

**METODY CHEMICZNEJ LIGACJI W SYNTEZIE  
PEPTYDÓW I BIAŁEK – CZĘŚĆ II**

**CHEMICAL LIGATION METHODS IN THE SYNTHESIS  
OF PEPTIDES AND PROTEINS – PART II**

**Katarzyna Jędrzejewska\*, Magdalena Kropidłowska,  
Ewa Wieczerek**

*Katedra Chemii Biomedycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański  
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk*

*\*e-mail: katarzyna.jedrzejewska@phdstud.ug.edu.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Synteza peptydów w roztworze
2. Synteza peptydów na nośniku stałym
3. Natywna chemiczna ligacja
3. Synteza peptydów metodą NCL z zastosowaniem strategii Fmoc
  - 4.1. Synteza z zastosowaniem żywicy 2-chlorotrytylowej
  - 4.2. Synteza przy użyciu żywicy „safety-catch”
  - 4.3. Synteza z wykorzystaniem linkera BAL (ang. *backbone amide linker*)
  - 4.4. Synteza z zastosowaniem linkera SEA (SEA – grupa bis(2-sulfanyloetylo)aminowa)
  - 4.5. Synteza z wykorzystaniem arylowego linkera hydrazynowego
  - 4.6. Synteza z użyciem linkera Dbz (Dbz – kwas 3,4-diaminobenzoesowy)
  - 4.7. Synteza z użyciem linkera hydrazynowego
  - 4.8. Synteza łączona

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr Katarzyna Jędrzejewska**, absolwentka Uniwersytetu Gdańskiego na Wydziale Chemii. W 2016 roku uzyskała tytuł magistra na kierunku Chemia, pracę dyplomową wykonywała w Katedrze Chemii Biomedycznej. Obecnie jest słuchaczką Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemii UG, gdzie wykonuje pracę doktorską pod kierunkiem dr hab. Elżbiety Jankowskiej. W swoich badaniach zajmuje się projektowaniem i syntezą peptydów i peptydomimetyków, których sekwencje oparte są na strukturach naturalnych białkowych aktywatorów proteasomu oraz ich badaniem pod kątem możliwości modulowania aktywności ludzkiego proteasomu h20S.

**Mgr Magdalena Kropidłowska** ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, broniąc w 2014 roku pracę pt. „Zastosowanie natywnej chemicznej ligacji do syntezy C-terminalnego fragmentu cystatyny C”. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie w Katedrze Chemii Biomedycznej Uniwersytetu Gdańskiego. Swoją pracę doktorską realizuje pod kierownictwem prof. dr hab. Franciszka Kasprzykowskiego. W ramach pracy doktorskiej zajmuje się poszukiwaniem modulatorów aktywności ludzkiego proteasomu h20S wśród związków pochodzenia naturalnego, takich jak polifenole i peptydy cykliczne izolowane z cyjanobakterii.

**Dr Ewa Wieczerzak**, absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Obecnie jest adiunktem w Katedrze Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii UG. W swojej pracy naukowej zajmuje się projektowaniem, syntezą i badaniami biologicznymi peptydów i peptydomimetyków o potencjalnym działaniu terapeutycznym (inhibitory proteaz cysteinowych, inhibitory/aktywatory proteasomu). Jej zainteresowania naukowe dotyczą również poszukiwania struktur wiodących umożliwiających projektowanie związków o potencjalnym działaniu terapeutycznym wśród substancji pochodzenia naturalnego.

### ABSTRACT

Proteins are synthesized only by living organisms. Today, we are able to receive them by recombinant protein expression in bacterial cells. This technique is very useful and gives satisfactory amount of desirable material but it precludes the possibility of introduction of some chemical modifications that are often obligatory. For this reason, chemical synthesis of longer peptide chains is still important and is the object of scientists attention.

Over the last century, notion of peptide synthesis took a new meaning. Nowadays, we know a number of innovative methods and also automated devices which help us to make progress in this area. Nevertheless, the synthesis of longer, more complicated peptide chains and proteins still constitutes a problem. Native chemical ligation (NCL) has facilitated the synthesis of numerous complex peptide and protein targets. Expansion of ligation techniques has allowed the entry of peptides into the world of therapeutic drugs [1].

NCL reactions are carried out in aqueous solution and give good yields. Due to mild conditions, NCL overcomes racemic and solubility problems encountered in classical peptide synthesis using protected fragments. The challenge is to synthesize the C-terminal thioester-containing peptide necessary for the transesterification reaction, which is the first step of linking the peptide fragments [2].

In this review we discuss the evolution, advantages and potential applications of chemical ligation reactions. In the first part of this article we described the utility of native chemical ligation approach to non-cysteine containing peptides. This part details a number of important approaches to the synthesis of peptides bearing a C-terminal thioester. Contemporary applications of these techniques to the total chemical synthesis of proteins are also presented.

**Keywords:** native chemical ligation, peptide synthesis, thioester

**Słowa kluczowe:** natywna chemiczna ligacja, synteza peptydów, tioester

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SYMBOLI I OZNACZEŃ

Aa	– aminokwas
AAPH	– dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-metylopropionoaminydny)
AcOH	– kwas octowy
BAL	– łącznik amidowy (ang. <i>Backbone Amide Linker</i> )
Boc	– <i>tert</i> -butoksykarbonyl
DBU	– 1,8-diazabicykloundek-7-en
Dbz	– kwas 3,4-diaminobenzoesowy
DCM	– dichlorometan
DIEA	– <i>N,N</i> -diizopropylodetyloamina
DMF	– <i>N,N</i> -dimetyloformamid
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy
Fmoc	– 9-fluorenylometoksykarbonyl
HATU	– heksafluorofosforan 2-(7-aza-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroniowy
HBTU	– heksafluorofosforan 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy
GdnHCl	– chlorowodorek guanidyny
GSH	– glutation
GSSG	– disiarczan glutationu
MPA	– kwas 3-merkaptopropionowy
MPAA	– kwas 4-merkaptofenylooctowy
NBS	– <i>N</i> -bromosukcynimid
Nbz	– <i>N</i> -acylobenzimidazol
NCL	– natywna chemiczna ligacja (ang. <i>Native Chemical Ligation</i> )
PBS	– buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
PG	– grupa ochronna
SEA	– grupa bis(2-sulfanyloetylo)aminowa
SPPS	– synteza peptydów na nośniku stałym (ang. <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i> )
TCEP	– tris(2-karboksyetylo)fosfina
TFA	– kwas trifluoroctowy
TFE	– trifluoroetanol
Thz	– tiazolidyna

## WPROWADZENIE

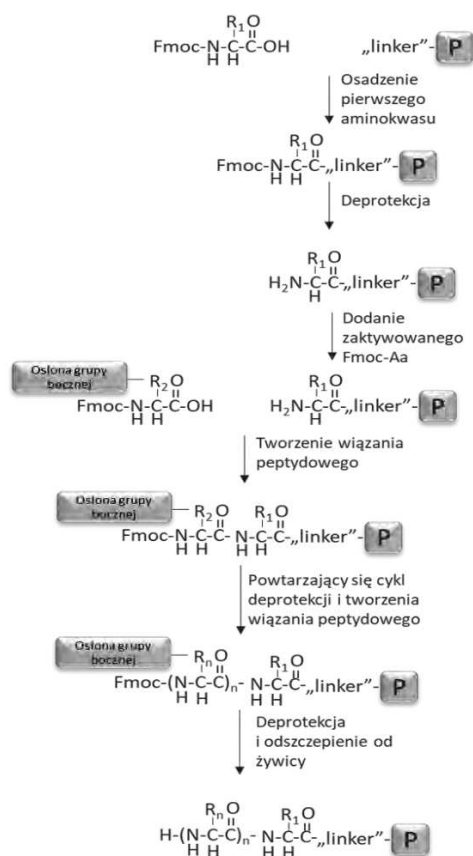
Białka syntetyzowane są jedynie przez organizmy żywe. Znaczne ilości białek można uzyskać wykorzystując techniki rekombinacji DNA, które prowadzą do ich zwiększonej ekspresji w komórkach bakteryjnych. W dzisiejszych czasach jesteśmy w stanie łatwo i skutecznie oczyścić wiele protein jednak istnieje szereg białek, których oczyszczenie w aktywnej i stabilnej formie może stanowić prawdziwe wyzwanie, np. białka integralne, niestabilne kompleksy białkowe lub też białka ulegające ekspresji w postaci nierozpuszczalnych agregatów, dlatego coraz częściej dąży się do pozyskania konkretnego białka przy zastosowaniu syntezy chemicznej.

W ciągu ostatniego stulecia pojęcie syntezy peptydów nabrało nowego znaczenia. W tej chwili dysponujemy szeregiem innowacyjnych metod, a także zautomatyzowanych sprzętów, które pomagają nam osiągać coraz większe postępy w tej dziedzinie. Niestety wciąż problemem są bardziej złożone łańcuchy peptydowe – białka, których produkcja, nawet dziś, często przekracza nasze możliwości. Technika jaką jest natywna chemiczna ligacja ułatwiła jednak syntezę licznych kompleksowych peptydów i białek. Reakcje NCL prowadzone są w roztworze wodnym i często dają dobre wydajności otrzymanych produktów. Wyzwaniem jest synteza peptydu zawierającego na C-końcu tioester, niezbędnego do zajścia reakcji transtioestryfikacji, która stanowi pierwszy etap łączenia fragmentów. W poniższym artykule przedstawione zostaną metody otrzymywania tioestrów peptydowych jako substratów do NCL przy użyciu strategii Fmoc oraz ich najnowsze zastosowania w pozyskiwaniu białek.

### 1. SYNTEZA PEPTYDÓW W ROZTWORZE

Początkowo synteza peptydów polegała na prowadzeniu wszystkich reakcji w roztworze. Ze względu na konieczność przeprowadzenia wielu reakcji tworzenia wiązania peptydowego, a także usuwania osłon grupy aminowej i/lub karboksylowej, metoda ta pochłania dużo czasu i pracy. Dodatkowym utrudnieniem jest konieczność wyodrębnienia i oczyszczenia peptydu po każdym etapie syntezy, a także scharakteryzowania produktów pośrednich. Ze względu na szereg etapów, synteza taka często wiąże się z małą wydajnością głównie poprzez straty podczas oczyszczania, a także powstawanie produktów ubocznych o właściwościach podobnych do produktu głównego. Z tego względu podejście takie najczęściej stosuje się do otrzymywania krótkich łańcuchów peptydowych [3].

## 2. SYNTEZA PEPTYDÓW NA NOŚNIKU STAŁYM

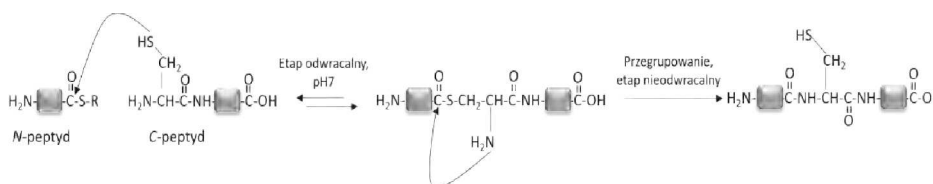


Rysunek 1. Schemat przedstawiający ideę syntezy peptydów na nośniku stałym  
 Figure 1. Scheme representing the idea of peptide synthesis on solid phase

Pomimo, że synteza w roztworze przynosiła stosunkowo dobre rezultaty zaczęto szukać nowych, bardziej wydajnych metod, a także dążyć do udogodnienia i usprawnienia operacji na przykład poprzez automatyzację podstawowych procesów podczas syntezy. W II połowie XX wieku Bruce Merrifield zaproponował innowacyjne podejście polegające na przyłączeniu C-końcowego aminokwasu do nierozpuszczalnego polimeru i stopniowym wydłużaniu łańcucha peptydowego. Sam nośnik natomiast przygotowuje się wcześniej poprzez reakcję z odpowiednim linkerem, który gwarantuje trwałe połączenie polimeru z aminokwasem oraz łatwe odszczerpienie peptydu po zakończonej syntezy. Kończącym etapem jest odszczerpienie peptydu od żywicy, najczęściej połączone ze zdjęciem osłon łańcuchów bocznych aminokwasów (Rys. 1) [4]. Nadmiar nieprzereagowanych substratów usuwa się poprzez przemywanie żywicy, co pozwala na stosowanie nadmiarów reagentów,

a syntezę można prowadzić na mniejszą skalę. Krokiem milowym w syntezie peptydów z wykorzystaniem stałego nośnika było stworzenie nowoczesnych syntezatorów mikrofalowych, które pozwalają znacznie skrócić czas syntezy, mniej angażują operatora, a także dają większe wydajności oraz czystsze produkty [2, 5].

### 3. NATYWNA CHEMICZNA LIGACJA



Rysunek 2. Dwuetapowy mechanizm natywnej chemicznej ligacji  
Figure 2. Two-stage mechanism of native chemical ligation

Częste trudności w syntezie polegającej na kondensacji fragmentów peptydów, a także wysoki stopień racemizacji jej produktów, spowodowały iż zaczęto szukać nowych sposobów tworzenia długich łańcuchów peptydowych. Alternatywne podejście do tego problemu zaproponował Stephen Kent w 1994 roku. Wraz z współpracownikami opracował on metodę Natywnej Chemicznej Ligacji (ang. *Native Chemical Ligation*, NCL), polegającą na chemoselektywnym łączeniu dwóch niechronionych peptydów natywnym wiązaniem peptydowym. Aby reakcja NCL mogła zajść, konieczna jest obecność dwóch peptydów: *N*-peptydu z *C*-terminalnym tioestrem oraz *C*-peptydu z wolną resztą cysteiny na *N*-końcu [6].

Reakcja NCL zachodzi w dwóch etapach. W pierwszym etapie następuje atak nukleofilowej grupy tiolowej *N*-końcowej reszty cysteiny *C*-peptydu na *C*-końcową grupę tioestru *N*-peptydu, która pełni rolę elektrofila. Tworzy się produkt pośredni zawierający wolną grupę aminową, a etap ten nazywa się odwracalną transtioestryfikacją. Następnie w wyniku wewnątrzcząsteczkowego ataku wolnej pary elektronowej atomu azotu grupy aminowej na karbonylowy atom węgla dochodzi do spontanicznego przegrupowania i przeniesienia acylu *S*→*N*. W efekcie powstaje peptyd połączony natywnym wiązaniem peptydowym (Rys. 2) [7].

Reakcję NCL prowadzi się w środowisku wodnym, w neutralnym pH (pH 6,8–7) ze względu na niestabilność tioestrów w warunkach zasadowych. Jako dodatek do buforu stosuje się chlorowoderek guanidyny, który zapobiega agregacji fragmentów peptydowych.

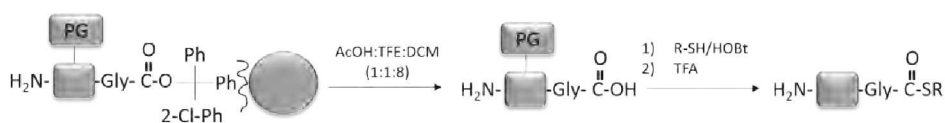
W związku z tym, że tioestry arylowe są bardziej reaktywne od tioestrów alkiłowych, powszechne jest stosowanie egzogennych katalizatorów (np. kwasu 4-merkaptofenylooctowego – MPAA) w celu zwiększenia szybkości ligacji [8, 9].

#### 4. SYNTEZA PEPTYDÓW METODĄ NCL Z ZASTOSOWANIEM STRATEGII FMOC

Niezbędne do przeprowadzenia reakcji NCL peptydy zakończone C-terminalnym tioestrem można otrzymać stosując standardową syntezę na nośniku stałym z użyciem chemii Boc bądź dla większych polipeptydów – stosując bakteryjne systemy ekspresyjne. Niestety synteza tioestrów peptydowych z zastosowaniem strategii Boc wymaga użycia toksycznego fluorowodoru podczas zdejmowania peptydu z nośnika.

Alternatywę dla chemii Boc stanowi chemia Fmoc, której zastosowanie nie wymaga użycia szkodliwego HF. Niestety do usuwania osłony Fmoc podczas syntezy w większości przypadków stosuje się piperydynę, co jest dużym ograniczeniem ze względu na niestabilność tioestrów w obecności tak silnych nukleofilów. Opisanym zostało jednak kilka strategii umożliwiających ominięcie tego problemu.

##### 4.1. SYNTEZA Z WYKORZYSTANIEM ŻYWICY 2-CHLOROTRITYLOWEJ



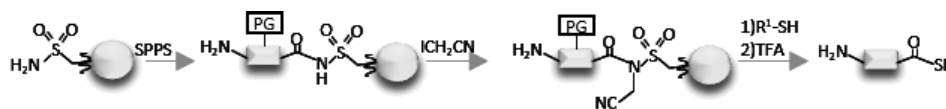
Rysunek 3. Schemat syntezy tioestru z zastosowaniem żywicy 2-chlorotrytylowej  
Figure 3. Scheme of thioester synthesis using 2-chlorotrityl resin

Pierwsza próba utworzenia tioestru z zastosowaniem strategii Fmoc polegała na zsyntezowaniu odpowiednio chronionego peptydu na żywicy 2-chlorotrytylowej. Po zdjęciu gotowego peptydu z nośnika w łagodnych warunkach kwasowych, wolną, C-kończącą grupę karboksylową częściowo chronionego peptydu poddawano tioestryfikacji odpowiednimi tiolami. Na koniec peptyd poddawano działaniu kwasu trifluorooctowego w celu zdjęcia wszystkich osłon. Słabą stroną opisanego metody była utrudniona rozpuszczalność chronionych peptydów, a także epimeryzacja C-końcowej reszty peptydu, innej niż glicyna (Rys. 3) [10].

Dzięki tej metodzie udało się między innymi otrzymać różne izoformy cholecy-stokininy (CCK) – hormonu odpowiedzialnego za uczucie głodu [11].

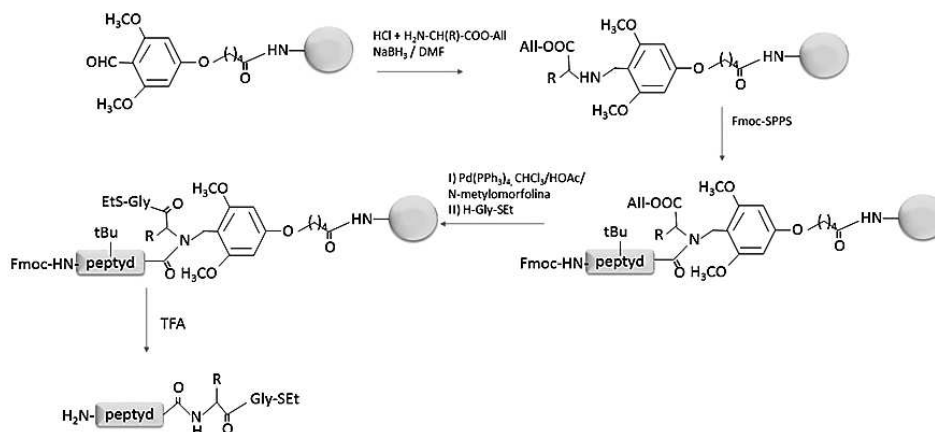


## 4.2. SYNTEZA PRZY UŻYCIU ŻYWICY „SAFETY-CATCH”



Rysunek 4. Synteza tioestru peptydu na żywicy typu „safety catch”  
Figure 4. Synthesis of peptide thioester on “safety catch” type resin

Peptyd syntezowany jest na żywicy z linkerem alkanosulfonamidowym, który jest stabilny w warunkach reakcji. Po zsyntezowaniu całego łańcucha do żywicy dodaje się tzw. czynnik aktywujący (jodoacetonitryl lub diazometan), w wyniku czego powstaje drugorzędowy sulfonamid. Sulfonamid poddaje się reakcji z nukleofilowym tiolem i przeprowadza całkowitą deprotekcję za pomocą TFA (Rys. 4) [12, 13].

4.3. SYNTEZA Z WYKORZYSTANIEM LINKERA BAL  
(ANG. BACKBONE AMIDE LINKER)

Rysunek 5. Synteza tioestru zawierającego C-kończącą glicynę przy użyciu linkera BAL  
Figure 5. Synthesis of thioester containing C-terminal glycine using BAL linker

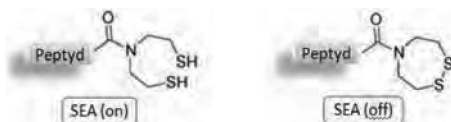
Użycie linkera BAL polega na zakotwiczeniu syntezowanego peptydu na nośniku stałym poprzez grupę  $\alpha$ -aminową C-końcowego aminokwasu. C-końcowa grupa karboksylowa pozostaje wtedy chroniona, najczęściej poprzez ester allilowy. Po zsyntezowaniu całego peptydu usuwa się osłonę z grupy  $\alpha$ -karboksylowej C-końcowego aminokwasu i przeprowadza tioestryfikację przy użyciu odpowiedniego tiolu [14].

Metoda ta stosowana jest w celu syntezy peptydów modyfikowanych na C-końcu (Rys. 5) [14] oraz peptydów cyklicznych [15].

Jednym z zastosowań linkera BAL była synteza cyklicznych 10-aminokwasowych peptydów opartych na sekwencji białka BPTI (ang. *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*) poprzez wewnątrzcząsteczkową NCL [15].

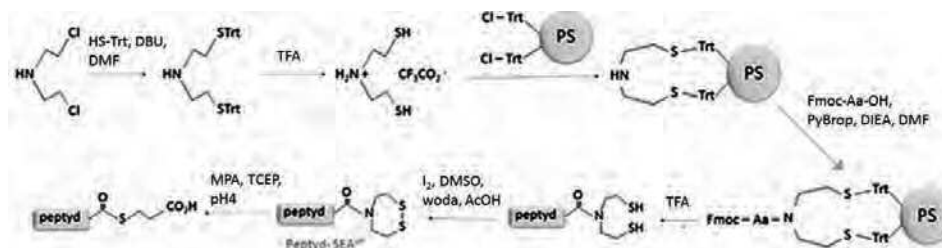
#### 4.4. SYNTEZA Z ZASTOSOWANIEM LINKERA SEA (SEA - GRUPA BIS(2-SULFANYLOETYLO)AMINOWA)

Grupa bis(2-sulfanyloetylo)aminowa może występować w formie zredukowanej (SEAon) oraz utlenionej (SEAoff) (Rys. 6). Grupa SEAon posiada dwa ugrupowania tiolowe. W wodnym środowisku łatwo przekształca się w nietrwały tioester poprzez przeniesienie acylu. Taki tioester może być poddany reakcji z egzogennym tiolem, w wyniku czego jesteśmy w stanie otrzymać tioester na C-końcowej grupie karboksylowej peptydu.



Rysunek 6. Schemat grupy SEA w formie zredukowanej (SEAon) oraz utlenionej (SEAoff)  
Figure 6. Scheme of reduced (SEAon) and oxidized (SEAoff) SEA group

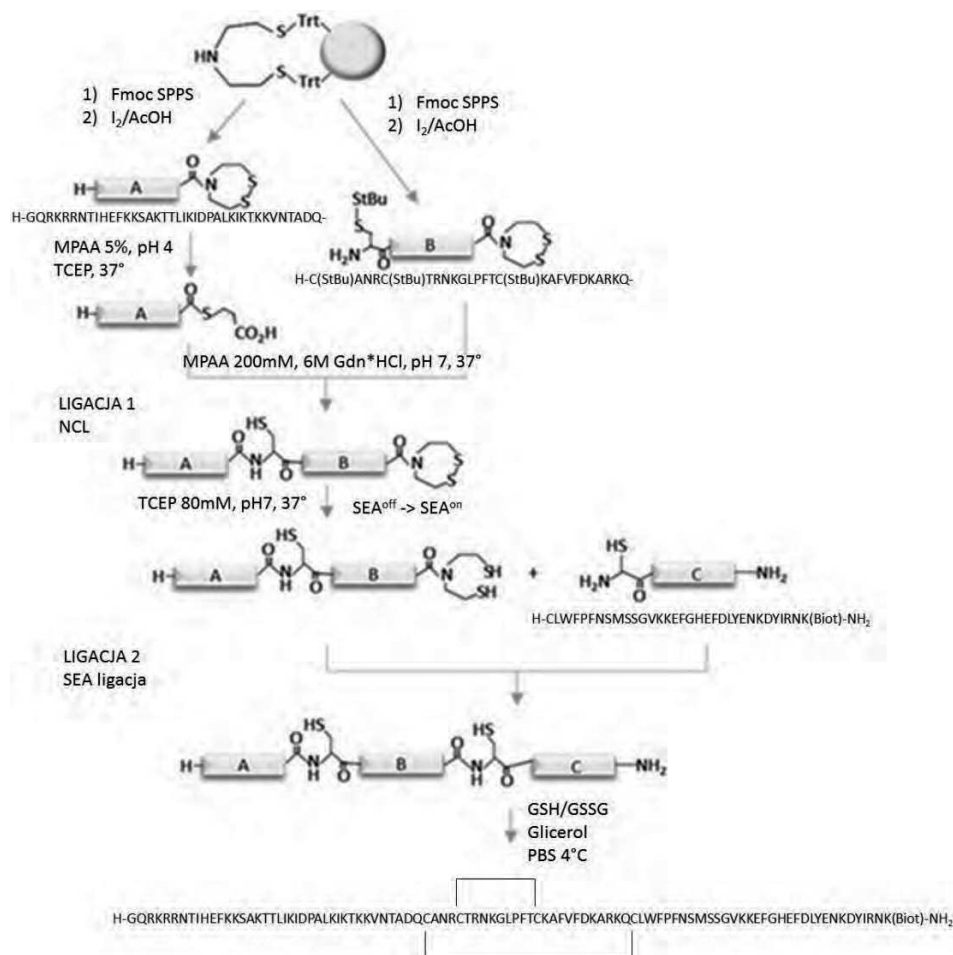
Synteza peptydu z grupą SEA na C-końcu rozpoczyna się od otrzymania stosownego linkera. Linker taki wytwarza się w reakcji chlorowodoru bis(2-chloroetylo)aminy z trifenylometanotiolem w obecności 1,8-diazabicykloundek-7-enu (DBU), a otrzymany produkt poddaje się deprotekcji pod wpływem TFA, po czym natychmiast nanosi na żywicę 2-chlorotrytylową.



Rysunek 7. Schemat syntezy tioestru z zastosowaniem grupy SEA  
Figure 7. Scheme of thioester synthesis using SEA group

Na tak przygotowanej żywicy z przyłączonym linkerem można osadzić pierwszy Fmoc-chroniony aminokwas. Kolejnym etapem jest elongacja łańcucha peptydowego. Po zakończonej syntezie peptyd jest odszczepiany od nośnika, w wyniku czego uzyskuje się SEA-peptyd, który po przekształceniu w tioester alkiowy może posłużyć za substrat do reakcji NCL (Rys. 7) [16].

Za pomocą SEA-ligacji otrzymano, między innymi, *N*-terminalną domenę ludzkiego czynnika wzrostu hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth Factor*, HGF) zbudowaną z 97 reszt aminokwasowych (Rys. 8) [17].



Rysunek 8. Schemat syntezy *N*-terminalnej domeny ludzkiego HGF  
Figure 8. Scheme of *N*-terminal domain of human HGF synthesis

#### 4.5. SYNTEZA Z WYKORZYSTANIEM ARYLOWEGO LINKERA HYDRAZYNOWEGO

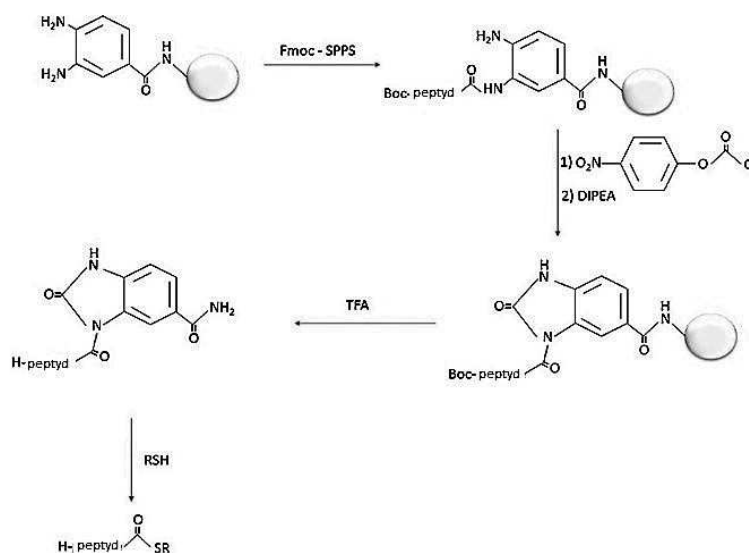
Synteza z zastosowaniem linkera arylo-hydrazynowego przebiega na żywicy fenylohydrazynowej przy użyciu standardowej strategii Fmoc. Po zakończonej syntezie następuje utlenienie chronionej żywicy za pomocą *N*-bromosukcynimidu (NBS) w obecności pirydyny w dichlorometanie (DCM). Kolejno, reaktywny acylowy związek azowy zostaje odszczepiony od nośnika

za pomocą alkilowego tioestru aminokwasu. Na skutek tej operacji powstaje chroniony  $\alpha$ -tioester peptydu, który poddawany jest reakcji z kwasem trifluoroocetowym w celu usunięcia grup ochronnych (Rys. 9) [18].

Linker arylowo-hydrazynowy jest również z powodzeniem używany w syntezie peptydów cyklicznych [19].

#### 4.6. SYNTEZA Z UŻYCIEM LINKERA DBZ (LINKER DAWSONA)

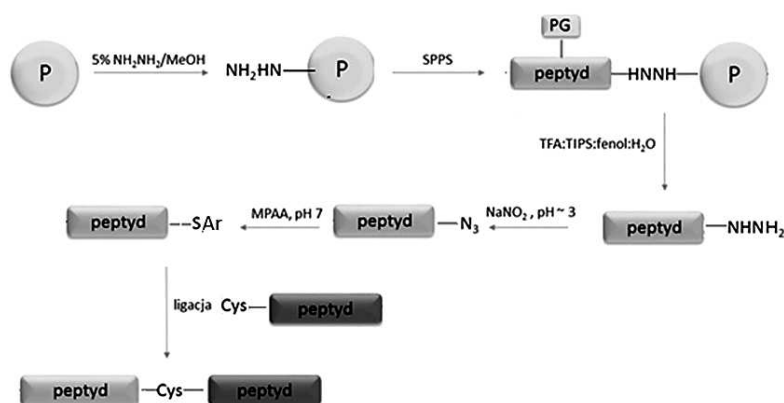
W pierwszym etapie kwas 3,4-diaminobenzoesowy przyłączany jest do żywicy. W tym celu przeprowadza się reakcję grupy karboksylowej Dbz z grupą aminową żywicy. Następnie na jednej z grup aminowych linkera prowadzona jest synteza łańcucha peptydowego przy zastosowaniu standardowej strategii Fmoc. Po przyłączeniu wszystkich aminokwasów następuje aktywacja linkera poprzez przekształcenie go do grupy zwanej Nbz (ang. *N*-acylobenzimidazol, Nbz) przy pomocy chloromówczanu *p*-nitrofenylny. W końcowym etapie peptyd odłączany jest od żywicy wraz z Nbz i może być przekształcony w *C*-końcowy tioester gotowy do reakcji chemicznej ligacji (Rys. 10) [20, 21]. Przy użyciu linkera Dawsona udało się między innymi otrzymać fragment H3M histonu H3 składającego się z 135 reszt aminokwasowych. Jest to tioestrowa pochodna 44-aminokwasowego fragmentu, zawierająca reszty 47–90 histonu, z wprowadzoną grupą acetylową na reszcie lizyny w pozycji 56. Fragment ten wykorzystano następnie w reakcji natywnej chemicznej ligacji, w celu utworzenia całej sekwencji wspomnianego białka [22].



Rysunek 10. Synteza tioestru peptydu przy użyciu linkera Dawsona  
Figure 10. Synthesis of peptide thioester using Dawson linker

## 4.7. SYNTEZA Z UŻYCIEM LINKERA HYDRAZYNOWEGO

Rolę związku, który można selektywnie przekształcić w tioester może pełnić również sama hydrazyna osadzona na nośniku stałym [23]. Procedura taka polega na początkowej hydrazynolizie żywicy 2-chlorotritylowej, w wyniku czego powstaje stosowny linker. Na tak przygotowanym polimerze syntezuje się peptyd zaczynając od C-końca, przy zastosowaniu strategii Fmoc i odczynników sprzęgających takich jak HATU czy HBTU. Po zakończonej syntezie i odszczepieniu peptydu od nośnika otrzymany peptydylohydrazyd utlenia się do azydku przy użyciu azotanu (III) sodu w pH 3. Kolejno azydek poddawany jest reakcji z egzogennym tiolem (najczęściej MPAA), co w rezultacie prowadzi do otrzymania tioestru, który może być wykorzystany w reakcji chemicznej ligacji (Rys. 11) [24].



Rysunek 11. Schemat syntezy tioestru peptydu przy użyciu hydrazyny w charakterze linkera  
Figure 11. Scheme of peptide thioester synthesis using hydrazine linker

Strategia opisana powyżej została między innymi wykorzystana podczas syntezy histonu H2A połączonej z metylowaniem glutaminy [24] oraz białka prionowego pochodzącego od myszy [25].

## 4.8. SYNTEZA ŁĄCZONA

Przy zastosowaniu linkerów hydrazynowego oraz Dbz udało się ułożyć strategię do otrzymania wielu interesujących białek, jak np. białka alergennego Pru p3 o pochodzeniu roślinnym. W celu uzyskania pełnej sekwencji białka, którego nie sposób otrzymać wykorzystując techniki rekombinacji DNA, podjęto się syntezy polegającej na połączeniu pięciu segmentów peptydowych przy użyciu ligacji chemicznej w połączeniu z desulfuryzacją i posłużeniu się dwoma wcześniej wspomnianymi linkerami (Rys. 12) [26].

Naukowcy podjęli się również otrzymania obiecującego dla celów antynowotworowych białka Grb2 (ang. *Growth factor receptor bound protein 2*), które otrzy-

mali zarówno przy użyciu linkera Dawsona – w jednej reakcji NCL (łączyć dwa fragmenty peptydowe), a także stosując sekwencyjną reakcję natywnej chemicznej ligacji w kierunku od *N*- do *C*-końca łącząc 3 fragmenty przy wykorzystaniu linkera hydrazynowego. Obie techniki pozwoliły na otrzymanie wyżej wspomnianego białka jednakże ligacja sekwencyjna pozwoliła otrzymać je z lepszą wydajnością [27].

## PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich lat, poprzez zaplanowaną syntezę zbieżną nieosłoniętych fragmentów peptydowych, reakcje chemicznej ligacji umożliwiły efektywną syntezę wielu natywnych białek, w tym białek modyfikowanych post-translacyjnie. W tym rozdziale podsumowane zostało znaczenie natywnej chemicznej ligacji w szeroko pojętej syntezie protein ze szczególnym naciskiem na metody tworzenia tioestrów peptydowych, które stanowią jeden z substratów niezbędnych do przeprowadzenia NCL. Omówione metody dotyczą przede wszystkim metodologii Fmoc, która w przeciwieństwie do chemii Boc umożliwia przeprowadzenie syntez w łagodniejszych warunkach i wyeliminowana zostaje konieczność użycia niebezpiecznego ciekłego fluorowodoru. Ze względu na swoją wysoką chemoselektywność, NCL okazała się być wygodną metodą w otrzymywaniu peptydów zbudowanych z ponad stu reszt aminokwasowych. Zastosowanie nowoczesnych żywic bądź linkerów (takich jak linker hydrazynowy czy linker Dawsona) pozwoliło na syntezę szeregu białek i enzymów, co daje nadzieję na stosowanie tej techniki w przyszłości do tworzenia jeszcze bardziej złożonych struktur.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L.R. Malins, R.J. Payne, *Top. Curr. Chem.*, 2014, **362**, 27.
- [2] W. Kamysz, D. Grzywacz, *Laborant*, 2014, **9**, 12.
- [3] S. Doonan, *Białka i peptydy*, PWN, Warszawa 2008.
- [4] R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 2149.
- [5] W. Kamysz, *Laborant*, 2011, **2**, 38.
- [6] S.B. Kent, P.E. Dawson, I. Clark-Lewis, T.W. Muir, *Science*, 1994, **266**, 776.
- [7] S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth, *Molecules*, 2013, **18**, 4373.
- [8] P.E. Dawson, M.J. Churchill, M. Reza Ghadiri, S.B. Kent, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 4325.
- [9] E.C. Johnson, S.B. Kent, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 6640.
- [10] S. Futaki, K. Sogawa, J. Maruyama, T. Asahara, M. Niwa, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 6237.
- [11] K. Kitagawa, H. Adachi, Y. Sekigawa, T. Yagami, S. Futaki, Y.J. Gu, K. Inoue, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 907.
- [12] C.P. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2008, **47**, 10030.
- [13] H.P. Hemantha, N. Narendra, V.V. Sureshbabu, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 9491.
- [14] K.J. Jensen, J. Alsina, M.F. Songster, F. Vágner, F. Albericio, A. Barany, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 5441.

- [15] J. Tulla Puche, G. Barany, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 4101.
- [16] N. Ollivier, J. Dheur, R. Mhidia, A. Blanpain, O. Melnyk, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 5238.
- [17] L. Raibaut, J. Vicogne, B. Leclercq, H. Drobecq, R. Desmet, O. Melnyk, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, 3486.
- [18] Y.H. Woo, A.R. Mitchell, J.A. Camarero, *Int. J. Pept. Res. Therap.*, 2007, **13**, 181.
- [19] C. Rosenbaum, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 5677.
- [20] J.B. Blanco-Canosa, P.E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 1.
- [21] S.K. Mahto, C.J. Howard, J.C. Shimko, J.J. Ottesen, *ChemBioChem*, 2011, **12**, 2488.
- [22] J.C. Shimko, A.J. North, A.N. Bruns, M.G. Poirier, J.J. Ottesen, *J. Mol. Biol.*, 2011, **408**, 187.
- [23] J. Zheng, S. Tang, Y. Qi, Z. Wang, L. Liu, *Nat. Protoc.*, 2013, **8**, 2483.
- [24] Q. He, J. Li, Y. Qi, Z. Wang, Y. Huang, L. Liu, *Sci. China Chem.*, 2017, **60**, 621.
- [25] L. Shi, H. Chen, S. Zhang, T. Chu, Y. Zhao, Y. Chen, Y. Li, *J. Pept. Sci.*, 2017, **23**, 438.
- [26] S. Buhler, J.H. Akkerdaas, T.A. Pertinhez, R. Van Ree, A. Dossena, S. Sforzaa, T. Tedeschi, *J. Pept. Sci.*, 2017, **23**, 282.
- [27] T. Noguchi, H. Ishiba, K. Honda, Y. Kondoh, H. Osada, H. Ohno, N. Fujii, S. Oishi, *Bioconjugate Chem.*, 2017, **28**, 609.

Praca wpłynęła do Redakcji 29 września 2017