

ТВЪРДОФАЗЕН ПЕПТИДЕН СИНТЕЗ (SPPS)

Силвия Михайлова

УС „Помощник-фармацевт“, Медицински колеж,
Медицински университет – Варна,

SOLID-PHASE PEPTIDE SYNTHESIS (SPPS)

Silvia Mihaylova

TRS Assistant Pharmacist, Medical College, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

В човешкия организъм пептидите изпълняват различни функции – биологично активни хормони, невротрансмитери и невромедиатори, растежни фактори, сигнални молекули и антибиотици. Тези разнообразни функции ги правят „интересни“ за фармацевтичния пазар.

През последните години световният пазар на терапевтични пептиди расте почти два пъти по-бързо спрямо пазара на другите лекарства. До момента близо 70 пептидни лекарства са одобрени от Американската агенция за контрол на храните и лекарствата (FDA). Голям брой нови пептидни молекули са в клинична (>150) и напреднали предклинични (>400) фази, което илюстрира спешната нужда от търсене и откриване на нови пептиди за лечение на различни заболявания.

SPPS е метод за синтез на пептиди, при който реакцията на кондензация на отделните аминокиселини (АК) се извършва в течна среда, но полученият продукт е прикрепен към твърд полимерен носител, наречен смола. Предимството на този метод пред синтеза в разтвор е по отношение на скорост и ефективност на работа. Времето, необходимо за синтез на един продукт в разтвор, е около 6-12 месеца, докато при твърдофазен синтез - същият може да се получи за по-малко от 3 седмици.

Краткото време за синтез дава възможност за получаване на голям брой пептидни аналози, което помага да се определят онези промени в молекулите, които водят до по-добре изразени ефекти. SPPS се използва успешно в лекарствения дизайн на нови молекули. Синтезирането на късоверижни пептиди с определени модификации в структурата дава възможност за комбинира-

ABSTRACT

In the human organism, peptides perform various functions - biologically active hormones, neurotransmitters and neuromediators, growth factors, signal molecules and antibiotics. These various features make them „interesting“ for the pharmaceutical market.

In recent years, the world market for therapeutic peptides has grown almost twice as fast as the other medicines market. So far, nearly 70 peptide drugs have been approved by the US Food and Drug Administration (FDA). A large number of novel peptide molecules are in clinical (> 150) and advanced preclinical (>400) phases, which illustrates the urgent need to search for and discover new peptides to treat various diseases.

Solid-phase peptide synthesis (SPPS) is a peptide synthesis method in which the condensation reaction of the individual amino acids (AA) is carried out in a liquid medium but the resulting product is attached to a solid polymeric carrier called a resin. The advantage of this method over solution synthesis is in terms of speed and efficiency. The time required for the synthesis of a solution in solution is about 6-12 months, whereas in solid phase synthesis - this can be achieved in less than 3 weeks.

The short synthesis time allows production of a large number of peptide analogs, which helps to identify those changes in molecules that lead to more pronounced effects. SPPS is successfully used in the drug design of new molecules. The synthesis of short-chain peptides with certain modifications in the structure allows the combination of various pharmacological effects in one ligand to optimize therapeutic regimens.

Keywords: peptides, synthesis, SPPS

не на различни фармакологични ефекти в един лиганд, което да доведе до оптимизиране на терапевтичните схеми.

Ключови думи: пептиди, синтез, SPPS

1. УВОД

В човешкият организъм пептидите изпълняват различни функции - биологично активни хормони, невротрансмитери и невромедиатори, растежни фактори, сигнални молекули и антибиотици. Тези разнообразни функции ги правят „интересни“ за фармацевтичния пазар. (6) Пептидите притежават всички свойства на протеините, но са със значително по-малко молекулно тегло, поради което могат лесно и евтино да се синтезират чрез използване на различни химични стратегии (24). Това осигурява широка перспектива за дизайн на нови аналози или структурни фрагменти на вече известни молекули.

В последните години световният пазар на терапевтични пептиди расте почти два пъти по-бързо, спрямо пазара на другите лекарства. (16) До момента близо 70 пептидни лекарства са одобрени от Американската агенция за контрол на храните и лекарствата (FDA) (25). Голям брой нови пептидни молекули са в клинична (>150) и напреднали предклинични (>400) фази, което илюстрира спешната нужда от търсене и откриване на нови пептиди за лечение на различни заболявания (1).

В началото на 20-ти век Емил Фишер синтезира първия дипептид, наречен *glycylglycine* и въвежда термина «пептид», който е образуван от „пептон“ (разградените продукти от действието на пепсина; от гръцки *peptos* – разграден) и полизахариди. (10) Петдесет години по-късно, през 1953 г. du Vigneaud разработва стратегия за производство на полипептид (23).

2. ОБЩ ПРЕГЛЕД НА МЕТОДИТЕ ЗА ОРГАНИЧЕН ПЕПТИДЕН СИНТЕЗ

В зависимост от начина на получаване на пептида, днес се използват два основни метода за синтез: пептиден синтез в разтвор и твърдофазен пептиден синтез (SPPS). В първия случай, синтезът се извършва чрез кондензация на отделни аминокиселини или на пептидни фрагменти в среда от органичен разтворител (диметилформамид, етилацетат, дихлорметан и др). При твърдофазния пептиден синтез, реакцията

на кондензация се извършва също в течна среда, но полученият продукт е свързан към твърд полимерен носител, наречен смола.

Пептидният синтез в разтвор е най-старият метод за получаване на пептиди. Използва се за синтез единствено на олигопептиди, съставени от няколко аминокиселинни остатъка. Образоването на дипептид се извършва чрез контролирано свързване на две аминокиселини, при което едната е защитена в своя N-край, а другата откъм своя C-край. След образуването на амидната връзка защитеният дипептид се изолира, пречиства и охарактеризира. Лесно се определят също и незавършените напълно реакции на деблокиране и кондензация. Предимство на този метод е възможността преди започване на следващия етап на кондензация, всички странични продукти да бъдат отстранени.

Използват се два подхода при синтез на полипептидна верига, като всеки от тях има своите предимства и недостатъци:

- метод на фрагментно свързване - в процеса участват защитени пептидни фрагменти. Фрагментната кондензация е по-удобна за синтез на дълги пептидни последователности, т.к. е по-лесно пречистването на междинните продукти поради голямата разлика в молекулните маси между реагиращите фрагменти и продукта на кондензацията. Недостатъци на този подход са затрудненията свързани с разтворимостта на по-дългите фрагменти, както и трудностите при протичане на кондензационни реакции.
- метод на последователно свързване - състои се в последователно деблокиране на N-края и свързване на отделни АК. За разлика от фрагментното кондензиране, при последователното свързване, добавянето на единични аминокиселини води до малки разлики в молекулните тегла на изходните и крайните продукти, което създава трудности при тяхното разделяне и пречистване. В повечето случаи се използват комбинирани схеми за синтез, включващи и двата подхода. Най-често за синтез на

по-къси линейни пептиди, представляващи фрагменти от по-голяма структура, се използва последователно свързване, като след това те се кондензират един с друг посредством фрагментна кондензация.

3. ТВЪРДОФАЗЕН ПЕПТИДЕН СИНТЕЗ (SPPS)

През 1963 г. Bruce Merrifield публикува получаването на тетрапептид, който се синтезира при хетерогенни условия от С- към N-края върху твърд полимерен носител, наречен „смола” (17). През 1965г. Мерифиелд представя и първият автоматично управляван пептиден синтез (18). SPPS доказва своето голямо предимство пред синтеза в разтвор по отношение на скоростта и ефективността на работа. Ако времето, необходимо за синтез на един продукт в разтвор е около 6-12 месеца, то чрез твърдофазен синтез, същият може да бъде получен за по-малко от 3 седмици. Първоначално SPPS е описан като метод за получаване на къси пептиди с потенциално приложение в получаването на полипептиди с висока Mw. (17,19) Принципите на твърдофазния пептиден синтез са илюстрирани на фигура 1.

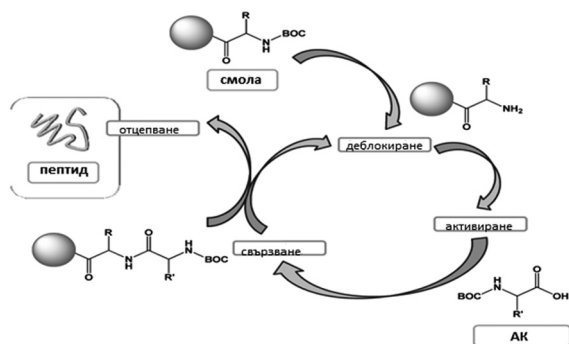
N-защитена аминокиселина с C-краен аминокиселинен остатък се свързва чрез карбоксилната си група към хидроксилна (или хлорна) или amino група на смолата, при което се получава естерно или amidно свързан пептид, който накрая ще доведе до получаването на C-краен киселинен или C-краен amidен пептид. След прибавяне на първата аминокиселина, желаната пептидна последователност се образува по линеен път от C-края към N-края (C→N стратегия) чрез повтарящи се цикли от N^α-деблокиране и аминокиселинни свързващи реакции.

За получаване на пептиди със зададена последователност е необходимо всички функционални групи, които не трябва да участват в обра-

зуването на пептидна връзка или има вероятност да встъпят в странични реакции, да бъдат защитени (блокирани) с постоянни защитни групи, които са стабилни при реакционните условия, използвани по време на нарастването на пептидите. Алфа-амино групата е предпазена чрез временни защитни групи, които най-често са от уретанов тип и могат лесно да бъдат премахнати при меки условия. Временната N-крайна защитна група се отстранява, което позволява прибавянето на следващата N-защитена аминокиселина, чрез активиране на нейната α-карбоксилна група (17). Основното изискване при избора на подходящ блокиращ заместител е не само лесното получаване на производно със съответната защитна група, но и отстраняването му да протича в условия, които да не водят до разрушаване на останалата част от молекулата. След свързването, излишните реагенти се премахват чрез филтруване и промиване. В последната стъпка, пептидът се отцепва от смолата и едновременно с това се премахват страничните защитни групи (15).

В зависимост от типа на използваната смола в практиката са се наложили два вида защитни групи за N^α-амино групата на АК. Вос – група (третична бутилоксикарбонилна) – киселинно лабилна (3) и Fmoc – група (9-флуоренилметилоксикарбонилна) – базично лабилна (4). Използването на тези защитни групи намалява силно рацемизацията при постепенното нарастване на пептида и дава възможност за лесно разкъсване на връзката алкил-кислород при различни условия. Тези два вида защитни групи са в основата съвременните стратегии, използвани при твърдофазния пептиден синтез (фиг. 2).

- Вос/Bzl-стратегията (фиг. 2B) се основава на повишената киселинна стабилност на страничните защитни групи. При тази стратегия, Вос групата се премахва чрез използването на разтвор на трифлуороцетна киселина (TFA) в дихлорметан, като защитните групи и откъсването на пептида от смолата става в края на синтеза чрез използването на силна киселина като безводен флуороводород (HF). Въпреки, че този метод позволява ефективен синтез на големи пептиди и малки протеини, използването на високо токсична HF к-на и нуждата от специална апаратура с политетрафлуороетиленова линия, ограничава използването му. Също така, използването на силно киселинни условия може да доведе до промяна в структурната цялост на пептидите, съдържащи лабилни последователности.



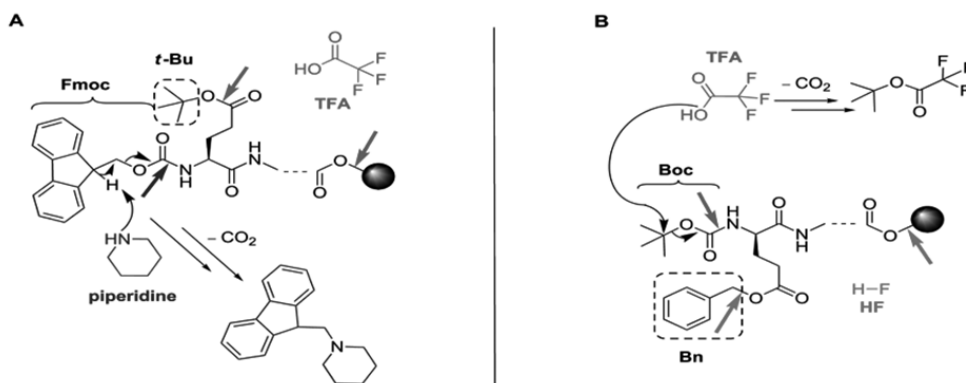
Фигура 1. Схематично представяне на SPPS по Wang (7)

- Fmoc/t-Bu-стратегията (фиг. 2A) използва N α-Fmoc група (лабилна в алкална среда) за защита на N-амино групата на АК, киселинно лабилните странични защитни групи и киселинно лабилните линкери, които представляват C-крайни блокирани аминокиселинни групи. (5) Основното предимство на тази стратегия е, че временните и постоянните защитни групи се премахват по различни механизми, което позволява използването на по-меки киселинни условия при крайното деблокиране и „откъсване” на пептида от смолата. Fmoc-групата може лесно да се отстрани с помощта на пиперидин, без необходимост от използване на трифлуорооцетна киселина (както при Boc-групата). Поради тази причина, Fmoc-базирания SPPS е метод на избор при рутинен синтез на пептиди.

карбоксилната група трябва предварително да се защити. В съвременния твърдофазен синтез Boc-стратегията намира ограничено практическо приложение (предимно при синтез на сложни пептиди или не-природни аминокиселини). Ето защо повечето новоразработени смоли и защитни групи са свързани със синтеза на пептиди по Fmoc-стратегията. Използват се различни защитни групи с висока степен на съвместимост помежду си, така че всяка от тях да се отстранява в присъствието на останалите. Ортогонална защитна схема се дефинира като пълна селективност на един клас защитни групи спрямо всички останали и обратното.

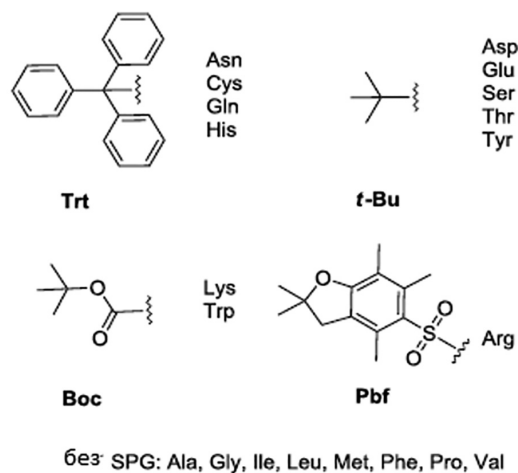
3.1. Смоли, линкери, активиращи и свързващи агенти, използвани в SPPS

В днешно време се използват три основни класа твърди полимерни носители (смоли): традиционният полистирен (PS), полиетиленгликол



Фигура 2. Fmoc/t-Bu(A) и Boc/Bzl(B) стратегии, прилагани за защита на N-амино групата на АК в SPPS. (A) Fmoc-групата се отстранява с помощта на пиперидин, а t-Bu се освобождава чрез ацидолиза с TFA. (B) Отцепване на защитната група с TFA и HF се осъществява чрез ацидолиза. Сините стрелки показват алкални, а червените/лилави стрелки - киселинни условия (15)

Синтезът обикновено започва от карбоксилния край на пептида. Най-често използваният подход за получаване на голям брой пептиди е стъпаловидният синтез, при който една аминокиселина се добавя във всяка стъпка. Особено важно е оптичната чистота на аминокиселините остатъци да остава непроменена в хода на синтеза. В природата се срещат предимно L-изомери, докато за получаване на ензимно-стабилни аналози много често се използват D-аминокиселини. Кондензационната реакция се подбира така, че да се намали вероятността от рацемизация на аминокиселинния остатък. При провеждане на кондензация във водна среда, участващата в нея карбоксилна група може да се защити лесно чрез превръщането ѝ в алкална сол. Ако процесът се провежда в неводни разтворители, което е по-често срещано в практиката,



Фигура 3. Най-често използваните защитни групи за страничните вериги (side chain protecting groups - SPG) на АК при Fmoc/t-Bu-стратегия. Trt (trityl), Pbf (pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl) (15)

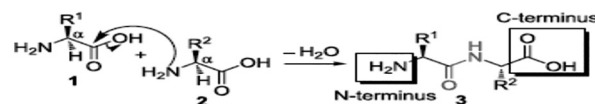
(PEG) върху полистирен (PS) (NovaSyn - смоли) и чисти PEG- базирани смоли. През 2013 г. Shelton и сътр. издават сборник с най-често използваните смоли, заедно с техните индивидуални свойства на набъбване и натоварване (определя се от еквивалента на АК в mmol/g, който може да бъде прикрепен към смолата) (21).

Линкера представлява връзка между смолата и синтезираната пептидна последователност. Той определя натоварването на смолата, разстоянието между смолата и пептида, химичните условия за прикачване и освобождаване и най-важното, С-крайната функционалност на получения пептид. В повечето случаи, пептидът се освобождава като киселина или амид, защото това са естествено срещани С-крайни функционални групи. Също така, С-краят може да бъде модифициран като хидразид, алкохол, алдехид, тиоестер и други (2,21).

Изборът на смола и линкер се основава на сложността на желаната пептидна последователност и условията на химичната реакция, както и желаната С-крайна модификация на получения пептид.

Образуването на пептидна връзка може да се разглежда като реакция на нуклеофилно заместване, където атаката се осъществява от нуклеофилен агент – аминокomпонента. За да се осъществи тази реакция при ниски температури е необходимо да се въведе функционална група (с отрицателен индукционен и мезомерен ефект), която да изтегли електронната плътност от въглеродния и кислородния атом (активиране на свободната COOH-група), което да улесни атаката на аминокomпонента:

В продължение на десетилетия, за активиране на COOH-група са използвани карбодии-

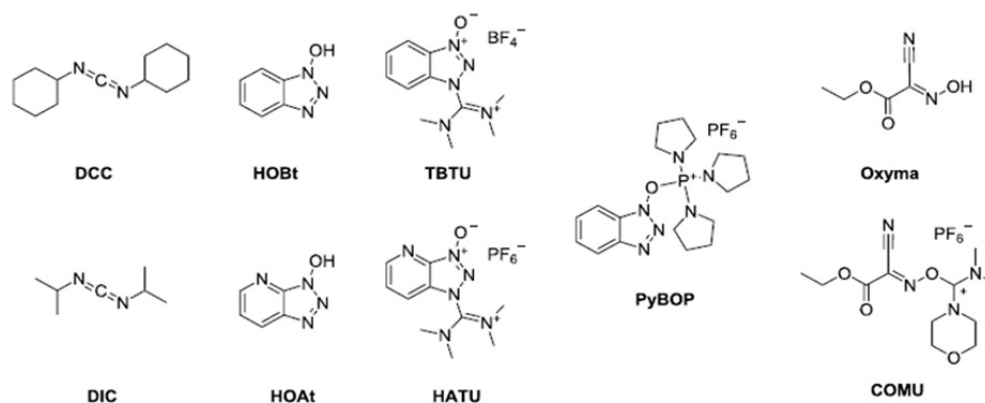


Фигура 4. Образуване на пептидна връзка

мид базирани свързващи реагенти като DCC (N, N'-дидициклохексилкарбодиимид) (17) и DIC (N, N'-диизопропилкарбодиимид) (11,9). Карбодиимидния метод е класически метод за активиране на карбоксилната група, предложен от Шийън и Хес през 1955 год. (20). Податливостта на тези ефективни активатори да рацемизират води до развитието на нови, потискащи рацемизацията свързващи реагенти. Най-популярен сред тях е HOBT (1-хидроксисбензотриазол) (14), който се прибавя в реакционната среда и води до образуване на активиран естер на съответната N-защитена АК. HOBT-активирани естери се образуват лесно, не се изолират и могат да се получат чрез цял клас нови, широко достъпни (много по-евтини от традиционния DCC) активиращи агенти: (фиг. 5) HOAt (1-hydroxy-7-azabenzotriazole), HATU (N-[(dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b] pyridin-1-ylmethylene]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide), PyBOP (benzotriazol-1-yloxytri (pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphate, TBTU - (N-[(1H-benzotriazol-1-yl) (dimethylamino) methylene] N-methylmethanaminium tetrafluoroborate N-oxide) (13).

Основно предимство на по-новите активиращи реагенти е изключително краткото реакционно време (15-30 мин) в сравнение с традиционните DCC и DIC (минимум 65 мин).

След приключване на пептидния синтез, защитните групи на страничните вериги се пре-



Фигура 5. Избрани свързващи (кондензиращи) агенти използвани в SPPS. Охута (ethyl 2-суано-2-(hydroxyimino) acetate) (12, 22) е въведена като алтернатива на HOBT през 2009 г. COMU ((1-суано-2-етоху-2-охоетилденаминоoxy) dimethylaminomorpholino-carbenium hexafluorophosphate) (8) е безопасна и по-силна урониева сол на Охута

махват и пептидът се отделя от твърдия носител. Универсалната процедура при Fmoc/^tBu-стратегията представлява обработване на пептидил-смолата с TFA (100% - 95%), смесена с различни вещества, наречени скевинджъри, които спомагат за предотвратяване на преаклиране при деблокиране и по-лесното отстраняване на образуващите се в хода на синтеза странични продукти: анизол, тиоанизол, етандитиол, етилметилсулфид, триизопропилсилан и др.

3.2. Методи за пречистване и анализ на получените пептиди

Последната стъпка на SPPS обхваща всички методи за пречистване на крайните пептиди от соли, енантиомери (димери), както и от скъсени аналози.

- Методи за пречистване на синтетични пептиди:
 - Тънкослойна хроматография (TLC);
 - Течна хроматография с класически колони и силика гел като пълнеж;
 - Високоэффективна течна хроматография (RP-HPLC);
 - Йонообменна хроматография или гел-филтрация;
- Методи за анализ на получените пептиди:
 - Електрофореза - Насоченото движение на колоидно диспергирани частици в течна дисперсна среда под действие на външно електрично поле към един от електродите, се нарича електрофореза. Скоростта на придвижване се определя от големината на електричния товар на частиците, от масата им, от състава и движението на тяхната фаза и др. Капиллярната електрофореза (CE) представлява комбинация между течната хроматография (LC) и стандартната електрофореза (полиакриламидна гел електрофореза) и се основава на принципите на електрофорезата.
 - Скоростта на движение или миграция на анализирания компонент в CE се определя от техния размер и товар. Малките, силно заредени частици преминават по-бързо в сравнение с големите, но по-слабо заредени.
 - Движението на анализирания компонент е причинено от електроосмотичен поток (EOF).
 - Скоростта на EOF може да се регулира чрез промяна на pH на използвания буфер

- Профилът на EOF поток е плосък – в резултат на което се постига висока разделителна ефективност.
- Крайните данни от CE се наричат електрофореграма
 - Протонна ЯМР спектроскопия (¹H-NMR) - физичен метод, който се основава на възможностите на атомните ядра да поглъщат и излъчват радиочестотна енергия, когато се намират в постоянно магнитно поле и служи за структурен анализ на органични съединения. Магнитни свойства притежават атомните ядра на ¹H, ¹³C, ¹⁹F, ³¹P и др.
 - Мас-спектрометрия (MS) - аналитичен, физикохимичен метод, при който смес от йони и техния фрагменти се разделят в газова фаза под действието на електромагнитно поле, в съответствие с масовите им числа m/z, където «m» е масата на молекулярния йон или на неговите фрагменти, а «z» е техният заряд. Най-често използваните йонизационни методи за анализ на биомолекули, като протеини, гликопротеини, олигонуклеотиди са електроспрей и наноспрей йонизацията, както и лазерна десорбционна йонизация с помощта на матрица (MALDI).

Електроспрей йонизацията намира най-голямо приложение при анализ на смес от хидролизирани протеини. Обикновено пробите с молекулни маси до 1200 Da, дават единично заредени молекулно-свързани йони.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Краткото време за синтез дава възможност за получаване на голям брой пептидни аналози, което помага да се определят онези промени в молекулите, които водят до по-добре изразени ефекти. SPPS се използва успешно в лекарствения дизайн на нови молекули. Синтезирането на късоверижни пептиди с определени модификации в структурата дава възможност за комбиниране на различни фармакологични ефекти в един лиганд, което да доведе до оптимизиране на терапевтичните схеми.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahrens VM; Bellmann-Sickert K.; Beck-Sickinger AGFuture Med. Chem. 2012, 4, p. 1567-1586

2. Alsina J.; Albericio F. *Biopolymers* 2003, 71, p. 454–477.
3. Carpino LA, *J. Am. Chem. Soc.* 1957, 79, 4427–4431.
4. Carpino LA, Han GY, *J. Am. Chem. Soc.* 1970, 92, 5748–5749
5. Carpino LA and Han GY, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem.* 1972; 37, p. 3404–3409
6. Craik DJ; Fairlie DP; Liras S.; Price D. *Chem. Biol. Drug Des.* 2013, 81, p. 136–147
7. Duro-Castano A., Conejos-Sánchez I. and Vicent MJ Peptide-based polymer therapeutics *Polymers* 2014; 6(2), p. 515–551
8. El-Faham A.; Subirós Funosas R.; Prohens R.; Albericio F. *Chem.–Eur. J.* 2009, 15, p. 9404–9416.
9. Els S.; Beck-Sickinger A. G.; Chollet C. *Methods Enzymol.* 2010, 485, p. 103–121.
10. Fischer E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1901, 34, p. 433–454.
11. Izdebski J.; Orłowska A.; Anulewicz R.; Witkowska E.; Fiertek D. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1994, 43, p. 184–189
12. Itoh M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1973, 46, p. 2219–2221.
13. Knorr R.; Trzeciak A.; Bannwarth W.; Gillessen D. *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, p. 1927–1930.
14. König W.; Geiger R. A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives *Chem. Ber.* 1970, 103, p. 788–798
15. Mäde V., Els-Heindl S. and Beck-Sickinger AG, Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. *Beilstein J. Org. Chem.* 2014; 10, 1197–1212
16. Marx V. Watching peptide drugs grow up *Chem. Eng. News* 2005, 83, p. 17–24
17. Merrifield RB Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963; 85, p. 2149–2154
18. Merrifield RB, Stewart JM Automated peptide synthesis. *Nature* 1965; 207, p. 522–3.
19. Merrifield RB Solid-phase peptide synthesis. *Ad. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1969; 32, p. 221–296.
20. Sheehan JC and Hess GP A new method of forming peptide bonds, *J Am Chem Soc* 1955; 77, p. 1067–1068.
21. Shelton PT, Jensen KJ Linkers, resins and general procedures for solid-phase peptide synthesis. In *Peptide synthesis and applications*; Jensen KJ, Shelton PT, Pedersen SL., Eds.; *Methods in Molecular Biology*, 1047; Humana Press, 2013; p. 23–41
22. Subirós-Funosas R.; Prohens R.; Barbas R.; El-Faham A.; Albericio F. *Chem.–Eur. J.* 2009, 15, p. 9394–9403.
23. du Vigneaud V.; Ressler C.; Swan CJM; Roberts CW; Katsoyannis PG; Gordon S., *J. Am. Chem. Soc.* 1953, 75, p. 4879–4880
24. Vlieghe P.; Lisowski V.; Martinez J.; Khrestchatsky M. *Drug Discovery Today* 2010, 15, p. 40–56
25. U.S. Food and Drug Administration. (accessed Jan, 2014). <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>

Адрес за кореспонденция:
Силвия Михайлова
e-mail: s_mihaylova@mail.bg