

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



Miroslava Palacková

*Příprava peptidů inhibujících interakci PA-PB1 chřipkové RNA
polymerasy*

*Synthesis of peptidic inhibitors targeting PA-PB1 interface of influenza
RNA polymerase*

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Aleš Machara, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 28. 8. 2018

.....
Miroslava Palacková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Ing. Aleši Macharovi, Ph.D., za profesionální vedení mé bakalářské práce, trpělivost a cenné rady pro začínajícího chemika. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Pavlu Majerovi, Ph.D., za kvalitní zázemí, příjemné prostředí a podporu pro vypracování mé bakalářské práce. Také bych chtěl poděkovat pracovníkům servisních laboratoří ÚOCHB AV ČR, za měření HPLC-MS spekter a výzkumnému týmu doc. RNDr. Jana Konvalinky, Ph.D., za vstřícnou spolupráci a podporu. Další poděkování patří kolegům z laboratoře za každodenní pomoc a přátelskou atmosféru na pracovišti. Na závěr bych chtěl poděkovat své rodině za jejich morální a finanční podporu po dobu celého studia.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou peptidů inhibujících protein-proteinovou interakci PA-PB1 podjednotek vyskytujících se v chřipkové RNA polymeráze. Cílem práce bylo provést modifikace objeveného minimálního peptidu na dvou tzv. “hot spotech” – místech, které nejvíce přispívají k interakci tohoto hexapeptidu s PA podjednotkou. Nejprve byl modifikován hot spot A, čímž vznikla první řada produktů a následně byl optimalizován i druhý hot spot B. Tímto postupem byly připraveny dvě série peptidů. S ohledem na skutečnost, že jeden z připravených hexapeptidů obsahoval komerčně nedostupnou aminokyselinu, musela tato aminokyselina být připravena. Dále se bakalářská práce zabývá přípravou bicyklického peptidu obsahující sekvenci inhibitoru a zároveň i peptidickou sekvenci, jenž umožňuje průchod peptidu přes buněčnou membránu.

Klíčová slova: *syntéza, peptidy, inhibitory, chřipka, polymerasa*

Abstract

The submitted Thesis deals with preparation of a hexapeptides inhibiting protein-protein interaction of PA-PB1 subunits of influenza RNA polymerase. Crucial part of the Thesis represent modifications of particular small hexapeptide at its two “hot spots”. It means at positions that significantly contribute to the binding of both subunits. These modifications resulted in preparation of two series of distinct hexapeptides. With regards to the fact that one designed hexapeptide contains unnatural and commercially unavailable amino acids this amino acid had to be prepared from simple building blocks. Apart from aforementioned work the Thesis also covers effort to prepared bicyclic peptide that contains sequences of peptidic inhibitor of protein-protein interactions and also cell-penetration peptide.

Key words: *synthesis, peptides, inhibitors, influenza, polymerase*

Seznam zkratek:

Ac	Acetyl
AcOH	kyselina octová
Boc	<i>t</i> -Butyloxykarbonyl
br s	Široký singlet
Bzl	Benzyl
CPP	„Cell-penetration peptides“ – buněčnou stěnou procházející peptidy
d	Dublet
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazobicyklo[2.2.2]oktan
DCC	<i>N, N'</i> -Dicyklohexylkarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIC	<i>N, N'</i> -Diisopropylkarbodiimid
DIPEA	Di- <i>iso</i> -propylethylamín
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
eq.	Molární ekvivalent
Et	Ethyl
EtOAc	Ethyl-acetát
EtOH	Ethanol
FDA	Federální Lékový Ústav Spojených států amerických
Fmoc	Fluorenyl-9-methyloxykarbonyl
GSH	glutathion
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát
HIV	„Human immunodeficiency virus“ – virus lidské imunitní nedostatečnosti
HMBA	4-(Hydroxymethyl)benzoová kyselina
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	Hydroxybenzotriazol
m	Multiplet

Me	Methyl
MeOH	Methanol
NMO	<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid
NMR	Nukleární magnetická rezonance
MRI	Magnetická rezonance
M1	matrixový protein 1
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NP	Nukleoprotein
o/n	Přes noc
OSu	<i>N</i> -Hydroxysukcinimidyl
PA	Polymerázový protein
PAM	4-(Hydroxymethyl)fenylacetamidomethyl-polystyren
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PB1	Polymerasový základní protein 1
PB2	Polymerasový základní protein 2
PPI	Protein-proteinová interakce
PyBoP	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinofosfonium hexafluorofosfat
q	Kvartet
RdRP	RNA-dependentní RNA polymerasou RNA
RNA	Ribonukleová kyselina
s	Singlet
SPPS	Syntéza peptidů na pevné fázi
t	Triplet
TAT	transaktivatorové proteiny viru HIV
TBAI	Tetrabutylammonium jodid
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborát
TFA	Kyselina trifluoroctová
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMSOTf	Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonat
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
Trt	Trityl
vRNA	Virová RNA

vRNP	Virový ribonukeoproteinový komplex
Z	Benzyloxykarbonyl

Obsah

1. Úvod	10
2. Teoretická část	12
2.1. Peptidy	12
2.1.1. Cell-penetrating peptides (CPP)	13
2.1.2. Cyklické peptidy	15
2.1.3. Bicyklické peptidy	17
2.1.4. Cyklické peptidy s vlastnostmi CPP	18
2.2. Protein-proteinové interakce	20
2.2.1. Inhibice interakce protein-protein	21
2.2.2. Interakce PA-PB1 chřipkové RNA polymerasy	23
2.3. Syntéza peptidů	24
2.3.1. Syntéza peptidů v kapalně fázi	25
2.3.1.1. Aktivace	26
2.3.1.2. Chránění	27
2.3.2. Syntéza peptidů na pevné fázi (SPPS)	28
2.3.2.1. Pryskyřice	29
2.3.2.2. Taktika syntézy na pevné fázi – výběr chránících skupin	30
2.3.2.3. Merrifieldova taktika – Boc/Bzl	30
2.3.2.4. Sheppardova taktika – Fmoc/tBu	31
3. Cíle práce	32
4. Výsledky a diskuse	33
4.1. Optimalizace minimálního peptidu	33
4.2. Příprava 4-(fosfonomethyl)fenylalaninu	37
4.3. Příprava centrálního fragmentu bicyklického peptidu	41
4.4. Design bicyklického peptidu	42
5. Pracovní postupy	47
5.1. Použité přístroje a chemikálie	47
5.2. Obecné postupy	47
5.2.1. PSSP	47
5.2.2. Acetylace na SPPS	48
5.2.3. Odštěpení peptidu z pryskyřice s následným odchráněním	48
5.2.4. Tvorba peptidové vazby v kapalně fázi	49

5.2.5. Acetylace v kapalně fázi.....	49
5.2.6. Reduktivní štěpení chránicí skupiny Z	49
5.3. Postupy.....	50
6. Závěr	71
7. L�teratura.....	72

1. Úvod

Chřipka představuje pro lidstvo jedno z nejzávažnějších onemocnění nikoli co do závažnosti průvodních příznaků či výsledné relativní mortality, ale z hlediska míry výskytu a mortality absolutní. Fakticky se chřipka stala ve 20. století poslední pandemickou nemocí lidstva, která se pravidelně vrací a relativně rychle mutuje do agresivnějších forem.

Příklady agresivnějších forem chřipky jako například chřipka španělská či chřipka ptačí nás varují, abychom přes relativní zkrocenost chřipky naším imunitním systémem neztráceli ve snaze toto onemocnění detailně studovat a vyvíjet léky proti ní.

Od 50. let minulého století řada vědeckých skupiny začala upozorňovat na velký význam interakcí mezi proteiny, skrze jejichž narušení či pozměnění by mohlo dojít k potlačení šíření virů v organismu. Za tímto účelem jsou dnes zkoumány tzv. protein-proteinové interakce (PPI) jako základní transmisní mechanismus, který lze vhodnými inhibitory ovlivňovat. Mezi klíčové PPI v případě chřipkových virů patří interakce mezi PA-PB1 podjednotkami, tj. interakce mezi polymerasovým proteinem a polymerasovým základním proteinem 1. Uvedený komplex PA-PB1 je součástí chřipkové RNA dependentní polymerasy a přímo se podílí na replikaci virové RNA.

Zkoumáním interakce PA-PB1 podjednotek u chřipky pomocí rentgenostrukturní analýzy se podařilo určit, že 25 aminokyselin podjednotky PB1 (N-konec) se nachází v místě vzájemného kontaktu obou podjednotek. Tato sekvence se stala důležitým vodítkem pro design inhibitoru této PPI, protože potenciální inhibitor musí mimikovat uvedenou sekvenci. Peptid se sekvencí ADVNPTLLFLKVPAQNAISTTFPYT, jehož primární struktura vychází se sekvence PB1, je schopen inhibovat interakci PA-PB1 podjednotek. Jedná se tedy o kompetiční inhibitor 25-ti aminokyselinové sekvence PB1 podjednotky. Následné studie prokázaly, že zkracováním tohoto peptidu jak z N- tak i z C-konce je možné získat minimální (nejmenší) peptid, který je schopen ještě inhibovat interakci PA-PB1 podjednotek. Konkrétně Schwemmler a jeho spolupracovníci v roce 2007 popsali peptid se sekvencí PTLLFLK a dokázali, že je schopen inhibovat PPI.^[1]

Podobným postupem naši kolegové z ÚOCHB navrhli *N*-acetylovaný peptid se sekvencí Ac-YLLFLK a prokázali jeho inhibičními účinky. Při navrhování sekvence museli kolegové brát do úvahy i rozpustnost tohoto minimálního peptidu. Z řady testů a rentgenostrukturní analýzy vyplynulo, že aminokyseliny tyrosin a fenylalanin představují v peptidu hot-spoty. Jinými slovy jsou to nejdůležitější aminokyseliny v sekvenci

peptidu, jenž výrazně ovlivňují jeho inhibiční schopnost. Logickým pokračováním snahy o nalezení ještě účinnějšího minimálního peptidu je takzvaná optimalizace hot-spotů. Ta se provádí záměnou vybraných aminokyselin (hot spoty) za jiné přírodní i nepřírodních aminokyselin. Cílem takové optimalizace je nalézt takový strukturní motiv, který ještě více podpoří vzájemnou interakci se studovaným proteinem, resp. PA podjednotkou.

Většina malých peptidů neprochází skrz buněčnou membránu a také rychle podléhají štěpení enzymy přítomnými ve fyziologickém prostředí. Z tohoto důvodu bylo na peptidy vždy nahlíženo jako na látky nevhodné v léčbě virových onemocnění. Respektive jakýkoliv peptid měl jen minimální šanci, že se z něj vyvine lék. Ke konci 20. století vědci však objevili peptidy, které jsou schopny procházet buněčnou stěnou. Nadto se prokázala schopnost těchto unikátních peptidů dopravovat do buňky i k nim připojené látky (konjugáty peptidů). Tyto peptidy se označují v anglickém jazyce jako „cell-penetration peptides“ (CPP). Ve velmi nedávné době se začalo intenzivně pracovat na bicyklických peptidech s vlastnostmi CPP. Tyto peptidy tedy kombinují unikátní vlastnosti plynoucí z cyklické struktury se schopností pronikat skrz buněčnou stěnu. U bicyklických peptidů jeden cyklus představuje sekvenci CPP a druhý cyklus má sekvence peptidu, jenž způsobuje žádanou buněčnou odezvu (inhibitor atd.). Obě výše popsané skutečnosti nás vedly jednak k přípravě minimálních peptidů s optimalizovanými hot spoty vhodných k inhibici interakce PA-PB1 podjednotek virové RNA polymerasy, ale zároveň jsme se rozhodli navázat inhibitor peptidické povahy na sekvenci CPP. Výsledný bicyklický peptid, by měl být schopný pronikat do buněk napadených virem a následně inhibovat interakci PA-PB1. Tím bychom učinili velký krok ve vývoji účinného léku proti všem subtypům chřipky. V následujících podkapitolách se čtenář dozví vše podstatné o místě terapeutické intervence, o protein-proteinových interakcích, o peptidech a jejich cyklických formách, o CPP a v neposlední řadě budou čtenáři prezentovány různé taktiky při syntéze peptidů. Všechny tyto informace jsou důležité pro pochopení cílů a způsobu řešení předloženého bakalářského projektu.

2. Teoretická část

2.1. Peptidy

Peptidy jsou oligomery přírodní povahy složené z aminokyselin spojených amidovou vazbou (peptidickou vazbou). Touto vazbou je spojena karboxylová skupina jedné aminokyseliny s α -aminoskupinou druhé aminokyseliny. Výchozími body pro číslování a další popis peptidů jsou jeho dva konce. Jeden konec nese volnou α -aminoskupinu a označujeme jej jako N-konec. Naopak druhý konec nese volnou karboxylovou skupinu a označujeme jej jako C-konec. U peptidů se používá standardizovaný zápis zleva doprava, tedy od N-konce k C-konci.^[2]

U struktur peptidů rozpoznáváme tři úrovně výstavby, a to konkrétně primární, sekundární a terciární. Primární struktura představuje pořadí jednotlivých aminokyselin v peptidovém řetězci; také bývá označována jako sekvence peptidu. Sekundární struktura vyplývá z prostorového uspořádání sobě blízkých aminokyselin.^[3] Nejčastějšími typy sekundárních struktur peptidů jsou α -helix, β -skládaný list, statistické klubko a β -ohyb.^[2] Terciární struktura popisuje celkové prostorové uspořádání peptidu.

Prostorová struktura peptidů úzce souvisí s jejich funkcí a biologickou aktivitou. U peptidů s podobnou biologickou aktivitou se vyskytují téměř identické strukturní motivy a funkční domény.^[3] Tento rys je velmi důležitý pro pochopení problematiky proteinů a jejich funkcí. Rovněž nám tento vztah mezi aktivitou a strukturou umožňuje navrhovat nové proteiny s požadovanými vlastnostmi.

V 19. století geniální Emil Fischer zformuloval základní ideu proteinové (enzymatické) substrátové specifičnosti, kdy substrát musí zapadnout do aktivního místa proteinu jako klíč do zámku. Postupně byla jeho idea rozšířená a dnes je známa jako teorie komplementarity, respektive jako idealizovaný model zámek-klíč. Aby se substrát navázal do aktivního místa proteinu a následně byl přeměněn, musí být geometricky komplementární k vazebnému místu, ale také musí být komplementární ve smyslu možných míst vzájemného kontaktu – musí dojít k interakci mezi donory a akceptory vodíkových můstků, negativně a pozitivně nabitými skupinami, nepolárními zbytky aminokyselin atd. V polovině 20. století David Koshland přišel s doplněnou teorií indukovaného přizpůsobení.^[4] Základní myšlenka teorie spočívá v představě, že konformačně flexibilní substrát po částečném navázání se k aktivnímu místu, začne přizpůsobovat svoji prostorovou strukturu aktivnímu místu. Stejně tak i protein přizpůsobí své aktivní místo substrátu.^[2] Nicméně pokud se zaměříme na samotné

interakce protein-protein tak zjistíme, že tento komplex je podstatně složitější k pochopení a popisu než model zámek-klíč vhodný především pro dvojice malý substrát-enzym s aktivním místem schovaným ve svém nitru. Přiblížení interakce protein-protein (protein-peptid) je v této práci věnována samostatná podkapitola.

Peptidy a proteiny vynikají ohromnou strukturní variabilitou při dodržení vcelku minimalistických požadavků na chemickou strukturu řetězce. V něm se totiž pouze střídají původní alfa-uhlíky s amidickými funkčními skupinami. Strukturní variabilitu vnášejí různé zbytky navázané na uvedený alfa-uhlík. Kombinací jen samotných dvaceti přírodních aminokyselin vznikají peptidy a proteiny s neuvěřitelnou paletou funkcí a aktivit. Některé peptidy a proteiny plní strukturní/stavební funkci v organismu, jiné umožňují transport látek, pohyb organismu, dále peptidy/proteiny organismus používá jako katalyzátory (enzymy) a také ke své ochraně. Je s podivem jak, z pohledu organického chemika, téměř podobné biopolymery, resp. látky stejného typu lišící se jen pořadím a počtem aminokyselin (monomerů) mohou vykazovat tak odlišné vlastnosti. Ačkoliv peptidy nepředstavují žádný úchvatný cíl pro syntetického chemika a jejich příprava je v podstatě založená na rutinním opakování syntetických kroků s občasným použitím nějakého již někým jiným vyvinutého triku, studium jejich vlastností a schopností je naopak velmi atraktivní činnost.

Výzkum transportních systémů, jenž umožňují vnést do buňky látku s požadovanou aktivitou při nízké toxicitě jak transportního systému, tak i transportované látky, je jednou z klíčových výzev při vývoji nových terapeutických prostředků. Objevení peptidů schopných procházet buněčnou stěnou a nedávný průlom v této problematice znovu zvedl zájem o chemii peptidů. Tuto problematiku stručnosti popisuje následující podkapitola.

2.1.1. Cell-penetrating peptides (CPP)

Takzvané „Cell-penetrating peptides“ (CPP), jejichž český ekvivalent je nejspíše „buněčnou stěnou procházející peptidy“ jsou peptidy čítající obvykle 5-30 aminokyselin, které na rozdíl od klasických peptidů mohou procházet přes buněčnou stěnu.^[5] Zjevně jejich unikátní schopnost dala vzniknout i názvu celé skupiny těchto peptidů. V roce 1988 nezávisle na sobě Frankel^[6] a Green^[7] publikovali sdělení o prvním CPP. Konkrétně se jednalo o transaktivátorové proteiny viru HIV (TAT).^[6-7] V průběhu následujících let bylo objeveno několik dalších přírodních tak i člověkem vytvořených CPP.^[8] Mezi nejznámější můžeme zařadit peptid ze sekvencí KRKRWHW, který výborným způsobem

prochází přes stěnu savčích buněk.^[9] V současné době nejpoužívanější CPP je peptid se sekvencí FØRRRR (Ø: 2-*L*-naftylalanin), který má lepší vlastnosti než TAT.^[10]

Základním strukturním motivem CPP jsou opakující se sekvence argininů (polyarginíny) nebo amfipatická struktura,^[11] kdy peptid obsahuje jak hydrofobní, tak hydrofilní část ve své struktuře.^[12] Guanidinové funkční skupiny polyargininů jsou silně bazické a nejspíše interagují s fosfátovými a sulfátovými zbytky buněčné stěny.^[8] V konečném důsledku CPP protein nejen přilne k buněčné stěně, ale následně i vstoupí do buňky. Tento mechanismus demonstrovala Wenderova a Futakiho skupina pomocí modelu s okta-argininem.^[13] Avšak další studie mechanismu CPP prokázaly, že tyto peptidy jsou transportovány různými mechanismy. Například přímá translokace CPP je založená na interakci pozitivně nabitých částí CPP s membránou, což může vést k destabilizaci membrány, vzniku pórů nebo micel z peptidů putujících skrz membránu. Dalším mechanismus vstupu do buňky je založen na endocytóze, kdy se kolem CPP vytvoří z membrány váček, který se uzavře směrem do buňky a v buňce se otevře.^[14]

Amfipatický charakter může vzniknout na primární nebo sekundární úrovni. Primární amfipatické peptidy obsahují hydrofilní a hydrofobní oblasti v primární struktuře. Sekundární amfipatické peptidy mají konformaci, která umožňuje umístění hydrofobních a hydrofilních zbytků kyselin na opačných stranách molekuly peptidu.^[11] Běžným strukturním motivem v sekundárních amfipatických peptidech je α -helix, v kterém jsou hydrofilní a hydrofobní aminokyseliny seskupené na oddělených stranách šroubovice. Jedna strana šroubovice je hydrofobní a druhá může být kladně nabitá, záporně nabitá nebo polární.^[11] V případě β -listu je jedna strana složená s polárními aminokyselinami a druhá s nepolárními, což se na primární struktuře projeví střídáním polárních a nepolárních aminokyselin,^[15] jako například u peptidu VP5 (DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD). V diskutovaných CPP převládá jako polární aminokyseliny vystupují arginin a lysin.^[5]

Jednotlivé CPP se v posledních dvou desetiletích začaly využívat jako molekulové transportéry přes buněčnou stěnu. Pomocí CPP je možné do buňky vpravit široké spektrum strukturně odlišných látek, které jsou dále označovány jako „náklad“ (odvozeno od anglického *cargo*). Nákladem mohou být například nízkomolekulární biologicky aktivní sloučeniny, malé peptidy, aminokyseliny, MRI (magnetická rezonance) kontrastní látky nebo krátké RNA.^[14] Velkou výhodou použití CPP při transportu požadovaného nákladu je nižší toxicita aduktu CPP-náklad v porovnání s jinými metodami.^[16] Konjugáty CPP s nákladem je možné rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupina je

charakterizovaná kovalentním spojením CPP s nákladem, přičemž druhá skupina vytváří stabilní nekovalentní komplex CPP s nákladem.^[11]

2.1.2. Cyklické peptidy

Cyklické peptidy jsou známé především díky jejich účinku na organismus. Tyto peptidy totiž jsou známými antibiotiky, imunosupresivy, toxiny, hormony, regulátory transportu ionů atd.^[17] Na tomto místě je nutné zdůraznit klíčovou vlastnost cyklických peptidů – tyto sloučeniny jsou v živém organismu mnohem stabilnější vůči proteolytickému štěpení než jejich lineární ekvivalenty. V porovnání s lineárními peptidy je konformační flexibilita cyklických peptidů snížena.^[18] Bylo zjištěno, že právě strukturní rigidita cyklických peptidů úzce souvisí s jejich bioaktivitou a stabilitou.^[19] Právě pro tyto výhodné farmakologické vlastnosti jsou cyklické peptidy studovány jako slibná potenciální léčiva.^[18]

Cyklické peptidy mohou být chemicky klasifikované jako homodetické (v tom případě se jedná o peptidy složené jen z α -aminokyselin^[20]) nebo jako heterodetické. Do skupiny heterodetických peptidů jsou zahrnuty také cyklické peptidy obsahující disulfidickou vazbu v kruhovém řetězci.^[18]

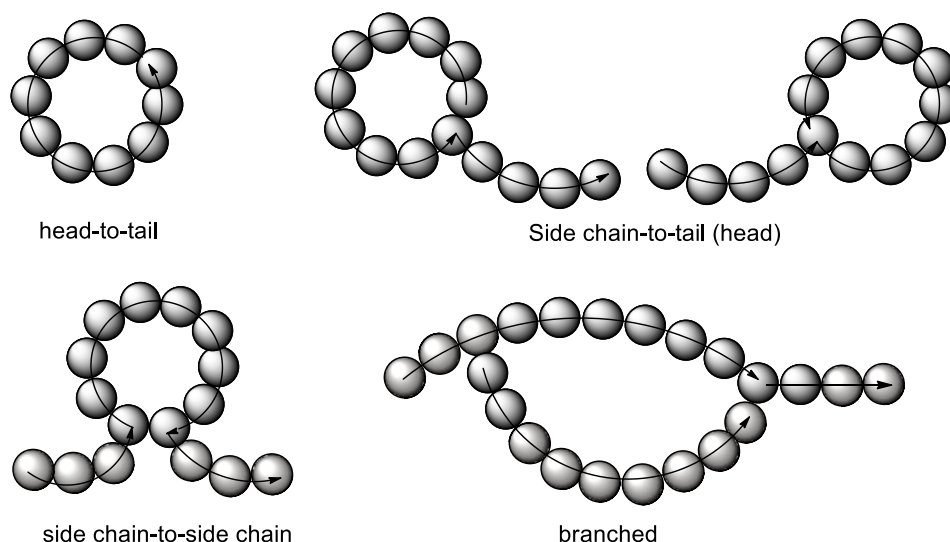
Cyklické peptidy mohou být metabolizované v savčích buňkách pouze v omezeném rozsahu, a to díky jejich vyšší odolnosti vůči enzymatické degradaci. Jejich lipofilní vlastnosti vedou k jejich odbourávání především v játrech (hepatic clearance), což naznačuje možnost přípravy snadno odbouratelných léčiv. Z výše uvedených důvodů jsou cyklické peptidy již od dob svého objevu intenzivně zkoumány. S ohledem na složitost problematiky jejich účinku jsou však v analytických metodách a jako léčiva využívány až od let osmdesátých.^[18]

Snížená flexibilita či jinak řečeno snížená konformační volnost umožňuje snáze designovat cyklické peptidy s ohledem na jejich interakci s receptory. Rovněž nižší náročnost výpočtů umožňuje snáze studovat interakci v aktivním centru (receptor, enzym či protein) pomocí nástrojů výpočetní chemie.^[18] Díky tomu je možné navrhovat „peptidase-stable“ sloučeniny s vysokou specifitou a bioaktivitou.^[19]

Izolace přirozeně se vyskytujících cyklických peptidů je obvykle velice obtížná. Proto standardní syntetický přístup představuje nejlepší metodu pro získání cyklických peptidů. V následující části budou velmi stručně popsány způsoby a typy cyklizací peptidů.

Obecně se při syntéze cyklických peptidů používají čtyři topologicky odlišné způsoby cyklizace. Jimi jsou tak zvané „to head-to-tail“ cyklizace, „side chain-to-side chain“, „side chain-to-tail (or head)“ cyklizace a v neposlední řadě takzvané „branched“ cyklizace.^[18] Výše uvedené způsoby cyklizace jsou uvedeny na Obrázku č. 2.1.

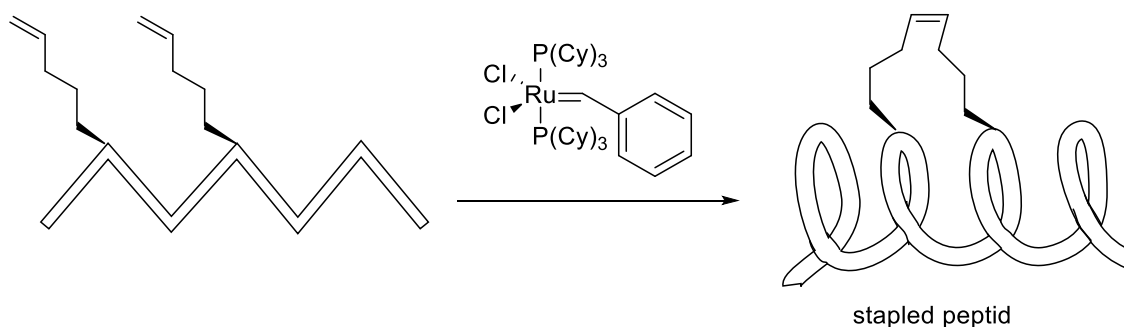
Obrázek 2.1 Čtyři základní způsoby cyklizace peptidů



Cyklické „head-to-tail“ peptidy obsahují ve své struktuře pouze amidické vazby mezi α -aminoskupinami a karboxylovými skupinami. V případě ostatních cyklických peptidů se v cyklické části peptidu vyskytují i jiné typy vazbem. Pro cyklické peptidy typu „side chain-to-tail (head)“ jsou charakteristické amidické vazby mezi karboxylovou skupinou na C-konci a aminoskupinou na postranním řetězci, popřípadě mezi aminoskupinou na N-konci s karboxylovou skupinou na postranním řetězci. Cyklická část struktury může obsahovat i disulfidické můstky či esterové vazby. V cyklickém peptidu typu „side chain-to-side chain“, případně i „branched“ typu, se vyskytuje alespoň jedna vazba mezi postranními skupinami aminokyselin. Může se jednat jak o amidickou vazbu, tak o disulfidický můstek nebo esterovou vazbu.^[18]

Existují ještě jiné typy cyklizací, které jsou typické pro cyklické peptidy. Příkladem mohou být tzv. „stapled peptides“. Jedná se o stabilní α -helikální peptidy, které obsahují syntetický olefinický můstek vyčnívající na jedné straně helixu, v angličtině též označovaný jako „staple“. Struktura je znázorněná na Obrázku č. 2.2. Olefinický můstek se připravuje metathetickou reakcí.^[21]

Obrázek 2.2 Schématický znázorněná příprava „stapled“ peptidu pomocí metatzeží



Syntézu cyklických peptidů lze provádět jak v roztoku, tak i na pryskyřici. Na cyklizaci lineárních peptidů je v principu možné použít jakékoliv činidlo pro tvorbu amidové vazby. Nicméně platí, že cyklizace je pomalejší než normální tvorba amidu. Cyklizace v roztoku jsou obvykle doprovázeny konkurenčními reakcemi, jako například dimerizacemi a cyklodimerizace, které se potlačují velkým zředěním reakčních směsí; koncentrace jsou řádově 10^{-4} až 10^{-3} M. V případě syntézy na pryskyřici je situace jednodušší, protože intramolekulární reakce jsou preferovány před intermolekulárními reakcemi. V tomto případě se používá dostatečný přebytek cyklizačního činidla, což je však při syntéze na pevné fázi běžné.^[18]

Pro syntézu cyklických peptidů typu „head-to-tail“ na pevné fázi je charakteristický poněkud odlišný způsob věšení substrátu na pryskyřici, než je v peptidové chemii obvyklé. Z logiky věci vyplývá, že, první aminokyselina musí být navázaná na pryskyřici pomocí boční skupiny/řetězce, pokud má reagovat svým C-koncem.^[18]

2.1.3. Bicyklické peptidy

Speciální podskupinou cyklických peptidů jsou bicyklické peptidy. Obvykle se jedná o peptidy s intramolekulárním můstkem; výsledkem propojení ve vnitřní struktuře je peptid se sníženou konformační volností. Bicyklické peptidy mají vyšší metabolickou stabilitu než lineární a monocyklické peptidy. Nižší konformační volnost zlepšuje jejich afinitu k vazebnému místu (například na receptoru) a selektivitu. Zafixovaná konformace, také vede k nižší entropické penalizaci při iniciaci interakce s vazebným místem.^[19]

Celá řada bicyklických peptidů byla vyvinuta buď jako potenciální léčiva nebo jako přenašeče léčiv či jako látky pro analyticko-diagnostické postupy. Rychlý rozvoj výzkumu bicyklických peptidů byl umožněn vědeckým rozvojem z počátku 21. století,

díky kterému vznikly celé řady knihoven bicyklických peptidů účinných vůči enzymům, receptorům a též knihovny inhibitorů protein-proteinových interakcí.^[22]

Mnoho z přirozeně se vyskytujících bicyklických peptidů se používá jak v medicíně, tak i v aplikované medicíně. Typickým zástupcem takových peptidů jsou například romidepsin a bouvardin. V případě romidepsinu^[23] se jedná o malý bicyklický depsipeptid poprvé izolovaný z bakterie *Chromobacterium violaceum* a v současnosti schválený úřadem FDA (Federální Lékový Ústav USA) pro léčbu kožních T-buněčných lymfomů.^[22] Bouvardin^[24] je inhibitor translokace peptidyl-*t*-RNA používaný při léčbě rakoviny hlavy a krku a gliomu v kombinacích s radioterapeutickými a dalšími chemoterapeutickými léčbami.^[22, 25]

Úspěch dosažený s přirozeně se vyskytujícími bicyklickými peptidy inspiroval badatele k hledání syntetických bicyklických peptidů jako potenciálních vysoce účinných léčiv stejně jako potenciálních slibných výzkumných prostředků v biochemii. Pozoruhodnou vlastností bicyklických peptidů je jejich vysoká inhibiční potence (fungují jako vysoce účinné inhibitory enzymů); speciálně v případě mimobuněčných enzymů.^[22]

2.1.4. Cyklické peptidy s vlastnostmi CPP

V porovnání s nízko-molekulárními léčivy jsou peptidy vysoce selektivní, účinné a současně i relativně bezpečné a dobře snášené organismem. Z toho důvodu CPP nabízejí do budoucna mnohá slibná využití v oblasti biochemie a medicíny. Využití CPP při výzkumu a terapii bylo do současnosti omezeno kvůli jejich nízké odolnosti vůči proteolytické degradaci. Rovněž jejich nepříliš velká schopnost prostupovat buněčnou membránou představovala překážku v terapeutickém využití.^[10]

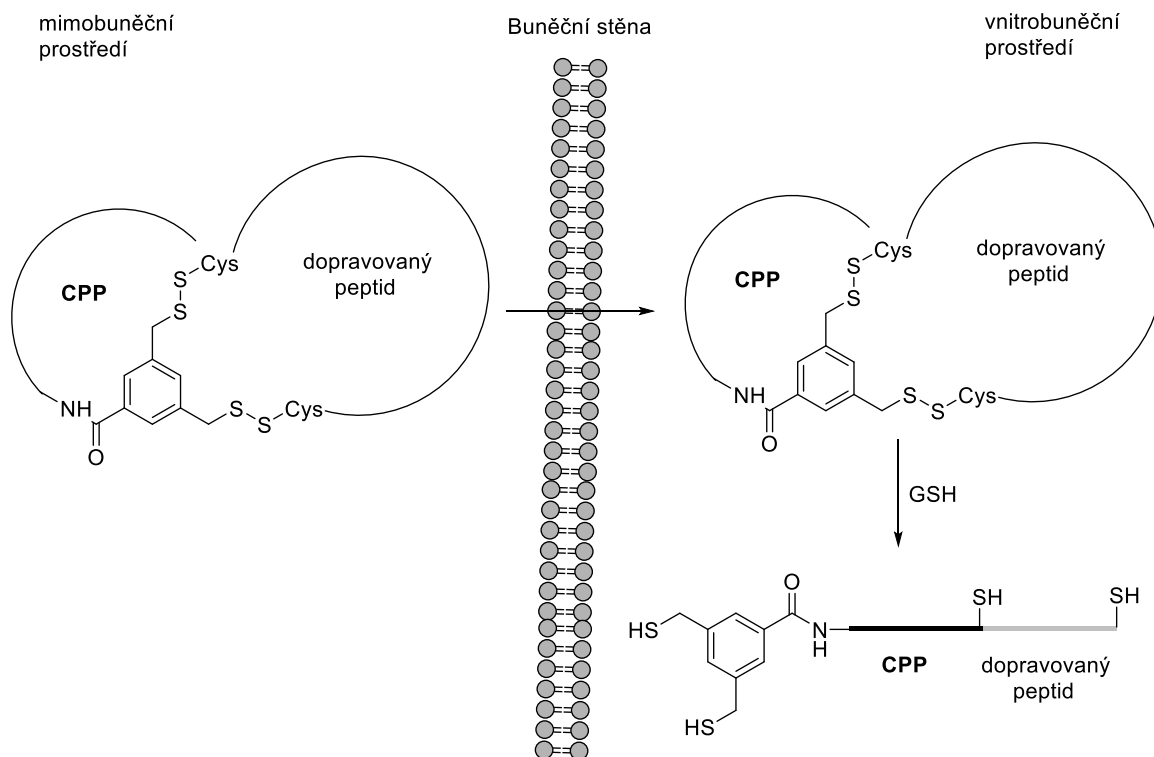
Jedním z velmi zajímavých cílů terapeutického zásahu CPP představuje inhibice protein-proteinových interakcí, neboť v této oblasti nízko-molekulární léčiva stále selhávají. Zvýšený zájem o peptidy vedl v poslední době k rozsáhlému výzkumu a vývoji v této oblasti. Dle otevřených zdrojů v současné době probíhají fáze klinických studií pro přibližně 140 různých peptidů.^[10]

Jednou ze strategií, jak u peptidů překonat jejich nevýhody, tedy nízkou nepropustnost přes membrány a hydrolytickou nestabilitu – je *N*-metylace peptidového řetězce (kostry) a formování intramolekulárních vodíkových vazeb. Alternativní způsoby představují vytvoření jednoho cyklického peptidu (monocyklického peptidu), který obsahuje jak sekvenci aktivního peptidu, tak sekvenci CPP anebo vytvoření bicyklického

peptidu. Jako slibnější se za tímto účelem ukázala strategie tvoření bicycklických peptidů, jejichž jeden cyklus představuje aktivní peptid a druhý buněčnou stěnou prostupující peptid (CPP). A to z toho důvodu, že v prvním případě (monocycklické peptidy) umožňuje tato strategie práci s pouze limitovanými velikostmi peptidů, neboť vede k tvoření větších cyklů, které ztrácí jak stabilitu, tak i schopnost prostupovat buněčnou membránou.^[10]

V nedávné době byl popsán způsob tzv. reverzibilní bicyklizace spočívající ve spojení CPP peptidu obsahující sekvenci FØRRRR (kde Ø je *L*-2-naftylalanin) s aktivním lineárním peptidem a následné bicyklizaci přes pár disulfidických můstků, jak je znázorněno na Obrázku č. 2.3. Tyto bicycklické peptidy jsou mimo buňku stabilní vůči proteolytické degradaci, přičemž po vstupu do buňky dochází účinkem buněčného glutathion (GSH) k redukci disulfidických můstků a rozpojení cyklů. Tím dojde v buňce ke vzniku lineární formy peptidu obsahujícího sekvenci aktivního peptidu. Tento elegantní způsob umožňuje navazování peptidů s delšími sekvencemi při zachování prostupnosti buněčnou membránou. Předpokládá se, že uvedený způsob by měl být aplikovatelný i pro transport libovolných lineárních peptidů.^[10]

Obrázek 2.3 Reverzibilní bicycklický peptid prostupující přes buněčnou membránu



Tato strategie založená na reverzibilních bicycklických peptidech se ukázala jako účinná i v případě aktivních peptidů, které jsou negativně nabitě a je o nich známo, že

samostatně nejsou vůbec schopny buněčnou stěnou prostupovat. Výzkum v této oblasti provedli a popsali v roce 2014 Hui Liao a Dehua Pei,^[26] když syntetizovali a otestovali buněčnou stěnou prostupující bicyklické peptidy inhibující T-buněčný protein tyrosin fosfatázu. K aktivnímu, ale buněčnou membránou neprostupujícímu peptidu inhibujícího enzym PTP1B, navázali CPP sekvenci (jako například FØRRRR, kde Ø je *L*-2-naftylalanin) a získali tak účinný bicyklický peptid. Vzniklý peptid prostupoval buněčnou membránou a zároveň si ponechal svojí inhibiční schopnost.^[27]

2.2. Protein-proteinové interakce

V buňkách i v celých tkáních dochází k neustálým interakcím mezi jednotlivými proteiny. Jako PPI (protein-proteinové interakce) označujeme však pouze takové interakce, které mají určitý specifický účel a jsou formovány v rámci míst vzájemného kontaktu specifickými silami. Hlavní rozlišovací, resp. identifikační znak pro určení protein-proteinové interakce je vzájemný kontakt proteinů identifikovaný pomocí rentgenostrukturních nebo NMR metod. Jisté závěry lze učinit i na základě takzvaného dockingu.^[28]

Proteiny běžně vytváří multivazebné komplexy, které se dynamicky vyvíjí v průběhu biologických procesů živých organismů. V rámci těchto komplexů navíc existují různé typy oblastí či míst vzájemného kontaktu, skrze něž jsou proteiny komplexu mezi sebou navázány, resp. mezi sebou interagují. Rozlišování typů funkčních kontaktů a typů spojení protein-proteinových komplexů je jednou z výzev pro výzkum na tomto poli.^[28]

K interakci protein-protein, respektive k vytvoření místa vzájemného kontaktu PP (interface) dochází na základě propojení nikoliv jen povrchu jednotlivých proteinů nebo proteinových komplexů, ale mezi postranními řetězci jejich aminokyselin, která představují uzavřené sekundární substrukтуры. Tato skutečnost byla potvrzena prací prof. Wellse, který ve zkoumaných místech kontaktu postupně nahrazoval jednotlivá aminokyseliny alaninem („alanine scanning“ technika), přičemž měřil rozdíly ve volné vazebné energii (Gibbsova energie) mezi původním kontaktem a modifikovaným místem kontaktu. Aminokyseliny,^[29] resp. jejich postranní řetězce, které vykazovaly pokles vazebné energie větší než 2 kcal/mol byly identifikovány jako klíčové pro utváření celkové nekovalentní PP interakce a metodicky byly označeny jako tzv. „hot spoty“. Následné výzkumy současně prokázaly, že pro utvoření silné PP interakce jsou důležitá i

některé aminokyseliny mimo „hot spot“ a to skrze jejich vnější/nepřímé působení – vytvářením prostředí pro vznik tohoto „hot spotu“.^[30]

PPI je možné rozdělit na několik typů: (i) na PPI homo-/ a hetero-oligomerních komplexů, (ii) PPI „non-obligate“ a „obligate“ komplexů, (iii) PPI přechodných a trvalých komplexů.^[31]

Homo – a hetero-oligomery jsou rozlišovány na základě symetrie vzniklého protein-proteinového komplexu. Přičemž v případě homo-oligomerů je nutné pro jejich další agregaci vytvořit nové místo vzájemného kontaktu, zatímco v případě hetero-oligomerů dochází k další agregaci automaticky až do dosažení stavu symetrie.^[31]

Stejně jako u skládání proteinových komplexů hovoříme o obligátních a neobligátních komplexech podle toho zda-li se protein dokáže správně zformovat (tzv. folding) sám o sobě, můžeme toto rozlišení uplatnit i na PPI. V případě obligátních PPI se jedná o takové PPI, jejichž promotéry (podjednotky – jednotlivé polypeptidové řetězce^[12]) se nenachází v samostatných stabilních strukturách a podílí se na esenciálních procesech. Například Arc repressor dimer je esenciální pro vazebnost DNA.^[32] U neobligátních PPI promotéry existují nezávisle jako například mezibuněčné signální komplexy nebo protilátka-antigen komplexy, a jsou samostatně stabilní.^[31]

PPI mohou být také rozlišeny z hlediska doby životnosti komplexů – existují trvalé i přechodné komplexy. Přechodné PPI, respektive PPI vyskytující se v přechodných komplexech mají tendenci se dynamicky měnit čili vázat a přeuspořádat se.^[31]

Při snaze o klasifikaci PPI jedním z výše uvedených způsobů, je nutno vzít v potaz skutečnost, že současné klasifikační metody jsou značně limitované a konkrétní (skutečné) PPI obvykle vykazují kombinace vlastností uváděných v jednotlivých klasifikačních třídách.^[31]

2.2.1. Inhibice interakce protein-protein

Na průběhu mnohých biologických procesů se neúčastní jednoduché proteiny, ale spíše proteinové komplexy. Biologická funkce proteinových komplexů závisí na jejich správné skladbě, a proto látky narušující protein-proteinové interakce potenciálně mohou mít vliv na biologickou funkci proteinového komplexu.^[33] Inhibice protein-proteinových interakcí má široké uplatnění v medicíně a ještě po dlouhou dobu nejspíše bude mít slibný výzkumný potenciál, ať už se jedná o inhibici vnitrobuněčného komplexu, jenž mají

největší potenciál v medicíně a nebo komplexu na buněčném povrchu. V současnosti existuje již několik na trh uvedených léčiv cílících na protein-proteinové interakce. Rovněž klinickými studiemi prochází řada slibných sloučenin, jejichž inhibiční účinek je založen na cílení PP interakcí. V neposlední řadě akademická sféra identifikovala řadu slibných cílů terapeutického zásahu spočívajících v narušení PP komplexů.^[34]

Jak již bylo zmíněno, nízkomolekulární sloučeniny nejsou schopny inhibovat PPI, jelikož PPI typicky zahrnují široká, plochá vazebná místa a nedisponují žádnou významnější vazebnou kapsou, která je v případě nízkomolekulárních sloučenin nutnou podmínkou jejich účinku. Nadto nízkomolekulární sloučeniny mají problém procházet buněčnou membránou. Cyklické peptidy o hmotnosti 700 – 2000 Da naproti tomu disponují jak schopností inhibovat PPI tak i schopností procházet buněčnou membránou; tedy disponují schopností inhibovat vnitrobuněčné PPI.^[35]

Inhibice vnitrobuněčné PPI pomocí farmaceuticky aktivní substance se dlouho pokládala za nemožnou. Avšak v poslední dekádě byly pomocí racionálního designu inhibitorů (structure-based design) a postupů opírajících se o existující knihovny peptidů navrženy a vyvinuty cyklické peptidy inhibující PPI.^[35]

V případech, kdy je PPI zprostředkována skrze konkrétní strukturní epitop (jako například α -helix, β -ohyb nebo peptidovou smyčku) na jednom z vazebných partnerů a zároveň je k dispozici i informace o struktuře, potom je racionální design cyklického peptidu inhibujícího PPI v zásadě proveditelný. Cyklický peptid samozřejmě musí napodobovat tvar a další strukturní rysy svého předobrazu, jenž vytváří inhibovaný PP komplex. Například v případě výskytu β -ohybu v místě vzájemné PP interakce musí navržený cyklický peptid napodobit tento ohyb. Jako konkrétní příklad lze uvést interakci Grb2 SH2, která je zprostředkována fosfotyrosinovým zbytkem v β -ohybu.^[22] Tento fakt byl prokázán zvýšenou afinitou vazebné domény vůči peptidu obsahujícího fosfotyrosin v β -ohybu; na základě čehož byl navržen vysoce účinný cyklický peptidový inhibitor proti interakci Grb2 SH2.^[36] Pro interface obsahující α -helix se ukázaly účinné tzv. „stapled peptides“ (již uvedené v kapitole Cyklické peptidy), jejichž struktura obsahuje stabilní α -helixy. Tyto α -helixy mají kovalentně propojené postranní řetězce aminokyselin v pozicích i a $i+4$ či $i+7$. Uvedené peptidy vykazují vysokou vazební afinitu k cílovým PPI, dobrou metabolickou stabilitu a v některých případech i zvýšenou schopnost pronikat buněčnou membránou. Z těchto důvodů se dá v následující dekádě očekávat využití objevených cyklických peptidů v klinické praxi. Nadto si cyklické peptidy stále udržují vysoký zájem v oblasti výzkumu inhibice PPI akademickou obcí.^[35]

2.2.2. Interakce PA-PB1 chřipkové RNA polymerasy

Virus chřipky je nejčastějším důvodem virové respirační infekce horní cest dýchacích. U zdravého dospělého člověka se jedná pouze o obtěžující onemocnění, avšak u určitých skupin lidí, jako například u kojenců, důchodců, dlouhodobě nemocných pacientů atd. může být chřipka život ohrožujícím onemocněním, obzvláště pokud se přidají i sekundárními infekce. Kromě zdravotního stavu a imunity hostitele, průběh onemocnění závisí i na kmenu chřipky. Existují tři typy viru chřipky, a to A, B a C, které se navzájem liší v antigenicitě jich nukleoproteinu (NP) a matrixového proteinu 1 (M1). Chřipka A napadá všechny savce a ptáky, zatím co chřipka B infikuje jenom lidi a tuleně.^[37]

Virus chřipky má jedno-vláknitý RNA genom organizovaný do osmi různých segmentů virové RNA (vRNA), které kódují deset virových proteinů. Každý segment je spojený vícenásobnými kopiemi NP a s RNA-dependentní RNA polymerasou (RdRP), čím se vytváří virový ribonukleoproteinový komplex (vRNP). RdRP v komplexu vRNP zabezpečuje aktivní transkripci a replikaci vRNA. Jedná se o velký heterotrimer skládající se z polymerasového proteinu (PA), polymerasového základního proteinu 1 (PB1) a polymerasového základního proteinu 2 (PB2). Podjednotky komplexu RdRP jsou navzájem propojeny složitými PPI, přičemž PB1 podjednotka tvoří jeho tělo komplexu.^[37] Na transkripci a replikaci vRNA jsou nutné všechny tři podjednotky komplexu RdRP, což nám dává možnost vhodnou inhibicí PPI potlačit funkce celého komplexu.^[38]

V komplexu RdRP je možné inhibovat tři PPI, a to PB1-PB2, PA-PB2 a PA-PB1. Dosud se prokázalo, že jenom interakce PA-PB1 je inhibovatelná jak peptidy, tak i nízkomolekulárními látkami. Komplex RdRP je přítomný v téměř nezměněné podobě u všech typů chřipky, a proto předpokládáme, že inhibitory ú interakce PA-PB1 podjednotek budou aktivní u A i B subtypu chřipky.^[37]

Dle výsledků rentgenostrukturní analýzy PA podjednotka interaguje svým C-koncem s N-koncem PB1 podjednotky.^[39] Komplex obou podjednotek je vysoce odolný vůči štěpení chymotrypsinem nebo trypsinem pravděpodobně z toho důvodu, že podjednotka PA je chráněná interakcí s PB1. Místo vzájemného kontaktu PA-PB1 podjednotek obsahuje hlavně hydrofobní aminokyselinové zbytky, které navzájem interagují Wan der Waalsovými silami. Polární interakce, jako například Coulombické

interakce, nemají výrazný vliv na tuto konkrétní PPI.^[40] Další důležitou interakcí v místě vzájemného kontaktu představují vodíkové můstky, hlavně mezi atomy hlavního řetězce.^[39]

Z rentgenostrukturní dat vyplývá, že podjednotka PA je složená ze dvou domén spojených spojkou. Guu a kolektiv^[38] uvádějí, že první doména obsahuje 256 aminokyselin od N-konce a označuje se N-PA, druhá doména je složená z aminokyselin v pozicích mezi 277 až 716 a označuje se jako C-PA. Spojka mezi oběma doménami obsahuje dvacet aminokyselin. Doména C-PA tvoří rozsáhlou interakci s PB1, zatímco doména N-PA interaguje s PB1 jenom omezeně.^[38] V interakci PA-PB1 byl pomocí alaninového skenování identifikováno několik „hot spotů“. U podjednotky PA je jsou to aminokyseliny Ttp706, Phe710, Phe411, Asn412, Gln408, Gln670, Leu666, Leu640 a sekvence aminokyselin 619-623. U podjednotky PB1 byly identifikovány aminokyseliny Val3, Asn4, Pro5, Leu7, Leu8, Phe9, Leu10 jako ty části řetězce, jenž se dají označit termínem „hot spot“.^[39]

V roce 2007 Schwemmle a kol. popsal peptid účinně inhibující interakci PA-PB1 na základě využití hot-spotů. Popsaný peptid má sekvenci PTLLFLK a strukturně se podobá helixu.^[1] Tento peptid dokumentuje velký potenciál inhibice interakce PA-PB1 pomocí malých peptidů. Poslední dvě aminokyseliny sekvence peptidu tvoří vodíkové můstky, zatímco zbytek má hydrofobní povahu. Tento fakt představuje důležitou informaci pro vývoj inhibitorů interakce PA-PB1, a proto se peptid PTLLFLK stal důležitým vodítkem pro vývoj léčiv proti chřipce A.^[39]

2.3. Syntéza peptidů

Peptidy patří mezi přirozeně se vyskytující biomolekuly. Od jejich první identifikace si člověk uvědomil potenciál peptidů pro možné ovlivňování základních biologických funkcí. Přirozeně se vyskytující peptidy vykazují vysokou vazebnost v biochemických procesech savčích buněk, avšak vykazují také nízkou stabilitu – jsou v průběhu procesů odbourávány. Racionální úvaha tedy snadno vede k závěru, že bio/chemie peptidů slibuje vysoký výzkumný a lékařský potenciál v případě, že se podaří syntetizovat takové peptidy, které neztratí svoji schopnost ovlivňovat biochemické procesy organismu, a přitom budou dostatečně stabilní ve fyziologickém prostředí.^[18]

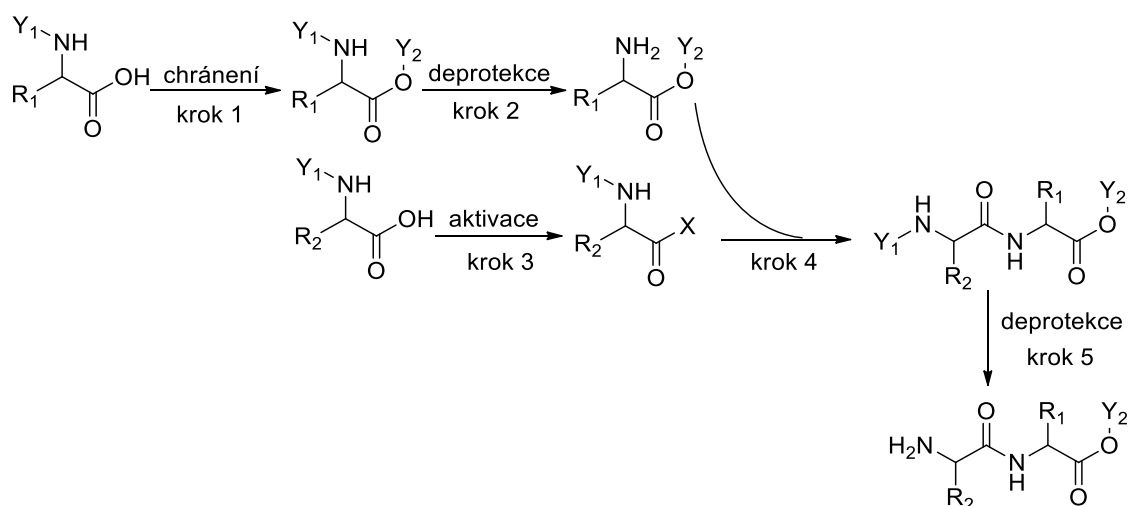
2.3.1. Syntéza peptidů v kapalně fázi

V padesátých a šedesátých letech 20. století byly provedeny první syntézy přírodních peptidů v kapalně fázi. Například, první popsána syntéza oxytocinu byla provedena v roce 1953 skupinou du Vigneauda.^[41] Syntéza této prominentní sloučeniny představuje důležitý milník v chemii i biochemii a po zásluze byla za tento počín udělena Nobelova cena. V tomhle období byla popsána i první syntéza inzulínu,^[18] která trvala celé dva roky. Následně byla vyvinuta řada metod s jejich pomocí došlo k bouřlivému rozvoji chemie peptidů. Důležitým faktorem při rozvoji metod byla časová náročnost, výtěžek a čistota. Rovněž byly popsány metody založené na spojování delších fragmentů, které urychlily syntézu peptidů. Bylo publikováno mnoho činidel tvořící peptidové vazby, jejich výhody, limity použití a byly vyvinuty i nejobecnější postupy přípravy peptidů používané dodnes. Metodologie se také zaměřila na chránici skupiny, jak karboxylové skupiny a α -aminoskupin, tak i funkční skupiny na postranních řetězcích. Veškeré poznatky o syntéze peptidů v kapalně fázi byly později využity v syntéze peptidů na pevně fázi, kterou se blíže zabývají další podkapitoly. V dnešní době je syntéza peptidů v kapalně fázi rozsáhle zpracována, a proto v následujících řádcích bude jenom stručně uvedeno několik základních faktů, které jsou pro syntézu peptidů v kapalně fázi charakteristické.^[18]

Tvorba amidové vazby je poměrně jednoduchý chemický proces. Při syntéze peptidů se vychází z N^α chráněných aminokyselin, protože bez chránění jejich N-konce by i při syntéze dipeptidu vznikla směs různých lineárních a cyklických oligomerů. V případě aminokyselin obsahujících vedlejší funkční skupiny, jako například Ser, Thr, Tyr, Asp nebo Cys, je potřeba odpovídajícím způsobem chránit i tyto skupiny. Prvním krokem syntézy je ochránění α -karboxylové skupiny. Druhým krokem je deprotektace α -aminoskupiny, která se účastní tvorby peptidové vazby. Aby syntéza peptidů mohla být provedena za mírných podmínek je potřebná karboxylovou kyselinu aktivovat. Proto se v třetím kroku aktivuje COOH skupina té aminokyseliny, jenž se v dalším kroku naváže na první aminokyselinu s ochráněným N-koncem. Po sloučení obou látek vznikne dipeptid. Dalším krokem syntézy peptidu je odštěpení chránicí skupiny z α -aminoskupiny dipeptidu. Základní schéma syntézy peptidů je uvedeno na Obrázku č. 2.4. Opakováním kroků 3 až 5 se prodlužuje peptidový řetězec. Nakonec je potřeba ochránit C-konec peptidu a v případě, kdy byly použity aminokyseliny s vedlejšími funkčními skupinami, ochránit také postranní řetězec peptidu. Syntéza peptidů může probíhat i spojováním

celých segmentů při použití téhož postupu až na to, že místo jednoduchých aminokyselin se používají menší peptidy. Tento postup se využívá na syntézu peptidů a segmentů do přibližně pěti aminokyselin.^[18]

Obrázek 2.3 Schematicky znázorněná syntéza peptidů, Y_1, Y_2 = chránicí skupiny, R_1, R_2 = bočné řetězce



Při syntéze peptidů v kapalně fázi může čištění a charakterizování meziproduktů probíhat po každém kroku, díky čemuž je finální produkt vysoce čistý. Naneštěstí, syntéza v kapalně fázi vyžaduje značnou investici času a práce. Avšak při syntéze několika fragmentů současně, popřípadě i několika pracovníky, je možné syntézu značně urychlit.^[18]

2.3.1.1. Aktivace

Jak již bylo uvedeno výše aktivace je nevyhnutelná pro tvorbu peptidické vazby za mírných podmínek při laboratorní teplotě. Aktivace karboxylové funkční skupiny nejen zvyšuje elektrofilitu $C=O$ reaktivní skupiny, ale především nahrazuje původní hydroxylový zbytek lepší odstupující skupinou. Díky tomu amidace probíhají velmi účinně i za laboratorních teplot. V současnosti existuje značné množství aktivačních činidel, přičemž většinu z nich lze použít při syntéze peptidů. Nicméně je třeba brát ohled i na zamezení racemizace a minimalizaci vedlejších reakcí. Mezi nejčastěji používaná aktivační činidla v syntéze peptidů patří HATU, HBTU, TBTU, PyBOP a DIC. Spolu s nimi se na potlačení racemizace používají HOBt nebo HOAt.^[18]

Aktivační činidla HATU, HBTU a TBTU patří do skupiny tzv. solí močoviny. Další výhodou těchto činidel je jejich dobrá dostupnost a nízká cena. Při reakci, jako vedlejší produkt vzniká tetramethylmočovina, kterou lze jednoduše odstranit extrakcí. Aktivace probíhá s anionem kyseliny, který nejčastěji vzniká reakcí s aminokyselinou s organickouází jako například s triethylaminem nebo DIPEA.^[18]

Aktivační činidlo HATU je strukturálně velmi blízkým analogem k HBTU, ale poskytuje větší výtěžek produktu s menším rozsahem racemizace. Nevýhodou je podstatně vyšší cena tohoto činidla.^[18]

Činidlo DIC je derivátem karbodiimidu a představuje nástupce činidla DCC, jenž šedesátých až osmdesátých letech bylo hlavním aktivačním činidlem používaným při přípravě peptidů. Jako vedlejší produkt při reakci karbodiimidu DIC vzniká di-*iso*-propylmočovina, kterou lze relativně snadno odstranit.^[18]

2.3.1.2. Chránění

Pro úspěšné provedení peptidové syntézy je klíčové i takticky správně zvolené chránění α -aminoskupin, C-konce a postranních řetězců aminokyselin. Všechny chránicí skupiny musí být stabilní po celou dobu syntézy, přičemž chránicí skupina na α -aminoskupinách musí být odstranitelná selektivně, tedy bez shození ostatních chránících skupin.

Pro všechny chránicí skupiny platí, že při jejich odchránění nesmí být narušena peptidová vazba a peptid nesmí racemizovat. S ohledem na skutečnost, že neexistuje univerzální chránicí skupina a jsou možné vzájemné kombinace chránících skupin, existuje několik syntetických přístupů k chránění. Navzdory této variabilitě v syntetických přístupech mezi nejpoužívanější patří chránění α -aminoskupiny skupinou Boc (*tert*-butyloxykarbonyl), chránění postranních aminoskupin pomocí Z chránicí skupiny (benzyloxykarbonyl), chránění karboxyskupin převedením na estery (nejčastěji methyl, ethyl, *tert*-butyl a benzyl), chránění alkoholů případně fenolů nejčastěji pomocí *tert*-butylu a chránění thiolů pomocí benzylu nebo acetamidomethylu.^[18]

Boc chránicí skupina je v obecném postupu syntézy peptidů nejdůležitější zejména s ohledem na její kompatibilitu s většinou chránících skupin a s většinou aktivačních metod. Na zavádění chránicí skupiny se nejčastěji používá anhydrid Boc₂O. Nicméně všechny proteogenní aminokyseliny jsou komerčně dostupné s ochráněnou α -aminoskupinou pomocí Boc takže zavádění Boc skupiny na aminokyseliny není zcela

běžné. Boc skupina je labilní v kyselém prostředí a standardně se na její odštěpení používá trifluoroctová kyselina (TFA). Boc skupina snáší katalytickou hydrogenaci, bazické prostředí a redukci v tekutém amoniaku. Výhodou Boc skupiny je snadná izolace produktu, neboť vznikající vedlejší produkty se odpaří.^[18]

Při syntéze komplikovanějších, cyklických anebo jinak modifikovaných peptidů je nutné strategii chránění navrhnout odlišně od obecného postupu a její promyšlený návrh je základem úspěšné syntézy cílové molekuly.^[18]

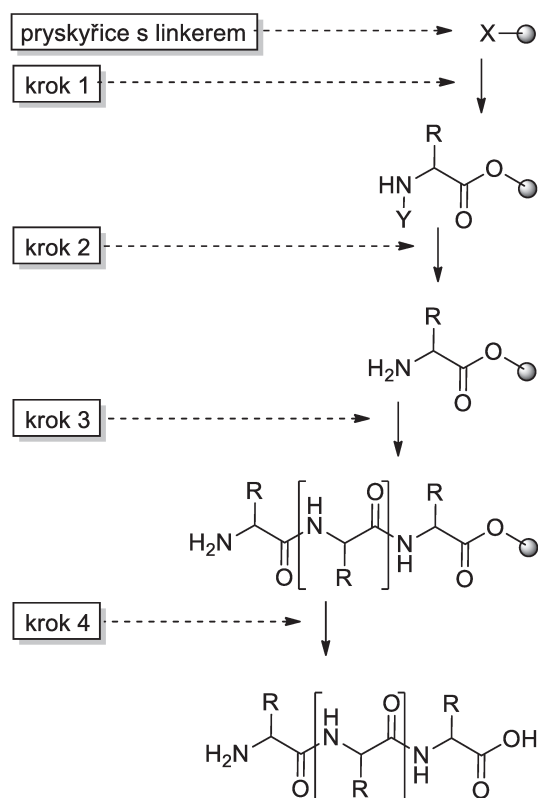
2.3.2. Syntéza peptidů na pevné fázi (SPPS)

V roce 1963 Robert Bruce Merrifield publikoval článek, ve kterém popsal novou metodu přípravy peptidů, dnes známou jako syntéza peptidů na pevné fázi (SPPS).^[42] Metoda se stala natolik významnou pro chemii, že za ní v roce 1984 byla udělena Nobelova cena.^[18]

Při SPPS se syntetizuje peptidový řetězec na polymerním nosiči (pryskyřice). Důležitým předpokladem pro navázání první aminokyseliny na polymerní materiál je přítomnost volné kotvící skupiny (linker). Během syntézy je nutné používat aminokyseliny s chráněnou α -aminoskupinou. V opačném případě by nebylo možné zaručit přesnou sekvenci peptidu. Elegantnost SPPS spočívá ve snadném oddělení meziproduktu od reaktantů a vedlejších produktů. Peptidový řetězec vzniká, respektive roste na nerozpustném polymerním nosiči, díky čemu se jednak snadno odfiltruje od rozpustných látek a též se dá promýt rozpouštědlem a tím se zbaví nežádoucích rozpustných látek.^[18] Obecný princip SPPS je ukázán na Obrázku č. 2.5.

Prvním krokem SPPS je navázání první aminokyseliny přes C-konec na linker (krok 1). Následně se z aminokyseliny selektivně odštěpí N-chránící skupina (krok 2), což umožňuje navázat další N^α chráněné aminokyseliny (krok 3). Kroky 2 a 3 se opakují až do získání požadované sekvence peptidu (krok 4). Nakonec se rozštěpí kovalentní vazba mezi peptidem a linkerem (krok 5). Rozpuštění volný peptid se od polymerního nosiče oddělí filtrací.^[18]

Obrázek 2.5 Princip syntézy na pevné fázi. Y = chránicí skupina, R = boční řetězec



2.3.2.1. Pryskyřice

Aby mohl být polymerní nosič použit v SPPS, musí být chemicky inertní, mechanicky stabilní a úplně nerozpustný v použitém rozpouštědle. Počet reaktivních míst na nosiči, na které se naváže první aminokyselina peptidu, musí být dostatečný, nicméně koncentrace těchto reaktivních míst má svůj přirozený limit jinak by mohlo docházet k nežádoucím interakcím/reakcím mezi peptidovými řetězci navázanými na pevném nosiči. Optimální stupeň substituce pryskyřice (koncentrace reaktivních míst) se pohybuje mezi 0,2 až 0,5 mmol na gram pryskyřice. Další důležitou podmínkou je, aby vazba mezi pryskyřicí a peptidem byla chemicky stabilní za podmínek syntézy.^[18]

Pryskyřice při kontaktu s rozpouštědlem nabobtná, čím může zvětšit svůj objem pěti – až šestinásobně.^[18] U většiny pryskyřic se čas úplného nabobtnání suché pryskyřice pohybuje do jedné hodiny.^[43] Suspenze pryskyřice v rozpouštědle nepředstavuje stabilní tuhou matici, ale spíše dobře pohyblivou gelovou fázi, což mimo jiné napomáhá přístupu reaktantů k reakčním místům na pryskyřici. Proto termín syntéza na pevné fázi je poněkud zavádějící a výstižnější by byl termín syntéza na gelové fázi.^[44]

Za posledních pár desetiletí se syntéza peptidů na pevné fázi stala standardní metodou, a proto bylo vyvinuto mnoho pryskyřic se specifickými vlastnostmi. Pryskyřice můžeme rozdělit do dvou základních skupin a to, jestli jsou labilní v kyselém nebo v bazickém prostředí. V dnešní době se preferují pryskyřice labilní v kyselém prostředí, protože umožňují vyšší modifikaci peptidů, vyplývající z taktiky chránění, která je rozebíraná v následujících kapitolách. Také existují pryskyřice, které po odštěpení poskytují buď klasický peptid, nebo amid peptidu, dokonce i alkohol peptidu. Také existují pryskyřice, které umožňují odštěpení plně chráněného peptidu či už ve formě kyseliny, amidu nebo alkoholu. Mezi ně patří i Sieberova amidová pryskyřice, labilní v mírně kyselém prostředí, což umožňuje odštěpení plně chráněného peptidu. Na odštěpení peptidu postačuje 1% roztok TFA v DCM. Sieberova amidová pryskyřice poskytuje amid peptidu.^[18]

2.3.2.2. Taktika syntézy na pevné fázi – výběr chránících skupin

Důležitým předpokladem pro úspěšnou SPPS je vhodně zvolená chránící skupina na α -aminoskupinách nacházejících se na N-konci. Zároveň je velmi důležité vybrat i vhodné chránící skupiny ostatních funkčních skupin postranního řetězce aminokyselin. Existují dvě základní taktiky chránění, které krátce přiblížím. V prvním případě se používá kombinace *tert*-butyloxykarbonylu a benzylu jako chránících skupin (Boc/Bzl) N-konce. Tato taktika je pojmenovaná podle Merrifielda. Druhý případ představuje kombinace fluorenyl-9-methyloxykarbonylu a *tert*-butylu (Fmoc/*t*Bu), také známá pod názvem Shepardova taktika. V posledních letech je preferovaná kombinace Fmoc/*t*Bu.^[18]

2.3.2.3. Merrifieldova taktika – Boc/Bzl

V Merrifieldově taktice se Boc skupina používá na chránění N^α-skupiny v kombinaci s benzylovou skupinou používanou na chránění postranního řetězce. Skupina Boc je labilní v silně kyselém prostředí nicméně například vytřepání s kyselým vodným roztokem nezpůsobí její odstranění. Štěpení Boc-skupiny se obvykle provádí účinkem 50% roztoku TFA v DCM. Alternativou k tomuto protickému systému je použití TMSOTf v kombinaci s Hunigovou bází. V Merrifieldově taktice je velice důležitá stabilita benzylové skupiny a vazby mezi pryskyřicí a peptidem za podmínek štěpení Boc-skupiny. Někdy se používají i další deriváty benzylu jako například 2,6-dichlorbenzyl

(2,6-Dcb), které jsou stabilnější. Pryskyřice používané při této metodě jsou na bázi chlormethylpolystyrenu nebo HMBA pryskyřice a PAM pryskyřice.^[18]

Na úplný závěr syntézy se provádí odštěpení produktu z pryskyřice a odchránění skupiny na postranních řetězcích. K tomu se používá roztok fluorovodíku a nejspíše právě fluorovodík zapříčinil odklon od Merrifieldovy taktiky, ačkoliv je v mnoha směrech lepší než níže popsaná Sheppardova taktika.^[45]

2.3.2.4. Sheppardova taktika – Fmoc/*t*Bu

V Sheppardově taktice se na chránění α -aminoskupiny používá fluorenyl-9-methoxykarbonylová skupina (Fmoc). Fmoc-skupina se odštěpuje v bazickém prostředí. Nejčastěji se k odstranění Fmoc skupiny používá 20% piperidin v DMF. V kombinaci s chránicí skupinou Fmoc se na chránění postranního řetězce používá *tert*-butylová skupina, která je naopak labilní v kyselém prostředí. Odštěpení *tert*-butylové skupiny probíhá za relativně mírných podmínek s TFA. V Sheppardově taktice se používají pryskyřice, u kterých je vazba mezi linkerem a peptidem labilní v kyselém prostředí, jako například Rinkova amidová pryskyřice. Odštěpení z pryskyřice obvykle probíhá současně se štěpením *tert*-butylové skupiny.^[18]

3. Cíle práce

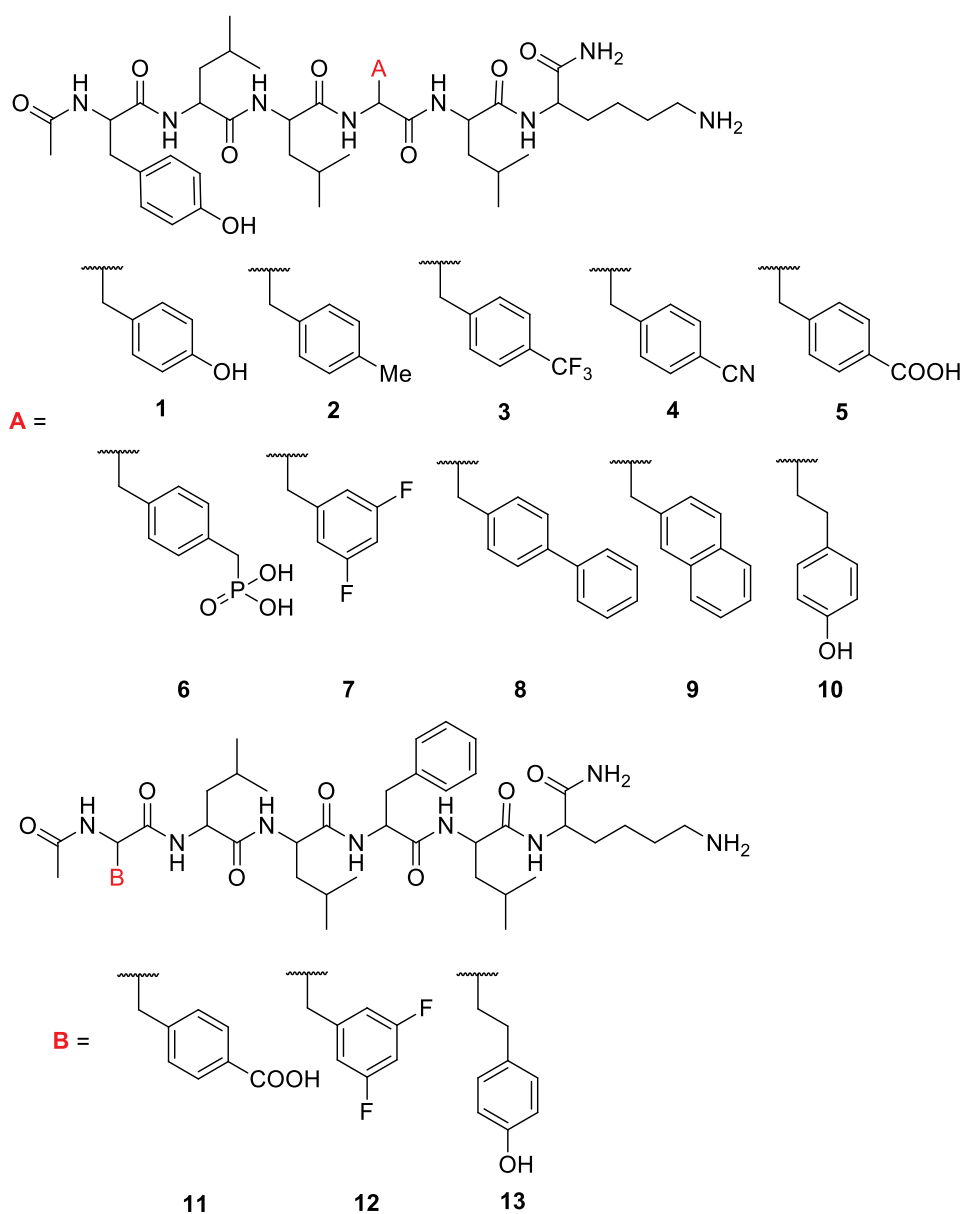
- Provést optimalizaci minimálního peptidu výměnou aminokyselin v hot spotu A a hot spotu B
- Připravit derivát 4-(fosfonomethyl)fenylalaninu
- Připravit centrální fragment navrženého bicycklického peptidu
- Připravit lineární sekvence navrženého bicycklického peptidu na pevné fázi a dále studovat za jakých podmínek lze provádět požadované cyklizační reakce

4. Výsledky a diskuse

4.1. Optimalizace minimálního peptidu

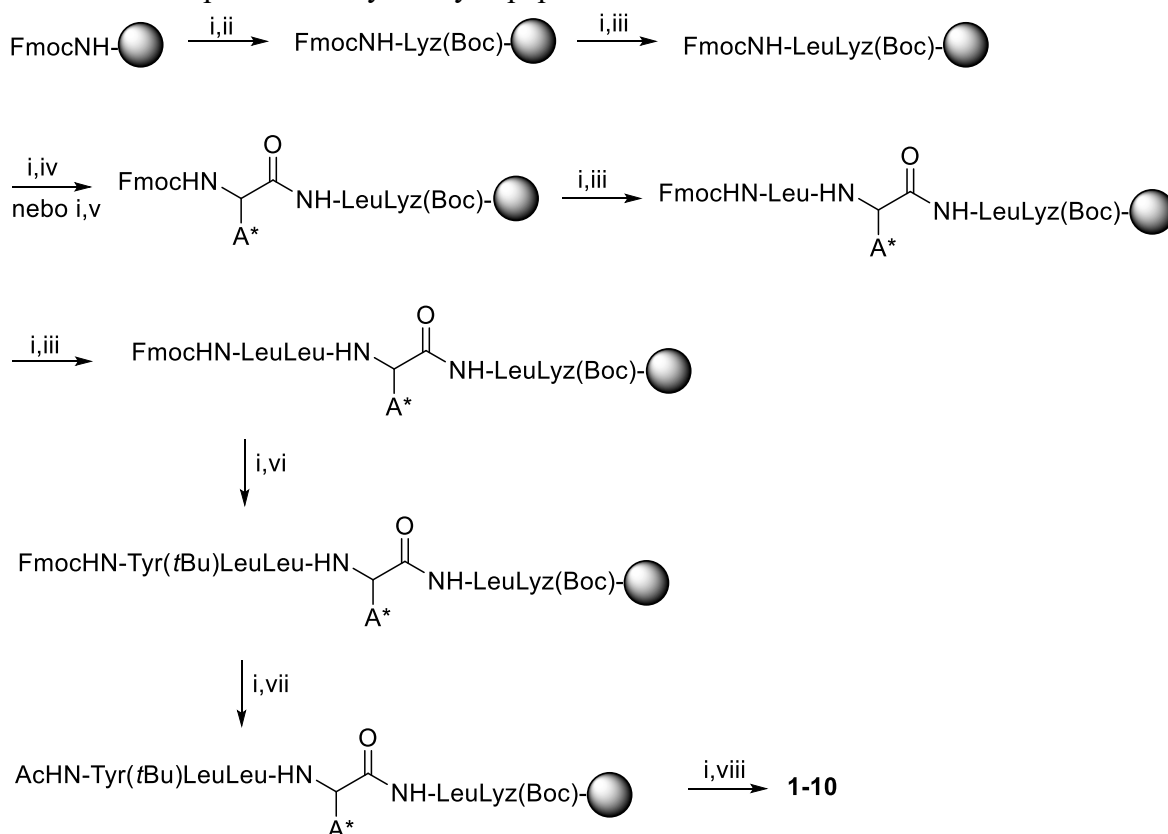
Cílem této bakalářské práce bylo připravit různé *N*-acetylované hexapeptidy inhibující interakci PA-PB1 podjednotek. Připravené peptidy je možné pro zjednodušení jejich popisu rozdělit do dvou sérií (Schéma 4.1). Peptidy první série se navzájem lišily v čtvrté aminokyselině od N-konce (hot spot A) a peptidy druhé série se lišily v první aminokyselině od N-konce (hot spot B). Jeden z peptidů obsahuje fosfátový derivát 4-methylfenylalaninu, jehož syntéza patřila též k cílům bakalářské práce.

Schéma 4.1 *N*-acetylované hexapeptidy navržené k přípravě



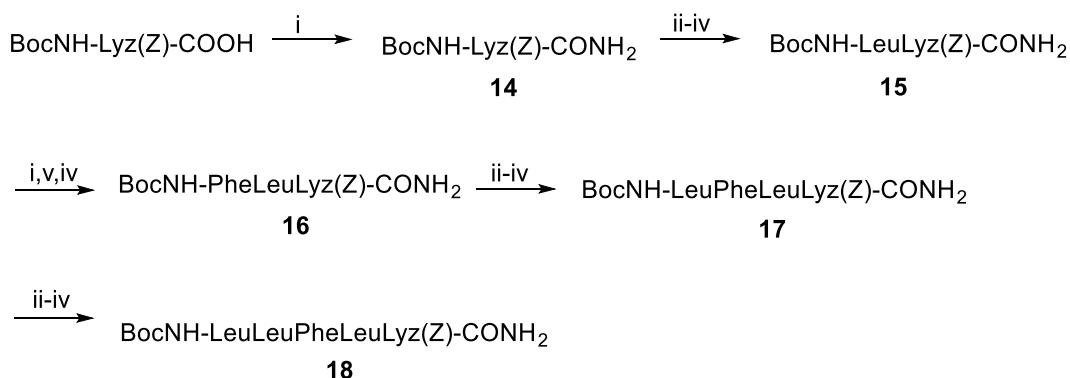
Peptidy **1-10** byly připravené na Rinkově amidové pryskyřici. Na tvorbu peptidové vazby bylo použito aktivační činidlo HBTU v bazickém prostředí NMM (Schéma 4.2). V případě peptidů **3** a **7** byla speciální aminokyselina aktivována pomocí činidla DIC s přídavkem HOBt a v bazickém prostředí DIPEA (Schéma 4.2). Při samotné syntéze byly dle zvyklostí z příprav peptidů na pevné fázi izolovány až konečné *N*-acetylované peptidy **1-10**. Čistota těchto produktů byla zkontrolována pomocí HPLC. Hmotnostní spektrometrie v kombinaci s HPLC (hi-res HPLC-MS technika) byla použita pro potvrzení správné struktury látek **1-10**, resp. pro potvrzení obsahu požadovaných aminokyselin.

Schéma 4.2 Příprava *N*-acetylovaných peptidů **1-10**



Činidla a podmínky: (i) piperidin, DMF; (ii) FmocNH-Lyz(Boc)-OH, TBTU, NMM, NMP; (iii) FmocNH-Leu-OH, TBTU, NMM, NMP; (iv) FmocNH-CH₂A*COOH, TBTU, NMM, NMP; (v) FmocNH-CH₂ACOOH, DIC, HOBt, DMF (v případě **3** a **7**); (vi) FmocNH-Tyr(*t*Bu)-OH, TBTU, NMM, NMP; (vii) CH₃COOH, DIC, HOBt, DMF; (viii) TFA, TIS, voda.

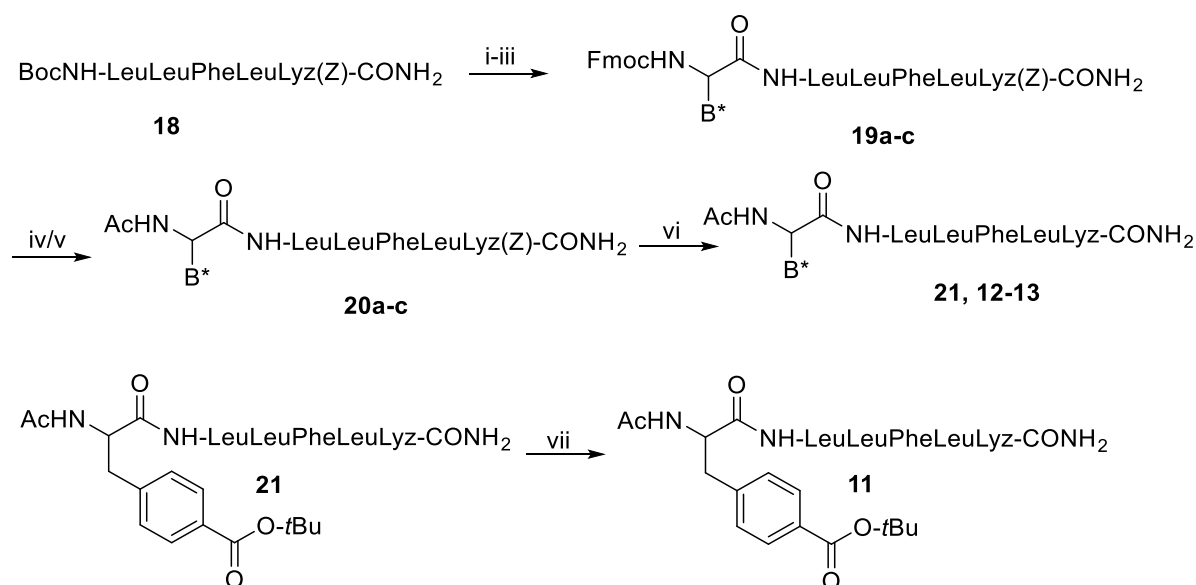
Druhá série *N*-acetylovaných peptidů (**11-13**) nebyla připravena na pryskyřici, ale v tomto případě byla zvolena klasická syntéza v roztoku. Nejprve byl připraven peptid **18** (Schéma 4.3). Jeho syntéza vycházela z chráněného lysinu, jehož C-konec byl nejprve převeden na amid kombinací aktivačního činidla TBTU a chloridu amonného jako zdroje amoniaku. Poté byla z N-konce odstraněna Boc chránicí skupina účinkem TFA a byl připojen N-chráněný leucin. Tento amidační kapling byl ukončen přidavkem 4-(2-aminoethyl)morfolinu, který nenavázaný, ale již aktivovaný leucin převedl na dobře rozpustný vedlejší produkt. Extrahovaná reakční směs byla promyta vodným roztokem 5% kyseliny chlorovodíkové a tak bylo zajištěno, že nenavázaný leucin, jenž zreagoval s derivátem morfolinu bude ze směsi odstraněn a nebude tedy nutné provádět kolonovou chromatografii surového produktu. Vzniklý peptid **15** byl znovu odchráněn účinkem TFA a na jeho volný N-konec byl připojen *N*-Boc chráněný fenylalanin stejným způsobem jako bylo popsáno výše. Analogickým způsobem byl zaveden další leucin. Tento krok byl ještě jednou zopakován, a tak byla získána sekvence intermediátu **18** se dvěma leucinovými fragmenty navázanými vedle sebe. Všechny intermediáty **14-18** byly izolovány a rovněž byly charakterizovány pomocí HPLC-MS techniky.



Na peptid **18** byly následně navázány speciální aminokyseliny hot spotu B (Schéma 4.4). Jako aktivační činidlo bylo opět použito TBTU v prostředí DIPEA. Po navázání speciálních aminokyselin na peptid **18** byla provedena deprotektace Fmoc-skupiny a současně i *N*-acetylace. Fmoc-skupina se štěpí v přítomnosti 4-

(dimethylamino)pyridinu (DMAP). V případě syntézy *N*-acetylovaného peptidu **13** byl na acetylaci použit Ac-OSu, protože přednostně acetyluje aminové funkční skupiny. Použitý Fmoc-homotyrosin totiž neměl chráněnou fenolovou funkční skupinu. V ostatních případech byl jako acetylační činidlo použit anhydrid kyseliny octové.

Schéma 4.4 Příprava *N*-acetylovaných peptidů **11-13** přes peptidy **19-21**

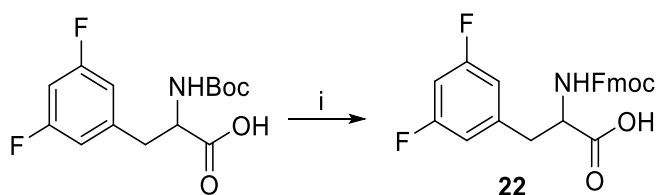


Činidla a podmínky: (i) TFA; (ii) FmocHN-CH₂B*-COOH, TBTU, DIPEA, DMF, rt, 3 h; (iii) 4-(2-aminoethyl)morfolin, rt, 30 min; (iv) DMAP, Ac₂O, DMF, rt; (v) DMAP, Ac-OSu, DMF, rt, (v případě látky **13**); (vi) H₂, Pd/C, EtOH, AcOH, rt, 3 h; (vii) TFA, DCM.

Finálním krokem příprav *N*-acetylovaných peptidů bylo hydrogenolytické štěpení *Z*-chránící skupiny z lysinu. Pro úplnost dodejme, že při syntéze peptidu **11** byl použit 4-(*tert*-butylkarboxy)fenylalanin, a proto bylo nutné provést ochrání postranní karboxylové funkční skupiny pomocí TFA.

N-Acetylovaný peptid **7** byl jako všechny ostatní peptidy připraven na Rinkově amidové pryskyřici, která je labilní v kyselém prostředí. Proto bylo nutné, aby použité aminokyseliny měly α -aminovou skupinu chráněnou Fmoc-skupinou, jenž se ochraňuje v bazickém prostředí. Protože byl k dispozici jen Boc-*L*-3,5-difluorfenylalanin, záměna chránících skupin byla nutná. Nejprve byla provedena deprotektace Boc-skupiny účinkem TFA a následně byla zavedena Fmoc chránící skupina činidlem Fmoc-OSu v přítomnosti hydrogen uhličitanu sodného (Schéma 4.5). Takto připravená aminokyselina **22** byla použita při syntéze peptidů **7** a **12**.

Schéma 4.11 Výměna chránicích skupinu na 3,5-difluorfenylalaninu

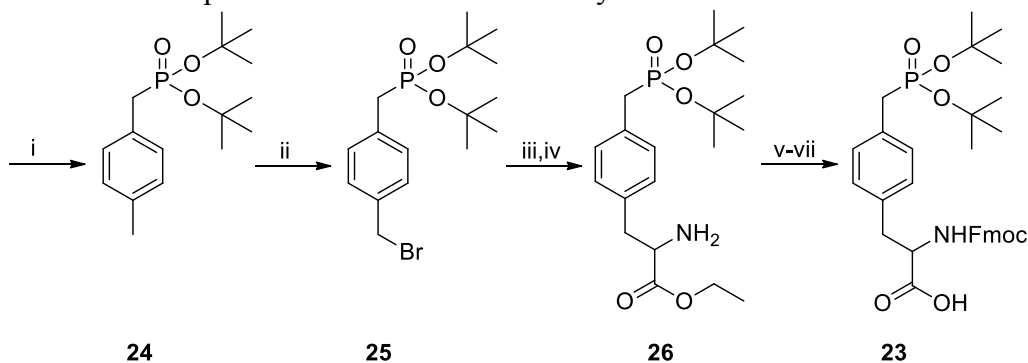


Činidla a podmínky: (i) TFA; (ii) Fmoc-OSu, NaHCO₃, dioxan/voda, rt, 12h.

4.2. Příprava 4-(fosfonomethyl)fenylalaninu

Pro syntézu *N*-acetylovaného peptidu **6** bylo nejprve nutné připravit odpovídající nepřírodní aminokyselinu **23**. Na její přípravu byl nejprve navržen sled chemických transformací, který je naznačen ve Schématu 4.6. Výchozí 1-brommethyl-4-methylbenzen reakcí s HPO₃(*t*Bu)₂ v přítomnosti hydridu sodného poskytl sloučeninu **24**. Při použití jednoho ekvivalentu fosforylačního činidla byl výtěžek reakce přibližně 70%, což bylo akceptovatelné.

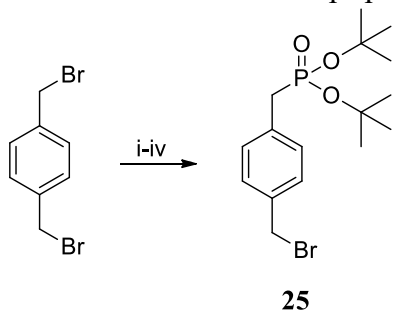
Schéma 4.6 Příprava fosfátového derivátu fenylalaninu **23**



Činidla a podmínky: (i) 1-brommethyl-4-methylbenzen, HPO₃(*t*Bu)₂, NaH, THF; (ii) NBS, kyseliny peroxobenzoová, CCl₄; (iii) sloučenina **27**, PhCH₂NMe₃OH, KI, dioxan; (iv) 5 % kyselina citronová, THF; (v) NaOH, voda, dioxan, 3h; (vi) HCl·Et₂O; (vii) Fmoc-OSu, DIPEA, 5h.

Dalším krokem reakční sekvence byla radikálová bromace benzylové polohy ve sloučenině **24**. Bohužel, tato reakce byla k mému překvapení neúspěšná a produkt byl identifikován pouze ve stopovém množství. Proto potřebný bromid **25** byl připraven alternativním postupem jenž je analogický přípravě látky **24** (Schéma 4.7). Výchozí α, α'-dibrom-paraxylen reakcí s HPO₃(*t*Bu)₂ a hydridem sodným v prvním pokusu o přípravu látky **25** poskytl produkt ve výtěžku 15 %.

Schéma 4.7 Alternativní příprava bromidu **25**

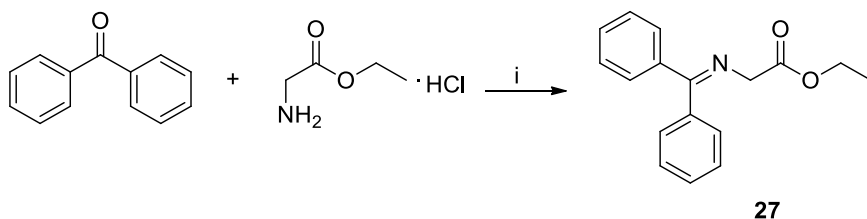


Činidla a podmínky: (i) $\text{HPO}_3(t\text{Bu})_2$, NaH, THF; (ii) $\text{HPO}_3(t\text{Bu})_2$, TBAI, K_2CO_3 , DMF; (iii) $\text{HPO}_3(t\text{Bu})_2$, $t\text{BuOK}$, THF; (iv) $\text{HPO}_3(t\text{Bu})_2$, $(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{NLi}$.

Reakce byla dále optimalizována a bylo postupně vyzkoušeno několik dalších bází. Substituce s použitím činidla $\text{HPO}_3(t\text{Bu})_2$, báze K_2CO_3 a za katalýzy s TBAI nevedla k vzniku produktu. Stejně tak i reakce s $\text{HPO}_3(t\text{Bu})_2$ s $t\text{BuOK}$ neposkytla bromid **25**. Reakce s použitím lithium bis(trimethylsilyl)amidu poskytla požadovaný bromid **25**, avšak ani po přečištění přes sloupec silikagelu nebyl bromid **25** dokonale čistý.

Sloučeninu **26** byla dle výše uvedeného syntetického plánu připravena reakcí bromidu **25** s glycinátem **27**, který byl připraven reakcí benzofenonu s ethyl-esterem glycinu (Schéma 4.8). Příprava glycinátu **27** byla katalyzována činidlem $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, ale tato na první pohled snadná reakce se ukázala být poněkud záludnou, především co se týče čištění produktu. Čistý glycinát **27** se nepodařilo nikdy připravit, protože krystalizace se nedařily. Látka **27** podléhá rozkladu na silikagelu a to vyloučilo kolonovou chromatografii jako vhodný způsob purifikace. Přibližný výtěžek glycinát **27** po chromatografii byl 6%. Nakonec byla tato sloučenina zakoupena od zahraničního dodavatele speciálních chemikálií.

Schéma 4.8 Příprava glycinátu **27**

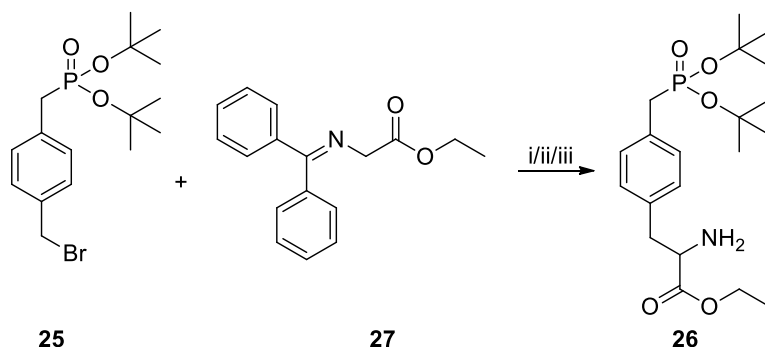


Činidla a podmínky: (i) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, toluen.

Příprava sloučeniny **26** byla dvoukrokovou transformací. V prvním kroku došlo k alkylation glycinátu činidlem **25**. Tato substituční reakce byla katalyzována jodidem

draselným a probíhala v bazickém prostředí. Před druhým krokem se odpařilo rozpouštědlo a provedla se extrakce toluenem. Bez dalšího čistění se žlutá olejovitá látka následně hydrolyzovala vodným roztokem kyseliny citronové. Avšak tato poněkud komplikovaná příprava sloučeniny **26** byla zprvu neúspěšná. Proto bylo vyzkoušeno několik alternativních postupů lišících se od sebe v druhu použité báze (Schéma 4.9).

Schéma 4.9 Substituční reakce bromidu **25** a glycinátu **27**

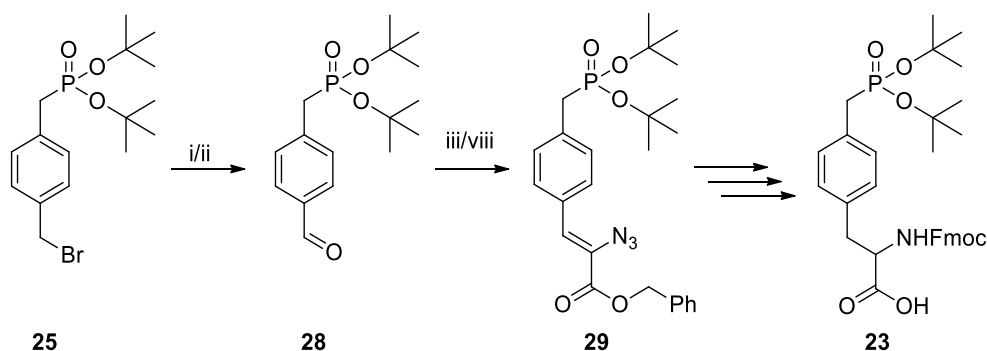


Činidla a podmínky: (i) PhCH₂NMe₃OH, TBAI, dioxan; (ii) (Me₃Si)₂Li, THF; (iii) Cs₂CO₃, CH₃CN.

V první reakci byl jodid draselný nahrazen za TBAI, což nevedlo k pozitivním výsledkům. V další reakci byla použita silná báze lithium bis(trimethylsilyl)amid v THF, ale ani tentokrát nebyla získána sloučenina **26**. Nakonec byla ještě vyzkoušená reakce s Cs₂CO₃, ale i v tomto případě nebyl získán požadovaný produkt.

K přípravě sloučeniny **23** byl následně vypracován odlišný syntetický přístup jehož klíčovým krokem nebyla alkylace glycinátu, ale Knoevenagelova kondenzace derivátu benzaldehydu s derivátem kyseliny octové (Schéma 4.10). Postup vycházel z bromidu **25**, který byl oxidován na benzaldehyd **28** pomocí několika odlišných způsobů. Nejprve byla vyzkoušena Kornblumova oxidace. Tato jmenná reakce je založena na reakci benzyloвого bromidu s dimethylsulfoxidem. Vzniklý adukt se následně účastní transformace, jenž se podobá Swernově oxidaci. Jinými slovy-nejprve báze odtrhne atom vodíku z methylové skupiny původně patřící molekule DMSO. Poté dojde k intramolekulární deprotonaci výše uvedeným C-anionem v benzylové poloze, což vede k eliminaci dimethylsulfidu a vzniku benzaldehydu. Navržená Kornblumova oxidace však v našem případě nevedla k požadovanému produktu **28**.

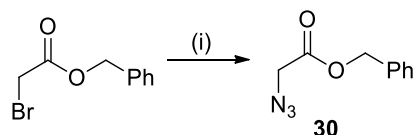
Schéma 4.10 Alternativní příprava látky **23** s klíčovou Knoevenagelovou kondenzací



Činidla a podmínky: (i) NaHCO_3 , DMSO; (ii) NMO, CH_3CN ; (iii) sloučenina **30**, $t\text{BuOK}$, THF; (iv) sloučenina **30**, DABCO, THF; (v) sloučenina **30**, MeONa, MeOH; (vi) sloučenina **30**, NaH, THF; (vii) sloučenina **30**, $t\text{BuOK}$, EtOH; (viii) azid **30**, Na, EtOH, 1h.

Proto byl použit jiný postup založený na reakci bromidu **25** s *N*-methylmorpholin-*N*-oxidu. Tato reakce byla nejen velmi snadná na provedení, ale i velmi účinná, pokud jde o výtěžek aldehydu **28**. Ten činil vždy minimálně 70%. V navrženém syntetickém postupu měl být derivát α -azidoskořicové kyseliny **29** připraven kondenzací aldehydu **28** s azidoacetátem **30**. Ten byl připraven substituční reakcí benzyl-bromacetátu s azidem sodným (Schéma 4.11). Reakce proběhla s 97% výtěžkem.

Schéma 4.11 Příprava azidu **30**



Činidla a podmínky: (i) NaN_3 , THF.

Ke kondenzaci aldehydu **28** s azidoacetátem **30** bylo použito několik reakčních podmínek (viz Schéma 4.10), avšak ani jedna nevedla k požadované sloučenině **29**.

Nakonec jsme znovu zkusili připravit sloučeninu **26** reakcí bromidu **25** s glycinátem **27**. Avšak v tomto případě byl místo připraveného glycinátu zjevně nevalné kvality použit komerčně dostupný glycinát. Reakce byla provedena v 1,4-dioxaně za použití báze $\text{PhCH}_2\text{NMe}_3\text{OH}$ a jodidu draselného jako katalyzátoru. Kontrola reakční směsi pomocí TLC poukazovala na odlišný průběh v porovnání s dříve provedenými, neúspěšnými pokusy. Surová sloučenina **25** byla poté hydrolyzovaná vodným

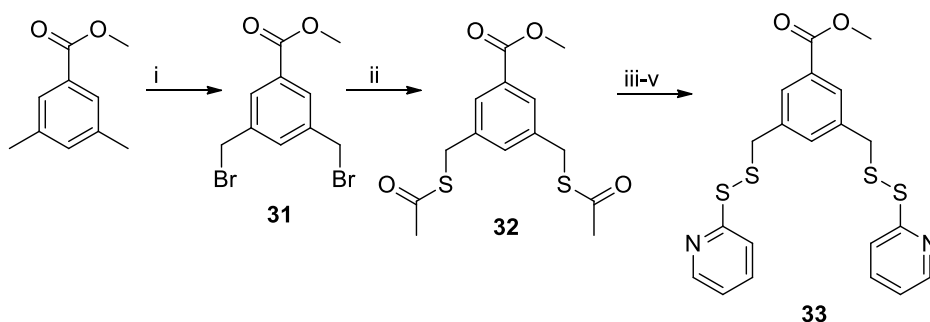
hydroxidem sodným. Po hydrolýze veškerého esteru bylo pH reakční směsi upravené pomocí roztoku chlorovodíku na neutrální. Posledním krokem bylo zavedení Fmoc chránicí skupiny účinkem činidla Fmoc-OSu, přičemž jako báze byl použit DIPEA.

Látka **23** byla připravena jako racemát. Pokusy o oddělení obou enantiomerů nebyly provedeny, protože jsme se spoléhali, že použití racemátu **23** v syntéze peptidu **6** povede k vzniku diastereomerní směsi, jenž by měla být separovatelná. K našemu potěšení distereomerní směs peptidu **6** byla skutečně separovatelná na preparativním HPLC a k změření inhibičních aktivit byly odevzdány dva čisté isomery peptidu **6**.

4.3. Příprava centrálního fragmentu bicyklického peptidu

Derivát benzoové kyseliny, který propojuje obě sekvence peptidů, tedy CPP část a část odpovědnou za inhibici interakce PA-PB1 podjednotek byl připraven dle již publikovaného postupu.^[10] Prvním krokem syntézy sloučeniny **33** byla radikálová bromace metyl-esteru kyseliny 3,5-dimethylbenzoové pomocí NBS s výtěžkem 58% (Schéma 4.12). Dibenzoyl peroxid byl použit pro iniciaci této radikálové bromace.

Schéma 4.12 Příprava centrálního fragmentu **33** bicyklického peptidu



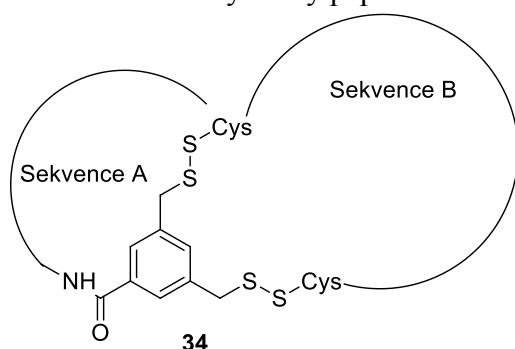
Činidla a podmínky: (i) NBS, dibenzoyl peroxid, CCl₄, Ar, reflux, o/n; (ii) KSAc, aceton, Ar, reflux, 3h; (iii) NaOH, MeOH, voda, o/n; (iv) HCl, voda; (v) 2,2'-dithiodipyridin, MeOH, kat. AcOH.

Dalším krokem syntézy byla reakce dibromidu **31** s thiooctanem draselným, která poskytla sloučeninu **32** v 62% výtěžku. Následná přeměna sloučeniny **32** na sloučeninu **33** byla dvoukroková. V prvním kroku byla provedena hydrolýza esteru a následně byly připraveny disulfidické můstky sloučeniny **33**. Látka **33** byla připravena v 70% výtěžku.

4.4. Design bicycklického peptidu

Dalším cílem práce bylo připravit bicycklický peptid **34**, jehož jeden cyklus tvoří sekvence CPP (FØRRRR, Ø: 2-*L*-naftylalanin) a druhý cyklus je tvořen sekvencí dekaeptidu (DYNPYLLFLK) inhibujícího interakci PA-PB1 podjednotek (Schéma 4.13). Jednotlivé sekvence jsou propojené pomocí disulfidických můstku cysteinů navázaných na centrální fragment, jenž je derivátem kyseliny benzoové (viz látka **33**).

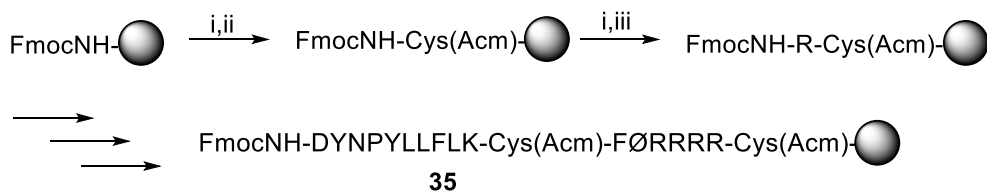
Schéma 4.13 Bicycklický peptid **34**



Sekvence A: DYNPYLLFLK, Sekvence B: FØRRRR, Ø: 2-*L*-naftylalanin.

Příprava bicycklického peptidu **34** vychází z odpovídajícího lineárního peptidu **35**, který byl připraven na Rinkově amidové pryskyřici pomocí peptidového syntetizátoru PS3 (Schéma 4.14). Na deprotekcí jak pryskyřice, tak i N-konců jednotlivých vzniklých peptidů byl použit 20% roztok piperidinu v DMF. Na navázání jednotlivých aminokyselin byl použit TBTU v NMP v bazickém prostředí NMM.

Schéma 4.14 Příprava peptidu **35**



Ø: 2-*L*-naftylalanin

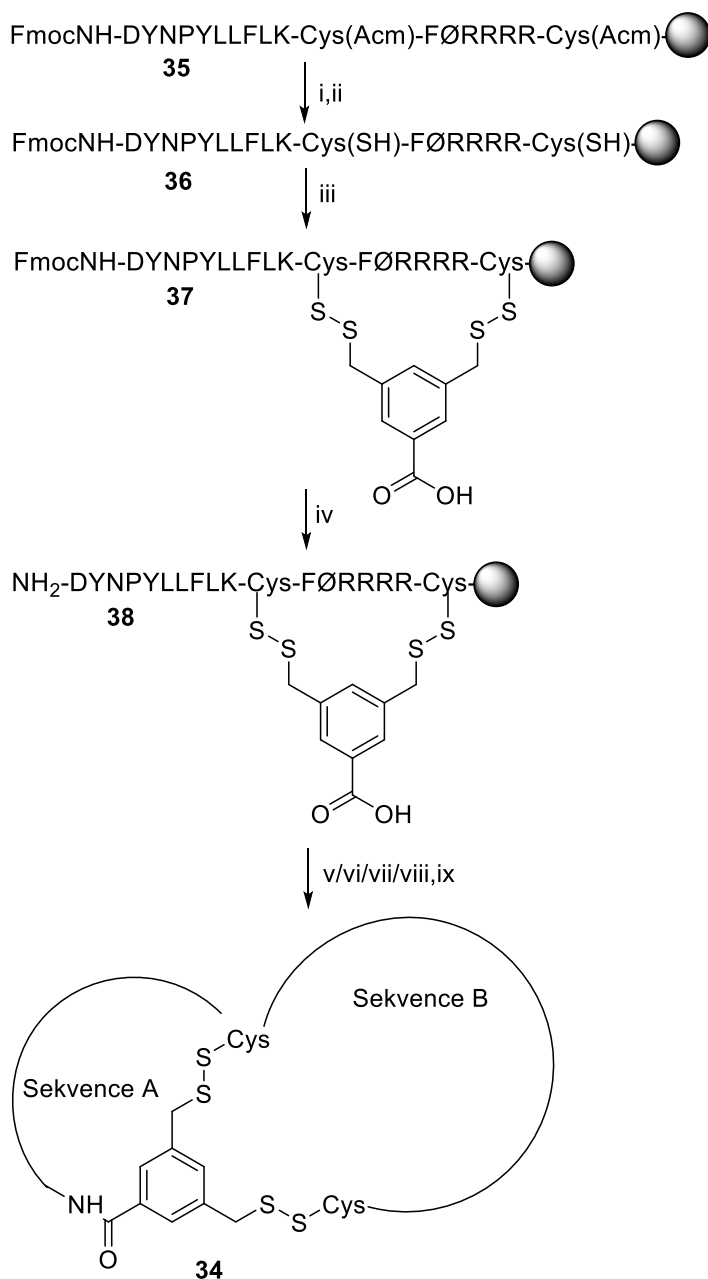
Činidla a podmínky: (i) piperidin, DMF; (ii) FmocNH-Cys(Acm)-OH, TBTU, NMM, NMP; (iii) FmocNH-Arg-OH, TBTU, NMM, NMP.

Můstek mezi jednotlivými cykly v bicycklickém peptidu **34** je tvořený derivátem 3,5-bis(thiomethyl)benzoové kyseliny. Aby se organický fragment mohl navázat na

lineární peptid **34**, bylo potřeba nejprve odštěpit chránicí skupiny na cysteinech. Na ochránění byl použit nasycený roztok octan rtuťnatý pod argonovou atmosférou, který se nechal třepat s peptidem na pryskyřici přes noc (Schéma 4.15). Potom se peptid promyl DMF a byl nechán dvakrát po dvě hodiny reagovat s 20% roztokem β -merkapt ethanolu v DMF, aby se rozrušily vzniklé disulfidické můstky. Vzniklý peptid **36** byl několikrát promyt DMF. Před navázáním organického fragmentu byl peptid promyt i methanolem, protože tento alkohol byl použit v dalším kroku. Sloučenina **33** byla rozpuštěna v methanolu s 1 % kyseliny octové, která slouží jako katalyzátor reakce, kterou bychom v uvozovkách mohli nazvat zkříženou disulfidací. Reakční směs byla třepána pod argonovou atmosférou přes noc. Navázáním sloučeniny **33** na peptid **36** vznikl peptid **37** obsahující jeden cyklus. Druhý cyklus se uzavírá vytvořením amidické vazby mezi N-koncem peptidu a karboxylovou skupinou navázaného organického fragmentu (viz látka **33**). Aby mohla amidická vazba vzniknout, byla odštěpená z N-konce Fmoc-skupinu pomocí 20% piperidinu v DMF. Na cyklizaci peptidu **38** bylo použito několik postupů, přičemž ani jeden nebyl úspěšný.

První s použitých postupů byl založen na aktivaci derivátu benzoové kyseliny pomocí HBTU, HOBt v bazickém prostředí DIPEA. Bohužel na karboxylovou skupinu organického fragmentu se navázal piperidin, který zůstal v peptidu přítomný po odchraňování Fmoc skupiny. V dalších pokusech byl peptid mnohonásobně promýván roztokem 20% DIPEA v DMF, aby byl odstraněn piperidin z peptidu a zabránilo se tak jeho navázání na karboxylovou skupinu. Dále na cyklizaci bylo vyzkoušeno kromě činidla HBTU i PyBrop, PyBop, DPPA. Bohužel, žádný z provedených experimentů neposkytl bicyklický peptid. Z analýzy reakční směsi pomocí HPLC-MS se nepodařilo zjistit jaká jiná reakce proběhla. Na uvedených cyklizacích se bude i nadále pracovat.

Schéma 4.15 Příprava bicycklického peptidu **34** s klíčovou cyklizací na Rinkově pryskyřici

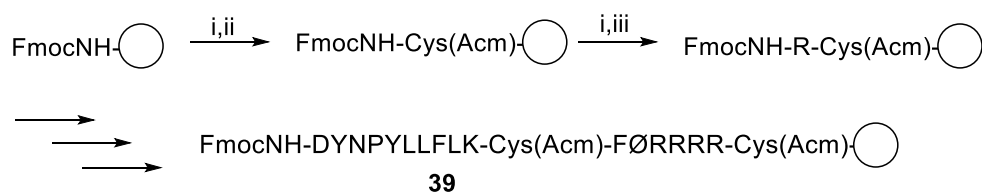


Ø: 2-*L*-naftylalanin

Činidla a podmínky: (i) $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, DMF, Ar, o/n; (ii) $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, DMF, 2h; (iii) sloučenina **33**, MeOH, kat. AcOH, Ar, o/n; (iv) piperidin, DMF, 20 min; (v) HBTU, HOBt, DIPEA, DMF, o/n; (vi) PyBroP, HOBt, DIPEA, DMF, o/n; (vii) PyBoP, HOBt, DIPEA, DMF, o/n; (viii) DPP, DIPEA, DMF, o/n; (ix) TFA, TIS, voda.

Protože se nepodařilo připravit bicyklický peptid cyklizací na Rinkově pryskyřici, byl navržen alternativní postup s klíčovou cyklizací v kapalně fázi. Odpovídající lineární peptid **39** byl připraven na Sieberově amidové pryskyřici (Schéma 4.16), která je labilní ve slabě kyselém prostředí. Díky tomu je možné odštěpit peptid z pryskyřice za podmínek, při kterých nedochází k odstranění chránících skupin ve struktuře peptidu. Peptid **39** byl připraven pomocí peptidového syntetizátoru, stejně jako v případě výše popsané syntézy peptidu **35**.

Schéma 4.16 Příprava peptidu **39**

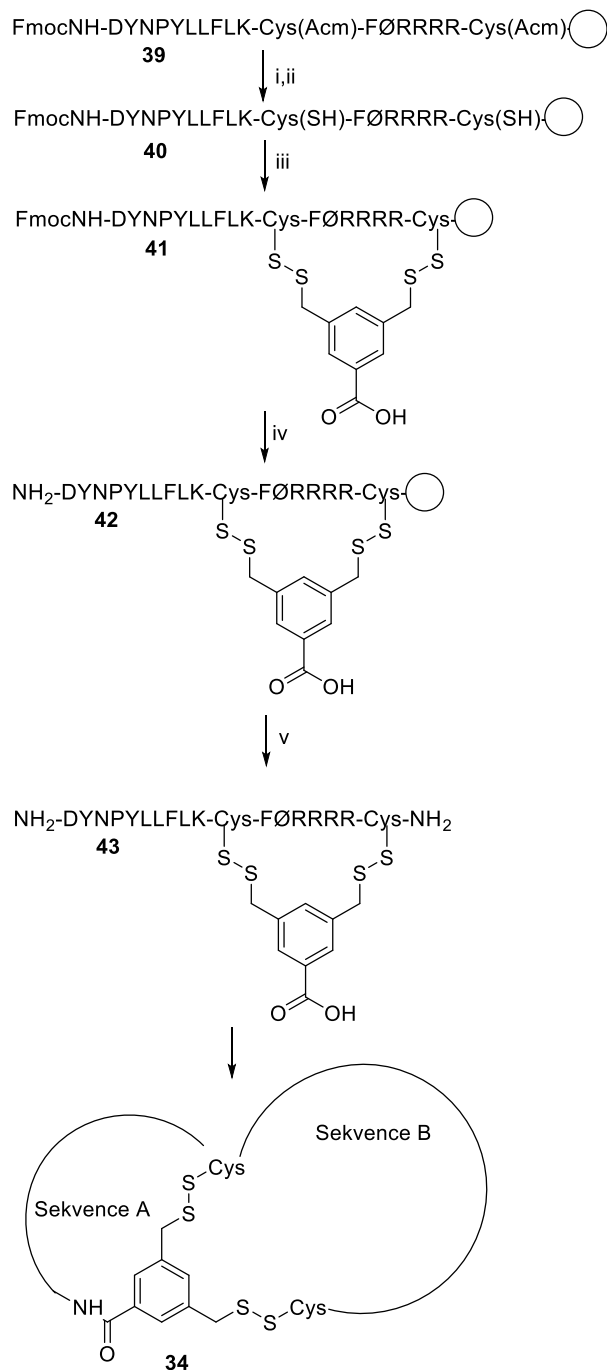


Ø: 2-*L*-naftylalanin

Činidla a podmínky: (i) piperidin, DMF; (ii) FmocNH-Cys(Acm)-OH, TBTU, NMM, NMP; (iii) FmocNH-Arg-OH, TBTU, NMM, NMP.

Postup práce při přípravě peptidu **39** byl tedy stejný jako u přípravy peptidu **35** až do momentu odštěpení chránící skupiny Fmoc (Schéma 4.17). Po tomto kroku byl peptid odštěpen z pryskyřice, čímž vznikl peptid **43** s chráněnými funkčními skupinami v postranních řetězcích. Pro odštěpení peptidu **42** ze Sieberovy amidové pryskyřice bylo postupováno dle doporučeného postupu (údaje od výrobce pryskyřice). Po dobu dvou minut byl peptid **42** protřepáván s 1% roztokem TFA v DCM a následně byl roztok vystříknut do 10% roztoku pyridinu v MeOH. Tento postup byl opakován desetkrát. Po odpaření spojených frakcí byl odparek vytřepán se směsí voda/DCM a organická vrstva byla oddělena a odpařena. Přítomnost peptidu **43** však nebyla pomocí HPLC-MS techniky potvrzena. Tato technika indikovala pouze přítomnost menších peptidů. Proč odštěpení z pryskyřice nebylo úspěšné se dosud nepodařilo zjistit.

Schéma 4.17 Příprava bicycklického peptidu **34** s klíčovou cyklizací v roztoku



Ø: 2-L-naftylalanin

Činidla a podmínky: (i) $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, DMF, Ar, o/n; (ii) $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, DMF, 2h; (iii) sloučenina **33**, MeOH, kat. AcOH, Ar, o/n; (iv) piperidin, DMF, 20min; (v) 1% TFA v DCM, 10% pyridin v MeOH.

5. Pracovní postupy

5.1. Použité přístroje a chemikálie

Všechny použité komerční rozpouštědla a reaktanty jsem použila bez úpravy, kromě THF, které jsem sušila pomocí směsi sodík-benzofenon a následně destilovala pod argonovou atmosférou. Pro měření ^1H a ^{31}P NMR spektra jsem měřila na Bruker AVANCE III HD 400 (^1H při 400 MHz). Vzorky jsem rozpouštěla v CDCl_3 nebo v $\text{DMSO}-d_6$. Peptidy byly syntetizovány pomocí peptidového syntetizátoru PS3, Protein Technologies, Inc. Reakční směsi byly analyzovány metodou HPLC-MS. Produkty byly charakterizovány pomocí metody HPLC-MS, kde použitý Agilent infinity 1260 v kombinaci TOF LC/MS analyzátozem 6230. Produkty jsem čistila pomocí preparativního HPLC za použití přístroje Agilent Infinity 1260 (průtok 10 mL/min, délka programu 50 minut) s reverzní stacionární fází C18 na koloně.

Při čistění sloupcovou chromatografií jsem použila silikagel 60 (0,063-0,100 mm, Merk) a na sledování průběhu reakce a sloupcové chromatografie jsem používala TLC hliníkové destičky (silikagel 60, F₂₅₄, Merk).

U syntézy peptidů pomocí SPPS jsem používala komerčně dostupné aminokyseliny s Fmoc-skupinou na α -aminoskupině, aminokyseliny s funkčními skupinami na postranních řetězcích měly chráněný i je (Fmoc-*L*-Lyz(Boc)-OH, Fmoc-*L*-Tyr(*t*Bu)-OH, Fmoc-*L*-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-*L*-Asp(*t*Bu)-OH, Fmoc-*L*-Asn(Trt)-OH, Fmoc-*L*-4-(karboxy-*terc*-butyl)fenylalanin).

5.2. Obecné postupy

5.2.1. PSSP

Na syntézu peptidů na pevné fázi byl použit peptidový syntetizátor PS3, přičemž bylo použito pět programů. Program 1 byl použit na jednoduchou tvorbu amidové vazby. Program 2 byl použit pro tzv. „double coupling“ aminokyselin, program 3 byl použit na odštěpení Fmoc-skupiny z α -aminoskupiny. Programy 4 a 5 se použili na navázání argininu, přičemž program 4 je ekvivalent programu 1 a program 5 je ekvivalent programu 5. Specifikace jednotlivých programů jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 5.1 Programy peptidového syntetizátoru PS3

Program	1 [min]	2 [min]	3 [min]	4[min]	5[min]
Solvatace	3x1	3x1 min	3x3 min	3x1	3x1 min
Deprotonace	2x10	2x10 min	2x10 min	2x10	2x10 min
Solvatace	6x1 min	6x1 min	6x1 min	6x1 min	6x1 min
Aktivace	1x2 min	1x2 min	-	1x4 min	1x4 min
Navázání aminokyseliny	1x30 min	1x30 min	-	1x30 min	1x30 min
Aktivace	-	1x2 min	-	-	1x4 min
Navázání aminokyseliny	-	1x30 min	-	-	1x30 min
Solvatace	3x1 min	3x1 min	-	3x1 min	3x1 min

Na solvataci bylo použito rozpouštědlo NMP. Na deprotekcii byl použit 20% roztok piperidinu v DMF a na aktivaci bylo použito 0,001 mol HBTU a roztok NMM v NMP. Pro navázání aminokyseliny na pryskyřici, resp. rostoucí peptidový řetězec bylo použito 0,001 mol aminokyseliny.

5.2.2. Acetylace na SPPS

Byl připraven roztok kyseliny octové (99,8 %, 6 eq.), HOBt (6 eq.) a DIC (6 eq.) v DMF (2 ml), který byl ponechán se třepat s peptidem na pryskyřici (1 eq.) podobu 4 hodin. Poté byla pryskyřice promyta DMF (3x3 ml) a DCM (6x3 ml).

5.2.3. Odštěpení peptidu z pryskyřice s následným odchráněním

Peptid na pryskyřici byl štěpen po dobu 1,5 hodiny v roztoku TFA (9,50 ml), TIS (0,25 ml) a vody (0,25 ml). Potom byla odfiltrována pryskyřice a získaný roztok byl odpařen proudem dusíkem. K tuhému odparku bylo nalito MTBE (50 ml), čímž byl peptid vysrážen. Odfiltrováním byl získán surový produkt.

5.2.4. Tvorba peptidové vazby v kapalně fázi

Po dobu 30 minut byla míchána směs aminokyseliny (1,1 eq.), TBTU (1,1 eq.) a DIPEA (3 eq.) v DMF (5 ml). Do reakce vstupující peptid (1,0 eq.) byl rozpuštěn v TFA (8 ml) a vznikl  směs byla míchána 30 minut. Poté bylo TFA odpařeno do sucha. Odparek byl rozpuštěn v toluenu a znovu byl odpařen. Tento postup se zopakoval ještě třikrát,  im  byla získána tuh  látka, která byla rozpu t n  v DMF (5 ml) a pomocí DIPA bylo upraveno pH na hodnotu p bli n  8.

P ipraven  roztoky byly smíchány dohromady, byla zkontrolována hodnota pH (p bli n  8) a směs byla dále 2 hodin míchána. Potom byl p idan  4-(2-aminoethyl)morfolin (0,1 eq.) a směs byla míchána dalších 30 minut. N sledn  bylo odpařeno rozpouštědlo a odparek byl rozpuštěn v EtOAc (20 ml). Roztok byl promyt s 5% HCl (2x10 ml), 10% K₂CO₃ (2x10 ml) a nakonec solankou. V další fázi byla zahu  t na organick  frakce do olejov t  konzistence a byl vysrážen peptid pomocí MTBE (30 ml). Peptid byl izolován filtrací,  im  se po vysu en  získal v sledn  surov  produkt.

5.2.5. Acetylace v kapalně fázi

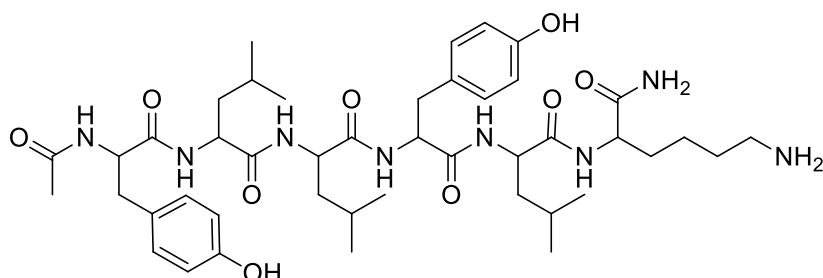
Peptid byl rozpuštěn v DMF (3 ml), bylo přidáno DMAP (5 eq.) a anhydrid kyseliny octov  (5 eq.). N sledn  reakční směs byla m chan  přes noc. Druhý den bylo odpařeno rozpouštědlo a odparek byl rozpuštěn v EtOAc (10 ml). Roztok byl promyt 5% HCl (2x 10 ml), 10% K₂CO₃ (2x 10 ml) a nakonec solankou. V další fázi byla zahu  t na organick  frakce do olejov t  konzistence a peptid byl vysrážen pomocí v MTBE (10 ml). Nakonec byl peptid izolován filtrací,  im  se po vysu en  získal v sledn  surov  produkt.

5.2.6. Reduktivní štěpení chránicí skupiny Z

Peptid byl rozpuštěn v roztoku ethanolu (20 ml) s kyselinou octovou (98%, 2 ml). Pod argonovou atmosférou bylo přidáno Pd/C (10 %) jako katalyzátor. Nakonec byla argonov  atmosféra nahrazena vodíkovou atmosférou za pou it  balónku a roztok byl intenzivn  míchán přes noc. Druhý den byla směs přefiltrována přes stříkačkový filtr a bylo odpařeno rozpouštědlo,  im  se získal surov  produkt.

5.3. Postupy

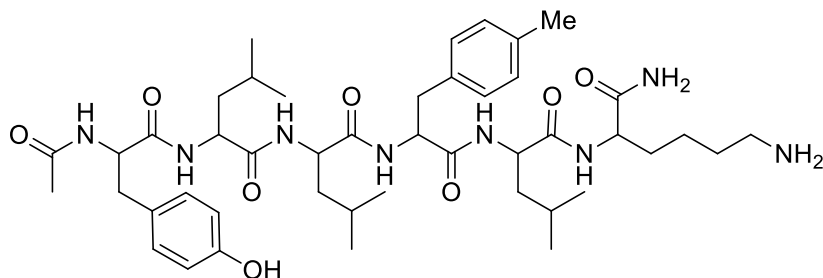
Peptid Ac-YLLYLK-NH₂ (1)



Rinkova amidová pryskyřice (0,74 mmol/g; 0,289 g; 0,214 mmol) byla navážena do reaktoru peptidového syntetizátoru. První čtyři aminokyseliny byly navázány pomocí programu 1. Pátá aminokyselina byla navázána programem 2 a poslední aminokyselina byla navázána pomocí programu 1. Nakonec z připraveného peptidu na pryskyřici byla odštěpená Fmoc-skupina programem 3. Peptid na pryskyřici byl z reaktoru syntetizátoru přenesen do stříkačky s fritou a acetylován obecným postupem: „Acetylace na SPPS“ s konkrétními hodnotami: kyselina octová (50 μ l, 0,878 mmol); HOBt (0,15 g; 0,980 mmol) a DIC (154 μ l; 9,95 mmol).

Na odštěpení peptidu z pryskyřice a ochránění vedlejších skupin byl použit obecný postup: „Odštěpení peptidu z pryskyřice s následným dochráněním.“ Po odštěpení byl peptid čištěn pomocí preparativního HPLC (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN $\rightarrow$ H₂O+0,1% TFA 30:80 ACN) a po lyofilizaci bylo získáno 0,08 g (42%) peptidu Ac-YLLYLK-NH₂.

Peptid Ac-YLLØLK-NH₂, Ø: *L*-4-methylfenylalanin (2)

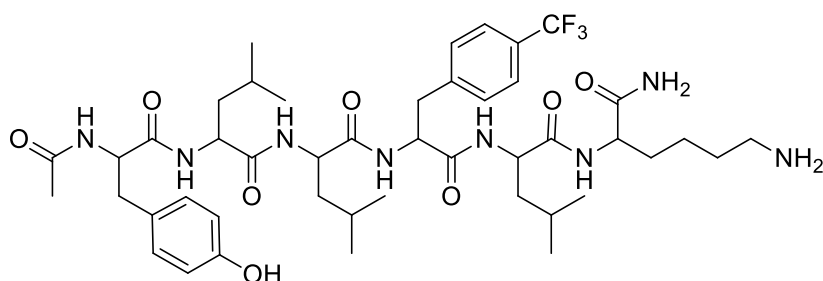


Rinkova amidová pryskyřice (0,74 mmol/g; 0,28 g; 0,206 mmol) byla navážena do reaktoru peptidového syntetizátoru. První čtyři aminokyseliny byly navázány pomocí programu 1. Pátá aminokyselina byla navázána programem 2 a poslední aminokyselina byla navázána pomocí programu 1. Nakonec z připraveného peptidu na pryskyřici byla

odštěpená Fmoc-skupina programem 3. Peptid na pryskyřici byl z reaktoru syntetizátoru přenesen do stříkačky s fritou a acetylován obecným postupem: „Acetylace na SPPS“ s konkrétními hodnotami: kyselina octová (50 μ l, 0,878 mmol); HOBt (0,15 g; 0,980 mmol) a DIC (154 μ l; 9,95 mmol).

Na odštěpení peptidu z pryskyřice a ochránění vedlejších skupin byl použit obecný postup: „Odštěpení peptidu z pryskyřice s následným dochráněním.“ Po odštěpení byl peptid čištěn pomocí preparativního HPLC (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN $\rightarrow$ H₂O+0,1% TFA 30:80 ACN) a po lyofilizaci bylo získáno 0,01 g (56%) Ac-YLLØLK-NH₂ (Ø: *L*-4-methylfenylalanin).

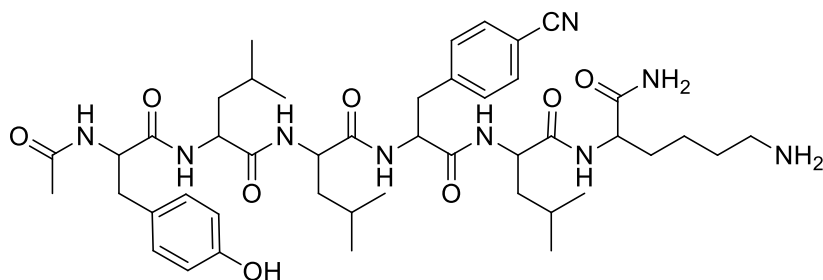
Ac-YLLØLK-NH₂, Ø: *L*-trifluormethylalanin (3)



Rinkova amidová pryskyřice (0,68 mmol/g; 0,15 g; 0,101 mmol) byla navážena do reaktoru peptidového syntetizátoru. První tři aminokyseliny byly navázány pomocí programu 1. Čtvrtá aminokyselina byla navázána ručně. Byl připraven roztok Fmoc-*L*-4-trifluormethylalaninu (0,08 g; 0,173 mmol), DIC (35 μ l; 0,226 mmol) a HOBt (0,03 g; 0,229 mmol) v DMF (2 ml), který byl třepán s peptidem přes noc. Další aminokyseliny byli znovu navázány pomocí stroje. Na navázání páté aminokyseliny byl použit program 2 a na navázání poslední aminokyseliny byl použit program 1. Nakonec z připraveného peptidu na pryskyřici byla odštěpená Fmoc-skupina programem 3. Peptid na pryskyřici byl z reaktoru syntetizátoru přenesen do stříkačky s fritou a acetylován obecným postupem: „Acetylace na SPPS“ s konkrétními hodnotami: kyselina octová (25 μ l; 0,439 mmol); HOBt (0,07 g; 0,457 mmol) a DIC (74 μ l; 0,478 mmol).

Na odštěpení peptidu z pryskyřice a ochránění vedlejších skupin byl použit obecný postup: „Odštěpení peptidu z pryskyřice s následným dochráněním.“ Po odštěpení byl peptid čištěn pomocí preparativního HPLC (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN $\rightarrow$ H₂O+0,1% TFA 30:80 ACN) a po lyofilizaci bylo získáno 0,05 g (52%) peptidu Ac-YLLØLK-NH₂ (Ø: *L*-trifluormethylalanin).

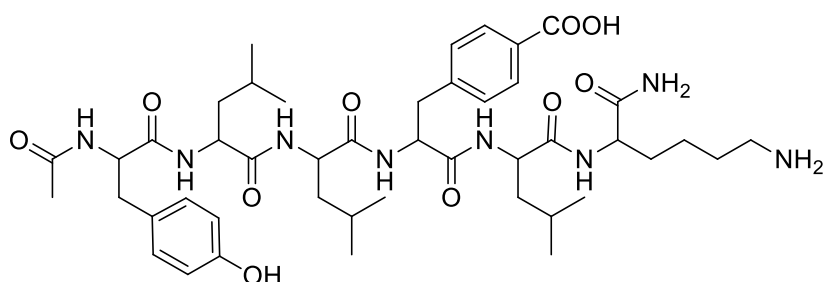
Peptid Ac-YLLØLK-NH₂, Ø: *L*-4-kyanofenylalanin (4)



Rinkova amidová pryskyřice (0,74 mmol/g; 0,25 g; 0,188 mmol) byla navážena do reaktoru peptidového syntetizátoru. První čtyři aminokyseliny byly navázány pomocí programu 1. Pátá aminokyselina byla navázána programem 2 a poslední aminokyselina byla navázána pomocí programu 1. Nakonec z připraveného peptidu na pryskyřici byla odštěpená Fmoc-skupina programem 3. Peptid na pryskyřici byl z reaktoru syntetizátoru přenesen do stříkačky s fritou a acetylován obecným postupem: „Acetylace na SPPS“ s konkrétními hodnotami: kyselina octová (50 µl, 0,878 mmol); HOBt (0,15 g; 0,980 mmol) a DIC (154 µl; 9,95 mmol).

Na odštěpení peptidu z pryskyřice a ochrání vedlejších skupin byl použit obecný postup: „Odštěpení peptidu z pryskyřice s následným dochráněním.“ Po odštěpení byl peptid čištěn pomocí preparativního HPLC (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN → H₂O+0,1% TFA 30:80 ACN) a po lyofilizaci bylo získáno 0,08 g (51%) peptidu Ac-YLLØLK-NH₂ (Ø: *L*-4-kyanofenylalanin).

Ac-YLLØLK-NH₂, Ø: *L*-4-karboxyfenylalanin (5)

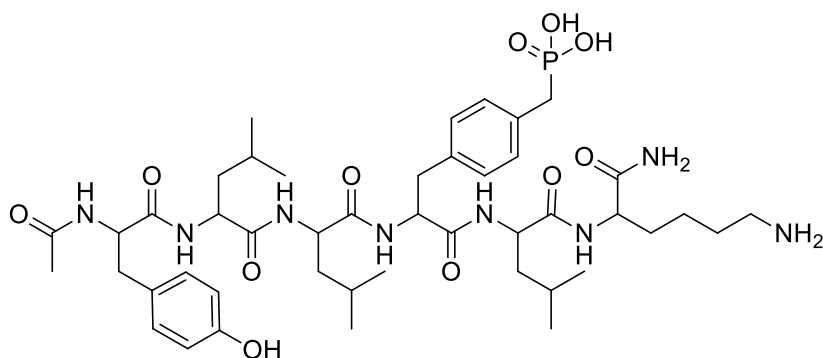


Rinkova amidová pryskyřice (0,68 mmol/g; 0,15 g; 0,099 mmol) byla navážena do reaktoru peptidového syntetizátoru. První čtyři aminokyseliny byly navázány pomocí programu 1. Pátá aminokyselina byla navázána programem 2 a poslední aminokyselina byla navázána pomocí programu 1. Nakonec z připraveného peptidu na pryskyřici byla odštěpená Fmoc-skupina programem 3. Peptid na pryskyřici byl z reaktoru syntetizátoru přenesen do stříkačky s fritou a acetylován obecným postupem: „Acetylace na SPPS“

s konkrétními hodnotami: kyselina octová (25 μ l; 0,439 mmol); HOBt (0,07 g; 0,457 mmol) a DIC (74 μ l; 0,478 mmol).

Na odštěpení peptidu z pryskyřice a ochránění vedlejších skupin byl použit obecný postup: „Odštěpení peptidu z pryskyřice s následným dochráněním.“ Po odštěpení byl peptid čistěn pomocí preparativního HPLC (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN $\rightarrow$ H₂O+0,1% TFA 30:80 ACN) a po lyofilizaci bylo získáno 0,042 g (48%) peptidu Ac-YLLØLK-NH₂ (Ø: L-4-karboxyfenylalanin).

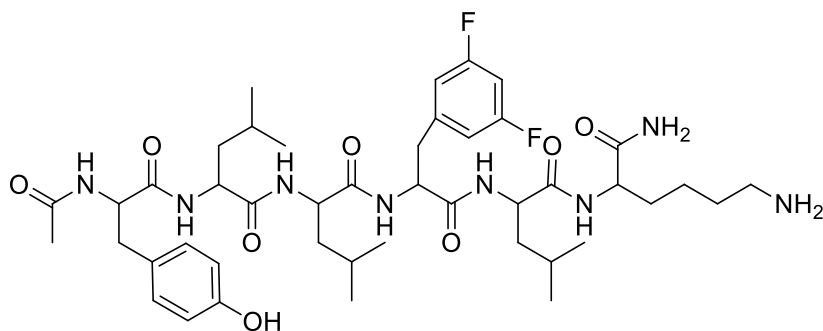
Ac-YLLØLK-NH₂, Ø: 4-(fosfonomethyl)alanin (6)



Rinkova amidová pryskyřice (0,71 mmol/g; 0,12 g; 0,085 mmol) byla navážena do reaktoru peptidového syntetizátoru. První tři aminokyseliny byly navázány pomocí programu 1. Čtvrtá aminokyselina byla navázána ručně. Byl připraven roztok sloučeniny **23** (0,03 g; 0,050 mmol), DIC (8 μ l; 0,052 mmol) a HOBt (0,01 g; 0,065 mmol) v DMF (2 ml), který byl třepán s peptidem přes noc. Další aminokyseliny byly znovu navázány pomocí stroje. Na navázání páté aminokyseliny byl použit program 2 a na navázání poslední aminokyseliny byl použit program 1. Nakonec z připraveného peptidu na pryskyřici byla odštěpená Fmoc-skupina programem 3. Peptid na pryskyřici byl z reaktoru syntetizátoru přenesen do stříkačky s fritou a acetylován obecným postupem: „Acetylace na SPPS“ s konkrétními hodnotami: kyselina octová (25 μ l; 0,439 mmol); HOBt (0,07 g; 0,457 mmol) a DIC (74 μ l; 0,478 mmol).

Na odštěpení peptidu z pryskyřice a ochránění vedlejších skupin byl použit obecný postup: „Odštěpení peptidu z pryskyřice s následným dochráněním.“ Po odštěpení byl peptid čistěn pomocí preparativního HPLC (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN $\rightarrow$ H₂O+0,1% TFA 30:80 ACN) a momentálně se peptid nachází lyofilizaci.

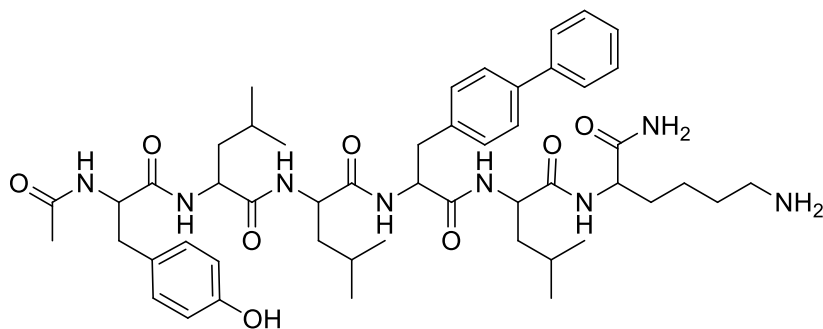
Ac-YLLØLK-NH₂, Ø: *L*-3,5-difluorfenylalanin (7)



Rinkova amidová pryskyřice (0,68 mmol/g; 0,151 g, 0,103 mmol) byla navážena do reaktoru peptidového syntetizátoru. První dvě aminokyseliny byly navázány pomocí programu 1. Třetí aminokyselina byla navázána ručně. Byl připraven roztok Fmoc-*L*-3,5-difluorfenylalaninu (0,08 g; 0,194 mmol), DIC (32 µl; 0,207 mmol) a HOBt (0,04 g; 0,229 mmol) v DMF (2 ml), který byl třepán s peptidem přes noc. Další aminokyseliny byly znovu navázány pomocí stroje. Na navázání páté aminokyseliny byl použit program 2 a na navázání čtvrté a poslední aminokyseliny byl použit program 1. Nakonec z připraveného peptidu na pryskyřici byla odštěpená Fmoc-skupina programem 3. Peptid na pryskyřici byl z reaktoru syntetizátoru přenesen do stříkačky s fritou a acetylován obecným postupem: „Acetylce na SPPS“ s konkrétními hodnotami: kyselina kyselina octová (25 µl; 0,439 mmol); HOBt (0,07 g; 0,457 mmol) a DIC (74 µl; 0,478 mmol).

Na odštěpení peptidu z pryskyřice a ochránění vedlejších skupin byl použit obecný postup: „Odštěpení peptidu z pryskyřice s následným dochráněním.“ Po odštěpení byl peptid čištěn pomocí preparativního HPLC (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN → H₂O+0,1% TFA 30:80 ACN) a po lyofilizaci bylo získáno 0,029 g (32%) peptidu Ac-YLLØLK-NH₂ (Ø: *L*-3,5-difluorfenylalanin).

Ac-YLLØLK-NH₂, Ø: 2-amino-3-(1,1'-bifenyl)propanová kyselina (8)

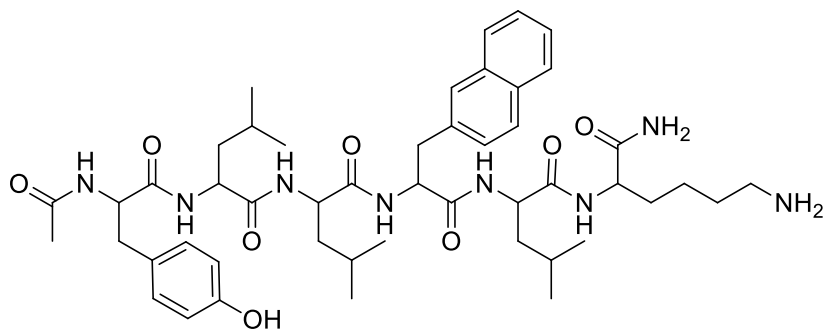


Rinkova amidová pryskyřice (0,68 mmol/g; 0,301 g, 0,205 mmol) byla navážena do reaktoru peptidového syntetizátoru. První čtyři aminokyseliny byly navázány pomocí

programu 1. Pátá aminokyselina byla navázána programem 2 a poslední aminokyselina byla navázána pomocí programu 1. Nakonec z připraveného peptidu na pryskyřici byla odštěpená Fmoc-skupina programem 3. Peptid na pryskyřici byl z reaktoru syntetizátoru přenesen do stříkačky s fritou a acetylován obecným postupem: „Acetylace na SPPS“ s konkrétními hodnotami: kyselina octová (50 μ l, 0,878 mmol); HOBt (0,15 g; 0,980 mmol) a DIC (154 μ l; 9,95 mmol).

Na odštěpení peptidu z pryskyřice a ochránění vedlejších skupin byl použit obecný postup: „Odštěpení peptidu z pryskyřice s následným dochráněním.“ Po odštěpení byl peptid čištěn pomocí preparativního HPLC (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN $\rightarrow$ H₂O+0,1% TFA 30:80 ACN) a po lyofilizaci bylo získáno 0,112 g (60%) peptidu Ac-YLLØLK-NH₂ (Ø: 2-amino-3-(1,1'-bifeny)propanová kyselina).

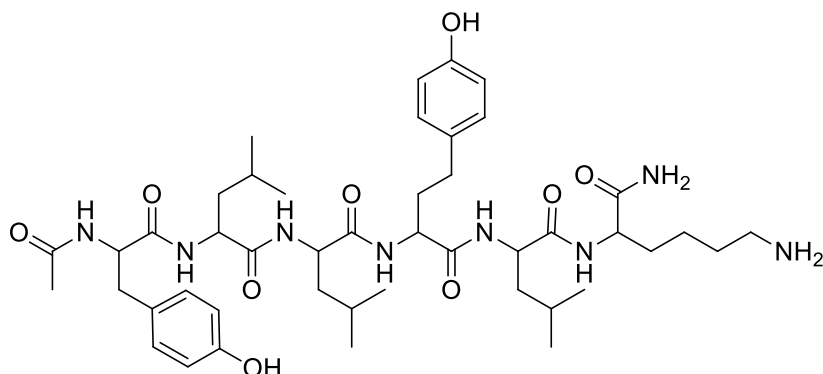
Peptid Ac-YLLØLK-NH₂, Ø: *L*-2-naftylalanin (9)



Rinkova amidová pryskyřice (0,68 mmol/g; 0,31 g, 0,209 mmol) byla navážena do reaktoru peptidového syntetizátoru. První čtyři aminokyseliny byly navázány pomocí programu 1. Pátá aminokyselina byla navázána programem 2 a poslední aminokyselina byla navázána pomocí programu 1. Nakonec z připraveného peptidu na pryskyřici byla odštěpená Fmoc-skupina programem 3. Peptid na pryskyřici byl se reaktoru syntetizátoru přenesen do stříkačky s fritou a acetylován obecným postupem: „Acetylace na SPPS“ s konkrétními hodnotami: kyselina octová (50 μ l, 0,878 mmol); HOBt (0,15 g; 0,980 mmol) a DIC (154 μ l; 9,95 mmol).

Na odštěpení peptidu z pryskyřice a ochránění vedlejších skupin byl použit obecný postup: „Odštěpení peptidu z pryskyřice s následným dochráněním.“ Po odštěpení byl peptid čištěn pomocí preparativního HPLC (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN $\rightarrow$ H₂O+0,1% TFA 30:80 ACN) a po lyofilizaci bylo získáno 0,09 g (48%) peptidu Ac-YLLØLK-NH₂ (Ø: *L*-2-naftylalanin).

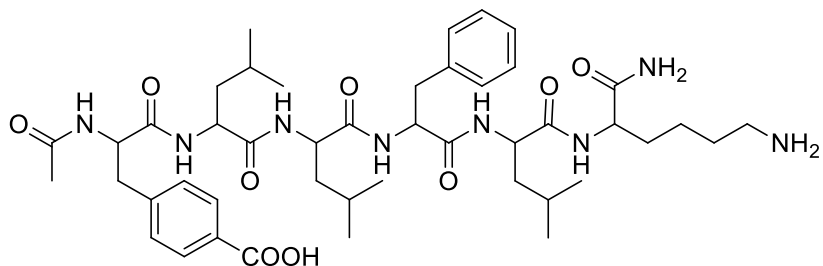
Ac-YLLØLK-NH₂, Ø: *L*-homotyrosin (10)



Rinkova amidová pryskyřice (0,68 mmol/g; 0,30 g, 0,205 mmol) byla navážena do reaktoru peptidového syntetizátoru. První čtyři aminokyseliny byly navázány pomocí programu 1. Pátá aminokyselina byla navázána programem 2 a poslední aminokyselina byla navázána pomocí programu 1. Nakonec z připraveného peptidu na pryskyřici byla odštěpená Fmoc-skupina programem 3. Peptid na pryskyřici byl se reaktoru syntetizátoru přenesen do stříkačky s fritou a acetylován obecným postupem: „Acetylace na SPPS“ s konkrétními hodnotami: kyselina octová (50 µl, 0,878 mmol); HOBt (0,15 g; 0,980 mmol) a DIC (154 µl; 9,95 mmol).

Na odštěpení peptidu z pryskyřice a ochrání vedlejších skupin byl použit obecný postup: „Odštěpení peptidu z pryskyřice s následným dochráněním.“ Po odštěpení byl peptid čistěn pomocí preparativního HPLC (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN → H₂O+0,1% TFA 30:80 ACN) a po lyofilizaci bylo získáno 0,04 g (20%) peptidu Ac-YLLØLK-NH₂ (Ø: *L*-homotyrosin).

Peptid Ac-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂, Ø: *L*-4-karboxyfenylalanin (11)

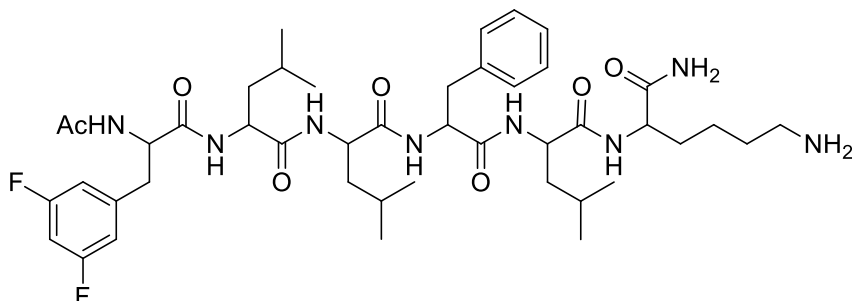


Peptid Ac-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz-NH₂, Ø: *L*-4-(karboxy-*terc*-

butyl)fenylalanin (0,04 g; 0,045 mmol) byl rozpusten v roztoku 1:1 TFA/DCM (4 ml) a byl míchán 30 minut. Poté byly těkavé podíly odpařeny. Odparek byl rozpuštěn v toluenu a toluen byl odpařen. Tento postup byl zopakován ještě třikrát, čímž se získala tuhá látka, která byla čistěná pomocí preparativního HLPC (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN →

H₂O+0,1% TFA 30:80 ACN) a následně lyofilizována přes noc. Byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 0,022 g (57%). Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

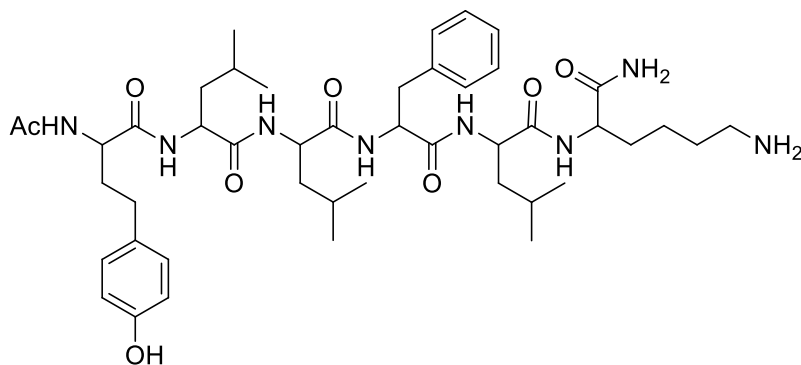
Peptid Ac-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz-NH₂, Ø: *L*-3,5-difluorfenylalanin (12)



Byl použit obecný postup „Reduktivní štěpení chránicí skupiny Z“ s konkrétními použitými navážkami: Ac-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂, Ø: *L*-3,5-difluorfenylalanin (0,09 g, 0,00928 mmol), Pd/C (0,010 g), EtOH (20 ml), AcOH (2 ml).

Reakcí byla získána bílá tuhá látka, která byla čištěná pomocí preparativního HPLC (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN → H₂O+0,1% TFA 30:80 ACN) a následně lyofilizována přes noc. Byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 0,013 g (16%). Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

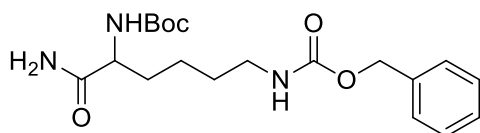
Peptid Ac-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz-NH₂, Ø: *L*-homotyrosin (13)



Byl použit obecný postup „Reduktivní štěpení chránicí skupiny Z“ s konkrétními konkrétními použitými hodnotami: Peptid Ac-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂, Ø: *L*-homotyrosin (0,12 g; 0,126 mmol), Pd/C (0,01 g), MeOH (20 ml), AcOH (2 ml).

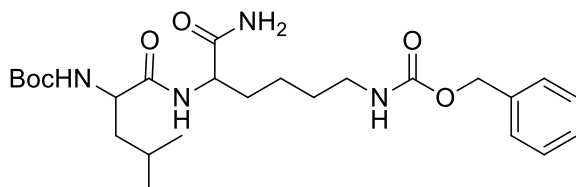
Reakcí byla získána bílá tuhá látka, která byla čištěná pomocí preparativního HPLC (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN → H₂O+0,1% TFA 30:80 ACN) a následně lyofilizována přes noc. Byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 0,045 g (42%). Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

Boc-Lyz(Z)-NH₂ (14)



Po 30 minutách míchání byl k roztoku Boc-*L*-Lyz-OH (1,06 g; 2,78 mmol), TBTU (0,99 g; 3,07 mmol) a DIPEA (0,22 g; 4,00 mmol) v DMF (5 ml) přidán pevný NH₄Cl (1,26 g; 9,76 mmol). Roztok byl míchán 3 hodiny. Poté bylo odpařeno rozpouštědlo. Odparek byl rozpuštěn v EtOAc (20 ml); směs byla promyta roztokem 5% HCl (2x10 ml), 10% K₂CO₃ (2x10 ml) a nakonec solankou. Rozpouštědlo bylo odpařeno, čímž se získalo 0,98 g (92%) bílé tuhé látky, která byla dále použita bez další purifikace. Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

Boc-Leu-Lyz(Z)-NH₂ (15)

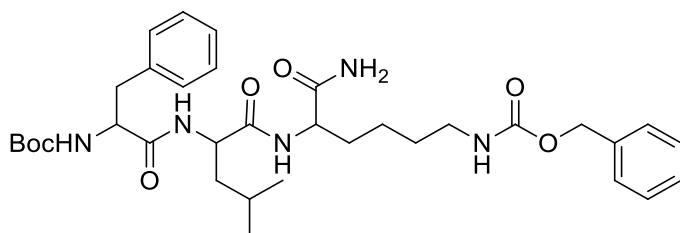


Byl použit obecný postup „Tvorba peptidové vazby v kapalně fázi“ s následující obměnou: produkt nebyl srážen v MTBE, ale po extrakci bylo jen odpařeno rozpouštědlo do sucha.

Konkrétní použité navážky byly: Boc-*L*-Leu-OH (0,66 g; 2,85 mmol), TBTU (0,93 g; 2,90 mmol), DIPEA (1,00 g; 7,74 mmol), Boc-Lyz(Z)-NH₂ (0,98 g; 2,58 mmol), 4-(2-aminoethyl)morfolín (35 µl; 0,258 mmol).

Reakcí byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 1,07 g (84%), která byla použita v dalším kroku bez purifikace. Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

Boc-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂ (16)

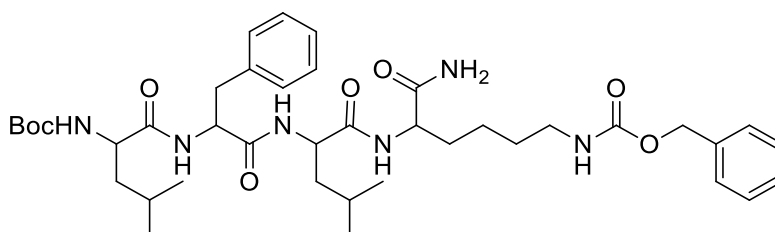


Byl použit obecný postup „Tvorba peptidové vazby v kapalně fázi“ s konkrétními použitými navážkami: Boc-*L*-Phe-OH (0,64 g; 2,42 mmol), TBTU (0,77 g; 2,41 mmol),

DIPEA (0,89 g; 6,90 mmol), Boc-Leu-Lyz(Z)-NH₂ (1,07 g; 2,17 mmol), 4-(2-aminoethyl)morfolín (29 µl; 0,221 mmol).

Reakcí byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 1,09 g (78%), která byla použita v dalším kroku bez purifikace. Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

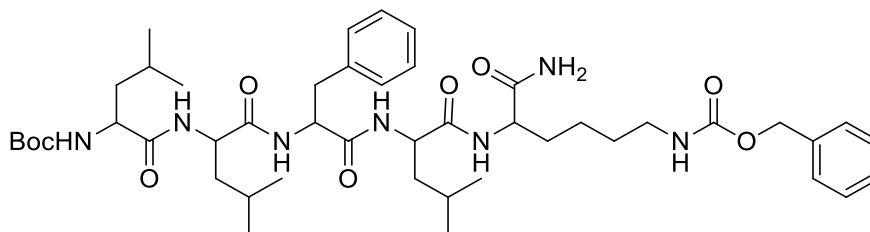
Peptid Boc-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂ (17)



Byl použit obecný postup „Tvorba peptidové vazby v kapalně fázi“ s konkrétními použitými navážkami: Boc-*L*-Leu-OH (0,44 g; 1,89 mmol), TBTU (0,59 g; 1,84 mmol), DIPEA (0,70 g; 5,42 mmol), Boc-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂ (1,09 g; 1,70 mmol), 4-(2-aminoethyl)morfolín (23 µl; 0,175 mmol).

Reakcí byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 1,05 g (82%), která byla použita v dalším kroku bez purifikace. Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

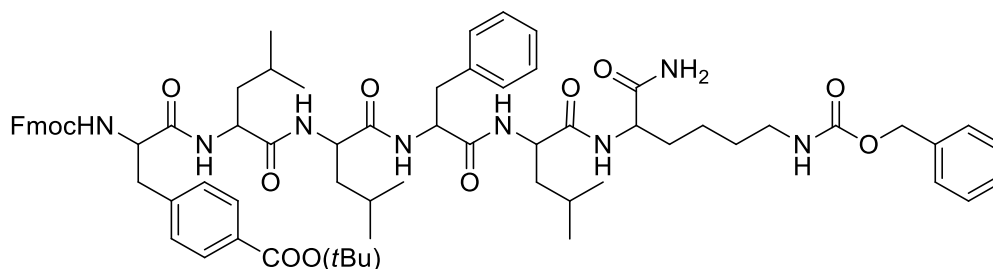
Peptid Boc-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂ (18)



Byl použit obecný postup „Tvorba peptidové vazby v kapalně fázi“ s konkrétními použitými navážkami: Boc-*L*-Leu-OH (0,39 g; 1,69 mmol), TBTU (0,60 g; 1,85 mmol), DIPEA (0,682 g; 4,51 mmol), Boc-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂ (1,05 g; 1,40 mmol), 4-(2-aminoethyl)morfolín (20 µl; 0,152 mmol).

Reakcí byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 0,92 g (76%), která byla použita v dalším kroku bez purifikace. Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

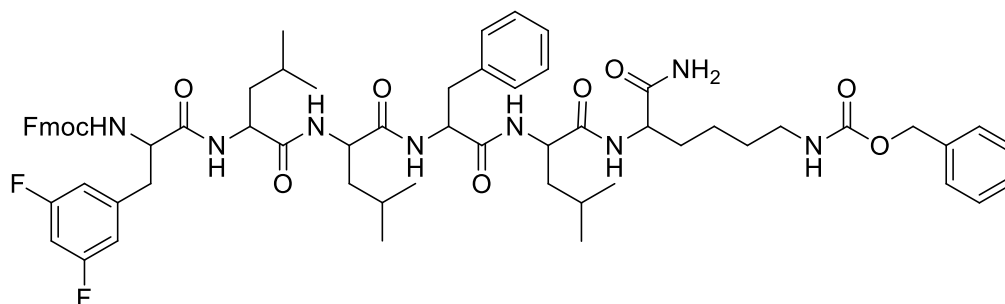
Peptid Fmoc-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂, **Ø:** L-4-(karboxy-*terc*-butyl)fenylalanin (19a)



Byl použit obecný postup „Tvorba peptidové vazby v kapalně fázi“ s konkrétními použitými navážkami: Fmoc-L-4-(karboxy-*terc*-butyl)fenylalanin (0,09 g; 0,187 mmol), TBTU (0,06 g; 1,91 mmol), DIPEA (0,08 g, 6,30 mmol), Boc-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂ (0,15 g; 0,173 mmol), 4-(2-aminoethyl)morfolin (2 µl; 0,0152 mmol).

Reakcí byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 0,11 g (53%), která byla použita v dalším kroku bez purifikace. Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

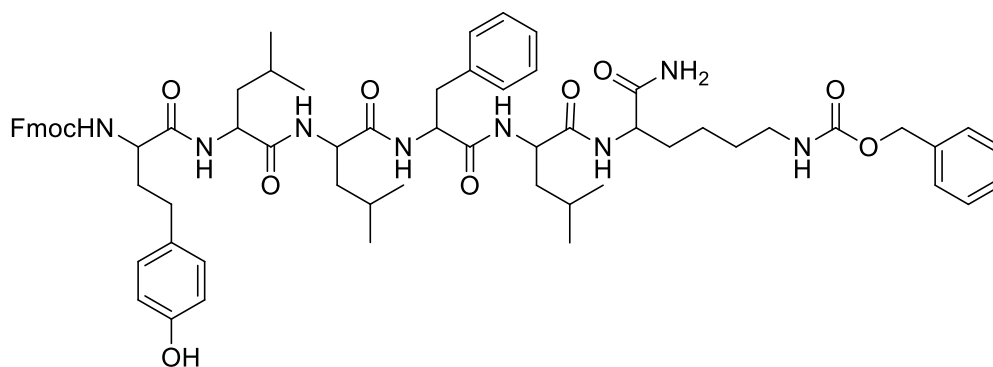
Peptid Fmoc-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂, **Ø:** L-3,5-difluorfenylalanin (19b)



Byl použit obecný postup „Tvorba peptidové vazby v kapalně fázi“ s konkrétními použitými navážkami: Fmoc-L-3,5-difluorfenylalanin (0,06 g; 0,157 mmol), TBTU (0,05 g; mmol), DIPEA (94 µl; 0,543 mmol), Boc-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂ (0,13 g; 0,148 mmol), 4-(2-aminoethyl)morfolin (2 µl; 0,0152 mmol).

Reakcí byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 0,17 g (97%), která byla použita v dalším kroku bez purifikace. Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

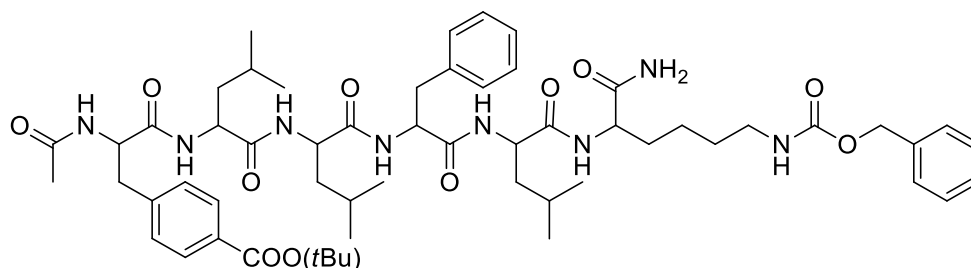
Peptid Fmoc-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂, Ø: *L*-homotyrosin (19c)



Byl použit obecný postup „Tvorba peptidové vazby v kapalně fázi“ s konkrétními použitými navážkami: Fmoc-*L*-homotyrosin (0,08 g; 0,192 mmol), TBTU (0,07 g; 0,210 mmol), DIPEA (95 µl; 0,546 mmol), Boc-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂ (0,15 g; 0,173 mmol), 4-(2-aminoethyl)morfolín (2 µl; 0,0152 mmol).

Reakcí byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 0,17 g (85%), která byla použita v dalším kroku bez purifikace. Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

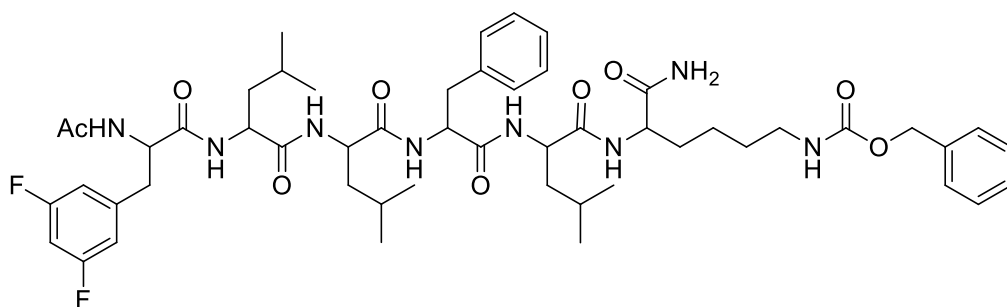
Peptid Ac-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂, Ø: *L*-4-(karboxy-*tert*-butyl)fenylalanin (20a)



Byl použit obecný postup „Acetylace v kapalně fázi“ s konkrétními použitými navážkami: Peptid Fmoc-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂, Ø: *L*-4-(karboxy-*tert*-butyl)fenylalanin (0,11 g; 0,0915 mmol), DMAP (0,06 g; 0,508 mmol), Ac₂O (41 µl; 0,434 mmol), DMF (3 ml).

Reakcí byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 0,08 g (77%), která byla použita v dalším kroku bez purifikace. Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

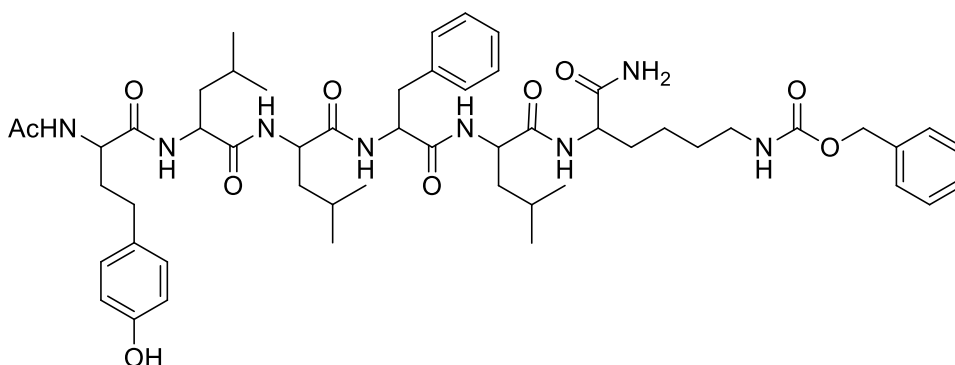
Peptid Ac-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂, Ø: *L*-3,5-difluorfenylalanin (20b)



Byl použit obecný postup „Acetylace v kapalně fázi“ s konkrétními použitými navážkami: Fmoc-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂, Ø: *L*-3,5-difluorfenylalanin (0,17 g; 0,143 mmol), DMAP (0,10 g; 0,819 mmol), Ac₂O (67 µl; 0,709 mmol), DMF (3ml).

Reakcí byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 0,09 g (65%), která byla použita v dalším kroku bez purifikace. Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

Peptid Ac-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂, Ø: *L*-homotyrosin (20c)

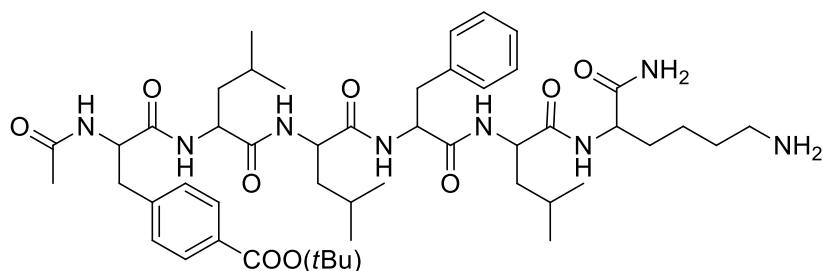


Byl použit obecný postup „Acetylace v kapalně fázi“ s následující obměnou: Místo anhydridu kyseliny octové jsem použila Ac-OSu.

Konkrétní použité navážky: Peptid Fmoc-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂, Ø: *L*-homotyrosin (0,17 g; 0,148 mmol), DMAP (0,07 g; 6,15 mmol), Ac-OSu (0,07 g; 0,446 mmol), DMF (3 ml).

Reakcí byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 0,12 g (30%), která byla použita v dalším kroku bez purifikace. Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

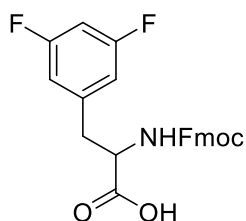
Peptid Ac-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz-NH₂, Ø: L-4-(karboxy-*tert*-butyl)fenylalanin (21)



Byl použit obecný postup „Reduktivní štěpení chránicí skupiny Z“ s konkrétními použitými navážkami: Peptid Ac-Ø-Leu-Leu-Phe-Leu-Lyz(Z)-NH₂, Ø: L-4-(karboxy-*tert*-butyl)fenylalanin (0,074 g; 0,070 mmol), Pd/C (0,01 g), EtOH (20 ml), AcOH (2 ml).

Reakcí byla získána bílá tuhá látka o hmotnosti 0,04 g (64%), která byla použita v dalším kroku bez purifikace. Struktura látky byla ověřena pomocí HPLC-MS.

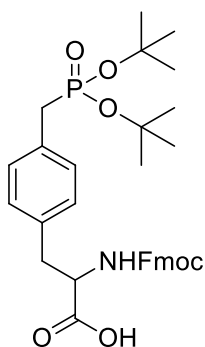
N-Fmoc-L-3,5-difluorfenylalanin (22)



N-Boc-L-2,5-difluorfenylalanin (0,25 g; 0,830 mmol) byl rozpuštěn v TFA (2 ml). Po 30 minutách míchaní byly odpařeny tekavé látky. Odparek byl rozpuštěn ve směsi 1,4-dioxane/voda 1:1 (5 ml) a poté byl přidán Fmoc-OSu (0,423 g; 1,25 mmol) a NaHCO₃ (0,139 g; 1,65 mmol). Vzniklý roztok byl míchán přes noc. Reakční směs byla odpařena do sucha a následně byl odparek rozpuštěn v EtOAc (10 ml) a byl promyt vodou (2x10 ml) a nasyceným roztokem NaHCO₃ (2x10 ml). Vodné fáze byly spojeny, okyseleny 5% roztokem HCl a extrahovány EtOAc (3x10 ml). Poté bylo odpařeno rozpouštědlo a odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií (silikagel, DCM: MeOH/10:1), čímž bylo získáno 0,18 g (51%) bílé tuhé látky.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,87 (d, *J* = 7.6 Hz; 2H); 7,62 (dd, *J*₁ = 7,6 Hz; *J*₂ = 2,7 Hz, 2H); 7,40 (t, *J* = 7,5 Hz; 2H); 7,29 (q, 2H); 7.08 – 6,98 (m, 3H); 4,28 – 4,13 (m, 4H), 3,15 (dd, *J*₁ = 13,7 Hz; *J*₂ = 4,3 Hz; 1H); 2,90 (dd, *J*₁ = 13,7 Hz; *J*₂ = 10,4 Hz; 1H).

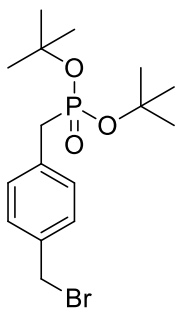
Fmoc-4-(Di-*tert*-butylfosfonomethyl)fenylalanin (23)



Ethyl ester 4-(di-*tert*-butylfosfonomethyl)fenylalaninu (**25**) (0,05 g; 0,128 mmol) byl rozpuštěn v 1,4-dioxanu (2 ml), byl přidán vodný roztok NaOH (1 M, 640 μ l; 0,64 mmol) a směs byla míchána podobu 3 hodin. Pomocí roztoku HCl v Et₂O (1M, 0,5 ml) bylo upraveno pH na hodnotu přibližně 7. Po přidání Fmoc-OSu (0,06 g; 0,184 mmol) a DIPEA (50 μ l, 0,287 mmol) byl roztok míchán 3 hodiny. Poté bylo odpařeno rozpouštědlo a odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií (silikagel, DCM: MeOH/20:1), čímž se získalo 0,03 g (41%) bílé tuhé látky.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,89 (d, J = 7,6 Hz, 2H); 7,68 (m, 2H); 7,42 (m, 2H); 7,32 (m, 2H); 7,17 (m, 4H); 4,22 – 4,13 (m, 1H); 3,07-2,81 (m, 1H); 1,33 (s, 18H).

4-(Di-*tert*-butylfosfonomethyl)- α -bromtoluen (25)

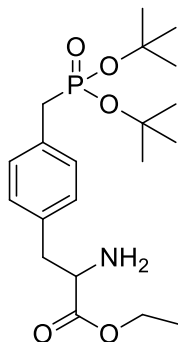


Při 120 °C byla vysušena ampule, která byla poté naplněna argonovou atmosférou. Do ampule byl přidán THF (15 ml) a HPO₃(*t*Bu)₂ (95 %; 1,06 g; 5,19 mmol). Roztok byl vychlazen na 0 °C, byl přidán NaH (60 %; 0,21 g; 5,25 mmol) a roztok byl míchán při této teplotě přibližně 2 hodiny. Byl přidán α,α' -dibrom *para*-xylen (1,37 g; 5,19 mmol) a roztok byl míchán 30 min. při laboratorní teplotě. Poté byl roztok refluxován přes noc. Bylo odpařeno rozpouštědlo, odparek byl rozpuštěn v EtOAc (20 ml), promyt 5% HCl (2x 10 ml) a solankou (10 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a bylo odpařeno rozpouštědlo. Odparek byl rozpuštěn v EtOAc, bylo přidáno 5 g silikagelu a roztok byl

odpařeno do sucha za vakua. Suchý silikagel s naadsorbovaným odparkem byl čištěn sloupcovou chromatografií (silikagel, cyklohexan: EtOAc/1:2), čímž se získalo 0,30 g (15%) bílé krystalické látky.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,32 – 7,30 (m, 1H); 7,26 – 7,24 (m, 1H); 4,48 (s, $J = 1,0$ Hz; 2H); 3,03 (d, $J = 21,5$ Hz; 2H); 1,41 (s, 18H).

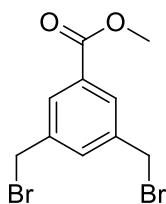
Ethyl ester 4-(Di-*tert*-butylfosfonomethyl)fenylalaninu (26)



Roztok 4-(di-*tert*-butylfosfonomethyl)- α -bromtoluenu (**24**) (0,26 g; 0,690 mmol), ethyl esteru *N*-(diphenylmetylen)glycinu (0,18 g; 0,673 mmol) a KI (0,012 g) v 1,4-dioxanu (5 ml) byl vychlazen přibližně na 10 °C a za stálého míchání byl přidán benzyltrimethylammonium hydroxid (40 %, 275 μl , 0,605 mmol). Roztok byl zahřát na laboratorní teplotu a byl míchán po dobu 6 hodin. Poté byl odpařen dioxan, odparek byl rozpuštěn v toluenu (20 ml), roztok byl promyt vodou (2x 10 ml) a solankou (10 ml). Organická fáze byla vysušena pomocí MgSO_4 . Odparek byl rozpuštěn v THF (8 ml) a byl přidán vodný roztok kyseliny citronové (10 %, 8 ml). Roztok byl intenzívně míchán po dobu 10 minut. Bylo odpařeno THF a vodný roztok byl extrahován s Et_2O (2x 10 ml). Pomocí nasyceného roztoku Na_2CO_3 bylo upraveno pH vodné fáze na hodnotu přibližně 8 a produkt byl extrahován DCM (3x10 ml). Organická fáze byla promyta solankou (10 ml) a bylo odpařeno rozpouštědlo. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií (silikagel, DCM: MeOH/10:1), čímž se získalo 0,05 g (19%) bílé tuhé látky.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,09-7,07 (m, 2H); 7,04-7,03 (m, 2H); 3,97 (q, 2H); 3,48 (t, 1H); 2,93 (d, $J = 24,3$ Hz; 2H); 2,76 (m, 2H); 1,71 (br s, 1H); 1,31 (s, 18H), 1,10 (t, 3H).

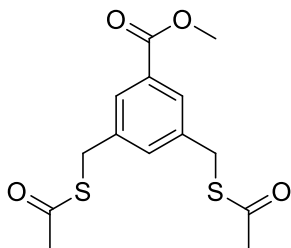
Metyl ester kyseliny 3,5-bis(brommethyl)benzoové (**31**)



Roztok metyl esteru kyseliny 3,5-dimethylbenzoové (1,03 g; 6,27 mmol), NBS (2,39 g; 13,4 mmol) a dibenzoyl peroxidu (hrot špachtle) v CCl₄ (10 ml) byl refluxován pod argonovou atmosférou po dobu 3 hodin. Vzniklá tuhá látka byla odfiltrována a filtrát byl promyt vodou (2x 20 ml) a solankou (10 ml). Roztok byl sušen síranem hořečnatým. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno a vzniklý olej byl přečištěn sloupcovou chromatografií (silikagel, hex: EtOAc/1:8), čímž se získalo 1,17 g (58%) bílé látky.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,00 (d, *J* = 1,8 Hz; 2H); 7,62 (s, 1H); 4,50 (s, 4H); 3,94 (s, 3H).

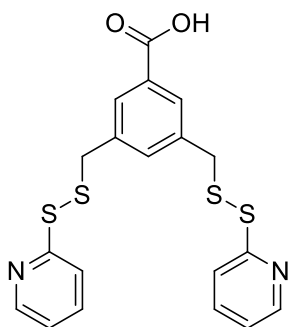
Metyl ester kyseliny 3,5-bis[(acetylsulfanyl)methyl]benzoové (**32**)



Roztok methyl esteru kyseliny 3,5-bis(brommethyl)benzoové (**31**) (1,17 g; 3,63 mmol), thiooctanu draselného (1,01 g; 8,84 mmol) v acetonu (24 ml) byl refluxován pod argonovou atmosférou podobu 3 hodin. Poté byl odpařen aceton a odparek byl rozpuštěn v EtOAc (20 ml), byl promyt vodou (2x 10 ml) a solankou (10 ml). Nakonec bylo odpařeno rozpouštědlo a odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií (silikagel, cyklohexan:EtOAc/4:1), čímž se získalo 0,68 g (62%) bleďožluté krystalické látky.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,83 (d, *J* = 1.8 Hz; 2H); 7,41 (s, 1H); 4,12 (s, 4H); 3,90 (s, 3H); 2,36 (s, 3H).

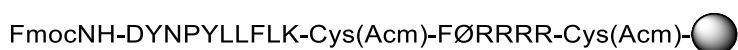
Kyselina 3,5-bis[(pyridin-2-yl)disulfanylmethyl]benzoová (33)



K roztoku metyl esteru kyseliny 3,5-bis[(acetylsulfanylmethyl)benzoové (32) (0,83 g; 2,66 mmol) v methanolu pod argonovou atmosférou byl přidán roztok hydroxidu sodného (1,37 g; 34,3 mmol) ve vodě (5 ml) a směs byla míchána přes noc. Na druhý den byla přidána kyselina octová (4 ml) a 2,2'-dithiodipyridin (2,34 g; 10,6 mmol). Po hodině míchání byla odfiltrována vzniklá žlutá tuhá látka a filtrát byl odpařen do sucha. Odparek byl rozpuštěn v DCM, byl k němu přidán silikagel (5 g) a znovu bylo odpařeno rozpouštědlo. Suchý silikagel s naadsorbovaným odparkem byl čištěn sloupcovou chromatografií (silikagel, toluen: CHCl₃:aceton:ethanol/3:5:2:1), čímž se získalo 0,84 g (70%) bledožluté krystalické látky.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10,82 (s, 2H); 8,44 (ddd, *J*₁ = 4,9 Hz; *J*₂ = 1,8 Hz; *J*₃ = 0,9 Hz; 2H); 7,85 (d, *J* = 1,7 Hz; 2H); 7,45 – 7,55 (m, 4H); 7,2 (t, *J* = 1,8 Hz; 2H); 7,03 (ddd, *J*₁ = 7,2 Hz; *J*₂ = 4,9 Hz; *J*₃ = 1,3 Hz; 2H); 3,96 (s, 4H).

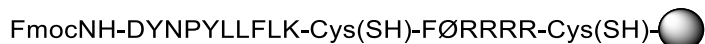
Peptid 35



Peptid byl syntetizován na Rinkově amidové pryskyřici (0,25 mmol/g; 0,31 g; 0,0775 mmol) pomocí peptidového syntetizátoru. Na navázání druhé a třetí aminonokyseliny byl použit program 4; na navázání čtvrté a páté aminokyseliny byl použit program 5; na navázání šesté, třinácté, šestnácté, sedmnácté a osmnácté byl použit program 2 a na zbylé aminokyseliny byl použit program 1.

Malá část peptidu na pryskyřici byla odštěpená a to tak, že se nechala míchat podobu 1,5 hodiny s roztokem TFA (95 µl); TIS (2,5 µl) a vody (2,5 µl). Dusíkem byly odfoukány těkavé látky a peptid byl rozpuštěn ve směsi acetonitril:voda/ 1:1, přes stříkačkový filtr byla odfiltrována pryskyřice a roztok byl analyzován pomocí HPLC-MS.

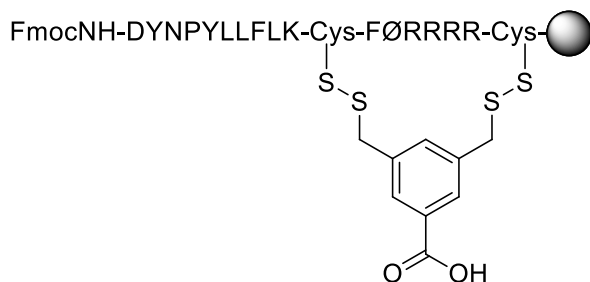
Peptid 36



Peptid **35** byl promyt DMF (2x 5 ml), a potom byl k němu přidán nasycený roztok octanu rtuťnatého v DMF (5 ml) pod argonovou atmosférou a byl třepán přes noc. Peptid byl promyt DMF (3x5 ml) a byl třepán s 20 % roztokem β-merkapt ethanolu v DMF (5 ml) dvakrát po 20 minut. Nakonec byl peptid promyt DMF (3x5 ml).

Malá část peptidu na pryskyřici byla odštěpená, a to tak, že se nechala míchat podobu 1,5 hodiny s roztokem TFA (95 μl); TIS (2,5 μl) a vody (2,5 μl). Dusíkem byly odfoukány těkavé látky a peptid byl rozpuštěn ve směsi acetonitril:voda/ 1:1, přes stříkačkový filtr byla odfiltrována pryskyřice a roztok byl analyzován pomocí HPLC-MS.

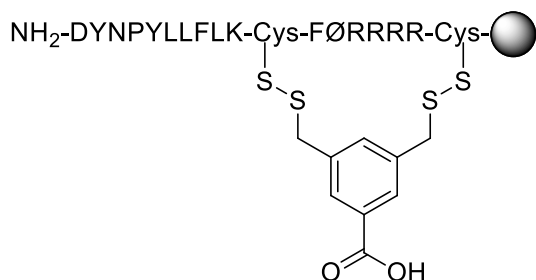
Peptid 37



Peptid **36** byl promyt DMF (5x 5 ml) a MeOH (5 ml). Potom byl třepán s roztokem kyseliny 3,5-bis[(pyridin-2-yl)disulfanyl)methyl]benzoové (**33**) (0,035 g, 0,0784 mmol) pod argonovou atmosférou přes noc. Nakonec byl peptid promyt DMF (3x5 ml).

Malá část peptidu na pryskyřici byla odštěpená, a to tak, že se nechala míchat podobu 1,5 hodiny s roztokem TFA (95 μl); TIS (2,5 μl) a vody (2,5 μl). Dusíkem byly odfoukány těkavé látky a peptid byl rozpuštěn ve směsi acetonitril:voda/ 1:1, přes stříkačkový filtr byla odfiltrována pryskyřice a roztok byl analyzován pomocí HPLC-MS.

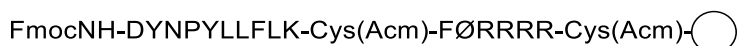
Peptid 38



Peptid **37** byl třepán 20 % roztokem piperidinu v DMF (5 ml) dva krát podobu 20 minut. Nakonec byl peptid promyt 50 % roztokem DIPEA v DMF (10x 5 ml).

Malá část peptidu na pryskyřici byla odštěpena a to tak, že se nechala míchat podobu 1,5 hodiny s roztokem TFA (95 μ l); TIS (2,5 μ l) a vody (2,5 μ l). Dusíkem byly odふうány těkavé látky a peptid byl rozpuštěn ve směsi acetonitril:voda/ 1:1, přes stříkačkový filtr byla odfiltrována pryskyřice a roztok byl analyzován pomocí HPLC-MS.

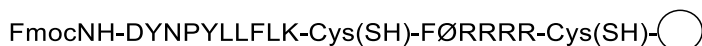
Peptid 39



Peptid byl syntetizován na Sieberově amidové pryskyřici (0,2 mmol/g; 0,19 g; 0,0236 mmol) pomocí peptidového syntetizátoru. Na navázání druhé a třetí aminonokyseliny byl použit program 4; na navázání čtvrté a páté aminokyseliny byl použit program 5; na navázání šesté, třinácté, šestnácté, sedmnácté a osmnácté byl použit program 2 a na zbylé aminokyseliny byl použit program 1.

Malá část peptidu na pryskyřici byla odštěpena a to tak, že se nechala míchat podobu 1,5 hodiny s roztokem TFA (95 μ l); TIS (2,5 μ l) a vody (2,5 μ l). Dusíkem byly odふうány těkavé látky a peptid byl rozpuštěn ve směsi acetonitril:voda/ 1:1, přes stříkačkový filtr byla odfiltrována pryskyřice a roztok byl analyzován pomocí HPLC-MS.

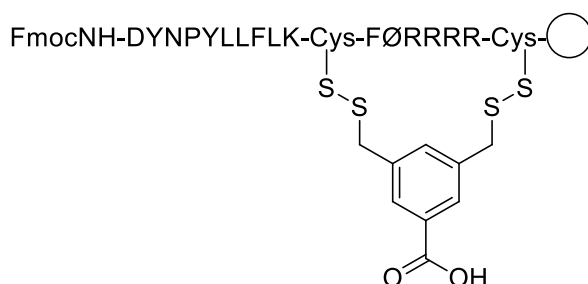
Peptid 40



Peptid **39** byl promyt DMF (2x 5 ml), a potom byl k němu přidán nasycený roztok octanu rtuťnatého v DMF (5 ml) pod argonovou atmosférou a byl třepán přes noc. Peptid byl promyt DMF (3x5 ml) a byl třepán s 20 % roztokem β -merkapt ethanolu v DMF (5 ml) dvakrát po 20 minut. Nakonec byl peptid promyt DMF (3x5 ml).

Malá část peptidu na pryskyřici byla odštěpena a to tak, že se nechala míchat podobu 1,5 hodiny s roztokem TFA (95 μ l); TIS (2,5 μ l) a vody (2,5 μ l). Dusíkem byly odふうány těkavé látky a peptid byl rozpuštěn ve směsi acetonitril:voda/ 1:1, přes stříkačkový filtr byla odfiltrována pryskyřice a roztok byl analyzován pomocí HPLC-MS.

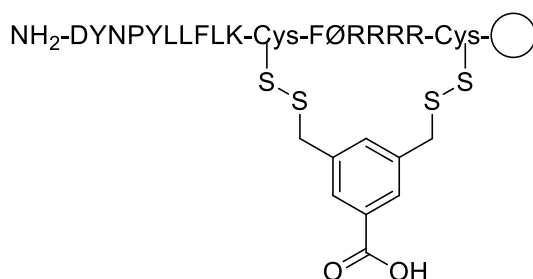
Peptid 41



Peptid **40** byl promyt DMF (5x5 ml) a MeOH (5 ml). Poté byl třepán s roztokem kyseliny 3,5-bis[(pyridin-2-yl)disulfanyl]methyl]benzoové (**33**) (0,018 g; 0,0403 mmol) pod argonovou atmosférou přes noc. Nakonec byl peptid promyt DMF (3x5 ml).

Malá část peptidu na pryskyřici byla odštěpena a to tak, že se nechala míchat podobu 1,5 hodiny s roztokem TFA (95 μ l); TIS (2,5 μ l) a vody (2,5 μ l). Dusíkem byly odfoukány těkavé látky a peptid byl rozpuštěn ve směsi acetonitril:voda/ 1:1, přes stříkačkový filtr byla odfiltrována pryskyřice a roztok byl analyzován pomocí HPLC-MS.

Peptid 42



Peptid **41** byl třepán s 20 % roztokem piperidinu v DMF (5 ml) dvakrát podobu 20 minut. Nakonec byl peptid promyt 50 % roztokem DIPEA v DMF (10x 5 ml).

Malá část peptidu na pryskyřici byla odštěpena a to tak, že se nechala míchat podobu 1,5 hodiny s roztokem TFA (95 μ l); TIS (2,5 μ l) a vody (2,5 μ l). Dusíkem byly odfoukány těkavé látky a peptid byl rozpuštěn ve směsi acetonitril:voda/ 1:1, přes stříkačkový filtr byla odfiltrována pryskyřice a roztok byl analyzován pomocí HPLC-MS.

6. Závěr

Úspěšně bylo připraveno třináct navržených hexapeptidů. K přípravě hexapeptidu **6** obsahující fosfonátovou funkční skupinu, bylo nutné připravit odpovídající 4-(fosfonomethyl)fenylalanin. Dále bylo připraveno centrální jádro navrženého bicyklického peptidu. Lineární sekvence bicyklického peptidu byly připraveny jak na Rinkově tak i na Siebertově pryskyřici. První cyklizace založená na zkřížené disulfidaci byla úspěšná. Po následném odchránění Fmoc-chránící skupiny z N-konce peptidu bylo vyzkoušeno několik různých podmínek pro tvorbu bicyklického peptidu. Tato reakce dosud nebyla úspěšně zvládnuta.

7. Literatura

- [1] A. Ghanem, D. Mayer, G. Chase, W. Tegge, R. Frank, G. Kochs, A. Garcia-Sastre, M. Schwemmle, *J Virol* **2007**, *81*, 7801-7804.
- [2] M. Kodíček, O. Valentová, R. Hynek, *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*, VŠCHT, Praha, **2015**.
- [3] D. Dobrota, *Lekárská biochémia*, Osveta, Martin, **2012**.
- [4] D. E. Koshland, *J Cell Compar Physl* **1959**, *54*, 245-258.
- [5] F. Milletti, *Drug Discov Today* **2012**, *17*, 850-860.
- [6] A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell* **1988**, *55*, 1189-1193.
- [7] M. Green, P. M. Loewenstein, *Cell* **1988**, *55*, 1179-1188.
- [8] E. Koren, V. P. Torchilin, *Trends Mol Med* **2012**, *18*, 385-393.
- [9] Y. P. Wei, C. L. Li, L. Zhang, X. Xu, *Bba-Biomembranes* **2014**, *1838*, 1911-1920.
- [10] Z. Q. Qian, C. A. Rhodes, L. C. McCroskey, J. Wen, G. Appiah-Kubi, D. J. Wang, D. C. Guttridge, D. H. Pei, *Angew Chem Int Edit* **2017**, *56*, 1525-1529.
- [11] F. Heitz, M. C. Morris, G. Divita, *Brit J Pharmacol* **2009**, *157*, 195-206.
- [12] R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell, *Harperova Biochemie*, H+H, Jihlava, **2002**.
- [13] A. Kloss, P. Henklein, D. Siele, M. Schmolke, S. Apcher, L. Kuehn, P. W. Sheppard, B. Dahlmann, *Eur J Pharm Biopharm* **2009**, *72*, 219-225.
- [14] F. H. Wang, Y. Wang, X. Zhang, W. J. Zhang, S. R. Guo, F. Jin, *J Control Release* **2014**, *174*, 126-136.
- [15] C. J. Bowerman, B. L. Nilsson, *Biopolymers* **2012**, *98*, 169-184.
- [16] E. Vives, J. Schmidt, A. Pelegrin, *Bba-Rev Cancer* **2008**, *1786*, 126-138.
- [17] Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, *Tetrahedron* **1975**, *31*, 2177-2209.
- [18] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, WILEY-VCH, Weinheim, **2009**.
- [19] M. A. Brimble, L. De Leon Rodriguez, E. Williams, *Chemistry* **2018**.
- [20] A. Kotynia, S. Bielinska, W. Kamysz, J. Brasun, *Dalton T* **2012**, *41*, 12114-12120.
- [21] Q. Chu, R. E. Moellering, G. J. Hilinski, Y. W. Kim, T. N. Grossmann, J. T. H. Yeh, G. L. Verdine, *Medchemcomm* **2015**, *6*, 111-119.
- [22] C. A. Rhodes, D. H. Pei, *Chem-Eur J* **2017**, *23*, 12690-12703.

- [23] G. L. Verdine, N. H. Vrolijk, S. Bertel, USA, **2009**.
- [24] T. T. Su, M. N. Gladstone, G. Zhang, T. Sammkia, USA, **2016**.
- [25] S. A. Stickel, N. P. Gomes, B. Frederick, D. Raben, T. T. Su, *Radiat Res* **2015**, *184*, 392-403.
- [26] W. L. Lian, B. S. Jiang, Z. Q. Qian, D. H. Pei, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 9830-9833.
- [27] H. Liao, D. H. Pei, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2017**, *15*, 9595-9598.
- [28] J. De Las Rivas, C. Fontanillo, *Plos Comput Biol* **2010**, *6*.
- [29] B. C. Cunningham, J. A. Wells, *Science* **1989**, *244*, 1081-1085.
- [30] O. Keskin, A. Gursoy, B. Ma, R. Nussinov, *Chem Rev* **2008**, *108*, 1225-1244.
- [31] I. M. A. Nooren, J. M. Thornton, *Embo J* **2003**, *22*, 3486-3492.
- [32] J. U. Bowie, R. T. Sauer, *Biochemistry-Us* **1989**, *28*, 7139-7143.
- [33] T. Berg, in *Protein-Protein Complexes* (Ed.: M. Zacharias), Munchen, **2014**, pp. 318-339.
- [34] D. A. Ockey, T. R. Gadek, *Expert Opin Ther Pat* **2002**, *12*, 393-400.
- [35] Z. Q. Qian, P. G. Dougherty, D. H. Pei, *Curr Opin Chem Biol* **2017**, *38*, 80-86.
- [36] Z. D. Shi, C. Q. Wei, K. O. Lee, H. P. Liu, M. C. Zhang, T. Araki, L. R. Roberts, K. M. Worthy, R. J. Fisher, B. G. Neel, J. A. Kelley, D. J. Yang, T. R. Burke, *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 2166-2169.
- [37] S. Massari, L. Goracci, J. Desantis, O. Tabarrini, *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59*, 7699-7718.
- [38] T. S. Y. Guu, L. P. Dong, P. Wittung-Stafshede, Y. J. Z. Tao, *Virology* **2008**, *379*, 135-142.
- [39] E. Obayashi, H. Yoshida, F. Kawai, N. Shibayama, A. Kawaguchi, K. Nagata, J. R. H. Tame, S. Y. Park, *Nature* **2008**, *454*, 1127-U1157.
- [40] H. X. Liu, X. J. Yao, *Mol Pharmaceut* **2010**, *7*, 75-85.
- [41] V. du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, *Journal of the American Chemical Society* **1954**, *76*, 3115-3121.
- [42] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149-&.
- [43] R. Santini, M. C. Griffith, M. Qi, *Tetrahedron Lett* **1998**, *39*, 8951-8954.
- [44] R. Epton, G. Marr, B. J. McGinn, P. W. Small, D. A. Wellings, A. Williams, *Int J Biol Macromol* **1985**, *7*, 289-298.
- [45] J. P. Tam, W. F. Heath, R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105*, 6442-6455.

