

METODA O-ACYLOIZOPEPTYDOWA W SYNTEZIE PEPTYDÓW

O-ACYL ISOPEPTIDE METHOD IN PEPTIDE SYNTHESIS

Oliwia Frączak, Aleksandra Olma*

*Instytut Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka
ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź
e-mail: aleksandra.olma@p.lodz.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Strategie stosowane w syntezy peptydów o trudnych sekwencjach
2. O-Acyloizopeptydy
3. Zastosowanie metody O→N-acyloizopeptydowej w syntezy peptydów

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr inż. Oliwia Frączak ukończyła studia w 2011 roku na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej na kierunku Technologia Chemiczna o specjalności Chemia i technologia Śródków leczniczych. Obecnie kontynuuje naukę na Studiach Doktoranckich na Wydziale Chemicznym PŁ, pod opieką prof. dr hab. inż. Aleksandry Olmy. W ramach pracy doktorskiej zajmuje się syntezą biwalentnych ligandów o potencjalnym działaniu przeciwbólowym modyfikowanych niebiałkowymi aminokwasami. Jest współautorką dwóch publikacji oraz wielu komunikatów konferencyjnych.

Prof. dr hab. Aleksandra Olma – Po ukończeniu studiów na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej (1972), rozpoczęła pracę w Instytucie Chemii Organicznej. Pracę doktorską obroniła w 1980 r., a stopień doktora habilitowanego uzyskała w roku 2000. Na stanowisku profesora pracuje od 2006 roku. W latach 1980–1982 odbyła staż naukowy w laboratorium prof. Maurice Manninga (Department of Biochemistry and Cancer Biology, University of Toledo, USA). Przebywała wielokrotnie na 1–3 miesięcznych pobytach naukowych u prof. Garlanda R. Marshalla (Washington University, School of Medicine, Department of Molecular Biology and Pharmacology, St. Louis, USA) oraz w laboratorium prof. M. Manninga. Jej zainteresowania naukowe skupiają się na chemii i biologii peptydów zawierających niekodowane aminokwasy (α,α -dipodstawione glicyny, β^3 -*h*-aminokwasy). Zajmuje się badaniami zależności pomiędzy strukturą a aktywnością peptydów bioaktywnych oraz chemią medyczną. Współpracuje z wieloma krajowymi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi. Jej dorobek naukowy obejmuje 64 publikacje w renomowanych czasopismach naukowych oraz ponad 90 komunikatów i posterów prezentowanych na zagranicznych i krajowych konferencjach naukowych. Jest współautorką 6 patentów. Wypromowała 2 doktorantów, obecnie jest promotorem dwóch.

ABSTRACT

Proteins are macromolecules that carry out most of the biochemical functions of the cell, which strongly depend on the secondary and tertiary structure, defined by the amino acid sequence of a polypeptide chain. The importance of peptides and proteins in biology and medicine inspired chemists to develop strategies for their synthesis.

The main limitation to the preparation of long peptides is their tendency to aggregation, what makes the coupling and deprotection reaction ineffective, and purification of the compounds difficult. Inter- and intramolecular interactions, hydrophobic character, the presence of multiple hydrogen bonds significantly affect the secondary structure of peptides, making further extension of the peptide chain very difficult.

Undesirable aggregation process may be disrupted by reduction of hydrophobic interactions. For this purpose, various methods are used, based on the implementation of specific modifications to the peptide chain, affecting its secondary structure. These methods include, for example, incorporation of pseudoproline building blocks [5] and proximity induced peptide ligation [6, 7].

In some cases, it is convenient to extend the amino acid side chain to form isopeptides (Fig. 1) [14–16]. Depsipeptides can be created with the natural amino acids such as cysteine, serine, threonine, tyrosine, or tryptophan. The basic requirement is the presence of β -hydroxyamino component.

The presence of a depsipeptide moiety in place of an amide bond significantly change the secondary structure of native peptide and prevents from aggregation, leading to higher yields of desired compounds [18]. In the solution phase peptide synthesis, this method is free from racemization [19]. Isodipeptide units can be successfully applied in SPPS for the synthesis of “difficult sequence”-containing peptides [19].

In this paper, many examples of effective use of *O*-acylisopeptides method in peptide synthesis are discussed.

Keywords: *O*-acyloisopeptides, *O*→*N*-migration, difficult sequence-containing peptides

Słowa kluczowe: *O*-acyloizopeptydy, *O*→*N*-migracja, peptydy zawierające trudne sekwencje

WPROWADZENIE

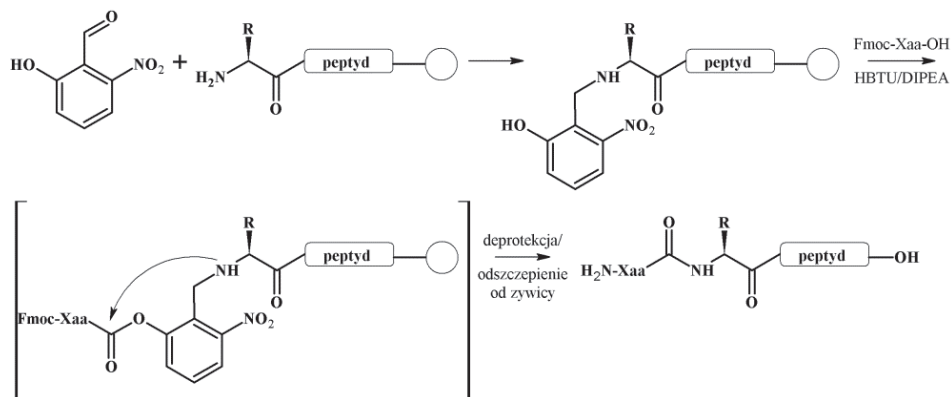
Białka to makrocząsteczki, które są odpowiedzialne za większość funkcji biochemicznych komórki. Biologiczna rola poszczególnych białek zależy ściśle od ich struktury drugo- i trzeciorzędowej, która jest zdefiniowana przez sekwencję aminokwasową łańcucha polipeptydowego. Znaczenie peptydów i białek w biologii i medycynie inspirowuje chemików do rozwijania strategii ich syntezy.

Metody otrzymywania polipeptydów zostały znacznie rozszerzone w ciągu kilku ostatnich dekad [1], zwłaszcza od momentu wprowadzenia przez Merrifielda syntezy na nośniku stałym [2] oraz zastosowania syntezy automatycznej. Jednak SPPS nie może zaspokoić rosnącego zapotrzebowania na syntezę dużych polipeptydów lub białek, ponieważ najlepiej nadaje się do syntezy łańcuchów peptydowych mających mniej niż 50 reszt aminokwasowych.

Główną przeszkodą w otrzymywaniu długich peptydów jest tendencja do ich agregacji, w wyniku której reakcje sprzęgania i usuwania grup ochronnych są mało wydajne, a oczyszczanie związków jest bardzo trudne. Między- i wewnątrzcząsteczkowe interakcje, hydrofobowy charakter, obecność wielu wiązań wodorowych wpływają w znacznym stopniu na strukturę drugorzędową peptydów, utrudniając dalsze wydłużanie łańcucha peptydowego. Dlatego też synteza peptydów o trudnych sekwencjach jest ostatnio przedmiotem badań wielu zespołów [3, 4].

1. STRATEGIE STOSOWANE W SYNTEZIE PEPTYDÓW O TRUDNYCH SEKWENCJACH

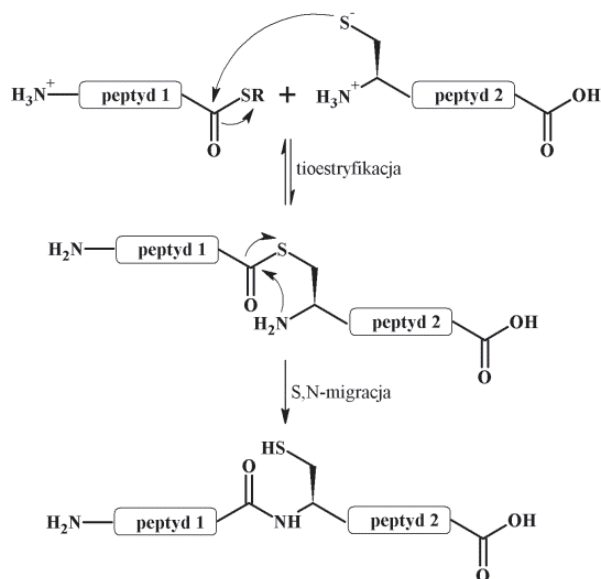
Niepożądany proces agregacji może zostać zakłócony w wyniku zmniejszenia hydrofobowych oddziaływań. Do tego celu stosowane są różne metody, polegające na wprowadzeniu konkretnych modyfikacji do łańcucha peptydowego, wpływających na jego strukturę drugorzędową. Do metod tych zaliczamy m.in. inkorporację pseudoprolinowych bloków budulcowych [5] oraz różnego typu substancji pomocniczych np. reszty 2-hydroksy-4-metoksybenzylowej (Hmb) [6]. Obecność substancji pomocniczych zakłóca strukturę drugorzędową, powstałą w wyniku oddziaływań między- i wewnątrzcząsteczkowych, co ułatwia reakcję *N*-acylowania. Metoda ta została zapoczątkowana przez Brennera i wsp. ponad 60 lat temu [7]. Ostatnio, Miranda i wsp. opisali zastosowanie pomocniczego 2-hydroksy-6-nitrobenzylu (Hnb), dla poprawy efektywności i wydajności syntezy peptydów na fazie stałej, zawierających sterycznie zawadzone aminokwasy, szczególnie β -rozgałęzione reszty [8]. W wyniku redukcyjnego alkilowania, odpowiedni benzaldehyd jest przyłączony do peptydu związanego z żywicą, a następnie wolna grupa hydroksylowa jest acylowana Fmoc-aminokwasem lub peptydem aktywowanym HBTU. *O*→*N* Migracja reszty acylowej prowadzi do utworzenia wiązania amidowego (Schemat 1).



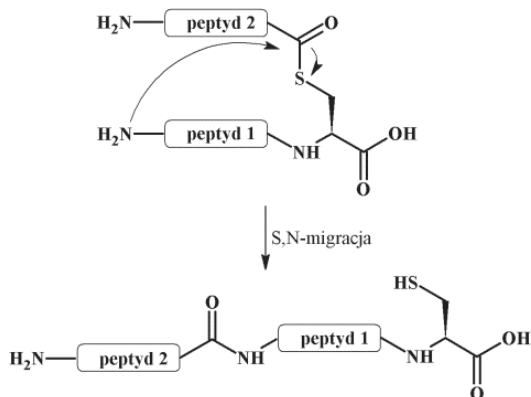
Schemat 1. Ligacja peptydu indukowana substancją pomocniczą
 Scheme 1. Proximity induced peptide ligation

Wprowadzono także strategie polegające na sprzęganiu fragmentów otrzymanych na fazie stałej i/lub w roztworze w celu ułatwienia syntezy dużych polipeptydów [9, 10]. Jedną z metod kondensacji fragmentów w roztworze, która zrewolucjonizowała syntezę peptydów jest natywna ligacja chemiczna (NCL) (Schemat 2a). Pojęcie NCL wprowadzono już w 1953 roku [11], ale metoda ta znalazła szerokie zastosowanie dopiero od 1994, kiedy to została wykorzystana w syntezie interleukiny-8, odpowiedzialnej za proliferację komórek B podczas odpowiedzi immunologicznej [12]. NCL polega na chemoselektywnym sprzęganiu dwóch fragmentów peptydowych, gdzie jeden z nich zawiera aktywowany C-terminały tioester, a drugi odblokowaną *N*-końcową resztę cysteiny. Ich połączenie prowadzi do uzyskania natywnego peptydu. Siłą napędową reakcji NCL jest większa termodynamiczna trwałość wiązania amidowego niż tioestrowego, która występuje w zakresie neutralnego pH [13]. Generalnie, NCL oznacza międzycząsteczkową ligację z udziałem dwóch cząsteczek (Schemat 2a), natomiast wewnątrzcząsteczkowa ligacja, często nazywana acylomigracją, występuje, gdy grupa acylowa migruje z *O*, *N*, *S*→*N* w izopeptydzie (Schemat 2b).

a)

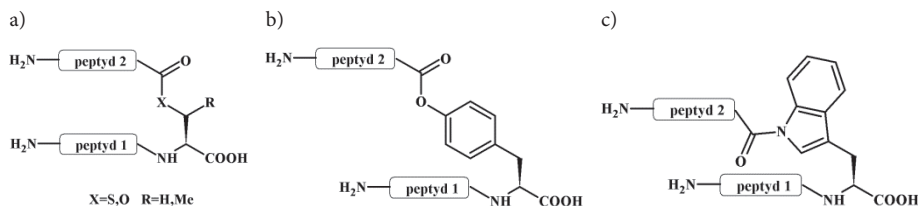


b)



Schemat 2. (a) Międzycząsteczkowa ligacja chemiczna, (b) Wewnątrzcząsteczkowa ligacja chemiczna
 Scheme 2. (a) Intermolecular chemical ligation, (b) Intramolecular chemical ligation

W przypadku kondensacji fragmentów, *N*-końcowy fragment peptydowy sprzężany jest z *C*-końcowym fragmentem, a następnie proces ten powtarzany jest aż do momentu osiągnięcia docelowego peptydu. W niektórych przypadkach, w których występuje problem z rozpuszczalnością w pełni odblokowanego natywnego peptydu lub występują problemy w efektywnym sprzęgnięciu segmentów, należy wykorzystać inne alternatywne metody. W takich przypadkach wygodniej jest wydłużać łańcuch boczny aminokwasu, zamiast przedłużania łańcucha głównego, tworząc izopeptydy (Rys. 1) [14]. Depsipeptydy mogą być tworzone na takich naturalnych aminokwasach jak cysteina, seryna, treonina, tyrozyna czy tryptofan. Dalsza część pracy poświęcona zostanie najczęściej stosowanym w syntezie *O*-acyloizopeptydom.

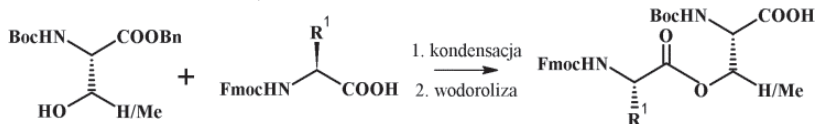


Rysunek 1. (a) Izopeptyd cysteiny/seryny/treoniny, (b) izopeptyd tyrozyny, (c) izopeptyd tryptofanu
 Figure 1. (a) Cysteine/serine/threonine isopeptide, (b) tyrosine isopeptide, (c) tryptophan isopeptide

2. O-ACYLOIZOPEPTYDY

Szybka, łatwa i nieodwracalna transformacja *O*-acyloizopeptydu do natywnego peptydu określana jest jako metoda „click” [15] lub „switch” [16]. Podstawowym wymogiem jest obecność składnika β -hydroksyaminowego. Białkowe aminokwasy Ser, Thr, Tyr i nienaturalne aminokwasowy np. Pns (kwas (2*R*,3*S*)-3-amino-2-hydroksy-4-fenylbutanowy), α -alkiloseryny spełniają ten podstawowy wymóg. W przypadku syntezy peptydów na fazie stałej, wiązanie estrowe utworzone jest pomiędzy grupą karboksylową jednego aminokwasu i grupą β -hydroksylową drugiego takiego jak np. Ser/Thr. Dalsze wydłużanie łańcucha peptydowego prowadzi się w regularny sposób. Po otrzymaniu pełnej sekwencji aminokwasowej peptyd odszczepia się od żywicy i usuwa grupę ochronną na Ser/Thr w celu uzyskania jednostki *O*-acylo-izopeptydowej, która w warunkach fizjologicznych (pH 7,4) np. w peroksyboranie(III) sodu (PBS) w temperaturze pokojowej ulega *O*→*N* wewnątrzcząsteczkowej migracji reszty acylowej. W konsekwencji otrzymuje się pożądaną peptyd [17]. Obecność ugrupowania depsiptydowego w miejscu wiązania amidowego nie powoduje tworzenia niepożądanych pofałdowań struktury drugorzędowej, które mogłyby prowadzić do agregacji.

Kiso i in. [18] wykazali że obecność reszt *O*-acylowych znacząco zmienia strukturę drugorzędową natywnego peptydu. *O*-Acyloizopeptydy są bardziej hydrofilowe i łatwiejsze do oczyszczenia metodą HPLC, niż odpowiadające im macierzyste peptydy. W tym samym zespole otrzymana została biblioteka 40 jednostek *O*-acyloizodipeptydowych o ogólnej strukturze Boc-Ser/Thr(Fmoc-AA)-OH (Schemat 3). Autorzy oznaczyli czystość enancjomeryczną otrzymanych depsiptydów metodą HPLC przez porównanie z wzorcami Boc-Ser/Thr(Fmoc-D-Xaa)-OH [19]. Badania wykazały, że metoda *O*-acyloizopeptydowa, w przypadku syntezy w roztworze, jest metodą wolną od racemizacji.

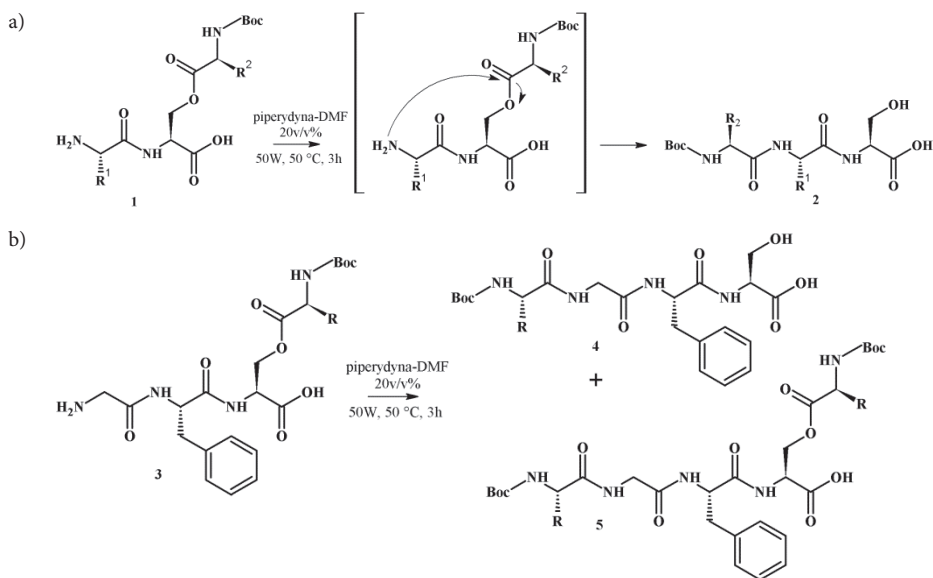


Schemat 3. Synteza jednostek *O*-acyloizopeptydowych [Boc-Ser/Thr(FmocXaa)-OH]
 Scheme 3. Synthesis of *O*-acyl isopeptide units [Boc-Ser/Thr(FmocXaa)-OH]

N-Końcowe izopeptydy serynowe szybko generują odpowiadające im natywne peptydy przez *O*→*N* wewnątrzcząsteczkową migrację reszty acylowej przez 5-cio członowy stan pośredni [20]. Zaobserwowano również klasyczne przesunięcie *O*→*N* reszty acylowej poprzez 8- i 11-członowe cykliczne stany przejściowe [21].

O→*N* Migrację w *O*-acyloizopeptydach (**1** i **3**) można prowadzić w bezwodnych warunkach w celu uniknięcia hydrolizy estru, w mieszaninie piperydyna-DMF (20% v/v), przy wspomaganiu promieniowania mikrofalowego w 50°C, MW 50W, 1 h (Schemat 4). Za pomocą metody HPLC-MS potwierdzono powstawanie pożądaných wewnątrzcząsteczkowych produktów ligacji (odpowiednio **2** i **4**), a także produktu *bis*-acylowania **5**, powstałych przez 8- i 11-członowe stany przejściowe.

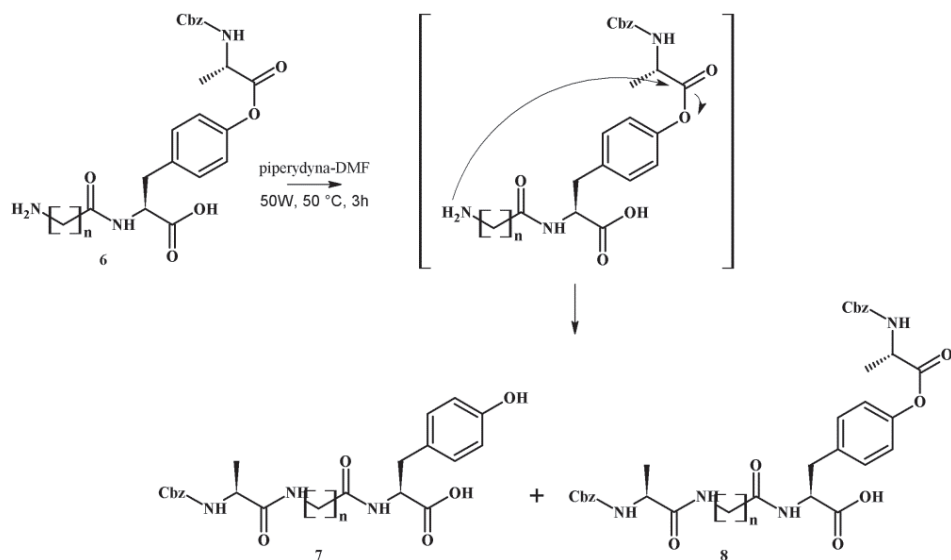
Ligacja związku **3** została zbadana również w warunkach wodnych (pH = 7,6, stężenie buforu 1 M, MW 50°C, 50 W, 1 h). Wyniki analizy HPLC-MS wskazywały na obecność tylko niewielkiej ilości produktu ligacji **4**, główny pik odpowiadał masie związku **3**, pozbawionego grupy Boc.



Schemat 4. Ligacja chemiczna izopeptydów seryny *via*: (a) 8-członowy stan przejściowy, (b) 11-członowy stan przejściowy

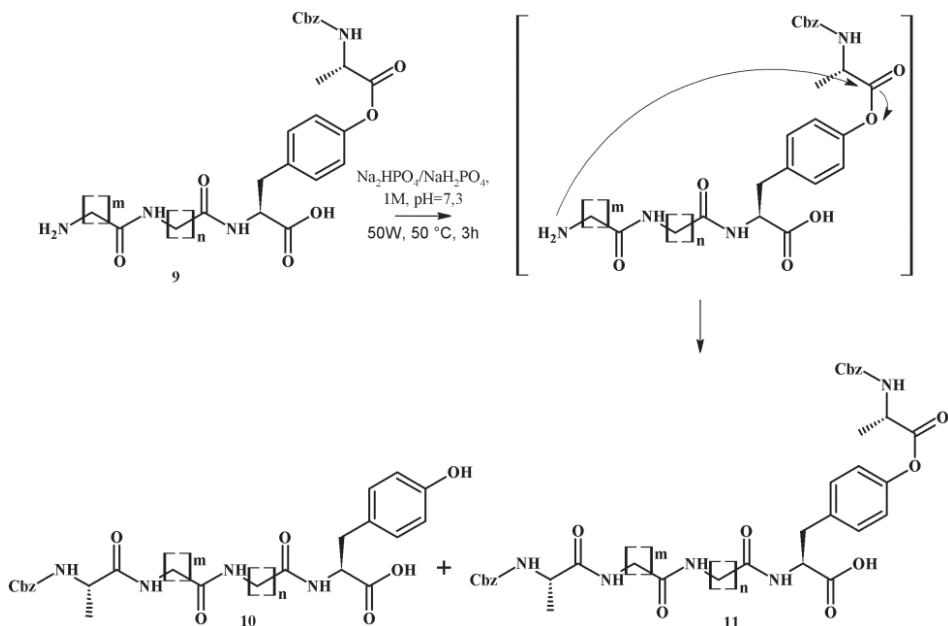
Scheme 4. Chemical ligation of serine isopeptide *via*: (a) 8-membered transition state, (b) 11-membered transition state

Izopeptyd tyrozyny **6** ($n = 1-3$) służył jak narzędzie do badania ligacji poprzez 12-14-członowe cykliczne stany przejściowe (Schemat 5).

Schemat 5. Ligacja chemiczna izopeptydu tyrozyny **6**Scheme 5. Chemical ligation of tyrosine isopeptide **6**

Próby ligacji izopeptydu tyrozyny **6** w warunkach wodnych zakończyły się niepowodzeniem. Jednakże, gdy reakcję prowadzono w warunkach promieniowania mikrofalowego (pH 7,3, stężenie buforu 1M, MW 50°C, 50 W, 3 h) (Schemat 5) otrzymano produkt wewnątrzcząsteczkowej O→N-acylomigracji **7** (85%), zanieczyszczony *bis*-acylowanym związkiem **8** (10%) oraz nieprzereagowanym substratem **6** (5%). Wyniki wskazują, że O→N-acylomigracja poprzez 12- i 14-członowe cykliczne stany przejściowe jest bardziej preferowana niż międzycząsteczkowe acylowania przebiegające poprzez 13-członowe cykliczne stany przejściowe.

Izopeptyd **9** ($m = 1-3$, $n = 1-3$) został wykorzystany do badania O→N wewnątrzcząsteczkowej migracji poprzez 15-19-członowe cykliczne stany przejściowe (Schemat 6) [22].

Schemat 6. Ligacja chemiczna izopeptydu tyrozyny **9**Scheme 6. Chemical ligation of tyrosine isopeptide **9**

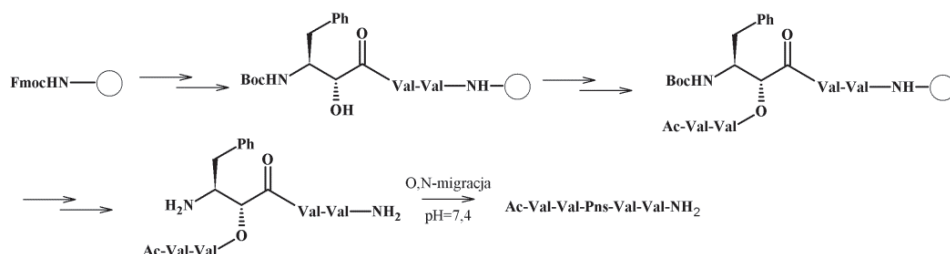
W środowisku wodnym (pH = 7,3), 12-, 13- i 14-członowe stany przejściowe nie prowadzą do produktów ligacji [23]. Wykazano, że w mieszaninie piperydyna-DMF, atakujący nukleofil jest całkowicie deprotonowany, a ligacja zachodzi z wysokimi wydajnościami sięgającymi 97%.

Ligacja izotetrapeptydu tyrozyny **9** w warunkach wodnych prowadzi do otrzymania oczekiwanego produktu ligacji **10** (87–100%, Schemat 6), któremu towarzyszyły nieznaczne ilości produktów międzycząsteczkowego *bis*-acylowania **11** oraz śladowe ilości nieprzereagowanego substratu **9**.

3. ZASTOSOWANIE METODY $O \rightarrow N$ -ACYLOIZOPEPTYDOWEJ W SYNTEZIE PEPTYDÓW

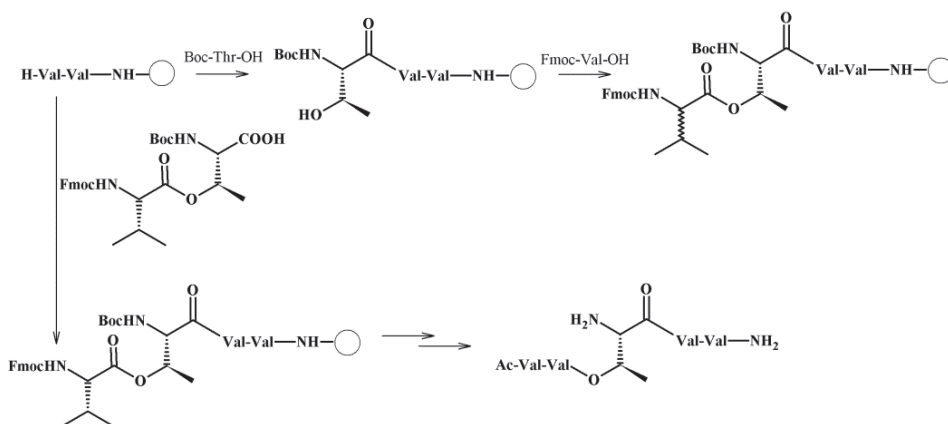
Podczas badań nad prolekami przeciwnowotworowymi paklitakselem i docetakselem, Kiso i in. stwierdzili, że obecność reszty *O*-acylowej zamiast *N*-acylowej, zwiększa rozpuszczalność produktu pośredniego. W łatwy sposób otrzymali depsi-peptyd, który w końcowym etapie poddali $O \rightarrow N$ -wewnątrzcząsteczkowej migracji otrzymując zaprojektowany związek [24, 25]. Wyniki te zostały poparte obserwacjami Fujii i wsp., którzy poprzez $O \rightarrow N$ -migrację otrzymali izoestry dipeptydów z grupą hydroksyetyloaminową (HDIs). Peptydomimetyki te wykorzystywane są w syntezie inhibitorów β -sekretazy [26].

Użycie tej metody pozwoliło otrzymać pentapeptyd Ac-Val-Val-Pns-Val-Val-NH₂ [27]. W przypadku zastosowania standardowej procedury wydłużania łańcucha peptydowego, Kiso i wsp. otrzymali mieszaninę związków, a oczyszczanie peptydu przy użyciu HPLC okazało się niezwykle problematyczne ze względu na słabą rozpuszczalność. Zaprojektowany peptyd wyodrębnili z bardzo słabą wydajnością (6,9%). Zastosowanie metody *O*-acyloizopeptydowej podniosło wydajność do 57,6% (Schemat 7).



Schemat 7. Synteza pentapeptydu Ac-Val-Val-Pns-Val-Val-NH₂ przy wykorzystaniu metody *O*-acyloizopeptydowej
 Scheme 7. *O*-Acyl isopeptide method for the synthesis of pentapeptide Ac-Val-Val-Pns-Val-Val-NH₂

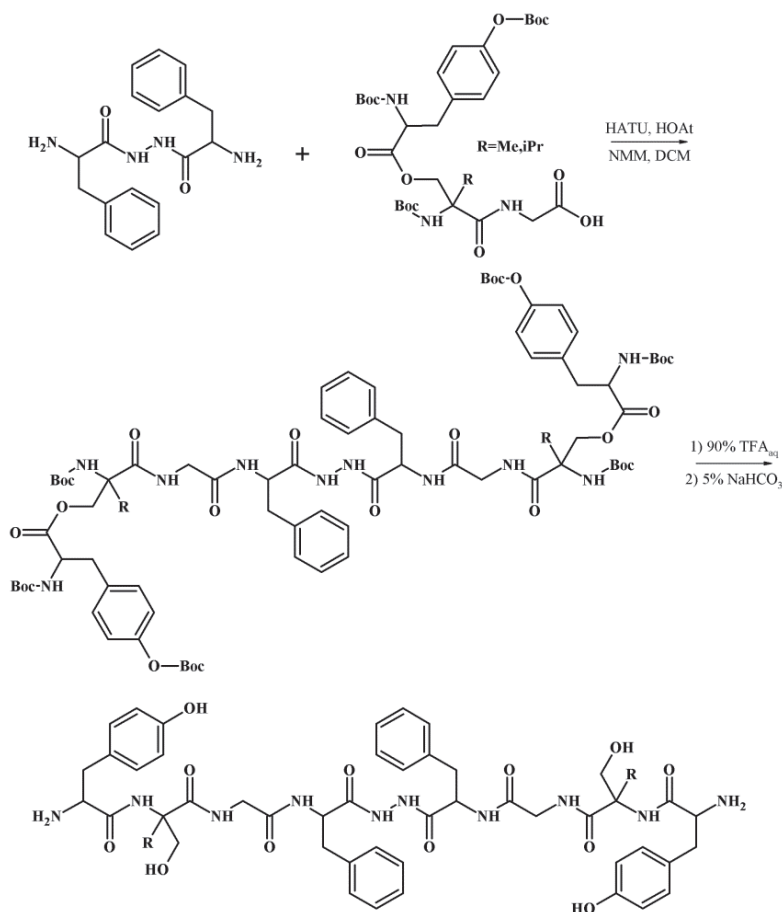
Boc-Pns-OH sprzęgano do dipeptydyłozywicy, a następnie acylowanie grupy β -hydroksylowej Boc-Pns przeprowadzono stosując Fmoc-Val. Po otrzymaniu pożądanego sekwencji, grupę Fmoc usunięto i wolną grupę aminową zacetylowano. Po odszczepieniu od żywicy i usunięciu grupy Boc otrzymano depsiptyd o 100% czystości HPLC, który był ok. 500-krotnie lepiej rozpuszczalny w wodzie niż natywny peptyd. Związek przechowywany był w 4°C przez okres 1 miesiąca bez degradacji. Izopeptyd poddano migracji (< 5 minut) w PBS o pH = 7,4, stężeniu 1 mg/ml.



Schemat 8. Synteza pentapeptydu Ac-ValValThrValVal-NH₂ przy wykorzystaniu metody *O*-acylo izopeptydowej
 Scheme 8. *O*-Acyl isopeptide method for the synthesis of Ac-ValValThrValVal-NH₂

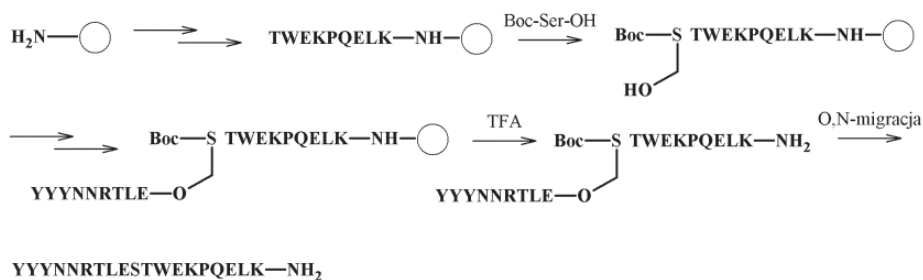
Podczas syntezy metodą $O \rightarrow N$ -acyloizopeptydową Ac-Val-Val-Thr-Val-Val-NH₂, Kiso i in. zaobserwowali powstawanie niepożądanego epimeru izopeptydu, Thr(Ac-Val-D-Val)Val-Val-NH₂ x TFA (około 21%), obok peptydu o pożądanej sekwencji [28]. Racemizacja Val spowodowana była małą szybkością estryfikacji na fazie stałej. Autorzy opracowali nową strategię, pozwalającą uniknąć epimeryzacji. Depsipeptyd Boc-Ser/Thr(Fmoc-Xaa-OH) otrzymali w roztworze i następnie wykorzystali w SPPS (Schemat 8).

Także analogi Leu-enkefaliny zawierające α -podstawione seryny w miejscu glicyny w pozycji 2 zostały otrzymane przy wykorzystaniu metody depsipeptydowej z wysokimi wydajnościami [29]. W przypadku klasycznej syntezy, ze względu na dużą zawadę przestrzenną dipodstawionych aminokwasów, co utrudnia acylowanie ich funkcji aminowej, pożądane produkty otrzymuje się z dużo niższymi wydajnościami. Identyczne podejście wykorzystano do syntezy analogów bifaliny, modyfikowanej w pozycjach 2, 2' (*R*)- lub (*S*)- α -metylo(izopropilo)seryną (Schemat 9) [30].



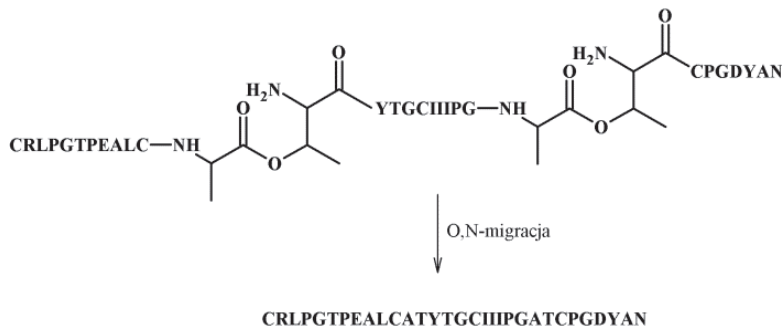
Schemat 9. Synteza analogów bifaliny przy wykorzystaniu metody O -acyloizopeptydowej
 Scheme 9. O -Acyl isopeptide method for the synthesis of biphalin analogues

Carpino i in. wykorzystali metodę depsiptydową do syntezy 37-aminokwasowej domeny WW FBP28, która przyjmuje formę trzyniciowej antyrównoległej β -kartki [31]. Nawet krótki fragment tego peptydu Y¹⁹-K³⁷ uznawany jest za niezwykle trudny w syntezie. Wprowadzenie wiązania depsiptydowego w pozycji E²⁷-S²⁸ rozwiązało problemy z agregacją, a po etapie migracji peptyd otrzymano z wysoką wydajnością, porównywalną do tej uzyskanej strategią pseudoprolinową (Schemat 10). Po wbudowaniu Boc-Ser-OH funkcja hydroksylowa Ser acylowana była Fmoc-Glu(O^tBu)-OH, w obecności *N*-metyloimidazolu (NMI). Pozostałe aminokwasy przyłączano standardowo. Powstały depsiptyd odszczepiono od żywicy przy użyciu kwasu trifluorooctowego (TFA) i poddano *O*→*N* migracji. Obecność pożądanego produktu potwierdzono za pomocą spektrometrii mas.



Schemat 10. Synteza fragmentu domeny WW FBP28 przy wykorzystaniu metody *O*-acylo izopeptydowej
 Scheme 10. *O*-Acyl isopeptide method for the synthesis of FBP28 WW domain fragment

Carpino i wsp. użyli jednostek depsiptydowych w automatycznej syntezie izopeptydów [31]. To pozwala uniknąć *O*-acylowania na żywicy, które jest niewygodne i podatne na racemizację. Otrzymany depsiptyd Boc-Thr(Fmoc-Ala)-OH wykorzystano w zautomatyzowanej syntezie 31-meru C-terminalego fragmentu krabiny (Schemat 11). Podczas syntezy fragmentu 16–46, depsiptyd wprowadzono w pozycję 27–28 i 38–39. W końcowym etapie przeprowadzono *O*→*N* migrację otrzymując zaprojektowany fragment 16–46 krabiny.



Schemat 11. Synteza fragmentu krabiny przy wykorzystaniu metody *O*-acylo izopeptydowej
 Scheme 11. *O*-Acyl isopeptide method for the synthesis of crabmine fragment

(C-koniec do *N*-końca), głowa-łańcuch boczny, łańcuch boczny-ogon lub łańcuch boczny-łańcuch boczny.

Amblard i wsp. opisali syntezę cyklicznego peptydu przy wykorzystaniu cyklizacji głowa-ogon [35]. Liniowy depsiptyd zawierający resztę seryny został otrzymany na fazie stałej. Po usunięciu z żywicy, przeprowadzono wewnątrzcząsteczkową cyklizację przez aktywację *C*-terminalnej *O*-acyloseryny. Po odblokowaniu funkcji aminowej seryny przeprowadzono *O*→*N*-migrację w cyklicznym depsiptydzie otrzymując cykliczny peptyd (Schemat 12).

PODSUMOWANIE

Ligacja peptydów przy użyciu metody *O*-acyloizopeptydowej, zbliżonej pod wieloma względami do metody pseudoprolinowej, posiada wiele zalet, m.in.:

- lepsza rozpuszczalność izopeptydów w wodzie, ze względu na obecność dodatkowej protonowanej grupy aminowej, co ułatwia ich oczyszczanie,
- stabilność acyloizopeptydów w obojętnych lub słabo zasadowych warunkach, w postaci roztworu w DMSO lub w postaci stałej po liofilizacji,
- *O*-*N*-acylomigracja zachodzi ilościowo w krótkim okresie czasu w łagodnych warunkach zasadowych,
- obecność wiązania depsiptydowego zapobiega niepożądanym agregacji,
- większe wydajności deprotekcji i sprzęgania w syntezie SPSS spowodowane obecnością jednostki *O*-acyloizopeptydowej,
- możliwość ligacji chemicznej przy użyciu białkowych aminokwasów takich jak cysteina, seryna, tyrozyna i tryptofan.

Metoda ta umożliwia otrzymanie z wysokimi wydajnościami peptydów o trudnych sekwencjach zawierających sterycznie zawadzone aminokwasy, cyklicznych peptydów, długich peptydów posiadających tendencję do agregacji. Zalety metody acyloizopeptydowej sprawiają, że coraz częściej metoda ta jest „metodą z wyboru” w syntezie peptydów.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] V. Muralidharan, T. Muir, *Nat. Methods*, 2006, **3**, 429.
- [2] (a) R. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 2149; b) S. Kent, *Biopolymers*, 2010, **94**, 4.
- [3] (a) L. Carpino, E. Krause, C. Sferdean, M. Schumann, H. Fabian, M. Bienert, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 7519; (b) W. Meuterms, S. Golding, G. Bourne, L. Miranda, M. Dooley, P. Alewood, M. Smythe, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 9790.
- [4] S. Panda, C. Hall, A. Oliferenko, A. Katritzky, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 1076.
- [5] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 9218.
- [6] T. Johnson, M. Quibell, D. Owen, R. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1993, 369.

- [7] M. Brenner, J. Zimmermann, J. Wehrmuller, P. Quitt, A. Hartmann, W. Schneider, U. Beglinger, *Helv. Chim. Acta*, 1957, **40**, 1497.
- [8] L. Miranda, W. Meutermans, M. Smythe, P. Alewood, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 5460.
- [9] (a) V. Pattabiraman, J. Bode, *Nature*, 2011, **480**, 471; (b) C. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 10030.
- [10] (a) J. Monbaliu, A. Katritzky, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 11601; (b) L. Raibaut, N. Ollivier, O. Melny, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 7001.
- [11] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. Lang, H. Lau, W. Schafer, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1953, **583**, 129.
- [12] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science*, 1994, **266**, 776.
- [13] S. Kent, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 338.
- [14] P. Geurink, F. Oualid, A. Jonker, D. Hameed, H. Ovaa, *ChemBioChem*, 2012, **13**, 293.
- [15] (a) Y. Sohma, Y. Kiso, *ChemBioChem*, 2006, **7**, 1549; (b) M. Skwarczynski, Y. Sohma, M. Noguchi, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 2542.
- [16] (a) M. Mutter, A. Chandravarkar, C. Boyat, J. Lopez, S. Santos, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Patiny, L. Saucedo, G. Tuchscherer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 4172; (b) J. Hentschel, E. Krause, H. Borner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7722.
- [17] (a) Y. Sohma, Y. Hayashi, M. Skwarczynski, Y. Hamada, M. Sasaki, T. Kimura, Y. Kiso, *Biopolymers*, 2004, **76**, 344; (b) H. Wang, T. Kakizawa, A. Taniguchi, T. Mizuguchi, T. Kimura, Y. Kiso, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 4881.
- [18] Y. Sohma, T. Yoshiya, A. Taniguchi, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Biopolymers*, 2007, **88**, 253.
- [19] T. Yoshiya, A. Taniguchi, Y. Sohma, F. Fukao, S. Nakamura, N. Abe, N. Ito, M. Skwarczynski, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 1720.
- [20] Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Chem. Commun.*, 2004, 124.
- [21] M. El Khatib, M. Elagawany, F. Jabeen, E. Todadze, O. Bol'shakov, L. Khelashvili, S. El-Feky, A. Asiri, A. Katritzky, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 4836.
- [22] V. Popov, S. Panda, A. Katritzky, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 7455.
- [23] S. Panda, A. Oliferenko, H. Marwani, A. Katritzky, *Mendeleev Commun.*, 2014, **24**, 75.
- [24] (a) M. Skwarczynski, Y. Sohma, M. Noguchi, M. Kimura, Y. Hayashi, Y. Hamada, T. Kimura, Y. Kiso, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 2655; (b) Y. Hayashi, M. Skwarczynski, Y. Hamada, Y. Sohma, T. Kimura, Y. Kiso, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 3782.
- [25] M. Skwarczynski, Y. Sohma, M. Kimura, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 4441.
- [26] H. Tamamura, T. Hori, A. Otaka, N. Fujii, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2002, 577.
- [27] Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Chem. Commun.*, 2004, 124.
- [28] Y. Sohma, A. Taniguchi, M. Skwarczynski, T. Yoshiya, F. Fukao, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 3013.
- [29] M. Horikawa, Y. Shigeri, N. Yumoto, S. Yoshikawa, T. Nakajima, Y. Ohfuné, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 2027.
- [30] O. Frączak, A. Lasota, A. Leśniak, A. Lipkowski, A. Olma, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2014, DOI: 10.1111/cbdd.12305
- [31] I. Coin, R. Dolling, E. Krause, M. Bienert, M. Beyermann, C. Sferdean, L. Carpino, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 6171.
- [32] (a) A. Taniguchi, T. Yoshiya, N. Abe, F. Fukao, Y. Sohma, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *J. Pept. Sci.*, 2007, **13**, 868; (b) Y. Sohma, A. Taniguchi, T. Yoshiya, Y. Chiymori, F. Fukao, S. Nakamura, M. Skwarczynski, T. Okada, K. Ikeda, Y. Hayashi, T. Kimura, S. Hirota, K. Matsuzaki, Y. Kiso, *J. Pept. Sci.*, 2006, **12**, 823.

-
- [33] Y. Sohma, Y. Chiyomori, M. Kimura, F. Fukao, A. Taniguchi, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Bio-org. Med. Chem.*, 2005, **13**, 6167.
- [34] C. White, A. Yudin, *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 509.
- [35] J. Lécaillon, P. Gilles, G. Subra, J. Martinez, M. Amblard, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 4674.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 lipca 2014

