

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

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

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

*Katedra Chemii Biomedycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański  
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk  
\*e-mail: magdalena.kropidlowska@phdstud.ug.edu.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Natywna chemiczna ligacja (NCL)
  - 1.1. Mechanizm oraz warunki reakcji NCL
  - 1.2. Zalety i ograniczenia reakcji NCL
2. Kinetycznie kontrolowana ligacja (KCL)
3. NCL peptydów niezawierających w sekwencji reszty cysteiny
  - 3.1. NCL z wykorzystaniem selenocysteiny
  - 3.2. NCL z wykorzystaniem reszty histydyny
  - 3.3. Chemiczna modyfikacja produktów NCL
    - 3.3.1. Alkilowanie i tioalkilowanie
    - 3.3.2. Katalityczna desulfuryzacja reszt cysteiny
    - 3.3.3. Alkilowanie homocysteiny
  - 3.4. Zastosowanie grup pomocniczych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**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.

**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.

**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 biological macromolecules affecting very important functions in the body. They are involved in many biochemical processes. They can perform catalytic functions acting as enzymes. They also participate in the transport of many small molecules and ions – for example one molecule of hemoglobin carries four molecules of oxygen. In addition, proteins serve as antibodies and are involved in transmission of nerve impulses as receptor proteins. Because peptides and proteins perform so important functions, to study them it is essential to obtain these compounds in the greatest possible amounts. The compounds can be obtained generally by three main methods:

- by isolation of the native peptides and proteins
- by expression in microorganisms
- by chemical synthesis.

Each of the above methods has its advantages and disadvantages, but only the chemical synthesis gives the possibility to introduce modifications to the structure of the resulting protein, such as the insertion of new functional groups, to give the product in the final form and with satisfactory yield.

In this review we present the application of chemical ligation methods in the synthesis of peptides and proteins. We describe in details mechanism of native chemical ligation method and the conditions necessary to carry the reaction [1]. The synthesis of long polypeptide chains by kinetically controlled ligation (KCL) is also depicted [2]. This part of the paper also details a number of approaches to non-cysteine containing peptides by chemical ligation methods.

**Keywords:** Native chemical ligation, NCL, Kinetically controlled ligation, KCL, peptide synthesis

**Słowa kluczowe:** Natywna chemiczna ligacja, NCL, Kinetycznie kontrolowana ligacja, KCL, synteza peptydów

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SYMBOLI I OZNACZEŃ

Boc	– grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
C-peptyd	– fragment peptydowy, na którego <i>N</i> -końcu znajduje się reszta cysteiny
Fmoc	– grupa fluorenylo-9-metoksykarbonylowa
KCL	– kinetycznie kontrolowana ligacja (ang. <i>Kinetically Controlled Ligation</i> )
MESNA	– 2-merkaptoetanosulfonian sodu
Mpa	– kwas 3-merkaptopropionowy
MPAA	– kwas 4-merkaptofenylooctowy
NCL	– natywna chemiczna ligacja (ang. <i>Native Chemical Ligation</i> )
<i>N</i> -peptyd	– fragment peptydowy, na którego <i>C</i> -końcu znajduje się ugrupowanie tioestrowe
SAr	– tioester arylowy
SDS	– dodecylosiarczan sodu
SR	– tioester alkilowy
TCEP	– tris(2-karboksyetylo)fosfina
TFA	– kwas trifluorooctowy
Thz	– tiazolidyna
TMSBr	– bromotrimetylosilan
Xaa	– reszta aminokwasu

## WPROWADZENIE

Białka to makromolekuły biologiczne spełniające bardzo ważne funkcje w organizmie. Biorą udział w wielu procesach biochemicznych. Struktury te mogą pełnić funkcje katalityczne, działając jako enzymy. Uczestniczą też w transporcie wielu małych cząsteczek i jonów – przykładowo jedna cząsteczka hemoglobiny przenosi cztery cząsteczki tlenu. Ponadto białka służą jako przeciwciała oraz biorą udział w przekazywaniu impulsów nerwowych jako białka receptorowe. W związku z tym, że peptydy i białka pełnią tak ważne funkcje, aby móc te funkcje badać istotna staje się możliwość pozyskiwania tych związków w jak największej ilości. Białka pozyskuje się generalnie za pomocą trzech głównych metod:

- wykorzystując izolację natywnych peptydów i białek,
- za pomocą ekspresji w mikroorganizmach,
- poprzez chemiczną syntezę.

Każda z powyższych metod ma swoje zalety i wady, ale jedynie chemiczna synteza daje możliwość wprowadzenia modyfikacji w budowę otrzymywanego białka, takiej jak na przykład wprowadzenie nienaturalnych grup funkcyjnych, co prowadzi do otrzymania produktu w ostatecznej formie i z zadowalającą wydajnością.

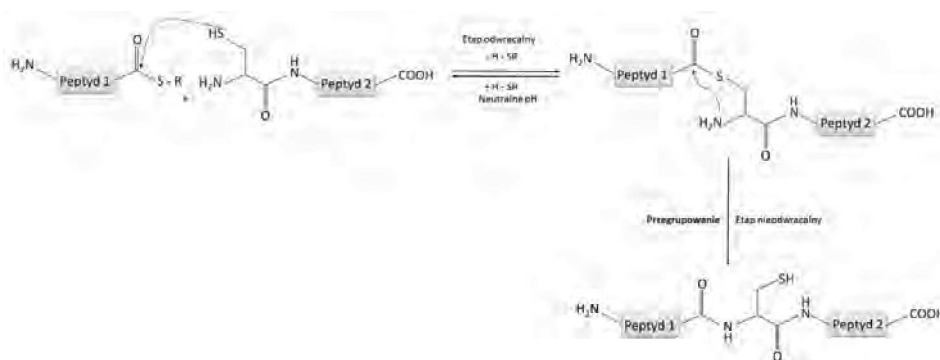
Powszechnie stosowaną techniką syntezy fragmentów peptydowych jest opracowana przez Bruce'a Merrifielda w drugiej połowie XX w. metoda syntezy na nośniku stałym [3]. Otrzymane w ten sposób, liniowe fragmenty peptydowe składające się z 30–40 reszt aminokwasów, można połączyć w większe cząsteczki za pomocą sprzęgania. Podczas łączenia dwóch fragmentów peptydowych z osłoniętymi grupami funkcyjnymi, tworzy się selektywnie wiązanie peptydowe, a w następnej kolejności usuwane są grupy ochronne. Ze względu na możliwość wystąpienia epimeryzacji oraz agregacji dużych odcinków peptydowych oraz częste problemy z ich rozpuszczalnością, strategia ta jest znacznie ograniczona [4]. Dlatego też aby otrzymać większe fragmenty peptydowe coraz częściej stosuje się chemoselektywne reakcje ligacji nieosłoniętych fragmentów peptydowych takie jak natywna chemiczna ligacja (NCL) czy kinetycznie kontrolowana ligacja (KCL).

### 1. NATYWNA CHEMICZNA LIGACJA

Natywna chemiczna ligacja została opisana po raz pierwszy przez Kenta i Dawsona w 1994 roku [5]. Jest to chemoselektywna reakcja kondensacji dwóch niechronionych fragmentów peptydowych, które można otrzymać za pomocą syntezy na nośniku stałym stosując strategię Boc lub Fmoc. Fragmenty biorące udział w reakcji zostały tak zaprojektowane, by reagowały ze sobą tylko poszczególne grupy funkcyjne – tzn. tioester znajdujący się na C-końcu jednego peptydu (*N*-peptyd) z grupą tiolową cysteiny znajdującej się na *N*-końcu drugiego peptydu (*C*-peptyd). Głównym produktem reakcji jest białko lub peptyd z natywnym wiązaniem amidowym w miejscu ligacji.

## 1.1. MECHANIZM ORAZ WARUNKI REAKCJI NCL

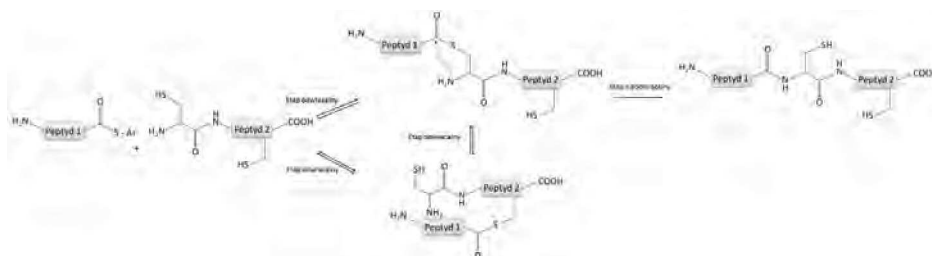
Natywna chemiczna ligacja jest techniką chemoselektywnego łączenia fragmentów peptydowych, opierającą się na procesie przegrupowania. Mechanizm reakcji jest dwuetapowy (Schemat 1). W pierwszym etapie następuje atak nukleofilowej grupy tiolowej reszty cysteiny znajdującej się na *N*-końcu jednego fragmentu peptydowego na elektrofilowy atom węgla grupy tioestrowej znajdującej się na *C*-końcu drugiego fragmentu peptydowego. Ten etap reakcji to odwracalna transtioestryfikacja, w wyniku której powstaje produkt pośredni związany wiązaniem tioestrowym, zawierający wolną grupę aminową. Zachodzi ona w obecności egzogenego tiolowego katalizatora, zwiększającego wydajność reakcji. W kolejnym etapie następuje wewnątrzcząsteczkowy atak nukleofilowy wolnej pary elektronowej atomu azotu z grupy aminowej na karbonylowy atom węgla tioestru i spontaniczne, nieodwracalne przegrupowanie, zachodzące poprzez pięcioczłonowy stan przejściowy, skutkujące przeniesieniem acylu  $S \rightarrow N$ . Prowadzi to do powstania produktu ostatecznego połączonego natywnym wiązaniem peptydowym, a w odpowiednio dobranych warunkach otrzymane białko bądź polipeptyd może uzyskać strukturę trzeciorzędową dzięki pofałdowaniu. Ponadto produkt otrzymywany jest w ostatecznej formie i nie ma konieczności dalszych modyfikacji. Zaletą reakcji jest brak racemizacji reszty aminokwasowej znajdującej się przy tioestrze *N*-peptydu [6].



Schemat 1. Mechanizm reakcji natywnej chemicznej ligacji  
 Scheme 1. Mechanism of native chemical ligation reaction

Odwracalność pierwszego etapu gwarantuje, że produkt powstanie z dużą wydajnością, nawet jeśli w łańcuchu któregoś z peptydów znajdowały się dodatkowe reszty cysteiny. Świadczy to o regioselektywności reakcji. Występowanie dodatkowych reszt cysteiny wewnątrz reagujących fragmentów peptydowych nie ma wpływu na wydajność reakcji, ponieważ nie uczestniczą one w reakcji NCL. Nieodwracalne przeniesienie acylu  $S \rightarrow N$  jest możliwe jedynie dla *N*-końcowej reszty cysteiny i zachodzi poprzez pięcioczłonowy stan przejściowy w drugim etapie reakcji ligacji. Każda pozostała reszta cysteiny uczestnicząca w tworzeniu tioestru szybko wraca

do pierwotnego stanu (Schemat 2) dzięki obecności nadmiaru tiolowego katalizatora [7].



Schemat 2. Równowaga pomiędzy tioestrami peptydów  
Scheme 2. Equilibrium between peptide thioesters

## 1.2. ZALETY I OGRANICZENIA REAKCJI NCL

Główną zaletą natywnej chemicznej ligacji są łagodne warunki reakcji, która zachodzi w buforze wodnym o obojętnym pH (6,8–7,0) zawierającym 6M wodny roztwór chlorowodoru guanidyny. Neutralne środowisko jest istotne z dwóch powodów:

- kwasowe warunki nie sprzyjają zachodzeniu reakcji NCL, gdyż spada reaktywność grupy tiolowej oraz grupy aminowej cysteiny znajdującej się na *N*-końcu *C*-peptydu,
- w warunkach zasadowych tioestry są niestabilne, gdyż ulegają utlenieniu, poza tym w silnie zasadowych warunkach reszta lizyny staje się podatna na reakcję z tioestrem.

Dzięki zastosowaniu łagodnych warunków, NCL rozwiązuje problemy z racemizacją i rozpuszczalnością występujące w klasycznej syntezie peptydów z wykorzystaniem fragmentów osłoniętych. Metoda ta umożliwia tworzenie dużych łańcuchów peptydowych, gdyż nie ma naturalnych barier dla wydajnego sprzęgania długich fragmentów peptydowych.

Natywna chemiczna ligacja jest reakcją chemoselektywną, ponieważ w jej wyniku nie tworzą się produkty uboczne, będące wynikiem reakcji z niezabezpieczonymi grupami funkcyjnymi aminokwasów obecnych w łańcuchach reagujących fragmentów peptydowych.

Czynnikiem ograniczającym reakcję NCL jest to, że zachodzi wyłącznie w peptydach zawierających na *N*-końcu resztę cysteiny, czyli jeden z aminokwasów rzadko występujących w białkach. Jeśli w odpowiednim miejscu w białku nie występuje cysteina ograniczenie to można jednak przewyciężyć, między innymi wprowadzając ten aminokwas w miejscu zachodzenia ligacji. Skłonność cysteiny do tworzenia wiązań disulfidowych sprawia jednak, że wprowadzenie dodatkowych grup tiolowych do sekwencji może wpłynąć niekorzystnie na strukturę bądź funkcje

tworzonego białka. Może to uniemożliwić jego właściwe pofałdowanie, bądź zakłócić funkcjonowanie białka już pofałdowanego [8].

W przypadku gdy któryś z reagujących fragmentów peptydowych nie jest rozpuszczalny w standardowych warunkach reakcji, można dodać odczynnika denaturującego (chlorowoderek guanidyny, mocznik) lub detergentów takich jak dodecylsulfian sodu (SDS) [9].

Bardzo ważnym czynnikiem w reakcji NCL jest budowa tioestru, który musi wykazywać dość wysoką reaktywność. Tioestry aryłowe są bardziej reaktywne, ale mniej stabilne od alkilowych, a co za tym idzie trudniejsze do otrzymania. Przez to powszechnie syntezuje się tioestry peptydowe jako pochodną alkilową m.in. 4-merkaptoetanosulfonianu sodu (MESNA) i dopiero w następnej kolejności przekształca je za pomocą reakcji transtioestryfikacji w tioestry aryłowe dodając pochodne tiofenoli np. rozpuszczalnego w wodzie kwasu 4-merkaptofenylooctowego (MPAA) [10] (Schemat 3).



Schemat 3. Reakcja wymiany tioestru alkilowego na tioester aryłowy  
Scheme 3. Exchange reaction of alkyl to aryl thioester

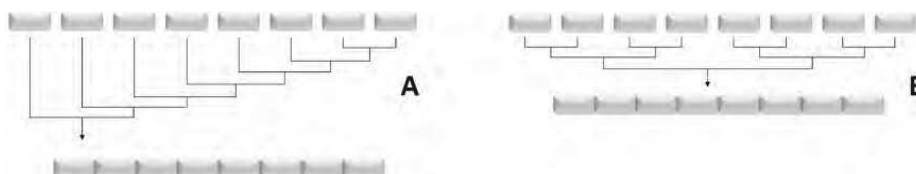
MPAA charakteryzuje się uniwersalnością i efektywnością, gdyż peptydy i białka otrzymane przy jego pomocy uzyskuje się z wysoką wydajnością. Dodatkowo katalizator ten rozpuszcza się w wodzie, a jego zapach nie jest drażniący, czego można by się spodziewać po związku siarki. Tioestry alkilowe bardzo szybko i niemal całkowicie podlegają reakcji transtioestryfikacji pod wpływem MPAA, jest on też idealną grupą odchodzącą w reakcji NCL.

Na szybkość reakcji NCL ma również wpływ charakter C-końcowej reszty aminokwasowej tioestru. Badania przeprowadzone przez Dawsona ze współpracownikami wykazały, że wszystkie 20 naturalnych aminokwasów ulega natywnej chemicznej ligacji [11], jednak reakcja będzie najszybsza i najwydajniejsza w przypadku gdy zastosuje się najmniej rozbudowany aminokwas poprzedzający C-końcową grupę tioestrową, taki jak glicyna lub alanina. Peptydy zawierające takie mało rozgałęzione aminokwasy reagują ilościowo w mniej niż 4 godziny, natomiast tioestry, które są poprzedzone  $\beta$ -rozgałęzionymi aminokwasami, jak izoleucyna i walina lub proliną nie dają ilościowej przemiany nawet po 48 godzinach. W celu zwiększenia efektywności reakcji podczas syntezy z użyciem zatłoczonych sterycznie tioestrów wymagane jest zastosowanie bardziej reaktywnych tioli jako katalizatorów [10].



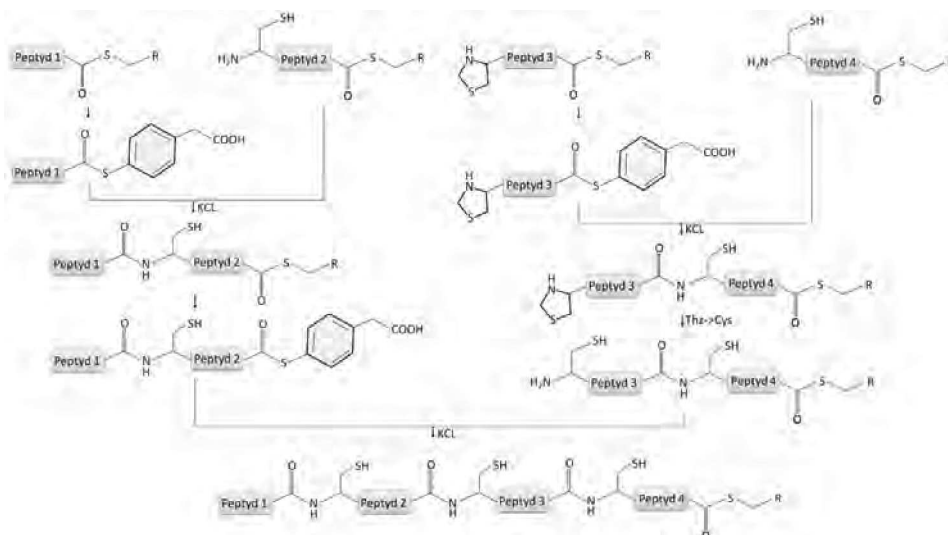
## 2. KINETYCZNIE KONTROLOWANA LIGACJA

Synteza długich łańcuchów polipeptydowych oraz białek metodą chemicznej ligacji często wymaga połączenia trzech, a nawet więcej niechronionych fragmentów peptydowych. Najlepszym rozwiązaniem byłaby synteza zbieżna, w której reakcje będą przebiegały równolegle, dzięki czemu osiąga się większe wydajności niż w przypadku ligacji sekwencyjnej, jednakże peptydy nieposiadające osłon mogłyby reagować chaotycznie, tworząc nieodpowiednie produkty (Schemat 4).



Schemat 4. Porównanie dwóch strategii syntezy chemicznej: a – sekwencyjnej ligacji, b – ligacji zbieżnej  
Scheme 4. Comparison of two chemical synthesis strategies: a – sequential ligation, b – convergent ligation

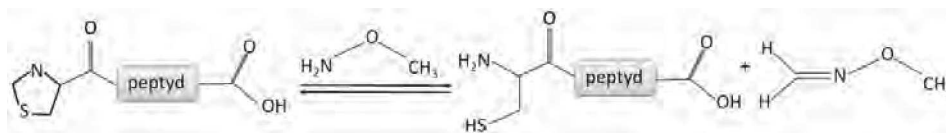
Związanie kilku nieposiadających żadnych osłon fragmentów peptydowych, w odpowiedniej kolejności, jest możliwe dzięki kinetycznie kontrolowanej ligacji (KCL) (Schemat 5). W reakcji tej wykorzystywane są różnice w reaktywności tioestrów alkilowych i arylowych w reakcji chemicznej ligacji. Poprzez wprowadzenie bardziej reaktywnego tioestru arylowego do fragmentu peptydowego mającego ulec w pierwszej kolejności ligacji, można uporządkować kolejność zachodzących reakcji [2, 12].



Schemat 5. Reakcja kinetycznie kontrolowanej ligacji (KCL)  
Scheme 5. The reaction of kinetically controlled ligation (KCL)

Głównym problemem jest ewentualna reaktywność wewnętrznych fragmentów polipeptydu, które zawierają nie tylko resztę cysteiny na *N*-końcu, ale i na *C*-końcu ugrupowanie tioesterowe.

Reakcja KCL może zachodzić zarówno w kierunku od *C*- do *N*-końca, jak i od *N*- do *C*-końca, natomiast reakcja NCL jedynie od *N*- do *C*-końca. Gdy reakcja KCL zachodzi od *C*-końca do *N*-końca można zablokować tymczasowo resztę cysteiny wewnętrznych fragmentów za pomocą ugrupowania tiazolidynowego (Thz). Po przeprowadzeniu reakcji z użyciem tioestru, pierścień Thz można otworzyć używając chlorowodoru metoksyaminy w środowisku kwaśnym co prowadzi do odtworzenia reszty cysteiny (Schemat 6) [13]. Łagodne utlenianie w końcowym etapie reakcji, po utworzeniu całego łańcucha polipeptydowego, powoduje utworzenie mostków disulfidowych, a białko ulega pofałdowaniu [6, 14].

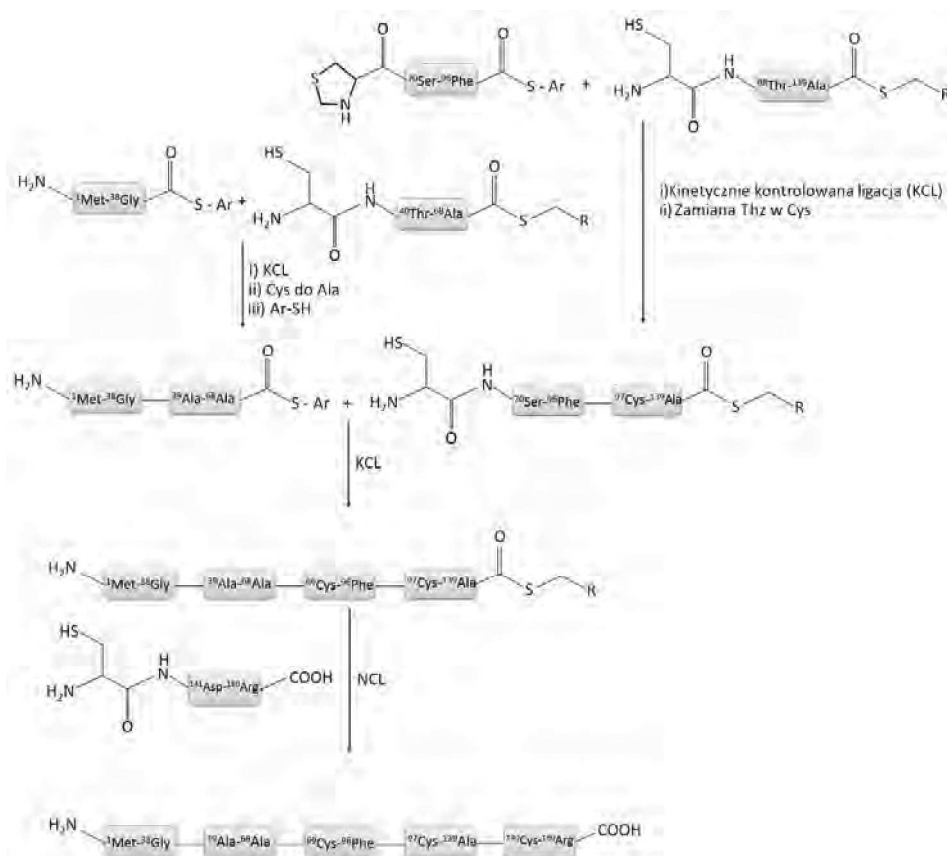


Schemat 6. Reakcja otwierania pierścienia tiazolidyny (Thz)  
Scheme 6. Thiazolidine (Thz) ring opening reaction

Przykładem enzymu otrzymanego za pomocą KCL i NCL jest 203-aminokwasowy homodimer proteazy HIV-1. Zsyntezowane z czterech fragmentów peptydowych białko wykazywało pełną aktywność enzymatyczną [15].

Na drodze KCL i NCL otrzymano również wykazujący pełną aktywność katalityczną ludzki lizozym. Jest to enzym zbudowany ze 130 reszt aminokwasowych, w tym ośmiu reszt cysteiny. Jego syntezę przeprowadzono łącząc cztery fragmenty peptydowe [14].

Poprzez połączenie pięciu fragmentów peptydowych natomiast przeprowadzono syntezę białka nowotworowego NY-ESO-1 zbudowanego ze 180 reszt aminokwasowych. W syntezie przeprowadzono desulfuryzację wprowadzonych trzech nienatywnych reszt cysteiny, a także przekształcenie utlenionej formy metioniny do natywnej metioniny (Schemat 7) [16].



Schemat 7. Reakcje ligacji prowadzące do otrzymania białka nowotworowego NY-ESO-1 zbudowanego ze 180 reszt aminokwasowych

Scheme 7. The ligation reactions leading to tumor protein NY-ESO-1, composed of 180 amino acid residues

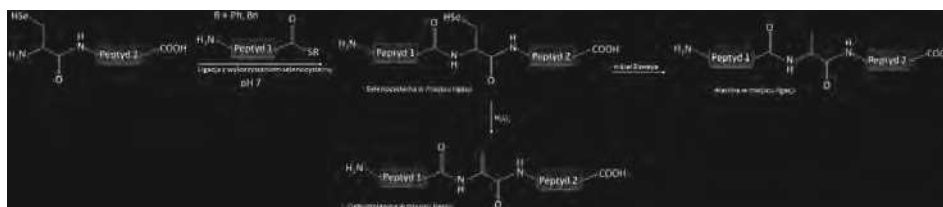
### 3. NCL PEPTYDÓW NIEZAWIERAJĄCYCH W SEKWENCJI RESZTY CYSTEINY

Reakcja NCL jest bardzo przydatną metodą pozwalającą na otrzymanie białek oraz polipeptydów zawierających natywne wiązanie peptydowe. Problem pojawia się, gdy w sekwencji otrzymywanego białka nie występuje reszta cysteiny, która musi być obecna na *N*-końcu *C*-peptydu by reakcja zaszła. Te ograniczenia można przezwyciężyć poprzez zastosowanie specjalnie opracowanej strategii w syntezie metodą NCL, gdzie resztę cysteiny wprowadza się na miejsce innej reszty aminokwasowej, a po zakończeniu reakcji ligacji tak modyfikuje łańcuch boczny by otrzymać oczekiwaną sekwencję. Kolejną metodą jest przeprowadzenie reakcji NCL z wykorzystaniem innego aminokwasu na *N*-końcu *C*-peptydu niż cysteina, a następnie

modyfikacja powstałego łańcucha bocznego lub zastosowanie grupy pomocniczej zawierającej w swojej budowie grupę tiolową [9].

### 3.1. NCL Z WYKORZYSTANIEM SELENOCYSTEINY

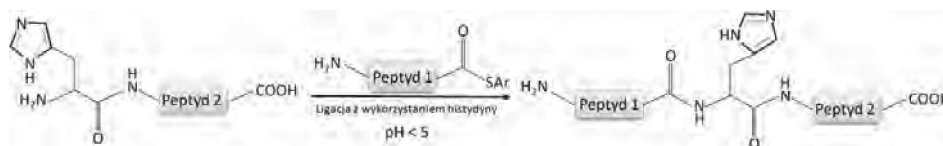
Jedną z metod syntezy białek niezawierających w swojej sekwencji cysteiny jest wprowadzenie w jej miejsce rzadkiego aminokwasu – selenocysteiny (Sec). Reakcja ligacji z grupą selenowodorową zachodzi szybko i z wysoką wydajnością, gdyż nukleofil selenowy jest bardziej kwasowy i nukleofilowy niż grupa tiolowa. Produkty NCL zawierające selenocysteinę można poddać dalszym modyfikacjom. Selenocysteinę można przekształcić w resztę alaniny przy zastosowaniu niklu Raneya, natomiast zastosowanie nadtlenu wodoru podczas oksydacyjnej eliminacji prowadzi do otrzymania dehydroalaniny w miejscu ligacji (Schemat 8) [17].



Schemat 8. Reakcja ligacji z wykorzystaniem Sec na *N*-końcu C-peptydu  
Scheme 8. Ligation reaction with Sec residue at *N*-terminus of C-peptide

### 3.2. NCL Z WYKORZYSTANIEM HISTYDYNY

Następnym przykładem zastosowania aminokwasu innego niż cysteina jest użycie histydyny na *N*-końcu C-peptydu. Ugrupowanie imidazolowe pełni rolę nukleofila, przyspieszającego reakcję przeniesienia acylu na atom azotu grupy aminowej w warunkach kwasowych (Schemat 9) [18].



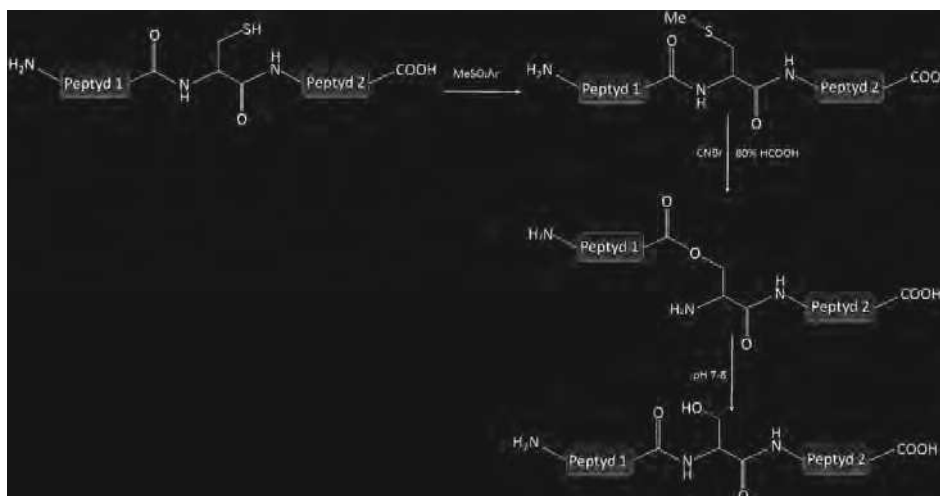
Schemat 9. Reakcja ligacji z wykorzystaniem histydyny na *N*-końcu C-peptydu  
Scheme 9. Reaction of histidine ligation at *N*-terminus of C-peptide

### 3.3. CHEMICZNA MODYFIKACJA PRODUKTÓW NCL

Produkt otrzymany metodą ligacji można w różny sposób zmodyfikować chemicznie. W wyniku tych modyfikacji w miejscu cysteiny otrzymuje się reszty takich aminokwasów jak: alanina, seryna, glutamina, kwas glutaminowy czy lizyna, co prowadzi do otrzymania białka o zupełnie nowych właściwościach.

#### 3.3.1. Alkilowanie i tioalkilowanie

Do modyfikacji reszty cysteiny wykorzystywane są właściwości nukleofilowej grupy tiolowej oraz jej podatność na alkilowanie i tioalkilowanie. Reszta cysteiny obecna w białkach może zostać przekształcona w procesie tioalkilowania metanotiosulfonianem metylu w analog metioniny. Można również otrzymać analog lizyny w reakcji z bromoetyloaminą [19] lub analog seryny w reakcji metylowania cysteiny 4-nitrobenzenosulfonianem metylu, a następnie wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania z bromocyjanem (CNBr) w kwasie mrówkowym, na skutek czego, w lekko zasadowym środowisku, następuje przeniesienie acylu  $O \rightarrow N$  (Schemat 10) [20].



Schemat 10. Reakcja przekształcenia cysteiny w serynę w wyniku metylowania, a następnie wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania z CNBr w kwasie mrówkowym

Scheme 10. The conversion of cysteine to serine residue due to the methylation and intramolecular rearrangement with CNBr in the formic acid

#### 3.3.2. Katalityczna desulfuryzacja reszt cysteiny

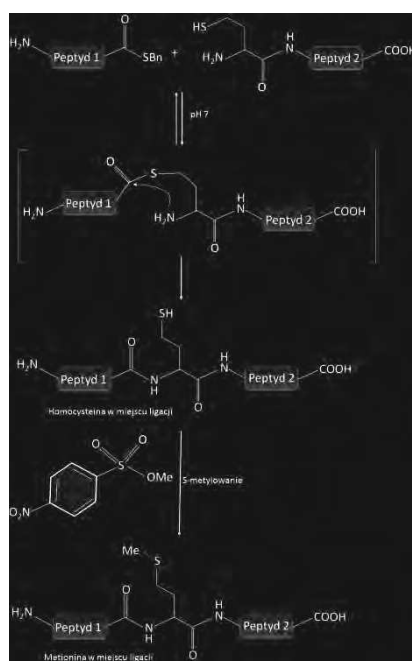
Desulfuryzacja jest jedną z najpowszechniejszych i najprostszych metod modyfikacji produktu ligacji. Polipeptyd zawierający wolną grupę tiolową jest prze-



### 3.3.3. Alkilowanie homocysteiny

Ligacja fragmentów peptydowych może zajść, gdy na *N*-końcu *C*-peptydu znajduje się homocysteina. Reakcja ta zachodzi analogicznie do NCL jednak w tym przypadku tworzy się 6-członowy stan przejściowy, a produkt końcowy połączony natywnym wiązaniem peptydowym w miejscu ligacji posiada homocysteinę (Schemat 12).

Otrzymany produkt z homocysteiną w miejscu ligacji można następnie zmodyfikować np. poddając go reakcji alkilowania *p*-nitrobenzenosulfoniamem metylu co prowadzi do peptydu posiadającego resztę metioniny w miejscu ligacji [6, 25].

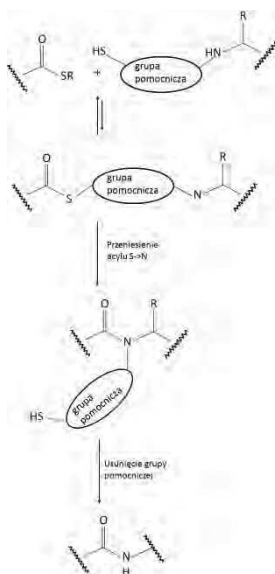


Schemat 12. Ligacja z wykorzystaniem homocysteiny na *N*-końcu *C*-peptydu  
Scheme 12. Ligation using homocysteine at the *N*-terminus of the *C*-peptide

### 3.4. ZASTOSOWANIE GRUP POMOCNICZYCH

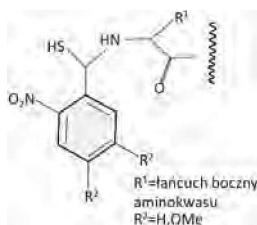
Ligacja peptydów niezawierających reszty cysteiny może zachodzić także w obecności grup pomocniczych zawierających grupę tiolową. Wprowadza się ją w pobliżu *N*-końca *C*-peptydu, a następnie przeprowadza reakcję ligacji. Po powstaniu produktu pośredniego połączonych wiązaniem tioestrowym dochodzi do wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania jak w przypadku reakcji NCL, a następnie z nowo powstałego produktu usuwa się grupy pomocnicze (Schemat 13).

Praktyczne grupy pomocnicze powinny cechować się łatwością wprowadzania do fragmentu poddawanego syntezie, powinny łatwo i szybko ulegać ligacji w denaturującym buforze wodnym oraz łatwo ulegać usunięciu w łagodnych warunkach [6, 26].



Schemat 13. Reakcja ligacji w obecności grup pomocniczych  
Scheme 13. Ligation reaction in the presence of auxiliary groups

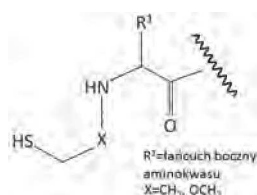
Grupy pomocnicze to związki organiczne wśród których wyróżnić możemy grupy fotolabilne (Schemat 14). Są one związkami  $N^{\alpha}$ -1-arylo-2-merkptoetylowymi i zawierają w swojej budowie *o*-nitrobenzen, pozwalający na efektywne łączenie dwóch fragmentów peptydowych. Produkty ligacji uzyskuje się z wysoką wydajnością, po czym grupę pomocniczą usuwa się za pomocą światła. Głównym ograniczeniem metody jest możliwość otrzymywania peptydów zawierających w miejscu ligacji tylko nierozbudowane sterycznie aminokwasy, takie jak glicyna-alanina i glicyna-glicyna [7, 27].



Schemat 14. Grupa fotolabilna  
Scheme 14. Photocleavable auxiliary group

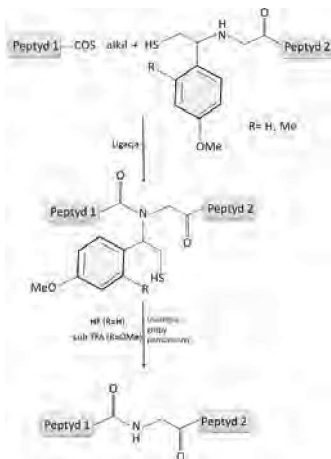


Kolejnym przykładem często wprowadzanych na *N*-koniec *C*-peptydu grup pomocniczych są grupy etanotiolowe i oksyetanotiolowe (Schemat 15.). Po wprowadzeniu grupy do fragmentu peptydowego zostaje przeprowadzona reakcja NCL, po czym wiązanie N-O znajdujące się w grupie oksyetanotiolowej może zostać zredukowane cynkiem w środowisku kwaśnym co prowadzi do otrzymania natywnego wiązania peptydowego w miejscu ligacji [28], natomiast grupa etanotiolowa nie zostaje usunięta z peptydu. Związki te wielokrotnie sprawdziły się w syntezie peptydów trudnych i problematycznych takich jak peptydy cykliczne.



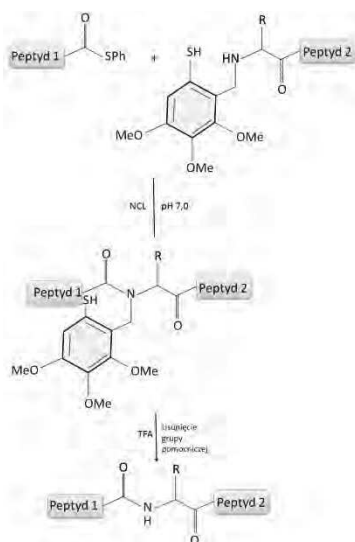
Schemat 15. Grupa etanotiolowa/oksyetanotiolowa  
Scheme 15. Ethanethiol/oxyethanethiol auxiliary group

Do grup pomocniczych zaliczamy również grupy *N*<sup>α</sup>-1-arylo-2-merkaptotetylowe, które pozwalają na łączenie fragmentów ze stosunkowo wysoką wydajnością, gdy w miejscu ligacji znajdują się nierozbudowane sterycznie aminokwasy takie jak alanina lub glicyna. Pozwalają na uzyskanie wysokiej wydajności syntezowanych peptydów, mogą to być zarówno glikopeptydy, jak i peptydy cykliczne. Grupę pomocniczą usuwa się w warunkach silnie kwasowych tj. pod działaniem TFA/TMSBr lub ciekłego fluorowodoru (Schemat 16) [6, 7].



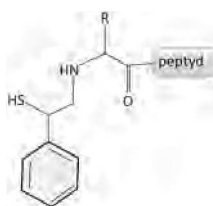
Schemat 16. Reakcja ligacji z zastosowaniem grupy *N*<sup>α</sup>-1-arylo-2-merkaptotetylowej  
Scheme 16. Ligation reaction using *N*<sup>α</sup>-1-aryl-2-mercaptoethyl group

Do grup pomocniczych należą również silnie nukleofilowe związki z grupy 4,5,6-trimetoksy-2-merkaptobenzylaminowych (Tmb) (Schemat 17). Grupa 2-merkaptobenzylowa została tak zaprojektowana, by była labilna w środowisku kwasowym oraz by reakcja ligacji była bardziej efektywna, dzięki tworzącemu się trzeciorzędowemu amidowi [6].



Schemat 17. Ligacja z zastosowaniem grupy 4,5,6-trimetoksy-2-merkaptobenzylaminowej (Tmb)  
Scheme 17. Ligation using 4,5,6-trimethoxy-2-mercaptobenzylamine (Tmb) group

Niedawno zaprojektowano również bardzo funkcjonalną grupę pomocniczą 2-merkapto-2-fenyletylową (Schemat 18), która po dołączeniu drugiego fragmentu peptydowego jest selektywnie usuwana w łagodnie zasadowych warunkach i w obecności TCEP [29].



Schemat 18. Grupa 2-merkapto-2-fenyletylowa  
Scheme 18. 2-mercapto-2-phenethyl auxiliary group

Jako prekursorzy tioestru dla reakcji natywnej chemicznej ligacji zaprojektowano również pochodne amidu peptydowego Weinreb z grupą merkaptoetylową podstawioną do atomu azotu. Udowodniono, że amidy te są doskonałymi elektrofilami, które ulegając wewnątrzcząsteczkowej acylowej substytucji nukleofilowej

tworzą tioestry dla NCL *in situ*. Reakcja ligacji takich tioestrów z peptydem zawierającym resztę cysteiny zachodzi szybko w normalnych warunkach NCL, prowadząc do utworzenia różnych wiązań peptydowych Xaa-Cys, w tym również trudnego do otrzymania innymi metodami wiązania Val-Cys [30].

### PODSUMOWANIE

Synteza peptydów z wykorzystaniem natywnej chemicznej ligacji oraz kinetycznie kontrolowanej ligacji posiada wiele zalet, a wśród nich:

- reakcja chemicznej ligacji pozwala rozwiązać problemy związane z rozpuszczalnością i racemizacją, które występują w klasycznej syntezie w roztworze
- reakcja ta umożliwia efektywne sprzęganie nawet dużych łańcuchów peptydowych
- jest to reakcja wysoce chemoselektywna, gdyż w wyniku jej zajścia nie tworzą się zazwyczaj produkty uboczne
- jest to reakcja regioselektywna, gdyż pierwszy etap reakcji tj. wymiana tiol – tioester jest całkowicie odwracalny w obecności egzogenego tiolu jako katalizatora
- substratami do reakcji są nieosłonięte fragmenty peptydowe, które dość łatwo można otrzymać za pomocą syntezy na nośniku stałym
- zarówno substraty, jak i produkty można z łatwością oczyścić za pomocą wydajnej chromatografii cieczowej na fazach odwróconych (RP-HPLC).

Wymienione zalety sprawiły, że reakcja ligacji cieszy się coraz większą popularnością. Naukowcy z całego świata coraz częściej wybierają metody NCL oraz KCL do syntezy białek oraz poli-peptydów o trudnych sekwencjach, rozgałęzionych, często agregujących i problematycznych, na co wskazują liczne doniesienia literaturowe.

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L. Raibaut, N. Ollivier, O. Melnyk, Chem. Soc. Rev., 2012, **41**, 7001.
- [2] J. Lee, Y. Kwon, B.N. Pentelute, D. Bang, Bioconjugate Chem., 2011, **22**, 1645.
- [3] R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 1963, **85**, 2149.
- [4] J.P. Tam, J. Xu, K.D. Eom, Biopolymers (Peptide Science), 2001, **60**, 194.
- [5] P.E. Dawson, T.W. Muir, I. Clark-Lewis, S.B.H. Kent, Science, 1994, **266**, 776.
- [6] H.P. Hemantha, N. Narendra, V.V. Sureshbabu, Tetrahedron, 2012, **68**, 9491.
- [7] C.P.R. Hackenberger, D. Schwarzer, Angew. Chem. Int. Ed., 2008, **47**, 10030.
- [8] S.B.H. Kent, Chem. Soc. Rev., 2009, **38**, 338.
- [9] F.I. Valiyaveetil, R. MacKinnon, T.W. Muir, J. Am. Chem. Soc., 2002, **124**, 9113.
- [10] E.C.B. Johnson, S.B.H. Kent, J. Am. Chem. Soc., 2006, **128**, 6640.
- [11] T.M. Hackeng, J.H. Griffin, P.E. Dawson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, **96**, 10068.
- [12] D. Bang, B.L. Pentelute, S.B.H. Kent, Angew. Chem. Int. Ed., 2006, **45**, 3985.

- [13] M. Villain, J. Vizzarone, K. Rose, *Chem. Biol.*, 2001, **8**, 673.
- [14] T. Durek, V.Y. Torbeev, S.B.H. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104**, 4846.
- [15] V.Y. Torbeev, S.B.H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, **46**, 1667.
- [16] P.W.R. Harris, M.A. Brimble, *Biopolymers (Peptide Science)*, 2015, **104**, 116.
- [17] F.R. Naider, J.M. Becker, *Biopolymers*, 1997, **43**, 3.
- [18] L. Zhang, J.P. Tam, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 3.
- [19] R. Yang, L. Qi, Y. Liu, Y. Ding, M.S.Y. Kwek, C.-F. Liu, *Tetrahedron Lett.*, 2013, **54**, 3777.
- [20] D. Macmillan, L. Arham, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 9530.
- [21] L.Z. Yan, P.E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 526.
- [22] Q. Wan, S.J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2007, **46**, 9248.
- [23] J. Chen, Q. Wan, Y. Yuan, J. Zhu, S.J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2008, **47**, 8521.
- [24] D. Crich, A. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 10064.
- [25] R.L. Heinrikson, *J. Biol. Chem.*, 1971, **246**, 4090.
- [26] D. Macmillan, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 7668.
- [27] T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 6059.
- [28] L.E. Canne, S.J. Bark, S.B.H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 5891.
- [29] S.F. Loibl, Z. Harpaz, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54**, 15055.
- [30] C. Rao, C.-F. Liu, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 2491.

Praca wpłynęła do Redakcji 29 września 2017