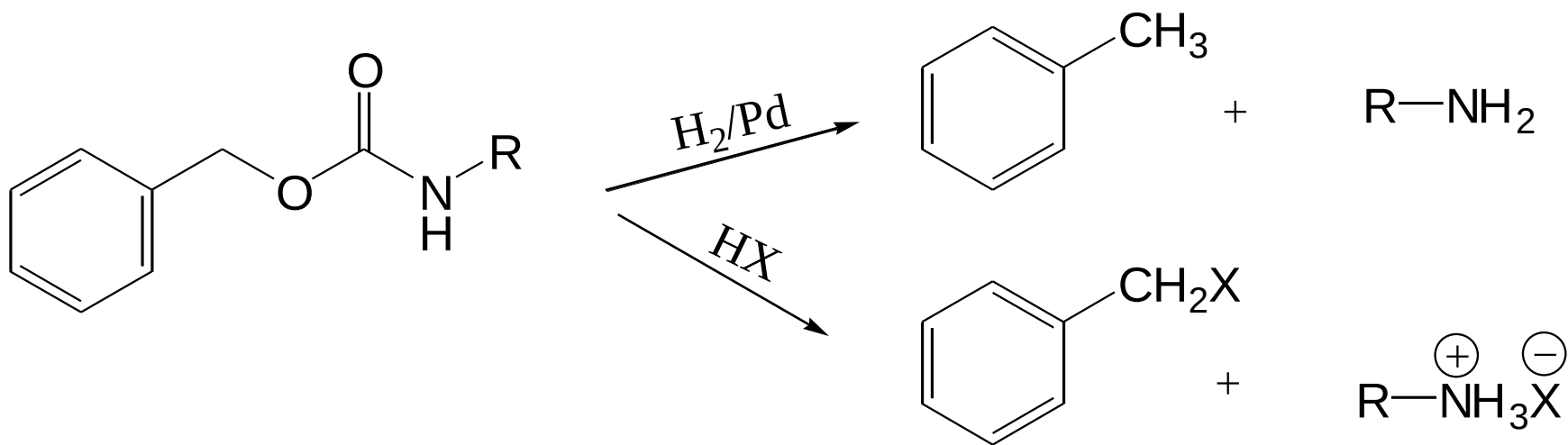
Ośłony typu uretanu.

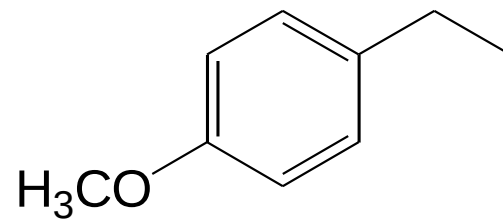
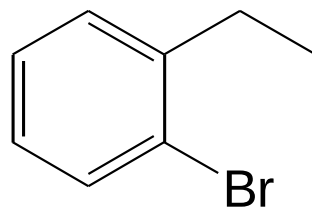
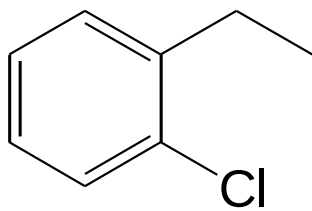
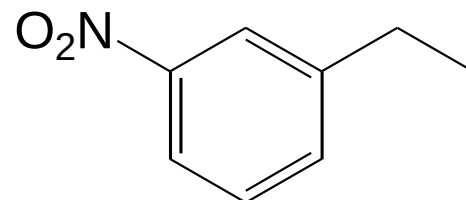
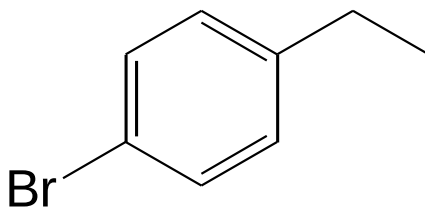
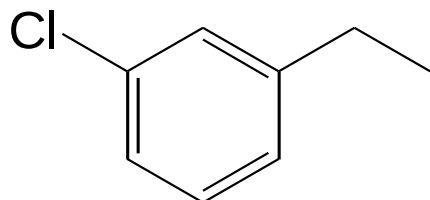
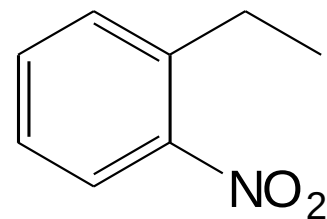
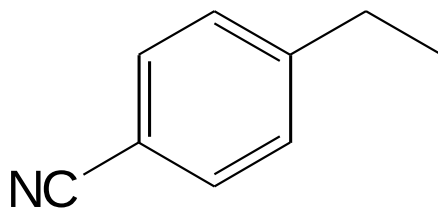
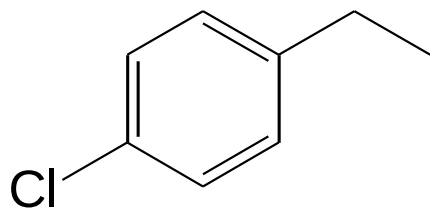
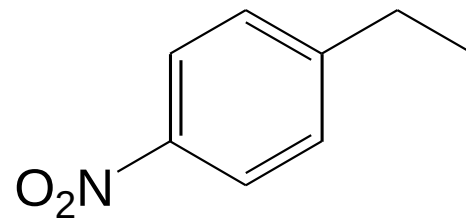
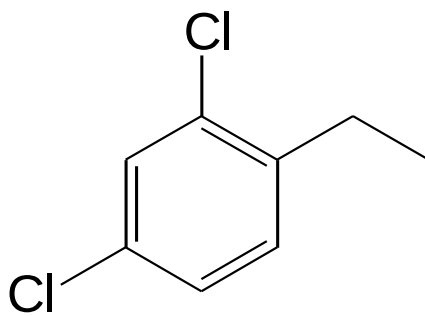
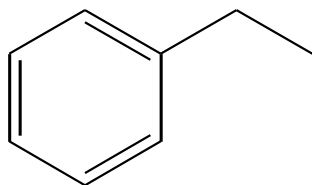
- zapobiegają racemizacji poprzez tworzenie azlaktonów.

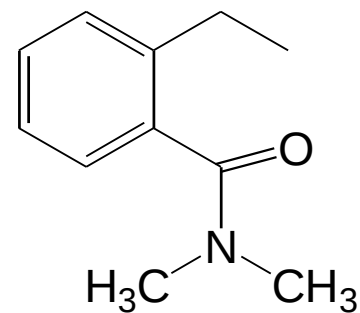
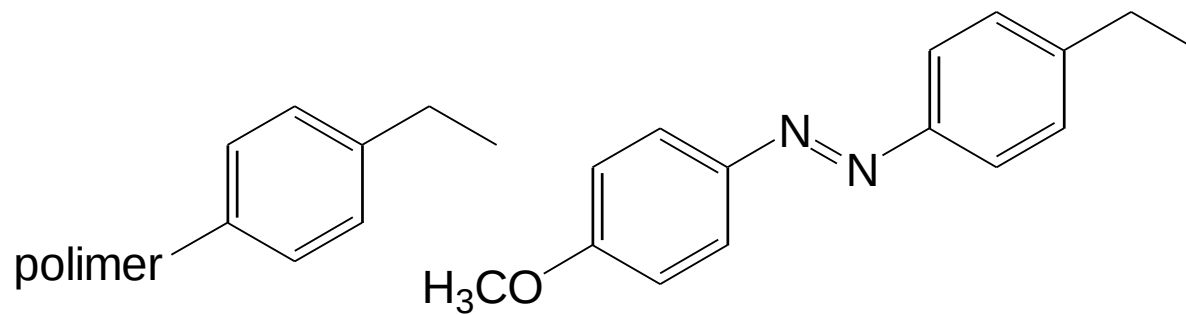
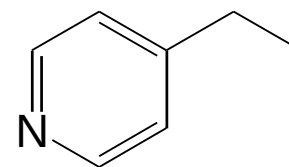
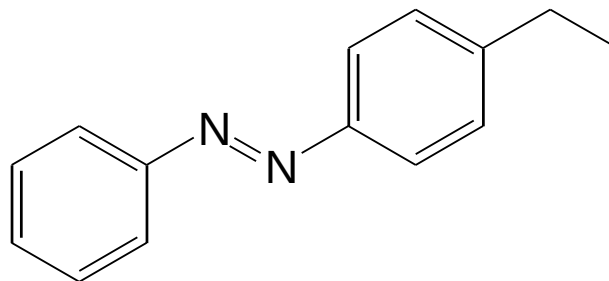
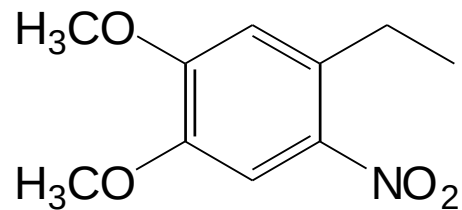
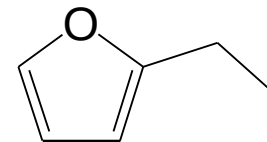
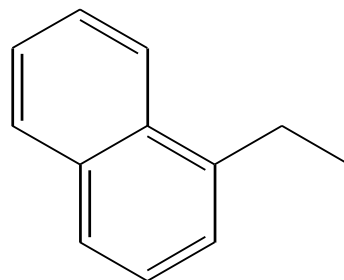
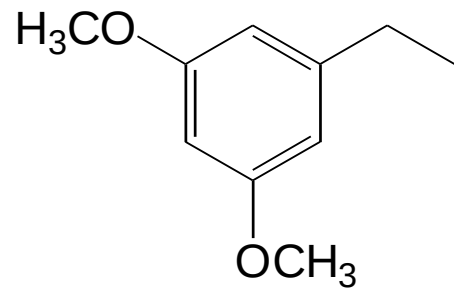
Ośłona benzyloksykarbonylowa (Z) i pochodne.

Usuwanie:

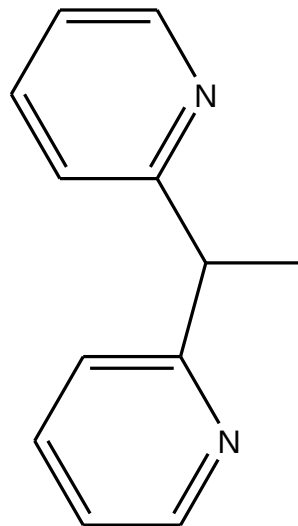
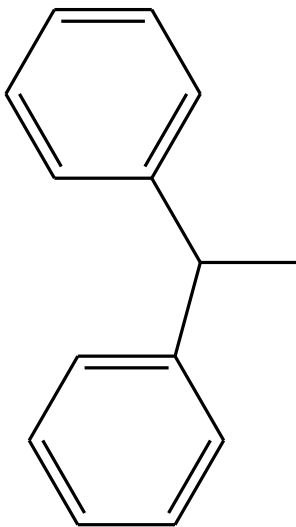
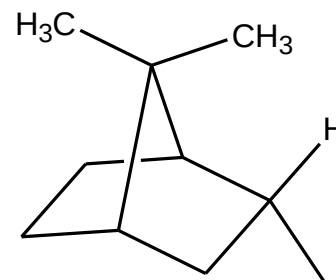
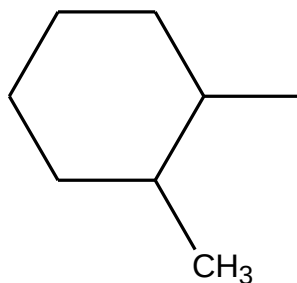
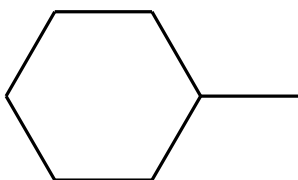
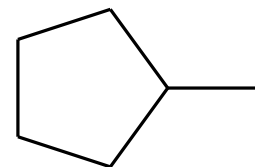
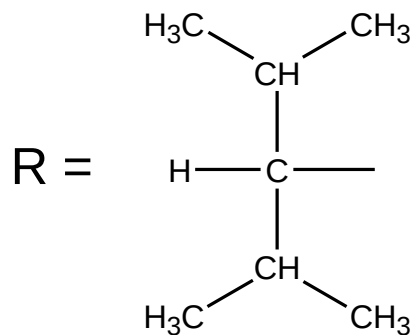
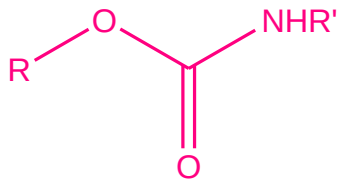
- acydoliza (HBr/AcOH, TFMSA, ciekły HF, niektóre kwasy Lewisa, TFA – tioanizol itp.)
- katalityczna wodoroliza, redukcja sodem w ciekłym amoniaku.

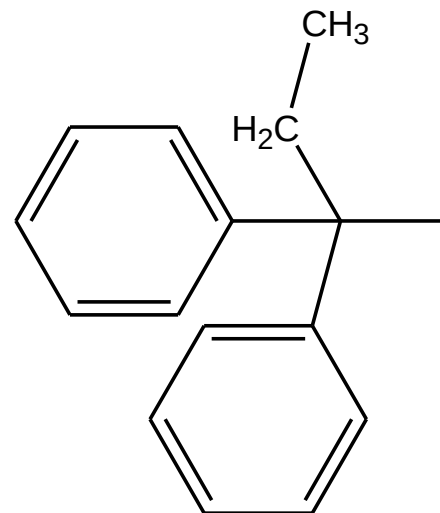
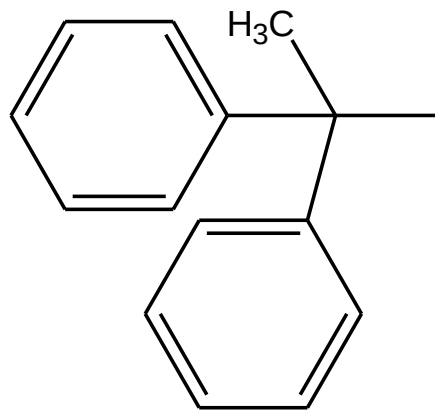
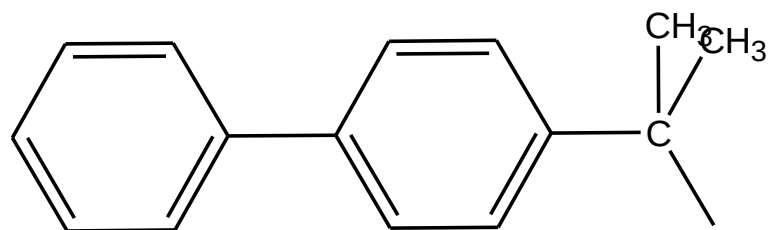
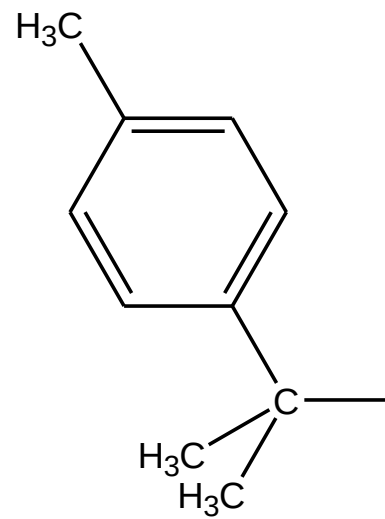
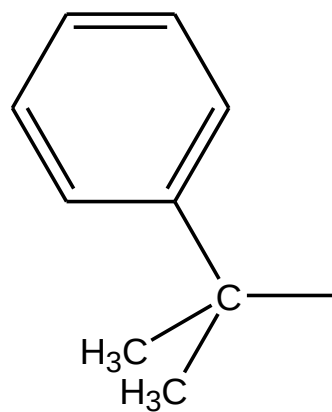
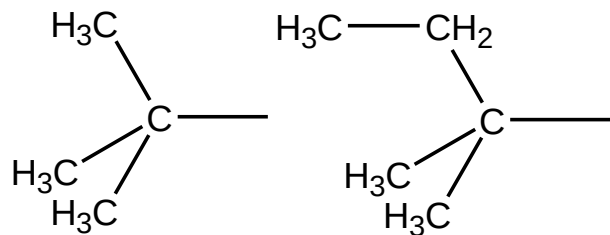


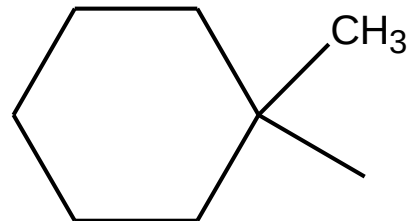
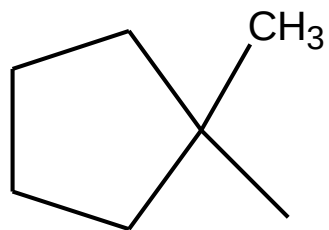
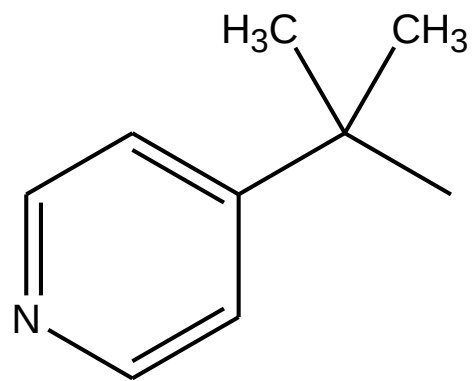
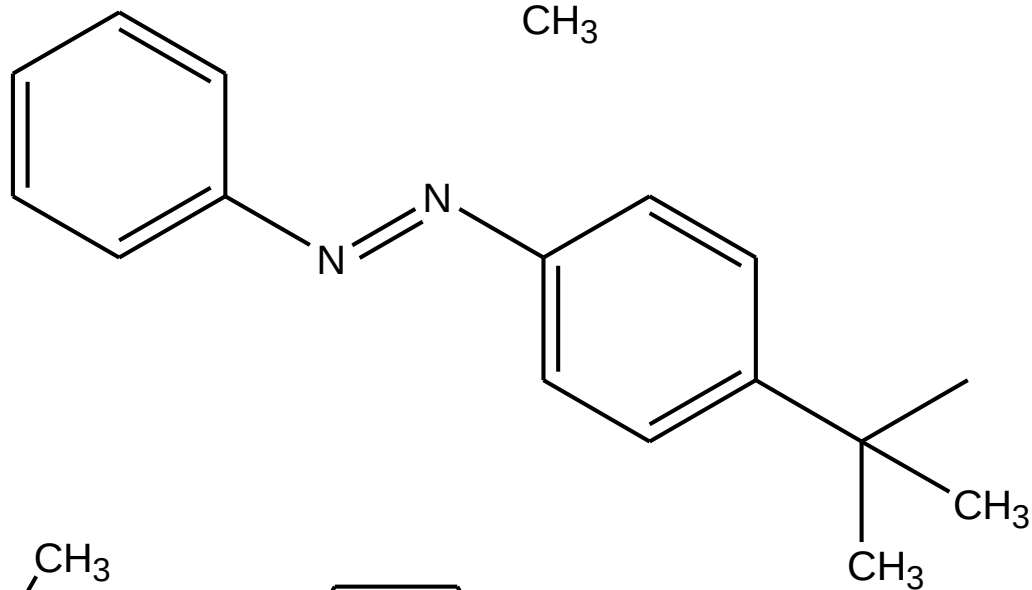
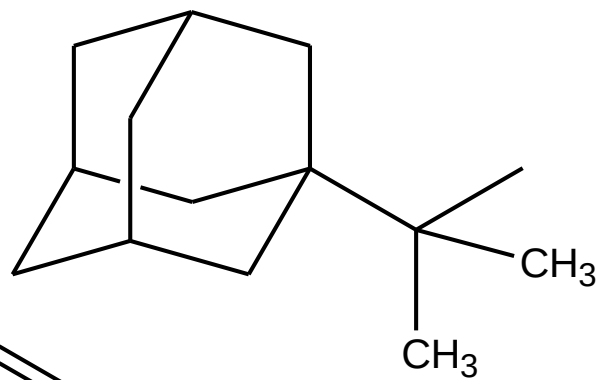
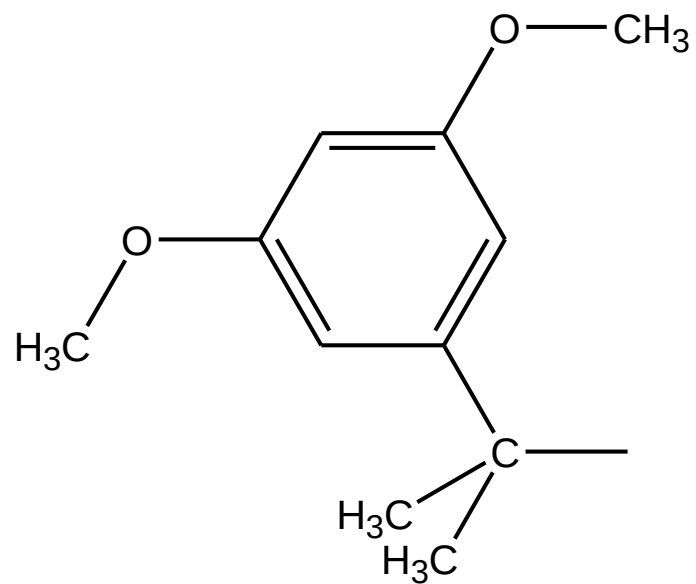


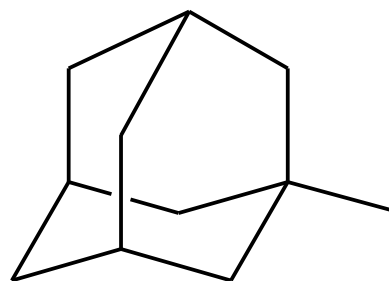
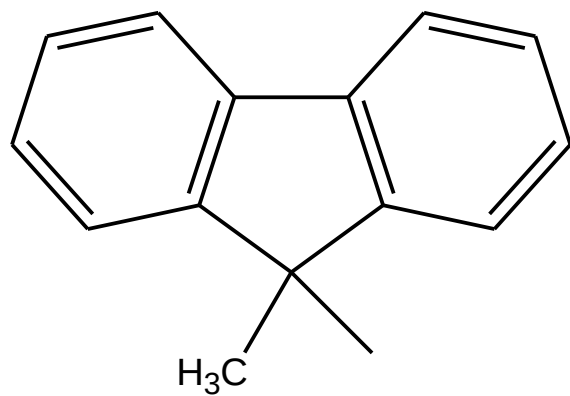
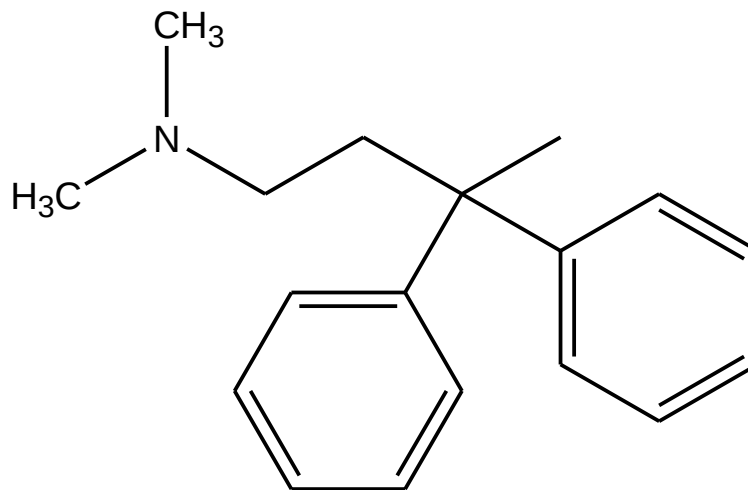
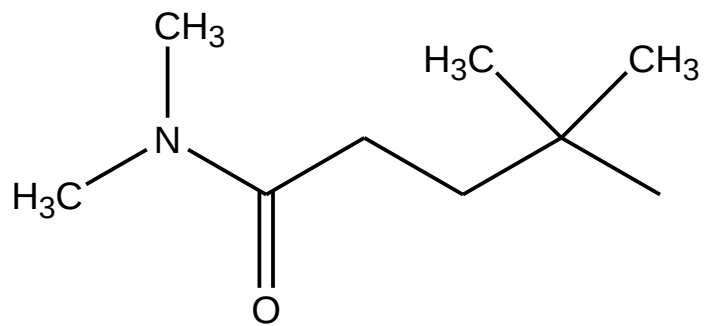


Ostony typu uretanu odszczepiane przez acydolizę

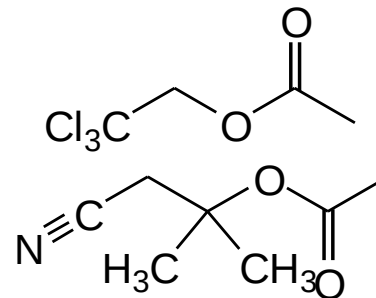
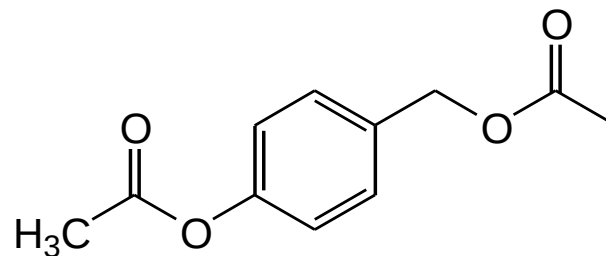
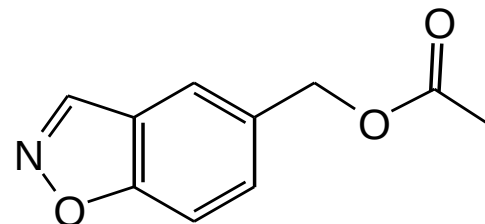
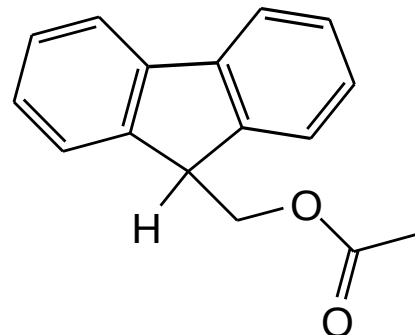
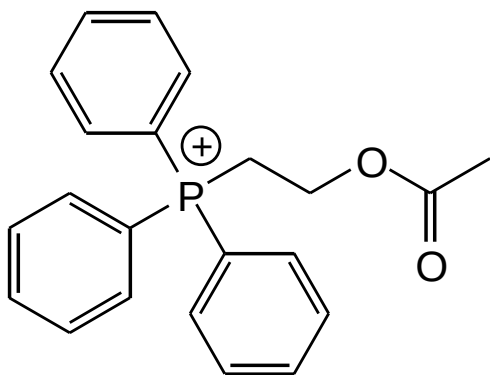
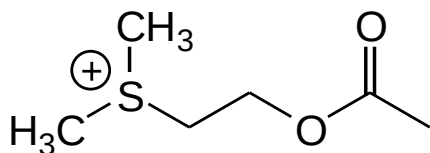
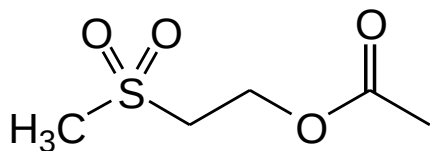
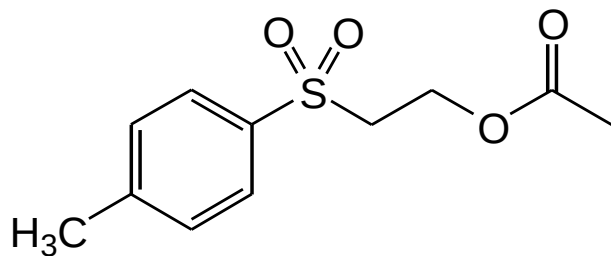




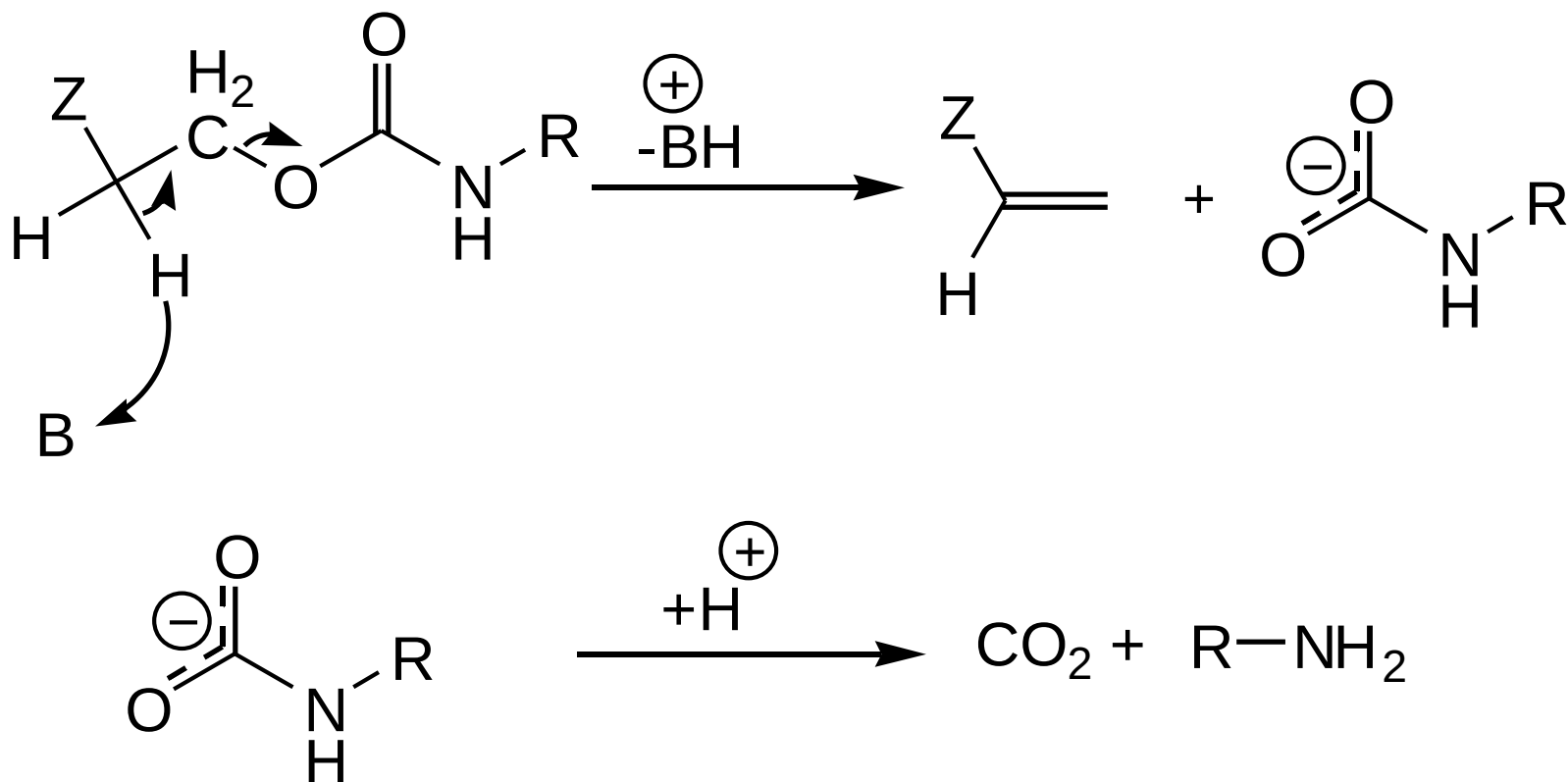




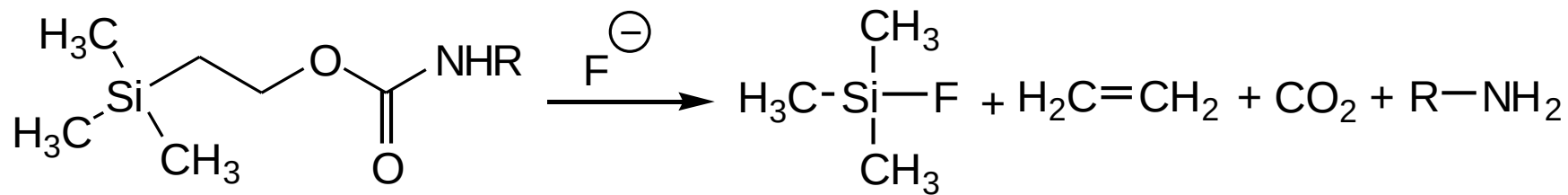
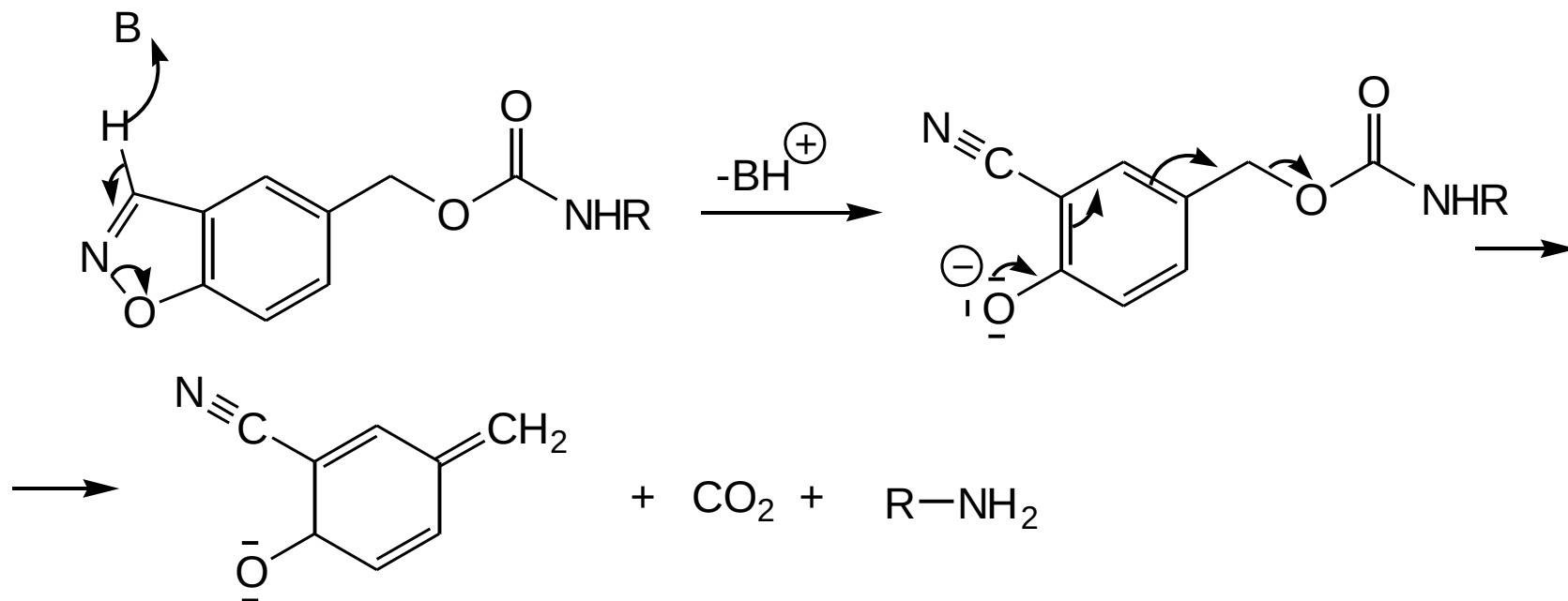
Ośłony typu uretanu odszczepiane przez eliminację



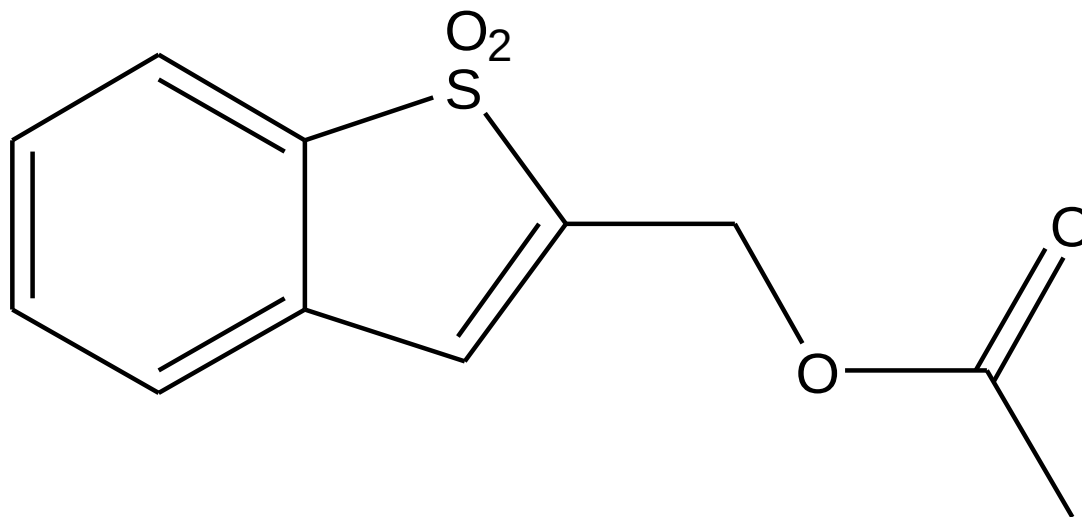
Typowy mechanizm odszczepiania



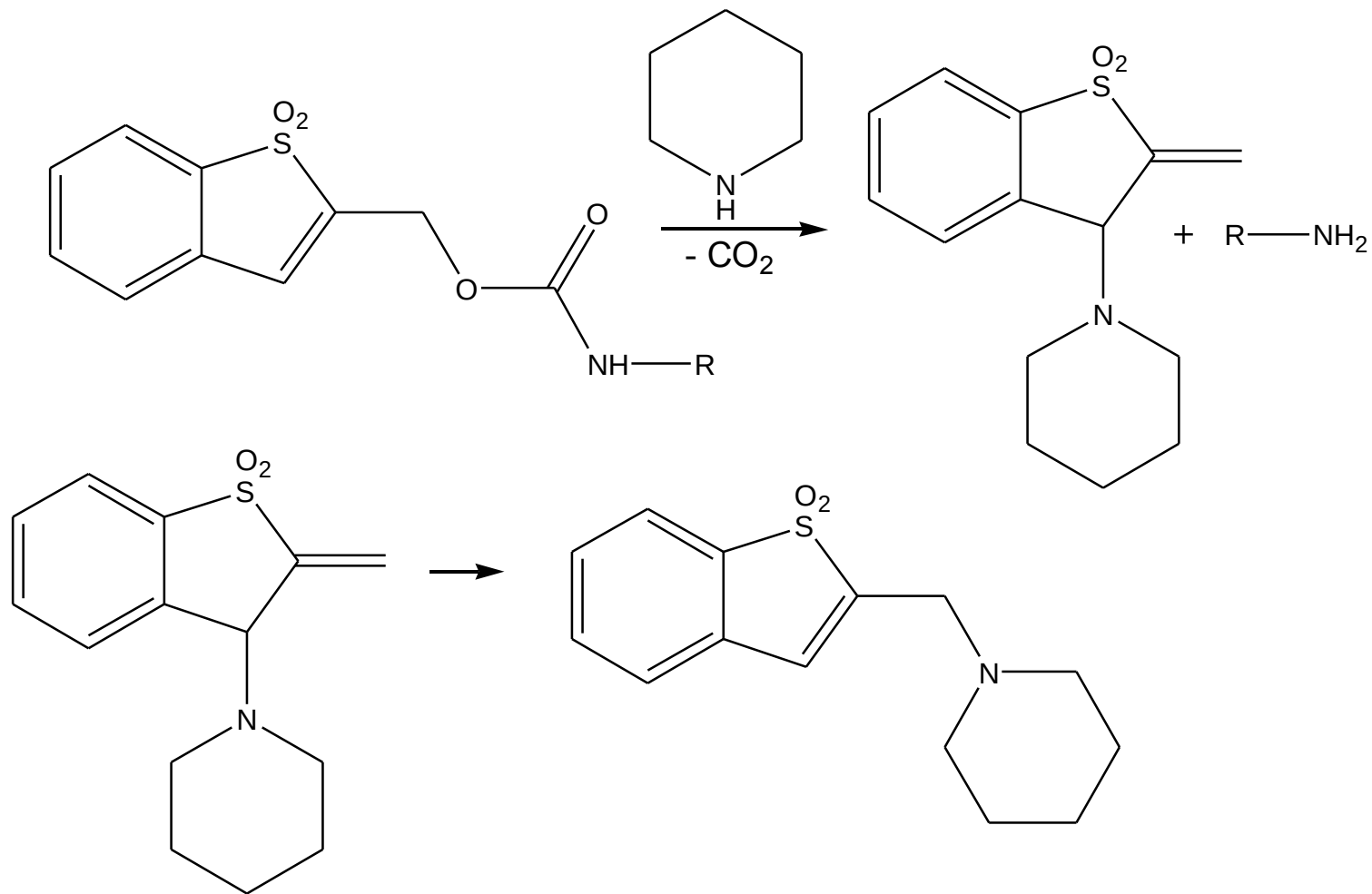
Inne mechanizmy:



Ośłona 1,1-dioksobenzo[b]tiofen-2-ylmetyloksykarbonylowa
(Bsmoc).

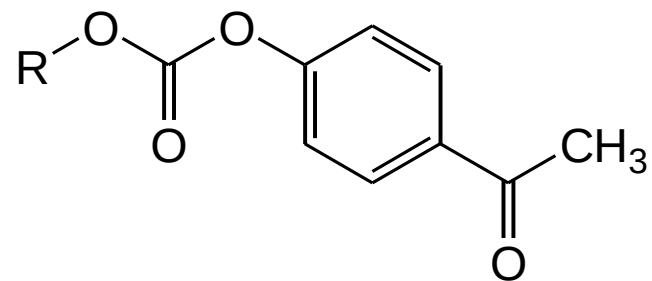
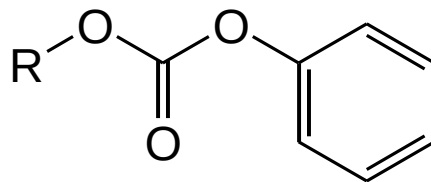
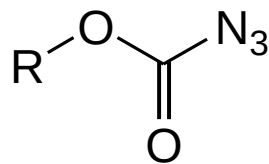
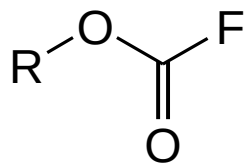
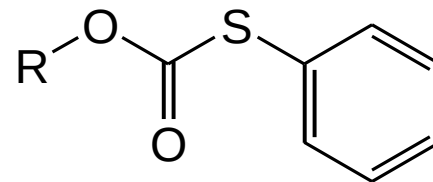
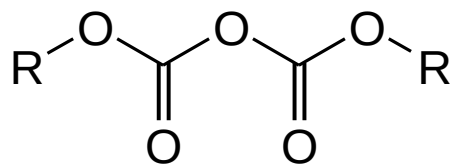
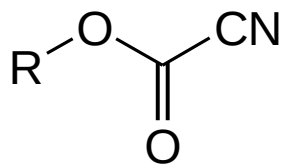
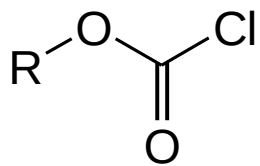


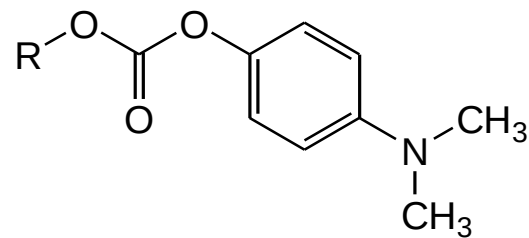
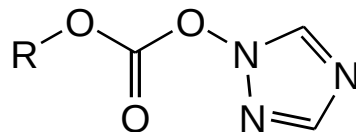
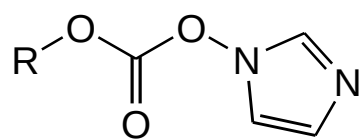
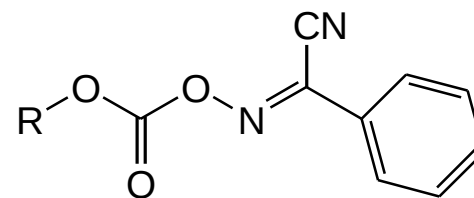
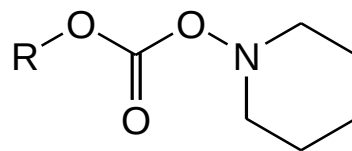
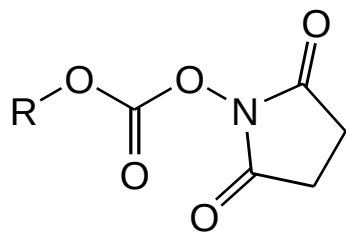
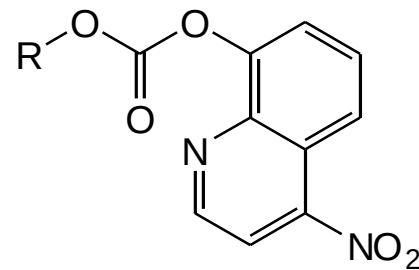
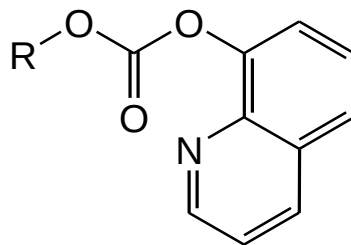
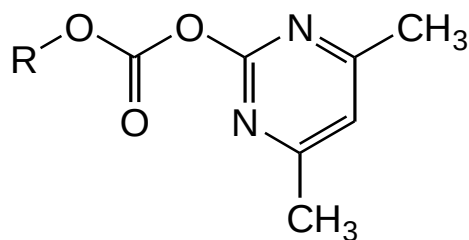
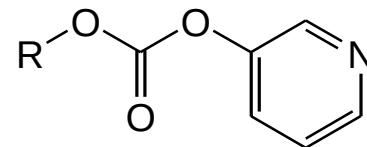
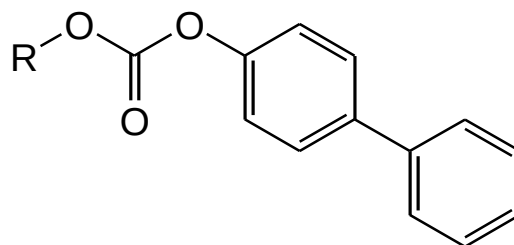
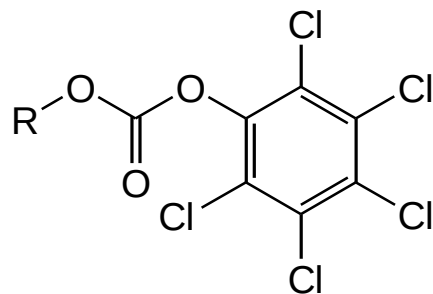
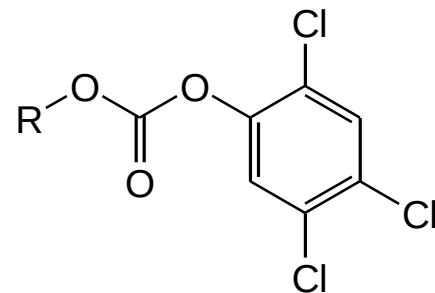
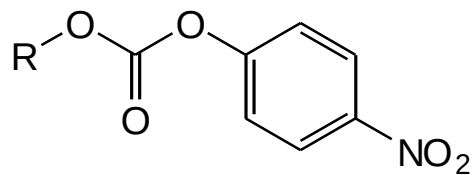
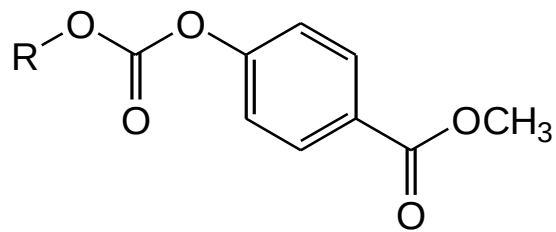
Usuwanie - rozcieńczone roztwory amin drugorzędowych np. 2% piperydyny w DMF, rozc. roztwory morfoliny, czy też tris[2-aminoetylo]aminy. Możliwe jest usunięcie tej osłony w obecności grupy Fmoc. Selektywne usuwanie Fmoc w obecności Boc - działanie metylo-*tert*-butyloaminą

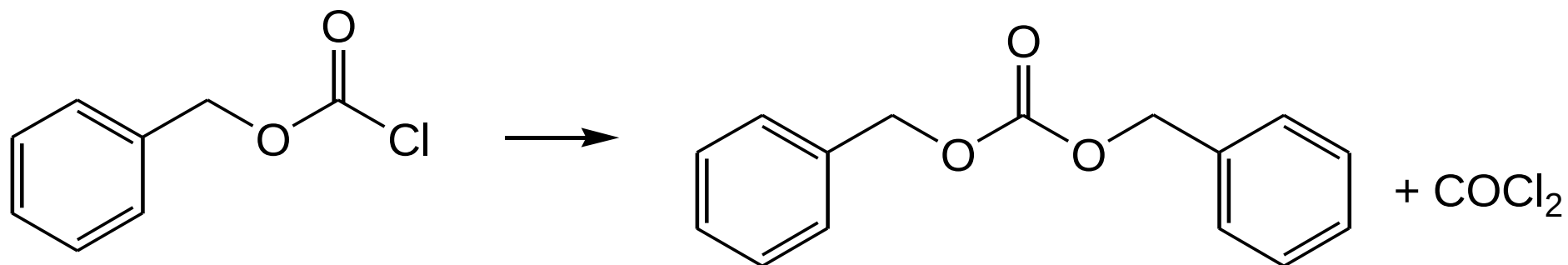
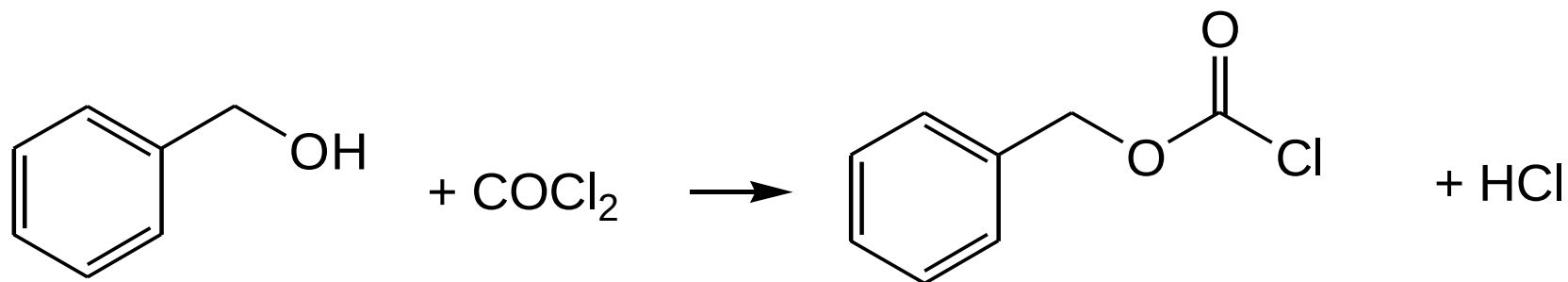


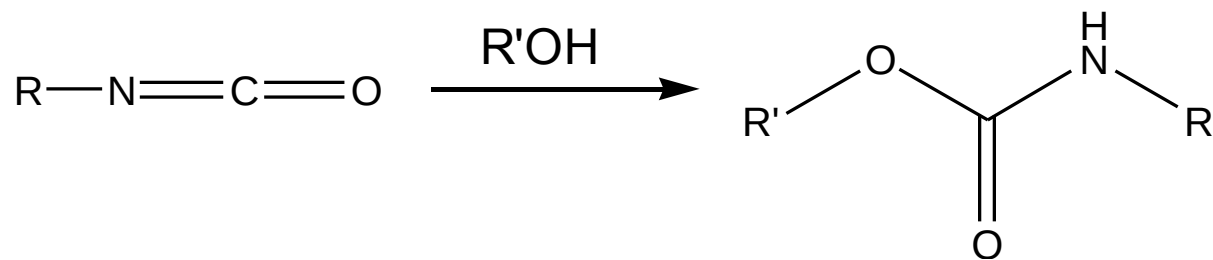
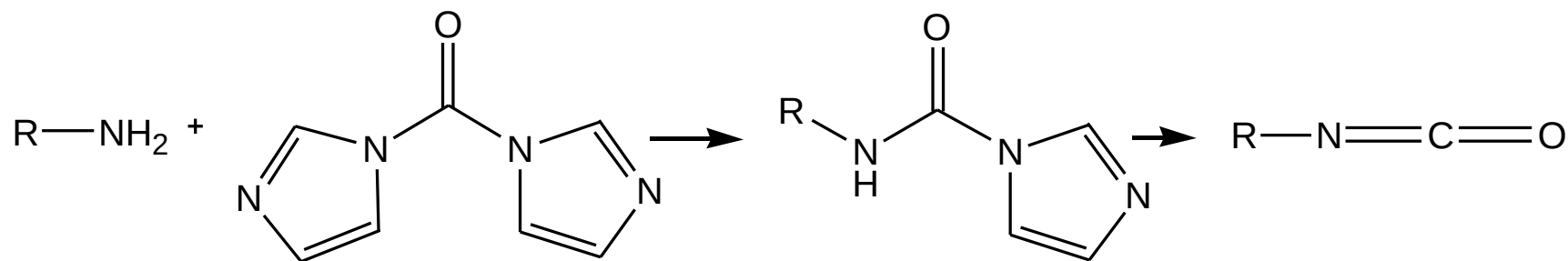
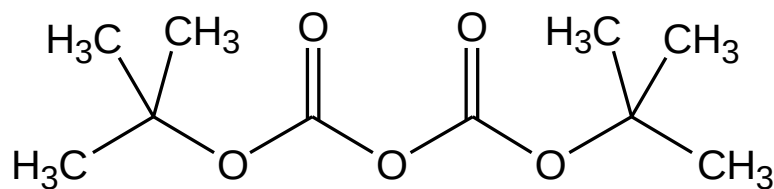
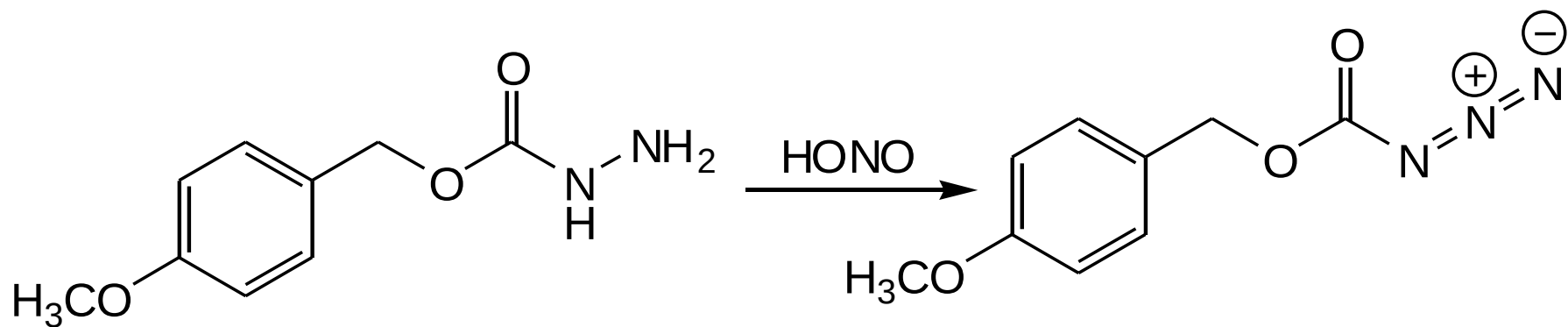
- występuje niebezpieczeństwo przedwczesnego usunięcia tej grupy przez grupę aminową drugiego składnika użytego w syntezie!

Wprowadzanie osłon typu uretanu



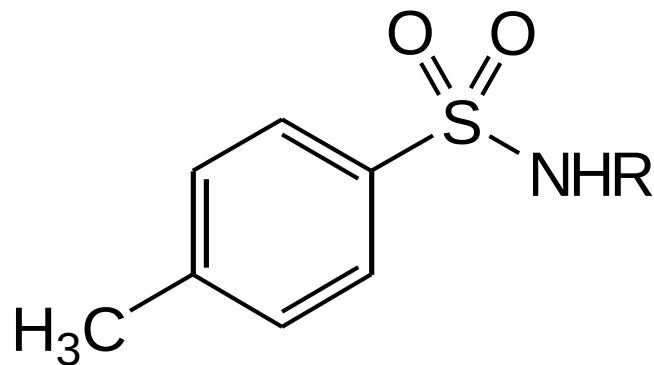






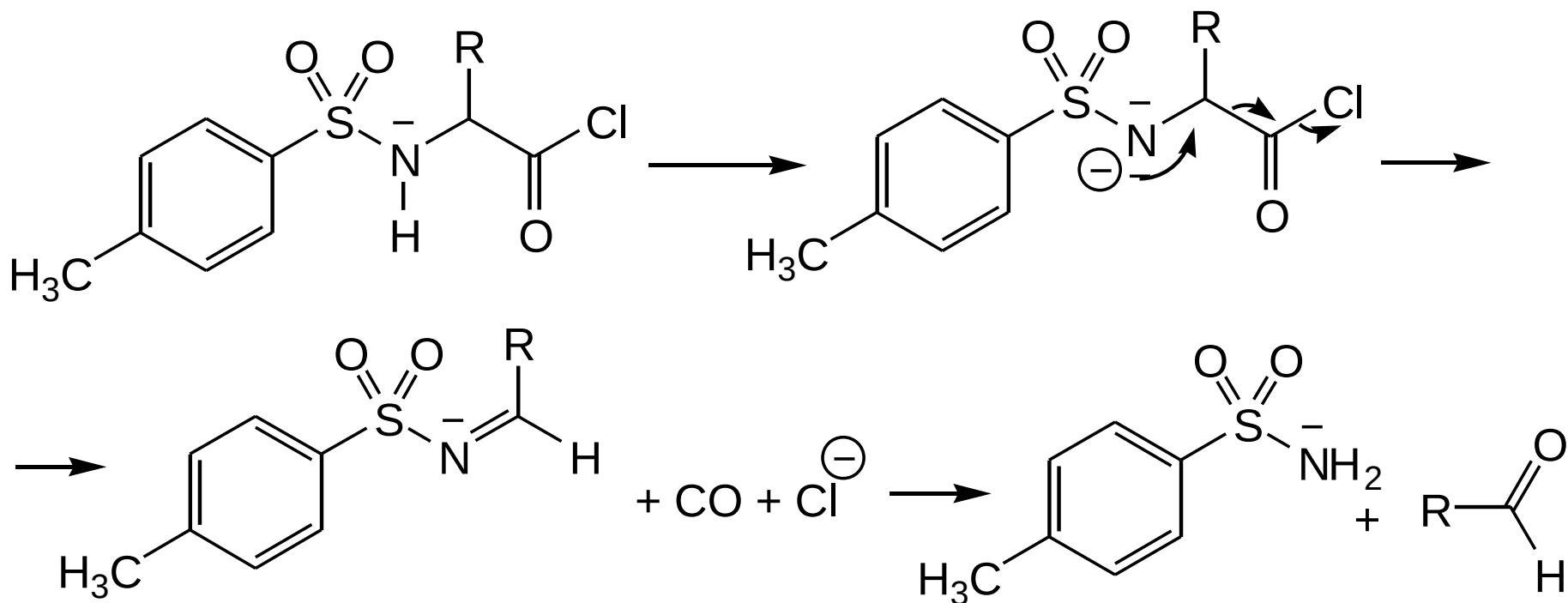
Ostony zawierające siarkę lub fosfor

p-Toluenosulfonyl (tosyl, Tos-).



Usuwanie:

Na/NH₃, ciekły HF, TFMSA, HBr/AcoH w obecności fenolu (b. powoli), redukcja elektrolityczna, fotoliza itp.



Użyty do osłony grupy aminowej glutaminy i kwasu glutaminowego promuje cyklizację. (powstaje pochodna kwasu piroglutaminowego).

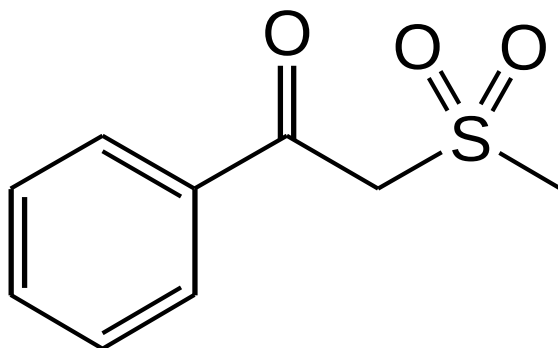
Wprowadzanie:

działanie chlorkiem kwasu p-toluenosulfonowego na sól sodową aminokwasu, w środowisku zasadowym.

Inne osłony tego typu:

benzylosulfonyl - usuwany przez redukcję sodem w ciekłym amoniaku,
wodorolizę przy użyciu niklu Raneya, ciekły HF;
analogicznie usuwana osł. 4-metylobenzylosulfonylowa;

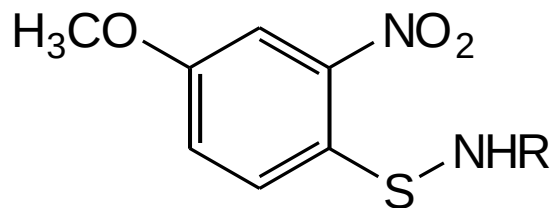
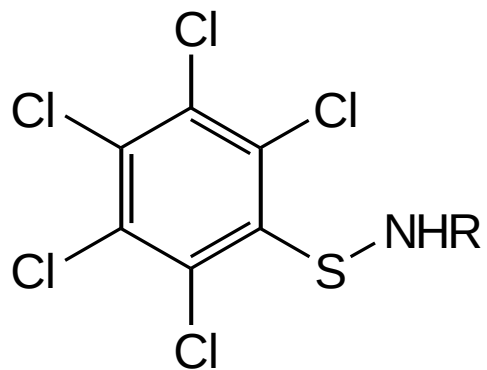
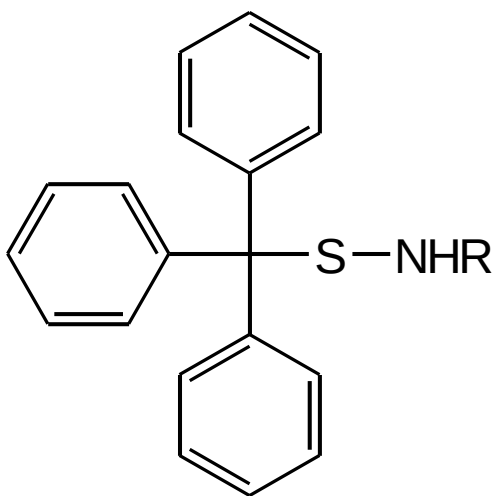
Ostona 2-fenyl-2-oksoetylosulfonylowa:



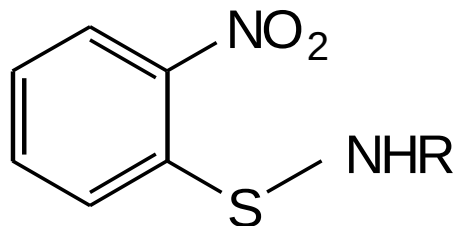
Usuwanie:

Na/NH₃, ciekły HF, TFMSA, HBr/AcoH w obecności fenolu (b. powoli),
redukcja elektrolityczna, fotoliza itp.

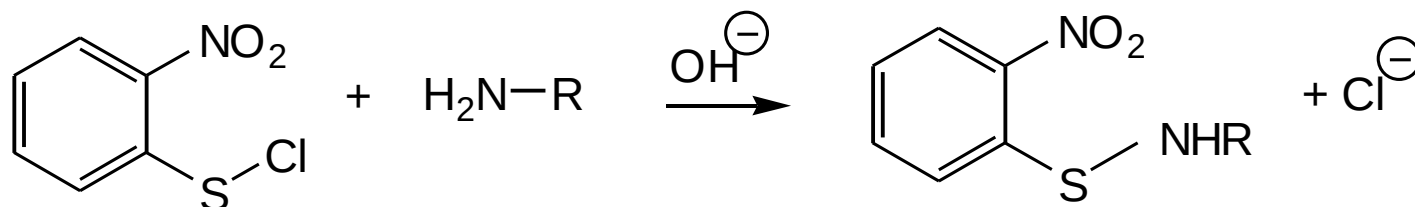
Pochodne sulfenylowe



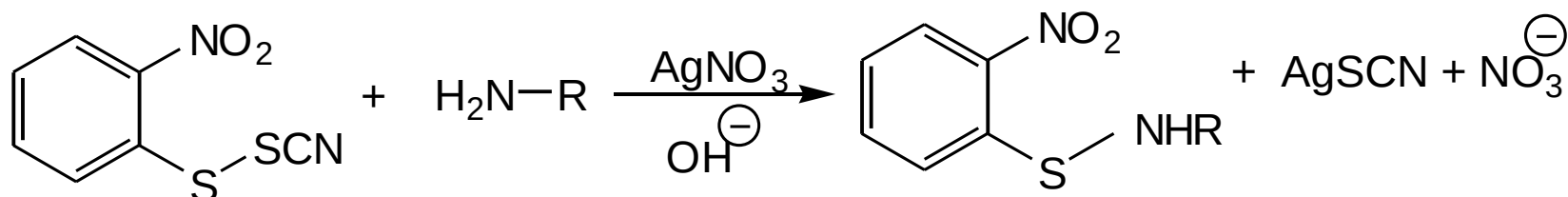
Ośłona o-nitrofenylosulfenylowa (Nps).



Wprowadzanie:

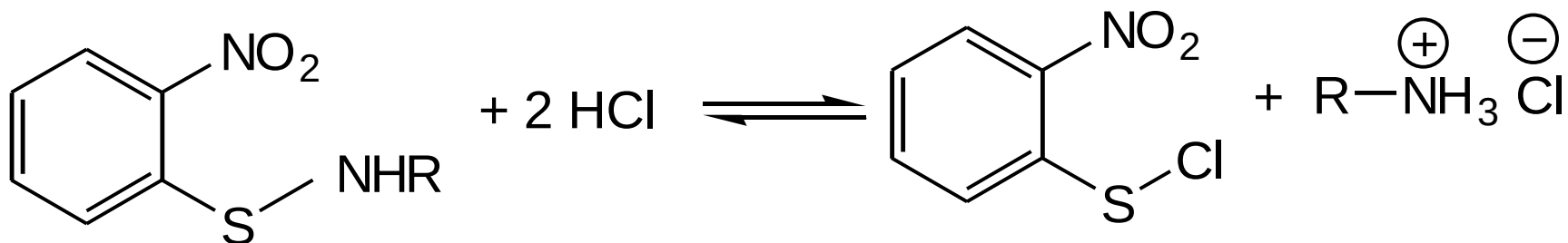


lub:

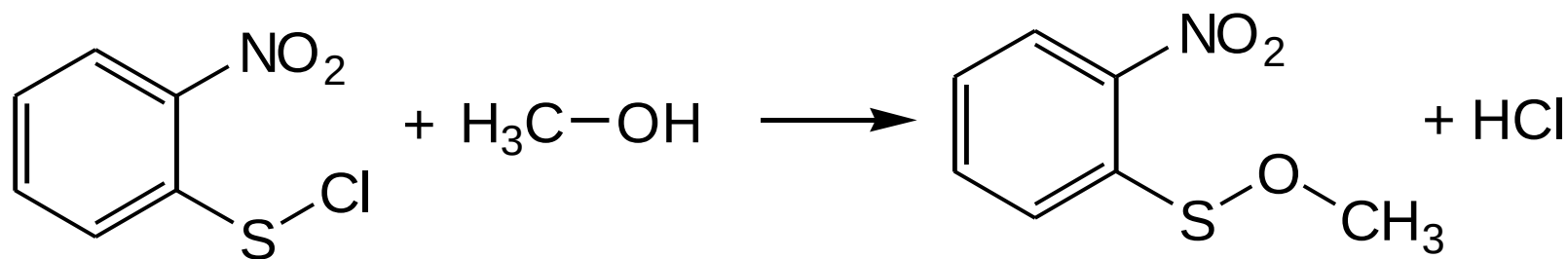


Nitrofenylosulfenyloaminokwasy przechowuje się w postaci soli z dicykloheksyloaminą (ze względu na labilność w środowisku kwaśnym).

Usuwanie:

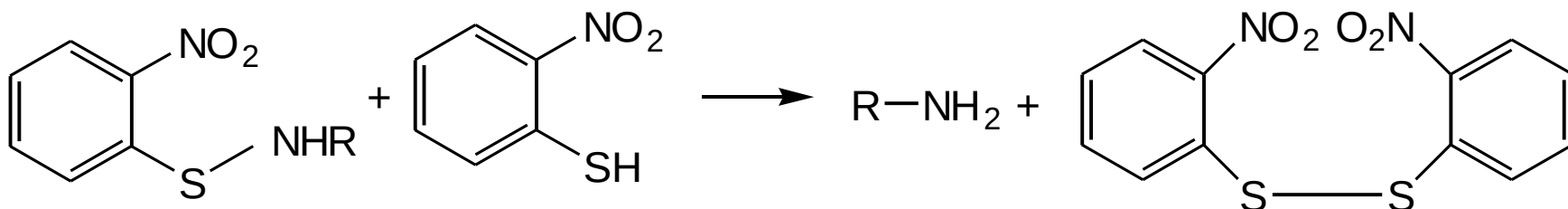


W metanolu dodatkowo zachodzi reakcja:

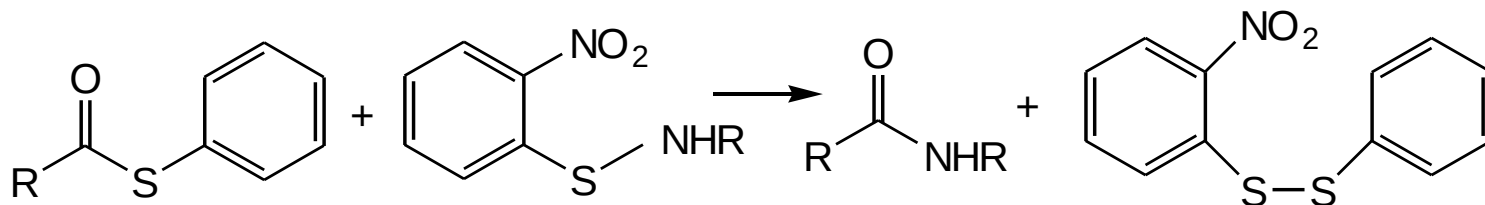


W innych rozpuszczalnikach dodaje się zmiataczy, w celu usunięcia powstającego chlorku o-nitrofenylosulfenylu.

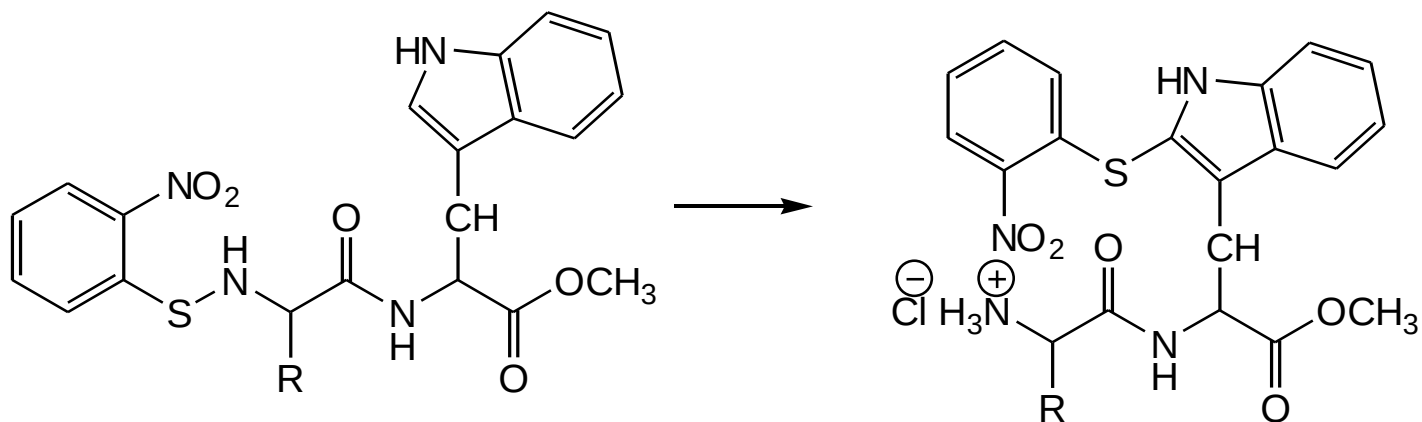
- użycie kwasu nadchlorowego, p-toluenosulfonowego itp.
- użycie imidu kwasu benzenosulfonowego. Tworzy on często krystaliczne sole z uwalnianymi aminami;
- reduktywna desulfuryzacja za pomocą wysyconego wodorem niklu Raneya (nie można zastosować do peptydów zawierających metioninę i/lub cysteinę);
- odblokowanie za pomocą nukleofili, takich jak siarczki, wodorosiarczki, jodowodór, tioacetamid, tiomocznik, kwas tioglikolowy, tiouretany, kwas tioglikolowy, kwas tioglikolowy, merkaptoetanol i inne tiole (tiofenole):



Użycie estrów tiofenylowych do odblokowania grupy aminowej i acylowania:



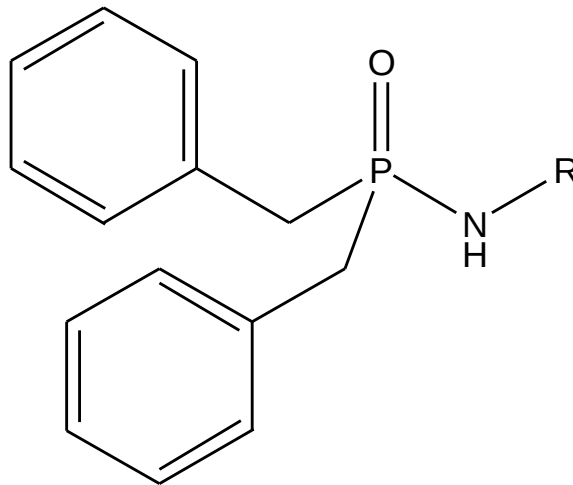
Reakcje uboczne związane z osłoną Nps:



Osłona Nps jest także usuwana przez grupę sulfhydrylową reszty cysteiny.

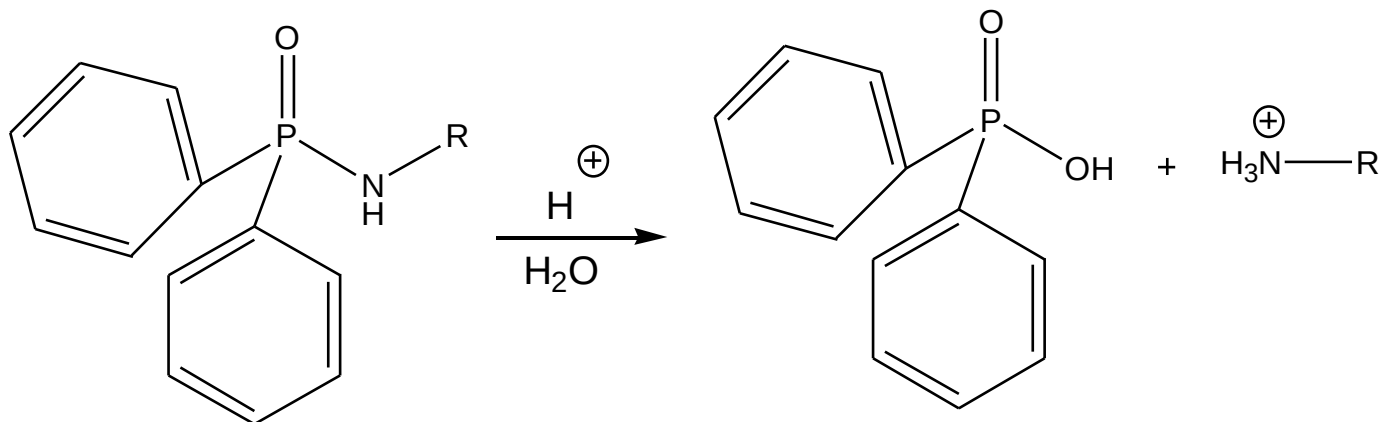
Grupy osłonowe zawierające fosfor

Grupa dibenzylofosforylowa i pochodne z podstawionymi pierścieniami fenylowymi.



- zbyt zatłoczona sterycznie, powoduje trudności w acylowaniu tak osłoniętymi aminokwasami.

Grupa difenylofosfinowa.

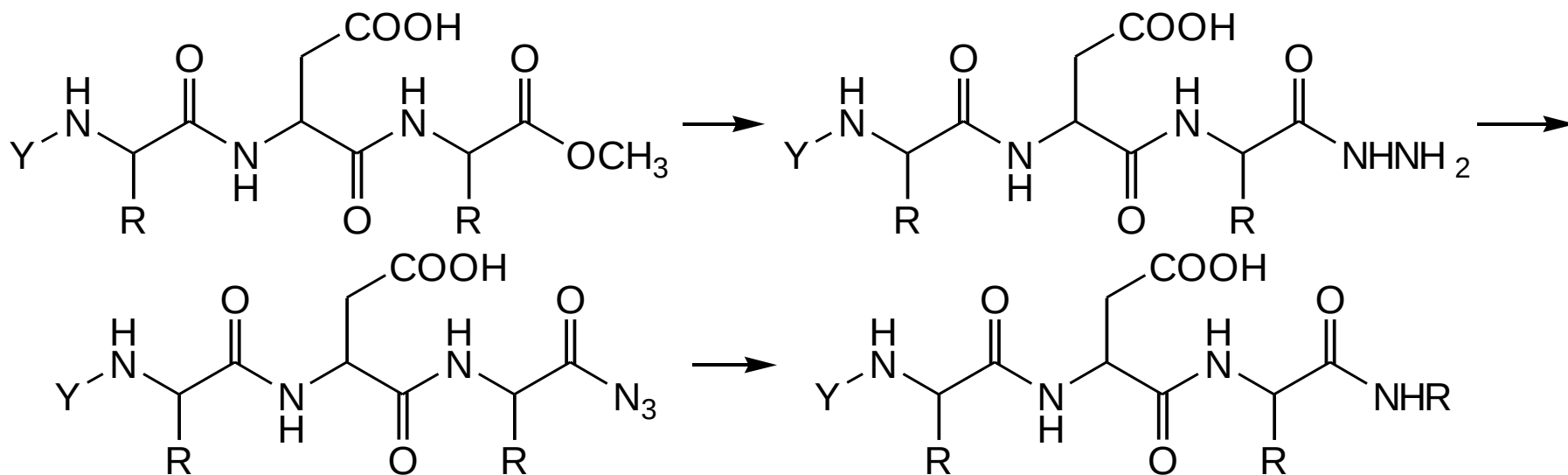


- odporna na wodorolizę, hydrazynolizę, i działanie zasadami;
- usuwana wodnymi roztworami średnio silnych kwasów;
- w trakcie jej usuwania nie powstają karbokationy, które są przyczyną licznych reakcji ubocznych w trakcie syntezy peptydów.

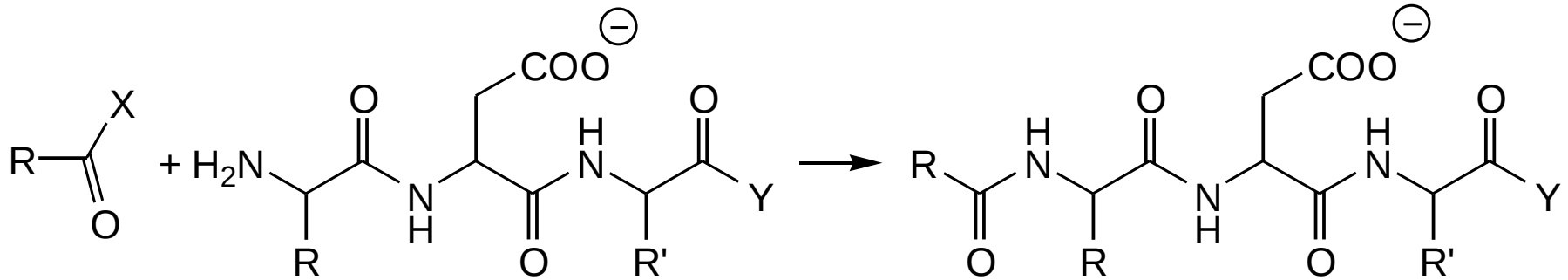
Ośłony grup funkcyjnych łańcuchów bocznych.

Asp i Glu

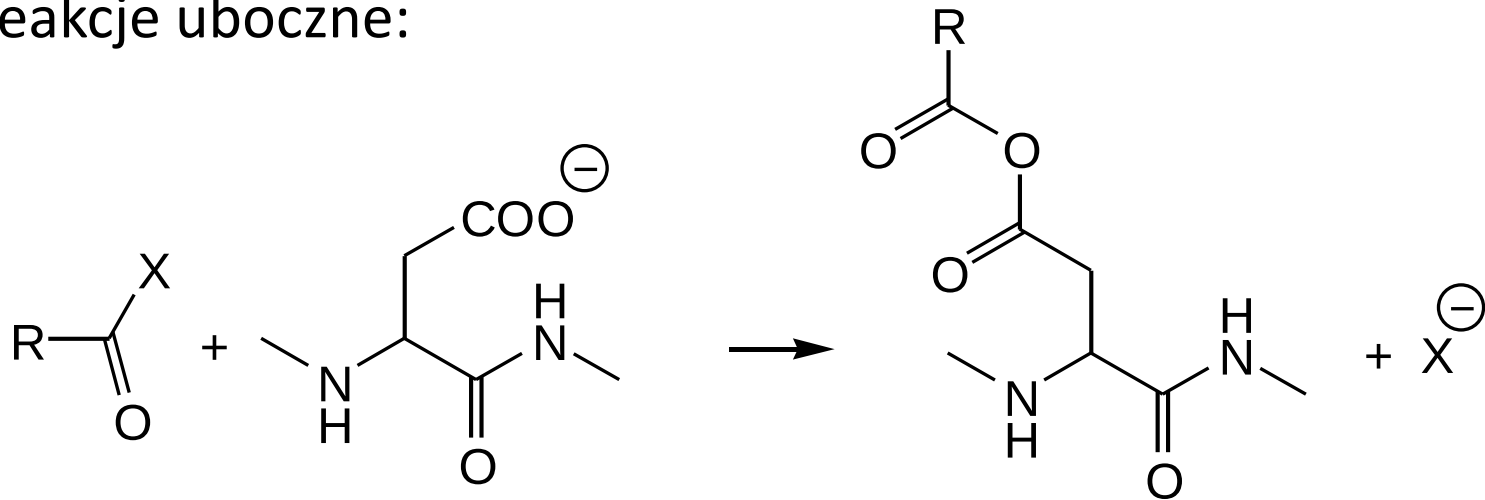
nieosłonięta grupa karboksylowa:



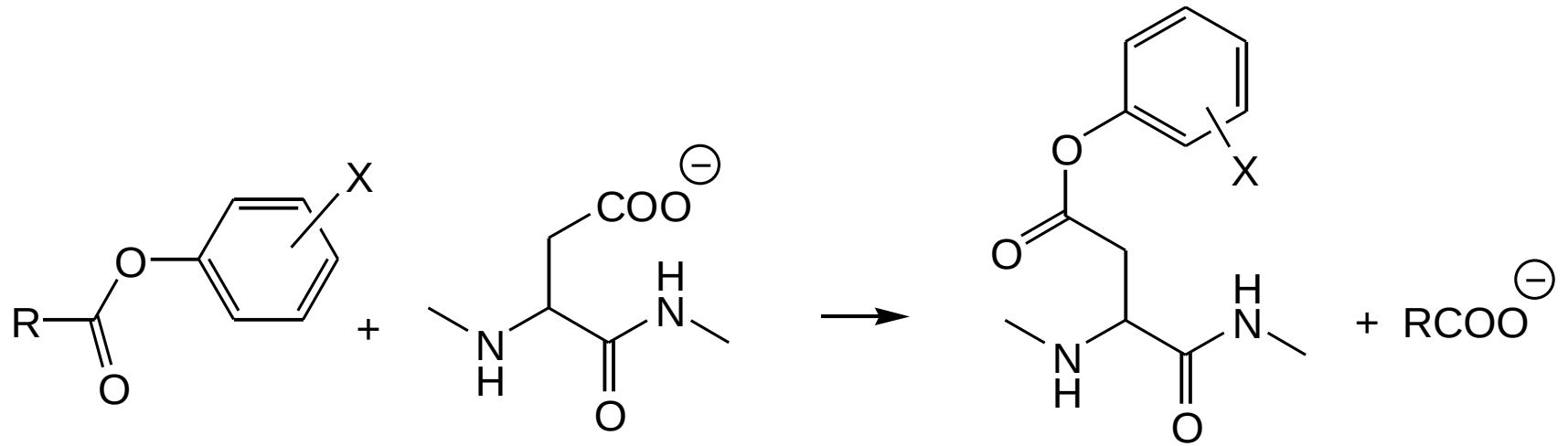
Ostrona w postaci soli:



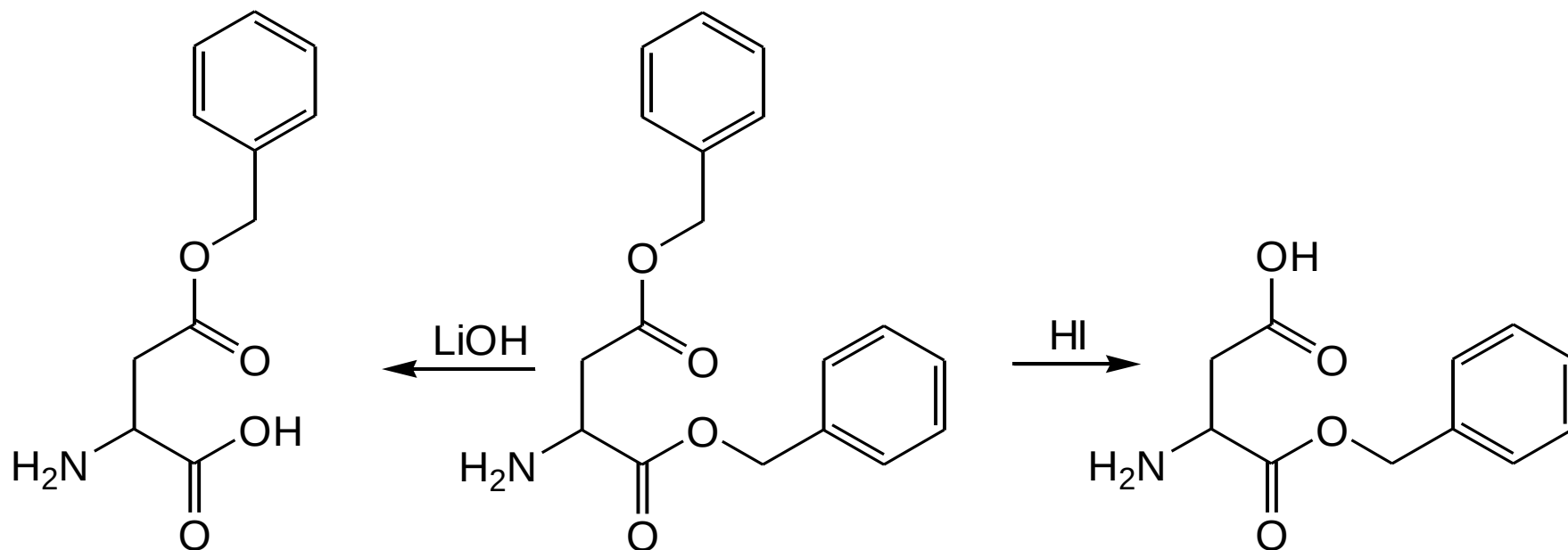
Reakcje uboczne:



Transestryfikacja

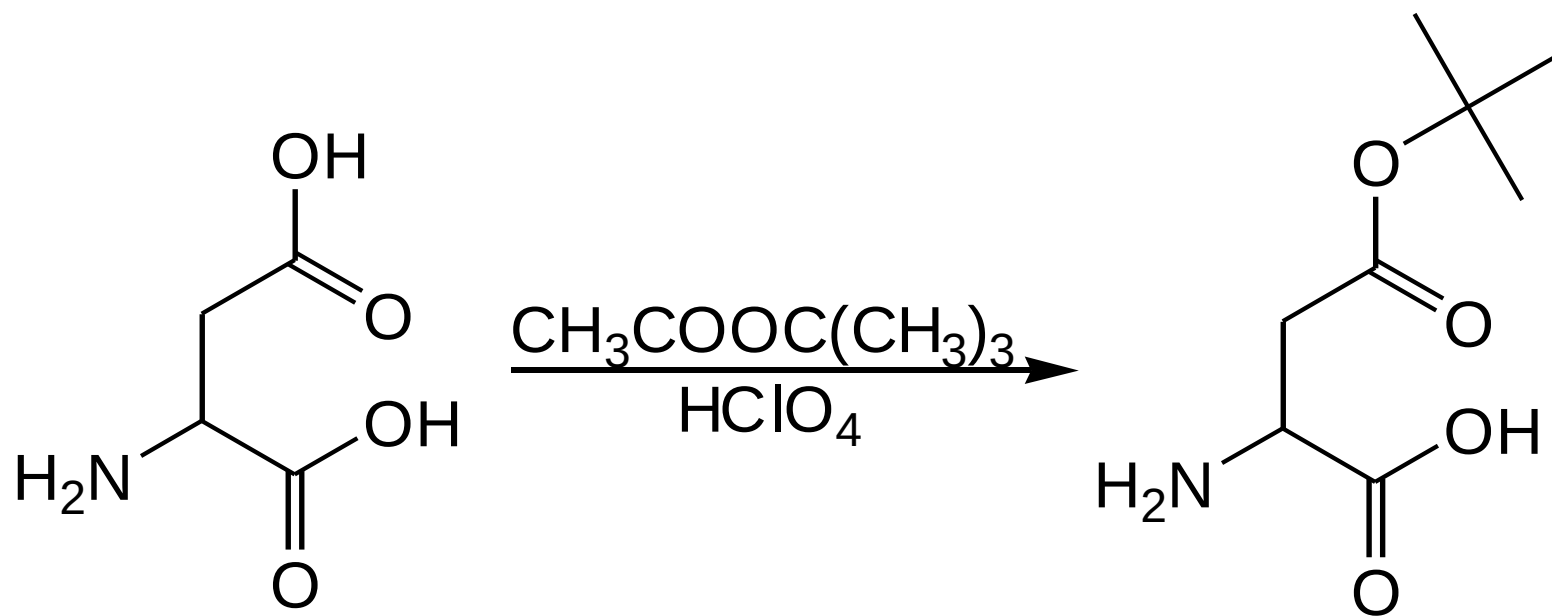


Wprowadzanie osłon na grupy karboksylowe łańcuchów bocznych:

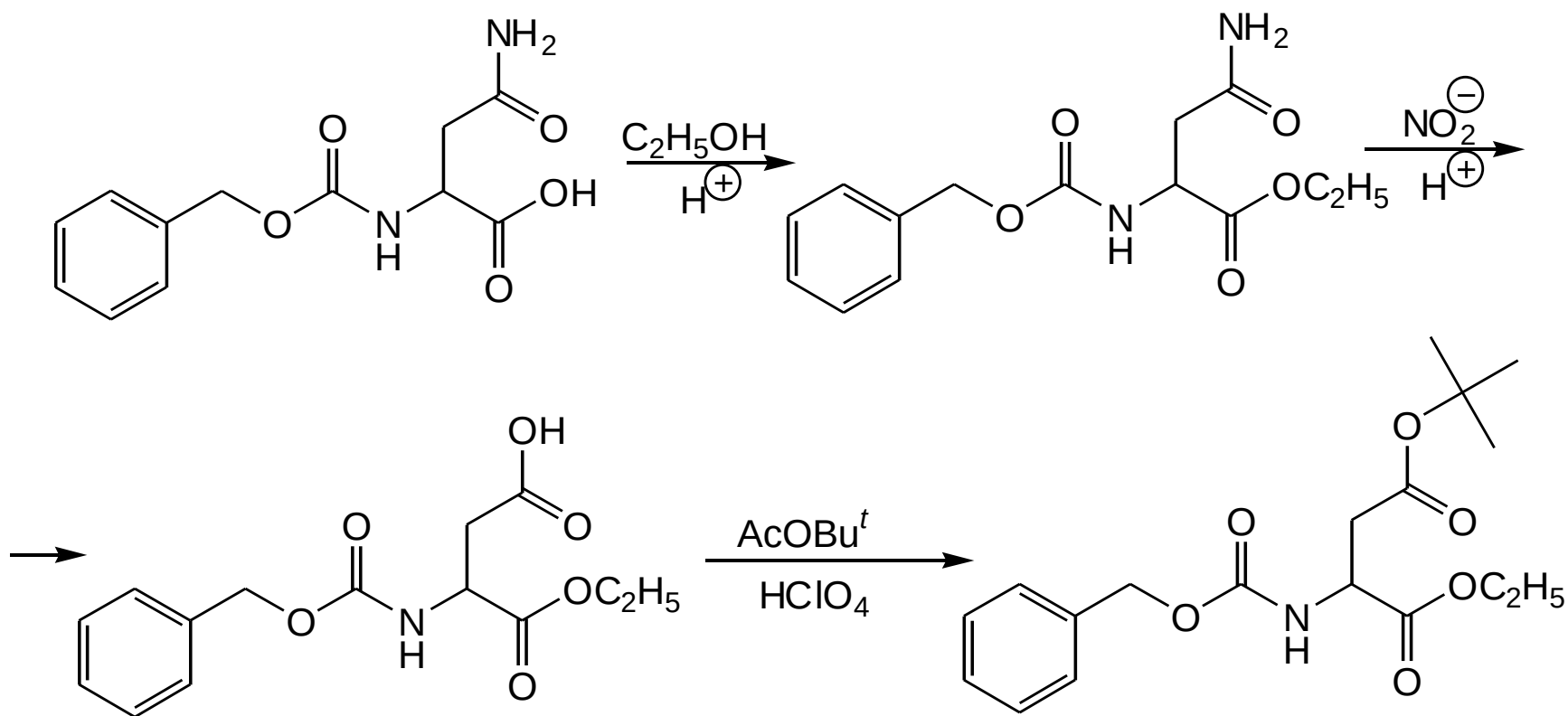


- Katalityczna hydroliza w obecności jonów Cu²⁺

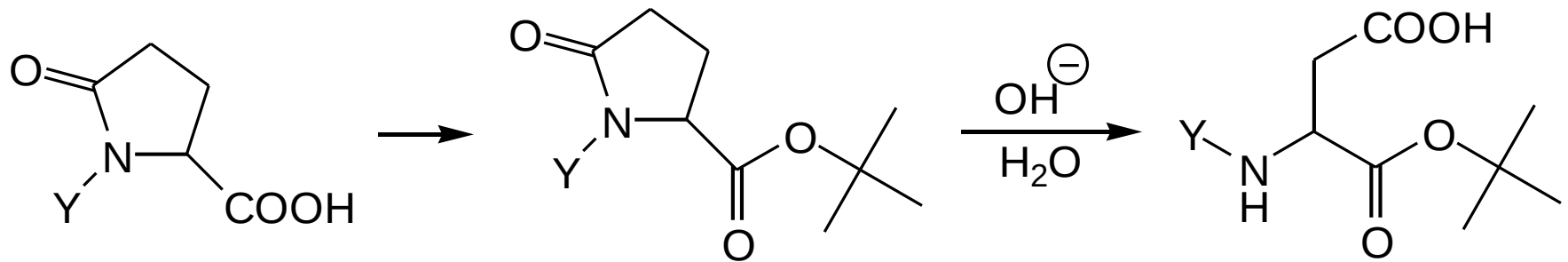
Transestryfikacja:



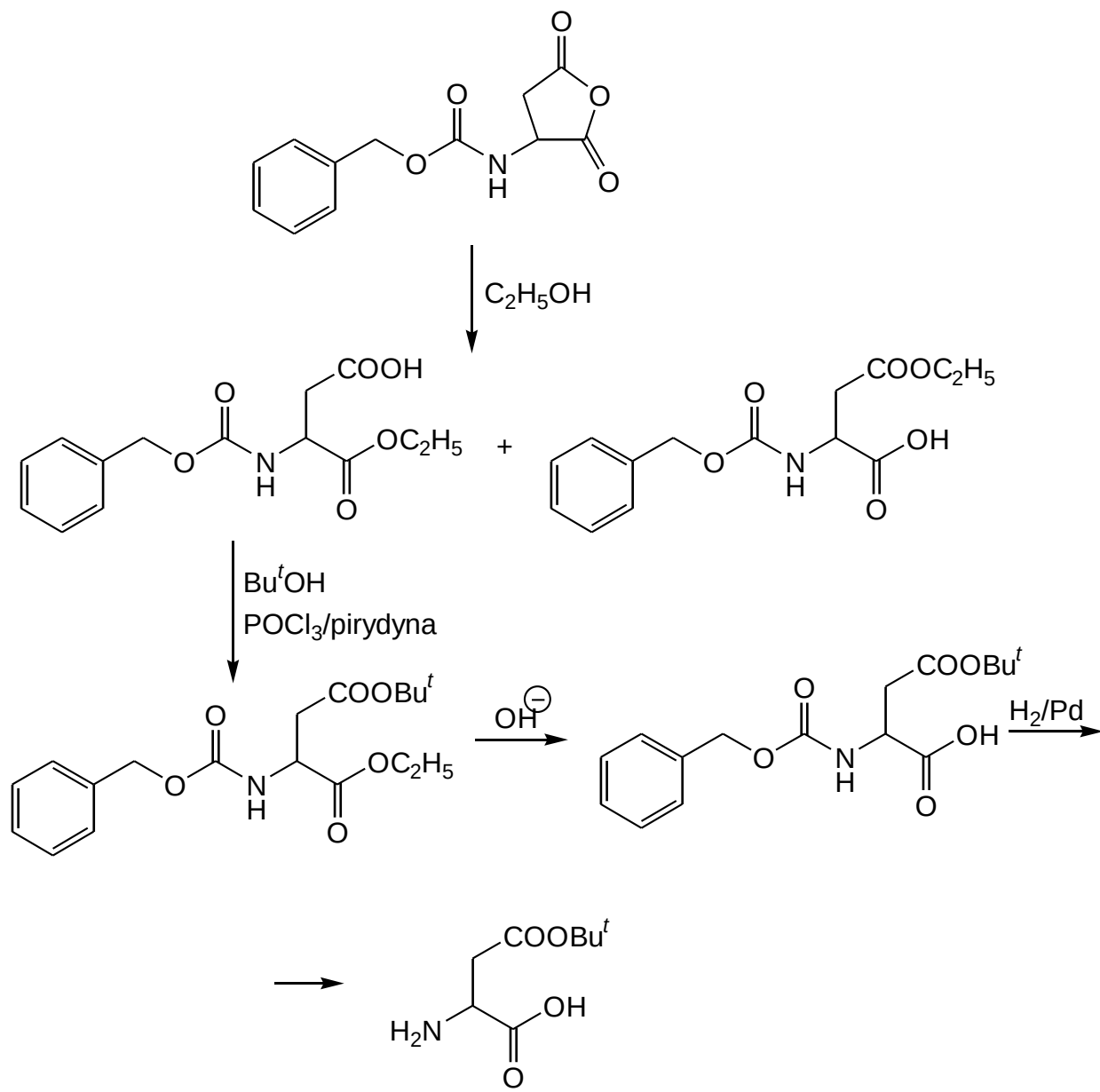
Otrzymywanie estrów z asparaginy i glutaminy

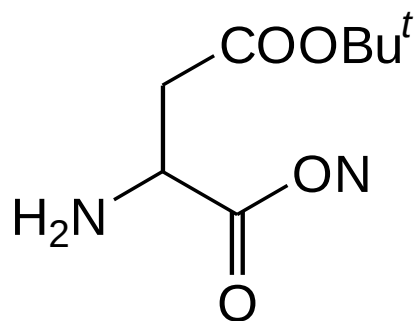
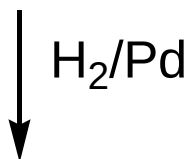
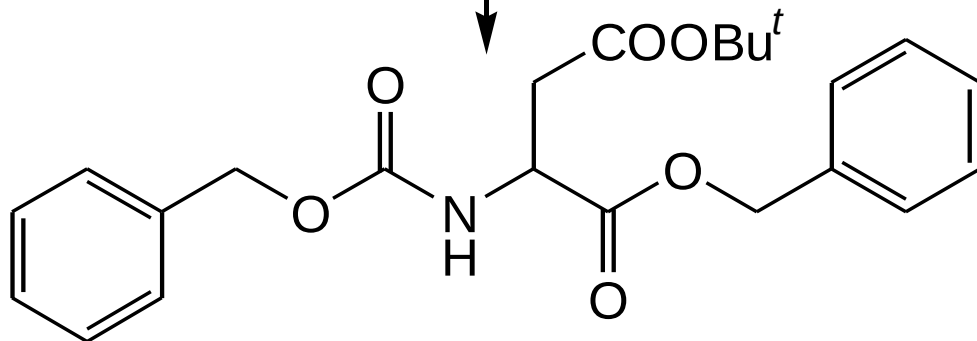
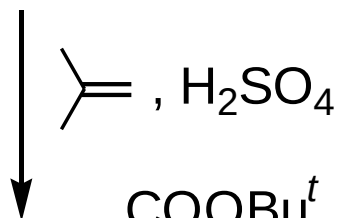
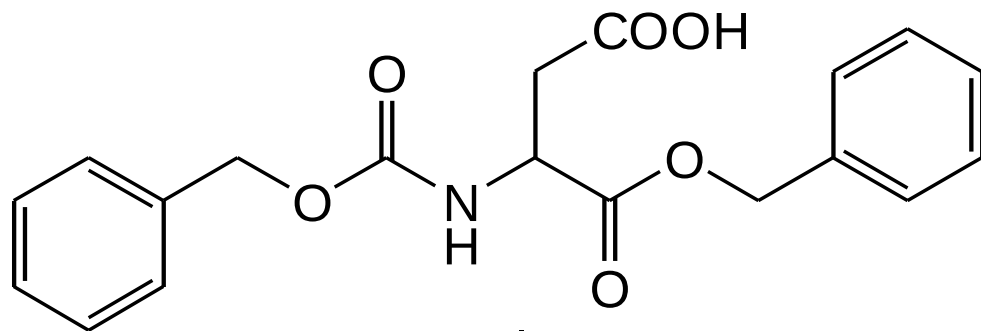


Otrzymywanie α -estrów kwasu glutaminowego z pochodnych kwasu piroglutaminowego

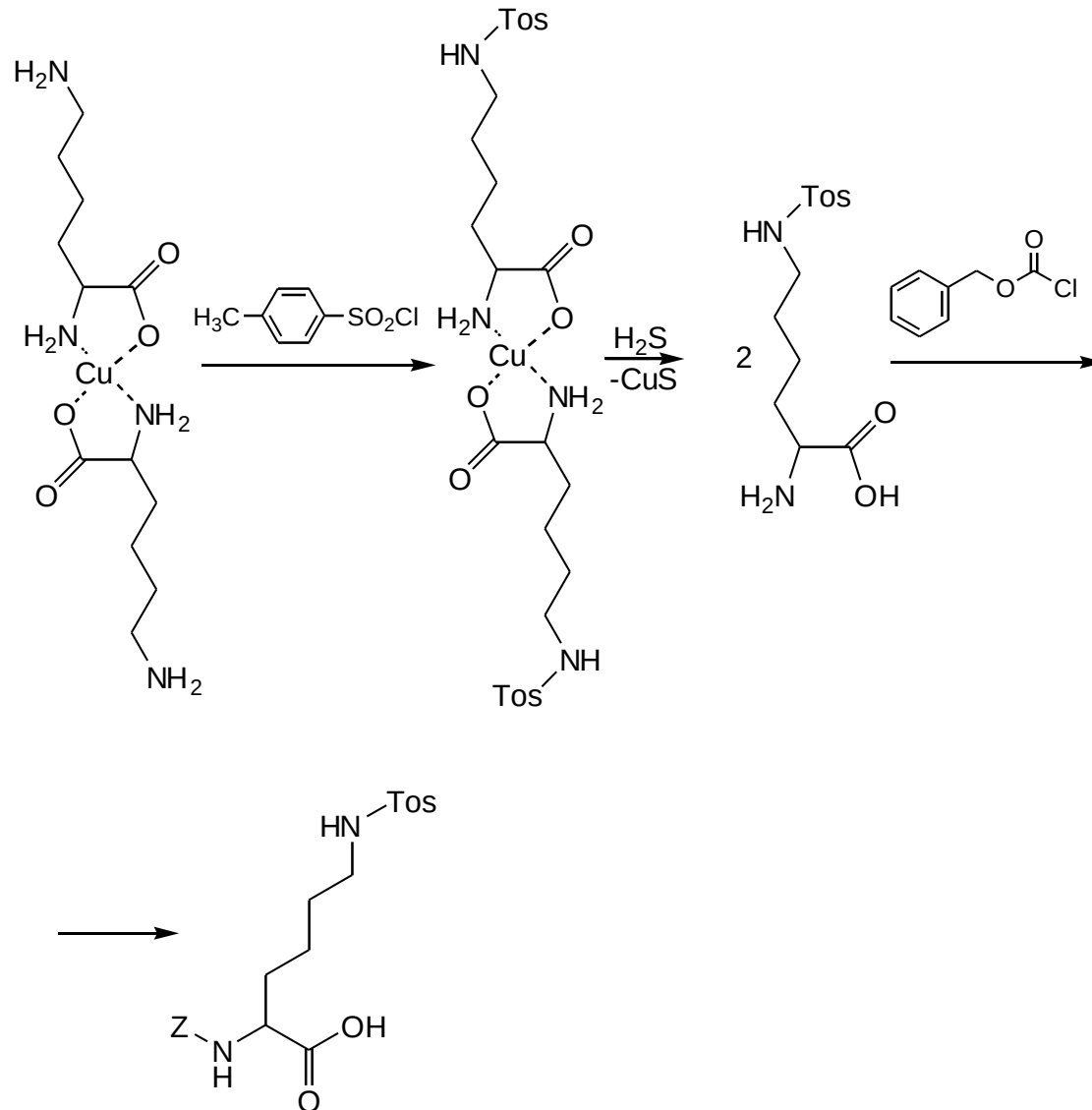


Otrzymywanie estrów z bezwodników kwasu asparaginowego:

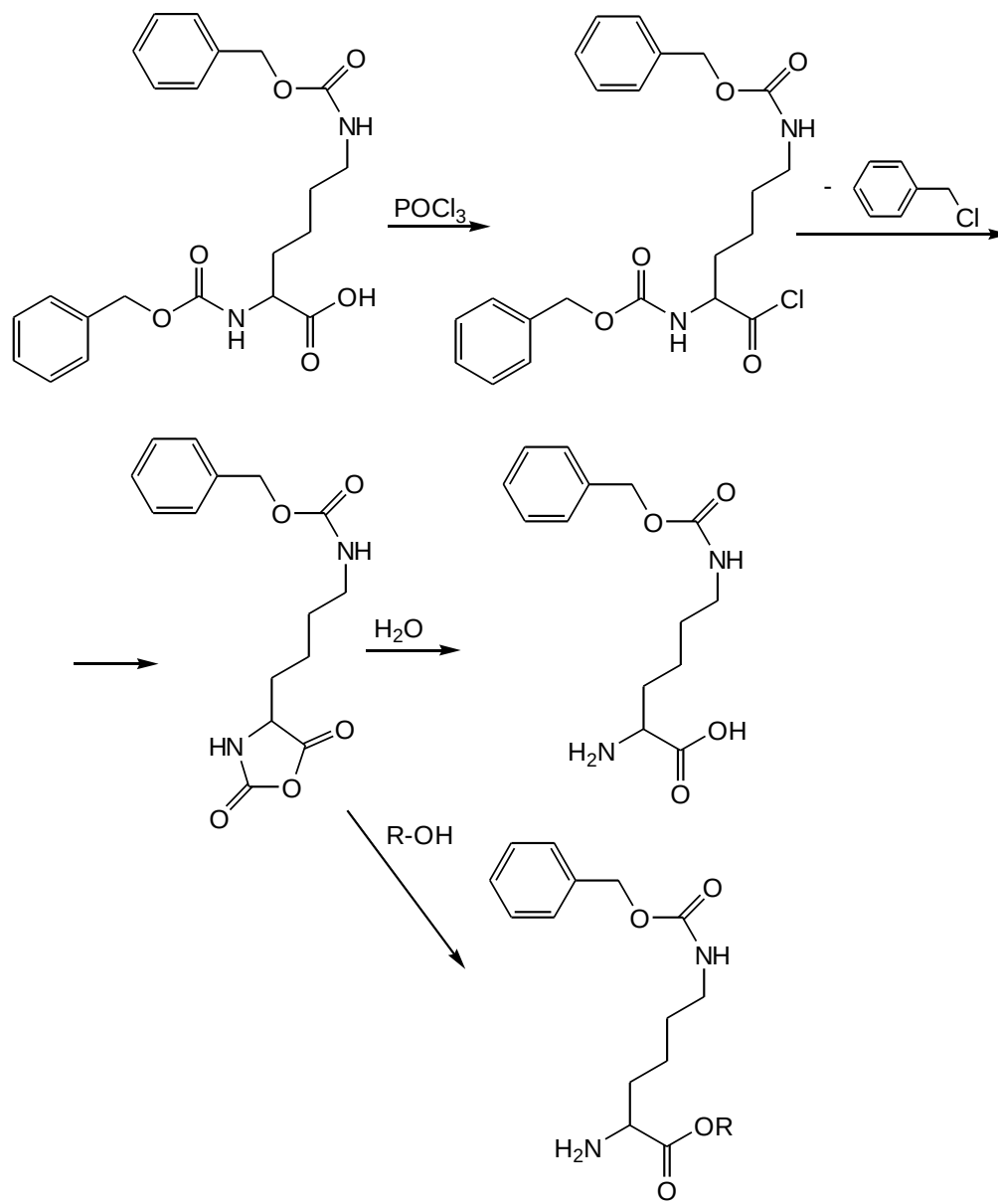




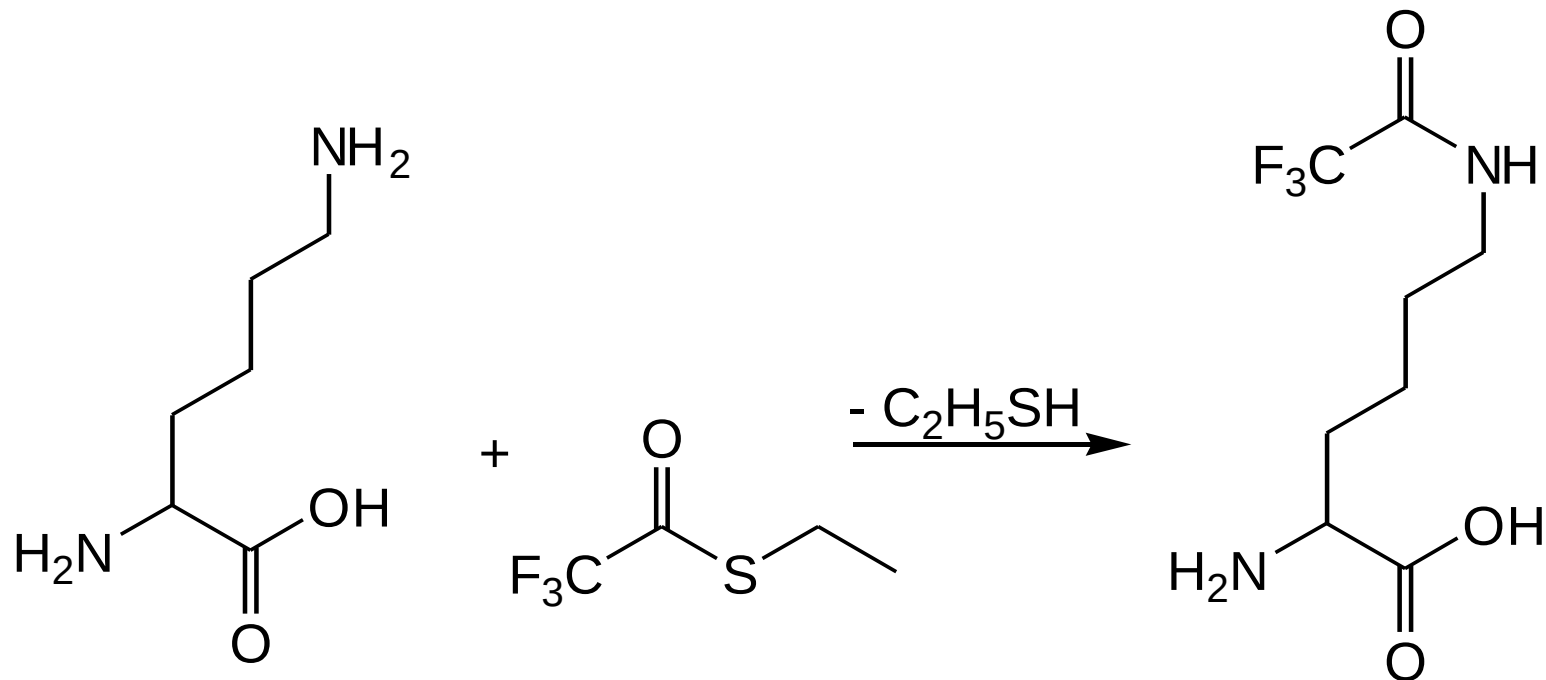
Grupy aminowe łańcuchów grup bocznych lizyny i ornityny.



Otrzymywanie N ϵ -benzyloksykarbonylizyny z N $^{\alpha}$,N $^{\epsilon}$ -dibenzyloksykarbonylizyny

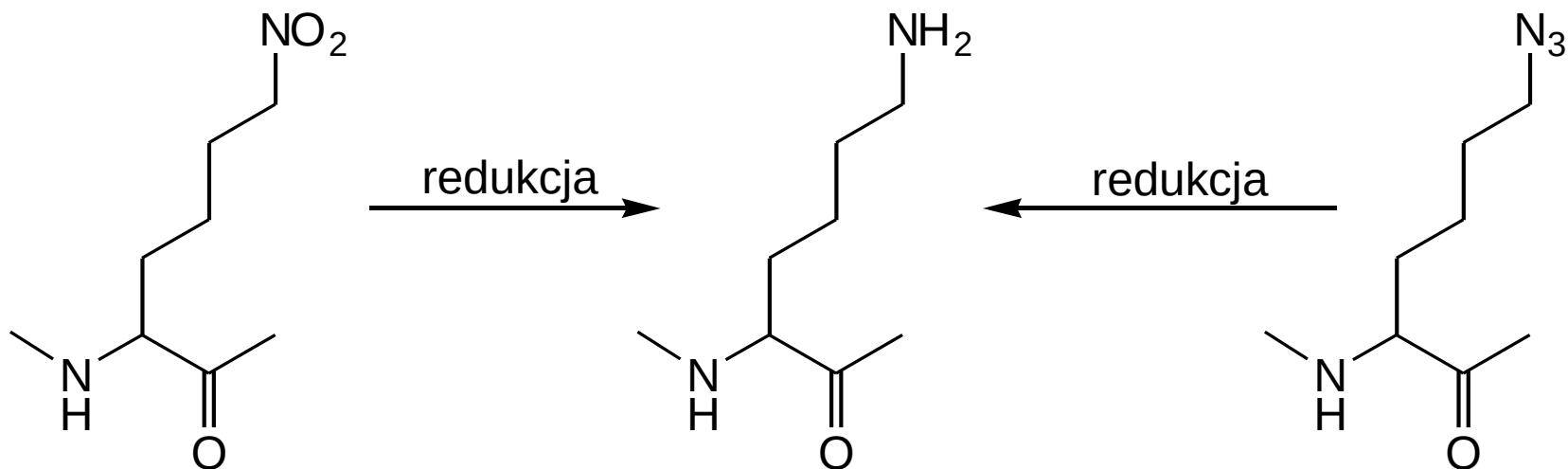


Wprowadzanie trifluoroacetylu z użyciem trifluorooctanu tioetyetylu



niewielkie ilości N α -trifluoroacetylolizyny można łatwo oddzielić ze względu na lepszą rozpuszczalność w wodzie.

Zastąpienie lizyny kwasem α -amino- ε -nitro- lub
 α -amino- ε -azydokapronowym.

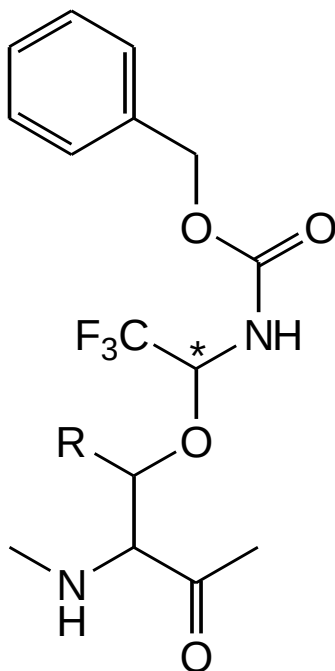


N ^ε -	N ^α -
Tos	Z, Boc,
Z	p-metoksybenzylokarbonyl, Boc, Adoc, Bpoc, izonikotynylokarbonyl, Nps, For,
Boc	Z, Tos, Bpoc, Fmoc
Ac, Tfa, For, 2-Cl-Z, 4-Cl-Z, 4-NO ₂ -Z, Pht	Boc

Grupy hydroksylowe seryny, treoniny i tyrozyny.

- najbardziej reaktywny jest hydroksyl fenolowy tyrozyny (przy wyższych pH). Mniej reaktywny jest hydroksyl łańcucha bocznego seryny, najmniej treoniny (zawady steryczne).
- Osłony typu acylu - mało przydatne względu na podatność na atak nukleofilowy (możliwość przesunięcia acylu $O \rightarrow N$);
- Tos- skłonność do β -eliminacji z utworzeniem dehydroaminokwasu;

2,2,2-trifluoroacetylo-1-benzyloksykarbonyloaminoetyl



usuwane przez wodorolizę, HBr/TFA, TFMSA, HFliq. itp.

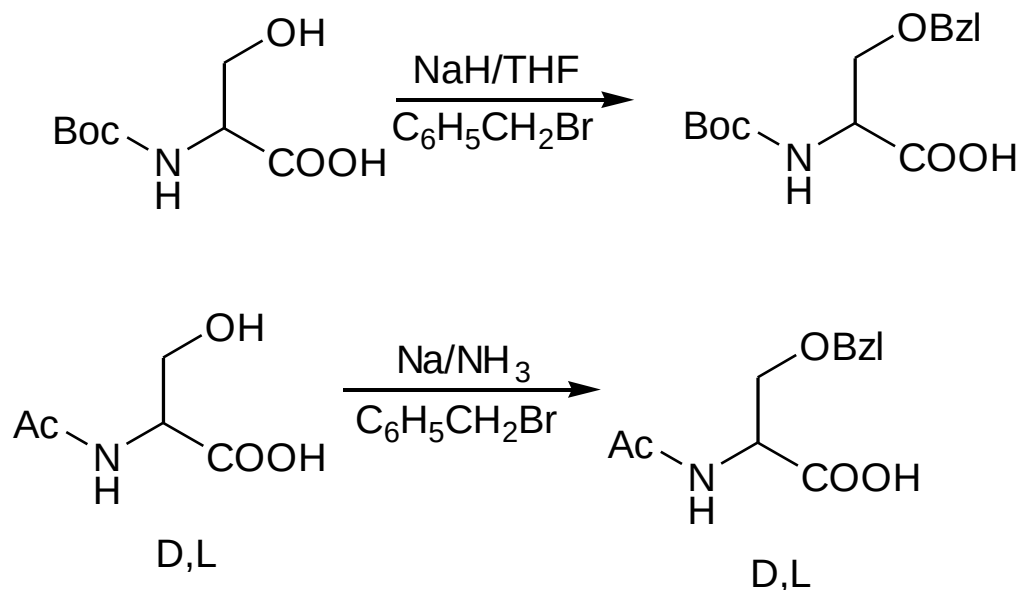
Ośłony typu alkilu.

Benzyl –

może być usunięty przez wodorolizę lub acydolizę (ośłona Z- może być selektywnie usuwana w obecności np. DCHA);

Wprowadzanie:

bezpośrednie alkirowanie grup hydroksylowych (trudne w przypadku seryny i treoniny);

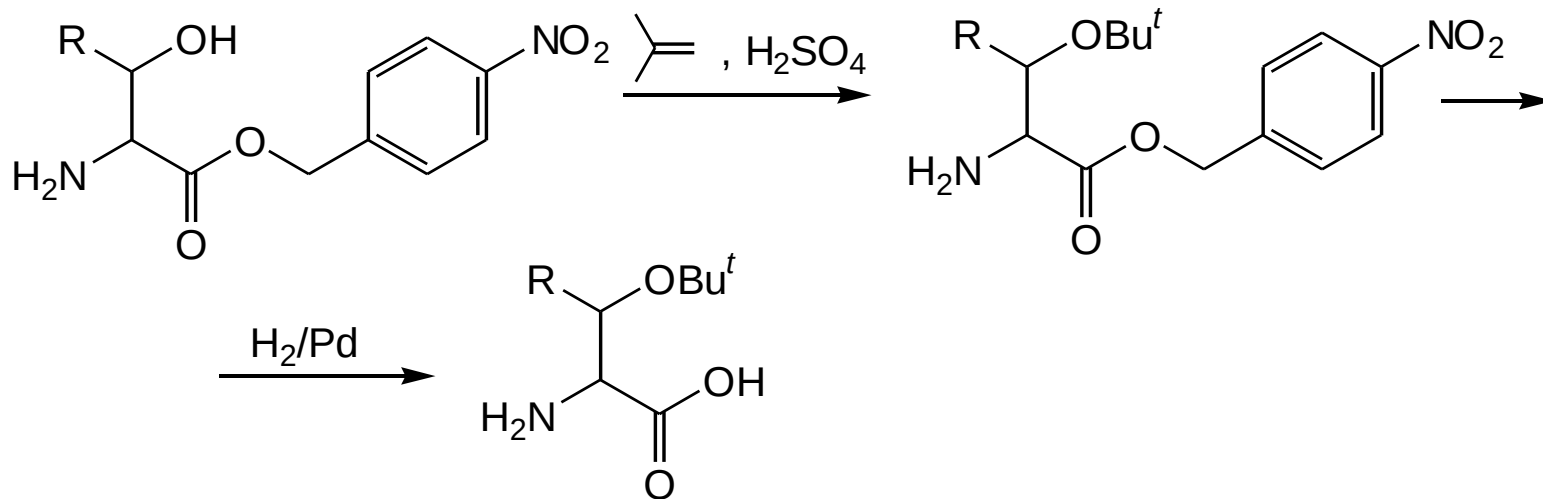


• Niebezpieczeństwo reakcji ubocznych (N-alkilowanie). Metody te dają niskie wydajności pochodnych O – benzylo treoniny. Lepsze wydajności uzyskuje się w tym ostatnim przypadku przez alkirowanie (i równoczesną estryfikację) treoniny alkoholem benzylowym w obecności kwasu benzylosulfonowego, a następnie zmydlenie otrzymanego estru.

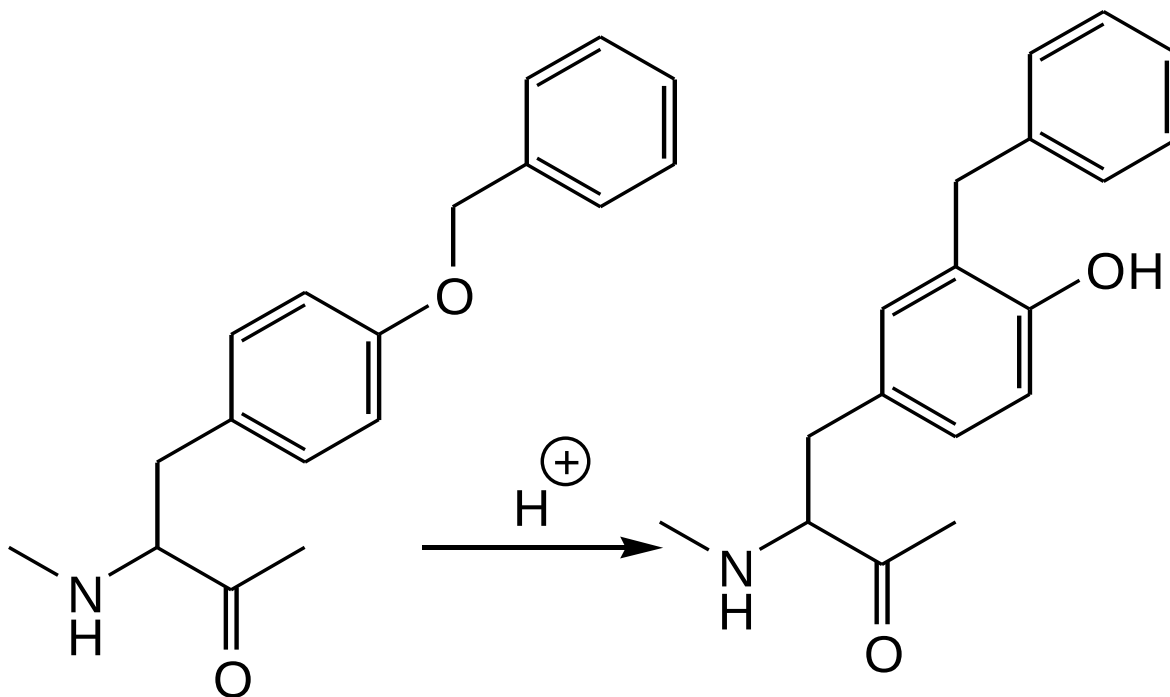
tert-butyl.

Wprowadzanie:

działanie izobutenem w środowisku kwasowym:

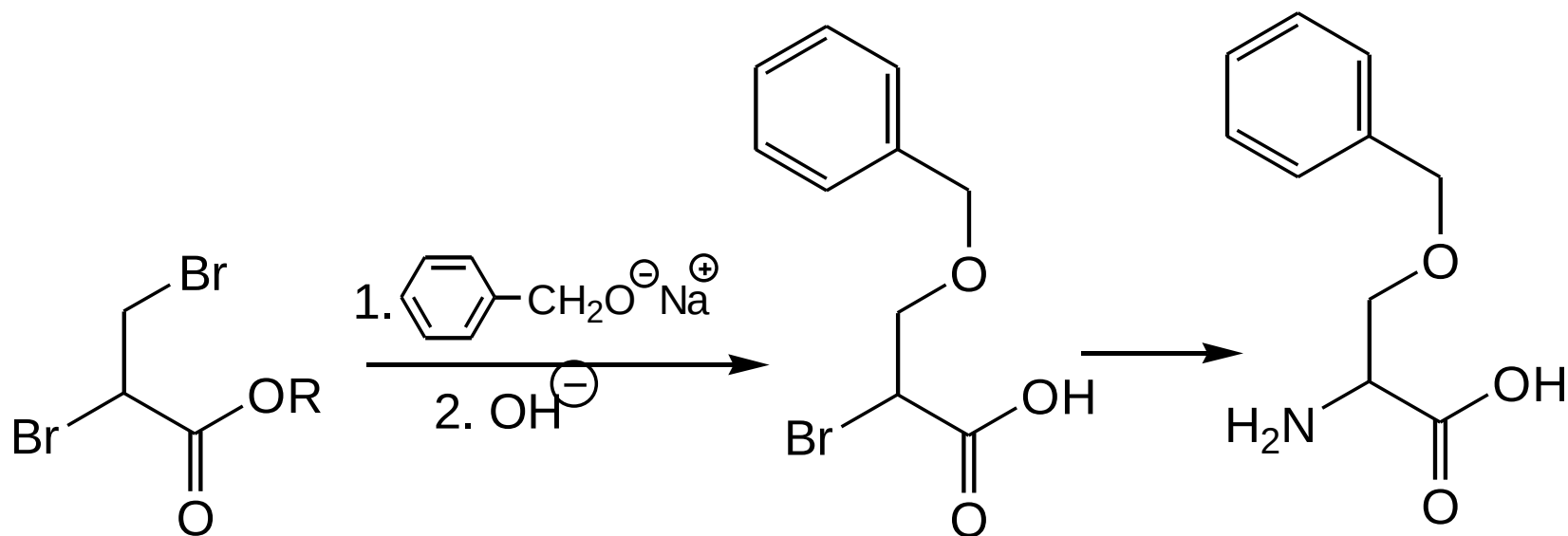


Reakcje uboczne związane z osłonami typu alkilu



- nie występuje w przypadku HBr/AcOH (w obecności fenolu), mieszaninie TFA/tioanizol ;
- problem przeniesienia alkilu jest mniej zaznaczony w przypadku 2-chlorobenzylu (zawady steryczne) lub 2-bromobenzylloksykarbonylu (O-2-BrZ- pochodne tyrozyny)
- usuwanie *tert*-butylu powoduje na ogół mniej reakcji ubocznych związanych z powstawaniem karbokationów niż usuwanie benzylu.
- Trityl, benzhydryl – duże zawady steryczne powodujące spowolnienie reakcji acylowania aktywowanymi pochodnymi seryny i treoniny zawierającymi te osłony.

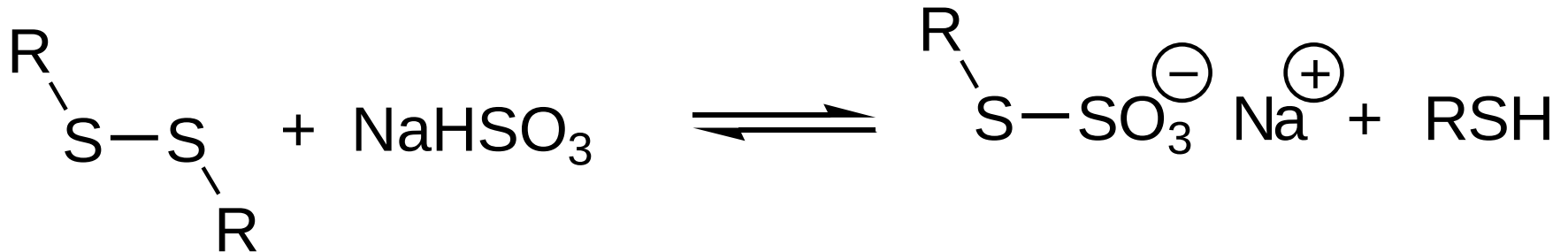
Alternatywna metoda syntezy *O*-benzyloseryny:



Grupa sulfhydrylowa cysteiny.

- grupa sulfhydrylowa jest silnie nukleofilowa i podatna na utlenienie;
- tioloestry są dosyć aktywnymi czynnikami acylującymi;
- można wbudować cystynę, jednakże synteza jest utrudniona ze względu na konieczność budowania dwóch równoległych łańcuchów peptydowych. Występują tu często problemy z rozpuszczalnością

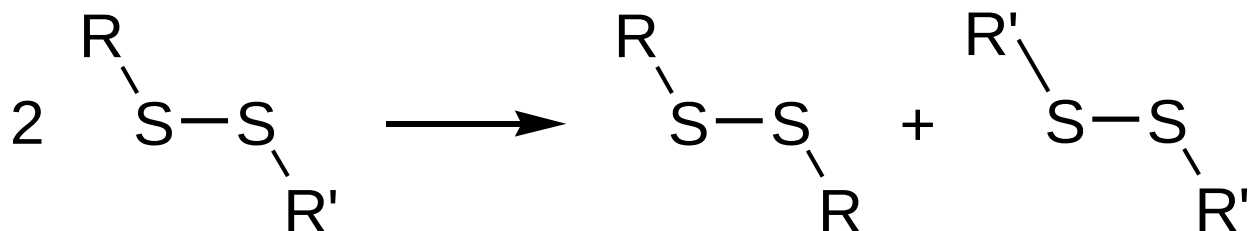
Zastosowanie soli Buntego:



używane do otrzymywania półsyntetycznych insulin itp. Podatne na działanie tioli i kwasów. Zbyt labilne aby mogły by być stosowane w syntezie peptydów.

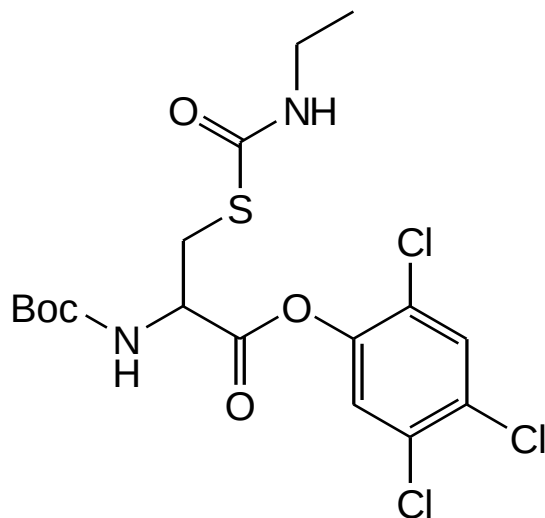
Mieszane disulfidy.

- wykazują tendencję do dysproporcjonowania:

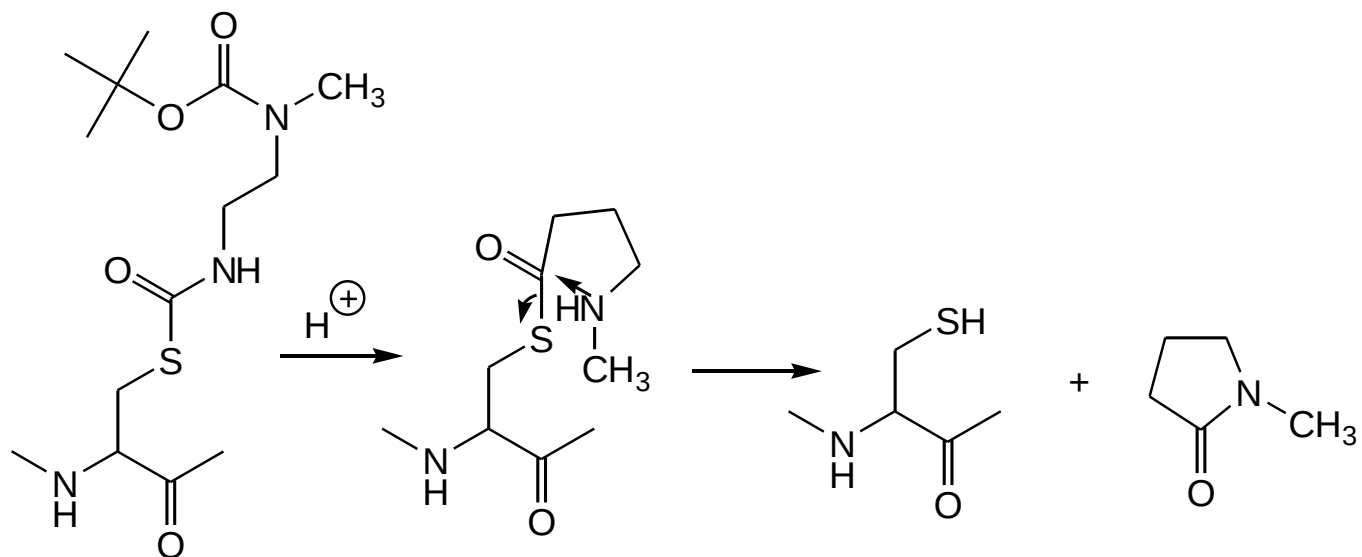
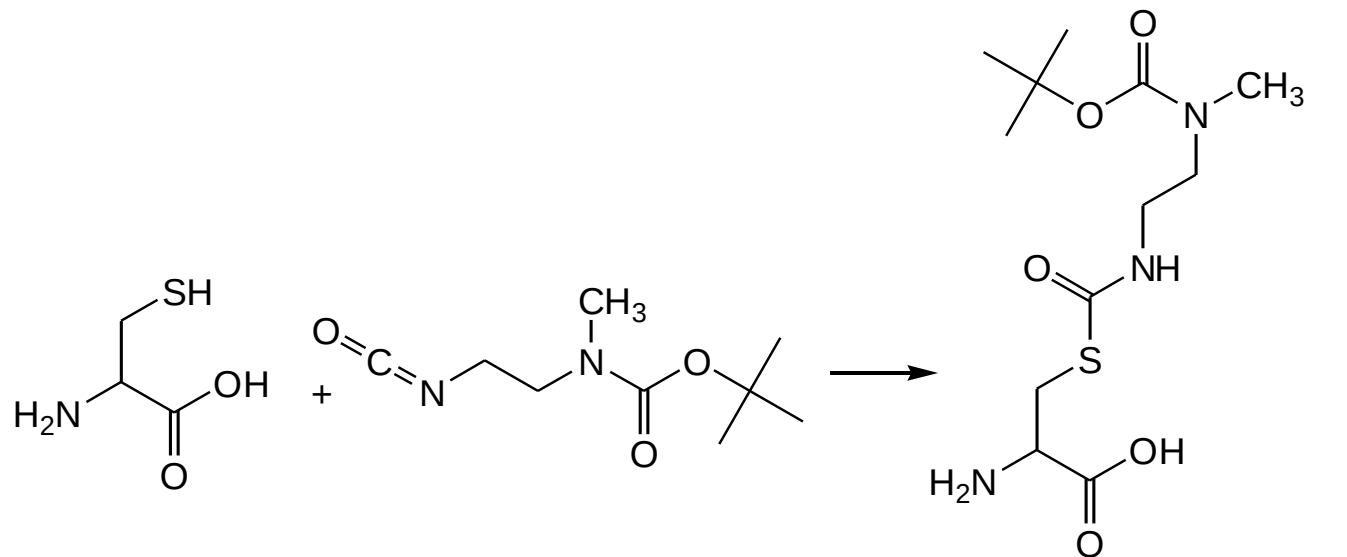


- S-Z, S-Boc, S-p-metoksybenzyloksykarbonyl – mniej reaktywne od innych pochodnych acylowych.

S-etylkarbamoil i pochodne.



usuwane przez wodorotlenek sodu, alkoholany sodu, ciekły amoniak,
hydrazyna sole Hg²⁺, Ag⁺ ;

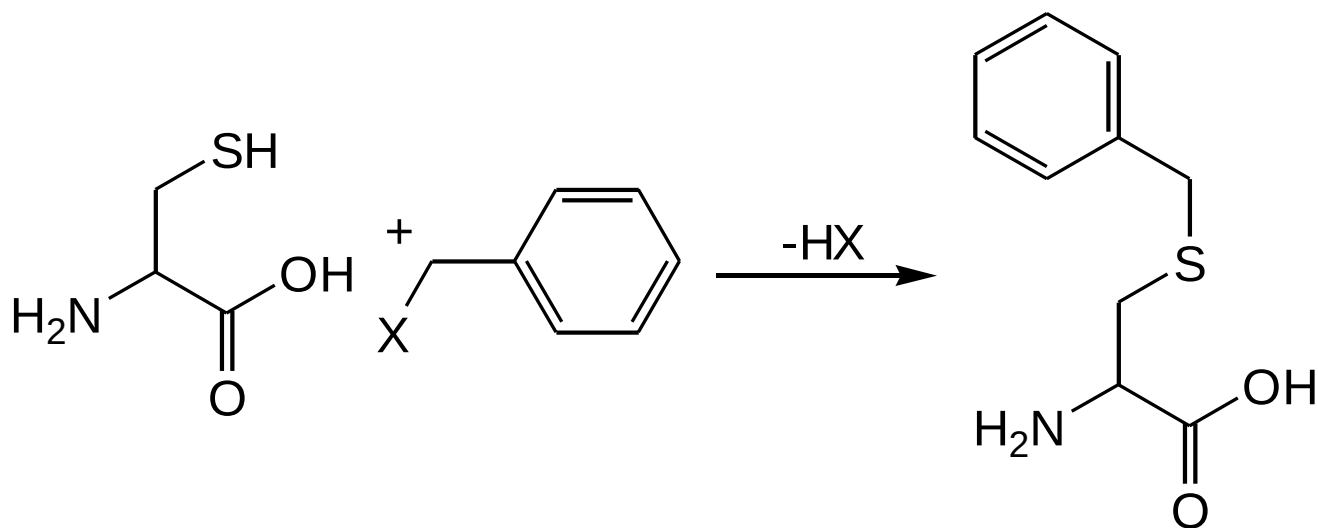


mogą być użyte inne osłony grupy N-metyloaminowej, np. Z, Adoc itp.

Ostony grupy sulfhydrylowej typu alkilu.

Ostona benzykowa (Bzl).

Wprowadzanie:

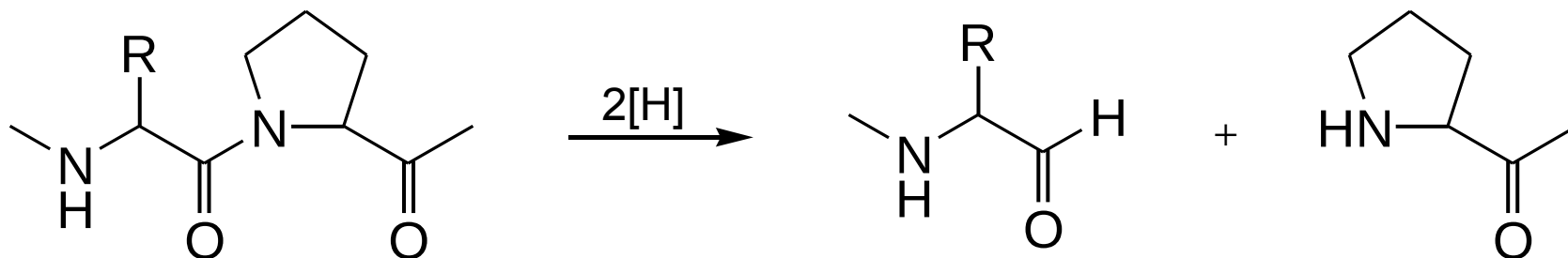


- reakcję prowadzi się w środowisku zasadowym (ciekły amoniak, metanolan sodu/metanol, wodne roztwory zasad).

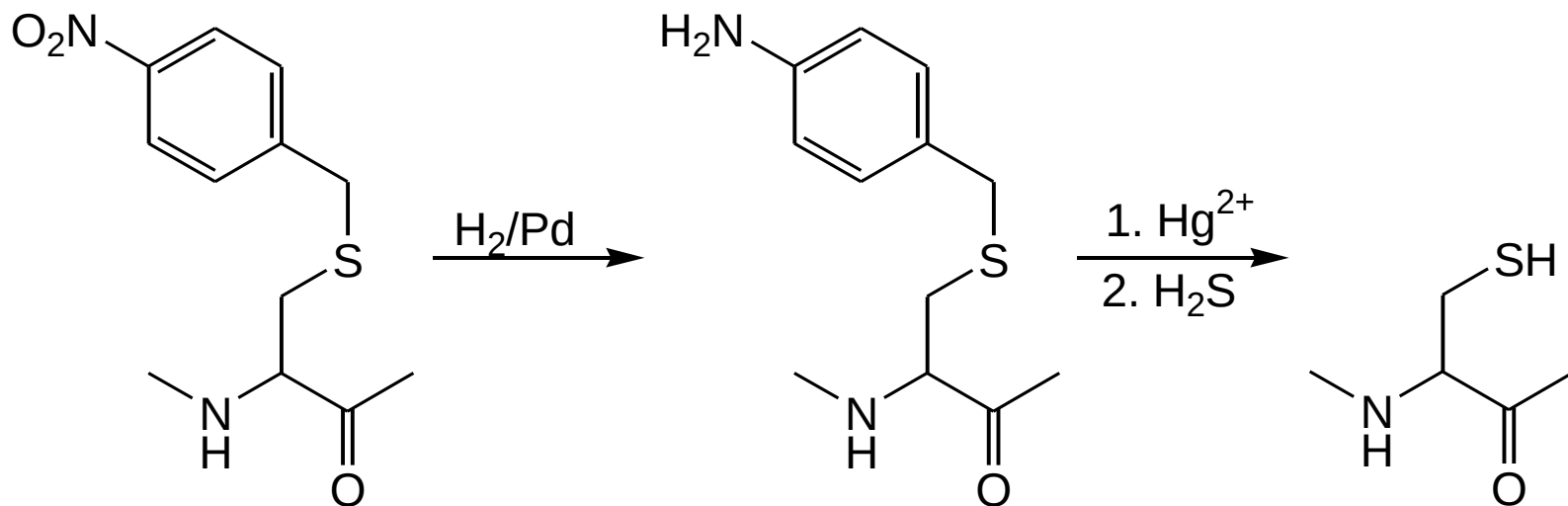
Usuwanie:

ciekły fluorowódór (często reakcja nie przebiega do końca), redukcja sodem w ciekłym amoniaku. Redukcja ta przebiega wolnorodnikowo (oprócz toluenu powstaje dibenzyl).

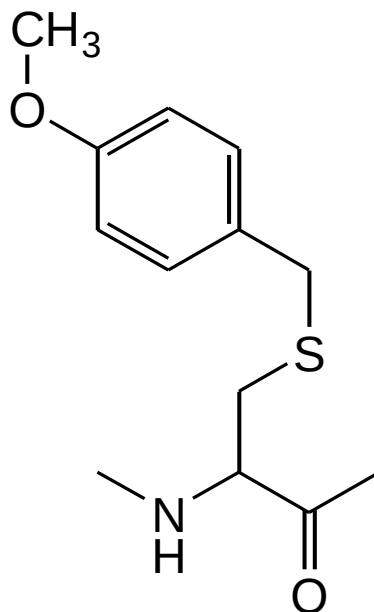
Reakcje uboczne – reduktywne rozszczepienie wiązania peptydowego z proliną:



Ostona p-nitrobenzylowa

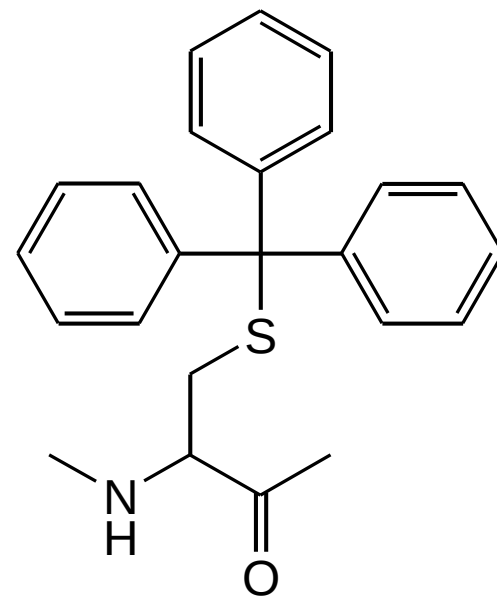
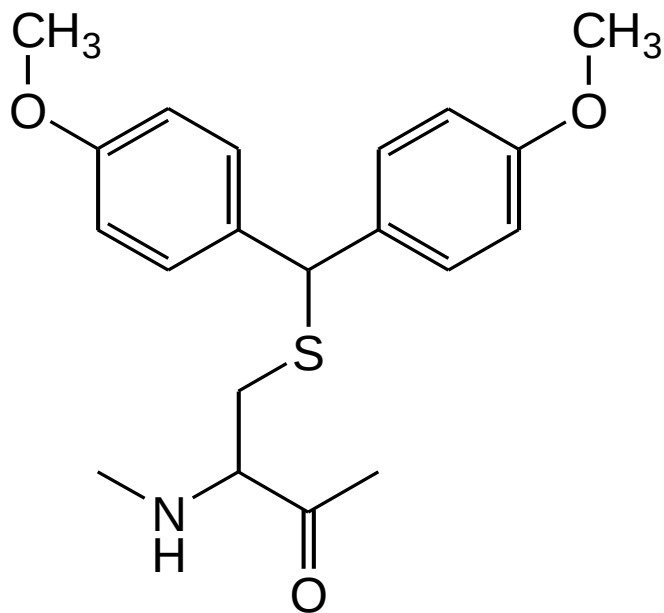
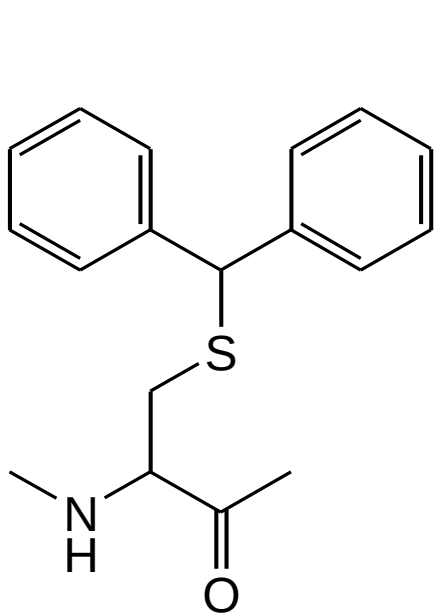


Ostona p-metosybenzylowa (Mob):



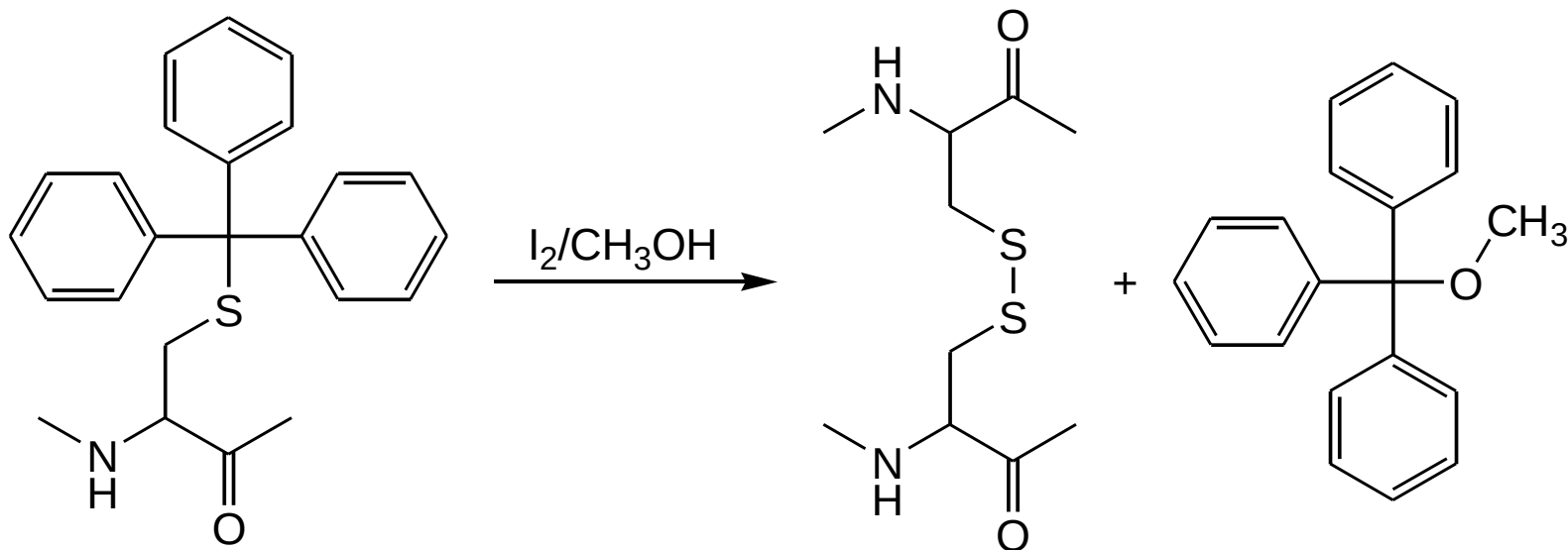
usuwana wrzącym TFA, ciekłym HF, TFMSA.

Ostony: S-difenylometylowa (benzhydrylowa), S-4,4'-dimetoksydifenylowa (dimetoksybenzhydrylowa) i S-trifenylometylowa (tritylowa).



tylko osłona S-tritylowa jest dostatecznie podatna na acydolizę (TFA w obecności efektywnych zmiataaczy karbokationów, np. EDT, TIS, TES);

usuwanie osłony tritylowej roztworem jodu w metanolu, z równoczesnym utlenieniem cysteiny do cystyny:



Inne metody usuwania:

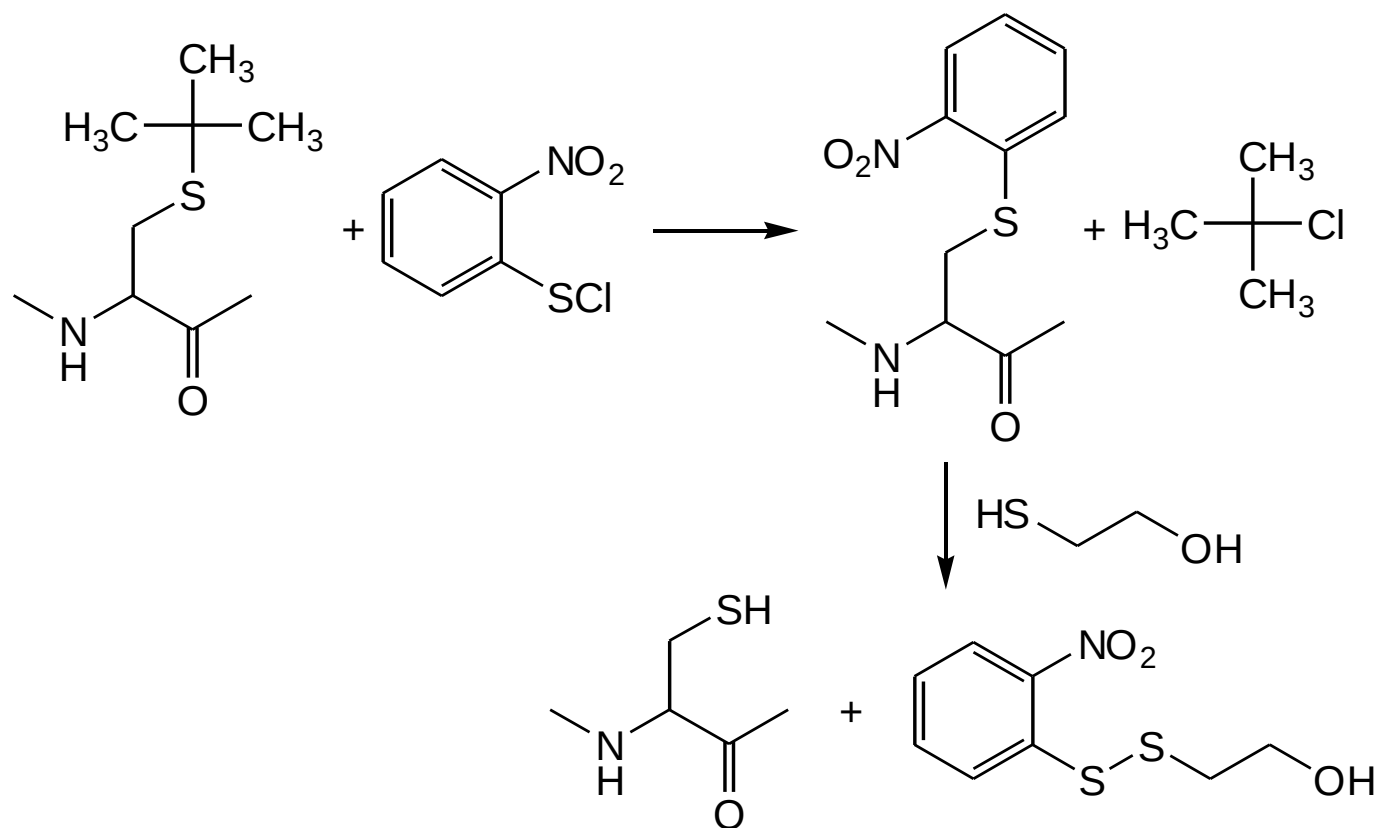
- działanie solami Ag^+ , Hg^{2+} ;
- działanie dirodanem, lub chlorkiem metoksykarbonylosulfenylu (z utlenieniem do disulfidu).

Wprowadzanie:

działanie na cystynę trifenylometanolem w kwasie octowym w obecności katalitycznych ilości $BF_3 \cdot Et_2O$.

Ośłona *S-tert*-butylowa

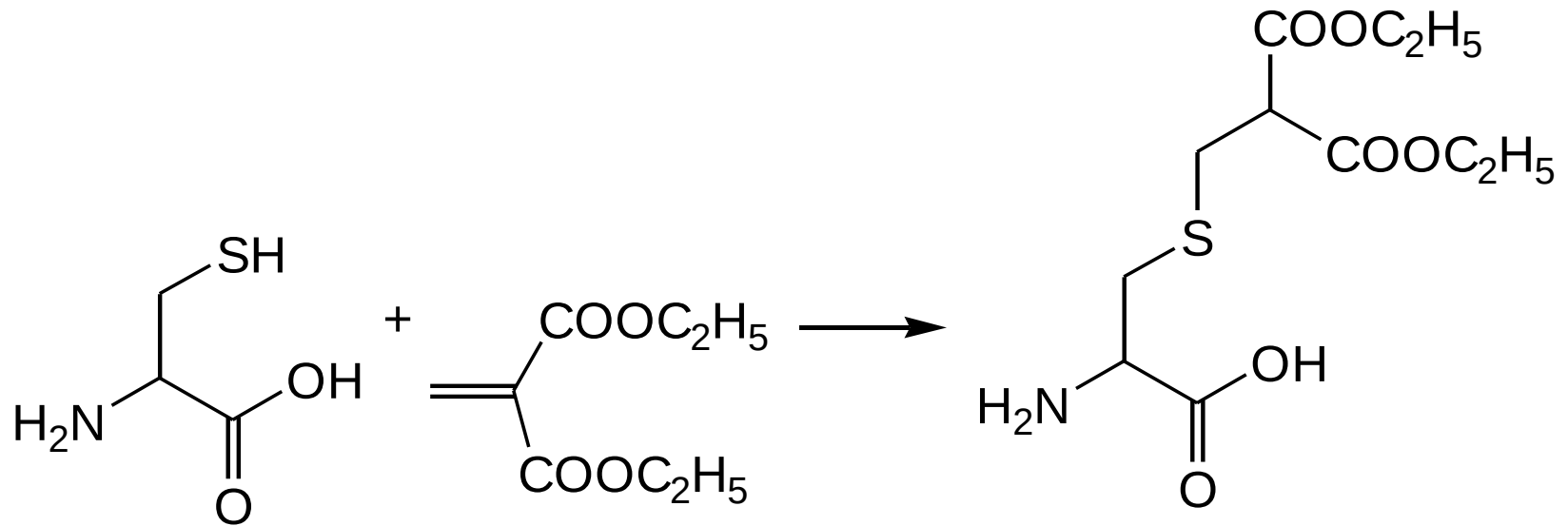
- odporna na działanie TFA, usuwana ciekłym HF w temperaturze pokojowej;
- usuwana dwuetapowo, przez wymianę na Nps a następnie działanie tiolami (merkaptoetanołem, kwasem tioglikolowym) lub borowodorkiem sodu:
- usuwana trifluorooctanem rtęci (II), trifenylofosfiną lub tributylfosfiną w 1,1,1-trifluoroetanolu.



Metylomalonyl, ester dietylowy

Wprowadzanie:

- działanie estrem dietylowym kwasu metylenomalonowego:

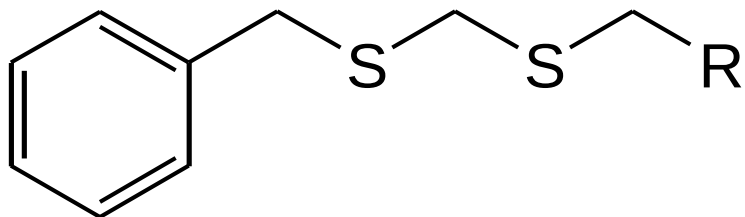


Usuwanie:

- działanie alkoholowym roztworem wodorotlenku potasowego.

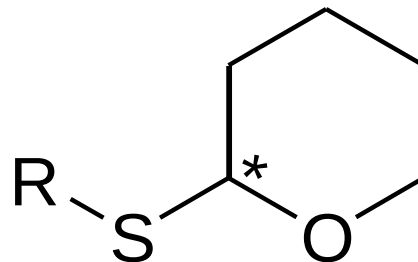
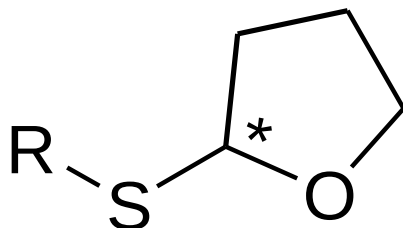
Ośłony typu tioacetalu.

Benzyltiometyl:



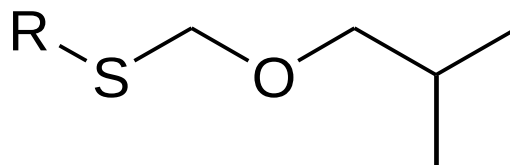
usuwany działaniem octanu rtęci (II) w wodnym roztworze kwasu mrówkowego, a następnie dodanie EDT i wysycenie H_2S w celu uniknięcia tworzenia reszty kwasu tiazolidynokarboksylowego z reszty cysteiny.

Ośłona przez addycję dihydrofuranu lub dihydropiranu
(2-tetrahydrofuranyli i 2-tetrahydropitanyli).

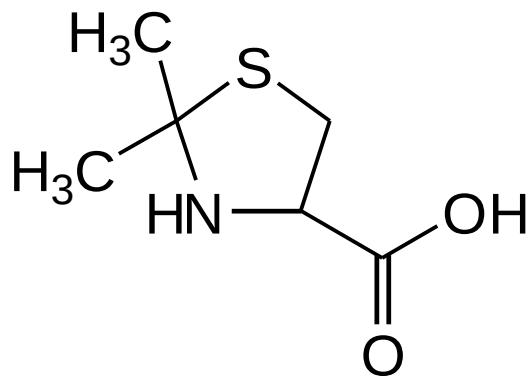


- zawierają dodatkowe centrum asymetrii.

Izobutyloksymetyl:

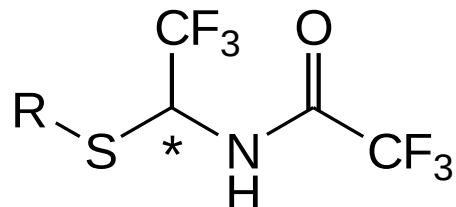


Ostona przez tworzenie pochodnej tiazolidynowej w wyniku reakcji z acetonem:



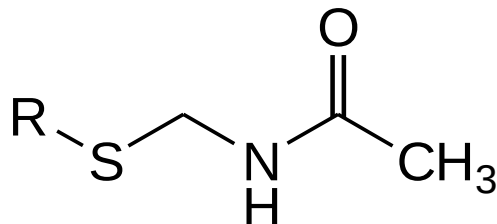
- może być stosowana tylko w przypadku *N*-terminalnej reszty cysteiny (równoczesna ostona grupy aminowej i sulfhydrylowej);
- usuwanie acydolityczne.

Ostony 1-acyloaminotrifluoroetylowe:



- odszczepiane przez usunięcie acylu;
- zawierają dodatkowe centrum asymetrii.

Acetamidometyl (Acm),



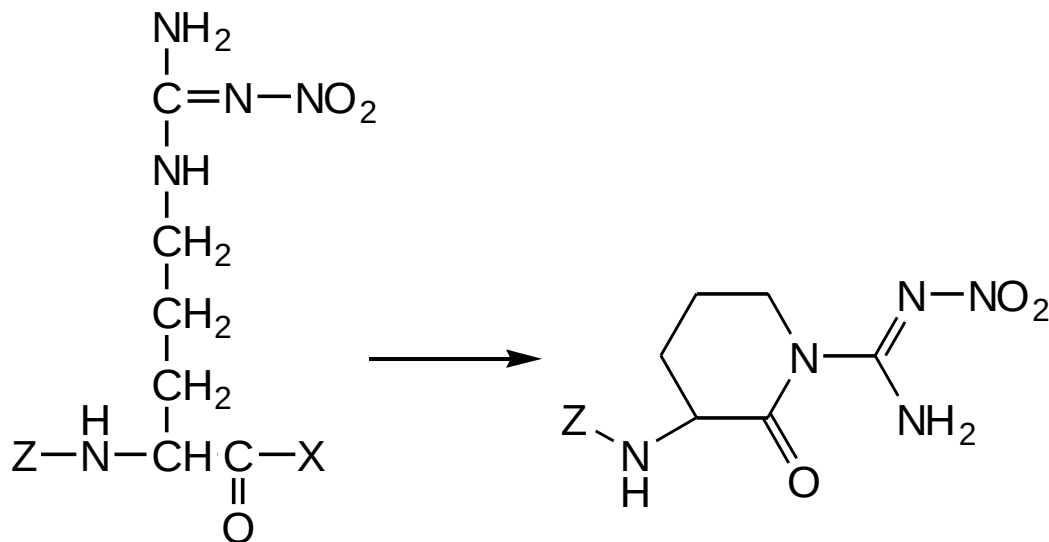
- niepodatny na acydolizę (nawet ciekły HF);
- usuwany przez działanie jodem w metanolu, z równoczesnym utlenieniem do disulfidu, lub działanie solami rtęci (II) przy pH=4.

Oślanianie grupy guanidylowej reszty argininy.

- możliwe jest wprowadzenie reszty argininy z nieosłoniętą funkcją guanidylową, lub zacylowanie argininy z nieosłoniętą grupą guanidylową (osłona przez protonowanie);
- możliwe jest otrzymanie estrów aktywnych N α -chronionej argininy (np. estrów p-nitrofenylowych);
- peptydy zawierające resztę argininy z nieosłoniętą grupą guanidylową są trudno rozpuszczalne w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych.

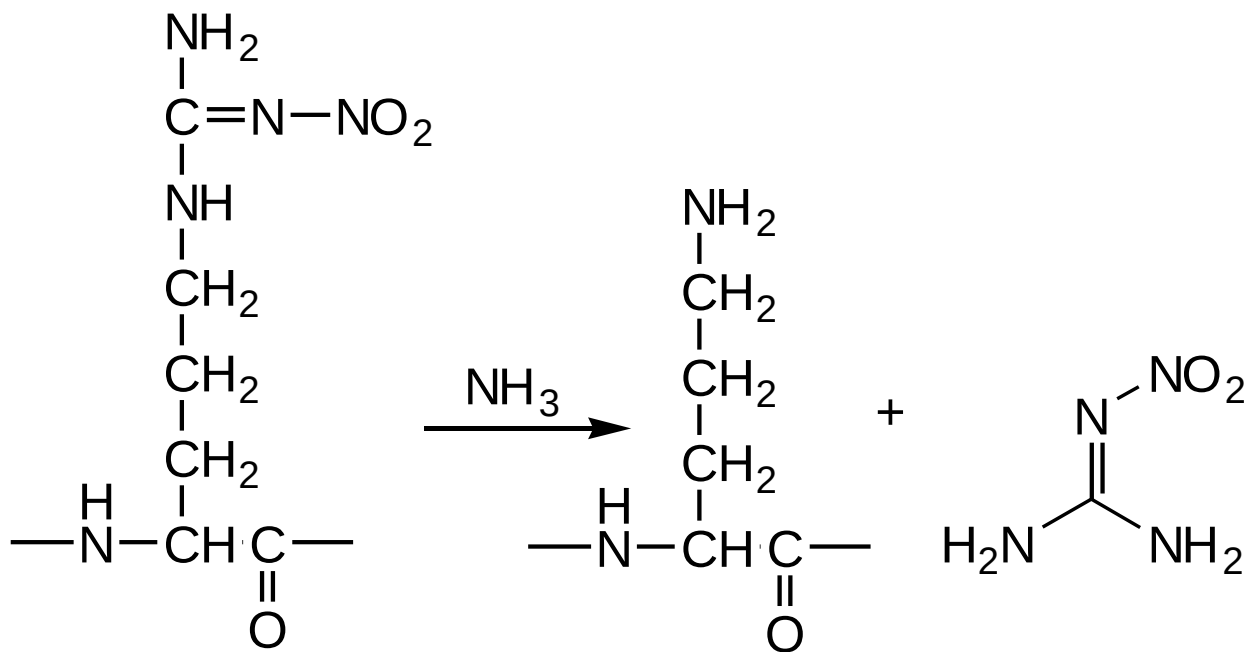
Ośłona przez nitrowanie grupy guanidynowej:

- zanik właściwości zasadowych;
- poprawa rozpuszczalności w rozpuszczalnikach organicznych;
- grupa nitroguanidylowa jest nukleofilowa. Powoduje to trudności przy acylowaniu poch. nitroargininy ze względu na konkurencyjne tworzenie poch. 2-piperydonu.



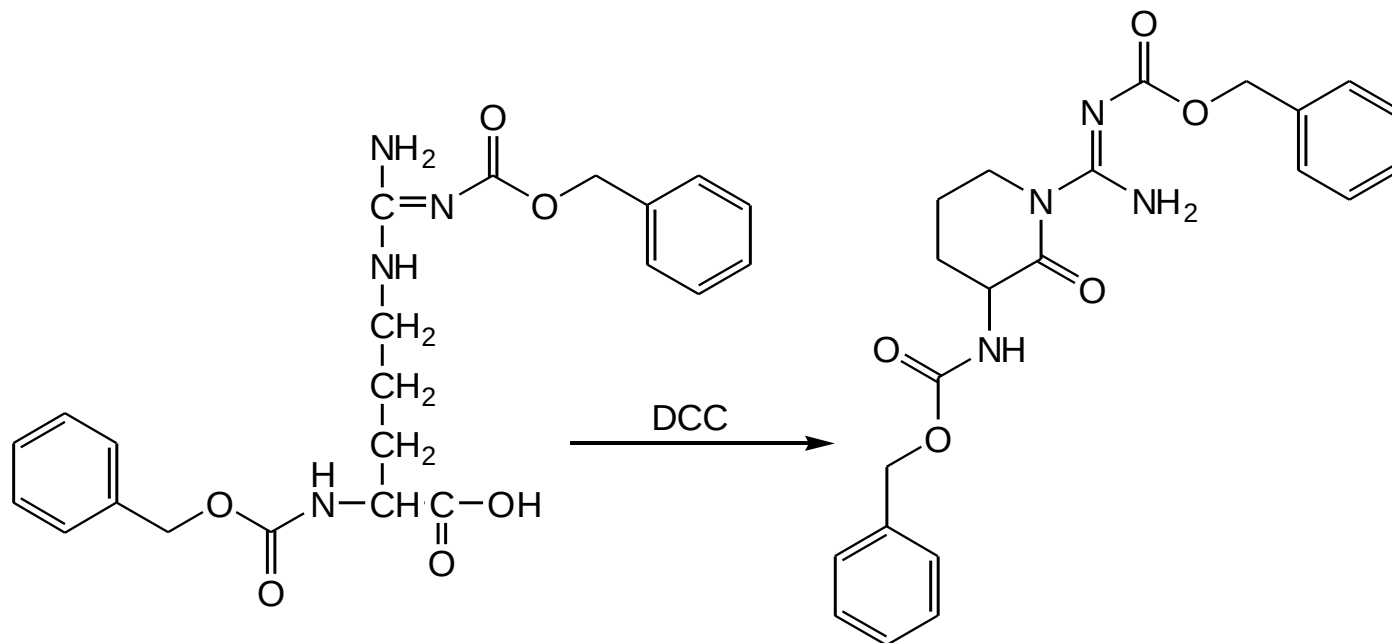
Usuwanie:

- redukcja metalami lub ich solami, np. Zn/HCl, Zn/ AcOH, Zn/HCOOH, SnCl₂, TiCl₂.
- katalityczna wodoroliza (często przebiega powoli – niebezpieczeństwo uwodornienia pierścieni aromatycznych!), w tym również w ciekłym amoniaku, lub w obecności BF₃;
- redukcja elektrolityczna;
- acydoliza – ciekły HF, TFMSA, kwas metanosulfonowy, kwasy Lewisa (BBr₃, B(OTf)₃) itp.
- Nitroarginina jest podatna na działanie nukleofili (amoniak, hydrazyna, aminy):



Ostony alkoksykarbonylowe:

- pojedyncza ostona alkoksykarbonylowa nie zabezpiecza przed tworzeniem pierścienia piperydonowego:



- wprowadzenie dwóch reszt *tert*-butyloksykarbonylowych lub benzyloksykarbonylowych daje pochodne chemicznie niestabilne;
- Wprowadzenie dwóch reszt adamantyloksykarbonylowych lub izobornyloksykarbonylowych daje stabilne pochodne i skutecznie zapobiega cyklizacji. Ostony te usuwa się acydolitycznie, kwasem trifluorooctowym.

Ostony arylosulfonowe:

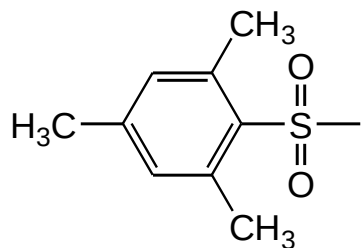
Tosyl:

- N^ε-tosyloarginina jest mniej podatna na działanie nukleofili niż nitroarginina;
- pochodne N^ε-tosyloargininy są podatne na cyklizację (tworzenie piperidonu) podczas aktywacji;

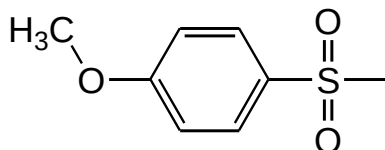
Usuwanie:

- acydoliza (ciekły HF lub TFMSA) – częściowy rozkład do ornityny oraz sulfonowanie pierścieni aromatycznych;
- redukcja sodem w ciekłym amoniaku – częściowe reduktywne rozszczepienie wiązania peptydowego z proliną;

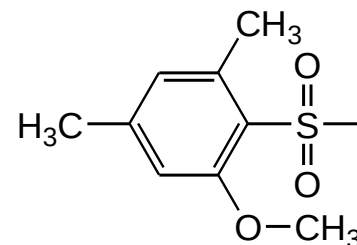
Podwyższanie podatności na acydolizę – wprowadzanie grup elektronodonorowych na pierścień aromatyczny.



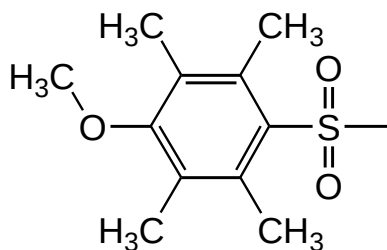
mezytylenosulfonyl
(Mts)



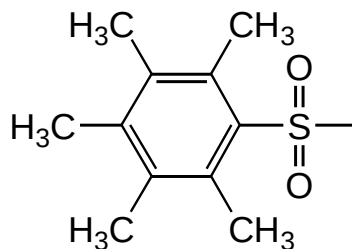
p-metoksybenzenosulfonyl
(Mbs)



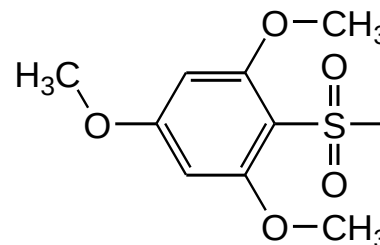
2-metoksy-4,6-dimetylo-
benzenosulfonyl (iMds)



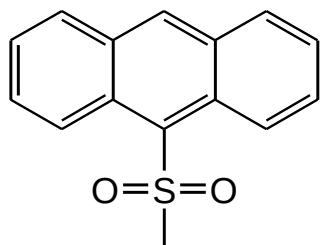
4-metoksy-2,3,5,6-tetra-
metylobenzenosulfonyl
(Mte)



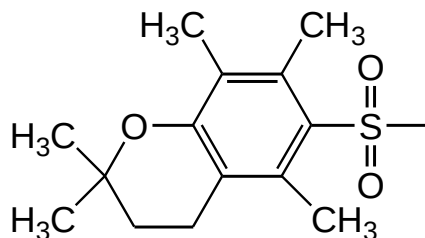
2,3,4,5,6-pentametylo-
benzenosulfonyl (Pme/Pms)



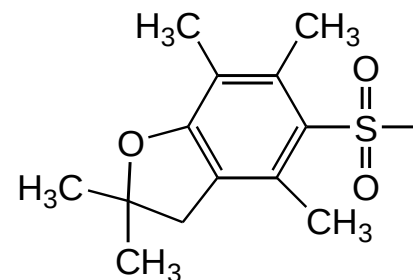
2,4,6-trimetoksybenzeno-
sulfonyl (Mtb)



9-antracenosulfonyl
(Ans)



2,2,5,7,8-pentametylochroman
(Pmc)



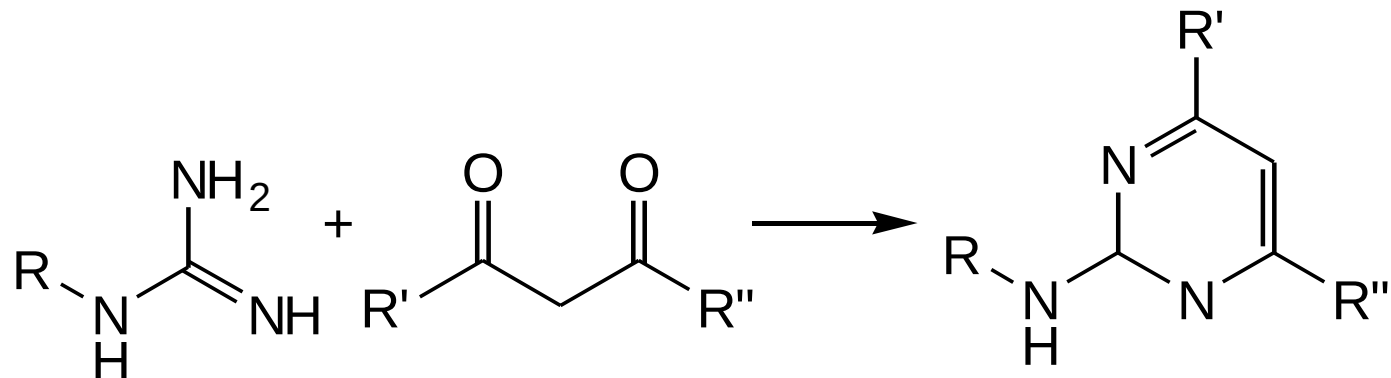
2,2,4,6,7-didehydrobenzo-
furan (Pbf)

Względna podatność na acydolizę:

$Pbf > Pmc > Mtr > Mds > Mtb > Pms > Mte > Mts \sim Mbs > iMds > Tos$

Inne próby osłaniania grup funkcyjnych – zastosowanie tritylu (wyczerpujące alkilowanie), izopropyloksykarbonylo tetrachlorobenzoil – nie dały pochodnych o większym znaczeniu praktycznym.

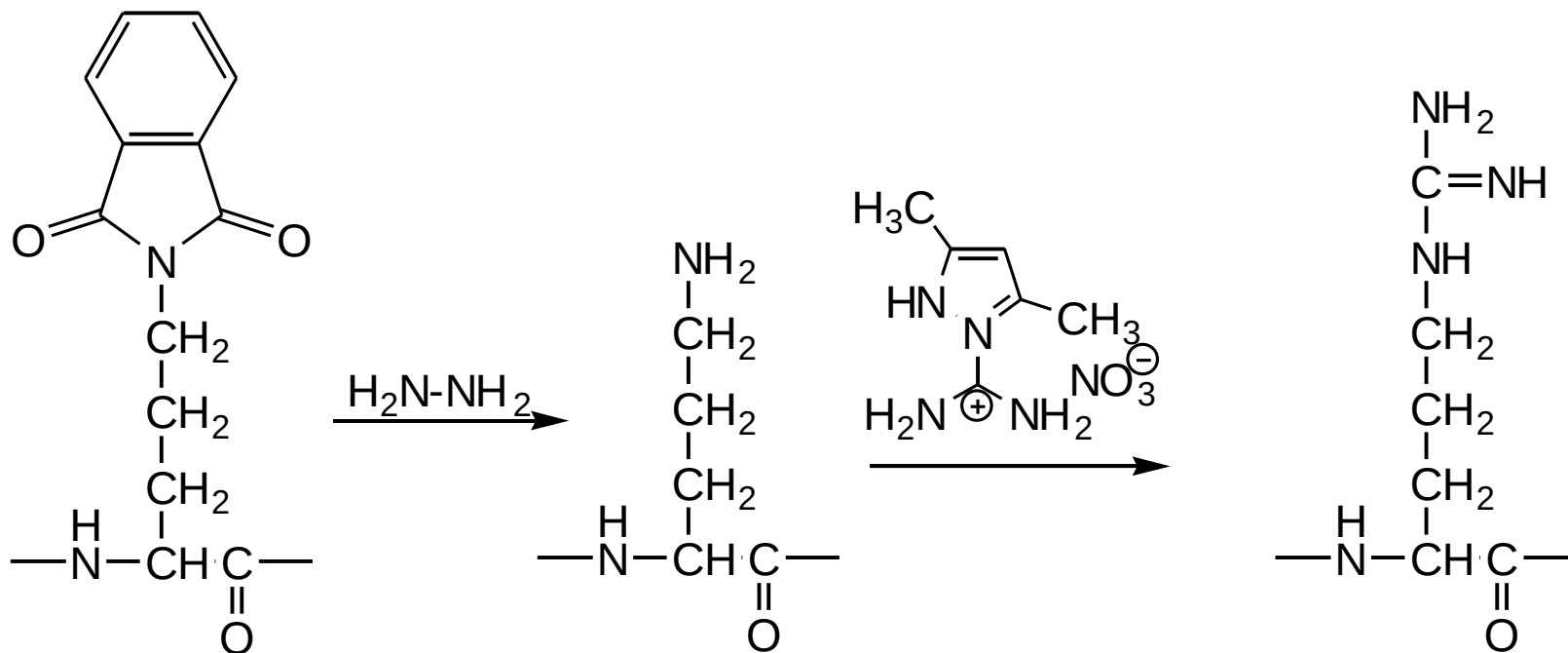
Kondensacja ze związkami 1,3-dikarbonyłowymi – trwałe
pochodne pirymidyny:

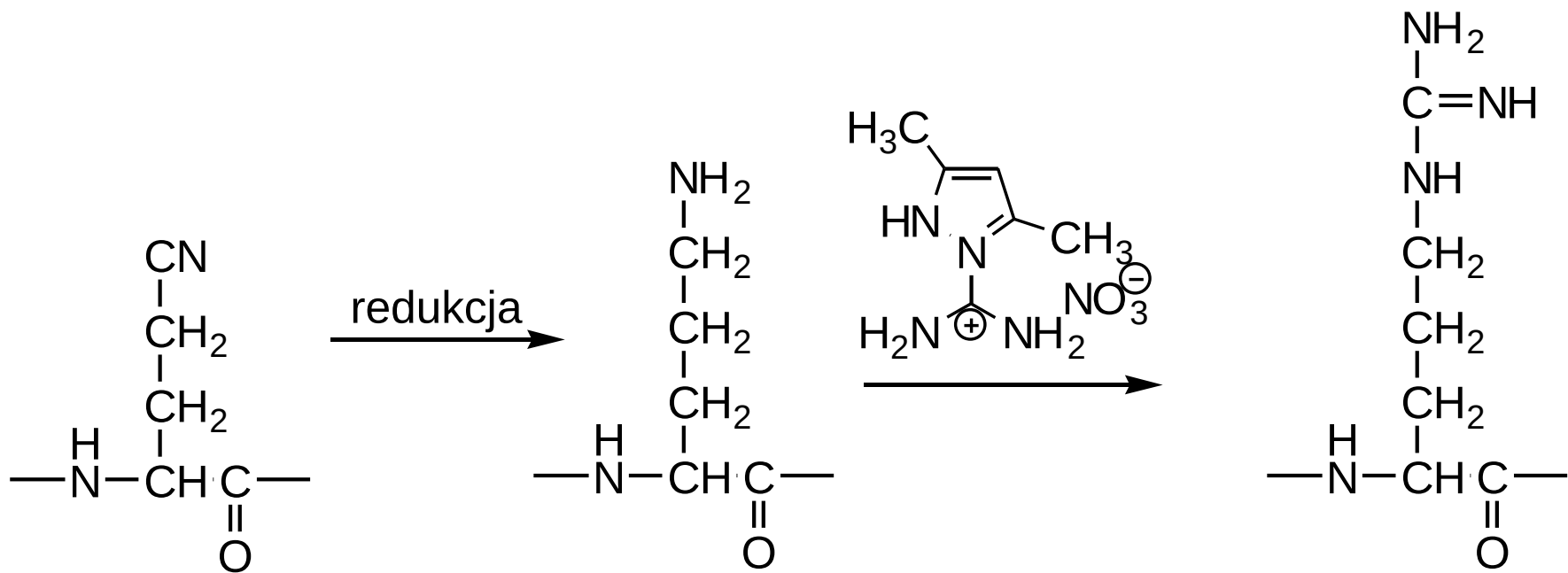


Kondensacja ze związkami 1,2-dikarbonyłowymi – pochodne
rozszczepialne.

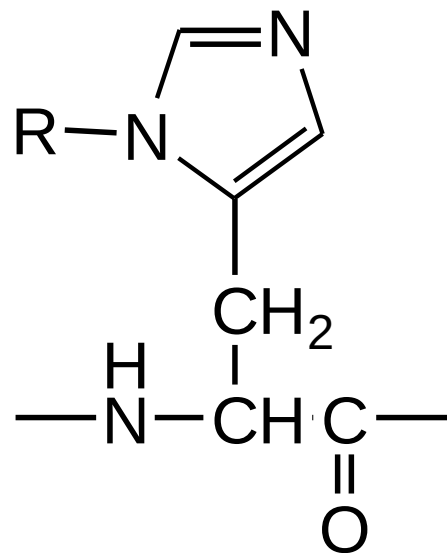
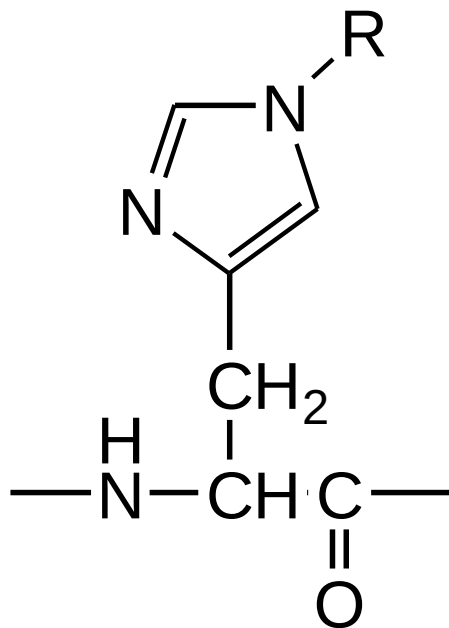
Produkt kondensacji z cykloheksano 1,2-dionem – rozszepiany
hydroksyloaminą.

Użycie prekursorów argininy:





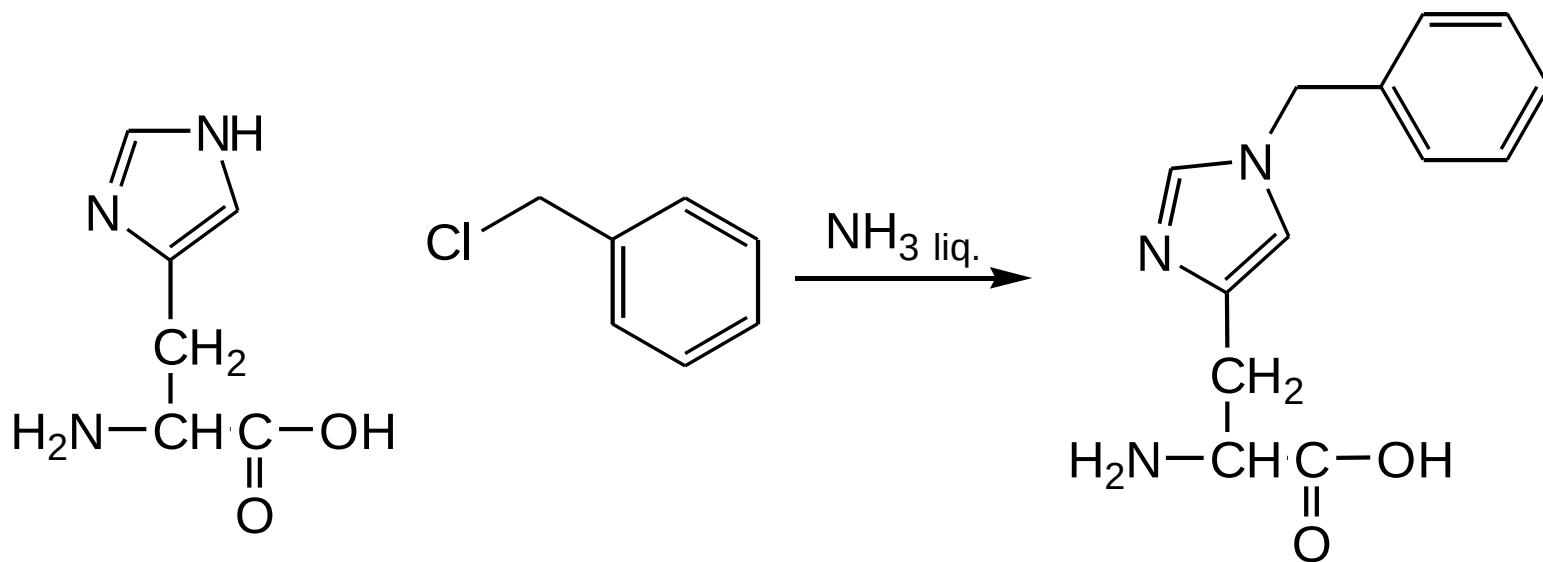
Pierścień imidazolowy histydyny.



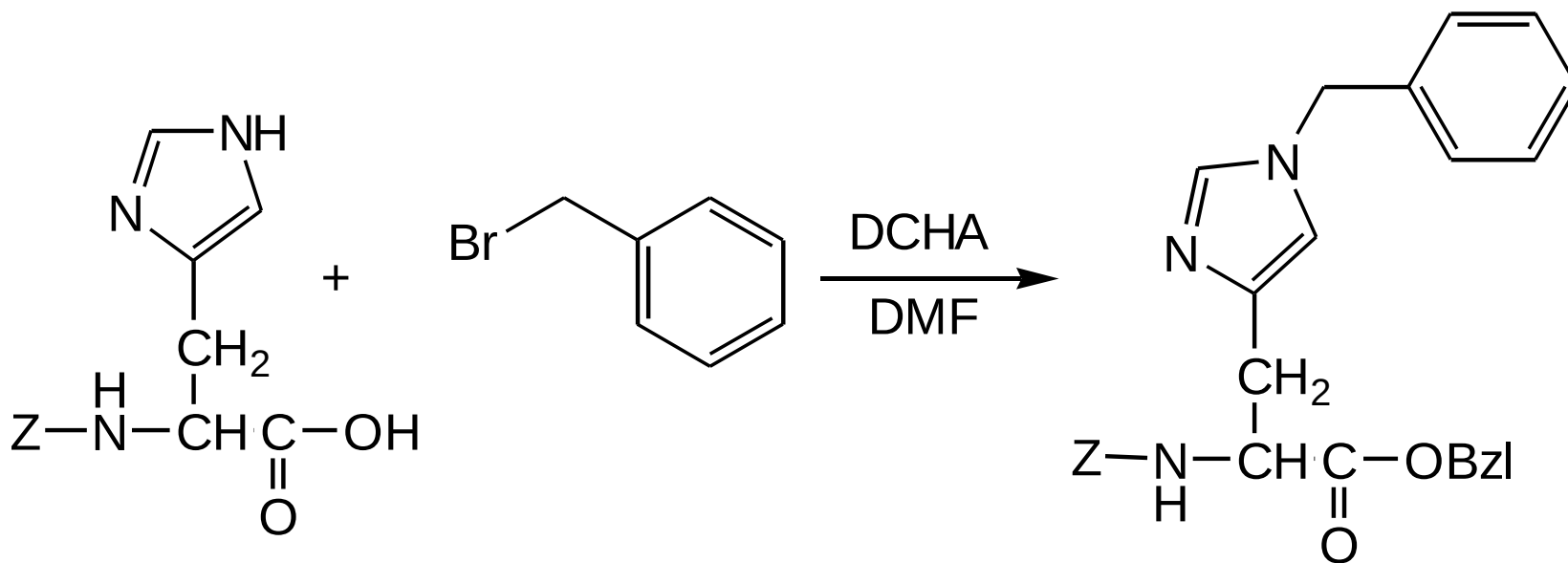
Benzyl.

Wprowadzanie:

alkilowanie chlorkiem benzylu w ciekłym amoniaku:



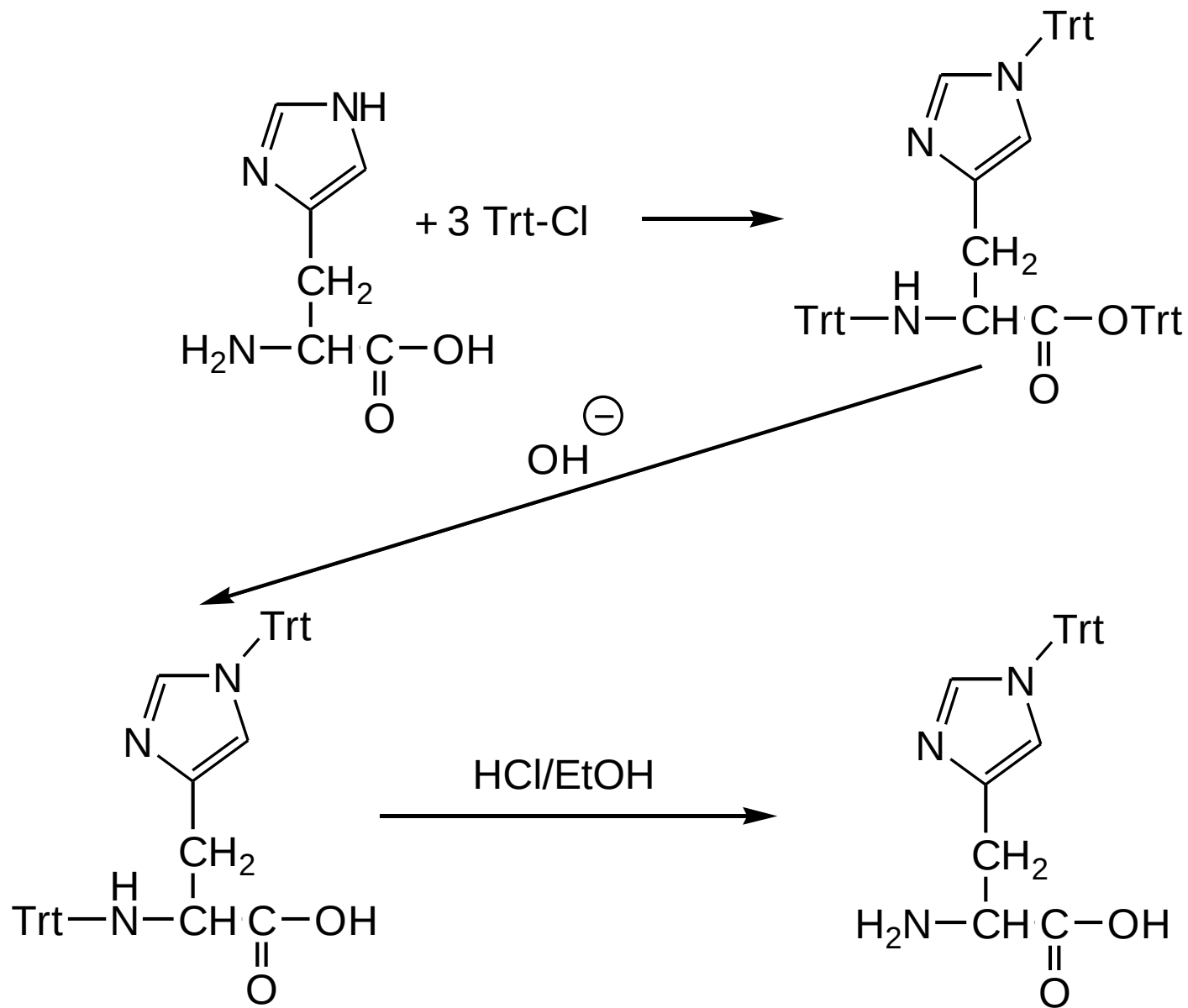
Alkilowanie bromkiem benzylu w obecności DCHA, w DMF:



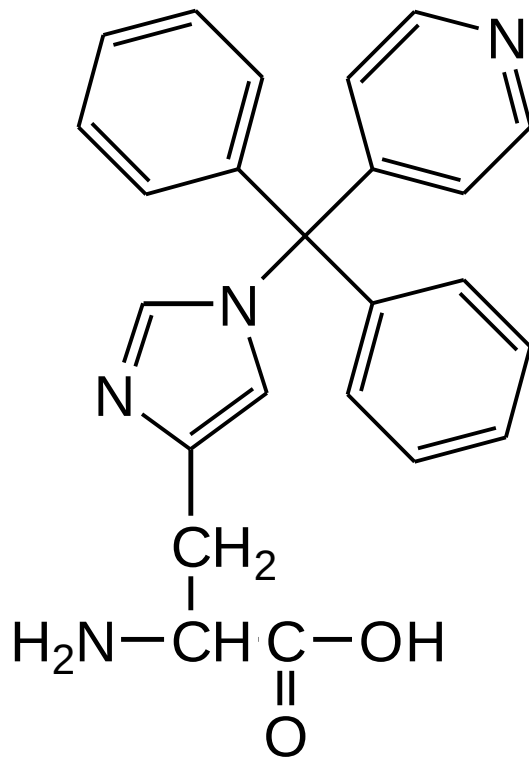
Usuwanie:

redukcja Na/NH_3 , katalityczna wodoroliza (powoli)
2-nitrobenzyl – możliwe usuwanie fotolityczne.

Trityl:



Grupa N^{im}-difenylo-4-pirydylometylowa

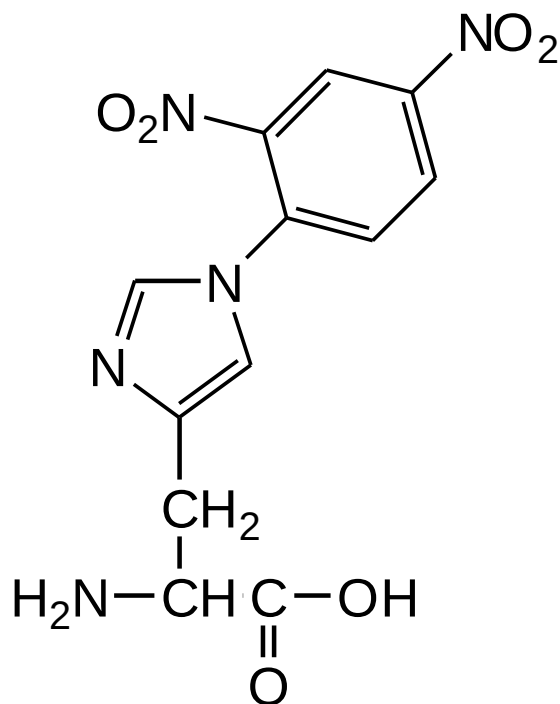


- odporna na działanie kwasów;
- usuwana przez redukcję elektrolityczną, katalityczną wodorolizę lub redukcję cynkiem w kwasie octowym.

Grupa benzhydrylowa.

- mniejsze zawady steryczne niż w przypadku tritylu;
- usuwana acydolitycznie lub przez katalityczną wodorolizę.

Grupa 2,4-dinitrofenylowa (Dnp).



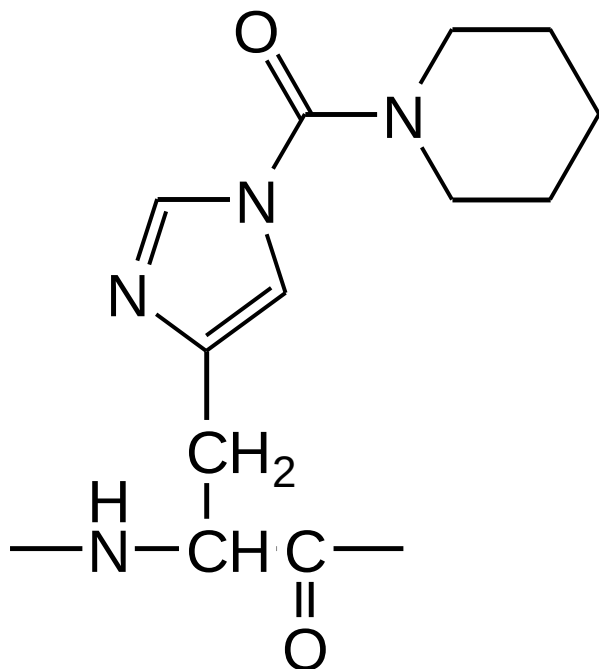
- usuwana przez tiolizę (merkaptoetanol, kwas tioglikolowy, DTT, tiofenol itp.);
- powoduje obniżenie zasadowości pierścienia imidazolowego;
- Dnp zajmuje pozycję τ ;
- nie powoduje obniżenia skłonności histydyny do racemizacji;
- usuwana również innymi nukleofilami, np. hydrazyną i potencjalnie również przez grupę aminową Aa.

Grupa 2,4,6 trinitrofenylowa.

usuwana nukleofilami, podobnie jak Dnp.

Ośłony typu uretanu - niestabilne, podatne na działanie nukleofili.

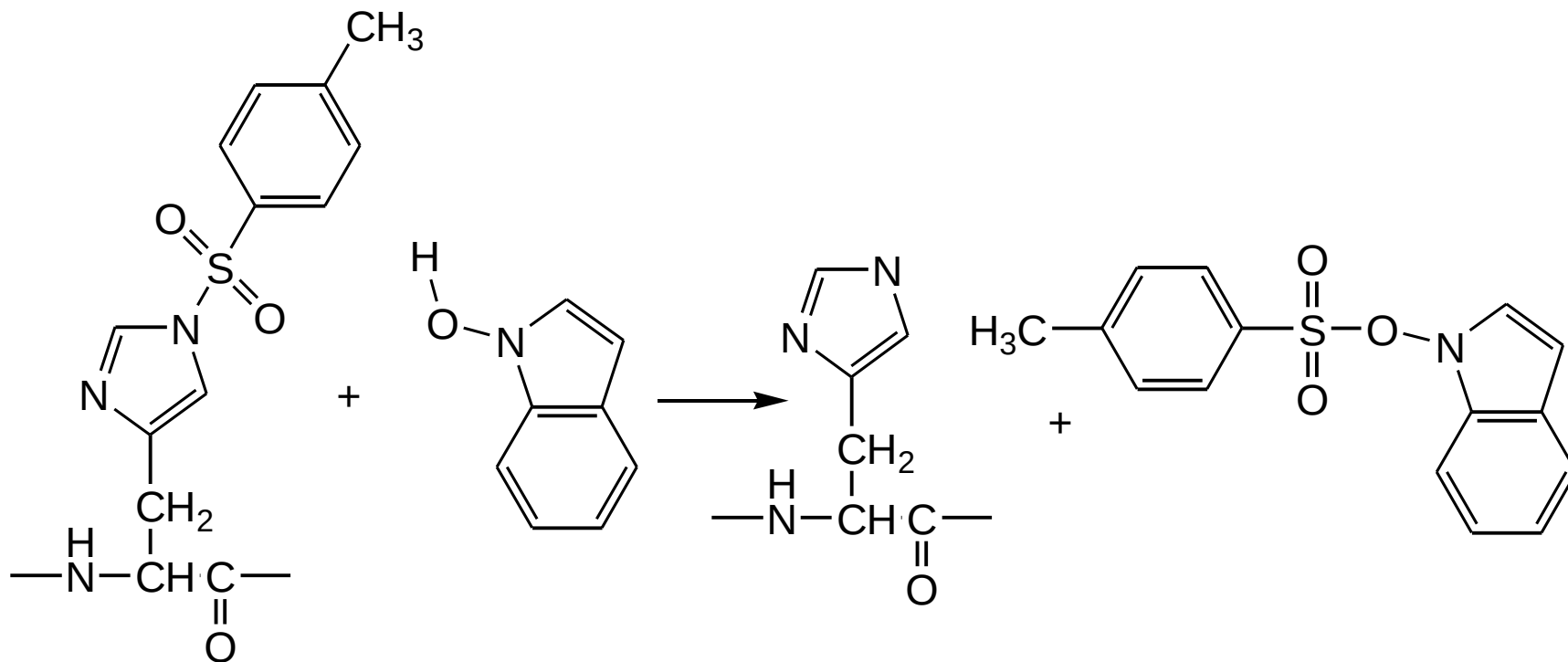
Piperydynokarbonyl.



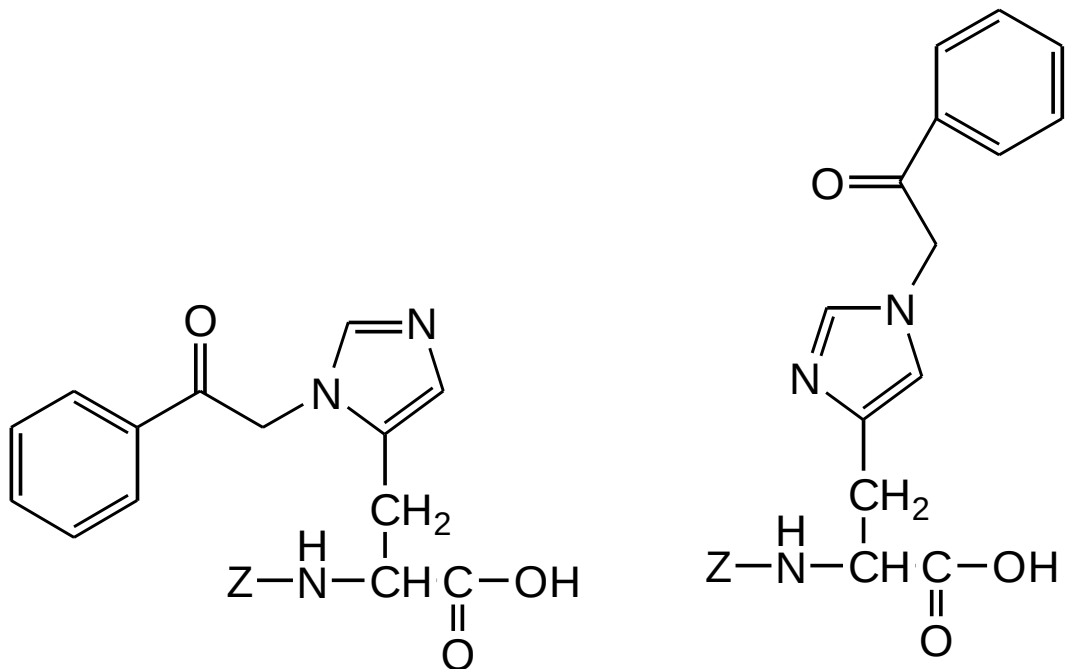
- mało podatny na działanie kwasów, niezbyt podatny na działanie nukleofili;
- usuwany przez działanie hydrazyną.

Tosyl (Tos).

- usuwany acydolitycznie;
- podatny na działanie nukleofilu;
- podatny na działanie 1-hydroksybenzotriazolu:

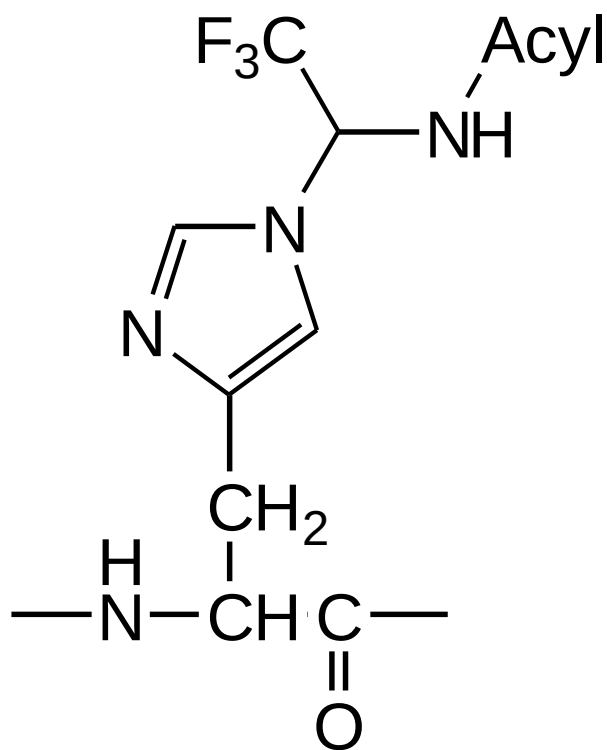


Ośłona N^π-fenacylowa i N^τ-fenacylowa (Pac).



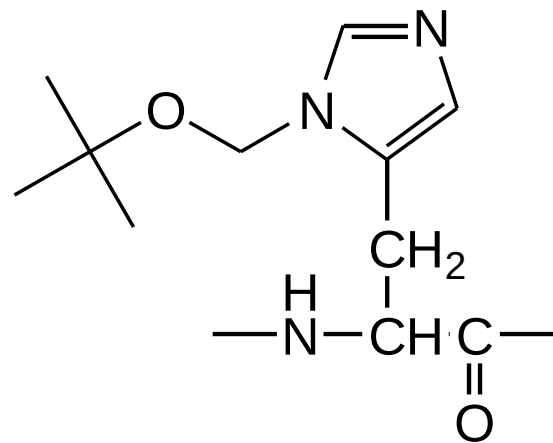
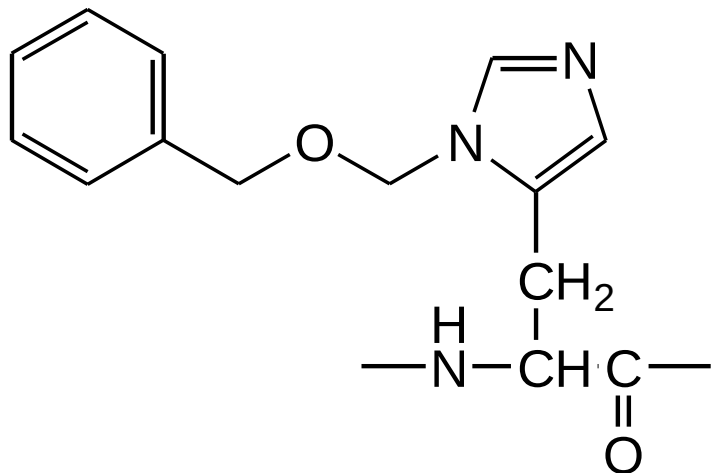
- osłonięcie azotu π powoduje obniżenie skłonności do racemizacji;
- osłona fenacylowa jest odporna na działanie nawet mocnych kwasów (z ciekłym HF włącznie),
- usuwana przez redukcję cynkiem w wodnym roztworze kwasu octowego lub fotolizę.

Trifluoroacyloaminometyl.



ulega rozpadowi po usunięciu acylu, z
uwolnieniem aldehydu trifluorooctowego.

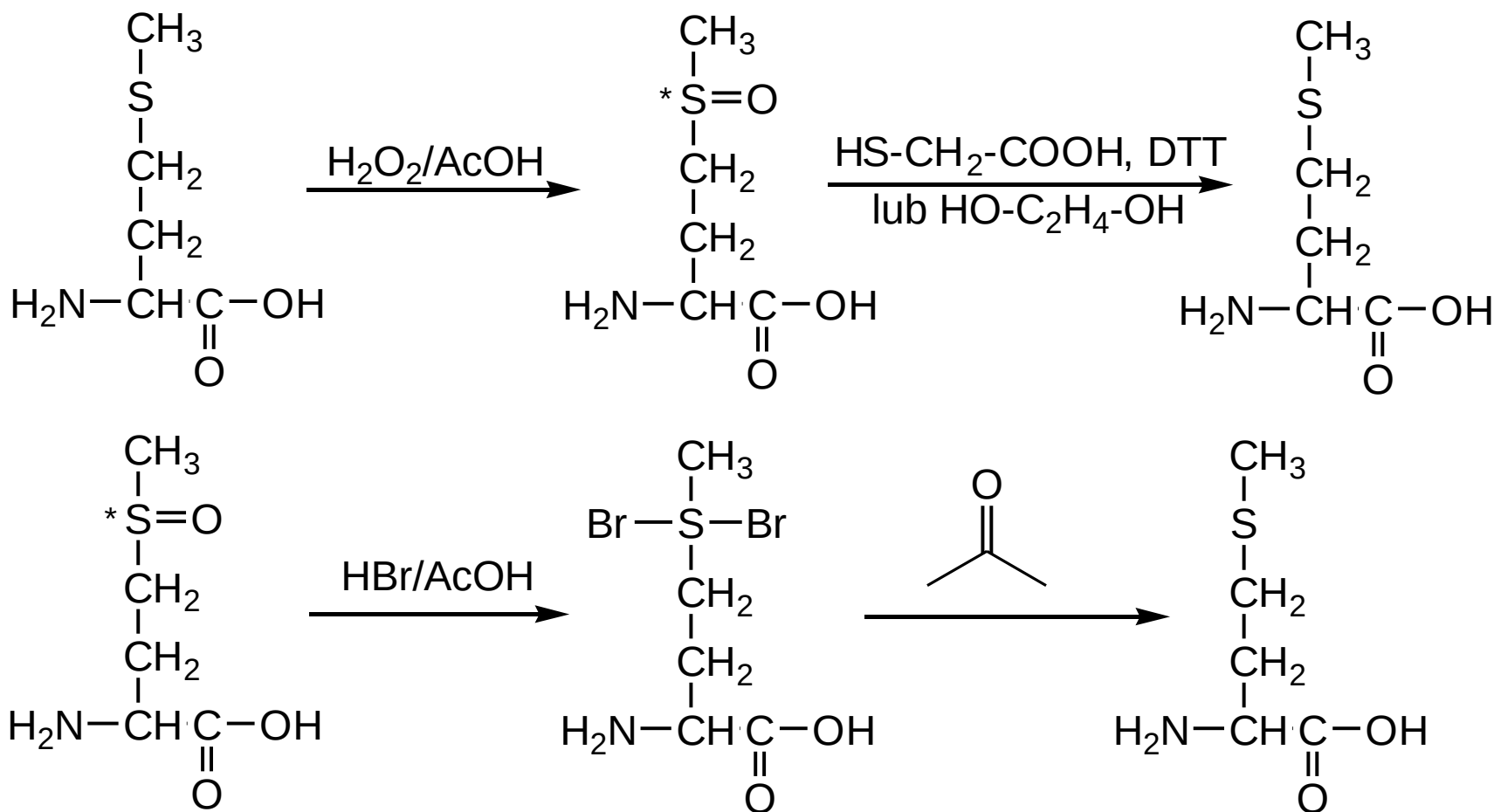
Benzyloksymetyl (Bom) i *tert*-butyloksymetyl (Bum).



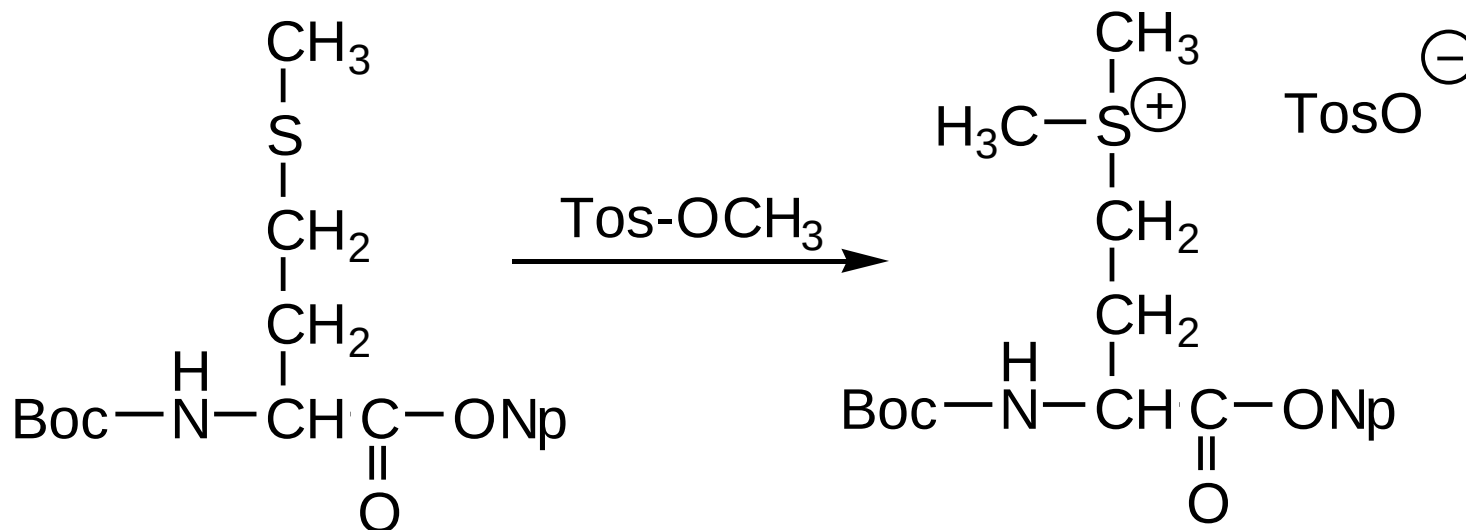
- osłaniany atom azotu π - obniżenie podatności na racemizację;
- w trakcie usuwania tych osłon powstaje formaldehyd mogący powodować reakcje uboczne.

Tioeter reszty metioniny.

Ostona przez utlenianie do sulfotlenku – powstaje mieszanina diastereoizomerów.



Ostona przez alkilowanie.



- usuwana przez tiolizę np. merkaptoetanołem

Azot indolowy reszty tryptofanu.

- pierścień imidazolowy podatny jest na utlenienie w środowisku kwaśnym;
- podatny na alkirowanie ;

Benzyloksykarnbonyl – wprowadzany w obecności fluorku potasowego i eteru koronowego 18-c-6. Podatny na acydolizę (ciekły HF, TFA (powoli), hydrolizę i katalityczną wodorolizę)

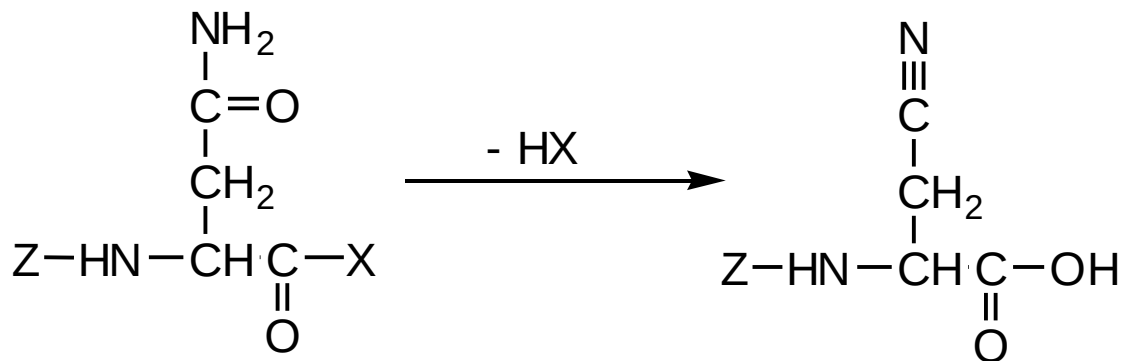
Formyl – wprowadzany przy pomocy kwasu mrówkowego i gazowego chlorowodoru. Usuwany przez działanie nukleofilami (wodny roztwór piperidyny, hydrazyna, lhydroksyloamina, wodny roztwór etanoloaminy).

- Usuwany także acydolitycznie (ciekły HF) w obecności zmiataczy.
- W ciekłym amoniaku obserwuje się migrację formylu na grupę α -aminową.
- Zabezpiecza pierścień indolowy przed utlenieniem i alkirowaniem.
- Promuje uwodornienie indolu w warunkach katalitycznej wodorolizy.

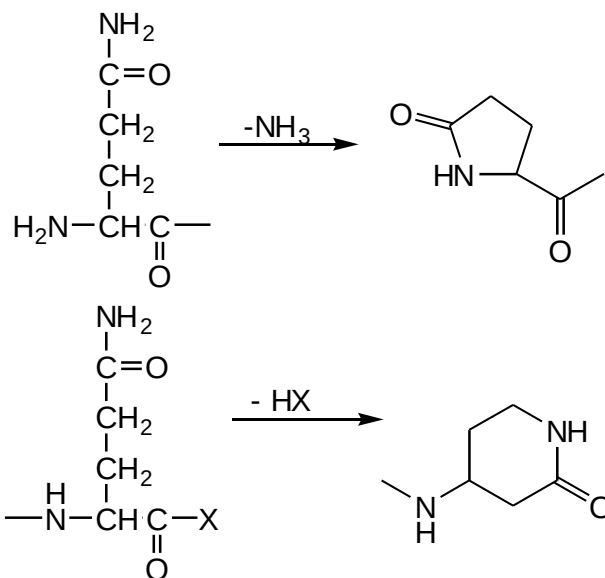
Boc – usuwany acydolitycznie w obecności zmiataczy. Stosowany przy użyciu Fmoc –aminokwasów, szczególnie jeżeli reszta tryptofanu jest aminokwasem C-terminalnym, a synteza prowadzona jest na nośniku stałym, z którego peptyd odszczepiany jest acydolitycznie.

Grupy karoksyamidowe asparaginy i glutaminy.

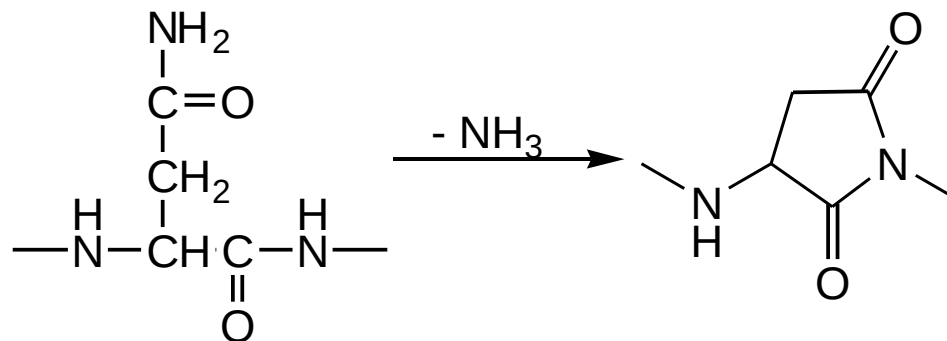
- mogą być nieoślaniane, pod warunkiem zastosowania odpowiednich metod acylowania i obróbki syntetycznych peptydów.
- wykazują skłonność do dehydratacji w trakcie aktywacji:



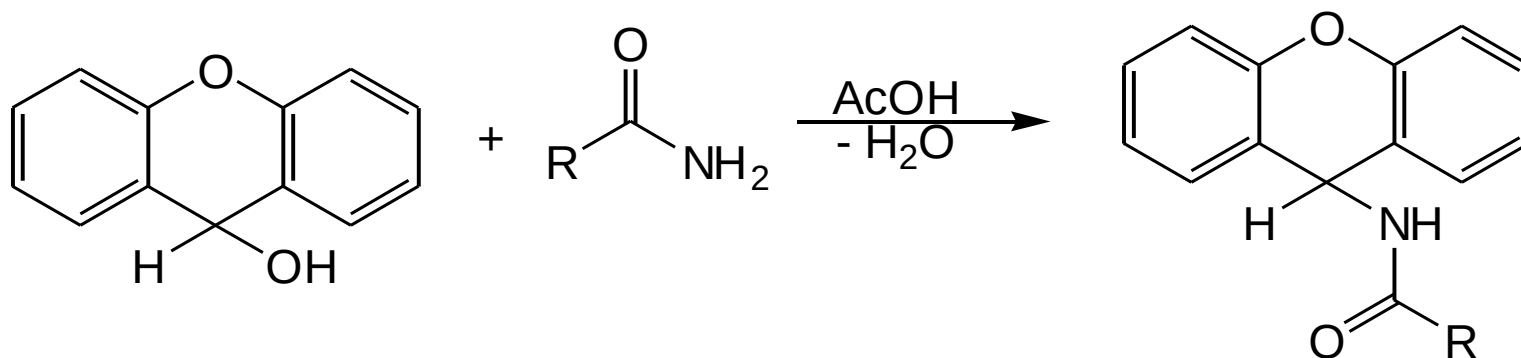
Glutamina może ulegać cyklizacji do kwasu piroglutaminowego:



Asparagina może cyklizować do pochodnych sukcyimidu:

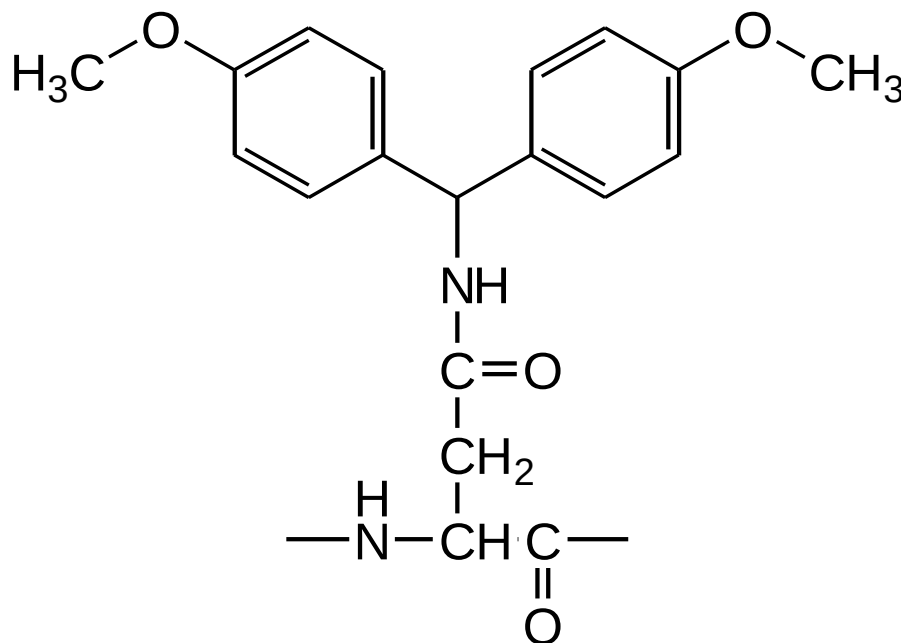
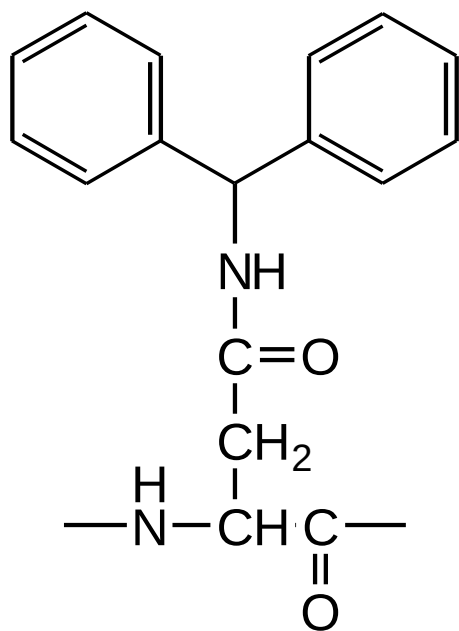


Ośłona ksantenylowa (Xan).



- pochodne tego typu są trudno rozpuszczalne w mało polarnych rozpuszczalnikach;
- usuwanie – acydoliza z zastosowaniem silnych kwasów (ciekły HF , TFMSA).

Ośłona benzhydrylowa i pochodne benzhydrylu.



- poprawa rozpuszczalności w rozpuszczalnikach organicznych;
- nieco zbyt stabilne w warunkach acydolitycznych (4,4'-dimetoksybenzhydryl usuwany jest we wrzącym TFA z dodatkiem anizolu).

Trityl

- usuwany TFA w temperaturze pokojowej w obecności anizolu.

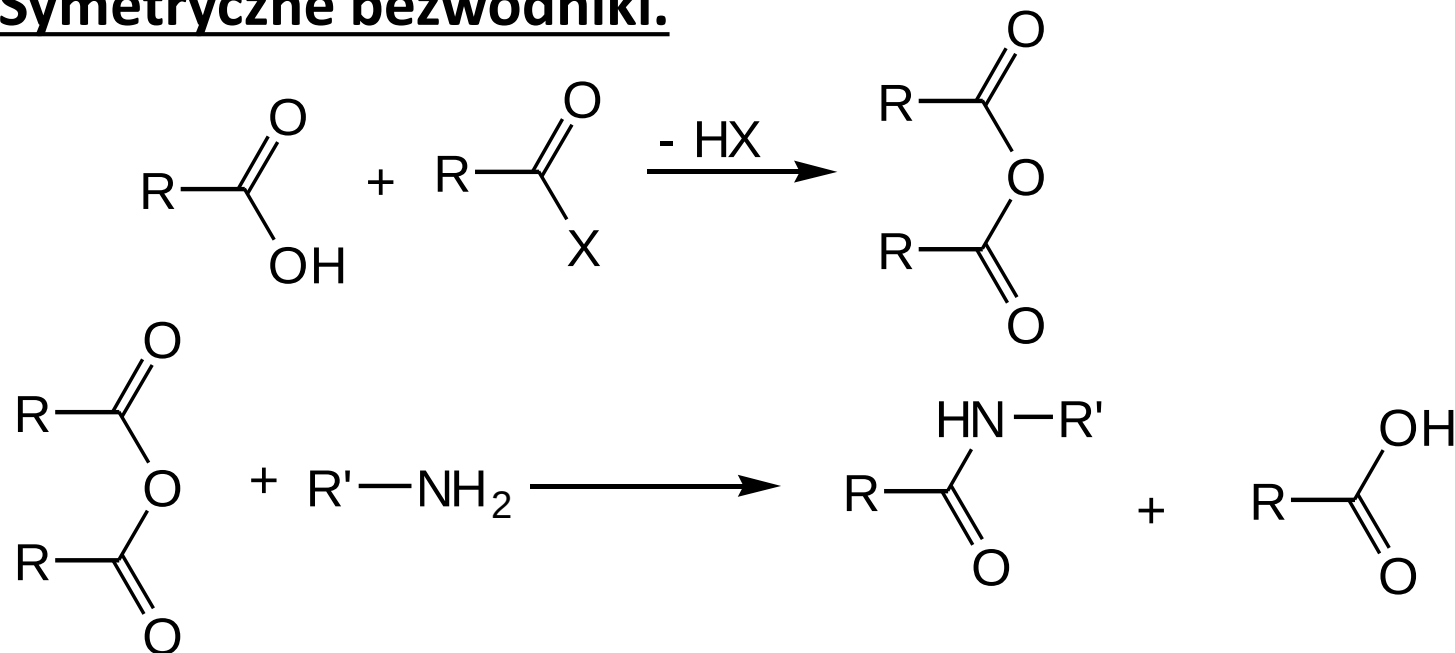
2,4- i 2,4,6- trimetoksybenzyl – mogą być usuwane selektywnie kwasem trifluorooctowym w obecności anizolu, w temperaturze pokojowej.

Użycie prekursorów asparaginy lub glutaminy.

- estry – mogą być poddane amonolizie – niebezpieczeństwo tworzenia pochodnych sukcyimidu lub glutarimidu.
- β -cyjanoalanina i γ -cyjanobutyryna mogą być stosowane jako prekursory asparaginy lub glutaminy. Stosuje się tutaj częściową hydrolizę przy użyciu HBr/AcOH/ H₂O lub H₂O₂/NaOH.
- kwas piroglutaminowy może być przekształcony w glutaminę przez amonolizę.

Aktywacja i sprzęganie.

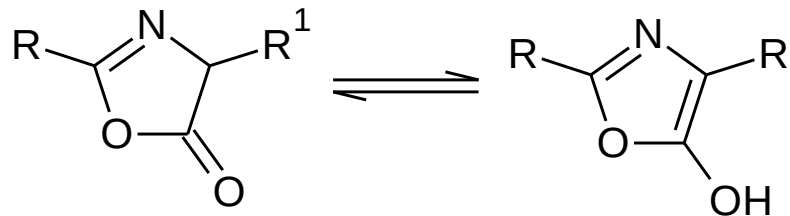
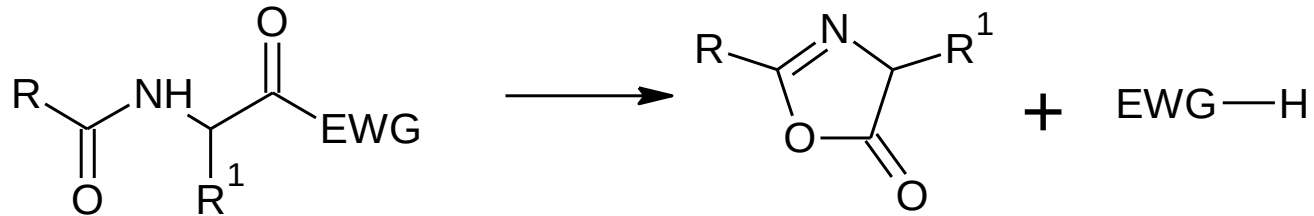
Symetryczne bezwodniki.



- silna aktywacja;
- stosowane w SPPS.

Racemizacja

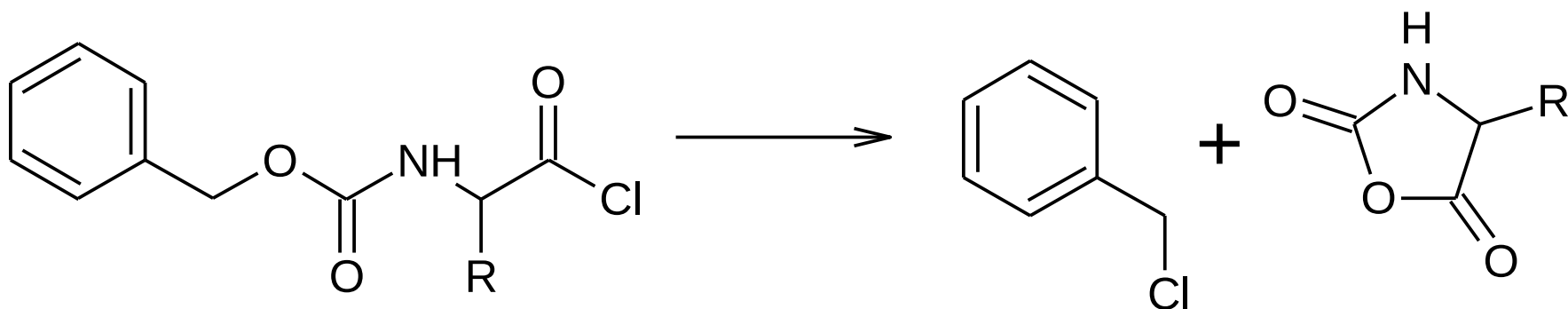
Mechanizm poprzez azlaktony:



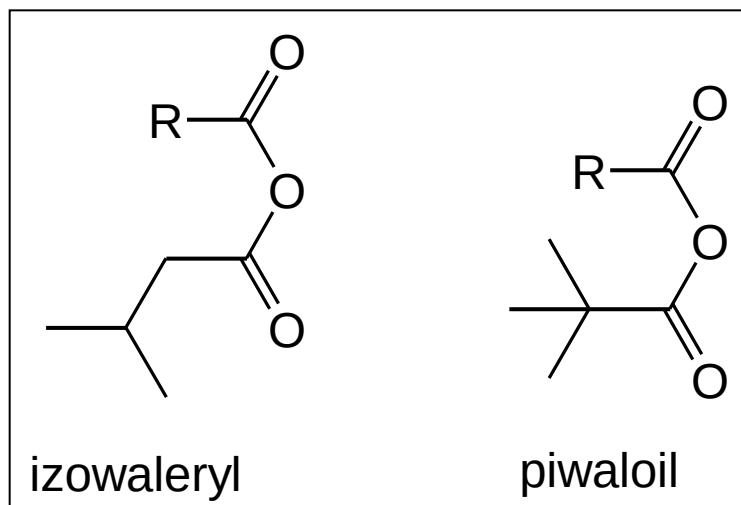
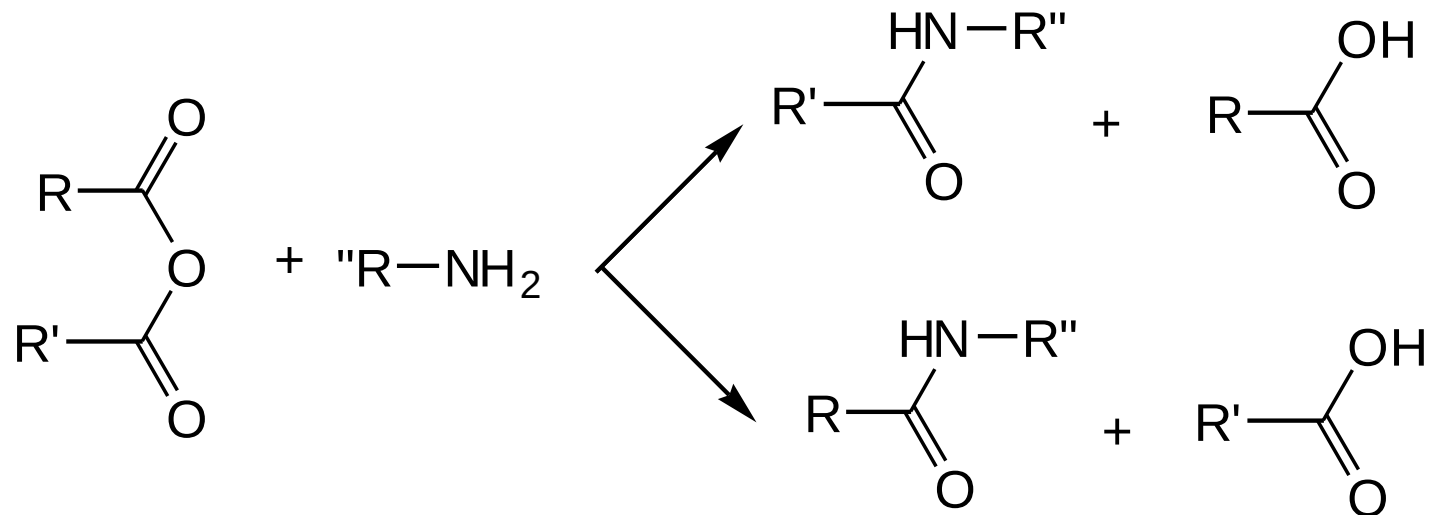
Inne mechanizmy racemizacji:

- Bezpośrednie oderwanie protonu z pozycji α (np. pochodne histydyny)
- Mechanizm eliminacji – addycji (np. pochodne cysteiny).

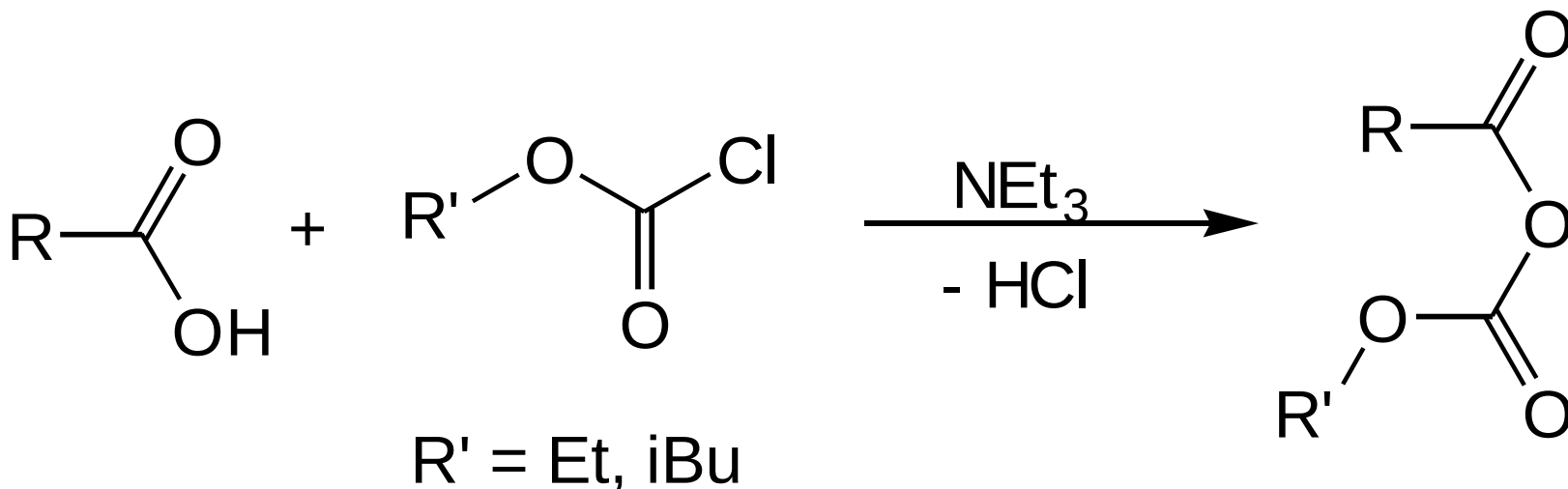
Reakcja alkoksykarbonyloaminokwasów:



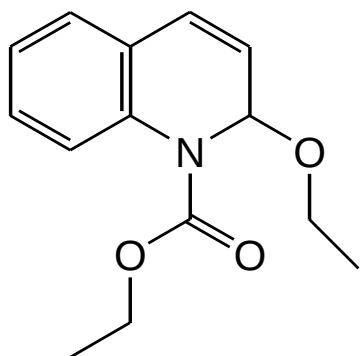
Bezwodniki asymetryczne.



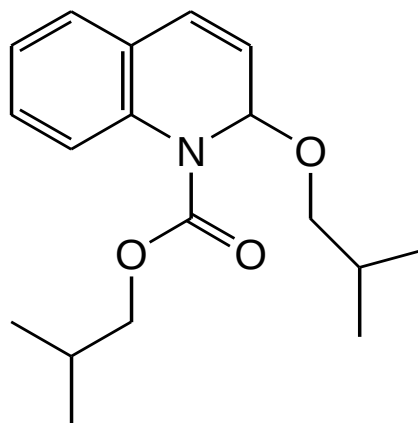
Mieszane bezwodniki z półestrami kwasu węglowego.



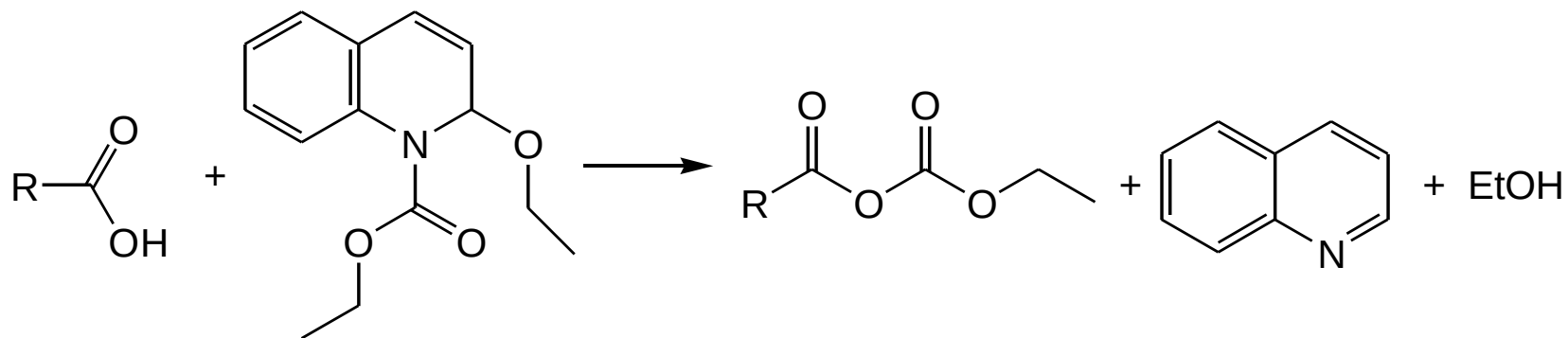
Zastosowanie 1-etokyykarbonylo-2-etoksy-1,2-dihydrochinoliny (EEDQ) i 1-izobutyloksykarbonylo-2-izobutyloksy-1,2-dihydrochinoliny (IIDQ).



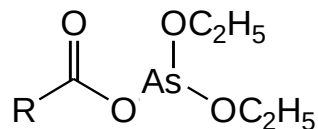
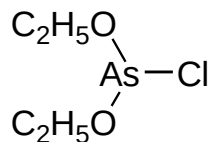
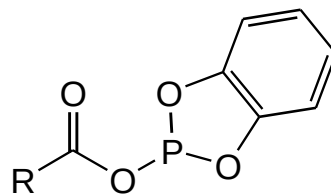
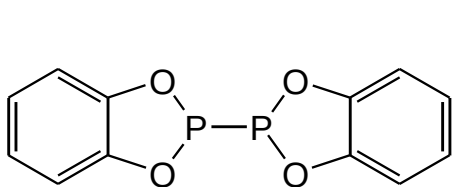
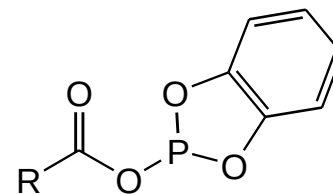
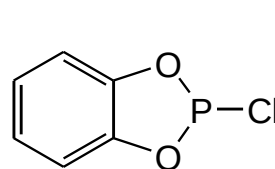
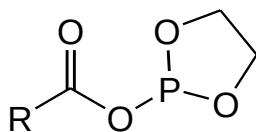
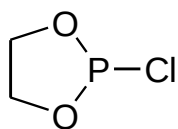
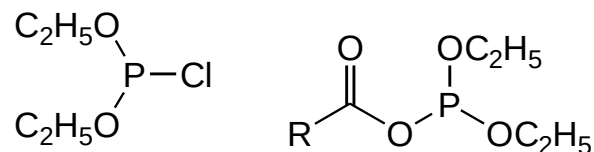
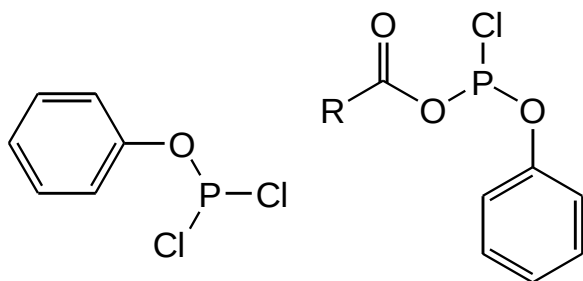
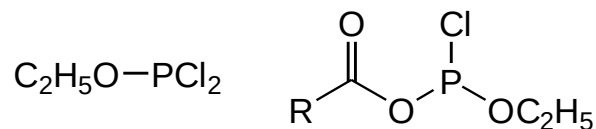
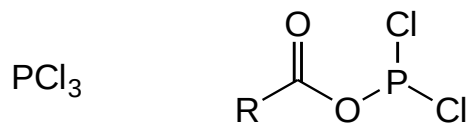
EEDQ



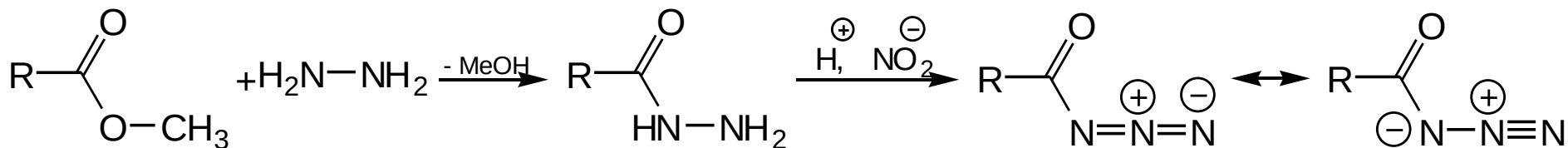
IIDQ



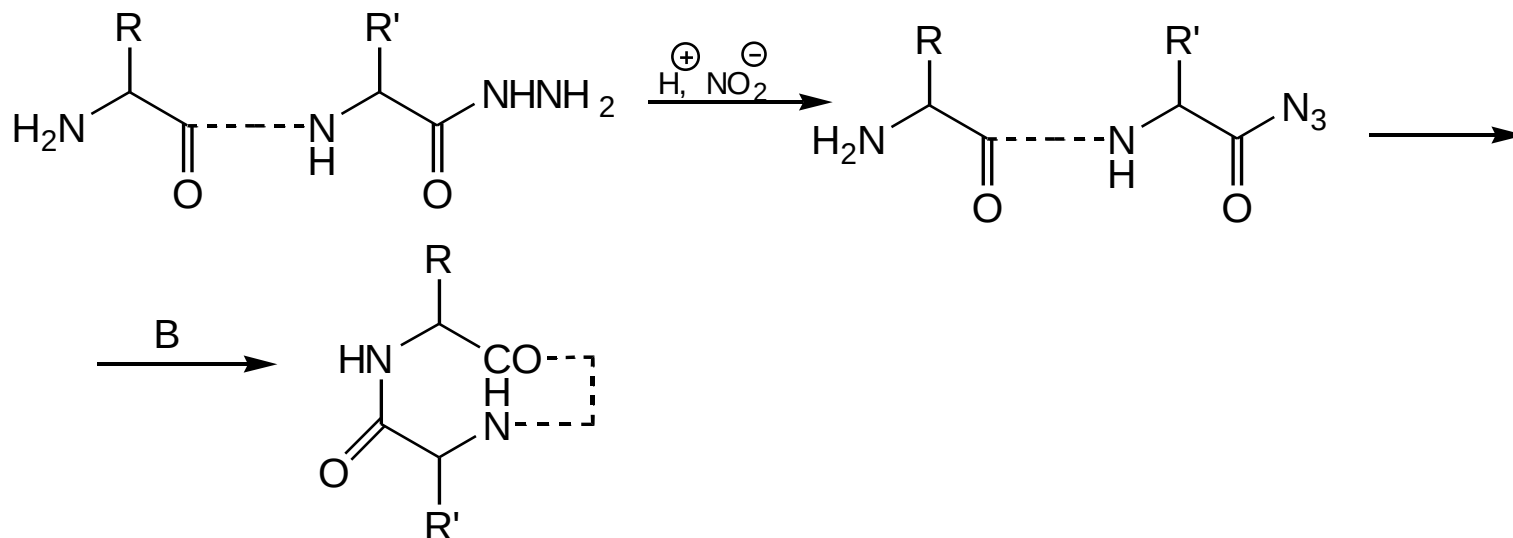
Mieszane bezwodniki zawierające fosfor.



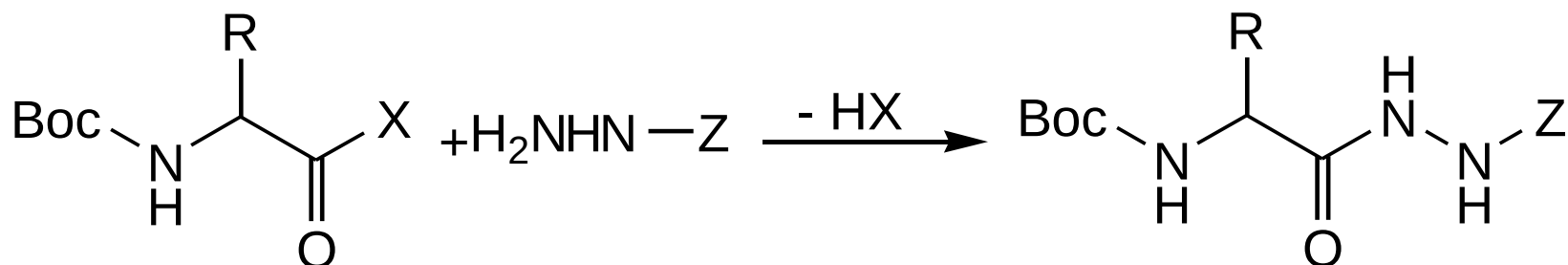
Metoda azydkowa.



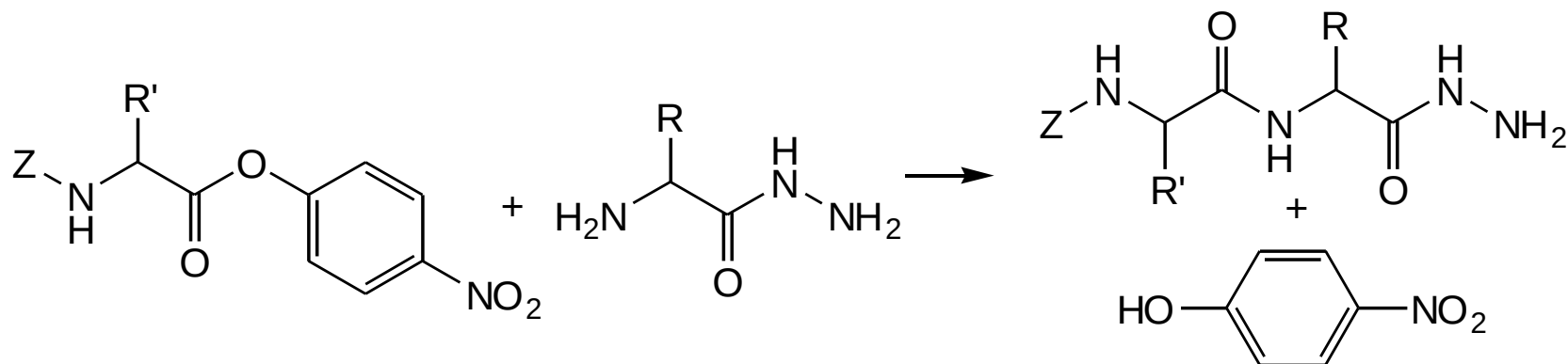
Możliwe jest zaktywowanie grupy karboksylowej bez naruszenia grupy aminowej:



Hydrazynoliza estrów jest często zbyt drastyczna i powoduje reakcje uboczne. Możliwe jest jednak zastosowanie osłoniętych hydrazydów (np. za pomocą Boc lub Z):

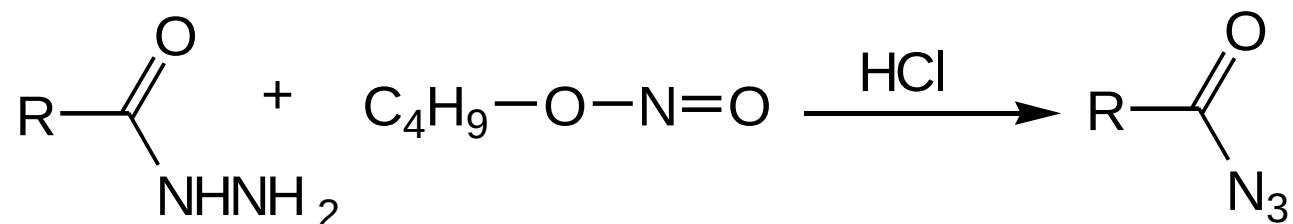


Możliwe jest także acylowanie grupy aminowej hydrazydów aminokwasów:

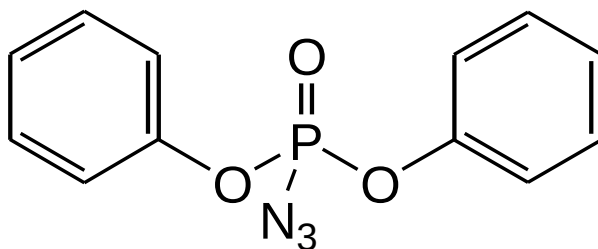


Inne metody otrzymywania azydów acylowych

Zastosowanie azotanu (III) butylu (azotynu butylu).

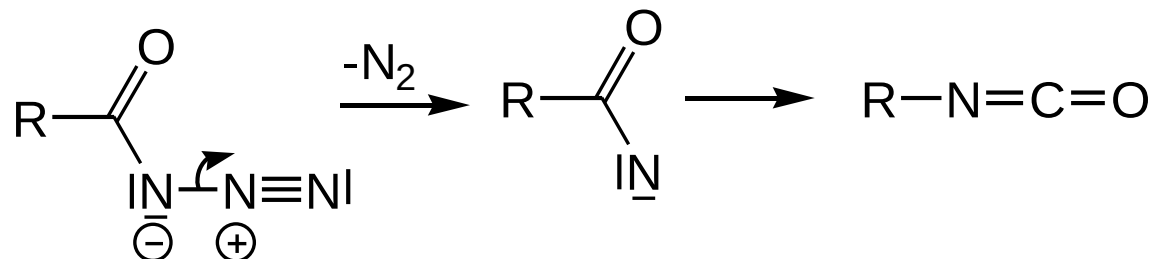


Zastosowanie DPPA:

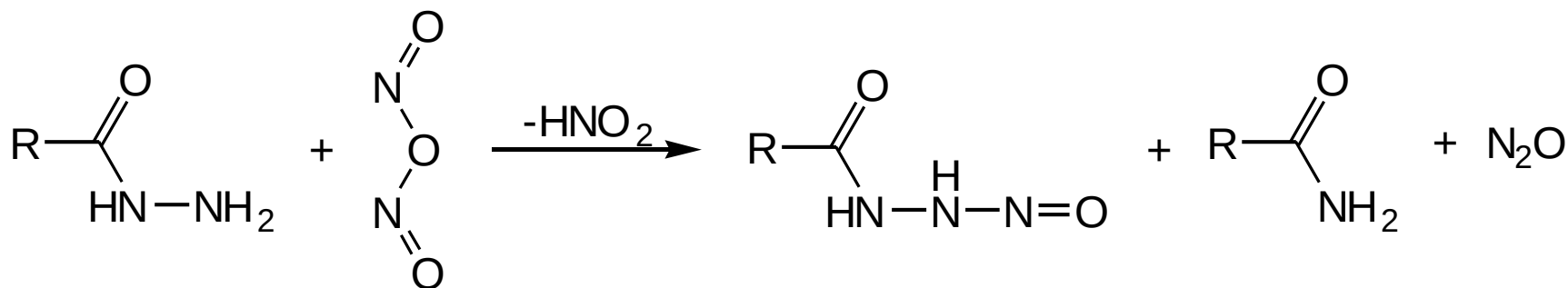


Reakcje uboczne:

- przegrupowanie Curtiusa i reakcje następne:



- tworzenie amidów zamiast azydków acylowych:

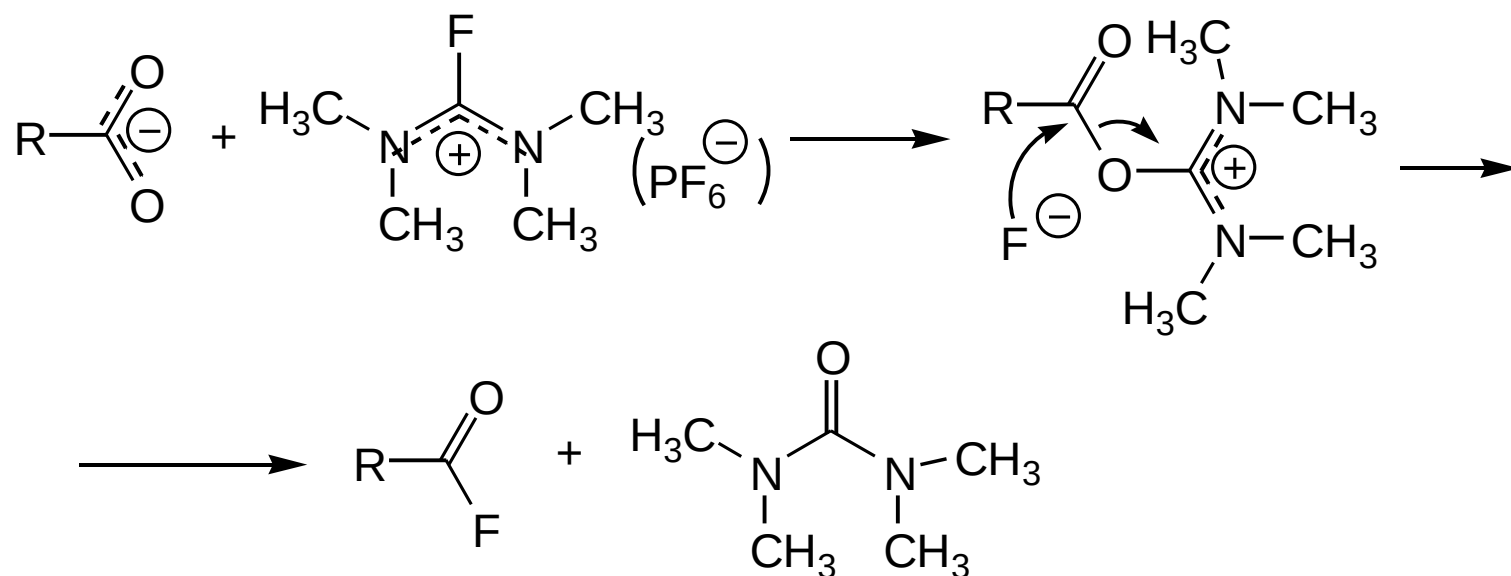


Acylowanie metodą azydkową biegnie często bardzo powoli. Ponadto stwierdzono iż w niektórych przypadkach występuje racemizacja.

Halogenki acylowe.

- bardzo silna aktywacja. Niebezpieczeństwo rozpadu pochodnych aminokwasowych z osłonami typu uretanu do N-karboksybezwodników (bezwodników Leuchsa). Praktycznie zastosowanie ograniczone do Fmoc- pochodnych aminokwasów.
- **Metody otrzymywania:**
- działanie na pochodną aminokwasową PCl_5 , SOCl_2 itp. Warunki tych reakcji są często zbyt drastyczne i powstają niekiedy uciążliwe produkty uboczne.
- Działanie tetrahalogenometanem (tetrahalogenkiem węgla) i trifenylofosfiną (otrzymywanie chlorków i bromków acylowych).

Zastosowanie specjalnych odczynników np. fluorku cyjanurylu
 heksafluorofosforanu fluoro-N,N,N',N'-tetrametyloformimidyniowego (TFFH)
 itp.:



Halogenopochodne Fmoc- aminokwasów są wyjątkowo trwałe i mogą być nawet przechowywane. Reagują bardzo szybko, przy niewielkim stopniu racemizacji. Znajdują zastosowanie tam, gdzie inne metody aktywacji zawodzą np. ze względu na występujące zawady steryczne (np. acylowanie kwasu α -amino-izomastowego itp.).

Estry aktywne.

Estry cyjanometylowe.

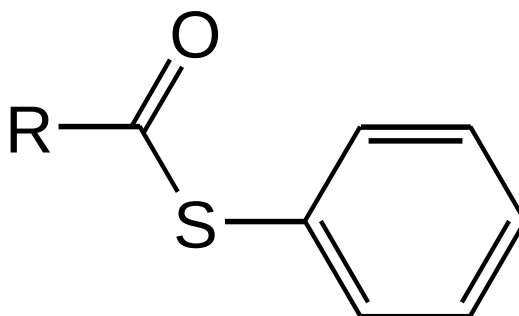
Otrzymywanie:



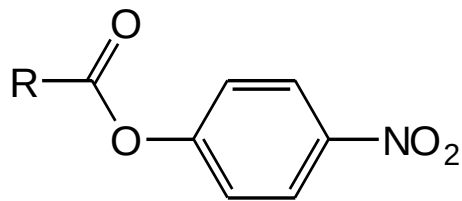
słaba aktywacja, małe szybkości reakcji aminolizy.

Estry aryłowe.

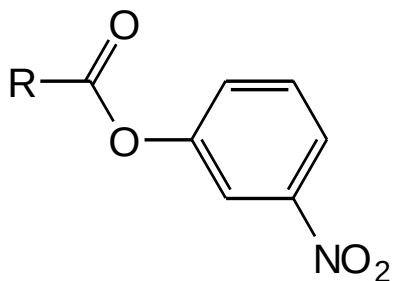
Estry tiofenylowe:



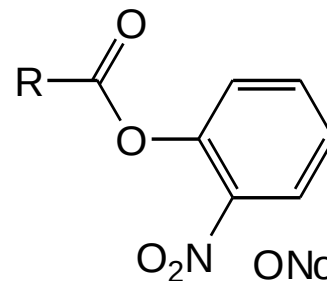
Podstawione estry fenylowe:



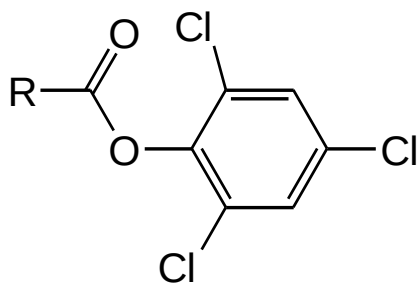
ONp



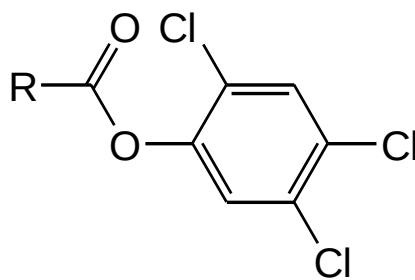
ONm



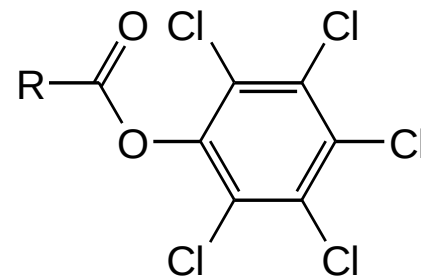
ONo



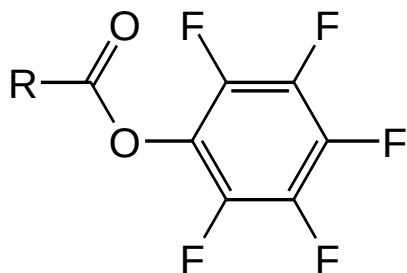
OTcp



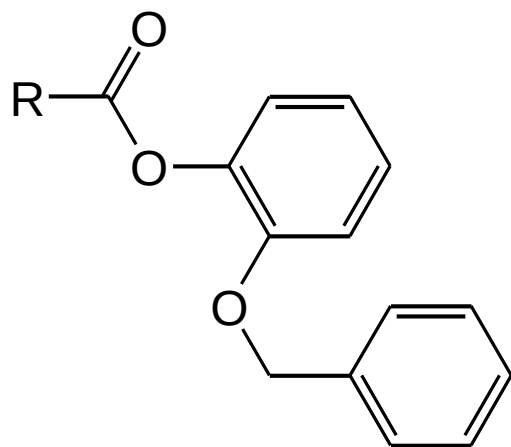
OTcp



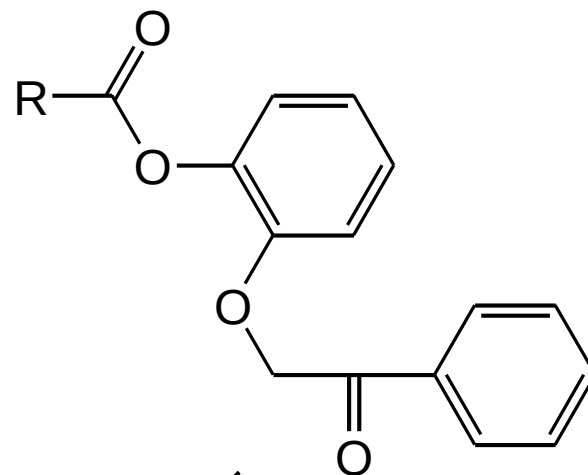
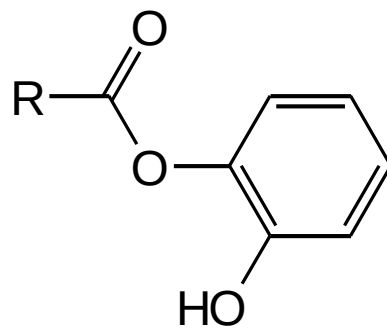
OPcp



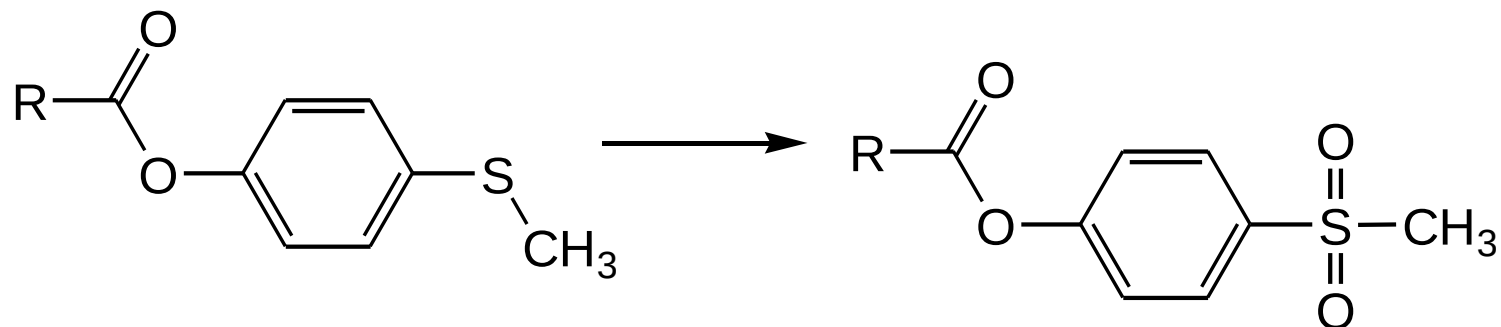
OPfp



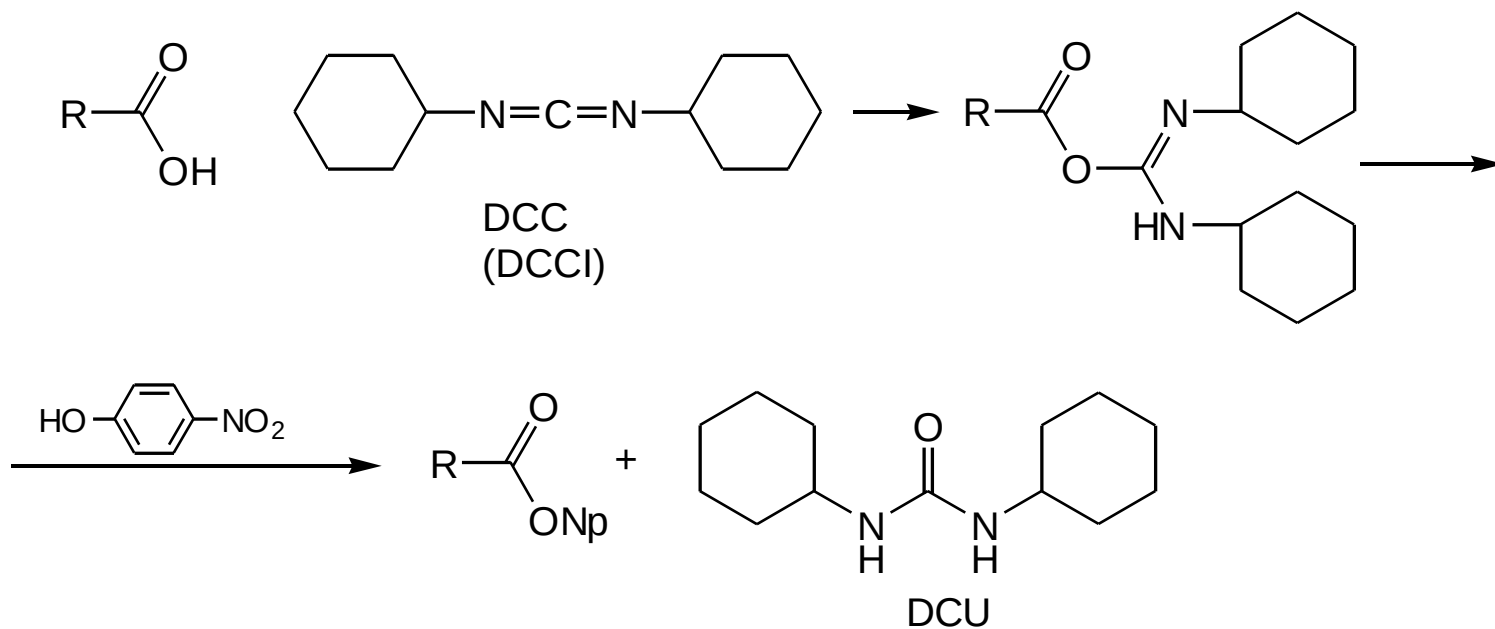
H_2/Pd



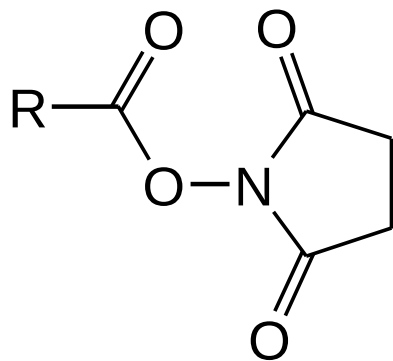
Zn/AcOH



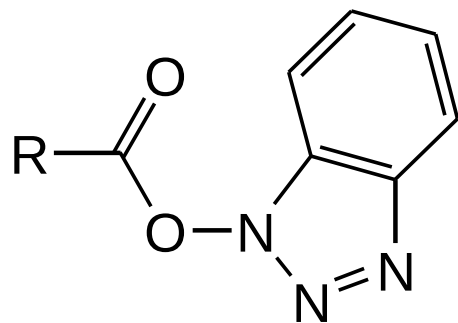
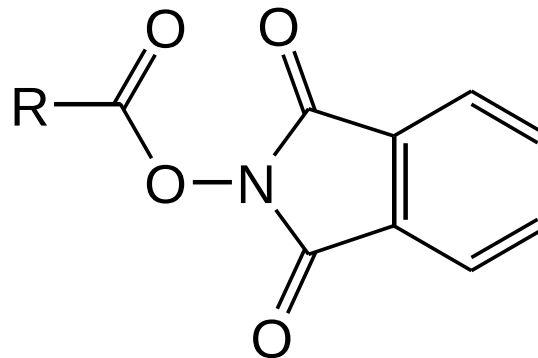
Otrzymywanie:



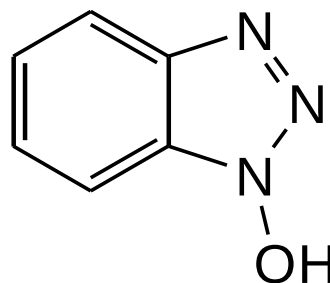
Estry pochodne hydroksyloaminy:



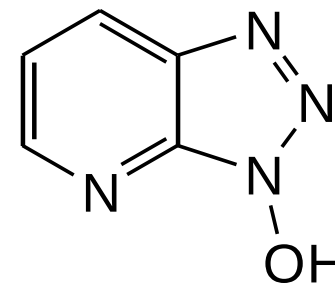
OSu
(ONsu)



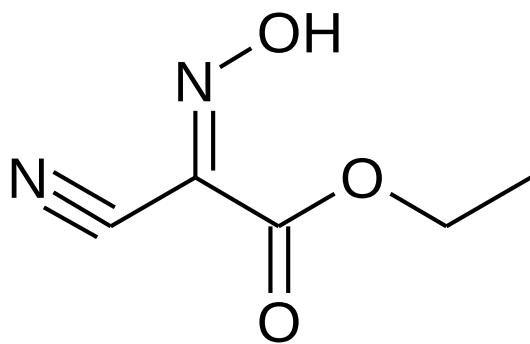
OBt



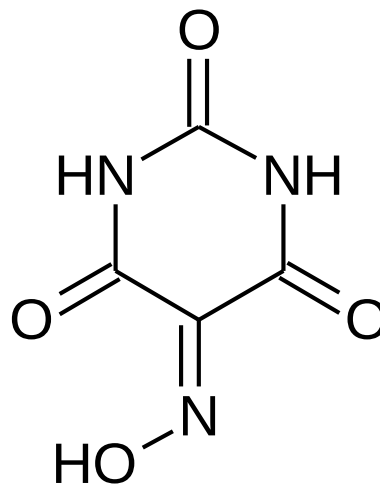
HOBT



HOAt

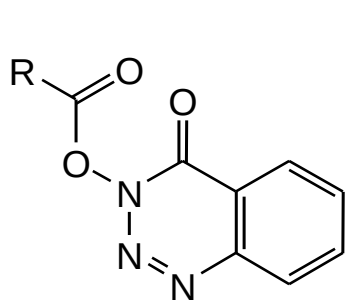


Oxyma pure

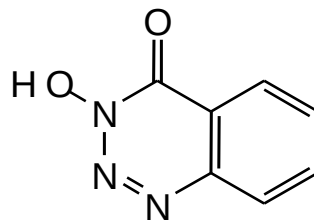


Oxyma B

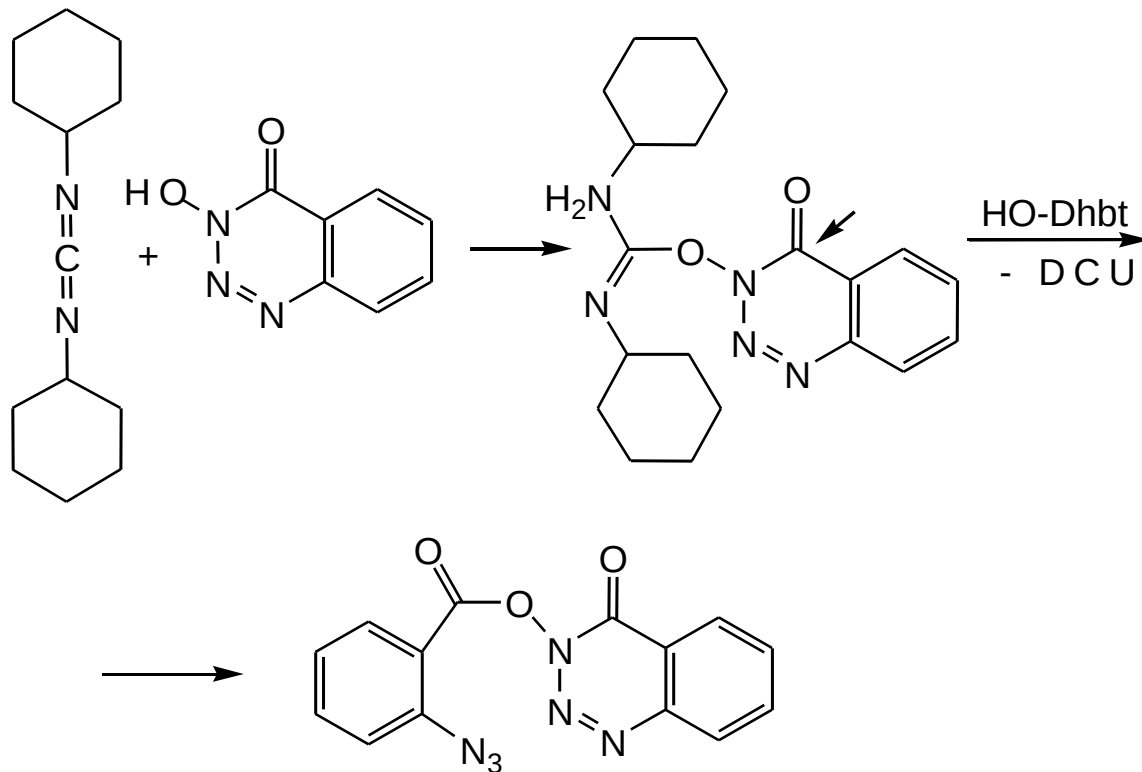
Estry 3,4-dihydro-4-oksobenzotriazyn-3-ylowe (ODhbt).



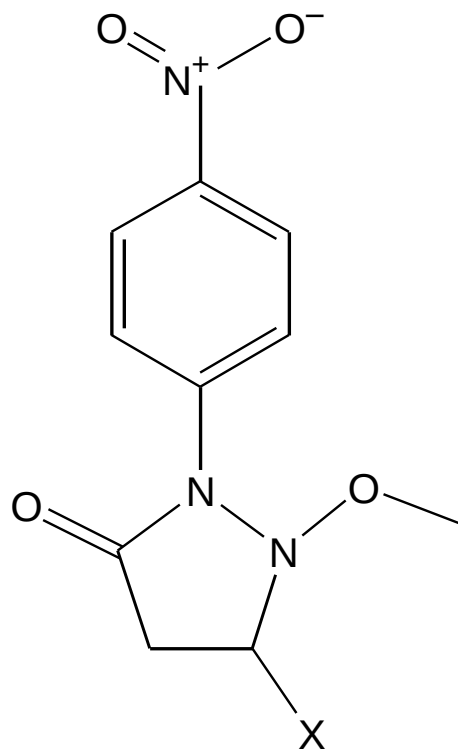
3-Hydroxy-3*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazin-4-one



Reakcja uboczna w trakcie tworzenia estrów Dhbt.



Estry 3-fenilo-1-(*p*-nitrofenilo)-2-pirazolin-5-onowe (-OPnp)
i 3-metylo-1-(*p*-nitrofenilo)-2-pirazolin-5-onowe (-ONpp).



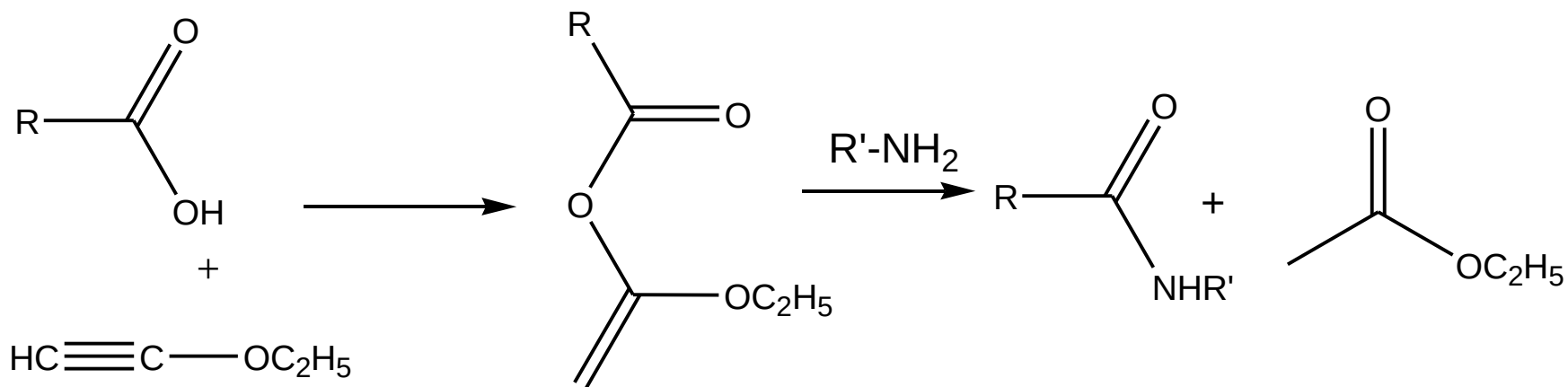
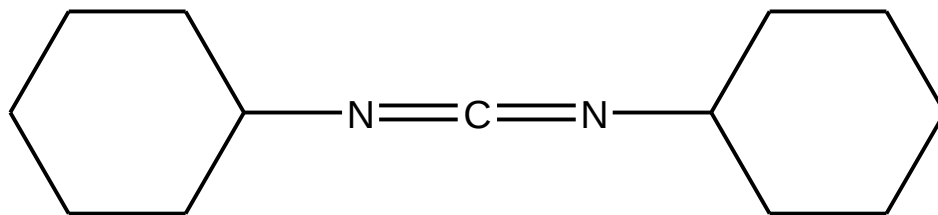
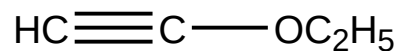
X = C₆H₅ - Pnp
CH₃ - Npp

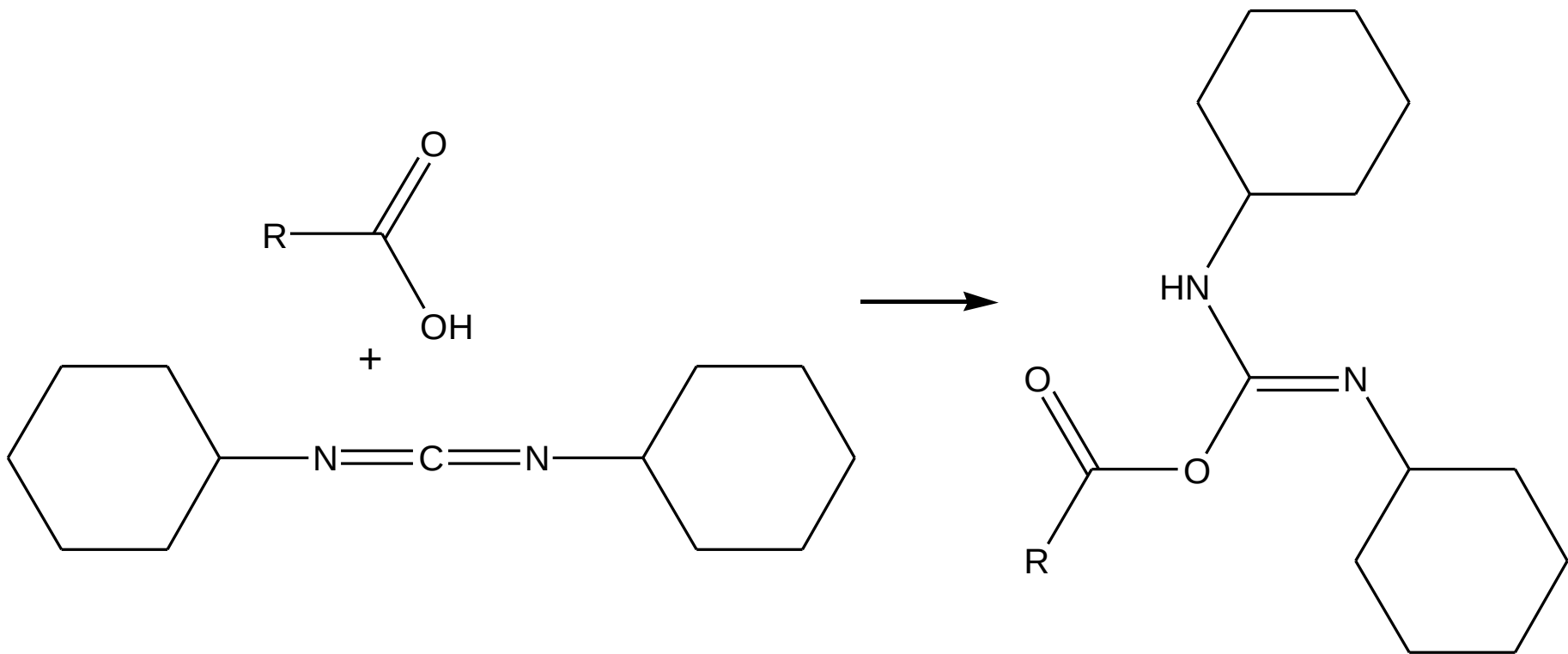
Względne szybkości acylowania:

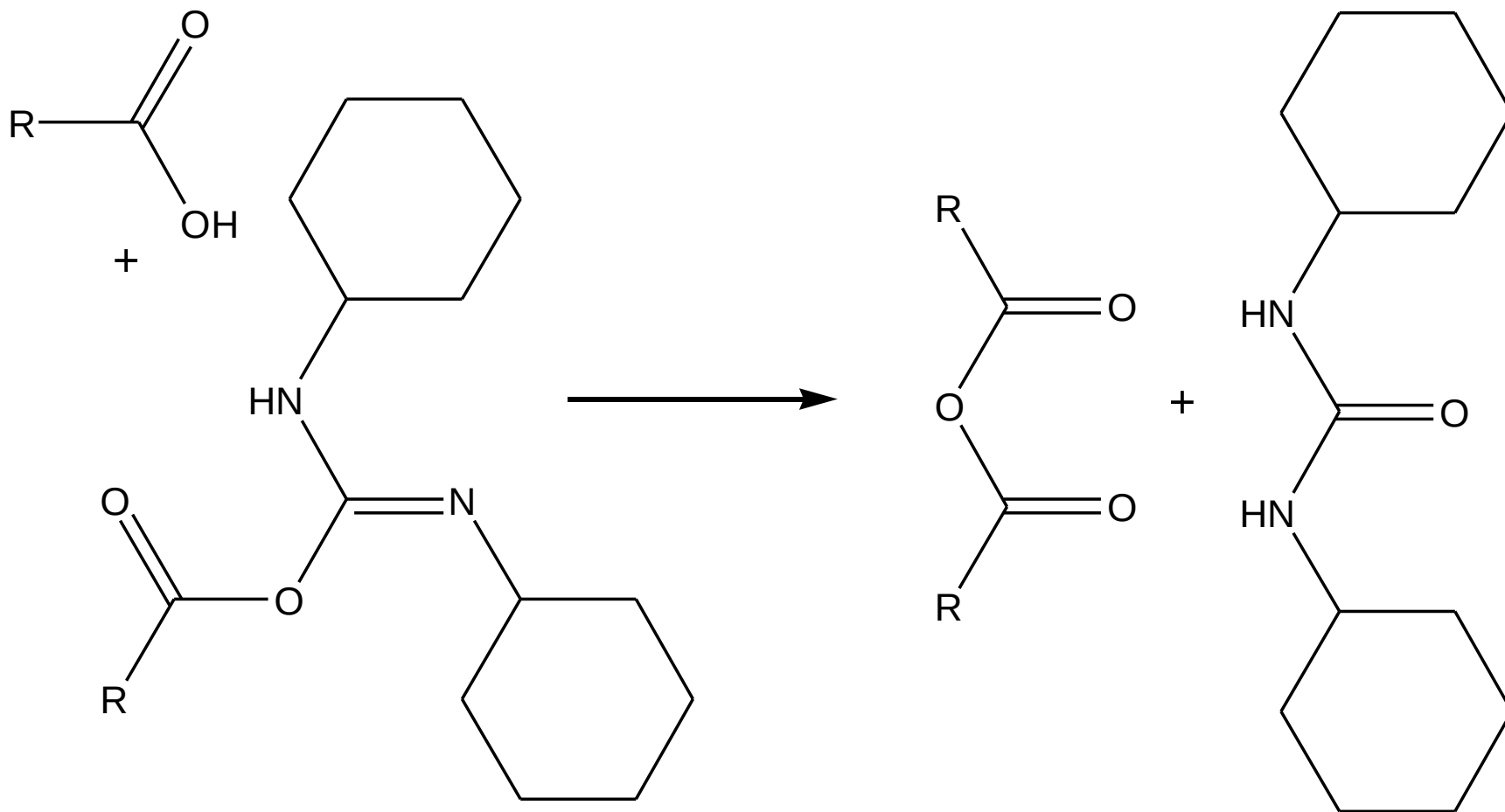
Pnp~Npp>Dhbt>Pfp~TDO>Tcp>Su>No

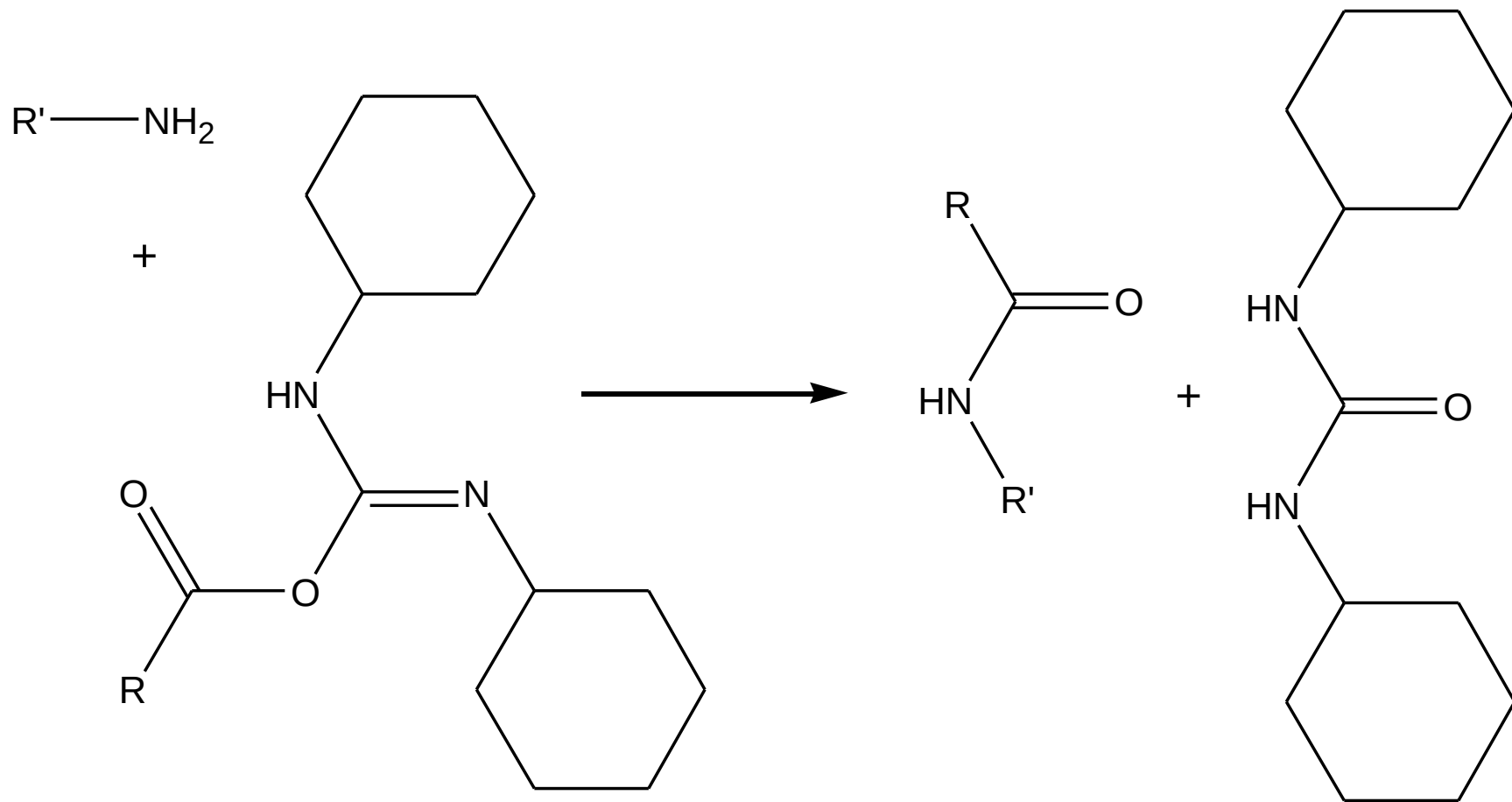
Zastosowanie odczynników sprzęgających.

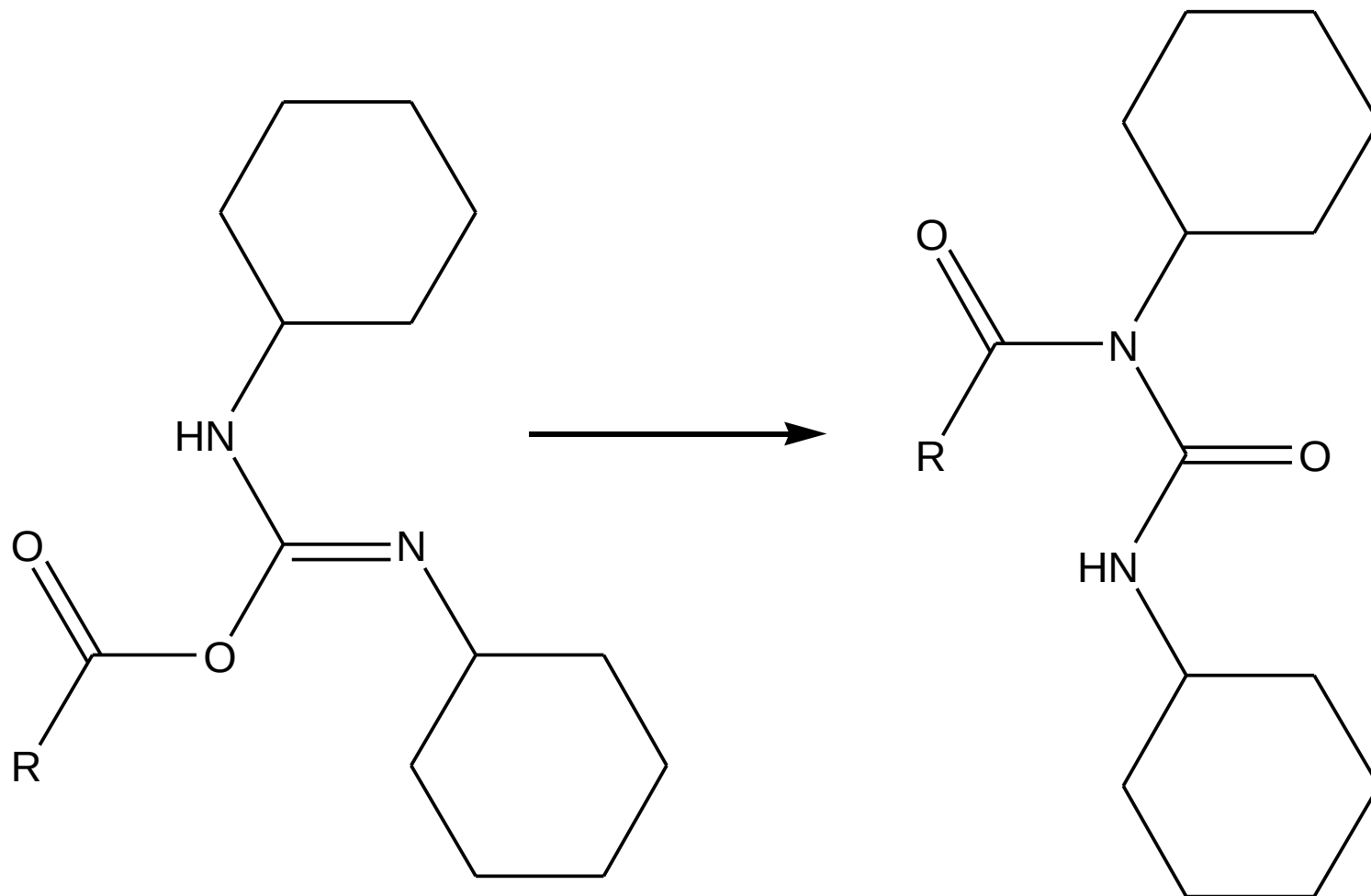
1955r



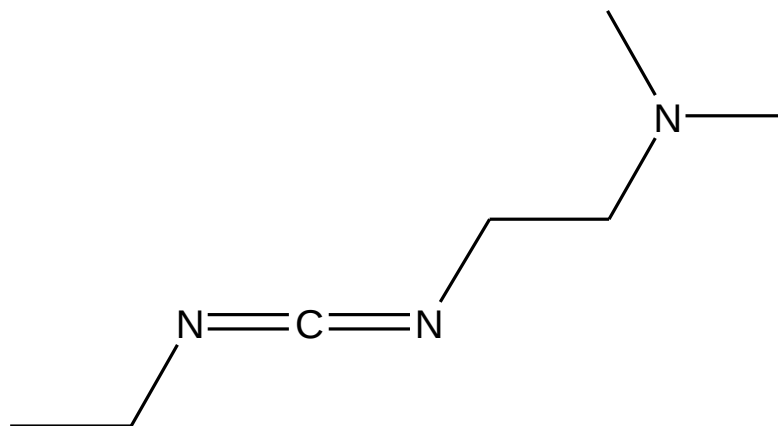






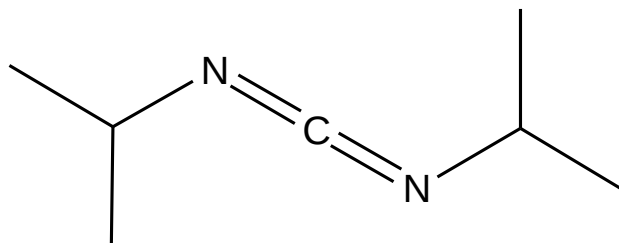


WSC (Water Soluble Carbodiimide)



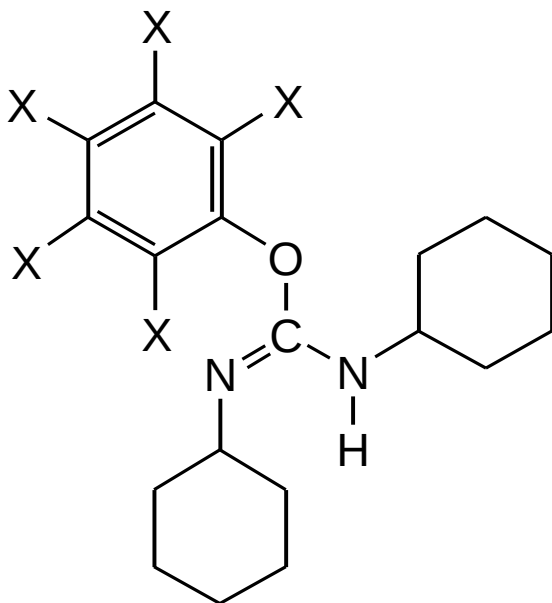
- powstająca jako produkt uboczny pochodna mocznika jest rozpuszczalna w wodzie i może być wyekstrahowana z mieszaniny reakcyjnej w postaci soli;
- ten karbodiimid powoduje powstawanie azlaktonów z niektórych pochodnych aminokwasów, nawet wtedy gdy zastosowana została osłona typu uretanu grupy α -aminowej.
- karbodiimidy i alkoksyacetyleny reagują selektywnie z grupą karboksylową.

DIPCDI, DIC diizopropylokarbodiimid



Powstający diizopropylomocznik jest dobrze rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych (szeroko stosowany w SPPS).

Pochodne karbodiimidów:

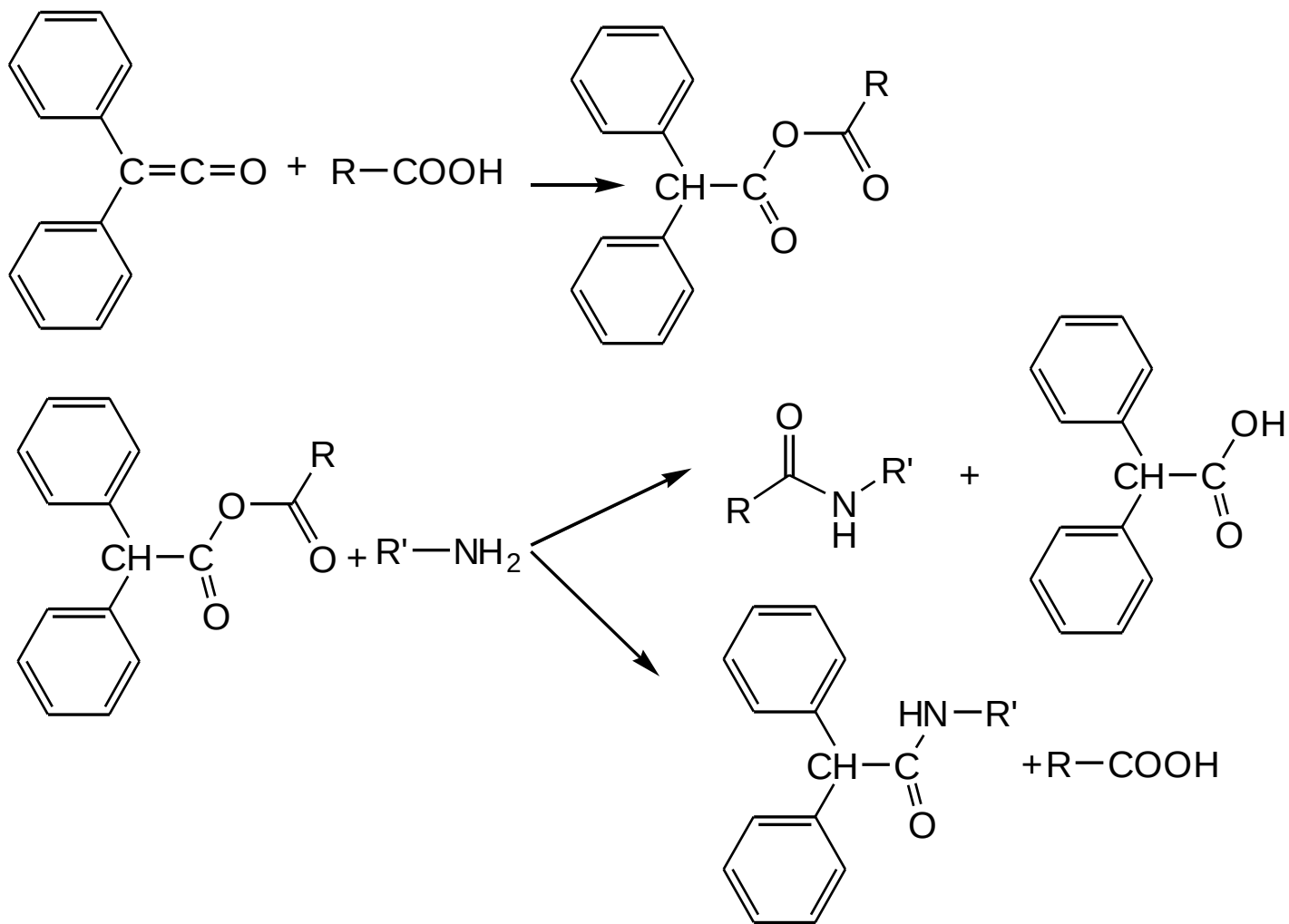


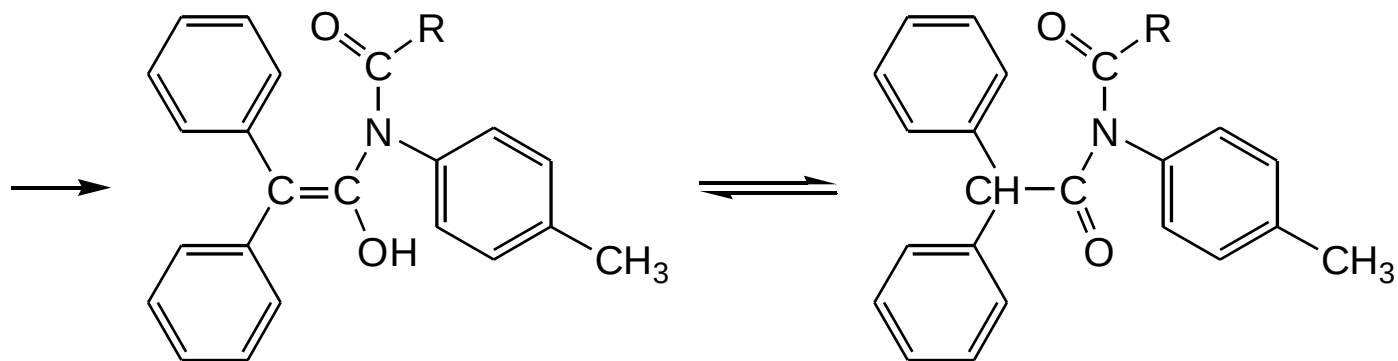
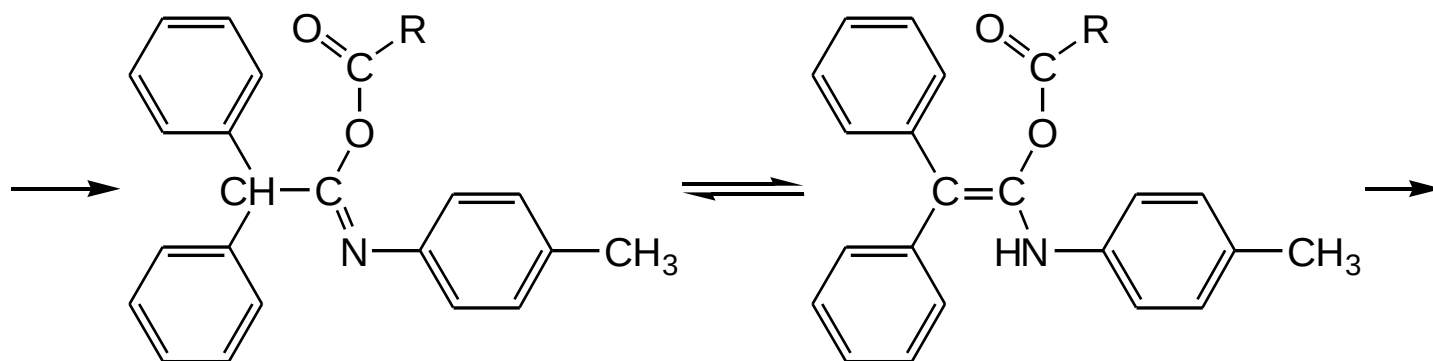
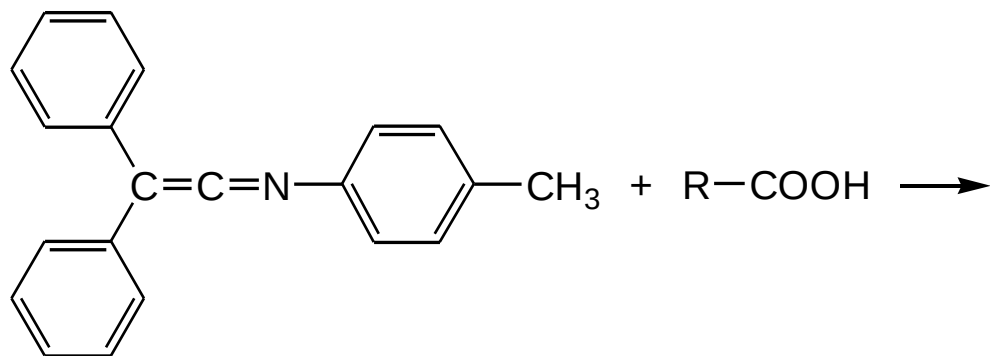
gdzie X = Cl lub F.

Pochodne ketenów.

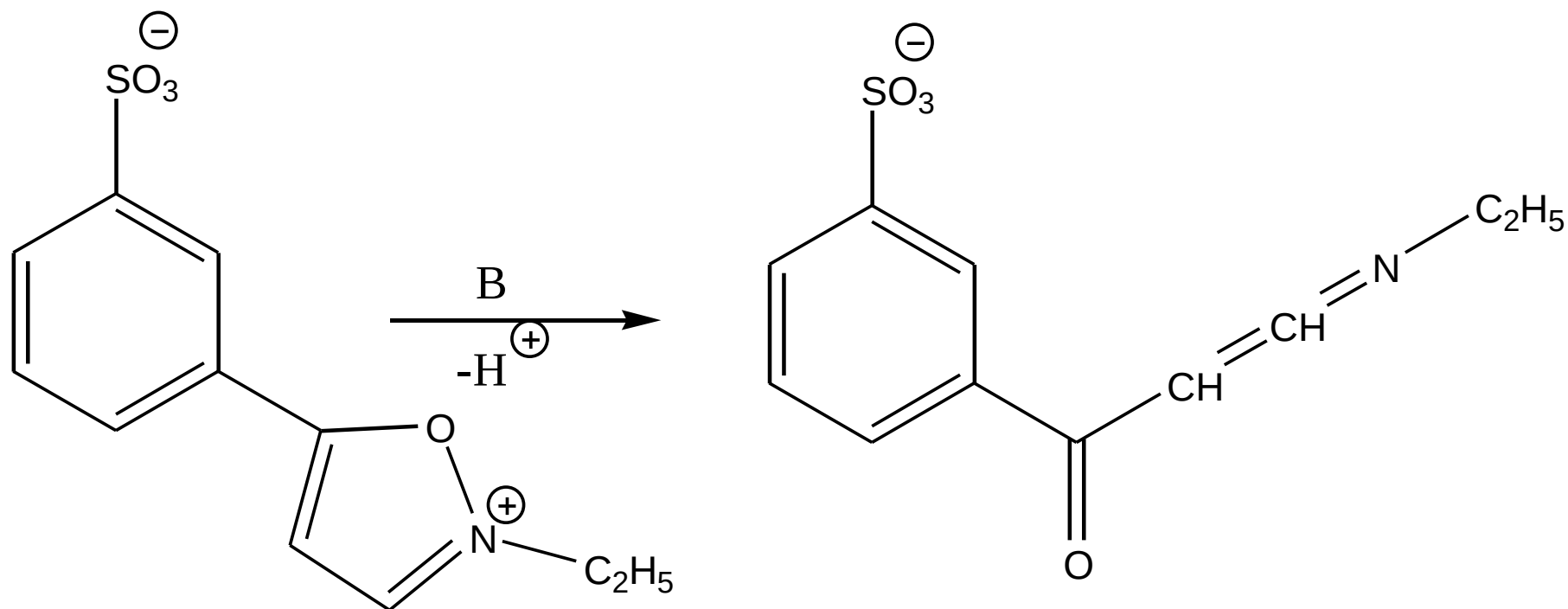
Keteny w reakcji z kwasami karboksylowymi dają asymetryczne bezwodniki.

Difenyloketen:

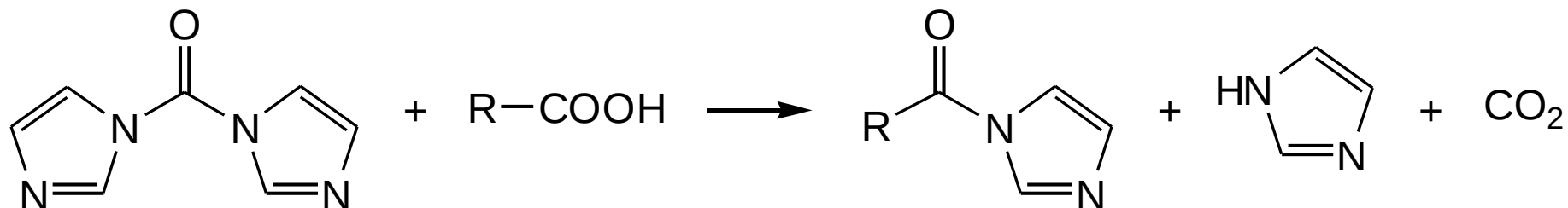




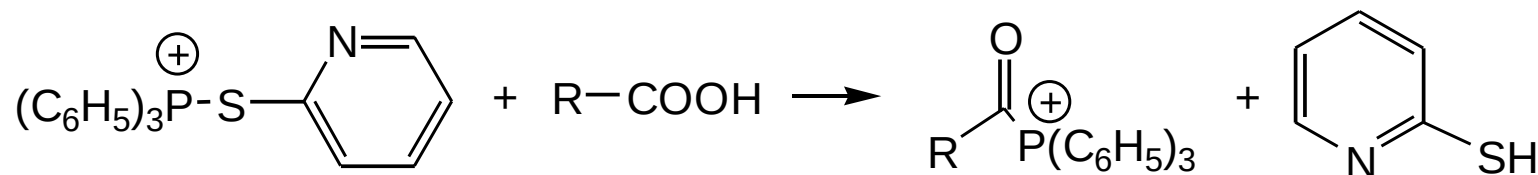
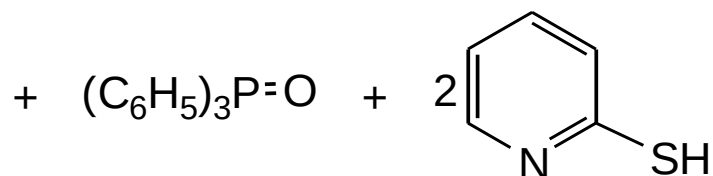
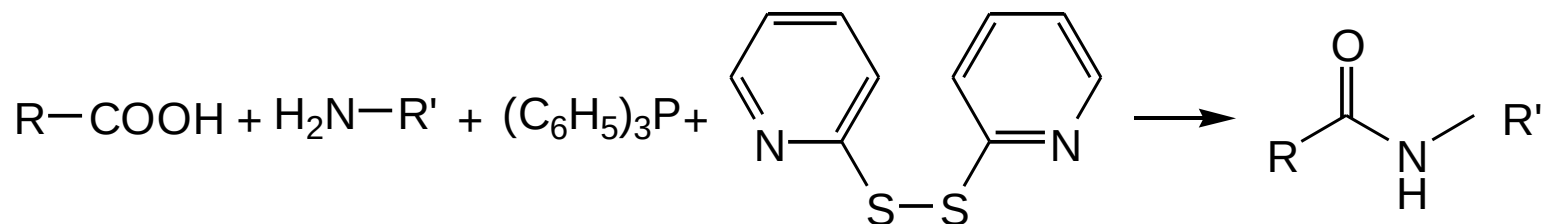
Odczynnik K Woodwarda:

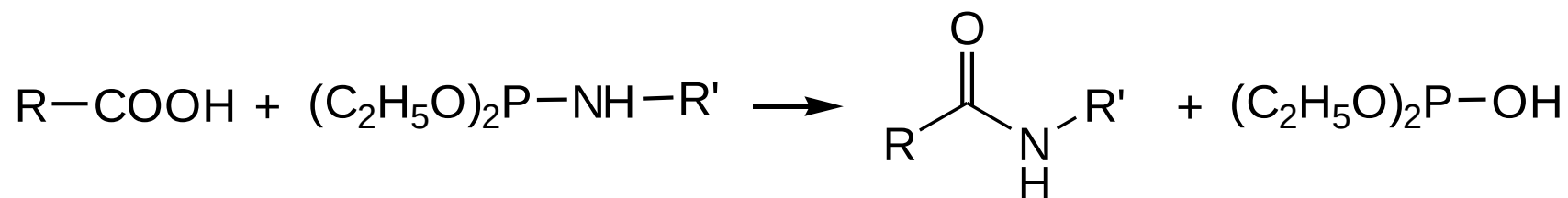


Pochodne fosgenu – karbonyldiimidazol (CDI):

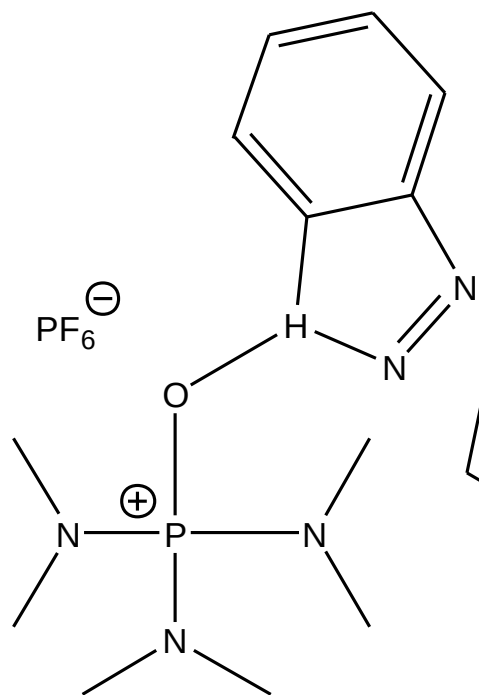


Pochodne fosfoniowe:

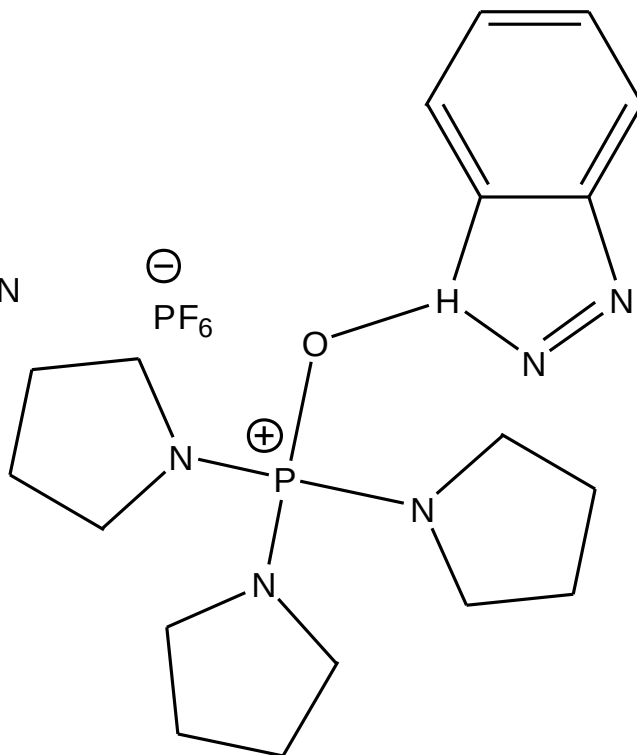




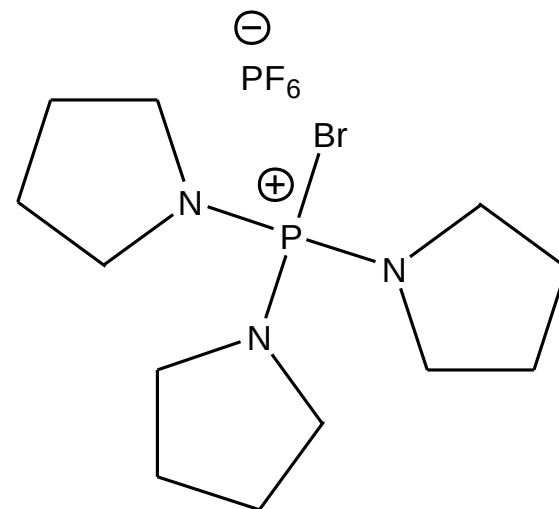
Odczynniki fosfoniowe.



BOP

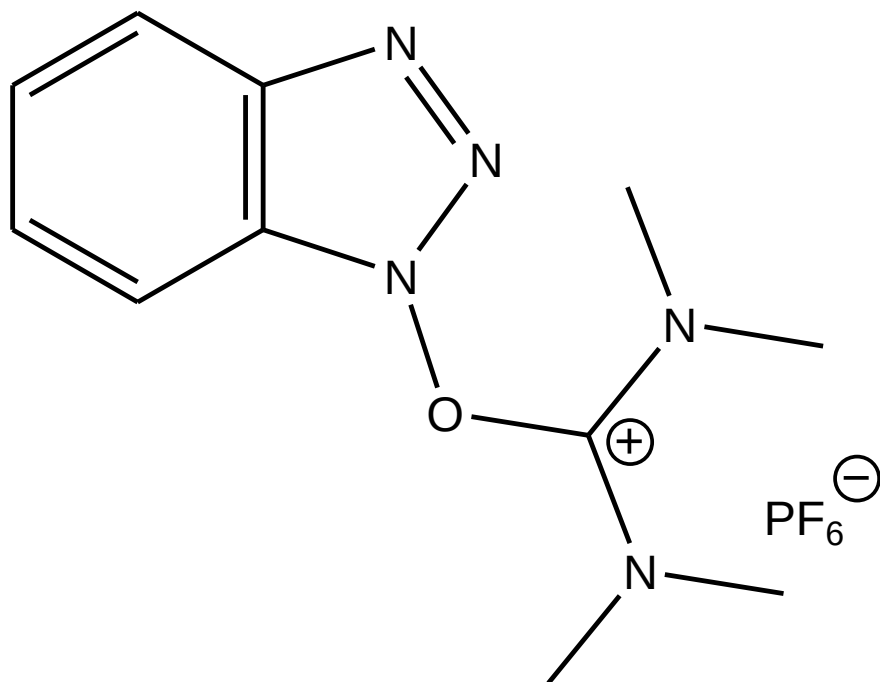


PyBOP



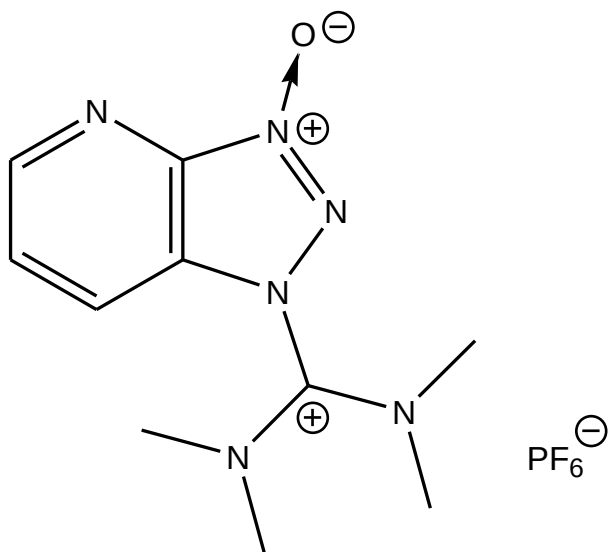
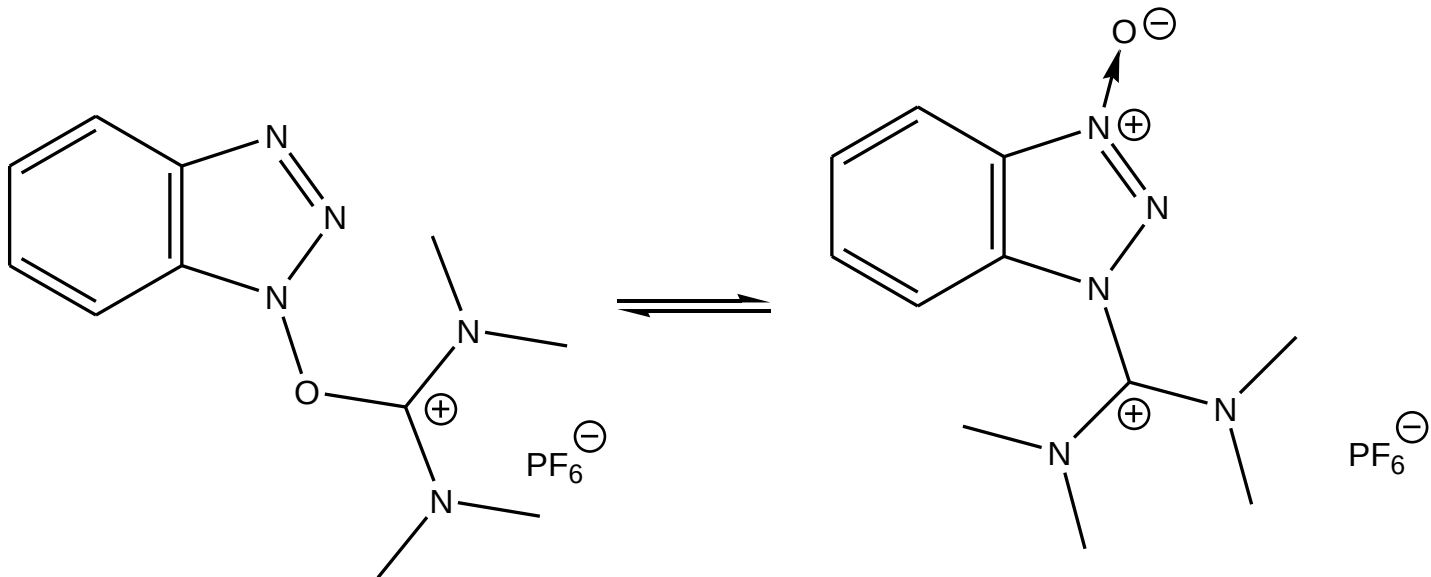
PyBroP

Odczynniki uroniowe.

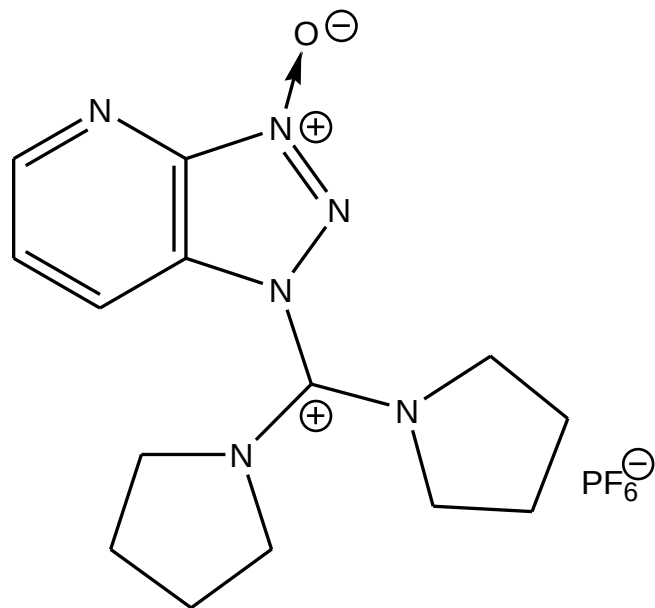


$X =$
 PF_6^- - HBTU

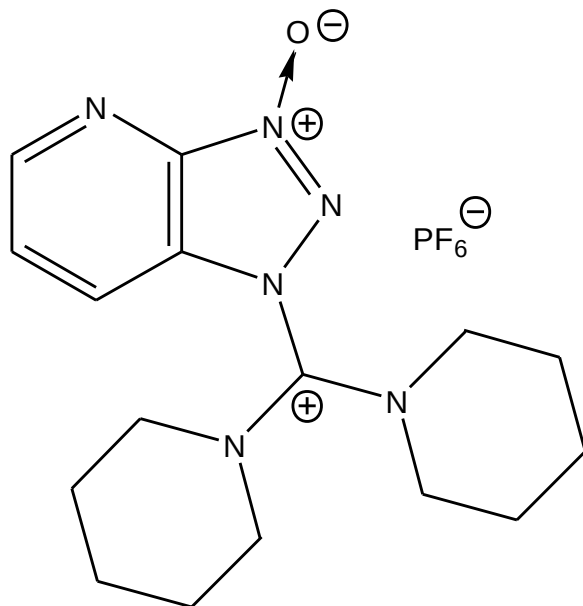
BF_4^- - TBTU



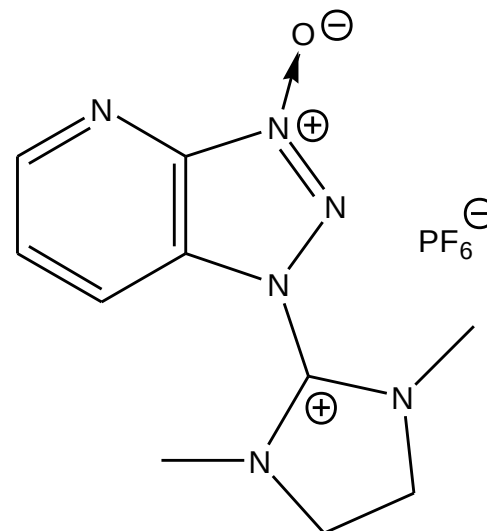
HATU



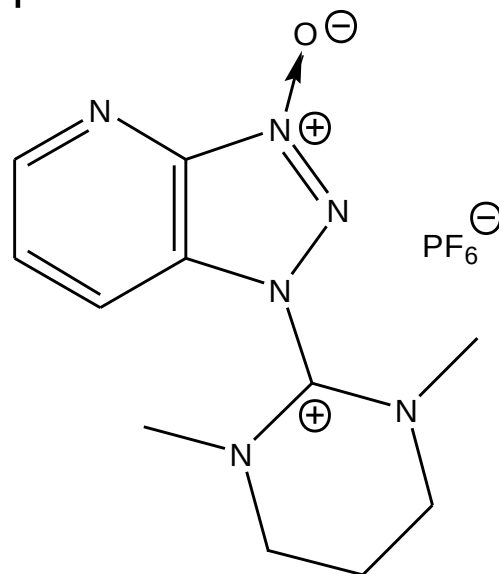
HAPyU



HAPipU



HAMDU



HAMTU

Synteza peptydów:

- „krok po kroku”:
 - ~~od N- do C końca sekwencji;~~
 - od C- do N-końca.
- Łączenie uprzednio zsyntezowanych fragmentów

W miejscu łączenia fragmentów powinny w miejscu łączenia występować aminokwasy nie ulegające, lub trudno ulegające racemizacji (Gly, Pro – reszty aminokwasowe aktywowane w procesie tworzenia wiązania peptydowego) oraz w miarę niewielkie zawady steryczne. Zalecane jest również zastosowanie metod aktywacji i warunków reakcji niesprzających racemizacji (metoda azydkowa itp., zastosowanie „dodatków antyracemizacyjnych” (HOBt, HOAt, oxyma itp.)

Problem wydajności w syntezie peptydów

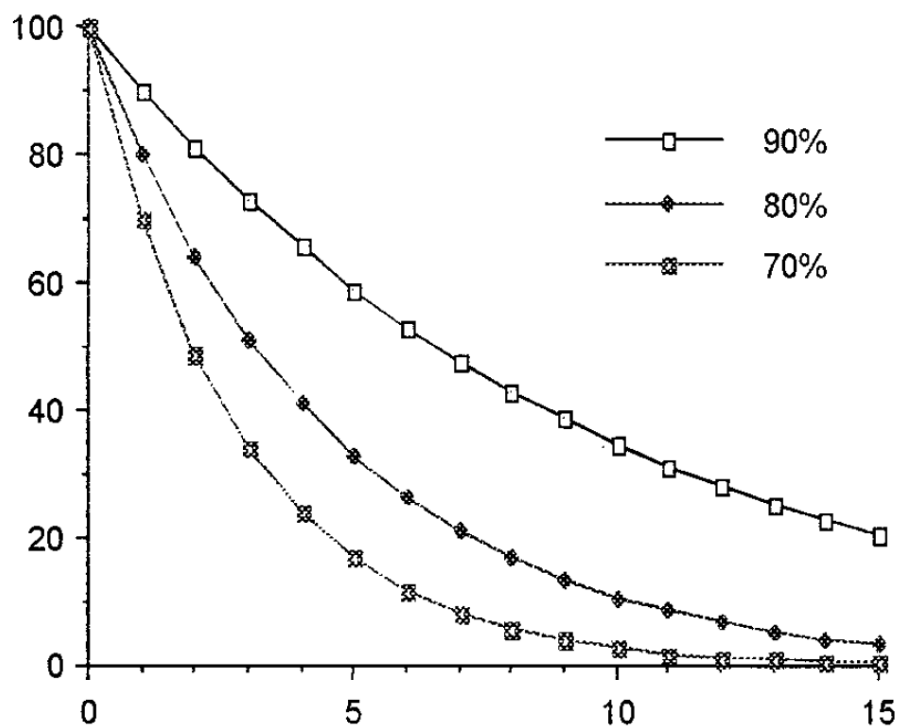
$$Y[\%] = 100 \left(\frac{y[\%]}{100} \right)^n$$

Gdzie:

$Y[\%]$ – wydajność syntezy

$y[\%]$ – uśredniona wydajność etapu syntezy

n – ilość etapów syntezy



Porównanie klasycznej metody syntezy peptydów z metodą syntezy na nośniku stałym

Metoda klasyczna	SPPS
• Niskie zużycie materiałów; • Powolna; • Wymaga dużego doświadczenia od prowadzącego syntezę; • Siła aktywacji i sposób tworzenia wiązania peptydowego są dobierane indywidualnie dla każdego etapu syntezy;	• Wysokie zużycie materiałów; • Szybka; • Nieskomplikowana - możliwa automatyzacja ; • Wymaga silnej aktywacji;
• Nie wszystkie reszty funkcyjne łańcuchów bocznych muszą być osłaniane;	• Na ogół stosuje się pełną osłonę grup funkcyjnych łańcuchów bocznych;
• Możliwe jest prowadzenie syntezy przez łączenie fragmentów.	• Na ogół synteza prowadzona jest metodą „krok po kroku”, od C-końca peptydu w kierunku N- końca peptydu.

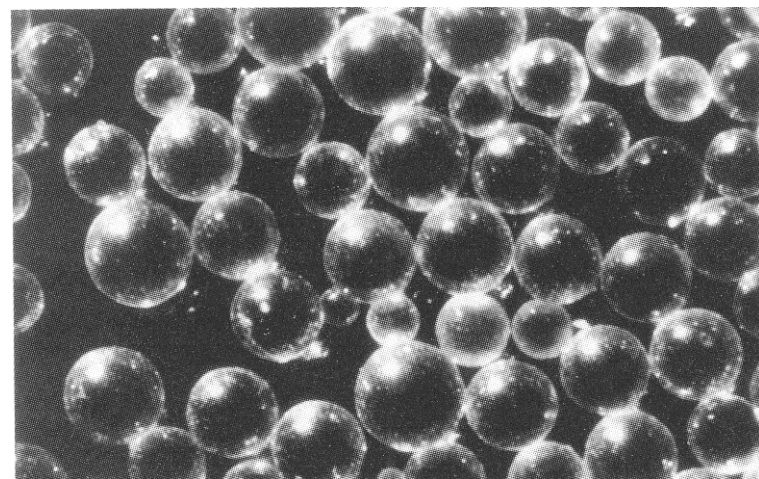
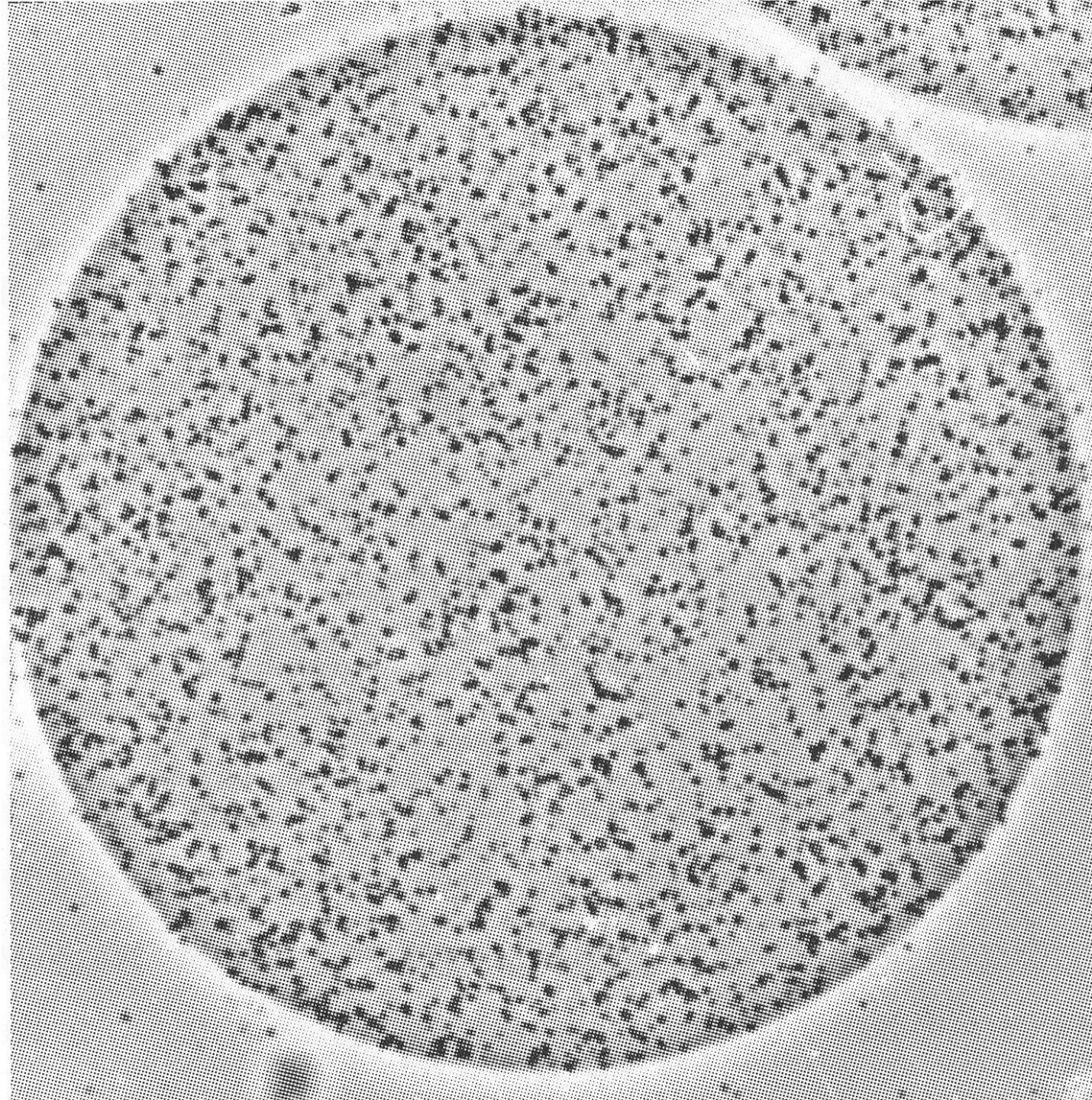
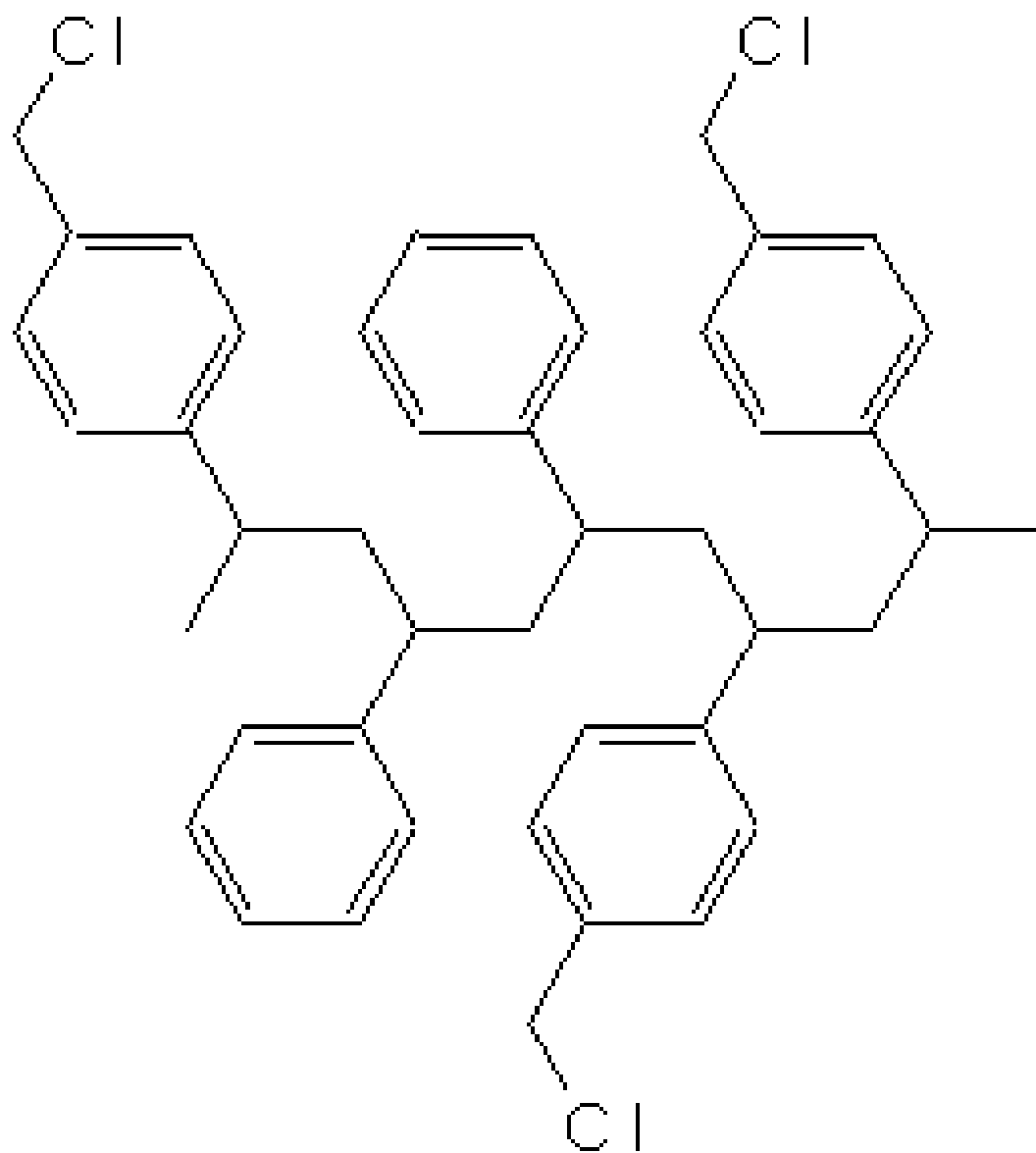
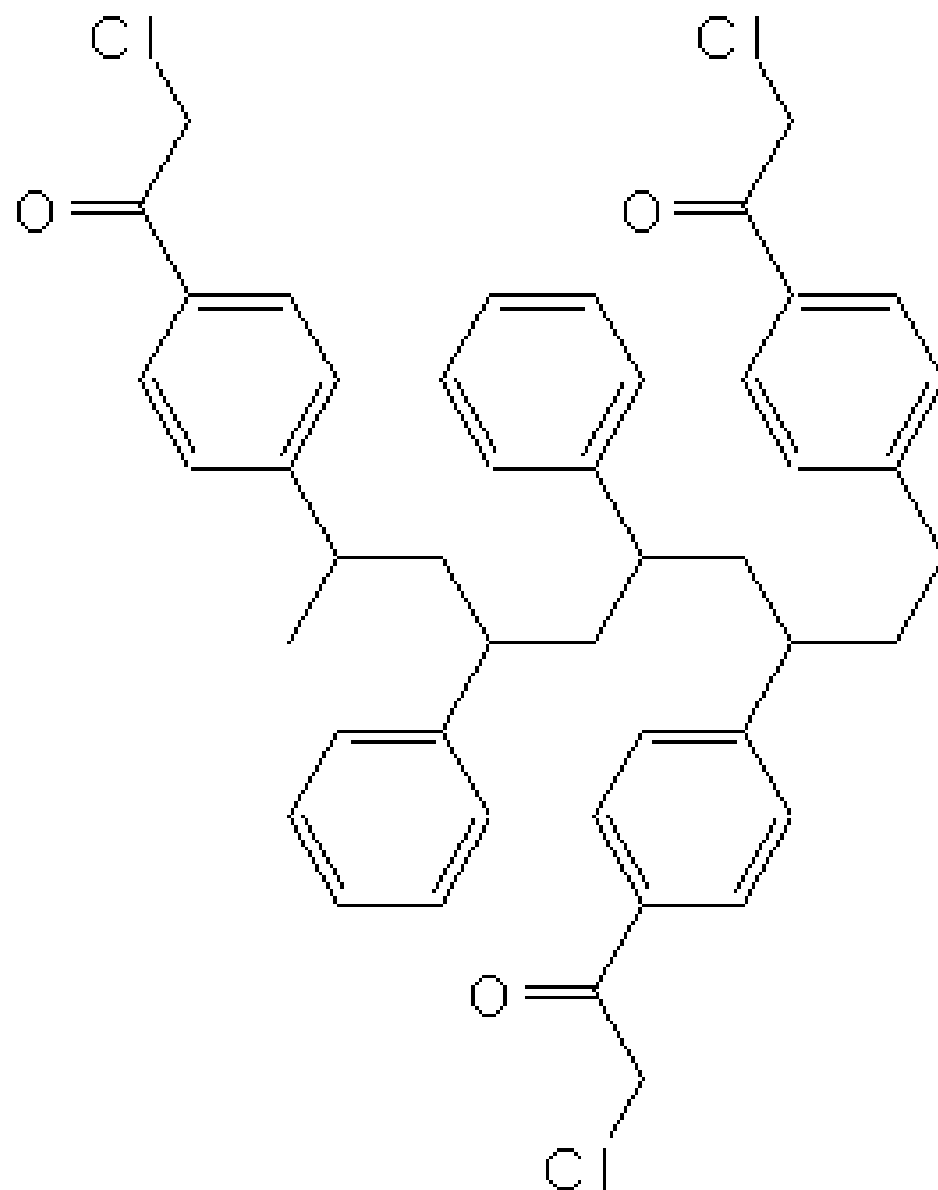


Fig. 4.38 Robert Bruce Merrifield and the first-generation solid-phase peptide synthesizer.

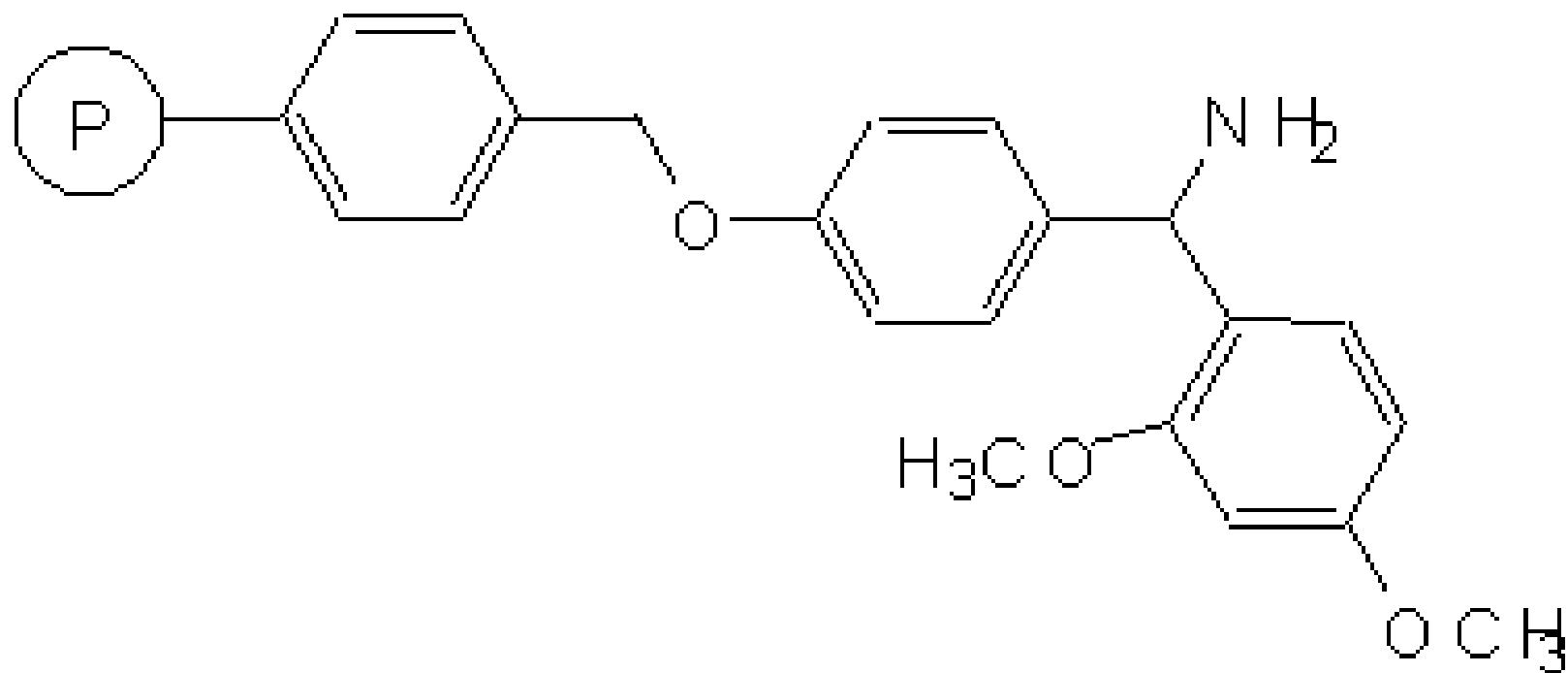




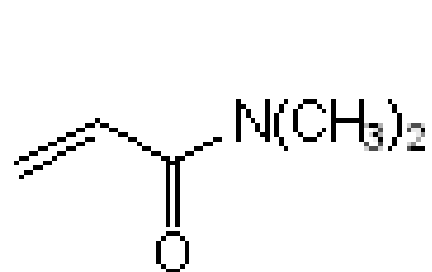
Chlorometylowana żywica polistyrenowa



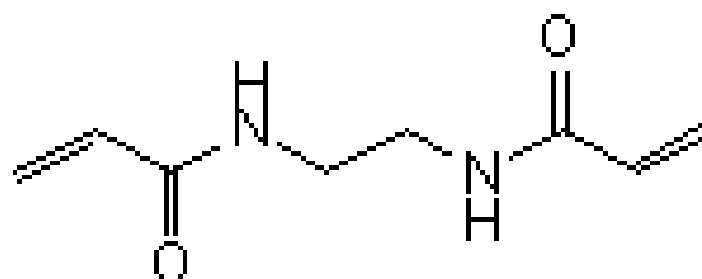
Żywica PAM



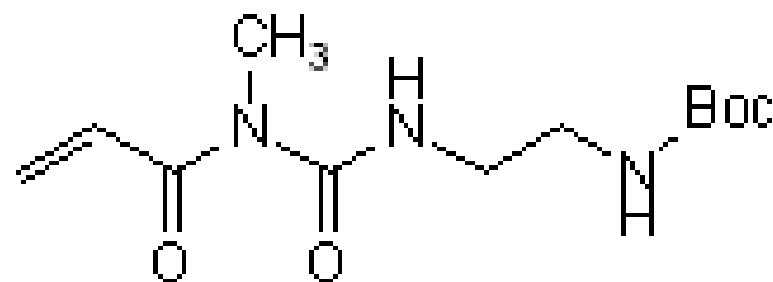
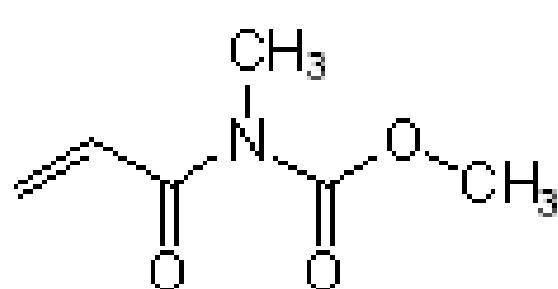
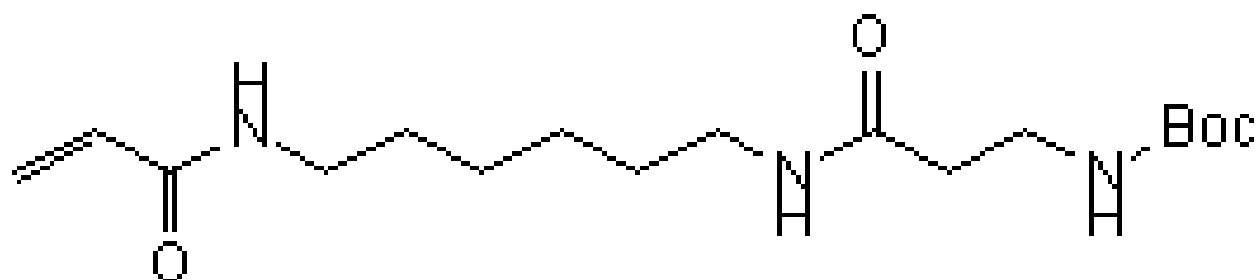
Žywica Rinka

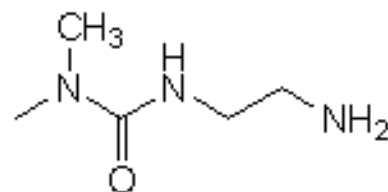
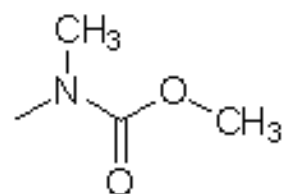
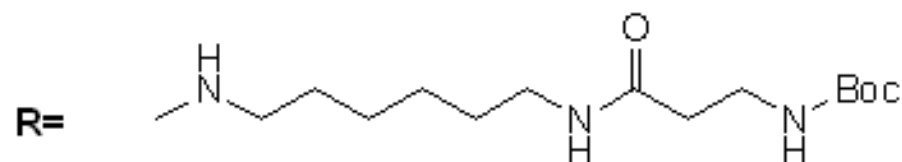
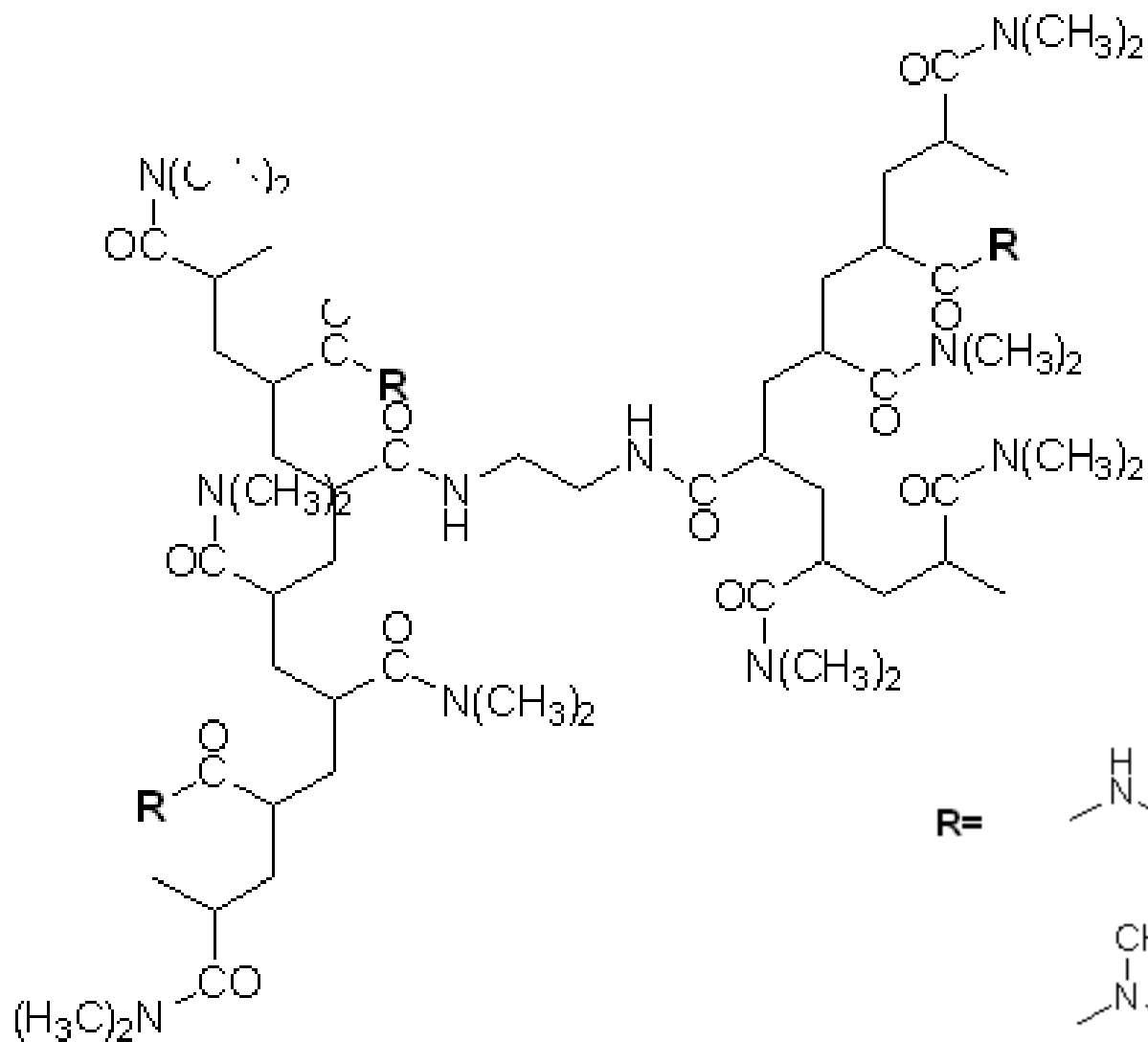


N,N dimetyloakrylamid

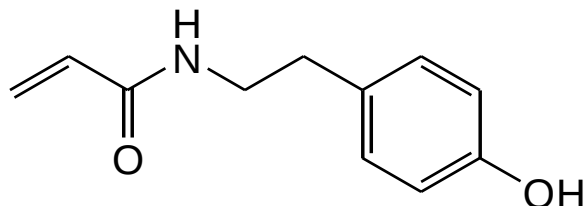


N,N' bisakryloetylenodiamina





Nośnik “core Q”



poli[N-2-(4-hydroksyfenylo)etylo]akryloamid

zastosowano jako nośnik o wysokim stopniu osadzenia.

Żywice poliakryloamidowe oparte na N- akroilopirolidynie jako monomerze podstawowym, usieciowanym N,N'etylenobisakrylamidem kopolimeryzowane z:

- estrem metylowym akroilo- β -alaniny (SPARE);
- chlorowodorkiem N-akroilo-1,6diaminoheksanu (PAP).

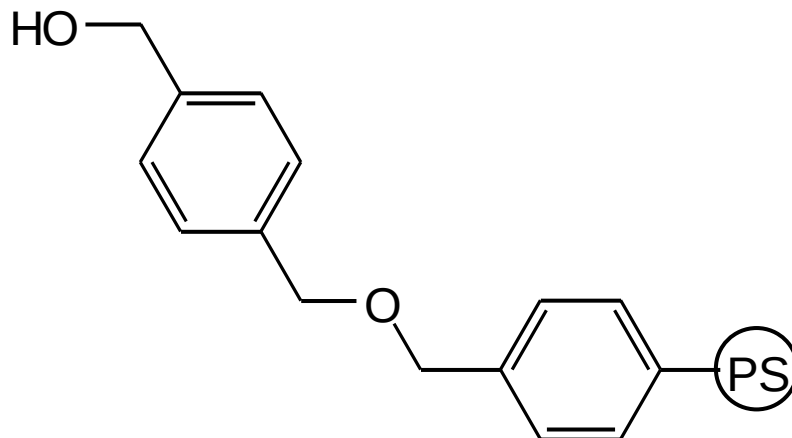
Żywice te osadzane są na mechanicznie stabilnych, porowatych podłożach, np. szerokoporowatym żelu krzemionkowym (nośnik PepSyn K), lub tzw. polyHIPE (high internal phase emulsion).

Nośniki oparte na glikolu polietylenowym szczepionym na usieciowanym DVB

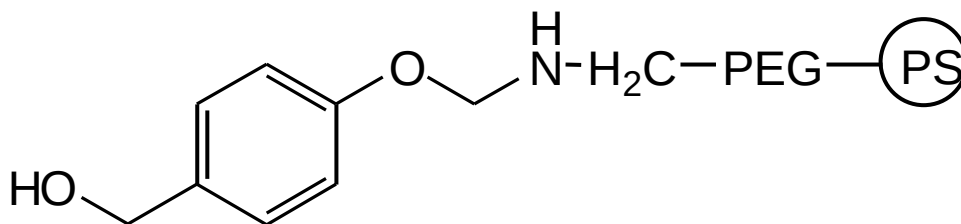
polistyrenie – Tenta Gel, Nova Syn TG itp



„Linkery”:



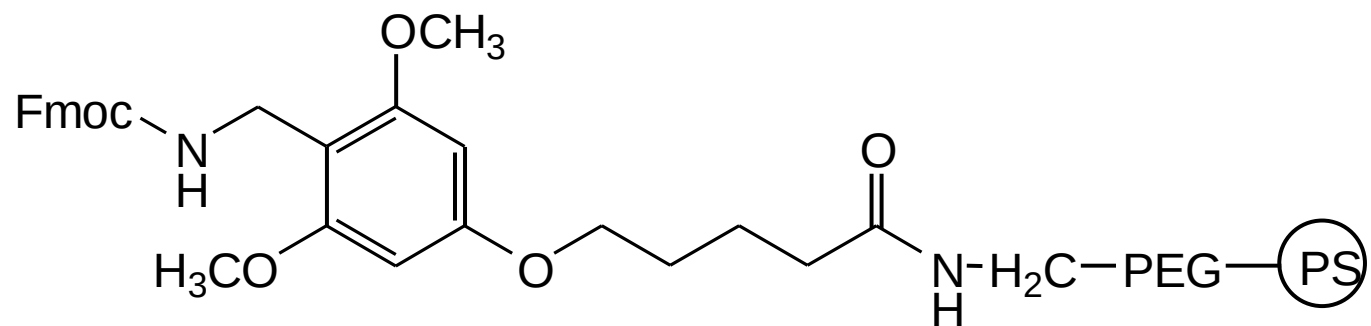
Wang



Nova Syn TGA,
TentaGel S PHB,
Tenta Gel R PHB
Pep Syn KA

Odszczepianie – TFA (50 – 95%) – wolna grupa karboksylowa.

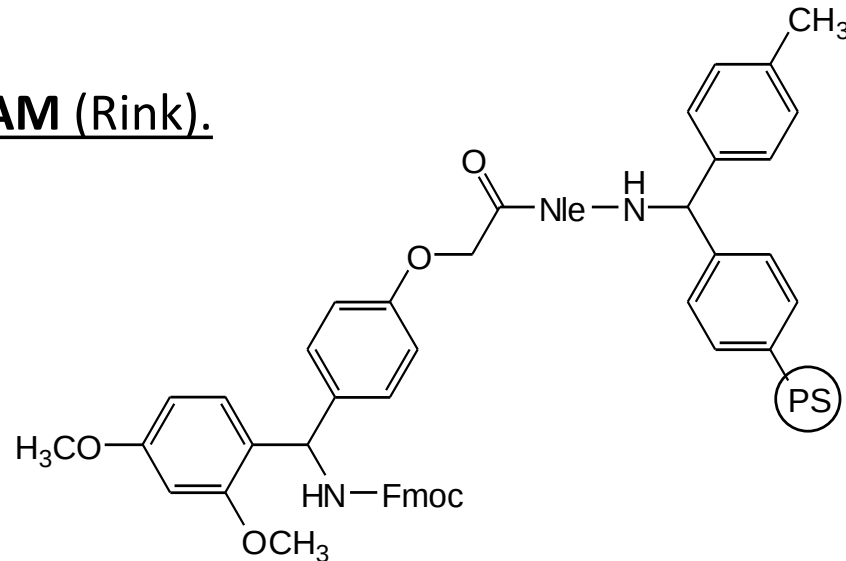
PAL.



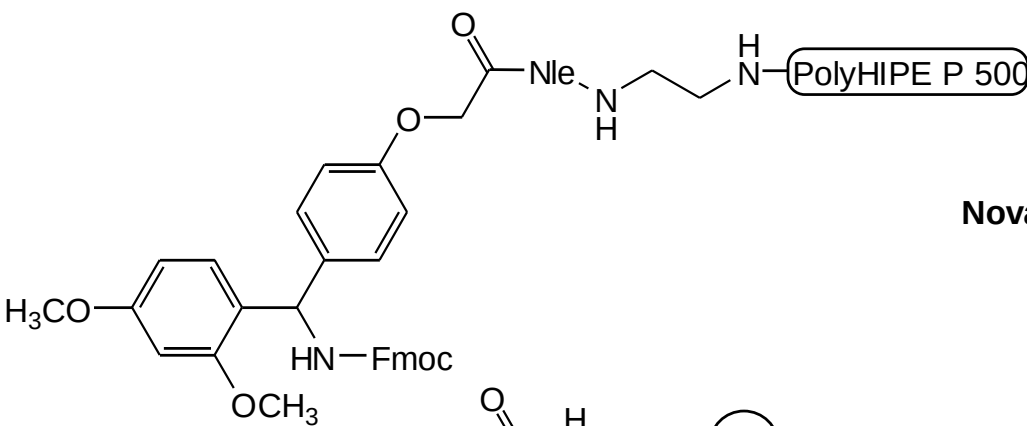
Tenta Gel S AM

Odszczepianie: 25 – 95% TFA, w postaci amidu.

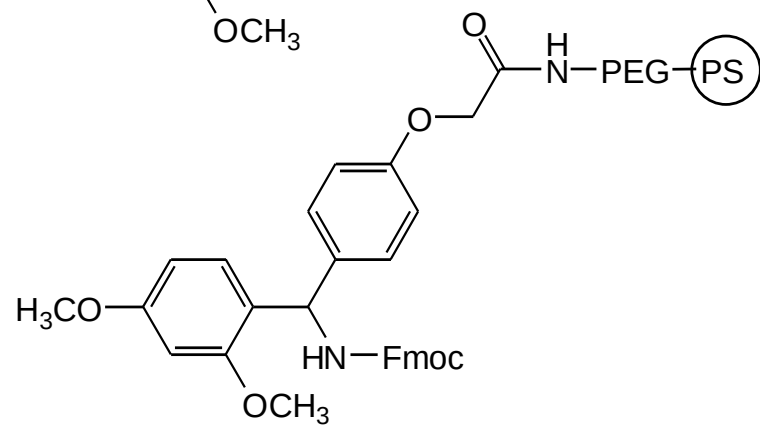
AM (Rink).



Rink amide MBHA (Nova)



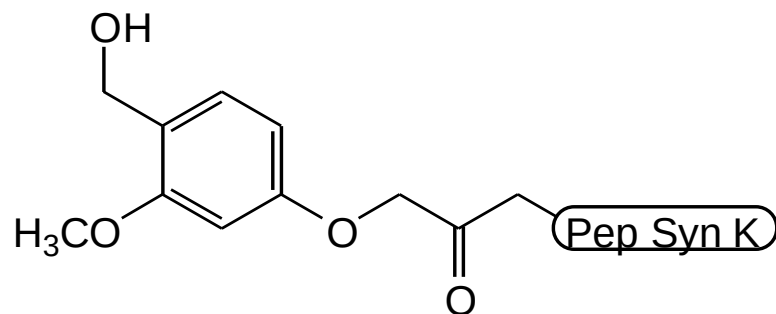
Nova Syn PR



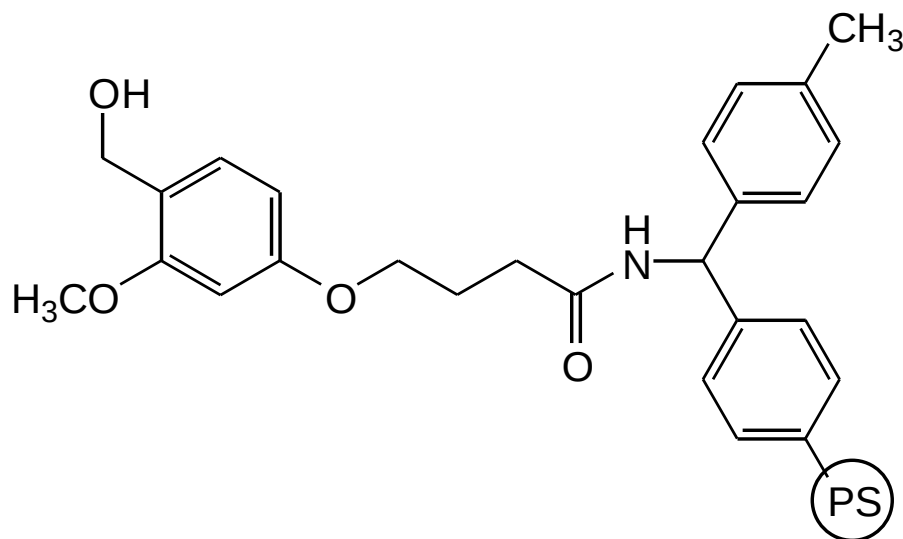
**Tenta Gel S RAM
Tenta Gel R RAM
Nova Syn TGR**

Odszczepianie: 60 – 95% TFA
(ulega odszczępieniu przy
stężeniach TFA wyższych od
2%) – amid.

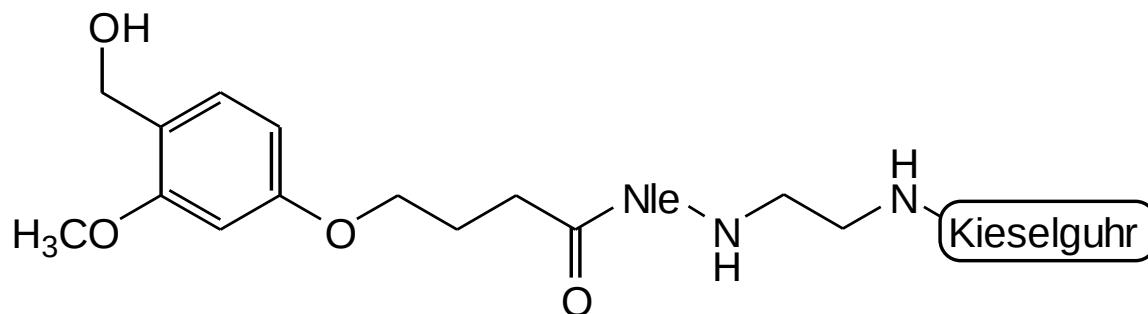
KH (HMPB)



Pep Syn KH



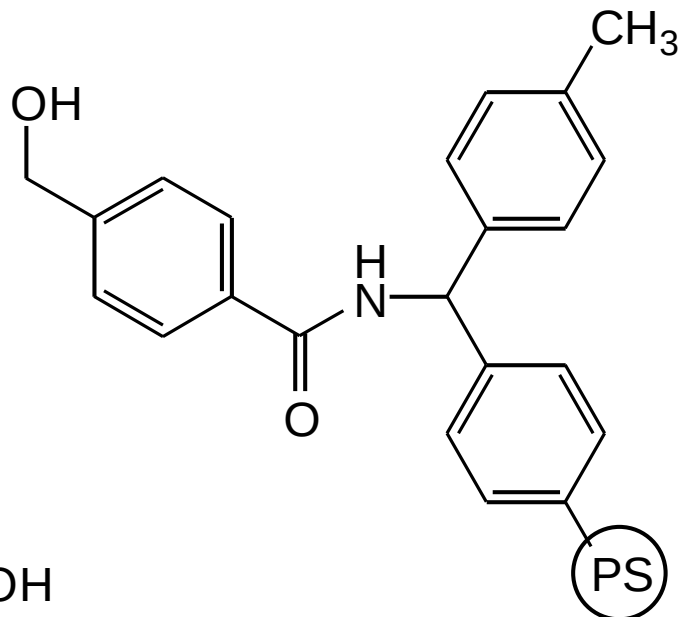
HMPB - MBHA (Nova)



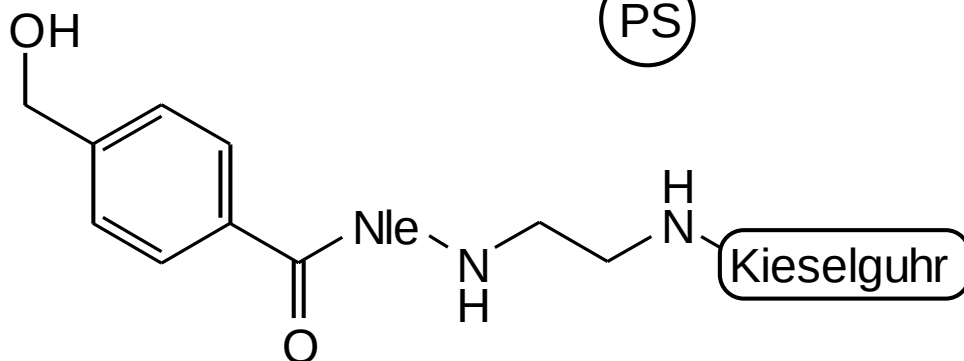
Nova Syn K HMPB

Odszczepianie: 1% TFA, osłonięty peptyd, wolna grupa karboksylowa.

KB (HMBA)



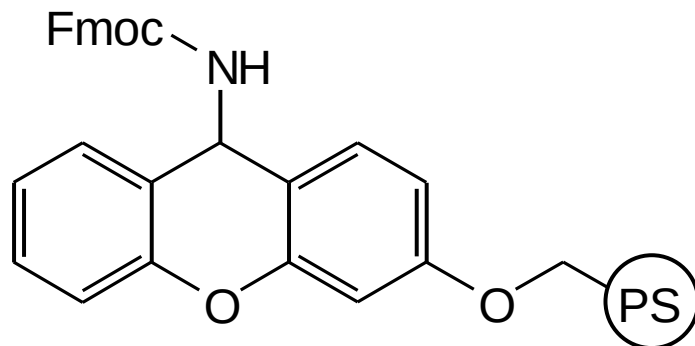
HMBA polystyrene (Nova)



Nova Syn KB
Pep Syn KB

Odszczepianie: amonoliza, hydrazynoliza, zmydlanie (NaOH_{aq} , metanoliza ($\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$), redukcja do alkoholu ($\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$).

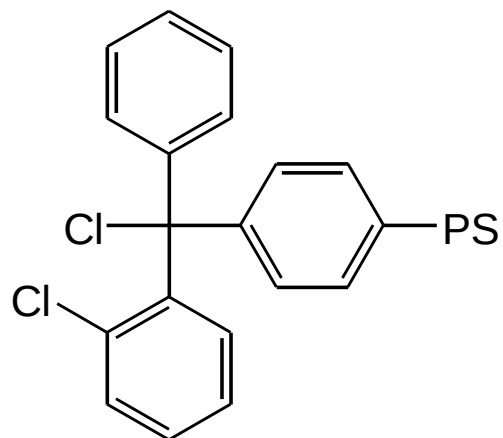
Linker Siebera.



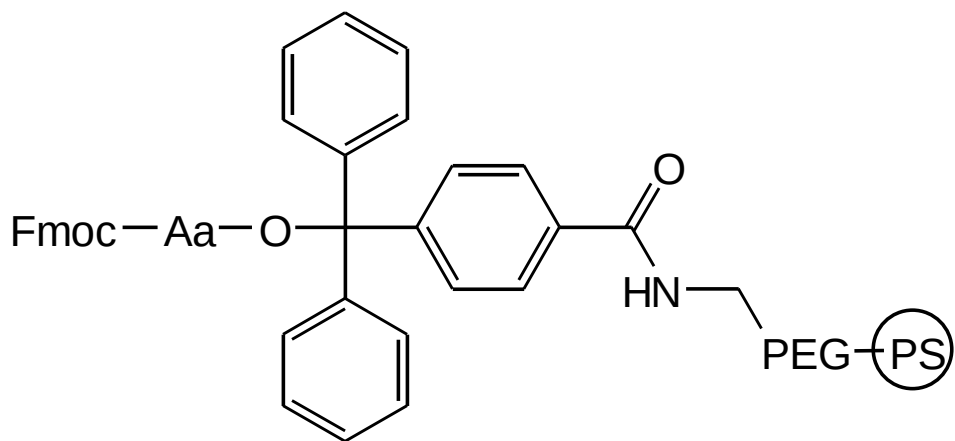
Sieber amide (Nova)

Odszczepianie: 1% TFA, w postaci amidu.

Nośniki tritylowe.



2-chlorotrityl chloride resin (Nova)



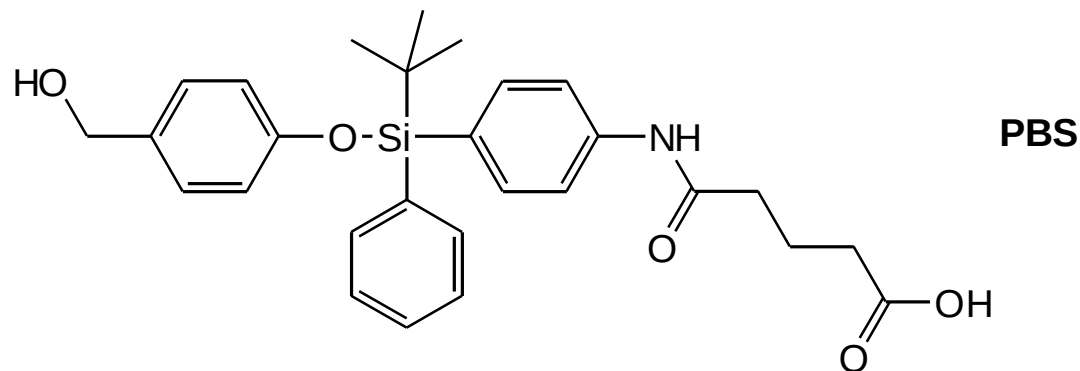
**Nova Syn TGT
Tenta Gel S Trt-Aa
Tenta Gel R Trt-Aa**

Odszczepianie: AcOH/TFE/DCM (2:2:6)

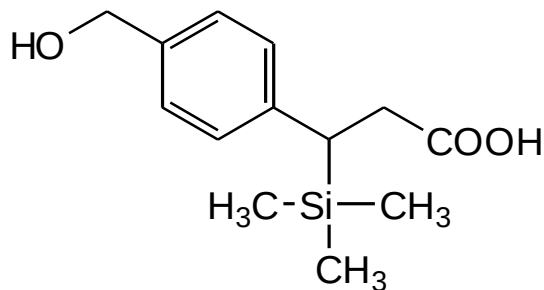
AcOH/MeOH/DCM (5:1:4)

osłonięty peptyd z wolną grupą karboksylową.

Linkery zawierające krzem.



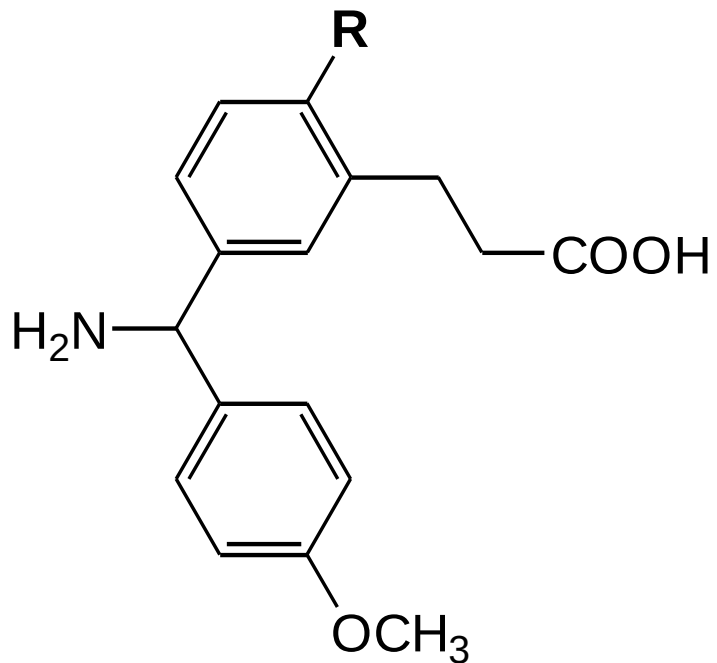
4-{4-[*tert*-Butyl-(4-hydroxymethyl-phenoxy)-phenyl-silanyl]-phenylcarbamoyl}-butyric acid



3-(4-Hydroxymethyl-phenyl)-3-trimethylsilanyl-propionic acid

Odszczepianie: działanie fluorkiem tetrabutylamoniowym (TBAF), - wolna grupa karboksylowa.

Inne linkery.

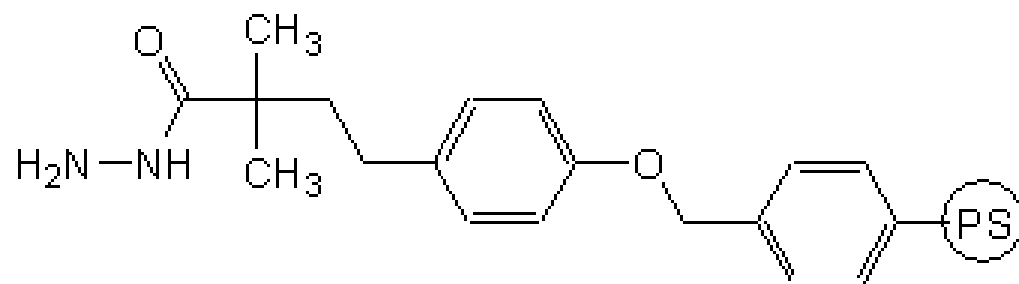


Odszczepianie: (amid)

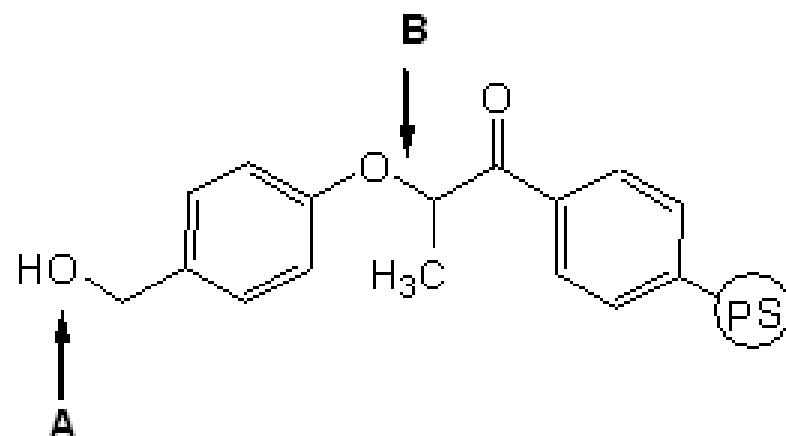
$\text{R} =$

$-\text{OCH}_3$ - rozcieńczony TFA

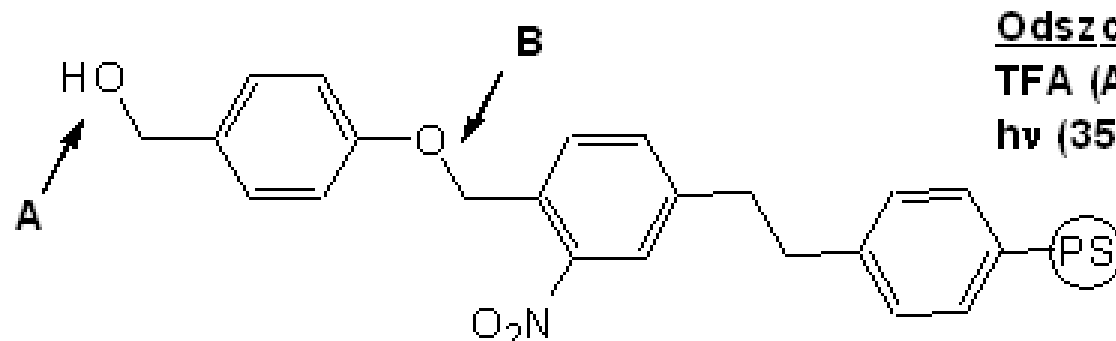
$-\text{H}$ - $\text{Me}_3\text{SiBr/TFA}$



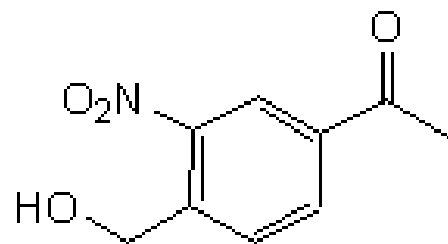
Odszczepianie: (hydrazyd)
TFA



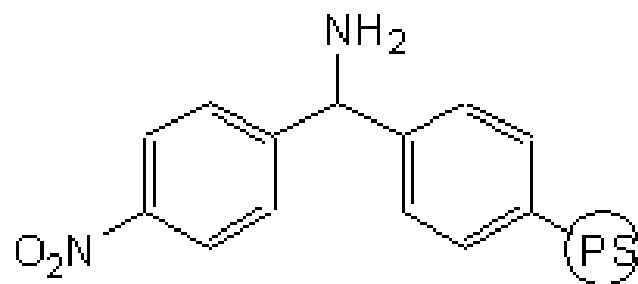
Odszczepianie:
TFA (A) - kwas
hv (350 nm) ester p-hydroksybenzylowy



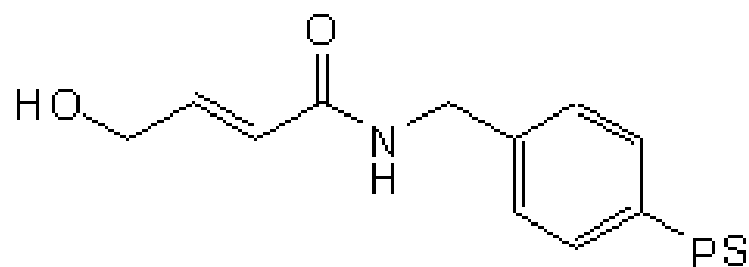
Odszczepianie:
TFA (A) - kwas
hv (350 nm) ester p-hydroksybenzylowy



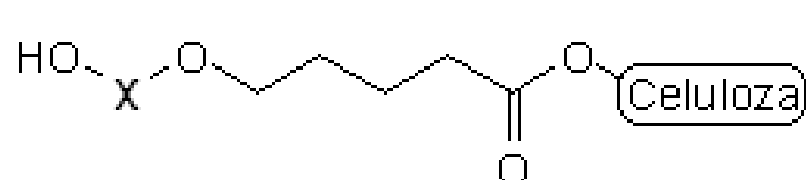
Odszczepianie:
 $h\nu$ (350 nm) - kwas



Odszczepianie:
 H_2/Pd kwas



Odszczepianie:
 $Pd(0)$ - kwas



gdzie X =



Odszczepianie:
 $Pd(0)$ - kwas

Solvatacja i efektywność acylowania.

- W rozpuszczalnikach polarnych obserwuje się wyższą efektywność acylowania.
- Najczęściej stosowane rozpuszczalniki:
dimetyloformamid (DMF), N-metylopirolidon (NMP),
trifluoroetanol (TFE), dimetyloacetamid (DMA).
- Rozpuszczalniki te powodują także obniżenie stopnia agregacji łańcuchów polipeptydowych (głównie przez obniżenie stopnia tworzeniu β -struktur).

Agregacja na skutek nagromadzenia niepolarnych grup (But, Boc, Trt itp.)

- agregacji tego typu przeciwdziała dodatek detergentów niejonowych, np. Tritonu X-100.
- Acylowanie prowadzi się często w tzw. „magic mixture”. Jest to mieszanina DMF-NMP-DCM (1:1:1) zawierająca 1% obj. Tritonu X-100.
- Można również zastosować pochodne aminokwasowe zawierające bardziej polarne grupy osłonowe.
- Jako rozpuszczalniki stosowano również DMSO, HMPA i fosforan trimetylowy (TMP).

Czynniki powodujące rozerwanie wiązań wodorowych.

- W celu zapobiegania agregacji wywołanej przez tworzenie wiązań wodorowych stosowano mocznik i jego pochodne (N-But N'-Me, N,N'-di-*i*Pr), nadchloran sodu lub potasu, rodanek sodu lub potasu. Korzystne było także podwyższenie temperatury np. do 50°C.

Monitoring sprzęgania.

Metody monitoringu można podzielić na:

- jakościowe,
- ilościowe
- inwazyjne (niszczące);
- nieinwazyjne (nieniszczące).

Test Kaisera.

Oparty na reakcji ninhydryny z grupami aminowymi. Stosowany jako test zarówno ilościowy jak i jakościowy. W wersji pierwotnej stosowany w syntezie peptydów z użyciem „chemii Boc”. W tej wersji nie nadaje się do sprawdzania stopnia zacylowania z zastosowaniem Fmoc-pochodnych aminokwasów, ze względu na niestabilność osłony Fmoc w pirydynie, w podwyższonej temperaturze. W tym przypadku może być stosowany o ile do próbki doda się niewielką ilość AcOH i skrócenie ogrzewania próbki do 5 min (standardowo 10 min.). Mało czuły jeżeli acylowana jest prolina.

Analogiczne testy barwne:

- test fluorescaminowy,
- test chloranilowy.
- test izatynowy – stosowany do określania stopnia zacylowania reszt Pro, Hyp oraz reszt N-alkiloaminokwasów.

Testy oparte na tworzeniu soli.

Testy te wykorzystują tworzenie soli z grupą aminową peptydu (aminokwasu) osadzonego na nośniku. Kwas wykorzystywany do tego celu powinien zawierać chromofor.

Najczęściej stosowane testy:

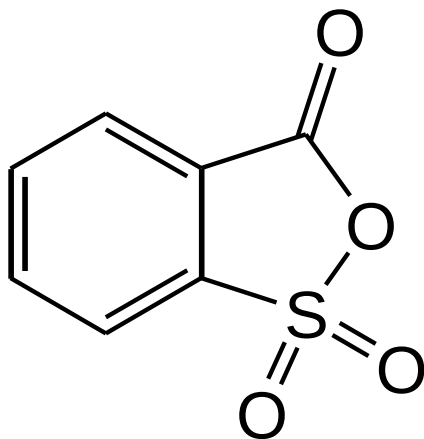
- pikrynianowy – może spowodować odszczepienie z nośnika (np. chlorotrytylowego)
- błękit bromofenolowy – niebieskie zabarwienie nośnika, zanikające po zacylowaniu grup aminowych;
- żółcień chinolinowa – monitorowane jest stężenie tego barwnika w roztworze.

Inne techniki oznaczania stopnia zacylowania:

- zalkilowanie grup aminowych chlorkiem 4,4'-dime-toksytrytylu i oznaczenie stężenia 4,4'-dimetoksy-trifenylokarbinolu po odszczepieniu tej grupy przy pomocy 2% roztworu kwasu dichlorooctowego;
- pomiar zaniku stężenia Fmoc-Aa w mieszaninie acylującej – mało diagnostyczne;
- pomiar ilości uwolnionego fulwenu (najczęściej jako adduktu z piperydyną), powstającego na skutek usunięcia osłony Fmoc – stosunkowo mało dokładne;
- zastosowanie estrów –OTDO lub ODHBT;
- oznaczenie sekwencji peptydu na nośniku, analiza aminokwasowa peptydu na nośniku;
- odszczepienie peptydu z próbki nośnika i oznaczenie masy cząsteczkowej (najczęściej techniką FAB –MS).

Blokowanie resztkowych grup aminowych (capping).

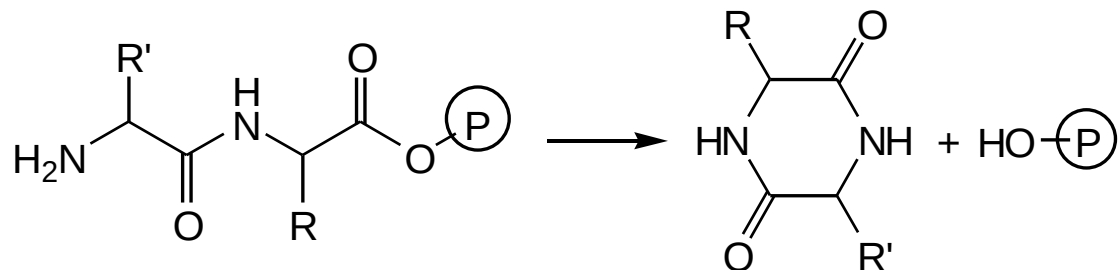
- acetylowanie – Ac_2O –zasada (trietyloamina, pirydyna itp.)
- acetylowanie - acetyloimidazol;



- zastosowanie bezwodnika kwasu *o*-sulfonobenzoeso-wego (OSBA)
- zastosowanie chlorku stearoilu w obecności zasad (amin trzecirzędowych, pirydyny itp.).

Reakcje uboczne.

Tworzenie diketopiperazyn:

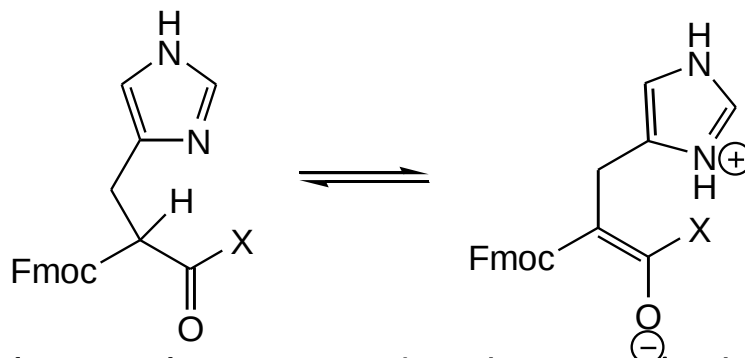


- szczególnie łatwo powstają jeżeli jednym z aminokwasów jest glicyna, prolina, N-metyloaminowas, lub jeden z aminokwasów posiada konfigurację D a drugi L.
- tworzenie DKP katalizowane jest zarówno przez zasady, jak również przez słabe kwasy.
- Środki zaradcze:
- skrócenie czasu odblokowania (np. 5 min, przy użyciu 50% piperidyny);
- acylowanie pierwszego aminokwasu odpowiednim Fmoc-dipeptydem.

Środki zaradcze:

- skrócenie czasu odblokowania (np. 5 min, przy użyciu 50% piperyny);
- acylowanie pierwszego aminokwasu odpowiednim Fmoc-dipeptydem.

Wysoka racemizacja w przypadku acylowania pochodnymi histydyny:



- Środki zaradcze:
- obniżenie zasadowości pierścienia imidazolowego (osłony Boc lub Fmoc na imidazolowy atom azotu)
- osłonięcie azotu π (Bom, Bum);
- użycie estrów aktywnych Fmoc-His (Pcp, Tcp itp.), w szczególności do osadzania na nośniku;
- osadzanie na nośniku przez podstawienie nukleofilowe atomu chlorowca występującego w nośniku, przy użyciu soli ceszowych.

Środki zaradcze:

- obniżenie zasadowości pierścienia imidazolowego (osłony Boc lub Fmoc na imidazolowy atom azotu)
- osłonięcie azotu π (Bom, Bum);
- użycie estrów aktywnych Fmoc-His (Pcp, Tcp itp.), w szczególności do osadzania na nośniku;
- osadzanie na nośniku przez podstawienie nukleofilowe atomu chlorowca występującego w nośniku, przy użyciu soli cezowych.

Asn, Gln.

Dehydratacja podczas aktywacji.

Środki zaradcze:

- użycie estrów aktywnych w obecności HOBt, lub zastosowanie dodatku HOBt;
- osłonięcie grupy karboksamidowej łańcucha bocznego.

Tworzenie pochodnych sukcyimidu, glutarimidu i kwasu piroglutaminowego:

- katalizowane przez HOBt i Fmoc-Aa

Środki zaradcze:

- użycie estru aktywnego lub symetrycznego bezwodnika następnego aminokwasu.

UWAGA.

osłonięcie grupy karboksamidowej Gln nie zabezpiecza przed tworzeniem piroglutaminianu! Ta reakcja uboczna katalizowana jest również przez piperydynę. Zaleca się stosowanie 50% piperydyny w DMF w ciągu 1 min. w celu usunięcia osłony Fmoc.

Arg

- tworzenie δ -laktamu;
- acylowanie guanidylu;
- rozkład guanidylu podczas odblokowania z utworzeniem reszty Orn.

Środki zapobiegawcze:

- acylować w obecności HOBt lub przy użyciu estrów aktywnych.

Odszczepianie od nośnika.

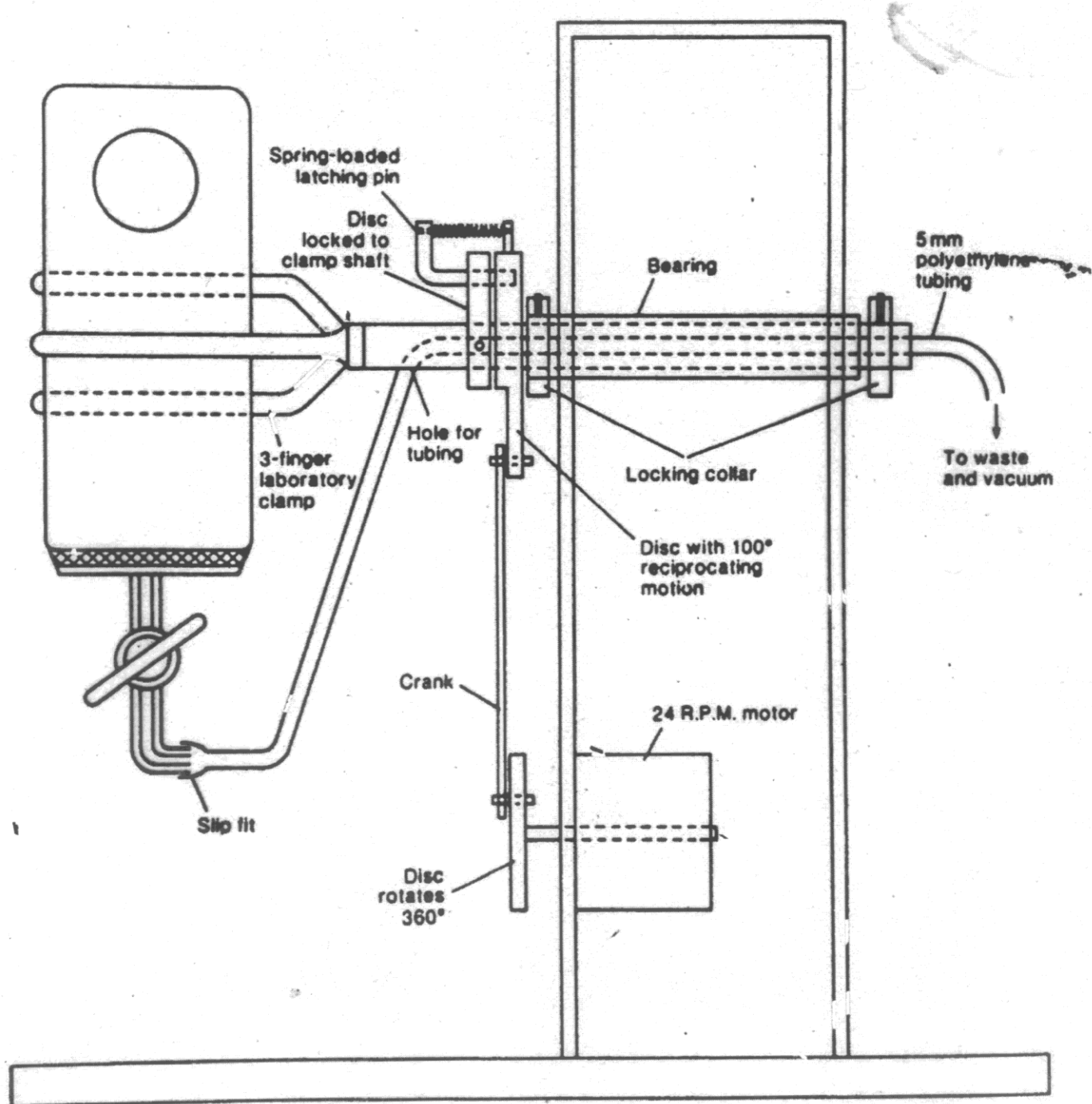
Odszczepianie od nośnika przez acydolizę może być przyczyną szeregu reakcji ubocznych, nawet gdy prowadzone jest przy użyciu stosunkowo słabych kwasów.

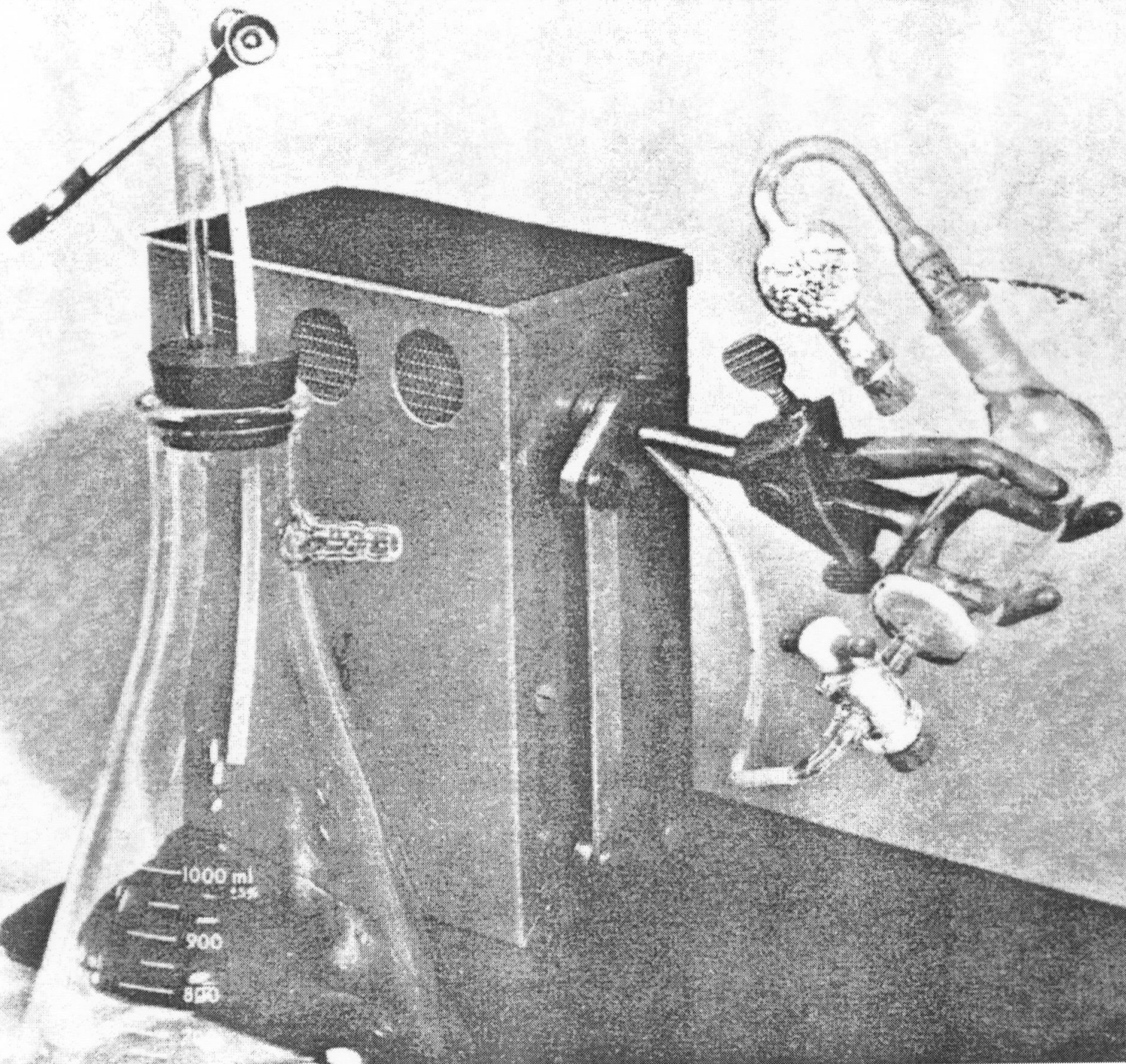
Mechanizm:

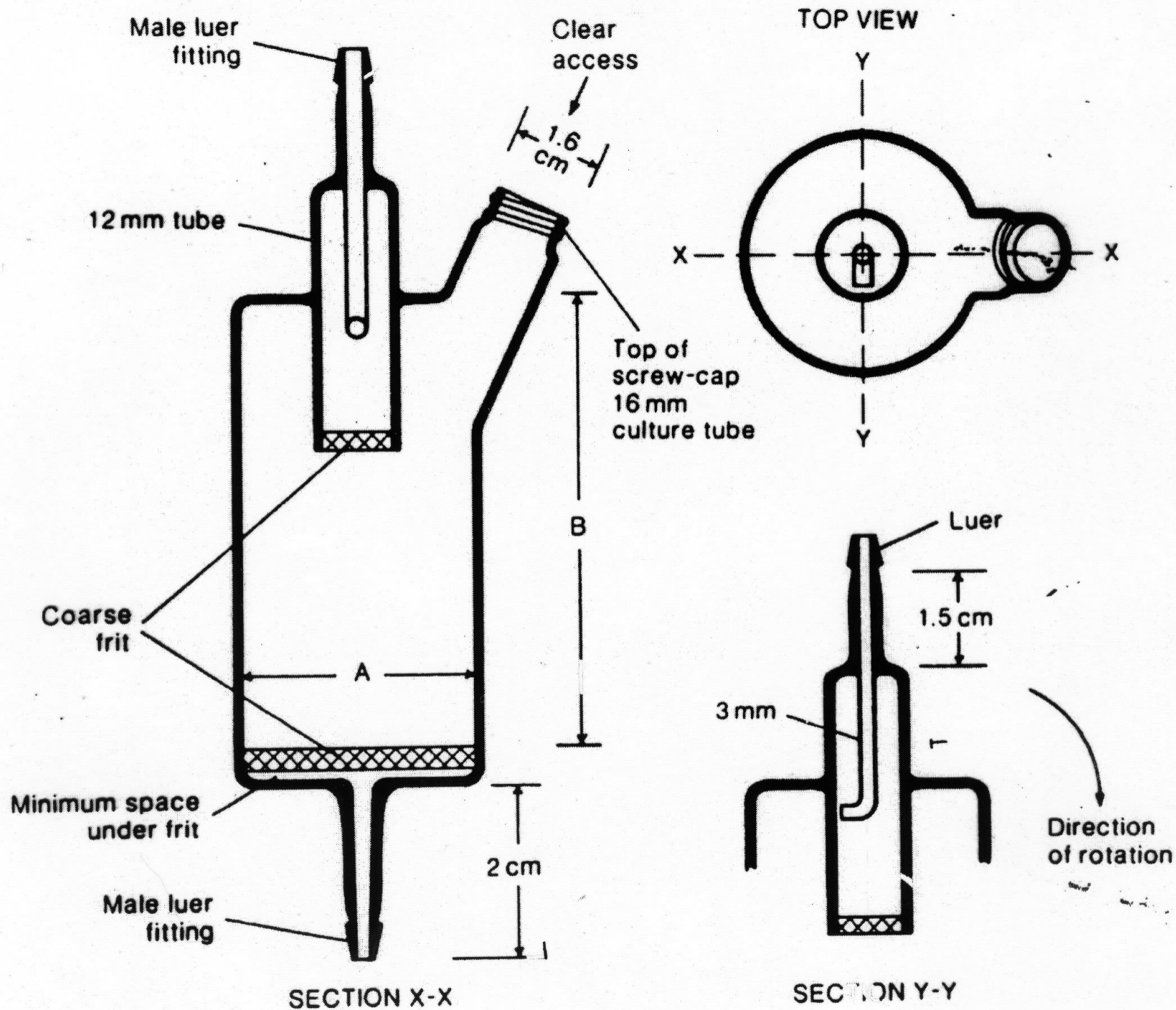
- S_N1 – powstają karbokationy.
- Reakcje uboczne:
- alkilowanie wrażliwych reszt (Trp, Tyr, Met).

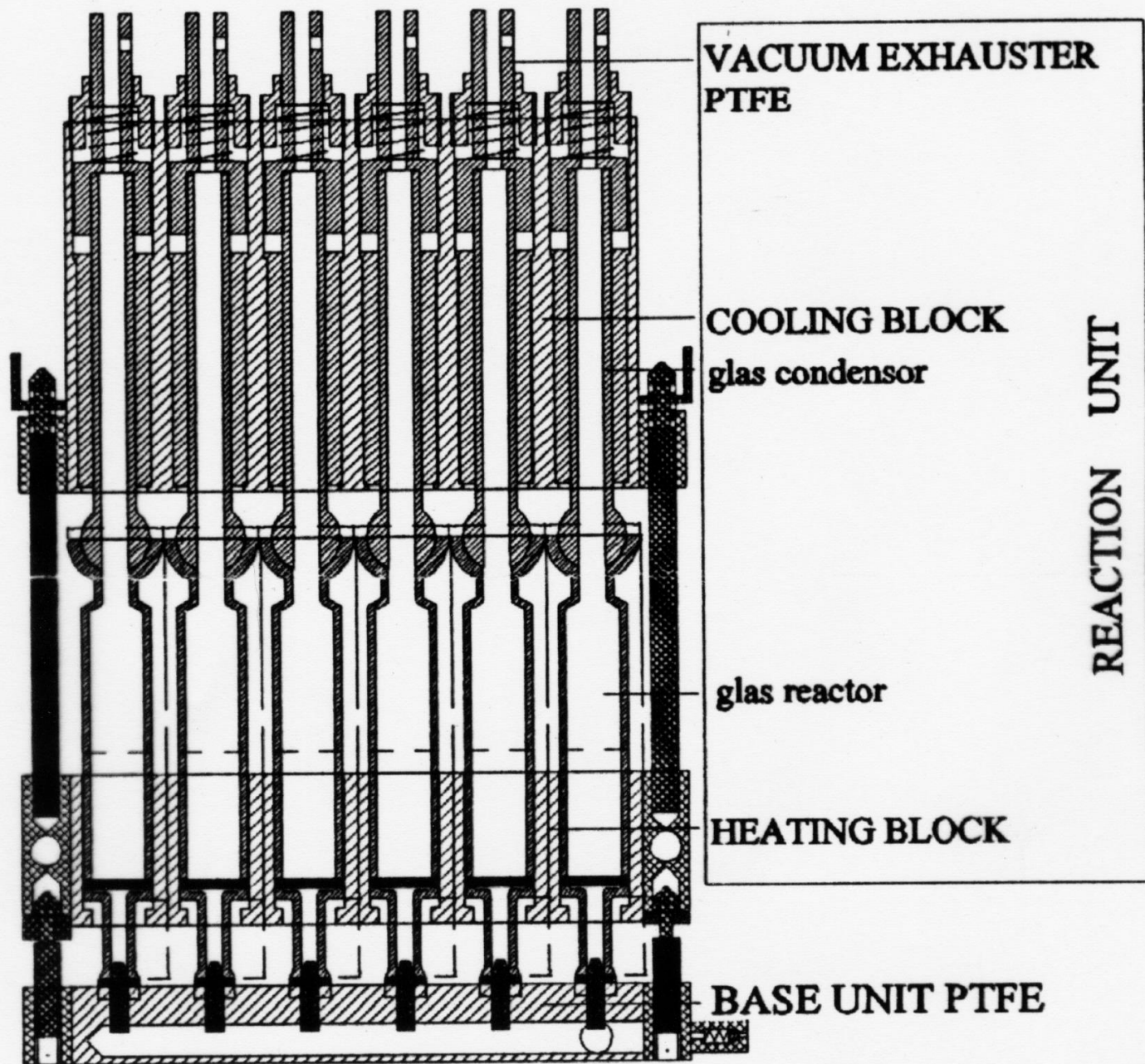
Środki zaradcze:

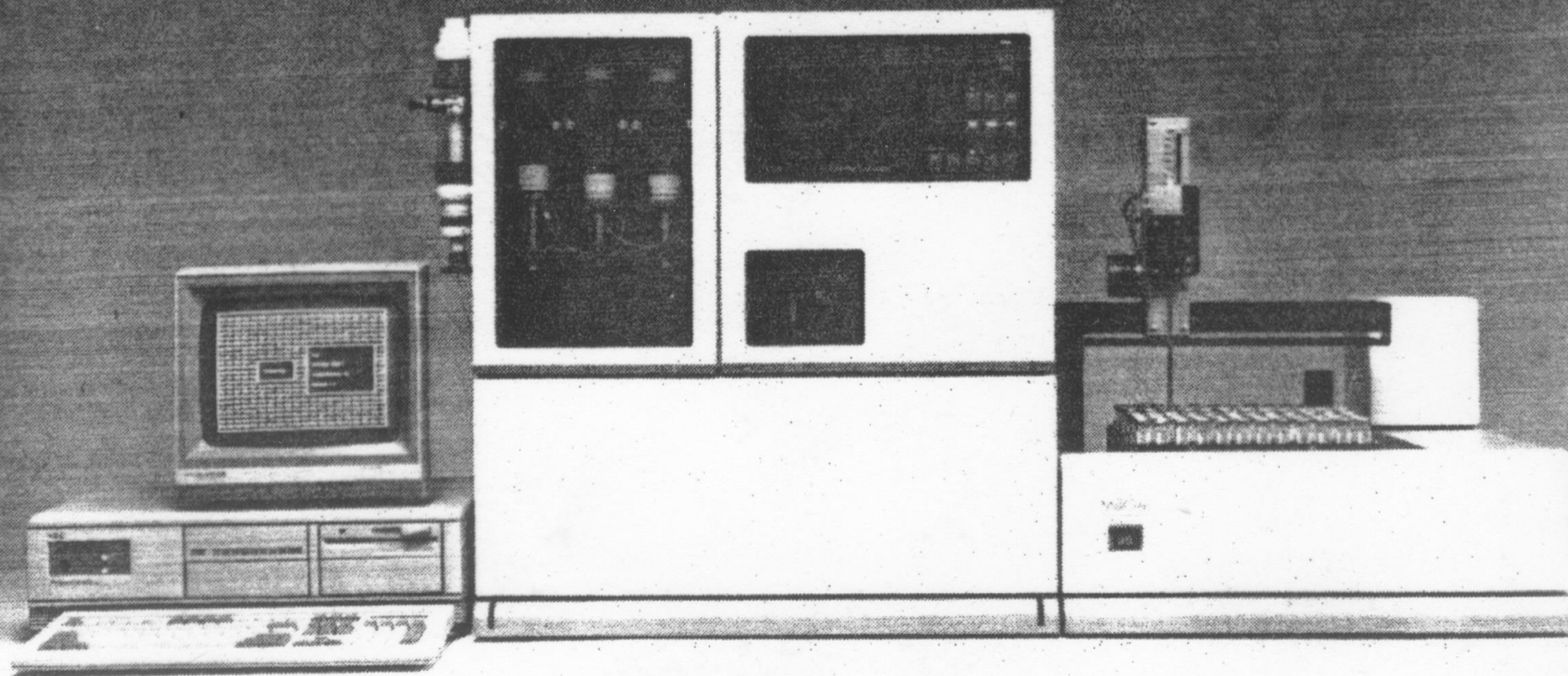
- zastosowanie „zmiataczy” – etanoditiolu, wody, silanów (TES, TIS – uwaga! redukują pierścień indolowy reszty Trp).
- odblokowanie –Cys(Trt)- jest odwracalne i wymaga zastosowania efektywnych zmiataczy.















Typowe pochodne aminokwasów wielofunkcyjnych stosowane w SPPS, chemia Boc

- Arg – Boc-Arg(Tos)-OH
- Asn – Boc-Asn(Xan)-OH lub bez osłony łańcucha bocznego
- Asp – Boc-Asp(OBzl)-OH
- Cys – Boc-Cys(Meb)-OH, Boc-Cys(Mob)-OH,
• Boc-Cys(Acm)-OH
- Glu – Boc-Glu(OBzl)-OH
- His – Boc-His(Bzl)-OH, Boc-His(Dnp)-OH,
• Boc-His(Bom)-OH, Boc-His(Tos)-OH

- Lys – Boc-Lys(Z)-OH, Boc-Lys(ClZ)-OH,
Boc-Lys(Tfa)-OH, Boc-Lys(For)-OH
- Orn – Boc-Orn(Z)-OH
- Ser – Boc-Ser(OBzl)-OH
- Thr – Boc-Thr(OBzl)-OH lub bez osłony grupy
hydroksylowej łańcucha bocznego.
- Trp – Boc-Trp(For)-OH lub bez osłony indolu
- Tyr – Boc-Tyr(ObtZ)-OH, Boc-Tyr(ODcb)-OH

Typowe cykle przemywań stosowane w SPPS (chemia Boc)

- DCM 3 x 5min.
- TFA-DCM-indol 1 x 1,5 min.
- TFA-DCM-indol 1 x 30 min.
- DCM 6 x 5 min
- TEA-DCM (1:10) 1 x 1,5 min
- TEA-DCM (1:10) 1 x 1,5 min (1 x 10 min)
- DCM 6 x 5 min
- Boc-Aa/DCM 1 x 1,5 min (20 min.)
- 1M DCC/DCM 120 min. lub do negatywnego wyniku testu Kaisera
- Powtórne sprzęganie (często pozostawiane na noc)
- DCM 3 x 5 min.
- DCM/MeOH (1:1) 1 x 5 min.
- MeOH 3 x 5 min. Test Kaisera
- DCM/MeOH (1:1) 1 x 5 min.
- DCM 3 x 5min.

- dioksan 3 x 5 min.
- 4N HCl/dioksan 1 x 1,5 min.
- 4N HCl/dioksan 1 x 30 min.
- dioksan 3 x 5 min.
- chloroform 3 x 5 min.
- TEA/chloroform 1 x 1,5 min. (5 min.)
- TEA/chloroform 1 x 1,5 min. (10 min.)
- chloroform 3 x 5 min.
- DCM 3 x 5 min
- Boc Aa/DCM 1,5 min (20 min.)
- 1 M DCC/ DMF 120 min
- DCM 3 x 5 min
- Powtórne sprzęganie , najczęściej pozostawiane na noc.
- DCM 3 x 5 min.
- DCM/MeOH 1 x 5 min
- MeOH 3 x 5 min. Test Kaisera
- MeOH/ DCM (1:1) 1 x 5 min.
- DCM 3 x 5 min.

- DCM 3 x 5 min.
- TFA – DCM 1 x 1,5 min.
- TFA – DCM 1 x 30 min.
- DCM 6 x 5 min.
- TEA/DCM (1:10) 1 x 1,5 min (5 min.)
- TEA/DCM (1:10) 1 x 1,5 min (10 min.)
- DCM 3 x 5 min.
- Symetryczny bezwodnik w DCM
120 min.
- DCM 3 x 5 min.
- Symetryczny bezwodnik w DCM
przez noc.
- DCM 3 x 5 min. Test Kaisera

- DCM 3 x 5 min.
- TFA – DCM 1 x 1,5 min.
- TFA – DCM 1 x 30 min.
- DCM 6 x 5 min.
- TEA/DCM (1:10) 1 x 1,5 min (5 min.)
- TEA/DCM (1:10) 1 x 1,5 min (10 min.)
- DCM 3 x 5 min.
- DMF 3 x 5 min.
- Ester aktywny w DMF
4 h.
- DMF 3 x 5 min.
- Ester aktywny w DMF
przez noc.
- DMF 3 x 5 min.
- DCM 3 x 5 min. Test Kaisera

Reakcje uboczne w trakcie syntezy na nosniku stałym.

- - straty wynikające z częściowego odszczepiania peptydu w trakcie deprotekcji (ok. 1% peptydu jest odszczepiane z klasycznej żywicy Merrifielda w trakcie usuwania osłony Boc).
- - trifluoroacetylowanie grupy aminowej w trakcie usuwania osłony Boc;
- - straty peptydu na początkowych stadiach syntezy na skutek tworzenia diketopiperazyn; - zakończenie łańcucha peptydowego na skutek trifluoroacetylowania grup aminowych przez przesunięcie trifluoroacetylu z tlenu (grupy hydroksylowej powstającej na nośniku w wyniku częściowego odszczepienia peptydu) na grupę aminową.
- - zakończenie łańcucha na skutek zanieczyszczenia Boc-aminokwasów sec-bytyloksykarbonylopochodnymi;
- - utrudnienie deprotekcji i acylowania na skutek oddziaływań łańcucha peptydowego peptydowego podłożem, łańcuchów polipeptydowych między sobą, lub konformację łańcucha peptydowego. zakończenie łańcucha peptydowego na skutek transferu tosyłu z imidazolu osłoniętej His na grupę aminową.
- - powstawanie peptydów peptydów delacjami reszt aminokwasowych.

Problemy związane z indywidualnymi resztami aminokwasowymi.

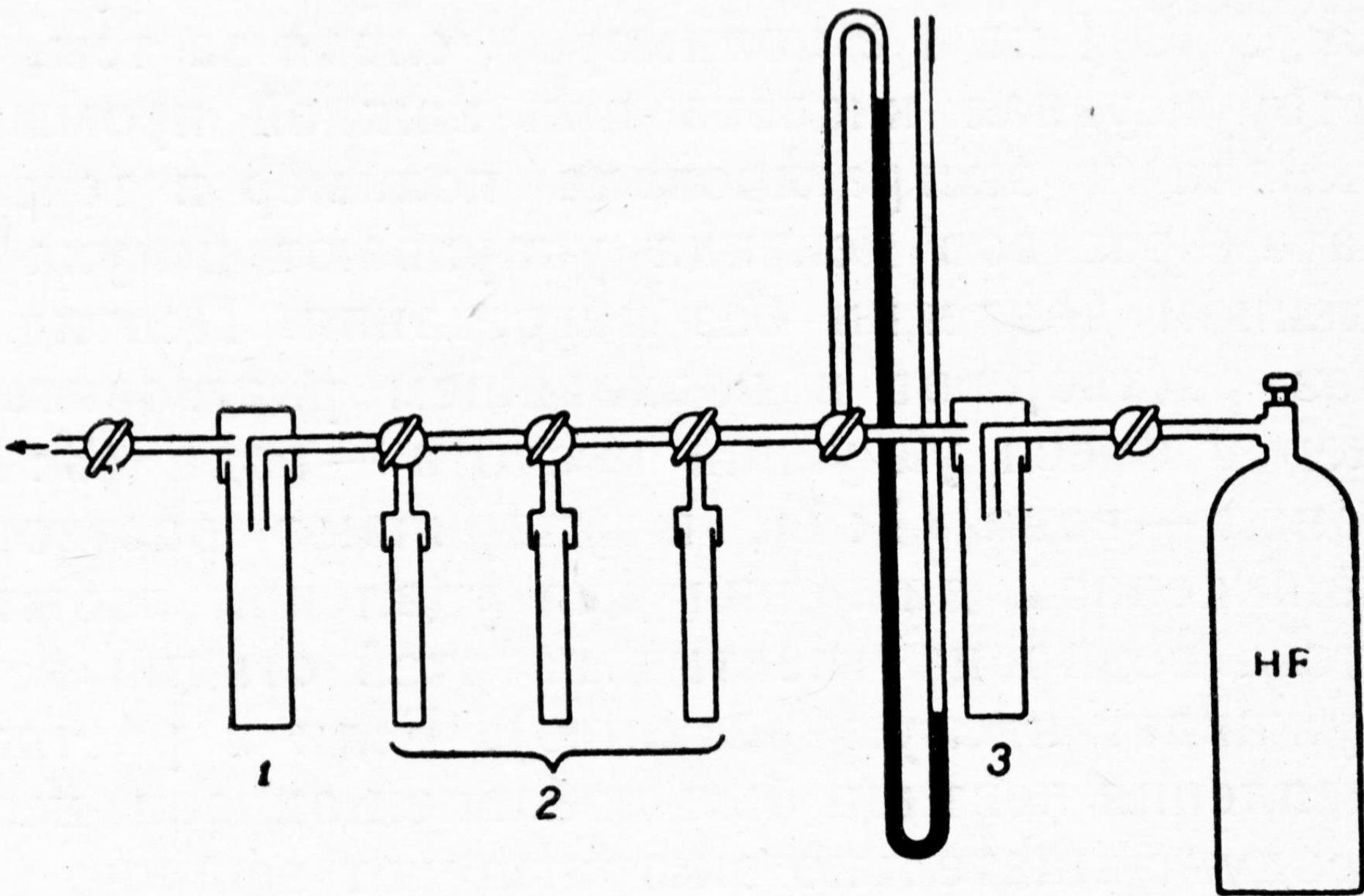
- niedoskonałe rozwiązanie problemu osłony grupy guanidylowej argininy;
- - zbyt mała stabilność osłony Z- na resztach Lys i Orn;
- - problemy związane z osłoną imidazolu reszty histydyny
- - Asp – tworzenie pochodnych sukcyimidu w trakcie syntezy (odblokowanie) i odszczepiania od nosnika, a w dalszym etapie tworzenie peptydów zawierających resztę kwasu izoasparaginowego.
- α -pKa = 2,5
- β -pKa = 3,5
- - Glu – acylowanie zmiataczy (głównie anizolu) w trakcie odszczepiania od nośnika (HF, TFMSA)
- - Asn, Gln – odwodnienie grupy karboksamidowej do nitrylu;
- Gln – cyklizacja do kwasu piroglutaminowego (katalizowana przez słabe kwasy), w szczególności w polarnych rozpuszczalnikach np. DMF;
- Hydroliza karboksamidu, w szczególności jeżeli w pobliżu występuje reszta Arg lub Lys. Reakcja ta katalizowana jest również przez słabe kwasy i zasady.

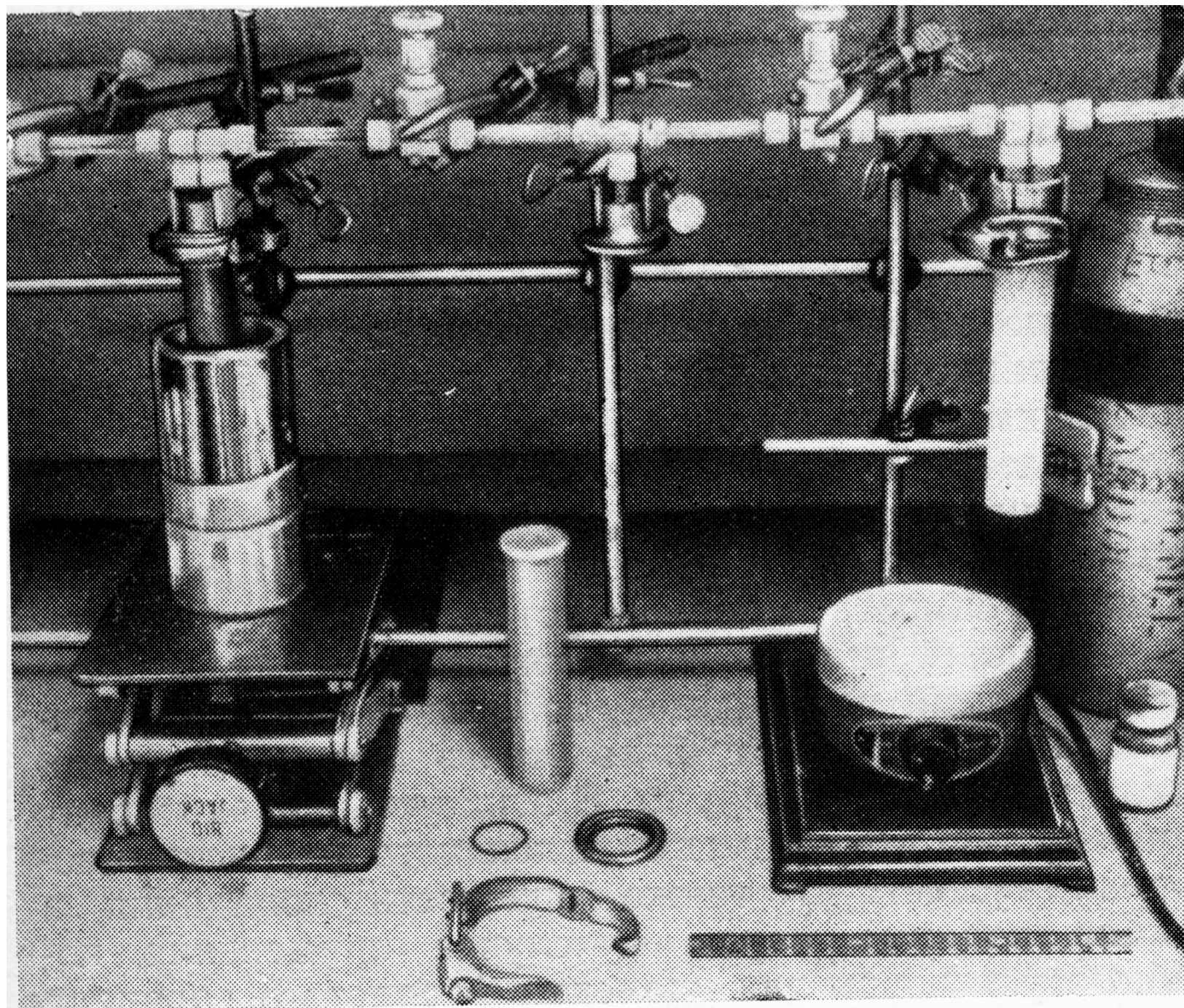
- Ser, Thr – „N $\rightleftharpoons$ O shift”, w szczególności w silnych, bezwodnych kwasach (np. ciekły HF). Może być odwrócona w roztworach wodnych, neutralnym lub łagodnie zasadowym środowisku.
- - Tyr – migracja alkilu (benzylu) stanowiącego grupę osłonową tlenu grupy fenolowej na pierścień aromatyczny. Praktycznie nie występuje jeżeli zastosowana w tym celu jest osłona BrZ lub cykloheksyl. Obniżenie *tert*-butylowania pierścienia fenolowego reszty Tyr uzyskano stosując indol jako zmiatacz. Chlorowcowanie (bromowanie) - może wystąpić w trakcie odszczepienia peptydu od nośnika metodą HBr – TFA . Może nastąpić także jodowanie tej reszty w trakcie utleniania cysteiny do cystyny lub usuwania osłony AcM z równoczesnym utlenieniem do cystyny.
- - Trp – utlenianie w środowisku kwaśnym i wysoka podatność na alkilowanie
- - Met - spontaniczne utlenianie do chiralnych sulfotlenków. Podatna na alkilowanie.
- Racemizacja
- - silniej zaznaczona w rozpuszczalnikach polarnych;
- - promowana przez trzeciorzędowe aminy, w tym DMAP

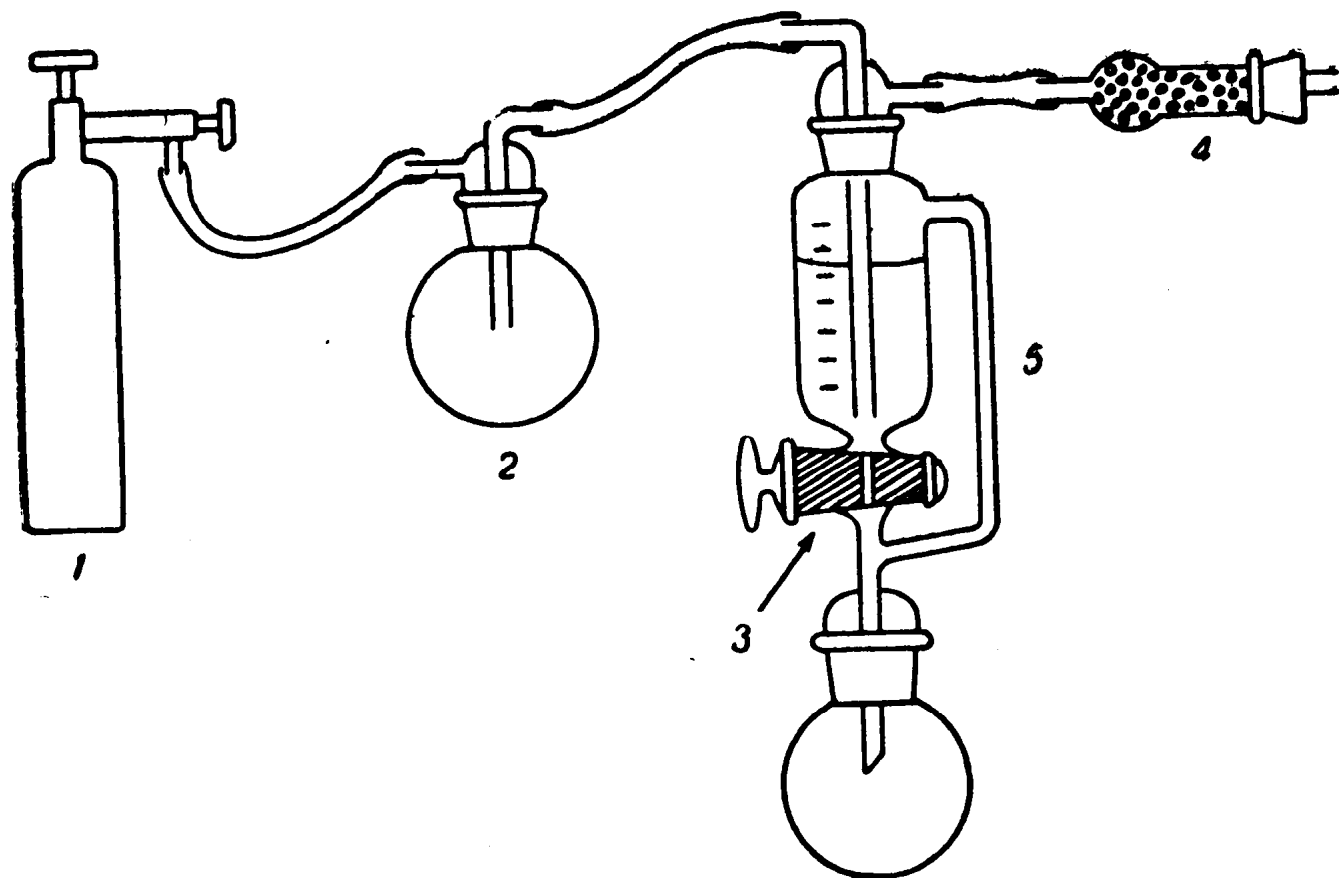
Metody odszczepiania od nośnika, chemia Boc.

- Zastosowanie ciekłego HF (t.w. = 19°C).
- Metoda ta wymaga zastosowania specjalnej, drogiej aparatury wykonanej z perfluorowanego polimeru (Kel F). Najczęściej prowadzona w temp. 0 °C, w ciągu 30 min., w obecności zmiataczy karbokationów. W tych warunkach następuje odszczepienie peptydu od nośnika, oraz usunięcie osłon grup funkcyjnych łańcuchów bocznych.
- Reakcje uboczne - związane z alkilowaniem wrażliwych reszt aminokwasowych przez powstające karbokationy, acylowanie anizolu stosowanego jako zmiatacz przez łańcuch boczny kwasu glutaminowego, przesunięcie N $\rightarrow$ O na resztach Ser i Thr.

- Najczęściej stosowane zmiatacze karbokationów – rezorcyna, tioanizol, anizol, siarczek dimetylu, siarczek etylowo-metylowy, metionina, 1,2 etanoditiol, indol.
- Metoda – „niski – wysoki HF” – zastosowanie ciekłego HF i siarczku dimetylu w stosunku molowym ok. 1 : 1, (1 : 3 objętościowo), a następnie (jeżeli to potrzebne) zastosowanie wysokiego stężenia HF (jeżeli w sekwencji występuje Arg(Tos), Arg(NO₂), Cys(Meb), His(Dnp), lub zastosowano nośnik BHA). Następuje tutaj zmiana mechanizmu odszczepiania osłon z SN1 na SN2. Pozwala to na uniknięcie licznych reakcji ubocznych, jak alkilowanie pierścienia fenolowego tyrozyny, tworzenia pochodnych sukcyrimidowych w sekwencjach Asp-Gly oraz umożliwia redukcję sulfotlenku na reszcie metioniny (przy zastosowaniu tiokrezolu jako zmiatacza).

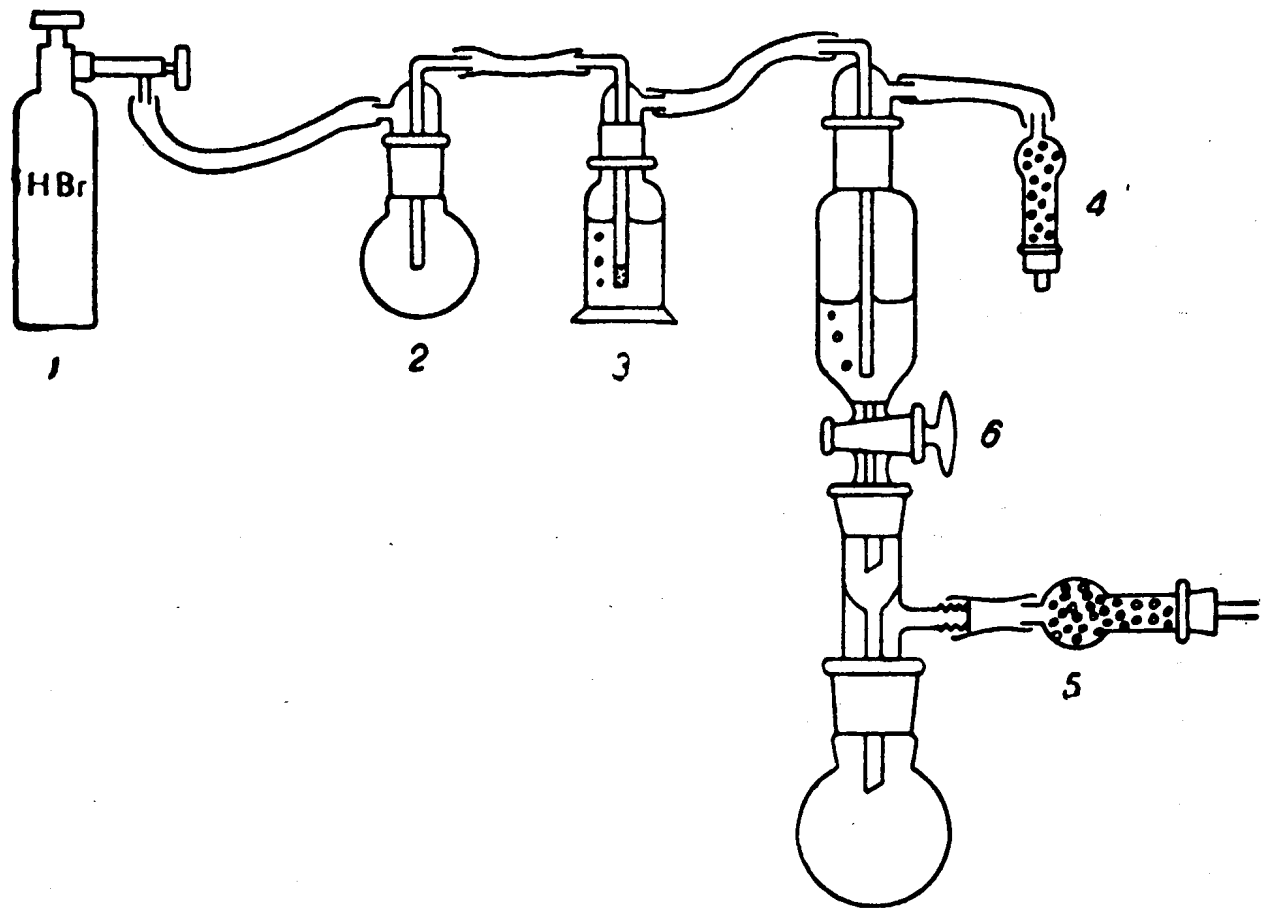






Zastosowanie mieszaniny HBr – TFA.

- Odszczepianie prowadzone jest przez przemywanie nośnika z peptydem zawieszonego w TFA strumieniem gazowego HBr. Metoda ta nie usuwa osłony tosyłowej (i nitrowej) z reszty argininy.



TFMSA –TFA –DCM

- Metoda ta nie usuwa grupy nitrowej i tosyłowej z reszty argininy. TFMSA wykazuje też silniej zaznaczone własności kwasu Lewisa niż HF, a w związku z tym powoduje więcej reakcji ubocznych.

Zastosowanie kompleksu pirydyna – HF

- Wadą tego odczynnika jest jego niska lotność, a w związku z tym nie może być on usunięty przez odparowanie.

Amonoliza

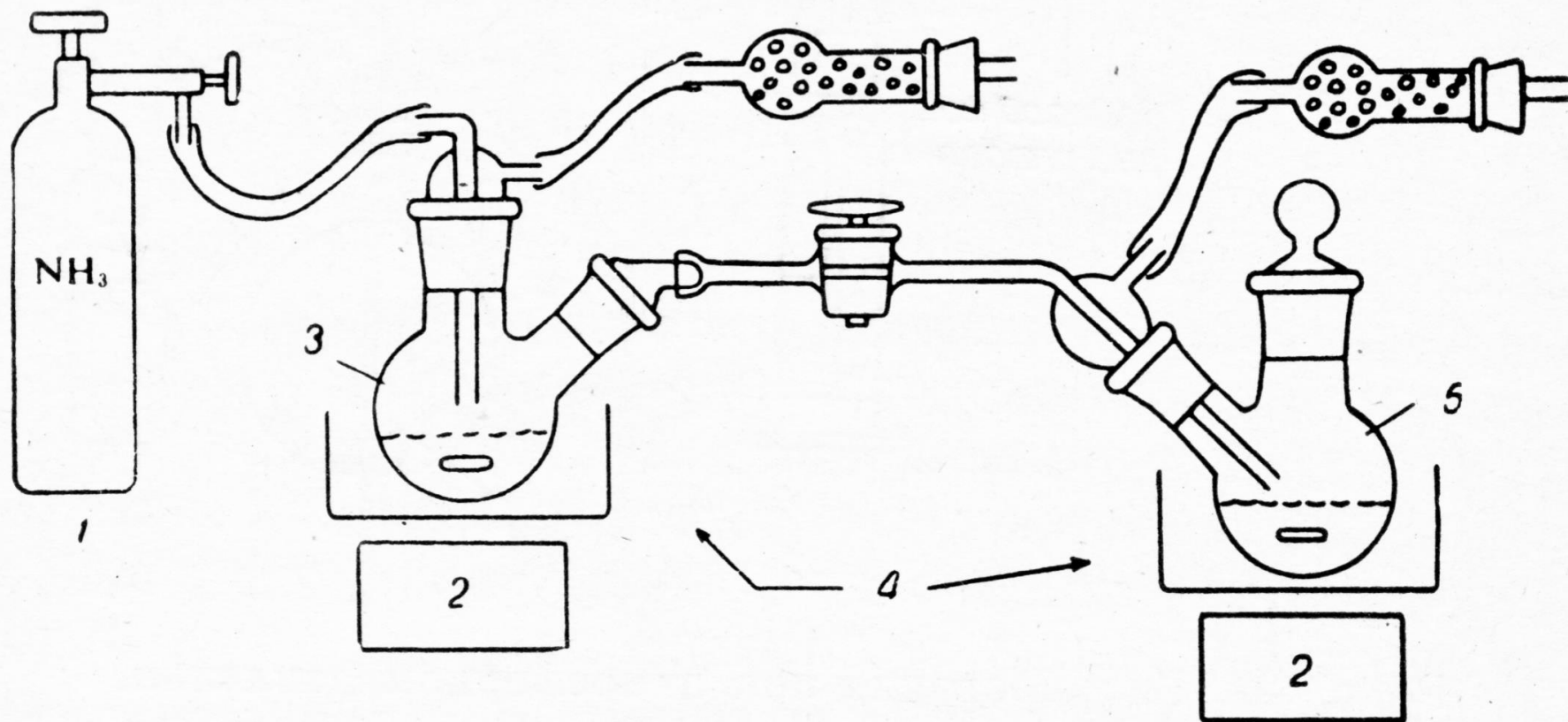
- Estry benzytowe mogą być poddawane amono - i aminolizie z utworzeniem odpowiednich amidów. Reakcja jest powolna i musi być prowadzona przez kilka dni. Stosowane były rozpuszczalniki powodujące pęcznienie nośnika, np. DMF, ale także i metanol. Niewielkie ilości trzeciorzędowych amin katalizowały niekiedy reakcje amonolizy. Stosowano także dimetyloaminoetanol jako katalizator, lub jako odczynnik do transestryfikacji, który prowadził do estru szybko hydrolizującego w wodzie, z utworzeniem peptydu z wolną grupą karboksylową.

Reduktywne odszczepianie z utworzeniem alkoholu

- W tym celu stosowano LiBH_4 w THF.

Inne metody odszczepiania

- transestryfikacja, hydrazynoliza.



Problemy związane ze zwiększaniem skali

1. Problem wydajności związany z wieloetapowością syntezy;
2. Ilości powstających odpadów (średnio 1t odpadów /1 kg gotowego produktu w przypadku syntezy metodą klasyczną – w przypadku SPPS ilość odpadów i zużycie materiałów wielokrotnie większe)
3. Problemy bezpieczeństwa związane z użyciem określonych rozpuszczalników i odczynników- np. eter dietylowy - łatwopalny , niskolotny, pary tworzące z powietrzem mieszaninę wybuchową, DCM – niszczy warstwę ozonową;
4. Powtarzalność procesu;
5. Czystość uzyskiwanego produktu i rodzaj występujących w nim zanieczyszczeń;
6. Powstawanie niebezpiecznych produktów ubocznych np, azotowodor w metodzie azydkowej metodzie azydkowej lub DPPa który jest lotny, silnie toksyczny wybuchowy i tworzący silnie wybuchowe sole z metalami ciężkimi;
7. Problemy związane z izolacją i oczyszczaniem produktów pośrednich - krystalizacja, strącanie chromatografia – najczęściej IEC, RP-HPLC, HIC
8. Metoda SPPS – trudna do skalowania, droga, często dająca produkty zawierające zanieczyszczenia trudne do usunięcia (diastereoizomery, peptydy z delecjami reszt aminokwasowych)

Wybór osłon:

Po usunięciu powinny dawać produkty łatwe do usunięcia (np. lotne);

Najczęściej stosowanie kombinacje:

Z- (grupa α -aminowa i grupy oparte na *tert*-butylu w łańcuchach bocznych, ewentualnie estry metylowe itp.);

Boc na grupie α -aminowej i osłony typu benzylu na łańcuchach bocznych, For, itp.

Przy syntezie w roztworze często stosuje się osłony łańcuchów tylko tam, gdzie jest to konieczne.

Preferowania strategia syntezy roztworze – kondensacja fragmentów. Wybór miejsca aktywacji – najlepiej aktywacja reszt nieulegających racemizacji, lub trudno racemizujących

Aktywacja przy łączeniu fragmentów – metoda azydkowa lub aktywacja *in situ* (karbodiimidy lubb mieszane bezwodniki) w obecności nukleofili pomocniczych (HOBt)