

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



**Zelená syntéza peptidů na pevné fázi**

*Bakalářská práce*

Autor:

Milan PASTOREK

Studijní obor:

Bioorganická chemie a chemická biologie, B1407

Vedoucí práce:

RNDr. Eva Schütznerová, Ph.D.

Olomouc 2020

Tímto prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval samostatně a uvedl jsem všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

V Olomouci dne 05.08.2020

.....

Pastorek Milan

## **Poděkování**

Úvodem bych chtěl poděkovat své vedoucí práce, RNDr. Evě Schütznerové, Ph.D., za vedení práce, rady a připomínky, a hlavně nevyčerpatelnou trpělivost a ochotu. Velké díky také patří RNDr. Adamu Příbylkovi, Ph.D. za cenné rady a pomoc v laboratoři. Děkuji RNDr. Sandře Benické za měření surových čistot a HRMS spekter. Tímto bych také chtěl poděkovat své rodině za obrovskou podporu při studiu.

Tato závěrečná práce vznikla za finanční podpory grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy IGA\_PrF\_2020\_012 a Grantové agentury České republiky 18-17978Y.

## Bibliografická informace

**Jméno a příjmení autora:** Milan Pastorek  
**Název práce:** Zelená syntéza peptidů na pevné fázi  
**Typ práce:** bakalářská  
**Pracoviště:** Katedra organické chemie  
Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci  
**Školitel:** RNDr. Eva Schütznerová, Ph.D.  
**Rok obhajoby práce:** 2020

### Abstrakt:

Bakalářská práce je zaměřena na studium nových zelených alternativ pro syntézu peptidů na pevné fázi (z angl. SPPS). Teoretická část se věnuje obecnému popisu syntézy na pevné fázi, definici pojmu zelená syntéza peptidů na pevné fázi (z angl. GSPPS) a souhrnem dosavadních snah o „zelenění“ této syntézy. Z odborné literatury vyplývá použitá testovací metodika pro nové alternativy v praktické části práce, která je završena syntézou pentapeptidu Leu-enkefalin-NH<sub>2</sub>.

**Klíčová slova:** Zelená chemie; syntéza na pevné fázi; peptidy; SPPS; GSPPS  
**Počet stran:** 76  
**Počet příloh:** 1  
**Jazyk:** čeština

## Bibliographical information

**Author's first name and surname:** Milan Pastorek

**Title:** Green solid-phase peptide synthesis

**Type of thesis:** bachelor

**Department:** Department of Organic chemistry  
Faculty of Science at Palacky University, Olomouc

**Advisor:** RNDr. Eva Schütznerová, Ph.D.

**The year of presentation:** 2020

### Abstract:

The bachelor thesis is focused on investigation of green alternatives for solid-phase peptide synthesis (SPPS). The theoretical part is dedicated to general description of solid-phase peptide synthesis, definition of the term green solid-phase peptide synthesis (GSPPS) and summary of attempts devoted to the „greening“ of solid-phase peptide synthesis. These gave rise to the applied testing procedure of green alternatives in the practical part of thesis, which culminates in the synthesis of model pentapeptide Leu-enkephalin-NH<sub>2</sub>.

**Key words:** Green chemistry; solid-phase synthesis; peptides; SPPS; GSPPS

**Number of pages:** 76

**Number of appendixes:** 1

**Language:** Czech

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
3.1	Peptidy .....	10
3.1.1	Význam peptidů .....	10
3.1.2	Syntéza peptidů .....	11
3.2	Syntéza peptidů na pevné fázi .....	14
3.2.1	Princip SPPS .....	14
3.2.2	Pryskyřice .....	15
3.2.3	Protektivní skupiny .....	16
3.2.4	Tvorba peptidové vazby .....	16
3.3	Zelená syntéza peptidů na pevné fázi .....	19
3.3.1	Zelená chemie .....	19
3.3.2	GSPPS .....	19
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>27</b>
4.1	Vybrané zelené alternativy .....	27
4.1.1	Zelená rozpouštědla .....	27
4.1.2	Zelené báze a acylační činidla .....	28
4.2	Testování rozpustnosti .....	29
4.2.1	Rozpustnost Fmoc-AMK-OH .....	29
4.2.2	Rozpustnost acylačních činidel .....	29
4.3	Bobtnání pryskyřic .....	31
4.3.1	PS-DVB pryskyřice .....	31
4.3.2	PS-PEG a PEG pryskyřice .....	32
4.4	Efektivita tvorby peptidové vazby .....	33
4.4.1	Příprava modelové výchozí látky pro testování .....	33
4.4.2	Testování efektivity acylace .....	33
4.5	Odštěpení Fmoc chránící skupiny .....	37
4.5.1	Příprava modelové výchozí látky .....	37
4.5.2	Metodika testování Fmoc štěpení .....	38
4.5.3	Piperidin .....	38
4.5.4	Morfolin .....	39
4.5.5	Piperazin .....	40
4.5.6	DBU .....	41
4.5.7	NaOH .....	42

4.6	Testování racemizace.....	43
4.6.1	Metody přípravy modelových peptidů.....	43
4.6.2	Výsledky testování.....	45
4.7	Příprava peptidu Leu-enkefalinu-NH <sub>2</sub> .....	45
4.7.1	Syntéza.....	45
4.7.2	Metody.....	46
4.7.3	Výsledky syntézy.....	49
4.8	Reaktivita rozpouštědel.....	50
4.8.1	Reaktivita s volným N-koncem peptidu.....	50
4.8.2	Reaktivita s bázemi.....	53
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>57</b>
5.1	Přístroje a metody.....	57
5.2	Testování rozpustnosti.....	57
5.2.1	Aminokyselin.....	57
5.2.2	Acylačních činidel.....	58
5.3	Testování bobtnání.....	58
5.4	Štěpení z pryskyřice.....	59
5.4.1	Kvantifikace metodou vnějšího standardu.....	59
5.4.2	Analýza meziproductů.....	59
5.4.3	Štěpení produktů.....	59
5.5	Kontrola acylačních reakcí.....	59
5.6	Testování efektivity tvorby peptidové vazby.....	60
5.6.1	Příprava modelové výchozí látky.....	60
5.6.2	Testování acylace.....	60
5.7	Testování účinnosti štěpení Fmoc skupiny.....	61
5.7.1	Syntéza výchozí látky.....	61
5.7.2	Testování deprotektce.....	61
5.8	Testování racemizace.....	61
5.9	Syntéza pentapeptidů.....	62
5.10	Testování reaktivity.....	62
5.10.1	Reaktivita rozpouštědel s volným N-koncem peptidu.....	62
5.10.2	Reaktivita s bázemi.....	65
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Cílem zelené chemie je navržení syntéz, které budou produkovat méně nebo v ideálním případě, žádný nebezpečný odpad. Toho je při syntézách farmaceuticky aktivních látek vyprodukováno mnoho, jeho likvidace je obtížná a často vede k dalšímu znečištění životního prostředí. Práce je věnována aplikaci zásad zelené chemie na jednu z nejméně zelených organických syntéz, syntézu peptidů na pevné fázi. Peptidy jsou velmi zajímavou skupinou farmaceuticky aktivních látek, a to díky jejich vlastnostem a hojnému výskytu v živočišném světě.

Zelená syntéza peptidů na pevné fázi je dynamicky se rozvíjející oblast, na což poukazuje fakt, že každý rok roste počet nových publikací na toto téma. Vzhledem k tomu, že rozpouštědla tvoří drtivou část odpadu při syntézách, jedná se především o evaluaci nových zelených alternativ ke tradičně používaným rozpouštědlům. Dalšími neméně významnými látkami, které jsou nahrazovány, jsou klasicky využívané báze nebo reagenty. Z pohledu zelené chemie je považováno za úspěch, pokud je nahrazen zelenou alternativou alespoň jeden aspekt jakékoliv syntézy, jelikož i malá změna může mít velký dopad v industriálním syntetickém měřítku.

Teoretická část se věnuje obecnému popisu syntézy na pevné fázi, která je předmětem práce, detailněji je definován pojem zelená syntéza peptidů na pevné fázi a dále zahrnuje přehled dosavadních úspěchů v této oblasti. Z odborné literatury byla sestavena metodika testování nových zelených alternativ v různých aspektech syntézy peptidů na pevné fázi a pokusy o její následnou aplikaci uvádí praktická část.



## 2 Cíle práce

Hlavním cílem předložené práce je studium nových rozpouštědel a bází pro syntézu peptidů na pevné fázi. Postup evaluace je zvolen tak, aby docházelo k postupné eliminaci metod, které nejsou pro tuto syntézu vhodné.

Jednotlivé cíle práce:

1. Vypracování rešerše na téma zelená syntéza peptidů na pevné fázi
2. Výběr zelených rozpouštědel a bází
3. Popis zelených rozpouštědel pro SPPS (rozpouštěcí schopnosti, bobtnání, účinnost acylace a deprotektce)
4. Evaluace zelených bází pro SPPS
5. Studium racemizace jako vedlejší reakce v SPPS
6. Studium vhodných kandidátů zelených rozpouštědel nebo bází na syntéze pentapeptidu Leu-enkefalin-NH<sub>2</sub>

## 3 Teoretická část

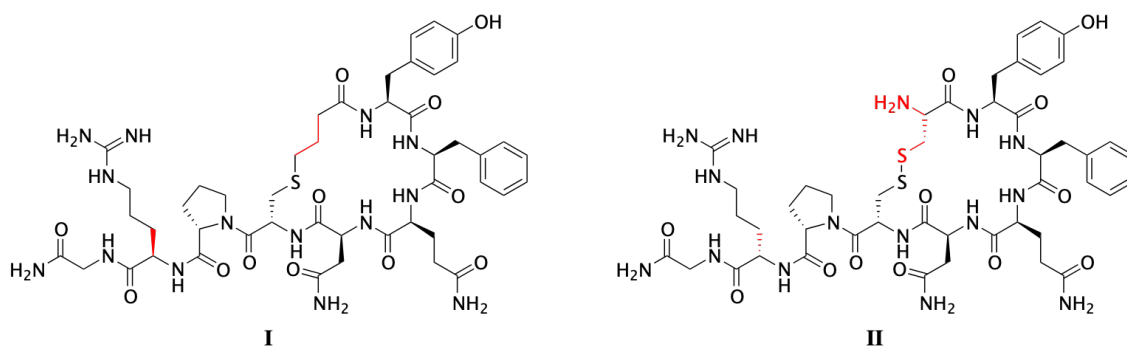
Tato část práce se zabývá významem a možnými způsoby syntézy peptidů. Detailněji je přiblížen princip syntézy peptidů na pevné fázi, používané pryskyřice a reagenty. Popsán je pojem zelené chemie a dosavadní snahy o zelenou syntézu peptidů na pevné fázi. Vzhledem k tomu, že jsou v praktické části použita tzv. zelená rozpouštědla a báze, je jim věnována samotná podkapitola.

### 3.1 Peptidy

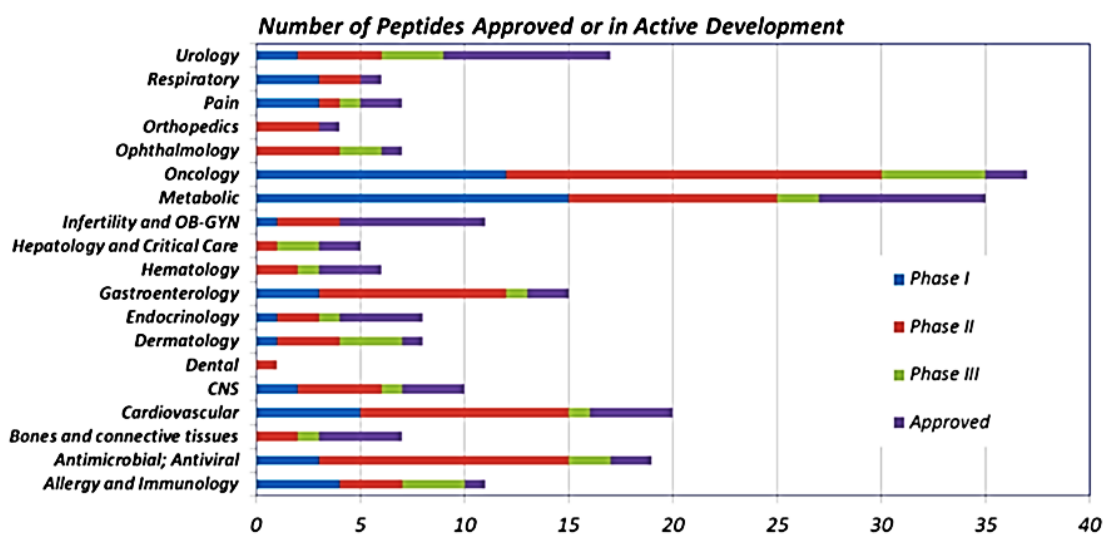
V této kapitole je přiblížen význam peptidů v organické syntéze. Dále jsou stručně shrnuty různé metody tvorby peptidové vazby.

#### 3.1.1 Význam peptidů

Peptidy jsou označovány jako kratší sekvence (většinou méně než 50) aminokyselin spojené peptidovými vazbami. Peptidy jsou molekuly, které se vyskytují v těle přirozeně a při použití v podobě léčiva projevují vysokou selektivitu, zatímco mají málo vedlejších účinků.<sup>1</sup> Nevýhodou peptidů je, že jsou v krevním řečišti rychle odbourávány, neprocházejí buněčnou membránou a při perorálním podání mají velmi malý účinek<sup>2</sup> a proto je přibližně 75 % peptidových léčiv vpraveno do těla formou injekce.<sup>1</sup> Zlepšení farmakokinetických vlastností lze dosáhnout např. úpravou skeletu peptidového řetězce nebo postranních řetězců aminokyselin.<sup>2</sup> Desmopressin (**I**, **Obrázek 1**) lze uvést jako příklad, což je analog arginin vasopressinu (**II**), který má díky modifikaci (vyznačena červeně) peptidového skeletu delší poločas života a vyšší afinitu k vasopressinovým receptorům 2.<sup>2</sup> Terapeutické peptidy jsou perspektivní látky s více než šedesáti léčivy schválenými organizací U.S. Food and Drug Administration a přibližně 140 látkami v klinickém testování.<sup>1-6</sup> **Obrázek 2** (převzatý z reference<sup>2</sup>) vyobrazuje počet peptidových léčiv v různých fázích vývoje nebo již schválených, a rozdělených do kategorií podle terapeutické oblasti.<sup>2</sup>



Obrázek 1: Struktura desmopressinu I a vasopressinu II.<sup>2</sup>



Obrázek 2: Peptidová léčiva a terapeutické oblasti jejich účinku (převzato z reference<sup>2</sup>).

### 3.1.2 Syntéza peptidů

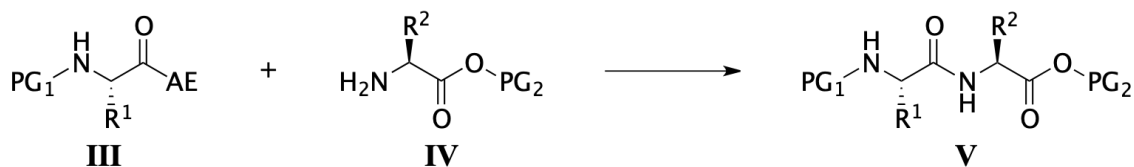
Miliardy let se zdokonalující enzymatická syntéza peptidů v přírodě tvoří důmyslný systém, který se v laboratoři zatím nepodařilo napodobit. V této kapitole budou stručně představeny dosavadní snahy o vývoj syntetických cest k tvorbě peptidové vazby.

#### 3.1.2.1 Syntéza v roztoku

Syntézou peptidů v roztoku (angl. liquid-phase peptide synthesis, LPPS) se zabýval americký biochemik jménem Vincent du Vigneaud, ten v roce 1953 využil LPPS pro syntézu oktapeptidu oxytocinu s hormonální aktivitou.<sup>7</sup> Za svou práci získal v roce 1955 Nobelovu cenu za chemii.

LPPS lze provést buď postupným připojováním aminokyselin nebo syntézou několika peptidových fragmentů, které jsou na konci syntézy spojeny v cílovou

sloučeninu. Princip LPPS spočívá v reakci mezi volnou amino skupinou (**IV**, **Schéma 1**) a např. aktivovaným esterem (AE) karboxylové skupiny (**III**) dvou aminokyselin nebo fragmentů. Podmínkou je přitom použití protektivních skupin (PG<sub>1,2</sub>) pro N- a C- konce aminokyselin, jejichž účast je v reakci nežádoucí. Syntéza je zakončena odštěpením protektivních skupin.<sup>8</sup>



**Schéma 1:** Syntéza libovolného dipeptidu pomocí LPPS.<sup>8</sup>

Mezi výhody LPPS patří: použití reaktantů v poměru 1:1, možnost izolace a charakterizace jednotlivých intermediátů, snadnější a levnější možnosti purifikace finálního produktu, zároveň je použití protektivních skupin postranních řetězců aminokyselin minimální.<sup>8</sup> Zapotřebí je však pečlivá optimalizace každého reakčního kroku, která může být zdlouhavá a obtížná.<sup>9</sup>

LPPS je často nahrazována syntézou na pevné fázi, přesto zůstává vhodnou metodou pro syntézu kratších peptidů (např. tyreotropin-uvolňující hormon, tripeptid), fragmentů a některých delších peptidů (např. kalcitonin, 32 aminokyselin).<sup>10</sup>

### 3.1.2.2 Syntéza na pevné fázi

Zdlouhavá, obtížná a často finančně nákladná LPPS vedla v roce 1963 amerického biochemika Roberta Bruce Merrifielda k publikaci studie, ve které představil syntézu peptidů na pevné fázi (angl. solid-phase peptide synthesis, SPPS).<sup>11</sup> Vývojem SPPS si R. B. Merrifield zasloužil Nobelovu cenu za chemii, nicméně až o 20 let později.

Detailní popis principu SPPS je dále v textu (3.2.1). Hlavní a zásadní odlišení od LPPS spočívá v ukotvení první aminokyseliny na polymerní nosič. SPPS přinesla výrazné zjednodušení syntézy peptidů a umožnila její automatizaci. Velkou výhodou také představuje možnost použití výše vracících rozpouštědel, jelikož je peptid ukotven na nosiči a rozpouštědlo tak slouží pouze k promývání. Přesto má SPPS určité nedostatky jako: použití velkého nadbytku reagentů, vyšší spotřeba rozpouštědla a možné reakce mezi rostoucími řetězci peptidů, čímž může klesat výtěžek celé reakce.<sup>10</sup>

SPPS je metoda používaná pro syntézu krátkých, středně dlouhých a dlouhých peptidových sekvencí (např. kortikoliberin, 41 aminokyselin) a fragmentů.<sup>10</sup>

### 3.1.2.3 Hybridní syntéza

Spojením SPPS a LPPS vzniká hybridní peptidová syntéza. Nejdříve proběhne SPPS fragmentů, které jsou následně spojeny pomocí LPPS. Tato syntéza je často preferována, protože kombinuje výhody obou již zmíněných postupů. Praktickým příkladem použití je syntéza léčiva enfuvirtid (Fuzeon, T-20). Jedná se o peptid, sestavený z 36 aminokyselin.<sup>10</sup>

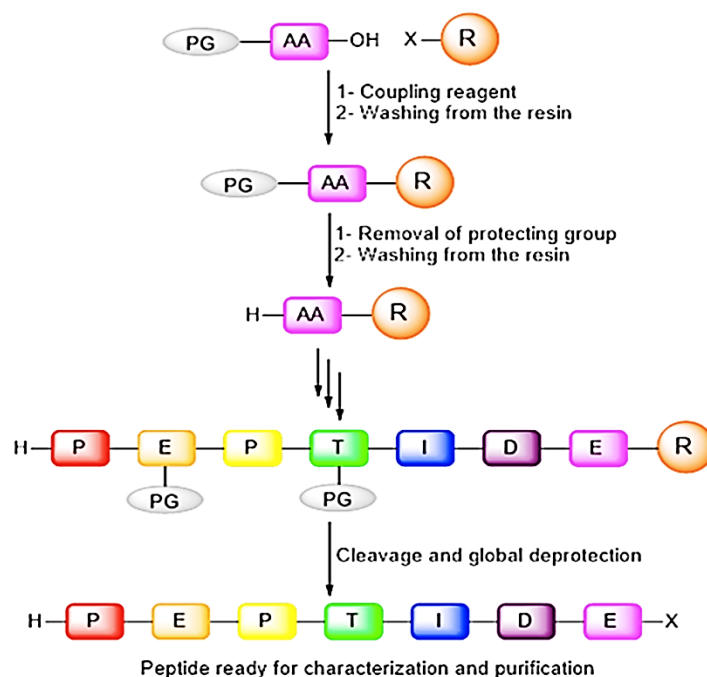
Hybridní syntéza nemusí znamenat pouze kombinaci SPPS a LPPS. V roce 1994 byla představena metoda nativní chemické ligace,<sup>12</sup> kterou lze spojit fragmenty vzniklé SPPS. Použití vodného prostředí a neutrálního pH při tvorbě peptidové vazby je velkou předností této syntézy.

## 3.2 Syntéza peptidů na pevné fázi

Syntéza peptidů na pevné fázi (angl. solid-phase peptide synthesis, SPPS) je předmětem této práce, proto bude v této kapitole detailně popsán její princip, používané pryskyřice, protektivní skupiny a reagenty, díky kterým je tvorba peptidové vazby možná.

### 3.2.1 Princip SPPS

Prvním krokem v SPPS je imobilizace první aminokyseliny na polymerní nosič, častěji označován jako pryskyřice (angl. resin), modifikovaný tzv. linkerem. Linker zprostředkovává přítomnost reaktivní funkční skupiny, na kterou bývá ukotvena první aminokyselina a vazba linker-aminokyselina je labilní vůči specifickým reakčním podmínkám. Aminokyselina je zpravidla ukotvena za C-konec, tudíž výstavba peptidu probíhá směrem k jeho N-konci. Následuje deprotektce N-koncové skupiny, čímž vznikne nové reaktivní místo, na které je možné ukotvit další aminokyselinu v pořadí. Proces elongace znamená opakované odstranění protektivní skupiny a ukotvení další aminokyseliny, dokud není dosaženo požadované sekvence aminokyselin. Na závěr proběhne štěpení terminální skupiny peptidu, ale také všech postranních řetězců aminokyselin, a finální přerušení labilní vazby linker-peptid. Takto získaný peptid je připraven pro analýzu a purifikaci. **Obrázek 3** (převzat z reference<sup>13</sup>) ilustruje průběh SPPS libovolného peptidu.

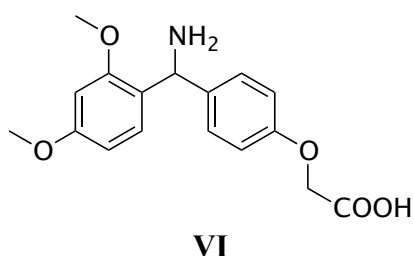


**Obrázek 3:** Syntéza peptidu na pevné fázi (obrázek převzat z reference<sup>13</sup>).

### 3.2.2 Pryskyřice

Pryskyřicí neboli polymerním nosičem, se rozumí kopolymery, které vznikají polymerizací dvou nebo více různých látek. Volba pryskyřice v SPPS je velmi důležitá a musí splňovat určitá kritéria jako: odolnost proti mechanickému míchání a různým teplotám, inertnost vůči použitým rozpouštědlům a reaktantům, vhodné nabobtnání pryskyřice a přítomnost reaktivního místa.

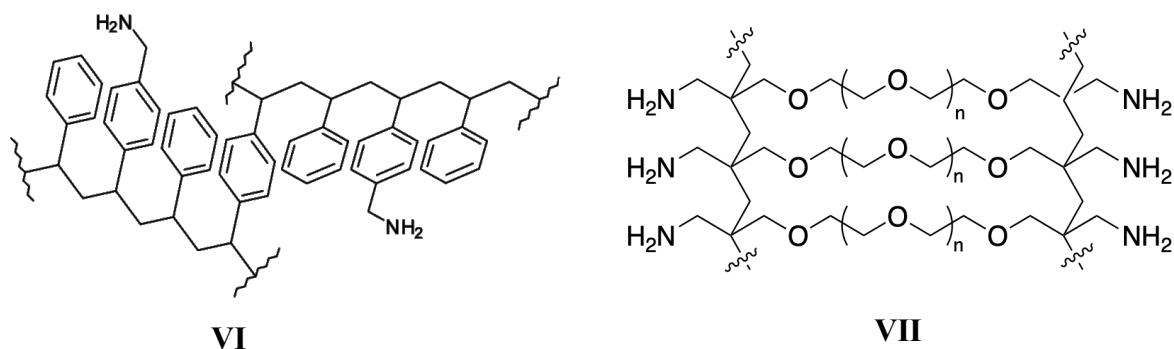
Přítomnost reaktivního místa je zajištěna pomocí linkeru. Vazba mezi linkerem a pryskyřicí musí být stabilní za každých podmínek použitých při elongaci peptidu. Na druhou stranu, vazba mezi aminokyselinou a linkerem je labilní vůči specifickým podmínkám. Mezi nejčastěji používané patří amidový linker (VI) popsáný v roce 1987 H. Rinkem,<sup>14</sup> jehož struktura je znázorněna na **Obrázku 4**.



**Obrázek 4:** Rink amide linker (RAM).<sup>14</sup>

Bobtnáním se rozumí zvětšení objemu pryskyřice vlivem rozpouštědla. To má zásadní vliv na úspěšné a rychlé provedení SPPS, protože zpřístupňuje reaktivní místa na pryskyřici, který pozoroval již R. B. Merrifield ve své studii, kde prováděl syntézu tetrapeptidu.<sup>11</sup> K hodnocení, jestli rozpouštědlo vhodně bobtná pryskyřici, se dnes standardně používá měřítko navržené v roce 1998 Richardem Santinim et al.<sup>15</sup> Bobtnání se zpravidla uvádí v jednotkách ml/g, tzn. objem nabobtnané pryskyřice na jednotku hmotnosti pryskyřice suché. Bobtnání větší než 4 ml/g je velmi dobré, 2–4 ml/g dostačující a menší než 2 ml/g neuspokojivé (rozpouštědlo je pro SPPS nepoužitelné). Míra bobtnání polymerního nosiče závisí jak na povaze pryskyřice, tak na charakteru použitého rozpouštědla. Pro hydrofobní kopolymery polystyrenu zesíťovaného 1-2 % divinylbenzenu (**VII, Obrázek 5, PS-DVB**)<sup>15</sup> se nejlépe hodí rozpouštědla nepolárního charakteru jako dichlormethan (DCM), ale nevylučuje se použití polárnějších rozpouštědel jako *N,N*-dimethylformamid (DMF). Předním zástupcem hydrofilních pryskyřic je ChemMatrix (**VIII**),<sup>16</sup> základní jednotkou tohoto kopolymeru je polyethylen glykol (PEG), který mnohem lépe bobtná v polárních rozpouštědlech (např. voda) Na

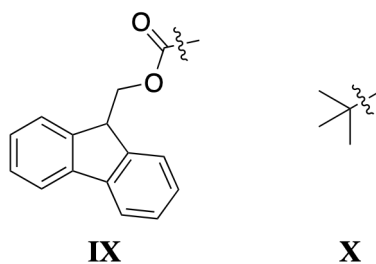
pomezí hydrofilních a hydrofobních pryskyřic stojí TentaGel,<sup>17</sup> jehož struktura obsahuje PS i PEG.



**Obrázek 5:** Struktura PS-DVB (VII, převzato z reference<sup>18</sup>) a PEG (VIII) pryskyřic.<sup>16</sup>

### 3.2.3 Protektivní skupiny

Při syntéze peptidu je nutné použití chránících skupin N-konců aminokyselin, ale i postranních řetězců. Mezi nejpoužívanější kombinaci patří 9-fluorenylmethoxykarbonyl (IX, **Obrázek 6**, Fmoc)<sup>19</sup> chránící N-konce aminokyselin a *tert*-butyl (X, *t*Bu) jako protektivní skupina postranních řetězců. K odštěpení Fmoc nejčastěji slouží roztok báze (např. piperidin), kdežto k odstranění *t*Bu z postranních řetězců se používá kyselina (např. trifluoroctová kyselina, TFA). Při použití kyselého labilního linkeru, jakým je RAM linker, dojde k deprotekcí postranních řetězců a odštěpení peptidu z pryskyřice v jednom kroku. Tato kombinace byla použita v praktické části této práce.



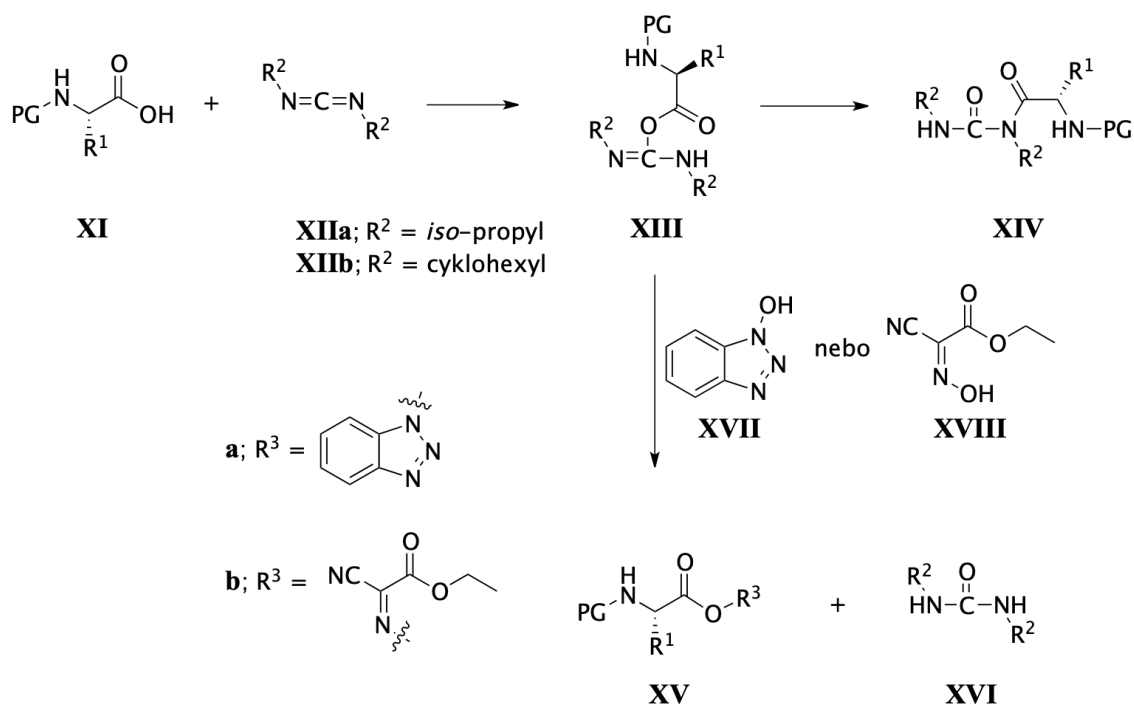
**Obrázek 6:** Struktura Fmoc (IX) a *t*Bu (X) chránících skupin.

### 3.2.4 Tvorba peptidové vazby

Dříve v textu bylo uvedeno, že je tvorba peptidové vazby umožněna převedením karboxylové skupiny na aktivovaný ester (**Schéma 1**). Nejčastější metodou přípravy aktivovaného esteru je pomocí karbodiimidu postupem, jenž nejprve zahrnuje reakci

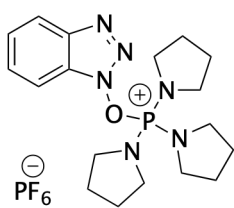


karboxylové skupiny (**XI**, **Schéma 2**) s dialkylkarbodiimidem (**XII**) za vzniku derivátu *O*-acyldialkylisomočoviny (**XIII**). Prvním navrženým dialkylkarbodiimidem byl *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (**XIIa**, DCC),<sup>20</sup> ale při použití DCC je vzniklá dialkylmočovina (**XVIa**) nerozpustná v organických rozpouštědlech a není možné ji odstranit pouhou filtrací. *N,N'*-Diisopropylkarbodiimid (**XIIb**, DIC) je běžně používán v SPPS, jelikož vzniklá dialkylmočovina (**XVIb**) je rozpustná v organických rozpouštědlech a odstraní se promytím reakční směsi. Další výhodou použití DIC oproti DCC je fakt, že vzniklý derivát *O*-acyldialkylisomočoviny nepodléhá přesmyknu na stálejší a nežádoucí *N*-acyldialkylmočovinu (**XIVb**) stejně snadno jako derivát (**XIVa**) vznikající z DCC.<sup>21</sup> *N*-hydroxybenzotriazol (**XVII**, HOBt)<sup>22</sup> nebo ethylkyano(hydroxyimino)acetát (**XVIII**, OxymaPure)<sup>23</sup> jsou běžně do reakční směsi přidávány jako aditiva, protože potlačují vznik dříve zmíněných nežádoucích produktů a také racemizaci vznikajícího peptidu. Výsledkem je aminokyselina s aktivovaným esterem (**XV**).

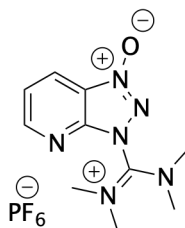


**Schéma 2:** Karbodiimidová metoda přípravy aktivovaného esteru.

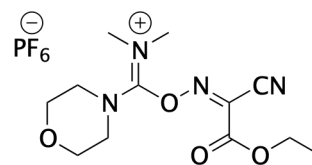
Další možností, jak připravit aktivovaný ester, je za pomoci fosfoniové soli, např. PyBOP (**XIX**, **Obrázek 7**),<sup>24</sup> případně to mohou být uroniové/aminiové soli jako HATU (**XX**)<sup>25</sup> nebo COMU (**XXI**).<sup>26</sup> Pro tvorbu žádaného produktu je do reakční směsi přidán ekvivalent báze jako např. diisopropylethylamin (DIEA).<sup>24</sup> V případě použití těchto solí jsou výsledné produkty stejné, jako v případě karbodiimidové metody.



**XIX**



**XX**



**XXI**

**Obrázek 7:** Struktury PyBOP (**XIX**), HATU (**XX**) a COMU (**XXI**).

## 3.3 Zelená syntéza peptidů na pevné fázi

Kapitola se věnuje obecnému popisu zelené chemie a jakým způsobem byla prozatím aplikována na SPPS. Popsána jsou také zelená rozpouštědla a zelené báze, která byla vybrána pro hodnocení v praktické části práce.

### 3.3.1 Zelená chemie

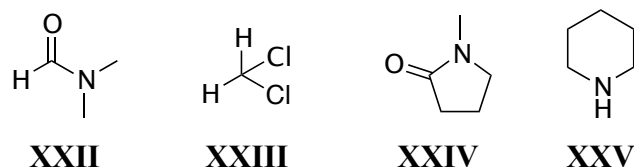
Úkolem zelené chemie je navrhovat chemické látky a procesy, které redukují či kompletně eliminují produkci nebezpečných substancí. P. T. Anastas a J. C. Warner v roce 1998 navrhli 12 zásad zelené chemie.<sup>27</sup>

Proces se dá zpravidla označit za „zelenější“, pokud je porovnán s jiným procesem. Splnit všech dvanáct zásad je obtížné, a proto je při vytváření nového procesu vhodné splnit alespoň jednu zásadu zelené chemie.

### 3.3.2 GSPPS

Zelená syntéza peptidů na pevné fázi (angl. green solid-phase peptide synthesis, GSPPS) se poprvé objevuje v publikaci výzkumné skupiny F. Albericia.<sup>28</sup> Proces lze takto popsat, pokud jsou nežádoucí podmínky nebo reagenty nahrazeny zelenější alternativou.

V syntéze farmaceuticky aktivní látky (angl. Active pharmaceutical ingredient, API) představují rozpouštědla více než 80 % použitého materiálu,<sup>29</sup> spotřebují kolem 60 % energií a rozpouštědlům se též připisuje 50 % skleníkových plynů vzniklých jejich zpracováním ve formě odpadu.<sup>30</sup> V SPPS jsou tyto problémy amplifikovány, jelikož jsou používány velké objemy rozpouštědel. Mezi nejčastěji používaná rozpouštědla v SPPS patří DMF (**XXII**, **Obrázek 8**), dichlormethan (**XXIII**, DCM) a *N*-methyl-2-pyrrolidon (**XXIV**, NMP). Všechna tato rozpouštědla jsou označena jako nebezpečná s doporučením, aby byla nahrazena jinými alternativami.<sup>31</sup> Zároveň jsou DMF a NMP na seznamu znepokojujících látek (angl. substances of very high concern, SVHC),<sup>32</sup> což jsou látky, které mohou být např. karcinogenní anebo mutagenní.



**Obrázek 8:** Struktury nejpoužívanějších rozpouštědel v SPPS a nejběžněji používané báze pro odštěpení Fmoc chránící skupiny – piperidinu.

Nejběžnější bázi pro štěpení Fmoc chránící skupiny v SPPS je piperidin (**XXV**). Z pohledu zelené chemie je označen jako nebezpečná látka<sup>33</sup> a jeho použití je kontrolováno, protože je využíván pro syntézu ilegálních omamných látek.<sup>34</sup> Nahrazení často užívaných acylačních činidel DIC a HOBT je také žádoucí. HOBT je značně výbušný a proto jeho použití v syntéze většího měřítka není ideální.<sup>35</sup>

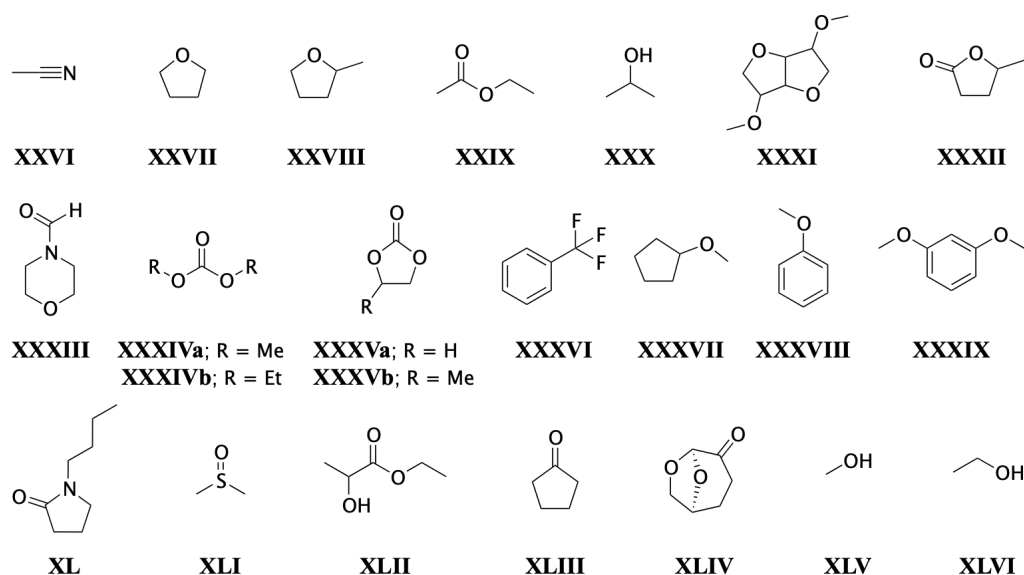
V následujícím textu jsou popsány dosavadní úspěchy v GSPPS, **Obrázek 12** a **Tabulka 3** tyto snahy shrnují.

### 3.3.2.1 Zelená rozpouštědla

#### 3.3.2.1.1 Hodnocení zelených rozpouštědel

Rozpouštědla představují velkou část odpadu, jak bylo popsáno dříve v textu. Proto byly některými velkými farmaceutickými společnostmi jako Sanofi,<sup>36</sup> Pfizer,<sup>37</sup> AstraZeneca<sup>38</sup> a GlaxoSmithKline (GSK)<sup>39</sup> vytvořeny příručky pro zjednodušení hledání zelenějších alternativ. Tyto příručky obecně hodnotí rozpouštědla z pohledu jejich vlastností, zpracování v podobě odpadu, bezpečnosti práce, dopadu na životní prostředí a lidské zdraví, ale také např. analýzy životního cyklu (angl. life-cycle assessment, LCA).<sup>40</sup> Výsledkem je často číselná hodnota anebo barevné rozlišení (červená – nežádoucí, žlutá – problematické, zelená – doporučené). V **Tabulce 1** jsou znázorněny výsledky GSK příručky<sup>39</sup> vybraných rozpouštědel (ta rozpouštědla, která v GSK příručce nebyla hodnocena, mají přiřazené reference poukazující na jejich potenciál jako zelená rozpouštědla), která již byla popsána pro GSPPS nebo byla vybrána pro hodnocení v praktické části této práce (vybrána na základě slibného bobtnání PS nebo PEG<sup>41</sup>, označeny \*). Těmito rozpouštědly jsou: acetonitril (**XXVI**, **Obrázek 9**, MeCN), tetrahydrofuran (**XXVII**, THF), 2-methyltetrahydrofuran (**XXVIII**, 2-MeTHF), ethylacetát (**XXIX**, EtOAc), *iso*-propylalkohol (**XXX**, IPA), isosorbid dimethylether (**XXXI**, DMI),  $\gamma$ -valerolakton (**XXXII**, GVL), *N*-formylmorfolin (**XXXIII**, NFM), dimethylkarbonát (**XXXIVa**, DMC), diethylkarbonát (**XXXIVb**, DEC) ethylenkarbonát

(XXXVa, EC), propylen-karbonát (XXXVb, PC), trifluorotoluen (XXXVI), cyklopentyl(methyl)ether (XXXVII, CPME), anisol (XXXVIII), 1,3-dimethoxybenzen (XXXIX, DMB), *N*-butylpyrrolidon (XL, NBP), dimethylsulfoxid (XLI, DMSO), ethyl-laktát (XLII, EL), cyklopentanon (XLIII, CP), cyren (XLIV), methanol (XLV, MeOH) a ethanol (XLVI, EtOH).



Obrázek 9: Struktury vybraných zelených rozpouštědel.

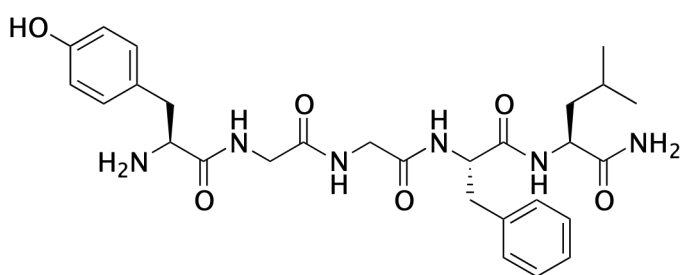
Tabulka 1: Hodnocení vybraných rozpouštědel.<sup>39</sup>

Rozpouštědlo	GSK hodnocení	Rozpouštědlo	GSK hodnocení
DMF	nežádoucí	PC	doporučené
DCM	nežádoucí	EC*	doporučené
NMP	nežádoucí	Trifluortoluen	problematické
MeCN	problematické	CPME	problematické
THF	nežádoucí	Anisol*	doporučené
2-MeTHF*	problematické	DMB	<sub>-43</sub>
EtOAc	doporučené	NBP	<sub>-44</sub>
IPA	doporučené	DMSO*	problematické
DMI*	problematické	EL *	<sub>-45</sub>
GVL	problematické	CP*	doporučené
NFM	<sub>-42</sub>	Cyren*	problematické
DMC	doporučené	MeOH*	problematické
DEC	doporučené	EtOH*	doporučené

\*rozpouštěla hodnocená v praktické části práce

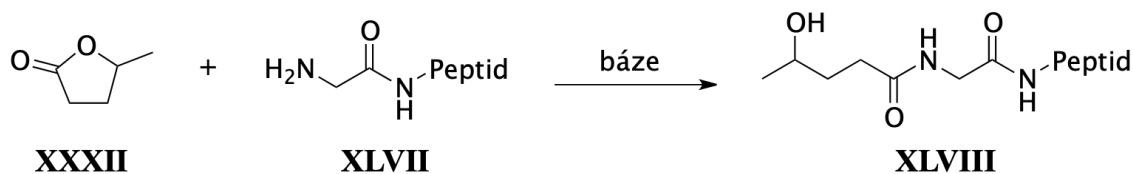
### 3.3.2.1.2 Zelená rozpouštědla v GSPPS

Již zmíněná výzkumná skupina F. Albericia se bezpochyby zasloužila o významné průlomové v GSPPS. Popsali jako první použití MeCN a THF v kombinaci s ChemMatrix H-Rink (RAM) pryskyřicí, a úspěšně syntetizovali modelové peptidy Leu-enkefalin (XLVII, **Obrázek 10**, pentapeptid, zobrazen jako amid), acyl carrier protein [ACP (65-74), dekapeptid], Aib-enkefalin a Aib-ACP (65-74).<sup>46,47</sup> Poukázali také na 2-MeTHF jako na vhodnou náhradu za DMF a DCM při acylaci, nicméně k promývání a deprotekcí byl stále využíván DMF.<sup>28</sup> V další studii představili kompletně zelený protokol syntézy modelových peptidů na ChemMatrix H-Rink, ve kterém byl použit 2-MeTHF pro deprotekcí a acylaci, k promývání sloužil EtOAc.<sup>48</sup> Prokázali mimo jiné využití 2-MeTHF pro PS-Wang<sup>49</sup> a PS-2-chlortrityl chlorid (PS-CTC)<sup>50</sup> pryskyřice.<sup>51</sup> Úspěšnou syntézu již zmíněných Aib-modelových peptidů popsali také pro GVL a NFM, tentokrát v kombinaci s PS-Rink (RAM) pryskyřicí.<sup>52</sup> Použití mikrovlnného reaktoru je z pohledu zelené chemie výhodou a proto bylo jeho využití popsáno v kombinaci s GVL.<sup>53</sup> V další studii byla pozorována reaktivita rozpouštědla GVL (XXXII, **Schéma 3**) s amino skupinou ukotveného Gly (XXXVII) na pryskyřici nebo jako součást rostoucího peptidu za vzniku acylovaného aminu (XXXVIII). Reakci se lze vyhnout za použití již syntetizovaného Fmoc-AMK-Gly-OH (AMK = aminokyselina) fragmentu.<sup>54</sup>



XLVII

**Obrázek 10:** Leu-enkefalin-NH<sub>2</sub> (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH<sub>2</sub>).



XXXII

XLVII

XXXVIII

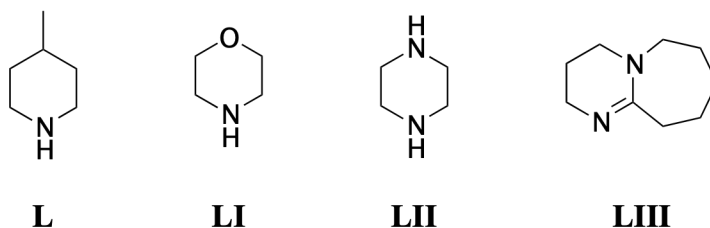
**Schéma 3:** Reakce mezi GVL a peptidem obsahující Gly s volným N-koncem.<sup>54</sup>

Lawreson et al. publikovali studii, ve které testovali bobtnání PS, PS-PEG a PEG pryskyřic pro více než 20 zelených rozpouštědel.<sup>41</sup> Popsali také použití PC v kombinaci s ChemMatrix-HMPB<sup>55</sup> na syntéze Bradykininu (nonapeptid).<sup>56</sup> Výzkumná skupina J. Lopeze se zasloužila testováním různých vlastností více než 30 rozpouštědel,<sup>57</sup> zároveň v této práci představili NBP jako vhodnou náhradu za DCM a DMF při syntéze oktapeptidu Okreotidu. Ferrazzano et al. za účelem vytvoření rozpouštědla s ideálními vlastnostmi pro GSPPS popsali použití směsí anisolu, cyrenu, sulfolanu s DMC nebo DEC.<sup>58</sup>

### 3.3.2.2 Zelené báze

#### 3.3.2.2.1 Hodnocení zelených bází

Podobně jako pro rozpouštědla, farmaceutická firma GSK vytvořila příručku pro jednoduché hledání zelenějších bází nebo kyselin pro organickou syntézu.<sup>33</sup> Výsledky jsou, obdobně jako u rozpouštědel, uvedeny jako číslo anebo barevně (červená – nežádoucí, žlutá – problematické, zelená – doporučené).<sup>33</sup> **Tabulka 2** shrnuje výsledky z GSK příručky pro prozatím použité báze v GSPPS i ty, které byly vybrány pro testování v praktické části této práce (označeny \*). Tyto báze jsou: piperidin, 4-methylpiperidin (**L**, **Obrázek 11**), morfolin (**LI**), piperazin (**LII**) diazobicykloundecen (**LIII**, DBU) a hydroxid sodný (NaOH).



**Obrázek 11:** Struktury vybraných bází.

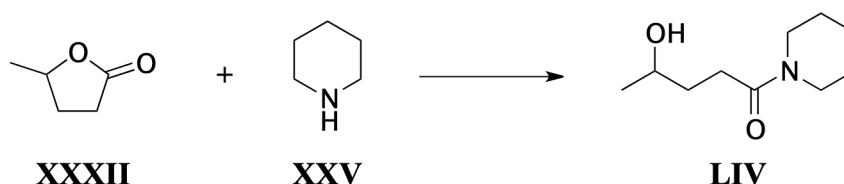
**Tabulka 2:** Hodnocení vybraných rozpouštědel.

Báze	GSK skóre
Piperidin	6,9
4-Methylpiperidin	– <sup>59</sup>
Morfolin*	7,5
Piperazin*	– <sup>60</sup>
DBU*	7,3
NaOH*	8

\*vybrané báze pro hodnocení v praktické části práce

### 3.3.2.2.2 Zelené báze v GSPPS

Albericio et al. pozorovali, že deprotektace roztokem piperidinu může být problematická v případě, že byla reakce provedena v jiném rozpouštědle než v DMF. Zabývali se proto dalším studiem štěpení Fmoc v rozpouštědlech: 2-MeTHF, ethylacetát, *iso*-propylalkohol, DMI, GVL, NFM, DMC, trifluorotoluen a CPME.<sup>61</sup> Zdůrazňují nutnost optimalizace nejen acylace, ale i deprotektace v daných rozpouštědlech. Pozorovali mimo jiné i nežádoucí reaktivitu GVL (**XXXII**, **Schéma 4**) se sekundárními aminy, jako je piperidin (**XXV**) nebo 4-methylpiperidin, za vzniku příslušného amidu (**LIV**).<sup>62</sup> Většina již představených GSPPS protokolů probíhala za pomoci piperidinu. Lopez et al. jako první představili studii, ve které použili NBP v kombinaci s 4-methylpiperidinem.<sup>57</sup> Později, Pawlas et al. popsali použití směsí EtOAc/DMSO a EtOAc/NBP v kombinaci s 4-methylpiperidinem.<sup>63,64</sup> Mezi další báze, kterými se pouze podařilo nahradit piperidin v SPPS ovšem vždy s kombinací s DMF, patří methylové deriváty piperazinu,<sup>59,65</sup> piperazin,<sup>65</sup> směs piperazin/DBU.<sup>34</sup> Studie provedena výzkumnou skupinou V. Krchňáka popsala použití NaOH s 2-MeTHF/MeOH na PS-Rink syntézou Leu-enkefalinu-NH<sub>2</sub> a komerčního peptidu Triptorelin (dekapeptid).<sup>66,67</sup>



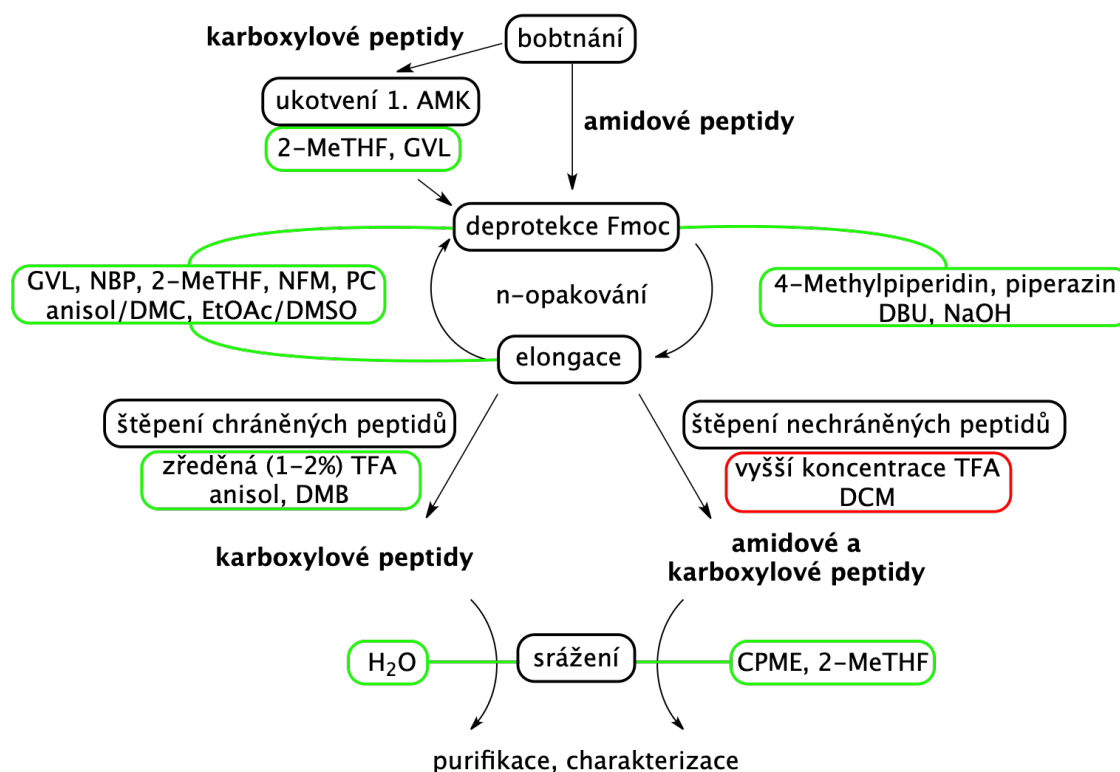
**Schéma 4:** Reaktivita GVL v přítomnosti sekundárního aminu.<sup>62</sup>



### 3.3.2.3 Jiné optimalizace GSPPS

Albericio et al. se také jako první zaměřili na použití zeleného štěpícího koktejlu, složeného ze zředěné (1-2%) TFA a anisolu nebo 1,3-dimethoxybenzenu.<sup>43</sup> Popsaný štěpící koktejl však slouží pouze pro štěpení chráněných peptidů z CTC pryskyřice, pro Wangův nebo Rinkův linker je koktejl příliš slabý.<sup>43</sup> Za zmínku také stojí fakt, že v případě CTC pryskyřice je možná, za určitých podmínek, její recyklace.<sup>68</sup> Vzhledem k tomu, že tato výzkumná skupina ve svých publikacích sledovala horší rozpustnost peptidů v CPME a 2-MeTHF,<sup>28</sup> nahradila diethylether zmíněnými rozpouštědly pro srážení peptidů.<sup>51,69</sup> 2-MeTHF se tak stal univerzálním rozpouštědlem pro GSPPS a je tak možné ho použít ve všech krocích GSPPS (kromě štěpení peptidu z pryskyřice).<sup>51</sup>

Farmaceutická firma GSK vytvořila příručku i pro hodnocení reagentů používaných v organické syntéze.<sup>70</sup> Příručka označuje často používaná acylační činidla v SPPS DIC, HOBt, HATU a PyBOP jako červená (nežádoucí). Vhodnou zelenou alternativu k těmto činidlům představují OxymaPure<sup>23</sup> a COMU.



**Obrázek 12:** Shrnutí GSPPS a jednotlivých zelených kroků (obrázek byl adaptován podle reference<sup>43</sup>).

**Tabulka 3:** Stručné shrnutí dosavadních úspěchů v GSPPS.

<b>Rozpouštědlo</b>	<b>Pryskyřice</b>	<b>Použito pro</b>	<b>Štěpení Fmoc</b>	<b>Peptid<sup>a</sup></b>	<b>Další studované aspekty</b>
MeCN <sup>46,47</sup>	PEG	Acylace, deprotektce, promytí	Piperidin	A, B, C, D	Bobtnání, racemizace
THF <sup>47</sup>	PEG	Acylace	Piperidin	C, D	Racemizace
CPME <sup>28,61,69</sup>	PS, PEG	Acylace, deprotektce, izolace peptidu	Piperidin	C	Bobtnání, rozpustnost, racemizace
2-MeTHF <sup>28,61,66,67,69</sup>	PS, PEG	Acylace, deprotektce, promytí, izolace peptidu	Piperidin, NaOH	A, C, D Triptorelin	Bobtnání, rozpustnost, racemizace
GVL <sup>52,53,61,62</sup>	PS, PEG	Acylace, deprotektce, promytí	Piperidin	C, D	Bobtnání, rozpustnost, reaktivita
NFM <sup>52,61</sup>	PS, PEG	Acylace, deprotektce, promytí	Piperidin	C, D	Bobtnání, rozpustnost
PC <sup>56</sup>	PEG	Acylace, deprotektce, promytí	Piperidin	Bradykinin	Racemizace
NBP <sup>57</sup>	PS	Acylace, deprotektce, promytí	4-Methylpiperidin	Oktreotid	Bobtnání, rozpustnost
Anisol <sup>43</sup>	PS, PEG	Acylace, deprotektce, promytí, štěpení z pryskyřice	Piperidin	C, D	Bobtnání, rozpustnost

<sup>a</sup>A = Leu-enkefalin, B = ACP (65-74), C = Aib-enkefalin, D = Aib-ACP (65-74)

## 4 Výsledky a diskuze

Tato část práce se zabývá aplikací hodnotících faktorů, které vyplývají z dosavadních snah o Fmoc/*t*Bu GSPPS v teoretické části práce. Těmito faktory jsou:

- 1) Výběr zelených alternativ (rozpuštědla, báze, acylační činidla)
- 2) Rozpustnost Fmoc-AMK-OH a acylačních činidel
- 3) Bobtnání pryskyřic (PS, PEG)
- 4) Efektivita tvorby peptidové vazby
- 5) Kvantitativní odštěpení Fmoc chránicí skupiny
- 6) Testování racemizace syntézou vhodného peptidu
- 7) Syntéza peptidů (Leu-enkefalin)
- 8) Testování reaktivity rozpuštědel s volným N-koncem rostoucího peptidu nebo s použitou bází

Uvedený postup zároveň nastiňuje rozdělení této části práce do příslušných kapitol.

### 4.1 Vybrané zelené alternativy

Kapitola se zabývá stručným popisem fyzikálních vlastností zvolených zelených rozpuštědel, bází nebo reagentů pro testování, které byly vybrány na základě zmíněné literatury v teoretické části práce.

#### 4.1.1 Zelená rozpuštědla

Slibné bobtnání PS nebo PEG pryskyřice bylo základem pro výběr zelených rozpuštědel (2-MeTHF, DMI, EC, anisol, CP, MeOH, EtOH, cyren), která byla zvolena pro testování.<sup>41</sup> Ostatní rozpuštědla (DMSO,<sup>39</sup> EL<sup>45</sup>) byla vybrána na základě jejich potenciálu jako zeleného rozpuštědla. V **Tabulce 4** jsou zelená rozpuštědla seřazena podle vzrůstajícího bodu tání, uveden jsou rovněž bod varu, kupní cena a skupenství za pokojové teploty. Pro srovnání jsou zařazeny rozpuštědla, jejichž použití je, v rámci zelené chemie, označeno jako nežádoucí (označena červeně).

**Tabulka 4:** Zelená rozpouštědla vybrána pro testování a jejich vlastnosti.

Rozpouštědlo	Bod tání <sup>71</sup> [°C]	Bod varu <sup>71</sup> [°C]	Cena [CZK]	Skupenství <sup>c</sup>
2-MeTHF	- 136,0	78,0	1000 <sup>a</sup>	kapalné
EtOH	- 114,1	78,5	500 <sup>a</sup>	kapalné
MeOH	- 97,8	64,7	250 <sup>a</sup>	kapalné
<b>DCM</b>	- 95,0	39,8	400 <sup>a</sup>	kapalné
<b>DMF</b>	- 61,0	153,0	600 <sup>a</sup>	kapalné
CP	- 51,3	130,6	1700 <sup>a</sup>	kapalné
DMI	- 50,0	234,0	3200 <sup>a</sup>	kapalné
Anisol	- 37,3	156,0	1300 <sup>a</sup>	kapalné
EL	- 25,0	154,0	1200 <sup>a</sup>	kapalné
DMSO	18,5	189,0	1000 <sup>a</sup>	kapalné
Cyren	–	231,0	6000 <sup>a</sup>	kapalné
EC	36,4	248,0	1800 <sup>b</sup>	pevné

<sup>a</sup>přibližné ceny za 1 dm<sup>3</sup> z reference<sup>72</sup>; <sup>b</sup>přibližné ceny za 1 kg z reference<sup>72</sup>;

<sup>c</sup>za pokojové teploty

Z **Tabulky 4** vyplývá, že manipulace a práce s EC je za pokojové teploty komplikována tím, že je to pevná látka a proto byl EC vyřazen z dalšího testování. Vysoká pořizovací cena rozpouštědla také není žádoucí, protože taková rozpouštědla nebudou farmaceutickými firmami vnímána jako vhodné náhrady za nebezpečná rozpouštědla. Z tohoto důvodu byla vyřazena rozpouštědla DMI a cyren z dalšího testování.

## 4.1.2 Zelené báze a acylační činidla

Pro výběr bází sloužily dříve zmíněné odborné publikace<sup>34,57,65–67</sup> a mezi zvolené báze patří piperazin, morfolin, DBU a NaOH. Piperidin byl jako reference také hodnocen v kombinaci se zelenými rozpouštědly, přesto že by jeho použití mělo být omezeno. V rámci zelené chemie je však lepší navrhnout syntézu tak, aby alespoň v některých aspektech SPSS byly použity zelené alternativy.

Vybranými acylačními činidly byly: OxymaPure, HATU, PyBOP, COMU.<sup>23,70</sup> V teoretické části práce bylo uvedeno, že acylační činidla HOBt a DIC nejsou z pohledu

zelené chemie jako ideální, přesto byla tato činidla dále testována v kombinaci se zelenými rozpouštědly, protože patří k nejpoužívanějším.<sup>70</sup>

## 4.2 Testování rozpustnosti

SPPS často probíhá v polypropylenové stříkačce s vloženou fritou (ta zabraňuje mechanickým ztrátám), z tohoto důvodu je vyžadována homogenita připravených roztoků, které obsahují potřebné reagenty. Rozpustností se zabývá následující kapitola.

### 4.2.1 Rozpustnost Fmoc-AMK-OH

Zvolené Fmoc-AMK-OH byly váženy tak, aby měl výsledný roztok koncentraci  $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$  používanou při tvorbě peptidové vazby. Rozpustnost vybraných aminokyselin je shrnuta v **Tabulce 5**. Vzhledem k tomu, že v některých případech se aminokyselina kompletně rozpustila až po přidání acylačních činidel HOBt nebo OxymaPure a DIC, jsou tato data označena pomocí (\*). Zajímavé rozpouštěcí schopnosti projevil CP, který se přiblížil tradičnímu SPPS rozpouštědлу DMF. Za účelem zvýšení rozpouštěcích schopností anisolu byly vytvořeny různé směsi s jinými zelenými rozpouštědly. Směs anisol/DMSO (4:1) není uvedena v **Tabulce 5**, i když je dále v práci testována, protože rozpouštění Fmoc-AMK-OH nebo acylačních činidel probíhalo vždy napřed v DMSO.

### 4.2.2 Rozpustnost acylačních činidel

Testování rozpustnosti probíhalo navážením (popř. napipetováním) daného množství zvoleného acylačního činidla, aby koncentrace roztoku byla  $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ . Další podíl byl přidán v případě, že rozpouštění látky proběhlo úspěšně, na výslednou koncentraci  $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ , tj. koncentrace využívána při acylacích v SPPS. Výsledky jsou shrnuty v **Tabulce 5**. EL a CP dobře rozpouští acylační činidla HOBt nebo OxymaPure, která jsou dále použita v této práci. Anisol špatně rozpouští reagenty potřebné pro acylace, a je proto nutné použití směsí jako anisol/EL, anisol/EtOH nebo anisol/DMSO. Acylační činidla HATU, PyBOP a COMU byla z dalšího testování vyřazena, a to z důvodu nízké rozpustnosti v zelených rozpouštědlech, ale také jejich vysoké pořizovací ceny.

**Tabulka 5:** Rozpouštěcí schopnosti zelených rozpouštědel.<sup>a</sup>

Fmoc-AMK(PG)-OH

Acylační činidlo 0,1M|0,2M

Rozpouštědlo	Phe	Gly	Ser( <i>t</i> Bu)	Tyr( <i>t</i> Bu)	DIC	HOBt	OxymaPure	HATU	PyBOP	COMU
DMF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
DCM	NT	NT	NT	NT	R	N	R	N	R	N
2-MeTHF	R	R	NT	NT	R	R	NT	NT	NT	NT
CP	R	R	R	R	R	R	R	N	R	R
Anisol	N	N	NT	NT	R	N	R	N	N	N
EL	R <sup>b</sup>	R <sup>b</sup>	R <sup>b</sup>	R <sup>b</sup>	R	R	R	N	N	N
DMSO	R	R	NT	R	NT	R	R	NT	NT	NT
EtOH	NT	NT	NT	NT	NT	R	R	NT	NT	NT
Anisol/EL (1:1)	R <sup>b</sup>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Anisol/EtOH (1:1)	R <sup>b</sup>	R <sup>*</sup>	R <sup>b</sup>	R <sup>b</sup>	NT	NT	NT	NT	NT	NT

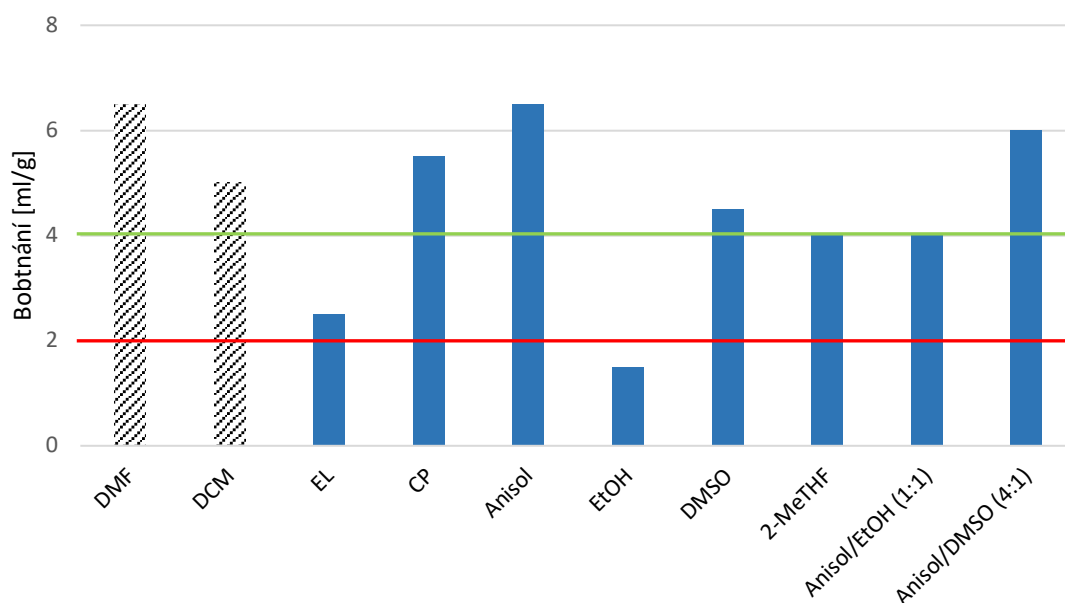
<sup>a</sup>R (zelená) = rozpustné, N (červená) = nerozpustné, NT (šedá) = nebylo testováno; <sup>b</sup>rozpuštění po přidavku HOBt nebo OxymaPure a DIC

## 4.3 Bobtnání pryskyřic

Jednou z klíčových vlastností vybraného zeleného rozpouštědla je bobtnání pryskyřice. Kapitola se věnuje testování vybraných zelených rozpouštědel s ohledem na jejich schopnosti bobtnat různé druhy pryskyřic.

### 4.3.1 PS-DVB pryskyřice

Pro testování bobtnání PS-DVB byla zvolena PS-Rink pryskyřice s kapacitou 0,61 mmol/g. **Graf 1** shrnuje výsledky bobtnání této pryskyřice v uvedených rozpouštědlech. Jsou vyznačeny hranice použitelnosti (<2 ml/g – nepoužitelné, 2-4 ml/g dobré, >4 ml/g velmi dobré) podle Santini et. al.<sup>15</sup> Pro srovnání je uvedena i hodnota bobtnání PS-Rink pryskyřice v DMF a DCM.



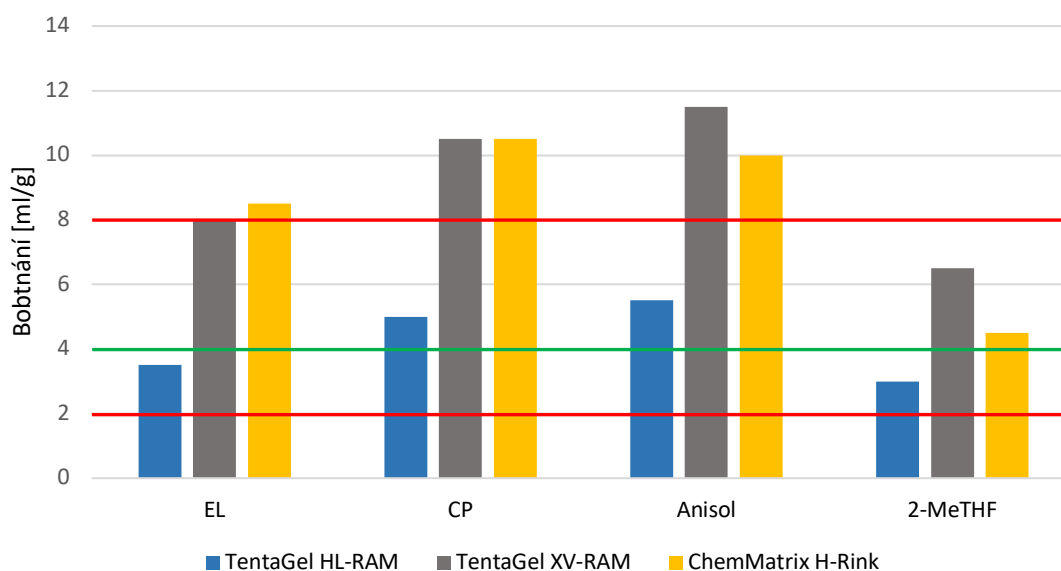
**Graf 1:** Výsledky bobtnání PS-Rink pryskyřice.

Z **Grafu 1** vyplývá, že CP, anisol, DMSO, 2-MeTHF bobtnaly PS-Rink pryskyřici velmi dobře. EL se pohyboval na hraně použitelnosti, i přesto byl dále v praktické části hodnocen, protože z hlediska zelené chemie se jedná o slibné rozpouštědlo. Anisol vykazoval slabé rozpouštěcí schopnosti různých reagentů (**Tabulka 5**), a proto bylo testováno bobtnání i u příslušných směsí anisolu s jinými rozpouštědly. Z těchto směsí byla nejlepší hodnota bobtnání pozorována u anisol/DMSO.

PS-Rink stále představuje jednu z nejužívanějších a komerčně nejdostupnějších pryskyřic a také pro tento resin nebylo popsáno mnoho úspěšných pokusů o GSPPS, z tohoto důvodu byla zvolena pro další charakterizaci zelených rozpouštědel v syntetické části této práce.

### 4.3.2 PS-PEG a PEG pryskyřice

Jako PS-PEG pryskyřice byl zvolen TentaGel ve dvou různých provedeních: HL-RAM (HL = high loading) s kapacitou 0,38 mmol/g a XV-RAM (XV = extended swelling volume) s kapacitou 0,21 mmol/g. Pro otestování bobtnání čistě PEG pryskyřic v zelených rozpouštědlech byl vybrán ChemMatrix H-Rink s kapacitou 0,48 mmol/g. Výsledky bobtnání PS-PEG a PEG pryskyřic shrnuje **Graf 2**.



**Graf 2:** Výsledky bobtnání na TentaGelu a ChemMatrixu.

TentaGel HL-RAM pryskyřice poskytovala nižší hodnoty bobtnání v méně polárních rozpouštědlech jako anisol a 2-MeTHF. CP se pohyboval na přibližně stejných hodnotách jak u PS-Rink pryskyřice. EL jakožto polárnější rozpouštědlo bobtnal tuto pryskyřici lépe než v případě PS-Rink.

TentaGel XV-RAM je pryskyřice, jejíž struktura byla upravena pro zlepšení bobtnajících schopností bez potřeby změny rozpouštědla. Hodnota bobtnání pro 2-MeTHF se zvýšila, ale u ostatních rozpouštědel bylo pozorováno příliš velké nabobtnání pryskyřice okolo hodnoty 8 ml/g. Následkem bylo vytvoření gelu, což v SPPS představuje problém, ve smyslu nedostatečného mechanického promíchání reakční směsi



a k nabobtnané pryskyřici by bylo zapotřebí přidat větší objem rozpouštědla. Z hlediska zelené chemie jsou rozpouštědla s hodnotou bobtnání  $\geq 8$  ml/g nepoužitelná.

Obdobná situace jako u pryskyřice TentaGel XV-RAM nastala i v případě ChemMatrix H-Rink. Hodnota bobtnání pro 2-MeTHF se pohybovala v optimálním rozmezí, rozpouštědla EL, CP a anisol poskytovala příliš velké hodnoty bobtnání a vznikal gel, který je v GSPPS nežádoucí.

## 4.4 Efektivita tvorby peptidové vazby

Hlavní a základní vlastností rozpouštědel pro úspěšné provedení SPPS je efektivní tvorba peptidové vazby bez vedlejších reakcí, a proto je této problematice věnována samostatná kapitola.

### 4.4.1 Příprava modelové výchozí látky pro testování

PS-Rink (**1**, Schéma 5) s kapacitou 0,61 mmol/g byl zvolen jako výchozí pryskyřice. Model pro testování byl připraven za použití tradičních činidel a rozpouštědel. Nejprve bylo provedeno štěpení Fmoc chránící skupiny z pryskyřice (**1**), jelikož je z výroby chráněna Fmoc protektivní skupinou, a následně byla ukotvena Fmoc-Ala-OH na pryskyřici (**2**). Po reakci byl vypočten loading (průměrná hodnota 0,3 mmol/g) a pokud byla hodnota uspokojivá, byla provedena další deprotektce. Připravená modelová látka (**3**) byla dále použita pro hodnocení efektivity tvorby peptidové vazby v zelených rozpouštědlech.

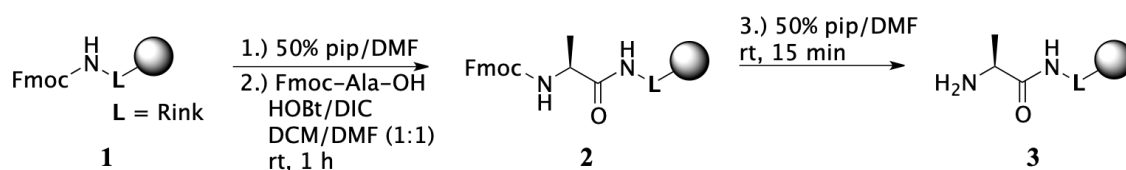


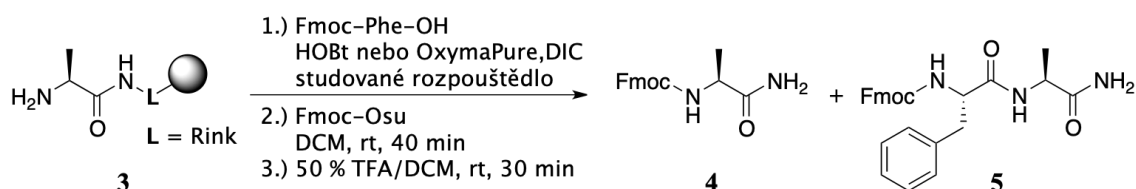
Schéma 5: Tvorba výchozí látky pro testování acylace v zelených rozpouštědlech.

### 4.4.2 Testování efektivity acylace

Podkapitola je dále rozdělena do tří částí, kde je popsána zvolená metodika testování a použití dvou kombinací acylačních činidel: standardní HOBt a DIC nebo zelenější kombinace OxymaPure a DIC. Během vypracovávání práce bylo použití 2-MeTHF popsáno v odborné literatuře a z dalšího testování byl proto vyřazen.<sup>66,67</sup>

#### 4.4.2.1 Metodika testování efektivity tvorby peptidové vazby

Pro testování bylo vždy odebráno analytické množství výchozí látky (**3**, **Schéma 6**), která byla acylována druhou Fmoc-AMK. Z důvodu účinnější chromatografické separace Fmoc-Ala-NH<sub>2</sub> (**4**) a dipeptidu (**5**) byla zvolena jako druhá aminokyselina Fmoc-Phe-OH.<sup>67</sup> Další zlepšení chromatografických vlastností poskytovala i přítomnost Fmoc chránící skupiny. Ke sledování úspěšnosti acylací byla nejprve provedena kontrola kvantitativní tvorby peptidové vazby s Fmoc-*N*-hydroxysukcinimidem (Fmoc-Osu). Pro stanovení výsledného poměru **5:4**, který odpovídá efektivitě acylace, bylo využito absorpčních vlastností Fmoc při 300 nm. Reakční podmínky acylací jsou popsány dále v **Tabulce 6** a **7**.



**Schéma 6:** Postup při testování acylace v zelených rozpouštědlech.

#### 4.4.2.2 HOBt a DIC

Postup při těchto reakcích popisuje **Schéma 6**. Reakční podmínky a výsledky testování tvorby peptidové vazby pro kombinaci acylačních činidel HOBt a DIC shrnuje **Tabulka 6**.

**Tabulka 6:** Reakční podmínky a výsledky acylace pomocí HOBt a DIC.

Experiment	Studované rozpouštědlo	Reakční podmínky <sup>a</sup>	5:4 <sup>b</sup>
1	DCM/DMF (1:1)	rt, 1 h	100:0
2		rt, 1 h	70:30 – 100:0
3	EL	MW (100 W, 50 °C), 15 min	100:0
4		MW (200 W, 90 °C), 2 min	100:0
5		rt, 1 h	6:94 - 74:26
6	CP	MW (100 W, 50 °C), 15 min	100:0
7		MW (200 W, 90 °C), 2 min	100:0
8		rt, 1 h	100:0
9	Anisol	MW (300 W, 85 °C), 2 min	100:0
10		rt, 1 h	100:0
11	Anisol/EL (1:1)	MW (200 W, 90 °C), 2 min	100:0
12		rt, 1 h	100:0
13	Anisol/EtOH (1:1)	MW (200 W, 90 °C), 2 min	100:0
14	Anisol/DMSO (4:1)	rt, 1 h	100:0

<sup>a</sup>MW = mikrovlnný reaktor; <sup>b</sup>Poměr 5:4 byl stanoven z chromatogramů při vlnové délce 300 nm.

Výsledky testování acylace v EL za standardních podmínek (rt, 1 h) jsou uvedeny v podobě rozmezí (70 – 100 %, **experiment 2**), protože se tento postup projevil jako nereprodukovatelný. Důvodem byla pravděpodobně reaktivita EL s volným N-koncem výchozí látky (**3**) podrobněji rozebrána v kapitole **4.8.1**. Použití kratšího reakčního času a mikrovlnného reaktoru poskytovala reakce uspokojivé výsledky (**experimenty 3, 4**). V případech, kdy bylo použito MW, nebylo zapotřebí dlouhého rozpouštění reagentů za pomoci ultrazvuku. Reakční směs byla kvantitativně přenesena do zkumavky a po reakci v MW byl roztok čirý bez známek vysrážení reakční směsi.

Obdobné výsledky jako pro EL byly pozorovány u CP. Acylace za tradičních podmínek (rt, 1 h) byla neúspěšná a její výsledky nereprodukovatelné (6 – 74 %), pravděpodobně opět z důvodu reaktivity CP s volným N-koncem výchozí látky (**3**), která je popsána v kapitole **4.8.1**. Při použití MW byly acylace úspěšné (**experimenty 6, 7**). Za povšimnutí stojí fakt, že po použití MW byl resin tmavě oranžové barvy a při promývání se DMF zabarvoval do oranžové barvy.

Anisol špatně rozpouštěl používané reagenty, a proto byla reakce provedena kvantitativním přenesením suspenze nerozpuštěných reagentů do stříkačky s odstraněným pístem (**experiment 8**). V tomto případě došlo v průběhu reakce k vysrážení směsi, kterou nebylo možné odstranit pouhým promýváním pomocí anisolu. K úplnému rozpuštění reakční směsi došlo při provedení acylace v MW (**experiment 9**), kdy ale musel být použit větší výkon (300 W, 85°C) a nižší teplota reakce, protože nebylo možné dosáhnout plánované teploty (90°C).

Směs anisol/EL neposkytovala homogenní roztok, ale po reakci byly veškeré reagenty rozpuštěné (**experiment 10 a 11**). U směsi anisolu s EtOH nebo DMSO nebyly pozorovány žádné komplikace a reakce probíhaly kvantitativně (**experimenty 12 – 14**).

#### 4.4.2.3 OxymaPure a DIC

Postup testování efektivity tvorby peptidové vazby pomocí acylačních činidel OxymaPure a DIC byl proveden podle **Schématu 6**. Reakční podmínky a výsledky popisuje **Tabulka 7**.

Tvorba peptidové vazby v EL za standardních podmínek reakce (rt, 1 h) neprobíhala kvantitativně (97 %, **experiment 2**), rozpustnost reagentů představovala komplikace v podobě nutnosti použití ultrazvuku a kompletního rozpuštění bylo dosaženo až po přidavku DIC. MW v tomto případě opět poskytoval homogenní roztok po reakci, bez předchozího použití ultrazvuku (**experimenty 3, 4**). Pyskyřice zežloutla a při promývání se DMF zbarvoval do žluté barvy. Zbarvení nejspíše způsobovala kombinace OxymaPure a DIC, protože při přípravě roztoku reagentů bylo možné pozorovat zbarvení roztoku do žluté barvy.

Acylace za standardních podmínek v CP poskytovala neuspokojivé výsledky (5 %, **experiment 5**), při použití MW byl tento problém odstraněn a reakce probíhala kvantitativně (**experimenty 6, 7**). Zbarvení pyskyřice bylo tentokrát do tmavě zelené až černé barvy.

Díky nízké rozpustnosti reagentů v anisolu byl roztok přenesen do stříkačky bez pístu. Přesto nebylo pozorováno vysrážení roztoku reagentů a acylace byla úspěšná, podobně jako při použití MW (**experimenty 8, 9**).

Reagenty se ve směsi anisolu s EL nebo EtOH opět rozpouštěly pomaleji, ale po přidání DIC bylo dosaženo homogenního roztoku. Všechny použité směsi anisolu

s jinými zelenými rozpouštědly poskytovaly kvantitativní tvorbu peptidové vazby bez dalších komplikací (**experimenty 10 – 13**).

**Tabulka 7:** Reakční podmínky a výsledky acylace pomocí OxymaPure a DIC.

Experiment	Studované rozpouštědlo	Reakční podmínky <sup>a</sup>	5:4 <sup>b</sup>
1	DCM/DMF (1:1)	rt, 1 h	100:0
2		rt, 1 h	97:3
3	EL	MW (100 W, 50 °C), 15 min	100:0
4		MW (200 W, 90 °C), 2 min	100:0
5		rt, 1 h	5:95
6	CP	MW (100 W, 50 °C), 15 min	100:0
7		MW (200 W, 90 °C), 2 min	100:0
8	Anisol	rt, 1 h	100:0
9		MW (300 W, 85 °C), 2 min	100:0
10	Anisol/EL (1:1)	rt, 1 h	100:0
11		MW (200 W, 90 °C), 2 min	100:0
12	Anisol/EtOH (1:1)	rt, 1 h	100:0
13	Anisol/DMSO (4:1)	rt, 1 h	100:0

<sup>a</sup>MW = mikrovlnný reaktor; <sup>b</sup>Poměr 5:4 byl stanoven z chromatogramů při vlnové délce 300 nm.

## 4.5 Odštěpení Fmoc chránící skupiny

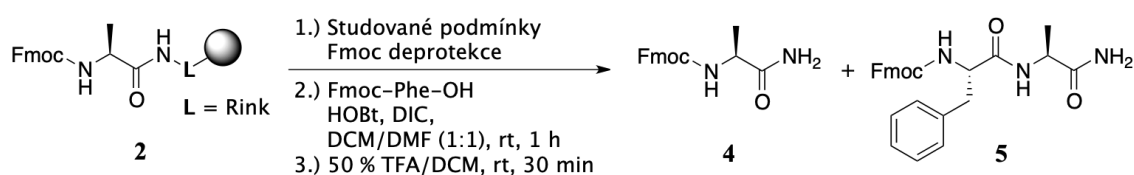
Kompletní odštěpení Fmoc chránící skupiny je dalším z kroků, který je pro úspěšnou GSPPS nutné optimalizovat. Následující kapitola se problematice věnuje a popisuje úspěšné i neúspěšné pokusy o optimalizaci deprotektce a je rozdělena do podkapitol podle studovaných bází.

### 4.5.1 Příprava modelové výchozí látky

Modelovou výchozí látkou pro testování štěpení Fmoc skupiny byl Fmoc-Ala-NH-Rink (**2**), schéma přípravy je součástí **Schématu 5**.

## 4.5.2 Metodika testování Fmoc štěpení

K testování bylo odebíráno analytické množství výchozí látky (**2**), která byla nabobtnána a promyta studovaným zeleným rozpouštědlem. Poté bylo provedeno štěpení Fmoc chránící skupiny za podmínek, které uvádí **Tabulka 8, 9, 10, 11 a 12** za vzniku nechráněného N-konce ukotvené aminokyseliny. Ukotvení Fmoc-Phe-OH probíhalo za tradičních podmínek dle **Schématu 7**. V podkapitole **4.4.2.1** jsou uvedeny důvody pro zvolení tohoto testovacího modelu. Efektivitu deprotektce poté charakterizuje poměr **5:4** získaný z chromatogramů při 300 nm.



**Schéma 7:** Postup při hodnocení účinnosti deprotektce Fmoc chránící skupiny.

## 4.5.3 Piperidin

Použité reakční podmínky a výsledky testování deprotektce v zelených rozpouštědlech pomocí 50% (v/v) roztoku piperidinu shrnuje **Tabulka 8**.

Nekompletní štěpení Fmoc chránící skupiny bylo pozorováno pouze u EL za standardních podmínek (2 %, **experiment 2**). Zvýšení účinnosti na 100 % bylo dosaženo pomocí zvýšené teploty (**experiment 3**). Při použití MW bylo dosaženo i kratších reakčních časů (**experimenty 4, 5**). Deprotektce v ostatních rozpouštědlech probíhala vždy kvantitativně bez dalších komplikací. Štěpení chránící skupiny pomocí roztoku piperidinu s CP bylo úspěšné (**experimenty 6, 7, 8**), ale při smíchání těchto látek bylo pozorováno žluté zbarvení roztoku a jak popisuje dále podkapitola **4.8.2**, reaguje CP s piperidinem za vzniku příslušného enamínu.

**Tabulka 8:** Testování štěpení Fmoc pomocí 50% (v/v) roztoku piperidinu.

Experiment	Studované rozpouštědlo	Reakční podmínky <sup>a</sup>	5:4 <sup>b</sup>
1	DMF	rt, 15 min	100:0
2		rt, 15 min	2:98
3		50 °C, 15 min	100:0
4	EL	MW (100 W, 50 °C), 5 min	100:0
5		MW (200 W, 90 °C), 2 min	100:0
6		rt, 15 min	100:0
7	CP	MW (100 W, 50 °C), 5 min	100:0
8		MW (200 W, 90 °C), 2 min	100:0
9		rt, 15 min	100:0
10	Anisol	MW (100 W, 50 °C), 5 min	100:0
11		MW (300 W, 85 °C), 2 min	100:0
12		rt, 15 min	100:0
13	Anisol/EL (1:1)	MW (100 W, 50 °C), 5 min	100:0

<sup>a</sup>MW = mikrovlnný reaktor; <sup>b</sup>Poměr 5:4 byl stanoven z chromatogramů při vlnové délce 300 nm.

#### 4.5.4 Morfolin

Reakční podmínky společně s účinností deprotektce 50% (v/v) roztoku morfolinu popisuje **Tabulka 9**.

Štěpení Fmoc chránící skupiny za použití 50% (v/v) roztoku morfolinu neprobíhalo kvantitativně za standardních podmínek (**experimenty 2, 7, 12 a 17**) v žádném ze studovaných rozpouštědel. Rozpouštědla lze seřadit do řady podle vzrůstající schopnosti deprotektce v kombinaci s morfolinem: EL (0 %) < CP (53 %) < anisol (55 %) < anisol/EL (60 %). Zvýšení teploty nevedlo ke kompletnímu odštěpení chránící skupiny, toho bylo dosaženo až při využití MW v kombinaci s delším reakčním časem (**experimenty 5, 10, 15, 20**) nebo vyšším výkonem MW (**experimenty 6, 11, 16**).

**Tabulka 9:** Testování štěpení Fmoc skupiny pomocí 50% (v/v) roztoku morfolinu.

Experiment	Studované rozpouštědlo	Reakční podmínky <sup>a</sup>	5:4 <sup>b</sup>
1	DMF	rt, 15 min	100:0 <sup>c</sup>
2		rt, 15 min	0:100
3		50 °C, 15 min	96:4
4	EL	MW (100 W, 50 °C), 5 min	96:4
5		MW (100 W, 50 °C), 15 min	100:0
6		MW (200 W, 90 °C), 2 min	100:0
7		rt, 15 min	53:47
8		50 °C, 15 min	96:4
9	CP	MW (100 W, 50 °C), 5 min	99:1
10		MW (100 W, 50 °C), 15 min	100:0
11		MW (200 W, 90 °C), 2 min	100:0
12		rt, 15 min	55:45
13		50 °C, 15 min	99:1
14	Anisol	MW (100 W, 50 °C), 5 min	99:1
15		MW (100 W, 50 °C), 15 min	100:0
16		MW (300 W, 85 °C), 2 min	100:0
17		rt, 15 min	60:40
18		50 °C, 15 min	99:1
19	Anisol/EL (1:1)	MW (100 W, 50 °C), 5 min	94:6
20		MW (100 W, 50 °C), 15 min	100:0

<sup>a</sup>MW = mikrovlnný reaktor; <sup>b</sup>Poměr 5:4 byl stanoven z chromatogramů při vlnové délce 300 nm.; <sup>c</sup>data pochází z reference.<sup>66</sup>

### 4.5.5 Piperazin

Často používanou koncentrací této báze bývá 5% (w/v) roztok,<sup>34</sup> proto i tato koncentrace byla zvolena pro testování účinnosti štěpení Fmoc chránící skupiny. Podmínky jednotlivých testování a jejich výsledky jsou představeny v **Tabulce 10**.



**Tabulka 10:** Testování štěpení Fmoc skupiny pomocí 5 % (w/v) roztoku piperazinu.

Experiment	Studované rozpouštědlo	Reakční podmínky <sup>a</sup>	5:4 <sup>b</sup>
1	DMF	rt, 15 min	NT
2		rt, 15 min	0:100
3		50 °C, 15 min	8:92
4	EL	MW (100 W, 50 °C), 5 min	8:92
5		MW (100 W, 50 °C), 15 min	32:68
6	CP	rt, 15 min	NT
7		rt, 15 min	71:29
8	Anisol	50 °C, 15 min	100:0
9		MW (100 W, 50 °C), 5 min	100:0
10		rt, 15 min	12:88
11	Anisol/EL (1:1)	MW (100 W, 50 °C), 5 min	68:32

NT = nebylo testováno; <sup>a</sup>MW = mikrovlnný reaktor; <sup>b</sup>Poměr 5:4 byl stanoven z chromatogramů při vlnové délce 300 nm.

CP nebyl testován, jelikož piperazin byl v tomto rozpouštědle nerozpustný. Úspěšné optimalizace reakčních podmínek se podařilo dosáhnout pouze v kombinaci piperazinu a anisolu, ovšem až za zvýšené teploty nebo použití MW (**experimenty 8, 9**). Podobnou účinnost nebylo možné pozorovat v případě směsi anisol/EL (12 – 68 %, **experimenty 10, 11**). Tento fakt naznačuje, že neúspěšnou deprotekcí zapříčiňuje přítomnost EL v této směsi.

#### 4.5.6 DBU

V **Tabulce 11** jsou popsány reakční podmínky a výsledky účinnosti deprotektce působením 5% (w/w) DBU.

EL nevykazoval uspokojivé výsledky (0 %, **experiment 2**) při standardních podmínkách, ani při zvýšené teplotě (15 %, **experiment 3**) a použití MW (17 – 21 %, **experimenty 4, 5**). Kompletní deprotektce bylo dosaženo až při použití vyšší teploty (90°C) a výkonu MW (**experiment 6**). CP za pokojových podmínek neposkytl kvantitativní deprotekcí (88 %, **experiment 7**), pravděpodobně způsobenou tvorbou hnědé emulze. Pro dosažení úspěšné optimalizace bylo nutné zvýšit teplotu nebo využít

MW. Použití anisolu vedlo, jako u jediného z testovaných rozpouštědel, k účinnému štěpení Fmoc chránící skupiny za standardních podmínek (**experiment 11**).

**Tabulka 11:** Testování štěpení Fmoc skupiny pomocí 5% (v/v) roztoku DBU.

Experiment	Studované rozpouštědlo	Reakční podmínky <sup>a</sup>	5:4 <sup>b</sup>
1	DMF	rt, 15 min	100:0
2		rt, 15 min	0:100
3		50 °C, 15 min	15:85
4	EL	MW (100 W, 50 °C), 5 min	17:83
5		MW (100 W, 50 °C), 15 min	21:79
6		MW (200 W, 90 °C), 2 min	100:0
7		rt, 15 min	88:12
8		50 °C, 15 min	100:0
9	CP	MW (100 W, 50 °C), 5 min	100:0
10		MW (200 W, 90 °C), 2 min	100:0
11		rt, 15 min	100:0
12	Anisol	MW (100 W, 50 °C), 5 min	100:0
13		MW (300 W, 85 °C), 2 min	100:0
14		rt, 15 min	39:61
15	Anisol/EL (1:1)	50 °C, 15 min	95:5
16		MW (100 W, 50 °C), 5 min	100:0

<sup>a</sup>MW = mikrovlnný reaktor; <sup>b</sup>Poměr 5:4 byl stanoven z chromatogramů při vlnové délce 300 nm.; <sup>c</sup>data pochází z reference.<sup>66</sup>

#### 4.5.7 NaOH

Zelená rozpouštědla jako EL a CP nebyla testována v kombinaci s NaOH, vzhledem k jejich reaktivitě (EL – ester, CP – keton). Možnost štěpení Fmoc chránící skupiny byla již popsána pro směs 2-MeTHF/MeOH<sup>66,67</sup> a z tohoto důvodu byla testována pouze směs anisolu s MeOH nebo EtOH. Některé výsledky (**experimenty 1 – 5**) jsou starší než zvolená metodika testování štěpení Fmoc (data příslušně označena v **Tabulce 12**). Tento starší postup se lišil v přípravě dipeptidu Fmoc-Ala-Ala-NH<sub>2</sub>. Separace Fmoc-Ala-NH<sub>2</sub> a Fmoc-Ala-Ala-NH<sub>2</sub> na HPLC nebyla dostatečně účinná, a proto jsou výsledky

uvedeny jako přibližné. **Tabulka 12** zároveň obsahuje informaci o reakčních podmínkách a výsledcích testování štěpení Fmoc chránící skupiny NaOH ve směsi anisol/EtOH syntézou dipeptidu Fmoc-Phe-Ala-NH<sub>2</sub> (**5**). Za těchto podmínek neproběhla kvantitativní deprotektce a směs anisol/EtOH vykazuje menší účinnost reakce (95 %, **experiment 6**) oproti směsi anisol/MeOH (**experiment 1**) za stejné koncentrace NaOH. Prodloužením reakčního času (**experiment 7**) bylo dosaženo kompletní deprotektce.

**Tabulka 12:** Testování deprotektce Fmoc pomocí roztoku NaOH.

Experiment	Studované rozpouštědlo	Reakční podmínky	5:4 <sup>a</sup>
1		0,2 M NaOH, rt, 15 min	100:0 <sup>b</sup>
2		0,1 M NaOH, rt, 25 min	100:0 <sup>b</sup>
3	Anisol/MeOH (1:1)	0,1 M NaOH, rt, 15 min	<99:>1 <sup>b</sup>
4		0,05 M NaOH, rt, 20 min	<90:>10 <sup>b</sup>
5		0,05 M NaOH, rt, 15 min	<60:>40 <sup>b</sup>
6	Anisol/EtOH (1:1)	0,2 M NaOH, rt, 15 min	95:5
7	Anisol/EtOH (1:1)	0,2 M NaOH, rt, 20 min	100:0

<sup>a</sup>Poměr 5:4 byl stanoven z chromatogramů při vlnové délce 300 nm; <sup>b</sup>připravený dipeptid Fmoc-Ala-Ala-NH<sub>2</sub>

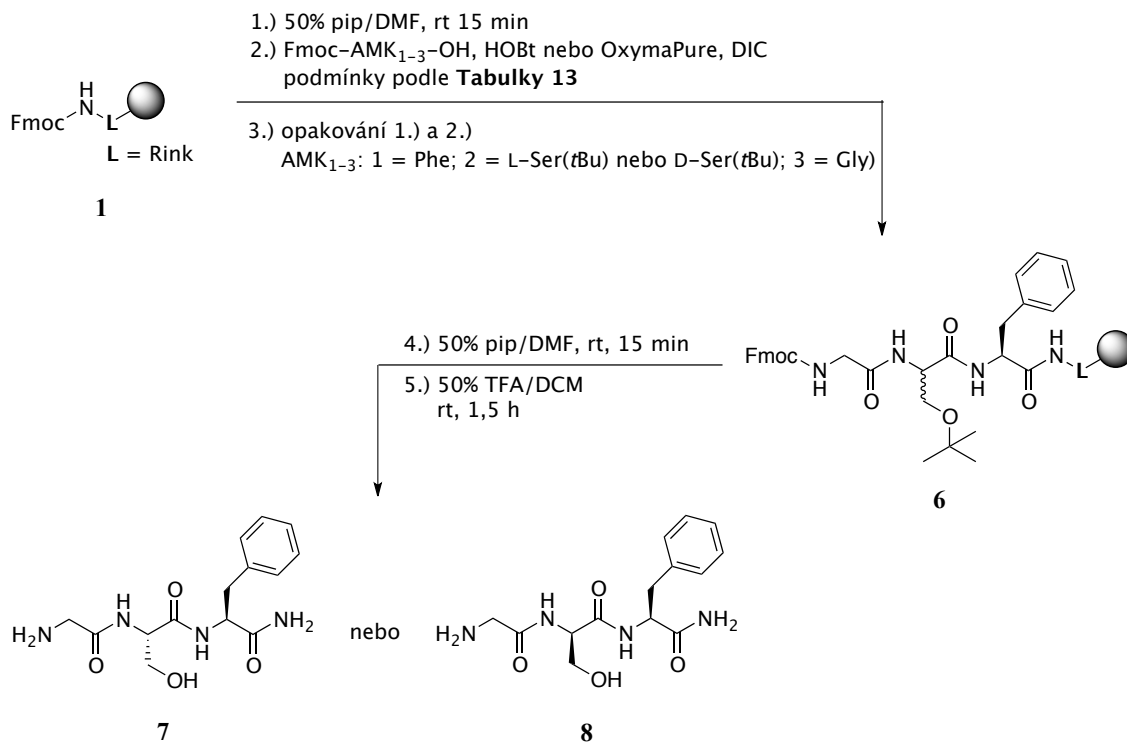
## 4.6 Testování racemizace

Racemizace patří k nejběžnějším vedlejším reakcím v SPPS a bývá velmi často z tohoto důvodu studována při zavádění nových acylačních postupů. Při použití různých rozpouštědel se může míra racemizace lišit a vzhledem k tomu, že se v této práci jedná o popsání nových rozpouštědel pro SPPS, je následující kapitola věnována právě této problematice.

### 4.6.1 Metody přípravy modelových peptidů

Syntetizované modelové tripeptidy byly H-Gly-L-Ser-Phe-NH<sub>2</sub> (**7**, **Schéma 8**) a H-Gly-D-Ser-Phe-NH<sub>2</sub> (**8**) podle odborné literatury,<sup>47</sup> ve které byly zvoleny s ohledem na náchylnost serinu ke tvorbě směsi racemátů. Metody pro separaci vznikajících diastereoisomerů pomocí UPLC (detaily metody jsou součástí Příloh), byly také vytvořeny podle odborné literatury. Syntéza byla provedena podle podmínek acylací

uvedených v **Tabulce 13**. Surové čistoty byly získány z UV-Vis chromatogramů, které jsou také součástí Příloh.



**Schéma 8:** Příprava modelových peptidů **7** a **8**.

**Tabulka 13:** Zvolené metody acylačních reakcí pro syntézu modelového tripeptidu.

Metoda	Rozpouštědlo	L-/D-Ser	Podmínky	Surová čistota [%] <sup>a</sup>
1	DCM/DMF (1:1)	L-Ser	HOBt, rt, 1h	88
2	DCM/DMF (1:1)	D-Ser	HOBt, rt, 1h	83
3	EL	L-Ser	HOBt, MW, <sup>b</sup> 15 min	47
4			OxymaPure, MW, <sup>b</sup> 15 min	50
5	CP	L-Ser	HOBt, MW, <sup>b</sup> 15 min	10
6			OxymaPure, MW, <sup>b</sup> 15 min	2
7	Anisol/EtOH	L-Ser	HOBt, rt, 1h	37
8	(1:1)		OxymaPure, rt, 1h	52
9	Anisol/DMSO	L-Ser	HOBt, rt, 1h	37
10	(4:1)		OxymaPure, rt, 1h	5

<sup>a</sup>procentuální čistota vypočítaná z UV-Vis spektra; <sup>b</sup>100W, 50°C

## 4.6.2 Výsledky testování

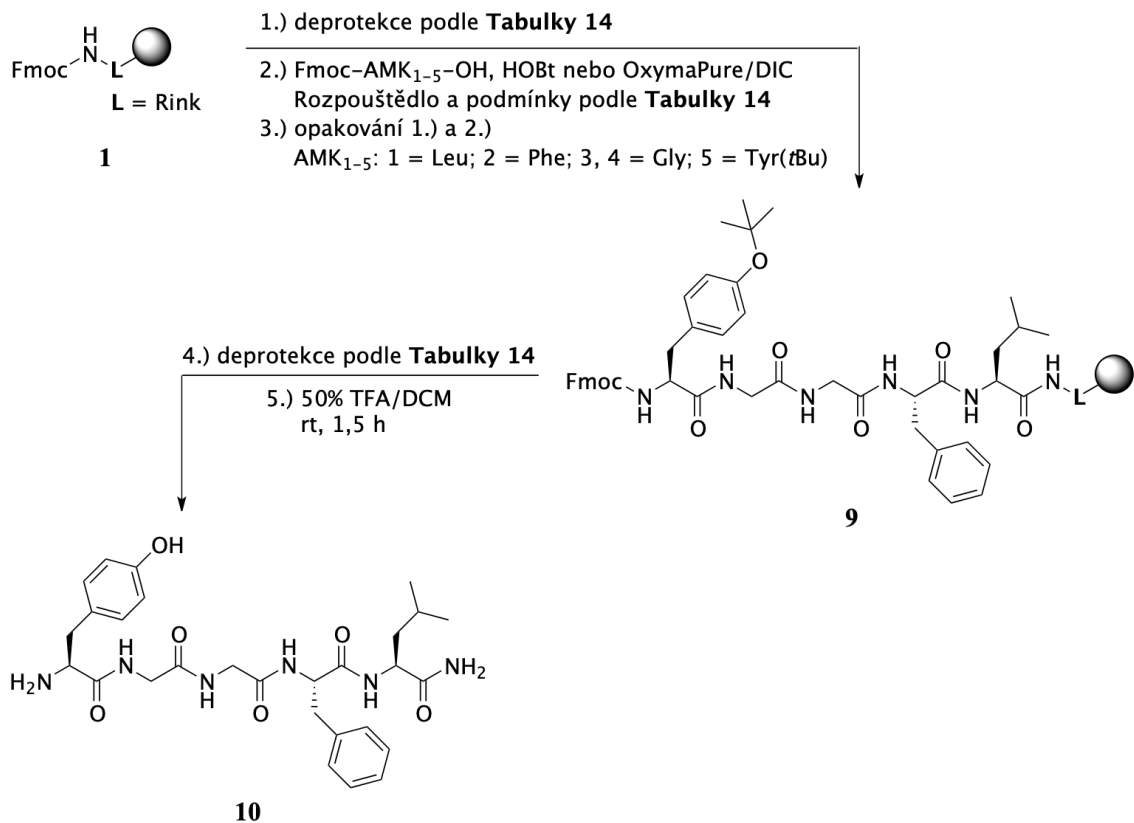
Syntetické a separační metody vytvořené podle literatury<sup>47</sup> neposkytovaly informaci o míře racemizace standardů (**7** a **8**) připravovaných tradičním postupem (**metody 1 a 2**). V získaných chromatogramech nebylo možné získat výsledky v podobě poměrů vznikajících diastereoisomerů tripeptidů, protože jejich separace nebyla dostatečně účinná. Testování selhalo i v dalších metodách (**metody 3 – 10**), které zahrnovaly použití zelených rozpouštědel nebo směsí. Příčinnou byly mimo jiné i malé čistoty izolovaných látek (viz. **Tabulka 13**) způsobené obtížným srážením peptidů. Reaktivita pravděpodobně také způsobovala nízké čistoty, jelikož některá zelená rozpouštědla reagují s volnou aminoskupinou rostoucího peptidu (kapitola **4.8.1**).

## 4.7 Příprava peptidu Leu-enkefalinu-NH<sub>2</sub>

Dalším krokem, k úspěšné aplikaci zelených alternativ na SPPS, je syntéza složitějšího modelového peptidu. Z takové syntézy je následně možné vyvodit použitelnost zvoleného protokolu v GSPPS. Kapitola je rozdělena na popis syntetické cesty, použitých metod a výsledky syntézy.

### 4.7.1 Syntéza

Výchozí pryskyřici byl zvolen PS-Rink s kapacitou 0,61 mmol/g. Zvolené metody štěpení Fmoc chránící skupiny a acylačních reakcí popisuje **Tabulka 14**. Pro kontrolu kompletní acylace byla provedena reakce s Fmoc-Osu. Finální štěpení peptidu a *t*Bu protektivní skupiny bylo realizováno roztokem TFA/DCM. Syntézu popisuje **Schéma 9**.



## 4.7.2 Metody

Použité metody pro syntézu Leu-enkefalinu-NH<sub>2</sub> (**10**) jsou shrnuty v **Tabulce 14**. Standardně používaná rozpouštědla nebo reagenty v SPPS jsou označeny červeně, zeleně pak studované alternativy. Pentapeptid připraven tradičním postupem (**metoda standard**) sloužil jako reference při dalších analýzách.

Dříve bylo uvedeno, že je v rámci zelené chemie výhodné nahradit alespoň jeden aspekt v SPPS zelenou alternativou a z toho důvodu byly první pokusy směřovány pouze k nahrazení standardně používaného roztoku piperidinu při štěpení Fmoc chránící skupiny. Zelené alternativy (**metody A, B, C**) byly zvoleny na základě výsledků efektivity deprotekcce popsané v kapitole **4.5**. Vzhledem k reaktivitě CP se sekundárními aminy (kapitola **4.8.2**), nebylo rozpouštědlo do této části testování zahrnuto. Deprotekce v 50% (v/v) morfolinu se zelenými rozpouštědly anisolem a EL nebyly kvantitativní za standardních podmínek (**Tabulka 9, experimenty 2 a 12**), a proto byly zvoleny metody (**metody A a B**), které využívaly MW s kratším reakčním časem (2 min, **experimenty 6 a 16**). Další vybranou deprotekcí bylo působení 5% (v/v) roztokem DBU v anisolu (**metoda C**), které bylo kompletní za standardních podmínek (rt, 15 min; **Tabulka 11**,

**experiment 11**). Piperazin poskytoval pouze pár úspěšných pokusů kvantitativního odštěpení Fmoc skupiny (**Tabulka 10**) a byl tak z dalšího testování vyřazen. Acylační reakce probíhaly za použití tradiční směsi rozpouštědel DCM/DMF a reagentů HOBt, DIC.

Dalším krokem bylo nahrazení rozpouštědel DCM a DMF při acylacích a promývání. Deprotekce probíhaly standardně 50% (v/v) roztokem piperidinu v DMF. Acylace za standardních podmínek v EL a CP (**metody D a E**) byly prováděny s cílem prokázáním vlivu reaktivity s volnou aminoskupinou rostoucího peptidu na výsledný výtěžek a čistotu získaného pentapeptidu, která je detailněji popsána dále v textu (podkapitola **4.8.1**). Další zvolená acylační metoda obsahovala anisol ve směsi s DMSO (**metoda F**), jelikož byly reagenty v této směsi nejlépe rozpustné (kapitola **4.2**) a při testování efektivity tvorby peptidové vazby nebyly pozorovány žádné komplikace (kapitola **4.4**).

Na základě výsledků předchozích metod byly navrženy buď kompletně (**metody I a J**) nebo alespoň z větší části zelené protokoly (**metody G a H**). V těchto metodách byla substituována rozpouštědla DMF a DCM ve všech krocích syntézy pentapeptidu kromě štěpení z pryskyřice. K promývání sloužil CP (**metody I a J**), jelikož vykazoval velmi dobré rozpouštěcí vlastnosti. Za předpokladu, že byla acylace pomocí směsi anisol/DMSO kvantitativní, neměla by jeho reaktivita s volným N-koncem představovat problém. CP nebyl při promývání s pryskyřicí v kontaktu déle než 30 sekund. Dále bylo nahrazeno acylační činidlo HOBt zelenější alternativou OxymaPure (**metoda K**). V protokolech s rozpouštědly EL (**metoda G**) nebo CP (**metoda H**) byl použit piperidin, který v kombinaci s těmito rozpouštědly za zvolených podmínek poskytoval kvantitativní štěpení Fmoc chránící skupiny (**Tabulka 8, experimenty 4 a 6**). Metody byly navrženy opět k testování vlivu reaktivity rozpouštědel (podkapitola **4.8.2**) na finální výtěžky a čistoty pentapeptidu.

**Tabulka 14:** Použité metody pro syntézu Leu-enkefalin-NH<sub>2</sub>.<sup>a</sup>

Metoda	Standard	A	B	C	D	E	F	G	H	I/J
Bobtnání	3×DCM	3×EL	3×Anisol	3×Anisol	3×DCM	3×DCM	3×DCM	5×EL	5×CP	5×Anisol
	3×DMF				3×DMF	3×DMF	3×DMF			
Štěpení Fmoc	50% pip <sup>b</sup>	50% morf <sup>c</sup>	50% morf <sup>c</sup>	5% DBU	50% pip <sup>b</sup>	50% pip <sup>b</sup>	50% pip <sup>b</sup>	50% pip <sup>b</sup>	50% pip <sup>b</sup>	5% DBU
	DMF rt, 15 min	EL MW <sup>d</sup> , 2 min	anisol MW <sup>e</sup> , 2 min	anisol rt, 15 min	DMF rt, 15 min	DMF rt, 15 min	DMF rt, 15 min	EL MW <sup>f</sup> , 15 min	CP rt, 15 min	anisol rt, 15 min
Promytí	5×DMF	5×DMF	5×DMF	5×DMF	5×EL	5×CP	5×Anisol	5×EL	5×CP	5×Anisol
	3×DCM	3×DCM	3×DCM	3×DCM						
Fmoc-AMK <sub>1-5</sub> -OH, HOBT (A-D) nebo OxymaPure (J), DIC										
Acylace	DMF/DC	DMF/DCM	DMF/DCM	DMF/DCM	EL	CP	Anisol/	EL	CP	Anisol/
	M (1:1) rt, 1 h	(1:1) rt, 1 h	(1:1) rt, 1 h	(1:1) rt, 1 h	rt, 1 h	rt, 1 h	DMSO (4:1) rt, 1 h	rt, 1 h	rt, 1 h	DMSO (4:1) rt, 1 h
Promytí	3×DMF	3×DMF	3×DMF	3×DMF	3×EL	3×CP	3×Anisol	3×EL	3×CP	3×CP
	3×DCM	3×DCM	3×DCM	3×DCM						

<sup>a</sup>reakční kroky zahrnující použití nežádoucích rozpouštědel jsou označeny červeně, zeleně pak použití doporučených alternativ; <sup>b</sup>pip = piperidin;

<sup>c</sup>morf = morfolin; <sup>d</sup>200 W, 90°C; <sup>e</sup>300 W, 85°C; <sup>f</sup>100 W, 50°C.



### 4.7.3 Výsledky syntézy

**Tabulka 15** uvádí procentuální výtěžky vypočtené z  $^1\text{H}$  NMR spekter (standard 4-methoxybenzoová kyselina) a surové čistoty získané z UV-Vis spekter. Vzorové  $^1\text{H}$  NMR spektrum pentapeptidu připraveného standardní metodou a rovněž LC chromatogramy, jsou součástí Příloh.

**Tabulka 15:** Výtěžky a surové čistoty syntetizovaných pentapeptidů.

Metoda	Výtěžek [%] <sup>a</sup>	Surová čistota [%] <sup>b</sup>
<b>Standard</b>	59 <sup>c</sup>	99
<b>A</b>	-	-
<b>B</b>	50 <sup>c</sup>	93
<b>C</b>	76 <sup>c</sup>	98
<b>D</b>	22/44 <sup>d</sup>	81
<b>E</b>	33 <sup>c</sup>	40
<b>F</b>	92 <sup>c</sup>	99
<b>G</b>	-/46 <sup>d</sup>	38
<b>H</b>	44 <sup>c</sup>	36
<b>I</b>	27 <sup>c</sup>	95
<b>J</b>	58 <sup>c</sup>	93

<sup>a</sup>procentuální výtěžek vypočítaný z NMR spektra; <sup>b</sup>procentuální čistota vypočítaná z UV-Vis spektra; <sup>c</sup>vypočítané výtěžky ze  $^1\text{H}$  NMR signálů Leu a Tyr; <sup>d</sup>vypočítané výtěžky ze  $^1\text{H}$  NMR signálů Leu/Tyr.

O úspěšnosti syntézy v SPPS je vypovídající hlavně surová čistota produktu, protože poukazuje na přítomnost látek, které mohou během syntézy vznikat např. nekompletní acylací, deprotekcí anebo samotnou reaktivitou rozpouštědla s rostoucím peptidem. Syntézou pomocí tradičních činidel a podmínek (**metoda standard**) vznikl pentapeptid s 99% surovou čistotou, jak bylo očekáváno.

V případě, kdy byla deproteckce provedena kombinací morfolin/EL (**metoda A**) nebyl pentapeptid izolován. Během syntézy byl pozorován klesající loading, způsobený reaktivitou EL s volnou aminoskupinou rostoucího peptidu, která byla pravděpodobně urychlena použitím MW. Kvůli prokázání vlivu reaktivity EL na syntézu peptidu byl EL použit ve všech krocích syntézy (**metoda G**), která poskytla surovou čistotu pouhých 38

% . V syntéze, kde byl EL uplatněn pouze při acylacích (**metoda D**), byl získán produkt s 81% čistotou. Přestože je tato hodnota čistoty vyšší než v předchozím případě, bylo dříve uvedeno, že acylační reakce nejsou za pokojových podmínek reprodukovatelné (**Tabulka 6, experiment 2**) a EL tak není vhodný pro použití jako zelené rozpouštědlo v GSPPS. Obdobně byl charakterizován i CP (**metoda H**), který v průběhu syntézy zbarvoval resin i výsledný produkt do oranžové barvy. O přítomnosti vysokého procenta nečistot je vypovídající 36% čistota získaného pentapeptidu. Z kapitoly **4.8.2** je patrné, že CP reaguje s použitými bázemi pro štěpení Fmoc chránící skupiny, a proto byla navržena metoda (**metoda E**), kde byly zvoleny standardní podmínky deprotektce působením roztoku piperidinu v DMF. U této syntézy bylo možné pozorovat zbarvení pryskyřice během syntézy s výslednou čistotou 40 %. CP, podobně jako EL, není pro acylační nebo deprotektční kroky v SPPS použitelný.

Mezi úspěšné pokusy o syntézu patří ty, se surovou čistotou pentapeptidu, která se blíží alespoň 90 %. Úspěšně byl nahrazen piperidin a DMF při deprotektci roztoky morfolinu nebo DBU v kombinaci s anisolem (**metody B, C, I a J**). Všechny kompletně zelené protokoly zahrnující anisol nebo jeho směsi (**metody I a J**) poskytovaly uspokojivé hodnoty čistot a lze je navrhnout pro použití v GSPPS.

## 4.8 Reaktivita rozpouštědel

Při aplikaci nového rozpouštědla pro GSPPS je nutné brát v potaz i jeho reaktivitu s použitými reagenty, jak plyne z literatury uvedené v teoretické části práce.<sup>53,62</sup> Této problematice je věnována následující kapitola.

### 4.8.1 Reaktivita s volným N-koncem peptidu

K testování reaktivity byly připraveny dvě výchozí látky. První modelovou látkou byl připraven H-Gly-NH-Rink (**11**), u kterého byla v literatuře pozorována reaktivita s GVL.<sup>54</sup> H-Ala-NH-Rink (**3**) byl vybrán jako zástupce běžné aminokyseliny. Cílem tohoto testování bylo vysvětlení snižujících se loadingů při deprotektci nebo acylačních reakcích u EL a CP. Přípravu modelových látek lze popsat **Schématem 5**, s rozdílem že při přípravě derivátu (**11**) byla ukotvován Fmoc-Gly-OH.

Testování bylo provedeno přidáním čistého rozpouštědla do stříkačky s pryskyřicí. V případě EL bylo testováno také jeho chování za přídavku aktivačních činidel HOBt a DIC. Výsledky testování a jeho podmínky s příslušnými deriváty shrnuje

**Tabulka 16 a 17.** Produkty byly dále charakterizovány pomocí  $^1\text{H}$  NMR a vedlejší produkty vznikající reakcí rozpouštědla EL s volnou aminoskupinou byly analyzovány také pomocí HRMS.

**Tabulka 16:** Reaktivita rozpouštědel s H-Gly-NH-Rink.<sup>a</sup>

Experiment	Rozpouštědlo	Podmínky	Výsledek	Vznikající derivát
<b>1</b>	EL	rt, on	S	-
<b>2</b>	EL	HOBt, DIC, rt, on	N	<b>14a</b>
<b>3</b>	CP	rt, on	N	<b>15a</b>
<b>4</b>	Anisol	rt, on	S	-

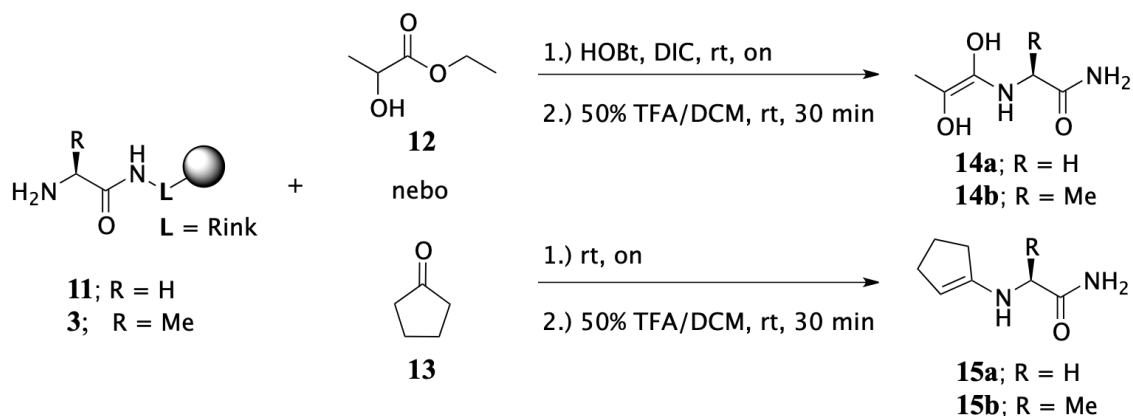
<sup>a</sup>S = stabilní, N = nestabilní

**Tabulka 17:** Reaktivita rozpouštědel s H-Ala-NH-Rink.<sup>a</sup>

Experiment	Rozpouštědlo	Podmínky	Výsledek	Vznikající derivát
<b>5</b>	EL	rt, on	S	-
<b>6</b>	EL	HOBt, DIC, rt, on	N	<b>14b</b>
<b>7</b>	CP	rt, on	N	<b>15b</b>
<b>8</b>	Anisol	rt, on	S	-

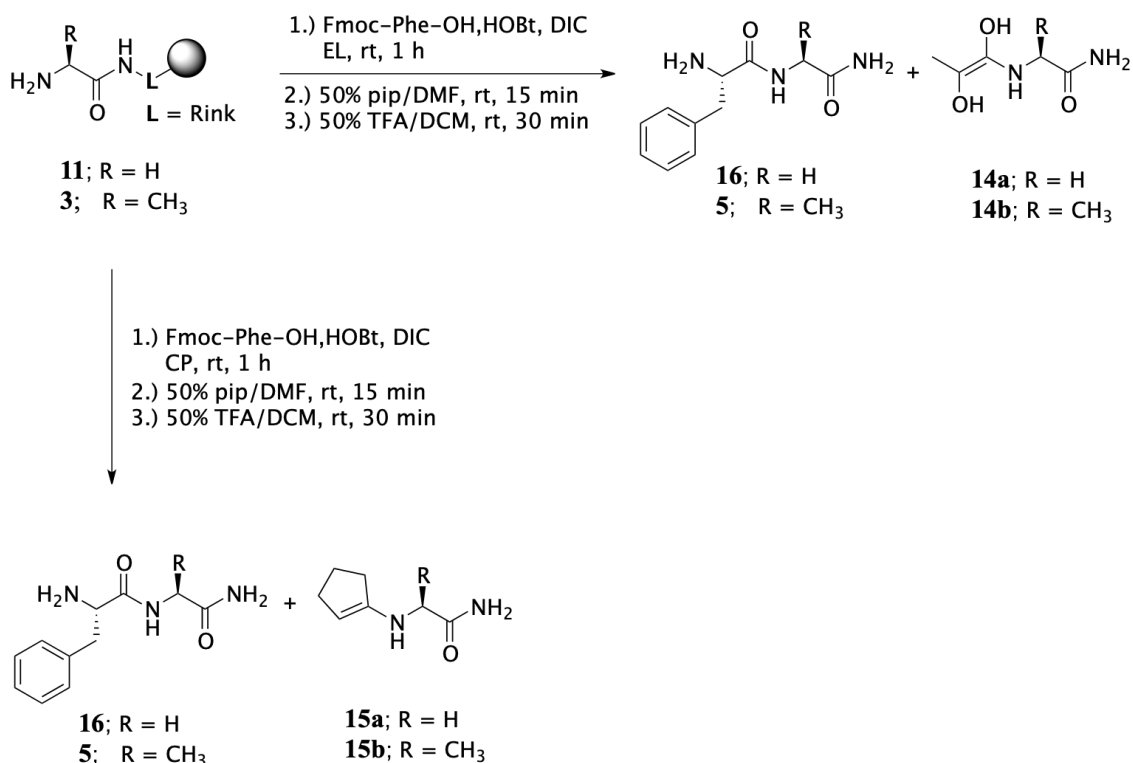
<sup>a</sup>S = stabilní, N = nestabilní

Z uvedených výsledků vyplývá, že rozpouštědla EL a CP s volnou aminoskupinou reagují (**experimenty 2, 3, 6 a 7**). Zatímco EL reaguje pouze v přítomnosti aktivačních činidel a je kompetitivní k acylaci s Fmoc-AMK, CP reaguje samostatně bez aktivačních činidel a tvoří Schiffovu bázi (**15a,b**). Acylace EL byla popsána v literatuře.<sup>73</sup> Struktura (**14a,b**) je spekulativní, protože v  $^1\text{H}$  NMR byl místo očekávaného dubletu pozorován singlet od  $\text{CH}_3$  skupiny EL kolem 1.8 ppm. Vznikající vedlejší produkty nejsou v SPPS žádoucí, jelikož je snižována čistota finálního produktu, ale také jeho výtěžek. Jevy, které byly v práci pozorovány, a lze je objasnit touto reaktivitou: nereprodukovatelnost acylace v EL (**Tabulka 6, experiment 2**), snižování loadingů nebo surových čistot při syntéze pentapeptidu v EL nebo CP (podkapitola **4.7.3**), zbarvující se pryskyřice během syntéz (podkapitoly **4.4.2.2 a 4.7.3**). **Schéma 10** popisuje předpokládané reakce, které mohou nastat mezi CP nebo EL s volnými N-konci aminokyselin.



**Schéma 10:** Reakce EL a CP s volnou aminoskupinou AMK.

Další pokusy byly směřovány k určení poměrů vznikajících hlavních a vedlejších produktů při acylačních reakcích prováděných za standardních podmínek (rt, 1 h). Studovány byla opět všechna rozpouštědla a jediné acylační reakce, u kterých bylo možné pozorovat vznik vedlejších produktů, byla EL (**12**) a CP (**13**). **Schéma 11** vystihuje prováděné reakce se zaměřením na EL a CP. Poměry vznikajících produktů (**16:14a**) nebo (**5:14b**) a (**16:15a**) nebo (**5:15b**) byly vypočítány z <sup>1</sup>H-NMR (zahrnuta do Příloh, látky nebyly purifikovány) spekter a jsou shrnuty v **Tabulce 18**.



**Schéma 11:** Testování vlivu reaktivity rozpouštědel CP a EL při acylacích.

**Tabulka 18:** Testování vlivu reaktivity rozpouštědel EL a CP při acylačních reakcích.

Experimenty	Rozpouštědlo	16:14a <sup>a</sup>	5:14b <sup>a</sup>	16:15a <sup>a</sup>	5:15b <sup>a</sup>
1	EL	87:13	-	-	-
2		-	88:12		
3	CP	-	-	85:15	-
4		-	-	-	79:21

<sup>a</sup>procentuální poměry vypočtené z příslušných <sup>1</sup>H NMR spekter

Za reaktivnější rozpouštědlo z této dvojice lze označit CP, kdy při acylacích vznikaly vedlejší produkty ve větší míře (15 % a 21 %, **experimenty 3 a 4**). CP má oproti EL tu výhodu, že dobře rozpouští používané reagenty (kapitola 4.2) a podkapitola 4.7.2 uvádí, že bylo této vlastnosti využito při promývání pryskyřice v syntéze pentapeptidu Leu-enkefalinu-NH<sub>2</sub>. Na základě těchto výsledků lze EL označit jako rozpouštědlo, které není vhodné pro GSPPS.

## 4.8.2 Reaktivita s bázemi

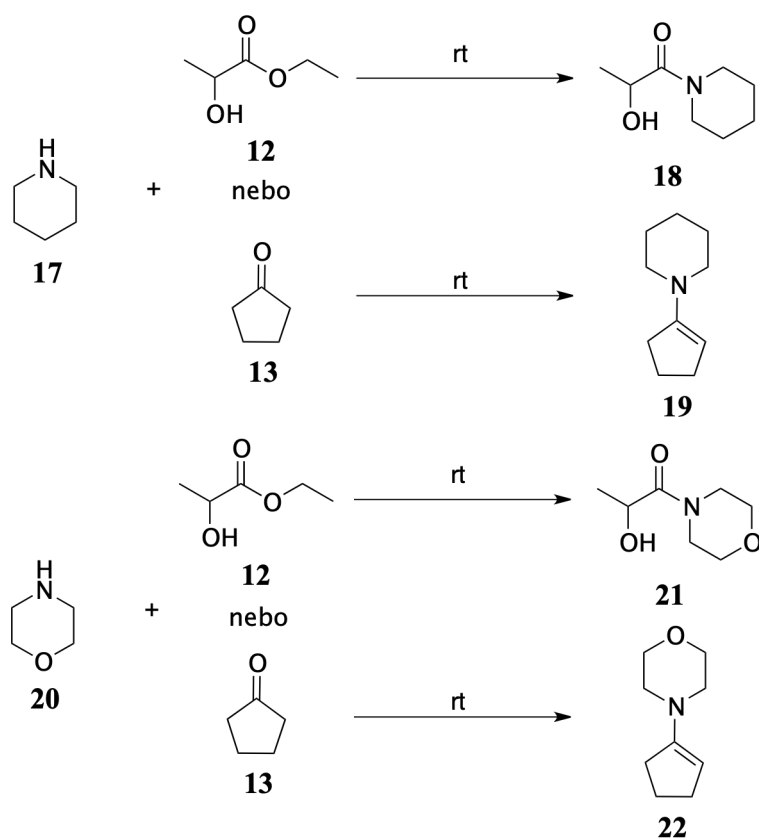
V teoretické části práce bylo poukázáno na reaktivitu GVL se sekundárními aminy, které jsou nejčastěji používány pro štěpení Fmoc chránící skupiny.<sup>62</sup> Podkapitola se věnuje testování stability rozpouštědel v přítomnosti bází způsobem, který je popsán ve zmíněné publikaci. Připravena byla ekvimolární směs rozpouštědla a báze, ta byla míchána za pokojové teploty a ve stanovených časech byly prováděny odběry reakční směsi a výsledky testování shrnuje **Tabulka 19**. Odebrané podíly byly analyzovány pomocí <sup>1</sup>H NMR.

**Tabulka 19:** Výsledky testování reaktivity rozpouštědel s bázemi.<sup>a</sup>

Rozpouštědlo	Piperidin	Morfolin	DBU
EL	N	N	S
CP	N	N	S
Anisol	S	S	S

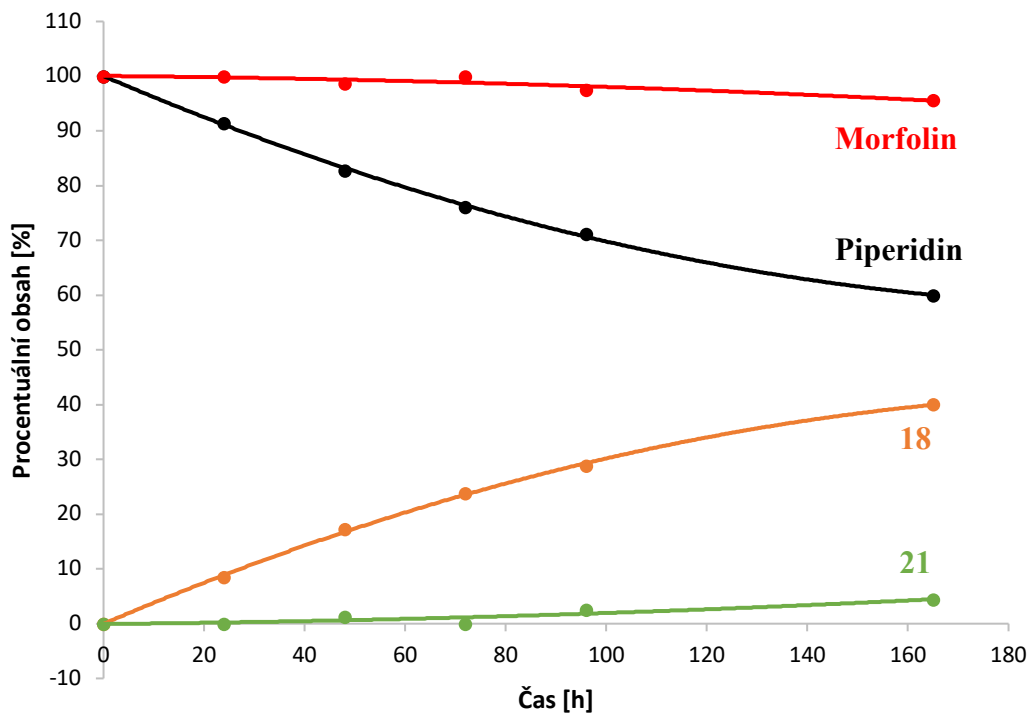
<sup>a</sup>S = stabilní, N = nestabilní

Z **Tabulky 19** je zřejmá reaktivita EL a CP se sekundárními aminy, jakými jsou piperidin a morfolin. V odborné literatuře byly popsány reakce CP s piperidinem<sup>74,75</sup> nebo morfolinem<sup>76</sup> a dále byla popsána reaktivita mezi EL a piperidinem<sup>74,77</sup> nebo morfolinem.<sup>77-79</sup> Ačkoliv byla reaktivita mezi CP nebo EL a bázemi popsána, často tyto reakce zahrnují použití vyšších teplot anebo katalyzátorů a proto bylo testováno v jaké míře reakce probíhají za pokojových podmínek. Pro vizualizaci průběhu těchto reakcí byly vytvořeny **Grafy 3** a **4**. Procentuální obsah vznikajících produktů v reakčních směsích byl získán integrací jejich <sup>1</sup>H NMR spekter. Vznik příslušných amidů nebo enaminů popisuje **Schéma 12**.

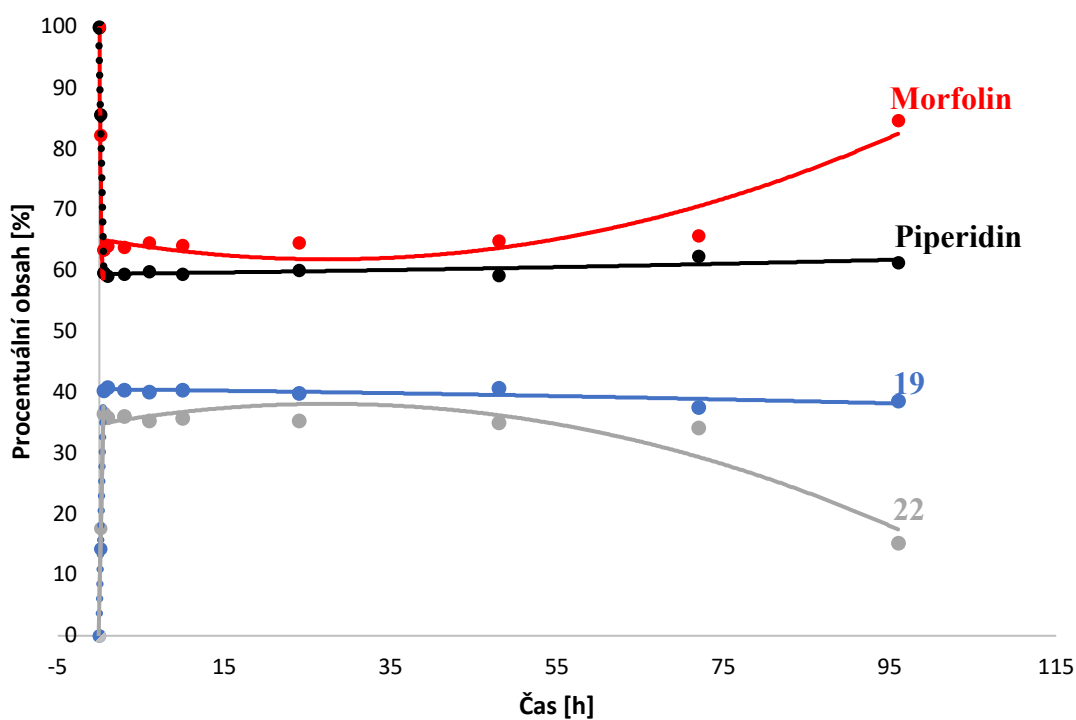


**Schéma 12:** Reakce mezi zelenými rozpouštědly a bázemi.

**Graf 3** vyobrazuje průběh reakce mezi EL a piperidinem nebo morfolinem. Po 165 h byly ve směsi přítomny příslušné amidy (**18**, 40 %; **21**; 4 %), avšak žádná deprotektace v SPPS neprobíhá tak dlouho. Přesto je tato reaktivita z pohledu zelené chemie nežádoucí, protože by byla potřeba vyšší koncentrace bází pro deprotektace.



**Graf 3:** Průběh reakce EL se zelenými bázemi piperidinem a morfolinem.



**Graf 4:** Průběh reakce CP se zelenými bázemi piperidinem a morfolinem.

Změnu složení reakční směsi v čase v případě CP a bází lze pozorovat na **Grafu 4**. Obě reakce probíhaly rychle zhruba do 30 min od smíchání. Poměr vznikajícího

enaminu (**19**) s piperidinem se dále neměnil a reakce tak dosáhla rovnováhy. Průběh vznikajícího derivátu (**22**) dosáhl maxima okolo 24 h reakčního času, zde se však neustanovila rovnováha a enamin se rozkládal zpět na CP a morfolin. Ani v tomto testování nebyla reakce kvantitativní a báze zůstala v nadbytku, přesto není CP, v kombinaci se sekundárními aminy, vhodným rozpouštědlem pro štěpení Fmoc chránící skupiny.



# 5 Experimentální část

Popisu přístrojů, které byly používány během práce, se věnuje tato část bakalářské práce. Dále jsou popsány postupy prováděných experimentů.

## 5.1 Přístroje a metody

Promývacím a reakčním zařízením byl domino block syntetizér (Torviq). Reakční směsi byly zahřívány pomocí BÜCHI Syncore reaktoru a mikrovlnného reaktoru (CEM Discover).

Chromatografické analýzy byly prováděny na UHPLC-MS systému od firmy Waters (UHPLC chromatograf Acquity; PDA detektor, hmotnostní spektrometr s kvadrupólem). Specifikace použité metody pro chromatografickou separaci tripeptidů a pentapeptidů jsou uvedeny v Přílohách. HRMS analýzy byly prováděny na systému tvořeném kapalinovým chromatografem (Thermo Fischer Scientific) a hmotnostním spektrometrem Orbitrap high-resolution (Thermo Fischer Scientific). Jako ionizační zdroj byl použit elektrosprej. Detaily metody jsou opět uvedeny v Přílohách.

Zbytky rozpouštědel v získaných produktech byly odstraněny lyofilizátorem (Scanvac CoolSafe).  $^1\text{H}$  NMR analýzy byly prováděny na zařízení JEOL ECA400II (400 MHz) nebo JEOL ECA500II (500 MHz) za pokojové teploty v rozpouštědle DMSO- $d_6$ .

## 5.2 Testování rozpustnosti

### 5.2.1 Aminokyselin

Do skleněné vialky bylo napřed naváženo množství Fmoc-AMK-OH podle **Tabulky 20**, aby po přidavku 1 ml rozpouštědla byla koncentrace rovna  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , pokud nedošlo k rozpuštění látky pouhým kroužením vialky, bylo využito ultrazvukové lázně.

**Tabulka 20:** Navážky testovaných Fmoc-AMK-OH

<b>Fmoc-AMK-OH</b>	<b>[mg]</b>
Fmoc-Phe-OH	77,4
Fmoc-Gly-OH	59,4
Fmoc-Ser( <i>t</i> Bu)-OH	76,6
Fmoc-Tyr( <i>t</i> Bu)-OH	91,8

## 5.2.2 Acylačních činidel

Do skleněné vialky bylo napřed naváženo množství acylačního činidla podle **Tabulky 21**, aby po přidavku 1 ml rozpouštědla byla koncentrace rovna  $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ . Pokud nedošlo k rozpuštění látky pouhým kroužením vialky, bylo využito ultrazvukové lázně. V případě, že došlo k vytvoření homogenního roztoku byl přidán další podíl zvoleného acylačního činidla tak, aby výsledná koncentrace odpovídala  $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ .

**Tabulka 21:** Navážky testovaných acylačních činidel.

<b>Acylační činidlo</b>	<b>Konc. <math>0,1 \text{ mol.dm}^{-3}</math></b>	<b>Konc. <math>0,2 \text{ mol.dm}^{-3}</math></b>
DIC	16 $\mu\text{l}$	32 $\mu\text{l}$
HOBt.H <sub>2</sub> O	15 mg	30 mg
HATU	38 mg	76 mg
PyBOP	52 mg	104 mg
OxymaPure	14 mg	28 mg
COMU	43 mg	86 mg

## 5.3 Testování bobtnání

Do 2 ml polypropylenové stříkačky s fritou bylo odváženo 100 mg studované pryskyřice. Následně byl přidán 1 ml zvoleného rozpouštědla. Směs byla třepána přes noc. Rozpouštědlo bylo poté odsáto pomocí vakua. Pro odečtení hodnoty bobtnání byla použita stupnice na stříkačce, kdy 1 dílek na stupnici byl roven 1 ml/g nabobtnání pryskyřice. V případě, že odsátí rozpouštědla zapříčinilo nerovnoměrné rozložení nabobtnané pryskyřice ve stříkačce, bylo přidáno malé množství nového podílu rozpouštědla, aby bylo možné s větší přesností odečíst hodnotu bobtnání.

## **5.4 Štěpení z pryskyřice**

### **5.4.1 Kvantifikace metodou vnějšího standardu**

Do 2 ml polypropylenové stříkačky s fritou bylo odebráno přibližně 20 mg pryskyřice. Následovalo promytí 3×DMF, 3×DCM a 3×MeOH. Pryskyřice byla poté vysušena proudem dusíku. Na analytických vahách bylo do dvou mikrozkušavek (typ Eppendorf) naváženo množství suché pryskyřice, které se pohybovalo kolem hodnoty 5 mg. K pryskyřicím byl přidán přibližně 1 ml štěpícího koktejlu [50% (v/v) TFA/DCM] a byly třepány po dobu 30 minut za pokojové teploty. Následně byl štěpící koktejl odstraněn proudem dusíku, produkty byly rozpuštěny v přesně 1 ml MeOH za pomoci ultrazvukové lázně. Poté bylo odebráno 255  $\mu$ l z roztoků do vialek a přidáno 255  $\mu$ l MeOH (ředění 1:1, v/v). Roztoky byly přefiltrovány vložením filtru do vialek a analyzovány pomocí UPLC-MS. Jako standard byl používán Fmoc-Ala-OH (ředění 1:1, v/v). Integrací píků při 300 nm byly získány jejich plochy, které byly použity při výpočtech loadingů metodou vnějšího standardu.

### **5.4.2 Analýza meziproductů**

Malé množství pryskyřice bylo přeneseno do mikrozkušavky, byl přidán štěpící koktejl a směs byla třepána po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po odpaření štěpícího koktejlu pod proudem dusíku následovalo rozpuštění v 1 ml MeOH. Roztok byl ve vialce přefiltrován a analyzován na UPLC-MS.

### **5.4.3 Štěpení produktů**

Finální produkty byly z pryskyřice štěpeny nasátím vhodného objemu (cca polovina objemu použité stříkačky) štěpícího koktejlu. Směs byla třepána po dobu 1,5 h, poté byl obsah stříkačky vytlačen pomocí pístu do skleněné vialky. Pryskyřice byla následně promyta několika podíly 10% (v/v) TFA/DCM a čistého DCM. Spojené frakce byly odpařeny proudem dusíku a produkt byl dosušen na lyofilizaci.

## **5.5 Kontrola acylačních reakcí**

Bylo odebráno přibližné množství 10 mg pryskyřice do 2 ml stříkačky. Pryskyřice byla promyta 3×DMF, 3×DCM a malé množství bylo přeneseno do mikrozkušavky.

S tímto vzorkem se dále pracovalo postupem popsaným v 5.4.2. Ke zbytku pryskyřice ve stříkačce byl přidán roztok Fmoc-Osu (500 mmol, 169 mg) a bylo ponecháno na třepačce po dobu 40 minut. Následovalo promytí 3×DCM, 3×DMF, a 3×DCM, odebrání malého množství pryskyřice a dále zpracováno podle 5.4.2.

## 5.6 Testování efektivity tvorby peptidové vazby

### 5.6.1 Příprava modelové výchozí látky

500 mg Rinkovy pryskyřice (0,61 mmol/g) bylo naváženo do 10 ml polypropylenové stříkačky s vloženou fritou. Pryskyřice byla promyta 3×DCM a následně 3×DMF. K nabobtnané pryskyřici bylo přidáno 5 ml 50% (v/v) roztoku piperidinu (25 mmol, 2,5 ml) v DMF (2,5 ml) a směs byla 15 minut třepána za pokojové teploty. Poté byla pryskyřice promyta 5×DMF, 3×DCM a byl přidán roztok Fmoc-Ala-OH (200 mmol, 311 mg), HOBt (200 mmol, 153 mg), DIC (200 mmol, 157  $\mu$ l) v DMF/DCM (1:1, v/v; 5 ml). Reakční směs byla následně třepána 1 h za pokojové teploty. Po reakci byla pryskyřice promyta 3×DMF, 3×DCM a byla provedena kvantifikace. Dále byla pryskyřice nabobtnána 3×DMF a byla štěpena Fmoc chránicí skupina 50% roztokem piperidinu v DMF (5 ml) 15 min za pokojové teploty. Po deprotekcii následovalo promytí pryskyřice 5×DMF, 3×DCM, 3×MeOH a vysušení pod proudem dusíku. Takto získaná suchá pryskyřice (**3**) byla připravena pro další testování.

### 5.6.2 Testování acylace

Do 2 ml stříkačky s fritou bylo odváženo přibližně 20 mg modelové výchozí látky (**3**), pryskyřice byla nabobtnána studovaným rozpouštědlem a následně i daným rozpouštědlem 2× promyta. Pokud reakce probíhala 1 h za pokojových podmínek, pak byl přidán roztok Fmoc-Phe-OH (200 mmol, 77,4 mg), HOBt (200 mmol, 30,6 mg) nebo OxymaPure (200 mmol, 28,4 mg), DIC (200 mmol, 31,3  $\mu$ l) v 1 ml studovaného rozpouštědla nebo směsi a ponecháno na třepačce. V případě, že byl využíván BÜCHI Syncore nebo mikrovlnný reaktor, byl roztok přidán do stříkačky bez pístu a pipetou kvantitativně přenesen do speciální skleněné kyvety. Po reakci byla pryskyřice promyta 3×DMF a 3×DCM. Poté proběhla kontrola konverze s Fmoc-Osu dle 5.5 a postup popsaný v 5.4.2.

## 5.7 Testování účinnosti štěpení Fmoc skupiny

### 5.7.1 Syntéza výchozí látky

Syntetický postup byl stejný jako v podkapitole 5.6.1 s rozdílem, že nebylo provedeno štěpení Fmoc chránicí skupiny z Fmoc-Ala-NH-Rink (2).

### 5.7.2 Testování deprotekce

Přibližně 20 mg výchozí látky (2) bylo naváženo do 2 ml stříkačky s fritou, bylo provedeno nabobtnání testovaným rozpouštědlem a poté byla ještě pryskyřice 2× promyta. Dále byl přidán roztok báze a zeleného rozpouštědla nebo směsi podle **Tabulky 22** a studovaných podmínek. Následovalo promytí 3×DMF a 3×DCM, poté byl přidán roztok Fmoc-Phe-OH (200 mmol, 77,4 mg), HOBt (200 mmol, 30,6 mg) nebo OxymaPure (200 mmol, 28,4 mg), DIC (200 mmol, 31,3  $\mu$ l) v DMF/DCM (1:1, 1 ml) a reakční směs byla třepána 1 h za pokojové teploty. Poté následoval postup z 5.4.2.

**Tabulka 22:** Směsi rozpouštědel a bází.

Rozpouštědlo [ml]	Báze
0,50	Piperidin (5 mmol, 0,5 ml)
0,50	Morfolin (6 mmol, 0,5 ml)
1,00	Piperazin (6 mmol, 50 mg)
0,95	DBU (3 mmol, 50 $\mu$ l)
5,00 <sup>a</sup>	0,05 M NaOH (13,5 $\mu$ l z 18,94 M NaOH)
2,00 <sup>a</sup>	0,1 M NaOH (10,6 $\mu$ l z 18,94 M NaOH)
1,00	0,2 M NaOH (10,6 $\mu$ l z 18,94 M NaOH)

<sup>a</sup>odebrán 1 ml z připraveného roztoku

## 5.8 Testování racemizace

Syntézy tripeptidů probíhaly v 5 ml stříkačkách, do kterých bylo naváženo 250 mg PS-Rink s kapacitou 0,61 mmol/g. Deprotekce byly prováděny pomocí 2,5 ml 50%

(v/v) roztoku piperidinu (25 mmol, 1,25 ml) v DMF (1,25 ml), acylace podle **Tabulky 13**. Finální štěpení bylo provedeno podle **5.4.3**. Produkty byly sráženy 1 ml vychlazeného diethyletheru, přefiltrovány, promyty 1 ml diethyletheru a dosušeny na lyofilizaci, pokud se srážení nepodařilo, byl diethylether dekantován a produkt lyofilizován.

## 5.9 Syntéza pentapeptidů

Do 5 ml stříkačky bylo naváženo 250 mg PS-Rink s kapacitou 0,61 mmol/g, 3× nabobtnáno a promyto rozpouštědlem. K pryskyřici byl přidán roztok (2,5 ml) báze pro deprotekcii. Následně byla pryskyřice 5× promyta příslušným rozpouštědlem. V případě, že bylo pro deprotekcii použito jiné rozpouštědlo než pro acylaci, bylo provedeno 3× promytí rozpouštědlem, které bylo použito pro deprotekcii a poté 3× rozpouštědlem zvoleným pro acylační reakci. Dále byl přidán roztok Fmoc-AMK<sub>1-5</sub>-OH (200 mmol, navážky v **Tabulce 23**), HOBt (200 mmol, 77,4 mg) nebo OxymaPure (200 mmol, 71 mg), DIC (200 mmol, 78,3 µl) ve studovaném rozpouštědle nebo směsi (2,5 ml). Každá acylace byla kontrolována podle postupu **5.5**. Po ukončení elongace peptidu bylo provedeno finální štěpení Fmoc chránicí skupiny a bylo zkontrolováno jeho kvantitativní odštěpení. Produkty byly z pryskyřice odštěpeny postupem **5.4.3**. Srážení peptidu a jeho přečištění bylo provedeno 2 ml vychlazeného diethyletheru a použitím ultrazvukové lázně. Vysrážený peptid byl přefiltrován, promyt 1 ml diethyletheru a vysušen na lyofilizaci.

**Tabulka 23:** Navážky Fmoc-AMK<sub>1-5</sub>-OH

<b>Fmoc-AMK<sub>1-5</sub>-OH</b>	<b>[mg]</b>
Fmoc-Leu-OH	176,5
Fmoc-Phe-OH	193,5
Fmoc-Gly-OH	148,5
Fmoc-Tyr( <i>t</i> Bu)-OH	229,5

## 5.10 Testování reaktivity

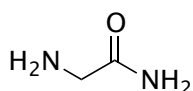
### 5.10.1 Reaktivita rozpouštědel s volným N-koncem peptidu

K přibližně 20 mg pryskyřice byl přidán 1 ml studovaného rozpouštědla nebo roztok HOBt (200 mmol, 30,6 mg) a DIC (200 mmol, 31,3 µl) v 1 ml rozpouštědla nebo

směsi. Pryskyřice byla poté promyta 5×DMF, 3×DCM a 3×DMF a byl přidán 1 ml 50% (v/v) roztoku piperidinu (5 mmol, 0,5 ml) v DMF (0,5 ml) a reakční směs byla třepána za pokojové teploty po dobu 15 minut. Následně byla pryskyřice promyta 5×DMF, 3×DCM a bylo provedeno štěpení z pryskyřice postupem 5.4.2. Produkty byly rozpuštěny v 600  $\mu$ l DMSO- $d_6$  a analyzovány pomocí  $^1\text{H}$  NMR.

### Spektrální data izolovaných látek:

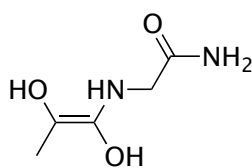
#### 2-aminoacetamid (11)



11

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.92 (br. s., 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 7.72 (br. s., 1 H, NH), 7.47 (br. s., 1 H, NH), 3.50 (q,  $J$  = 5.4 Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ) ppm.

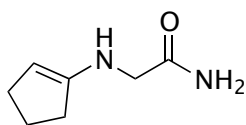
#### (*E*)-2-((1,2-dihydroxyprop-1-en-1-yl)amino)acetamid (14a)



14a

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.03 - 7.93 (m, 1 H, NH), 7.26 (br. s., 1 H, NH), 6.97 (br. s., 1 H, NH), 3.59 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.84 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. HRMS (ESI-Orbitrap)  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$  [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$  145.0608, nalezeno 145.0604.

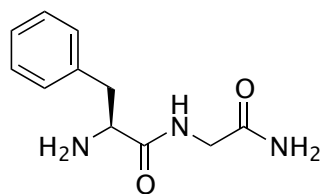
#### 2-(cyklopent-1-en-1-ylamino)acetamid (15a)



15a

$^1\text{H}$  NMR (500M Hz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.95 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 1 H, NH), 7.24 (br. s., 1 H, NH), 6.96 (br. s., 1 H, NH), 3.60 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1 H, CH), 2.21 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 2.16 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.71 (quin,  $J$  = 7.4 Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ) ppm.

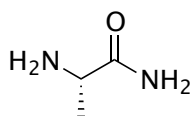
**(S)-2-amino-N-(2-amino-2-oxoethyl)-3-phenylpropanamid (16)**



**16**

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 8.68 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1 H, NH), 8.14 (br. s., 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 7.38 - 7.22 (m, 6 H, Ph + NH), 7.13 (br. s., 1 H, NH), 4.09 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 1 H, CH), 3.81 - 3.73 (m, 1 H,  $\frac{1}{2}$   $\text{CH}_2$ ), 3.70 - 3.61 (m, 1 H,  $\frac{2}{2}$   $\text{CH}_2$ ), 3.11 (dd,  $J$  = 5.8, 14.0 Hz, 1 H,  $\frac{1}{2}$   $\text{CH}_2$ ), 2.95 (dd,  $J$  = 7.9, 14.0 Hz, 1 H,  $\frac{2}{2}$   $\text{CH}_2$ ) ppm.

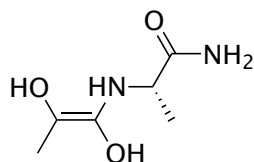
**(S)-2-aminopropanamid (3)**



**3**

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 7.96 (br. s., 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 7.75 (br. s., 1 H, NH), 7.50 (br. s., 1 H, NH), 3.79 - 3.69 (m, 1 H, CH), 1.35 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

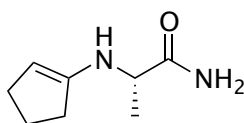
**(S,E)-2-((1,2-dihydroxyprop-1-en-1-yl)amino)propanamid (14b)**



**14b**

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 7.91 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1 H, NH), 7.27 (br. s., 1 H, NH), 6.91 (br. s., 1 H, NH), 4.18 (quin,  $J$  = 7.3 Hz, 1 H, CH), 1.82 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.17 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. HRMS (ESI-Orbitrap)  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$  [ $\text{M-H}$ ] $^-$  159.0764, nalezeno 159.0762.

**(S)-2-(cyklopent-1-en-1-ylamino)propanamid (15b)**



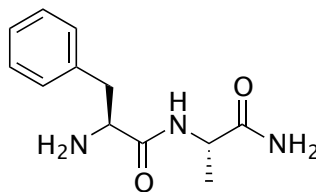
**15b**

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 7.87 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1 H, NH), 7.25 (br. s., 1 H, NH), 6.90 (br. s., 1 H, NH), 4.19 (td,  $J$  = 7.2, 14.5 Hz, 1 H, CH), 3.76 - 3.69 (m, 1 H, CH), 2.23



- 2.17 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.14 (dt,  $J = 3.2, 7.4$  Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.74 - 1.66 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.17 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**(S)-2-amino-N-((S)-1-amino-1-oxopropan-2-yl)-3-fenylpropanamid (5)**



**5**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta = 8.62$  (d,  $J = 7.6$  Hz, 1 H, NH), 8.10 (br. s., 2 H, NH<sub>2</sub>), 7.37 - 7.23 (m, 6 H, Ph + NH), 7.07 (s, 1 H, NH), 4.28 (quin,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, CH), 4.07 (dd,  $J = 5.3, 12.7$  Hz, 1 H, CH), 3.11 (dd,  $J = 5.5, 14.0$  Hz, 1 H,  $\frac{1}{2}$  CH<sub>2</sub>), 2.97 - 2.87 (m, 1 H,  $\frac{2}{2}$  CH<sub>2</sub>), 1.25 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>) ppm.

### 5.10.2 Reaktivita s bázemi

Byly připraveny ekvimolární směsi rozpouštědel s bázemi podle **Tabulky 24** do skleněných vialek s míchadlem a směsi byly ponechány na elektromagnetické míchače za pokojové teploty. V příslušných časech bylo odebráno vždy 15  $\mu$ l ze směsi, rozpuštěno v 600  $\mu$ l DMSO-*d*<sub>6</sub> a vše bylo napipetováno do kyvety pro měření <sup>1</sup>H NMR.

**Tabulka 24:** Přípravy ekvimolárních směsí rozpouštědel s bázemi.

<b>Báze</b>	<b>Piperidin [<math>\mu</math>l]</b>	<b>Morfolin [<math>\mu</math>l]</b>	<b>DBU [<math>\mu</math>l]</b>
<b>Rozpouštědlo</b>			
CP (565 mmol, 0,5 ml)	558	488	845
EL (436 mmol, 0,5 ml)	430	377	500
Anisol (460 mmol, 0,5 ml)	454	398	688

## 6 Závěr

Bakalářská práce se věnuje studiu zelených alternativ ke tradičně užívaným rozpouštědlům, bázím a reagentům v syntéze peptidů na pevné fázi. V teoretické části je stručně popsán význam a možné způsoby přípravy peptidů. Obecně je popsán princip SPPS, stručně definován pojem zelené chemie a pojednáno je mimo jiné o možnostech výběru zelených alternativ z odborné literatury, které však poskytují stále příliš malý výběr. Přehledně jsou také shrnuty dosavadní snahy nebo úspěchy o zelenou syntézu na pevné fázi a z nich vyplývající testovací postup pro evaluaci nových rozpouštědel pro SPPS. Výsledky a diskuze jsou strukturovány podle jednotlivých hodnotících faktorů a popsány jsou úspěchy i neúspěchy ve studiu zelených alternativ pro SPPS. Experimentální část pak obsahuje informaci o přístrojích a jednotlivých postupech, v Přílohách jsou uvedena příslušná analytická data.

V bakalářské práci byla popsána úspěšná syntéza pentapeptidu zeleným SPPS protokolem na PS-Rink pryskyřici, která byla zvolena vzhledem k její komerční dostupnosti a také proto, že na této pryskyřici nebylo představeno mnoho úspěšných pokusů o zelenou syntézu na pevné fázi. Štěpení Fmoc chránící skupiny bylo provedeno roztokem DBU v anisolu a acylace probíhaly ve směsi anisol/DMSO v kombinaci s acylačním činidlem HOBt nebo zelenější alternativou OxymaPure. Anisol má špatné rozpouštěcí vlastnosti, proto bylo nutné pro promývací kroky syntézy zvolit jiná rozpouštědla. Cyklopentanon byl zvolen jako promývací rozpouštědlo s ohledem na jeho dobré rozpouštěcí vlastnosti, ale použití CP je v ostatních krocích syntézy limitováno tím, že reaguje s volným N-koncem rostoucího peptidu nebo s používanými bázemi, což jsou sekundární aminy jako piperidin a morfolin. Problematickou reaktivitu vykazuje ethyl-laktát, z pohledu zelené chemie velmi slibné rozpouštědlo, který se i přes velkou snahu nepodařilo úspěšně aplikovat v SPPS, přestože ostatní výzkumné skupiny popsali použití esterů jako EtOAc nebo GVL v GSPPS. Ethyl-laktát již z počátku vykazoval špatné rozpouštěcí vlastnosti, nízkou hodnotu bobtnání, problémové acylace a deprotektce za pokojových podmínek. Reaktivita společně s vyjmenovanými omezeními dělají bohužel z ethyl-laktátu nepoužitelné rozpouštědlo pro SPPS.

Mezi neúspěchy se řadí pokusy o popsání míry racemizace ve zelených rozpouštědlech přesto, že byl vybrán peptid i metoda separace přesně podle odborné literatury.

## 7 Seznam zkratek

<b>2-MeTHF</b>	2-methyltetrahydrofuran
<b>ACP (65-74)</b>	acyl carrier protein
<b>AE</b>	aktivovaný ester
<b>Aib</b>	2-amino-2-methylpropanová kyselina
<b>Ala</b>	alanin
<b>AMK</b>	aminokyselina
<b>API</b>	active pharmaceutical ingredient, farmaceuticky aktivní látka
<b>COMU</b>	(1-kyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino- morfolino-karbenium hexafluorofosfát
<b>CP</b>	cyklopentanon
<b>CPME</b>	cyklopentyl(methyl)ether
<b>CTC</b>	2-chlortrityl chlorid
<b>DBU</b>	diazobicykloundecen
<b>DCC</b>	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
<b>DCM</b>	dichlormethan
<b>DEC</b>	diethyl-karbonát
<b>DIC</b>	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
<b>DIEA</b>	diisopropylethylamin
<b>DMB</b>	1,3-dimethoxybenzen
<b>DMC</b>	dimethyl-karbonát
<b>DMF</b>	<i>N</i> -dimethylformamid
<b>DMI</b>	isosorbid dimethylether
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>EC</b>	ethylen-karbonát
<b>EL</b>	ethyl-laktát
<b>EtOAc</b>	ethyl-acetát
<b>EtOH</b>	ethanol
<b>Fmoc</b>	9-fluorenylmethyloxykarbonyl
<b>Fmoc-Osu</b>	Fmoc- <i>N</i> -hydroxysukcinimidem
<b>Gly</b>	glycin
<b>GSK</b>	GlaxoSmithKline

<b>GSPPS</b>	green solid-phase peptide synthesis, zelená syntéza peptidů na pevné fázi
<b>GVL</b>	$\gamma$ -valerolakton
<b>HATU</b>	1-((dimethylamino)(dimethyliminio)methyl)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5- <i>b</i> ]pyridine 3-oxid hexafluorofosát
<b>HMPB</b>	4-[4-(hydroxymethyl)-3-methoxyphenoxy]butanová kyselina
<b>HOBt</b>	<i>N</i> -hydroxybenzotriazol
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>HRMS</b>	High-Resolution Mass Spectroscopy
<b>IPA</b>	<i>iso</i> -propylalkohol
<b>LCA</b>	life-cycle assessment, analýza životního cyklu
<b>Leu</b>	leucin
<b>LPPS</b>	liquid-phase peptide synthesis, syntéza peptidů v roztoku
<b>MeCN</b>	acetonitril
<b>MeOH</b>	methanol
<b>MF</b>	mobilní fáze
<b>Morf</b>	morfolin
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometr
<b>MW</b>	mikrovlnný reaktor
<b>NaOH</b>	hydroxid sodný
<b>NBP</b>	<i>N</i> -butylpyrrolidon
<b>NFM</b>	<i>N</i> -formylmorfolin
<b>NMP</b>	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidon
<b>NMR</b>	nukleární magnetická rezonance
<b>OxymaPure</b>	ethylkyano(hydroxyimino)-acetát
<b>PC</b>	propylen-karbonát
<b>PEG</b>	polyethylen glykol
<b>PG</b>	protecting group, protektivní skupina
<b>Phe</b>	fenylalanin
<b>Pip</b>	piperidin
<b>PS-DVB</b>	polystyren zesíťovaný divinylbenzenem
<b>PyBOP</b>	(benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinofosfonium hexafluorofosfát
<b>RAM</b>	Rink amide linker, Rinkův amidový linker
<b>rt</b>	pokožová teplota

<b>Ser</b>	serin
<b>SPPS</b>	solid-phase peptide synthesis, syntéza peptidů na pevné fázi
<b>SVHC</b>	substances of very high concern, seznam znepokojujících látek
<b><i>t</i>Bu</b>	<i>tert</i> -butyl
<b>TFA</b>	trifluoroctová kyselina
<b>THF</b>	tetrahydrofuran
<b>Tyr</b>	tyrosin
<b>UPLC</b>	Ultra Performance Liquid Chromatography
<b>UV-Vis</b>	Ultrafialová-viditelná spektroskopie

## 8 Seznam literatury

- (1) Fosgerau, K.; Hoffmann, T. Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (1), 122–128.
- (2) Henninot, A.; Collins, J. C.; Nuss, J. M. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (4), 1382–1414.
- (3) Lau, J. L.; Dunn, M. K. Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (10), 2700–2707.
- (4) Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. The Future of Peptide-Based Drugs. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81* (1), 136–147.
- (5) Kaspar, A. A.; Reichert, J. M. Future Directions for Peptide Therapeutics Development. *Drug Discov. Today* **2013**, *18* (17–18), 807–817.
- (6) Al Musaimi, O.; Al Shaer, D.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. 2017 FDA Peptide Harvest. *Pharmaceuticals* **2018**, *11* (2).
- (7) Du Vigneaud, V.; Ressler, C.; Swan, J. M.; Roberts, C. W.; Katsoyannis, P. G.; Gordon, S. The Synthesis of an Octapeptide Amide With The Hormonal Activity of Oxytocin. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75* (19), 4879–4880.
- (8) Tulla-Puche, J.; El-Faham, A.; Galanis, A. S.; de Oliveira, E.; Zompra, A. A.; Albericio, F. Methods for the Peptide Synthesis and Analysis. In *Peptide Chemistry and Drug Design*; 2015; pp 11–73.
- (9) Goodwin, D.; Simerska, P.; Toth, I. Peptides As Therapeutics with Enhanced Bioactivity. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (26), 4451–4461.
- (10) Bray, B. L. Large-Scale Manufacture of Peptide Therapeutics by Chemical Synthesis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2* (7), 587–593.
- (11) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154.
- (12) Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. H. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science*. **1994**, *266* (5186), 776–779.
- (13) Jad, Y. E.; Kumar, A.; El-Faham, A.; De La Torre, B. G.; Albericio, F. Green Transformation of Solid-Phase Peptide Synthesis. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7* (4), 3671–3683.
- (14) Rink, H. Solid-Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments Using a Trialkoxy-Diphenyl-Methylester Resin. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (33), 3787–3790.

- (15) Santini, R.; Griffith, M. C.; Qi, M. A Measure of Solvent Effects on Swelling of Resins for Solid Phase Organic Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (49), 8951–8954.
- (16) García-Martín, F.; Quintanar-Audelo, M.; García-Ramos, Y.; Cruz, L. J.; Gravel, C.; Furic, R.; Côté, S.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. ChemMatrix, a Poly(Ethylene Glycol)-Based Support for the Solid-Phase Synthesis of Complex Peptides. *J. Comb. Chem.* **2006**, *8* (2), 213–220.
- (17) Quarrell, R.; Claridge, T. D. W.; Weaver, G. W.; Lowe, G. Structure and Properties of TentaGel Resin Beads: Implications for Combinatorial Library Chemistry. *Mol. Divers.* **1996**, *1* (4), 223–232.
- (18) Soral, M.; Hlaváč, J.; Krchňák, V. *Linkers for Solid-Phase Peptide Synthesis*. In *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*; Edited by Hughes, A. B.; Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA, **2011**; Vol. 3., pp 273-312.
- (19) Carpino, L. A.; Han, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (19), 5748–5749.
- (20) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (4), 1067–1068.
- (21) Bates, H. S.; Jones, J. H.; Witty, M. J. Direct Observation of an Alkoxycarbonylamino Acid O-Acylisourea. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, (16), 773–774.
- (22) König, W.; Geiger, R. A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives, *Chem. Ber.* **1970**, *103* (3), 788–798.
- (23) Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (37), 9394–9403.
- (24) Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP®: A New Peptide Coupling Reagent Devoid of Toxic by-Product. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (2), 205–208.
- (25) Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mügge, C.; Wenschuh, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. The Uronium/Guanidinium Peptide Coupling Reagents: Finally the True Uronium Salts. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2002**, *41* (3), 441–445.
- (26) El-Faham, A.; Funosas, R. S.; Prohens, R.; Albericio, F. COMU: A Safer and More Effective Replacement for Benzotriazole-Based Uronium Coupling Reagents. *Chem.*

- Eur. J.* **2009**, *15* (37), 9404–9416.
- (27) Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; **1998**.
- (28) Jad, Y. E.; Acosta, G. A.; Khattab, S. N.; De La Torre, B. G.; Govender, T.; Kruger, H. G.; El-Faham, A.; Albericio, F. 2-Methyltetrahydrofuran and Cyclopentyl Methyl Ether for Green Solid-Phase Peptide Synthesis. *Amino Acids* **2016**, *48* (2), 419–426.
- (29) Constable, D. J. C.; Jimenez-Gonzalez, C.; Henderson, R. K. Perspective on Solvent Use in the Pharmaceutical Industry. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11* (1), 133–137.
- (30) Dunn, P. J. The Importance of Green Chemistry in Process Research and Development. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (4), 1452–1461.
- (31) Byrne, F. P.; Jin, S.; Paggiola, G.; Petchey, T. H. M.; Clark, J. H.; Farmer, T. J.; Hunt, A. J.; Robert McElroy, C.; Sherwood, J. Tools and Techniques for Solvent Selection: Green Solvent Selection Guides. *Sustain. Chem. Process.* **2016**, *4* (1), 1–24.
- (32) Regulation (EC) Number 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006, <https://echa.europa.eu/regulations/reach/understanding-reach>.
- (33) Henderson, R. K.; Hill, A. P.; Redman, A. M.; Sneddon, H. F. Development of GSK's Acid and Base Selection Guides. *Green Chem.* **2015**, *17* (2), 945–949.
- (34) Ralhan, K.; KrishnaKumar, V. G.; Gupta, S. Piperazine and DBU: A Safer Alternative for Rapid and Efficient Fmoc Deprotection in Solid Phase Peptide Synthesis. *RSC Adv.* **2015**, *5* (126), 104417–104425.
- (35) Wehrstedt, K. D.; Wandrey, P. A.; Heitkamp, D. Explosive Properties of 1-Hydroxybenzotriazoles. *J. Hazard. Mater.* **2005**, *126* (1–3), 1–7.
- (36) Prat, D.; Pardigon, O.; Flemming, H. W.; Letestu, S.; Ducandas, V.; Isnard, P.; Guntrum, E.; Senac, T.; Ruisseau, S.; Cruciani, P.; Hosek, P. Sanofi's Solvent Selection Guide: A Step Toward More Sustainable Processes. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17* (12), 1517–1525.
- (37) Alfonsi, K.; Colberg, J.; Dunn, P. J.; Fevig, T.; Jennings, S.; Johnson, T. A.; Kleine, H. P.; Knight, C.; Nagy, M. A.; Perry, D. A.; Stefaniak, M. Green Chemistry Tools to Influence a Medicinal Chemistry and Research Chemistry Based Organisation. *Green Chem.* **2008**, *10* (1), 31–36.
- (38) Diorazio, L. J.; Hose, D. R. J.; Adlington, N. K. Toward a More Holistic Framework for Solvent Selection. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20* (4), 760–773.
- (39) Alder, C. M.; Hayler, J. D.; Henderson, R. K.; Redman, A. M.; Shukla, L.; Shuster, L. E.; Sneddon, H. F. Updating and Further Expanding GSK's Solvent Sustainability Guide. *Green Chem.* **2016**, *18* (13), 3879–3890.



- (40) Raymond, M. J.; Slater, C. S.; Savelski, M. J. LCA Approach to the Analysis of Solvent Waste Issues in the Pharmaceutical Industry. *Green Chem.* **2010**, *12* (10), 1826–1834.
- (41) Lawrenson, S.; North, M.; Peigneguy, F.; Routledge, A. Greener Solvents for Solid-Phase Synthesis. *Green Chem.* **2017**, *19* (4), 952–962.
- (42) Westbye, P. Agricultural Formulations with Acyl Morpholines and Polar Aprotic Co-Solvents., U.S. Patent 8791145, July 24, **2014**.
- (43) Alhassan, M.; Al Musaimi, O.; Collins, J. M.; Albericio, F.; De La Torre, B. G. Cleaving Protected Peptides from 2-Chlorotrityl Chloride Resin. Moving Away from Dichloromethane. *Green Chem.* **2020**, *22* (9), 2840–2845.
- (44) Sherwood, J.; Parker, H. L.; Moonen, K.; Farmer, T. J.; Hunt, A. J. N - Butylpyrrolidinone as a Dipolar Aprotic Solvent for Organic Synthesis. *Green Chem.* **2016**, *18* (14), 3990–3996.
- (45) Aparicio, S.; Alcalde, R. The Green Solvent Ethyl Lactate: An Experimental and Theoretical Characterization. *Green Chem.* **2009**, *11* (1), 65–78.
- (46) Acosta, G. A.; Del Fresno, M.; Paradis-Bas, M.; Rigau-DeLlobet, M.; Côté, S.; Royo, M.; Albericio, F. Solid-Phase Peptide Synthesis Using Acetonitrile as a Solvent in Combination with PEG-Based Resins. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15* (10), 629–633.
- (47) Jad, Y. E.; Acosta, G. A.; Khattab, S. N.; De La Torre, B. G.; Govender, T.; Kruger, H. G.; El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Synthesis beyond DMF: THF and ACN as Excellent and Friendlier Alternatives. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (8), 2393–2398.
- (48) Jad, Y. E.; Acosta, G. A.; Govender, T.; Kruger, H. G.; El-Faham, A.; De La Torre, B. G.; Albericio, F. Green Solid-Phase Peptide Synthesis 2. 2-Methyltetrahydrofuran and Ethyl Acetate for Solid-Phase Peptide Synthesis under Green Conditions. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4* (12), 6809–6814.
- (49) Wang, S.-S. P -Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p - Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments . *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (4), 1328–1333.
- (50) Athanassopoulos, P.; Barlos, K.; Gatos, D.; Hatzi, O.; Tzavara, C. Application of 2-Chlorotrityl Chloride in Convergent Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (31), 5645–5648.
- (51) Al Musaimi, O.; Jad, Y. E.; Kumar, A.; El-Faham, A.; Collins, J. M.; Basso, A.; De La Torre, B. G.; Albericio, F. Greening the Solid-Phase Peptide Synthesis Process.

- 2-MeTHF for the Incorporation of the First Amino Acid and Precipitation of Peptides after Global Deprotection. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22* (12), 1809–1816.
- (52) Kumar, A.; Jad, Y. E.; El-Faham, A.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. Green Solid-Phase Peptide Synthesis 4.  $\gamma$ -Valerolactone and N-Formylmorpholine as Green Solvents for Solid Phase Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58* (30), 2986–2988.
- (53) Kumar, A.; Jad, Y. E.; Collins, J. M.; Albericio, F.; De La Torre, B. G. Microwave-Assisted Green Solid-Phase Peptide Synthesis Using  $\gamma$ -Valerolactone (GVL) as Solvent. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6* (6), 8034–8039.
- (54) Kumar, A.; Thompson-Adewumi, A.; Nandhini, K. P.; Collins, J. M.; Albericio, F.; De La Torre, B. G. Troubleshooting When Using  $\gamma$ -Valerolactone (GVL) in Green Solid-Phase Peptide Synthesis. *Org. Process Res. Dev.* **2019**, *23* (5), 1096–1100.
- (55) Flörsheimer, A.; Riniker, B. Solid-Phase Synthesis of Peptides with the Highly Acid-Sensitive HMPB Linker. *Peptides*, **1991**; pp 131–133.
- (56) Lawrenson, S. B.; Arav, R.; North, M. The Greening of Peptide Synthesis. *Green Chem.* **2017**, *19* (7), 1685–1691.
- (57) Lopez, J.; Pletscher, S.; Aemissegger, A.; Bucher, C.; Gallou, F. N - Butylpyrrolidinone as Alternative Solvent for Solid-Phase Peptide Synthesis. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22* (4), 494–503.
- (58) Ferrazzano, L.; Corbisiero, D.; Martelli, G.; Tolomelli, A.; Viola, A.; Ricci, A.; Cabri, W. Green Solvent Mixtures for Solid-Phase Peptide Synthesis: A Dimethylformamide-Free Highly Efficient Synthesis of Pharmaceutical-Grade Peptides. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7* (15), 12867–12877.
- (59) Hachmann, J.; Lebl, M. Alternative to Piperidine in Fmoc Solid-Phase Synthesis. *J. Comb. Chem.* **2006**, *8* (2), 149.
- (60) Wade, J. D.; Mathieu, M. N.; Macris, M.; Tregear, G. W. Base-Induced Side Reactions in Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis: Minimization by Use of Piperazine as  $N\alpha$ -Deprotection Reagent. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2000**, *7* (2), 107–112.
- (61) Jad, Y. E.; Govender, T.; Kruger, H. G.; El-Faham, A.; De La Torre, B. G.; Albericio, F. Green Solid-Phase Peptide Synthesis (GSPPS) 3. Green Solvents for Fmoc Removal in Peptide Chemistry. *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21* (3), 365–369.
- (62) Kumar, A.; Sharma, A.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. Scope and Limitations of  $\gamma$ -Valerolactone (GVL) as a Green Solvent to Be Used with Base for Fmoc Removal in

- Solid Phase Peptide Synthesis. *Molecules* **2019**, *24* (21), 4004.
- (63) Pawlas, J.; Antonic, B.; Lundqvist, M.; Svensson, T.; Finnman, J.; Rasmussen, J. H. 2D Green SPPS: Green Solvents for on-Resin Removal of Acid Sensitive Protecting Groups and Lactamization. *Green Chem.* **2019**, *21* (10), 2594–2600.
- (64) Pawlas, J.; Rasmussen, J. H. Re Green SPPS: Enabling Circular Chemistry in Environmentally Sensible Solid-Phase Peptide Synthesis. *Green Chem.* **2019**, *21* (21), 5990–5998.
- (65) Luna, O. F.; Gomez, J.; Cárdenas, C.; Albericio, F.; Marshall, S. H.; Guzmán, F. Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine? *Molecules* **2016**, *21* (11).
- (66) Příbylka, A.; Krchňák, V.; Schütznerová, E. Environmentally Friendly SPPS I. Application of NaOH in 2-MeTHF/Methanol for Fmoc Removal. *Green Chem.* **2019**, *21* (4), 775–779.
- (67) Příbylka, A.; Krchňák, V.; Schütznerová, E. Environmentally Friendly SPPS II: Scope of Green Fmoc Removal Protocol Using NaOH and Its Application for Synthesis of Commercial Drug Triptorelin. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (14), 8798–8811.
- (68) García-Martín, F.; Bayó-Puxan, N.; Cruz, L. J.; Bohling, J. C.; Albericio, F. Chlorotriptyl Chloride (CTC) Resin as a Reusable Carboxyl Protecting Group. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26* (10), 1027–1035.
- (69) Al Musaimi, O.; Jad, Y. E.; Kumar, A.; Collins, J. M.; Basso, A.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. Investigating Green Ethers for the Precipitation of Peptides after Global Deprotection in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2018**, *11*, 99–103.
- (70) Adams, J. P.; Alder, C. M.; Andrews, I.; Bullion, A. M.; Campbell-Crawford, M.; Darcy, M. G.; Hayler, J. D.; Henderson, R. K.; Oare, C. A.; Pendrak, I.; Redman, A. M.; Shuster, L. E.; Sneddon, H. F.; Walker, M. D. Development of GSK's Reagent Guides-Embedding Sustainability into Reagent Selection. *Green Chem.* **2013**, *15* (6), 1542–1549.
- (71) SciFinder - A CAS Solution. <http://www.cas.org/products/scifinder>.
- (72) A. S. Merck KGaA <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>.
- (73) Knott, M. E.; Manzi, M.; Zabalegui, N.; Salazar, M. O.; Puricelli, L. I.; Monge, M. E. Metabolic Footprinting of a Clear Cell Renal Cell Carcinoma in Vitro Model for Human Kidney Cancer Detection. *J. Proteome Res.* **2018**, *17* (11), 3877–3888.
- (74) Liu, Y. P.; Zhu, C. J.; Yu, C. C.; Wang, A. E.; Huang, P. Q. Tf2O-Mediated Intermolecular Coupling of Secondary Amides with Enamines or Ketones: A

- Versatile and Direct Access to  $\beta$ -Enaminones. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 2019 (42), 7169–7174.
- (75) Paleček, J.; Paleta, O. Novel and Convenient Aldolization of Methyl 3,3,3-Trifluoropyruvate Using Enamines Instead of Ketones. *Synthesis - Stuttgart* **2004**, (4), 521–524.
- (76) Stumpf, T. D. J.; Steinbach, M.; Höltnke, M.; Heuger, G.; Grasemann, F.; Fröhlich, R.; Schindler, S.; Göttlich, R. C-Bridged Bispiperidines and Bispiperidines as New Ligands. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 2018 (40), 5538–5547.
- (77) Ammazalorso, A.; Amoroso, R.; Bettoni, G.; De Filippis, B.; Fantacuzzi, M.; Giampietro, L.; Maccallini, C.; Tricca, M. L. Asymmetric Synthesis of Arylpropionic Acids and Aryloxy Acids by Using Lactamides as Chiral Auxiliaries. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, (18), 4088–4091.
- (78) Tasaka, A.; Tamura, N.; Matsushita, Y.; Teranishi, K.; Hayashi, R.; Okonogi, K.; Itoh, K. Optically Active Antifungal Azoles. I. Synthesis and Antifungal Activity of (2*R*,3*R*)-2-(2,4-Difluorophenyl)-3-Mercapto-1-(LH-1,2,4-Triazol-1-Yl)-2-Butanol and Its Stereoisomers. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, 41 (6), 1035–1042.
- (79) Wang, G. Z.; Mallat, T.; Baiker, A. Enantioselective Hydrogenation of  $\alpha$ -Ketoamides over Pt/A<sub>12</sub>O<sub>3</sub> Modified by Cinchona Alkaloids. *Tetrahedron Asymmetry* **1997**, 8 (13), 2133–2140.

## 9 Přílohy

**Tabulka P1:** Hodnoty bobtnání pryskyřic pro **Graf 1** a **2**.

<b>Pryskyřice</b> <b>Rozpouštědlo</b>	<b>PS-Rink</b>	<b>TentaGel</b> <b>HL-RAM</b>	<b>TentaGel</b> <b>XV-RAM</b>	<b>ChemMatrix</b> <b>H-Rink</b>
DMF	6,5	-	-	-
DCM	5,0	-	-	-
EL	2,5	3,5	8,0	8,5
CP	5,5	5,0	10,5	10,5
Anisol	6,5	5,5	11,5	10,0
EtOH	1,5	3,0	6,5	4,5
DMSO	4,5	-	-	-
2-MeTHF	4,0	-	-	-
Anisol/EtOH (1:1)	4,0	-	-	-
Anisol/DMSO (4:1)	6,0	-	-	-

**Tabulka P2:** Vypočítané procentuální obsahy pro **Graf 3** z  $^1\text{H}$  NMR spekter pro určení průběhu reakcí EL s bázemi.

<b>Procentuální obsah</b> <b>Čas [h]</b>	<b>EL + piperidin</b> <b>(18)</b>	<b>Piperidin</b> <b>(17)</b>	<b>EL + morfolin</b> <b>(21)</b>	<b>Morfolin</b> <b>(20)</b>
24	0,00	100,00	0,00	100,00
48	8,51	91,49	0,01	99,99
72	17,26	82,74	1,28	98,72
96	23,86	76,14	0,01	99,99
165	28,83	71,17	2,53	97,47

**Tabulka P3:** Vypočítané procentuální obsahy pro **Graf 4** z  $^1\text{H}$  NMR spekter pro určení průběhu reakcí CP s bázemi.

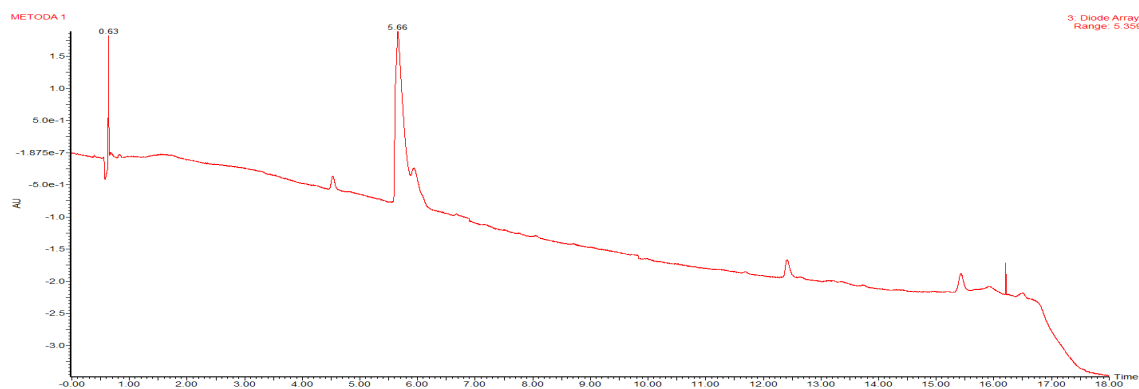
<b>Procentuální obsah</b>	<b>CP + piperidin</b>	<b>Piperidin</b>	<b>CP + morfolin</b>	<b>Morfolin</b>
<b>Čas [h]</b>	<b>(19)</b>	<b>(17)</b>	<b>(22)</b>	<b>(20)</b>
0	0,00	100,00	0,00	100,00
0,083 (5 min)	14,35	85,65	17,70	82,30
0,5	40,30	59,70	36,51	63,49
1	40,83	59,17	35,90	64,10
3	40,48	59,52	36,10	63,90
6	40,12	59,88	35,38	64,62
10	40,48	59,52	35,79	64,21
24	39,94	60,06	35,38	64,62
48	40,74	59,26	35,06	64,94
72	37,60	62,40	34,21	65,79
96	38,65	61,35	15,25	84,75

#### **UPLC metoda analýzy tripeptidů a pentapeptidů:**

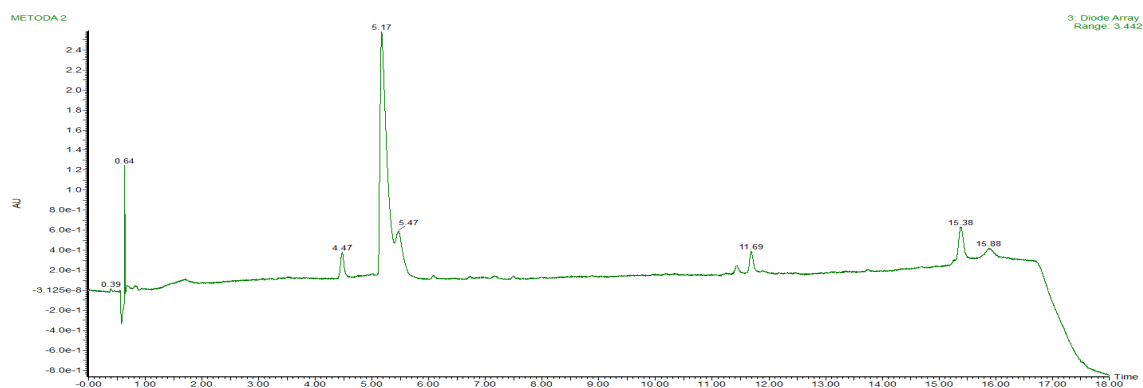
UPLC analýza byla provedena pomocí systému složeného z UPLC chromatografu Acquity s PDA detektorem. Byla použita chromatografická kolona X-Select HSS T3 C18 (2.5  $\mu\text{m}$ , 3.0 mm X 50 mm, + předkolonka, Waters) a průtok mobilní fáze (MF) 600  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Jako MF byla použita směs vodného roztoku 0,1% TFA (A) a ACN s přídavkem 0,1% TFA (B). Použitá gradientová eluce měla lineární průběh 0 – 30 % B v A za 15 minut. Následující minutu zůstalo složení MF konstantní a posléze došlo k ekvilibraci kolony. Celkový čas analýzy byl 18 minut.

#### **Přesný popis použitých přístrojů a metody při HRMS analýzách:**

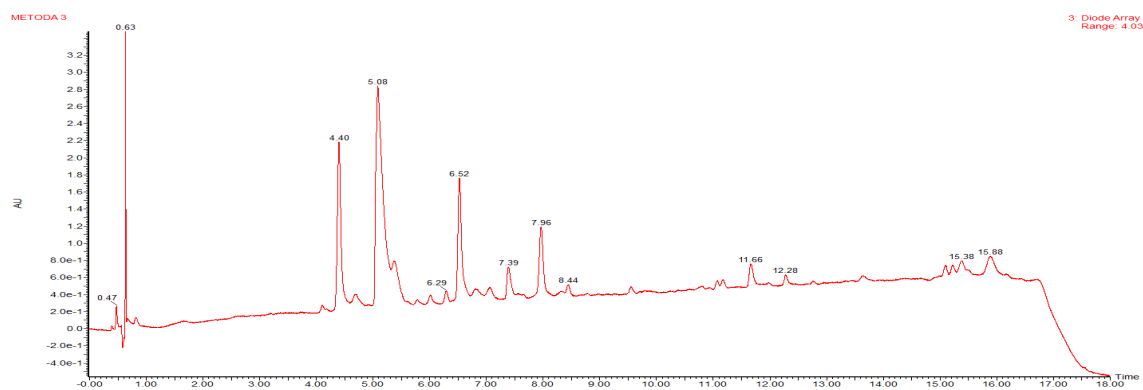
Analýzy byly prováděny na systému tvořeném kapalinovým chromatografem (Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific, MA, USA) a hmotnostním spektrometrem Exactive Plus Orbitrap high-resolution (Thermo Fischer Scientific, MA, USA). Jako ionizační zdroj byl použit elektrosprej a snímána byla spektra v kladném i záporném módu v rozsahu od 100 do 1000 m/z. Chromatografické separace byly prováděny na koloně Phenomenex Gemini (C18, 50 x 2 mm, 3  $\mu\text{m}$  částice), eluce byla izokratická, MF obsahovala 95 % MeOH a 5 % vody + 0,1% HCOOH. Vzorky byly připraveny rozpuštěním látek v počáteční mobilní fázi. Celkový čas analýzy byl 18 minut.



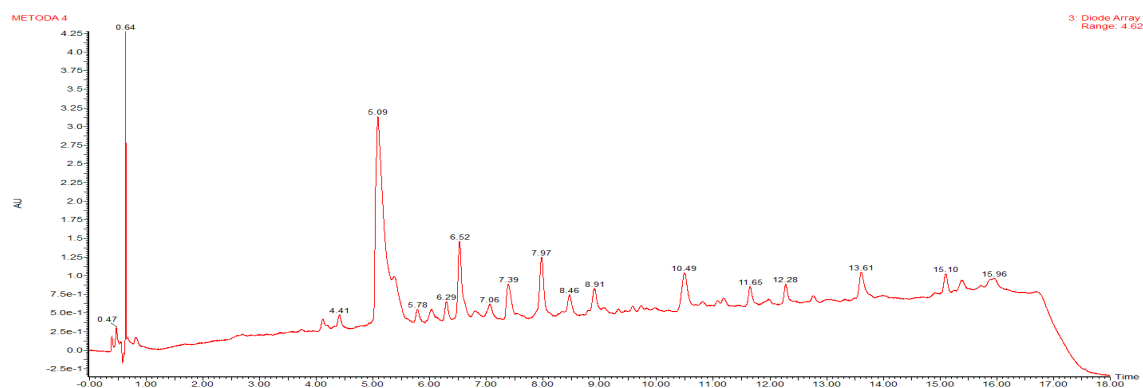
**Obrázek P1: Chromatogram tripeptidu připraveného Metodou 1.**



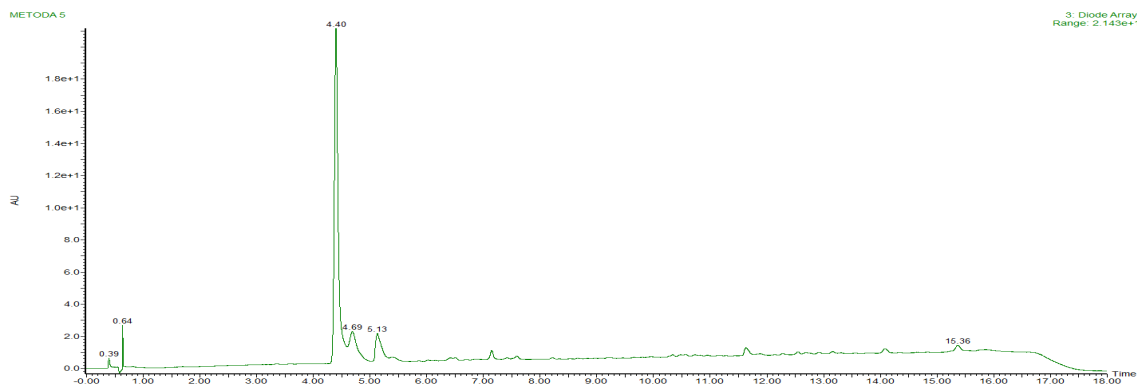
**Obrázek P2: Chromatogram tripeptidu připraveného Metodou 2.**



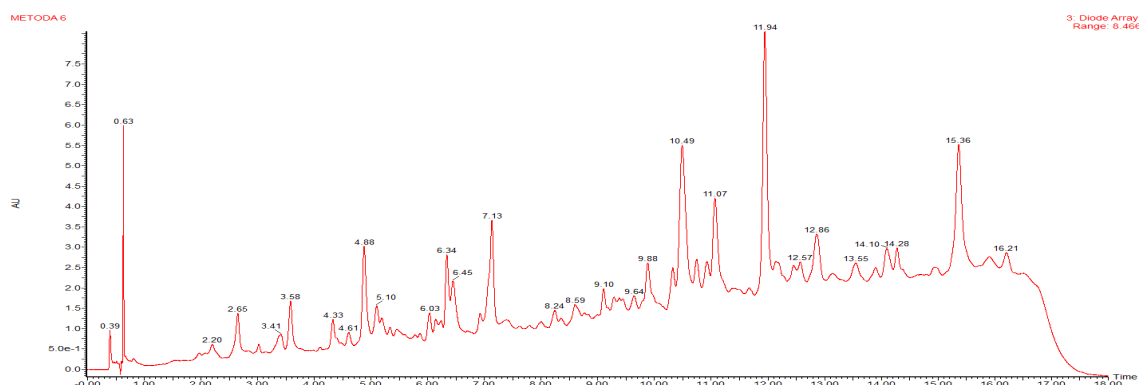
**Obrázek P3: Chromatogram tripeptidu připraveného Metodou 3.**



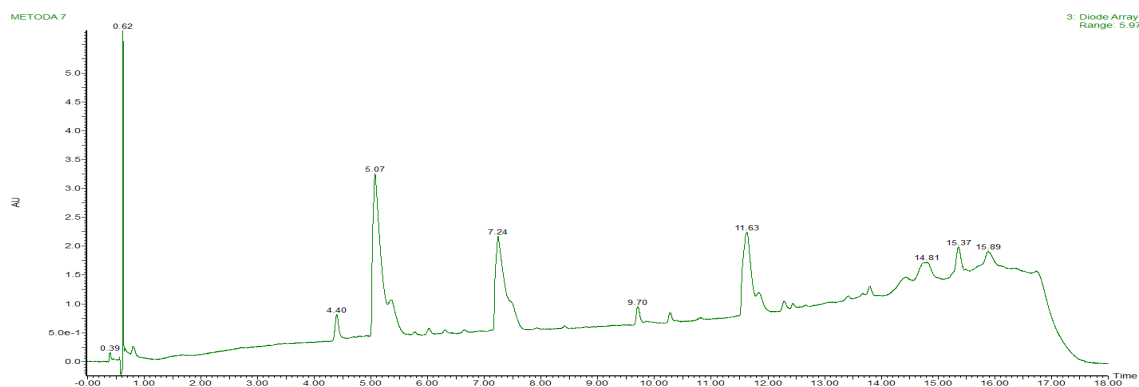
**Obrázek P4: Chromatogram tripeptidu připraveného Metodou 4.**



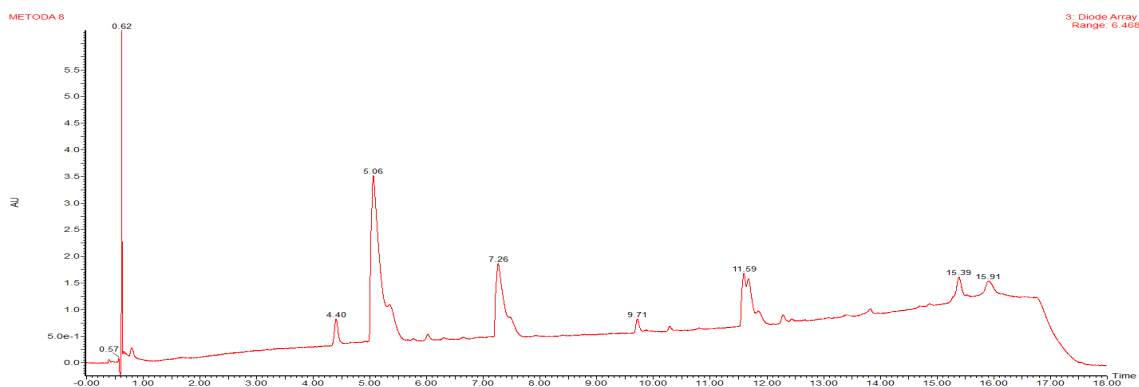
**Obrázek P5: Chromatogram tripeptidu připraveného Metodou 5.**



**Obrázek P6: Chromatogram tripeptidu připraveného Metodou 6.**

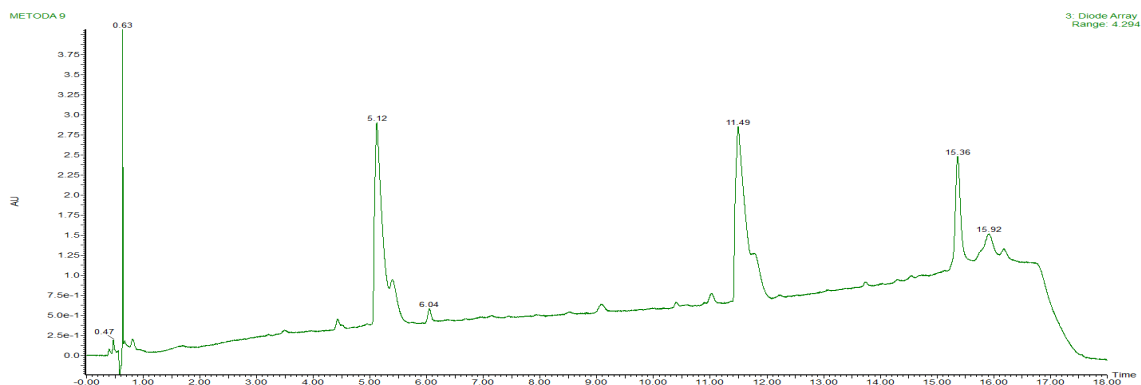


**Obrázek P7: Chromatogram tripeptidu připraveného Metodou 7.**

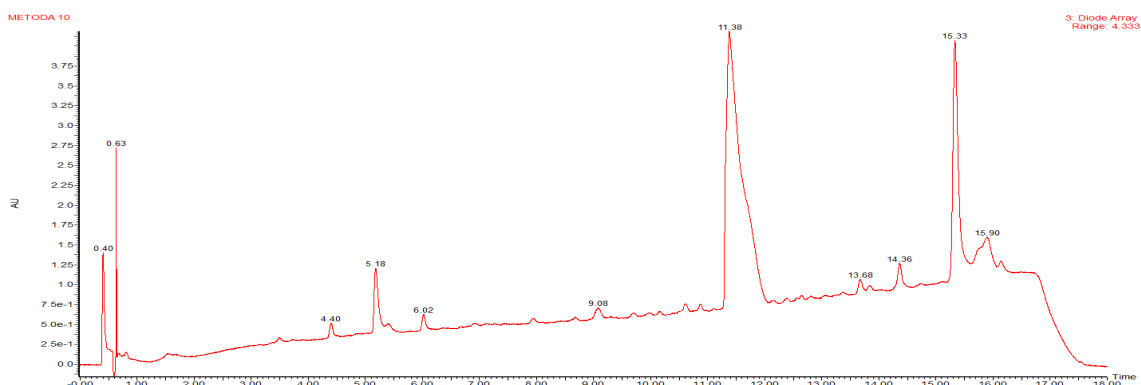


**Obrázek P8: Chromatogram tripeptidu připraveného Metodou 8.**

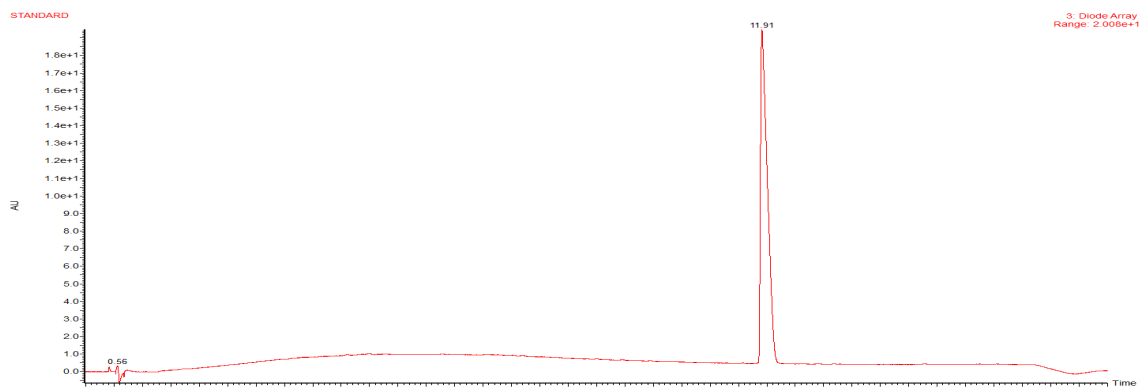




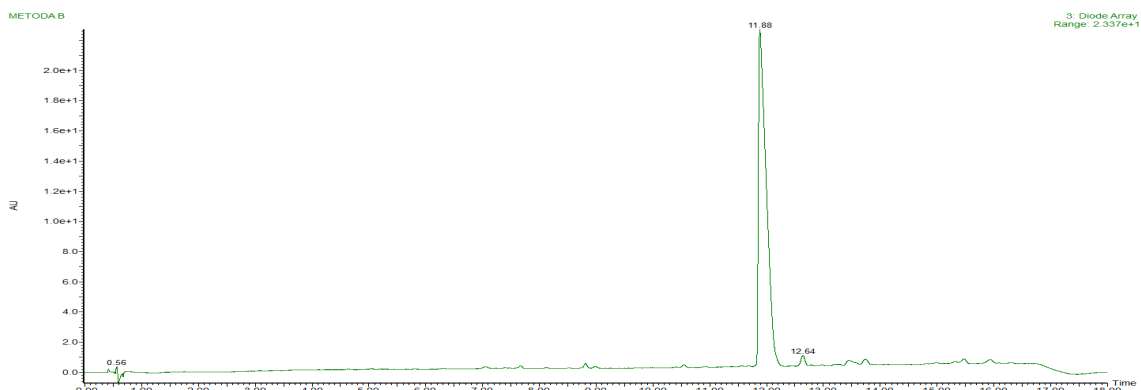
**Obrázek P9:** Chromatogram tripeptidu připraveného Metodou 9.



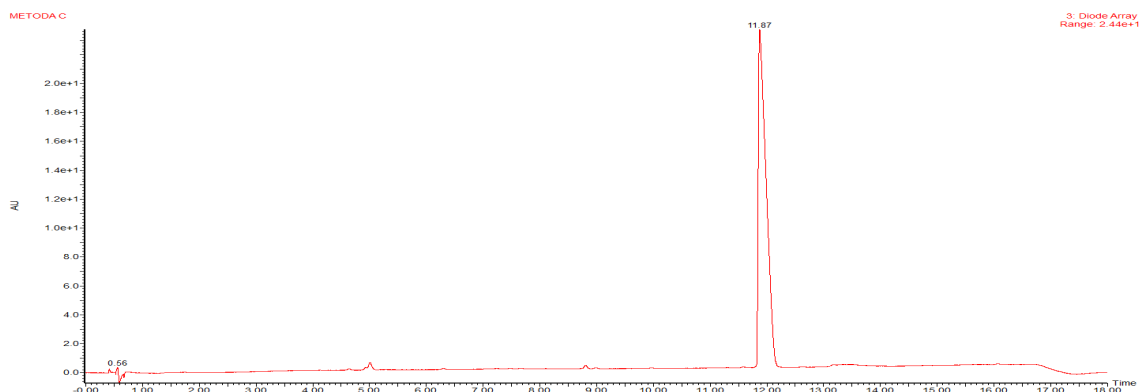
**Obrázek P10:** Chromatogram tripeptidu připraveného Metodou 10.



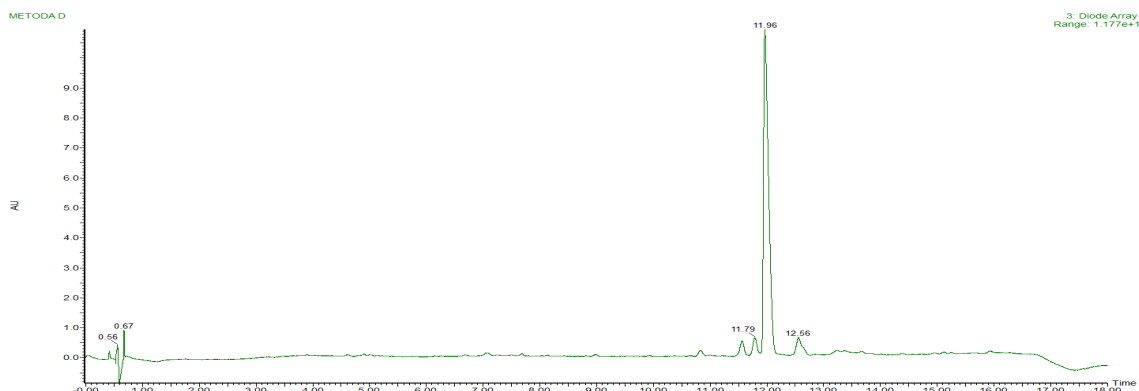
**Obrázek P11:** Chromatogram pentapeptidu připraveného Metodou standard.



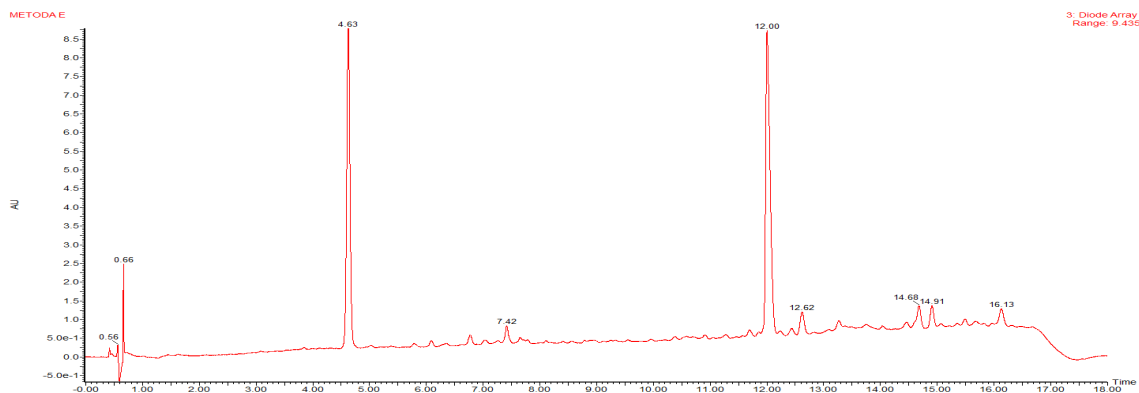
**Obrázek P12:** Chromatogram pentapeptidu připraveného Metodou B.



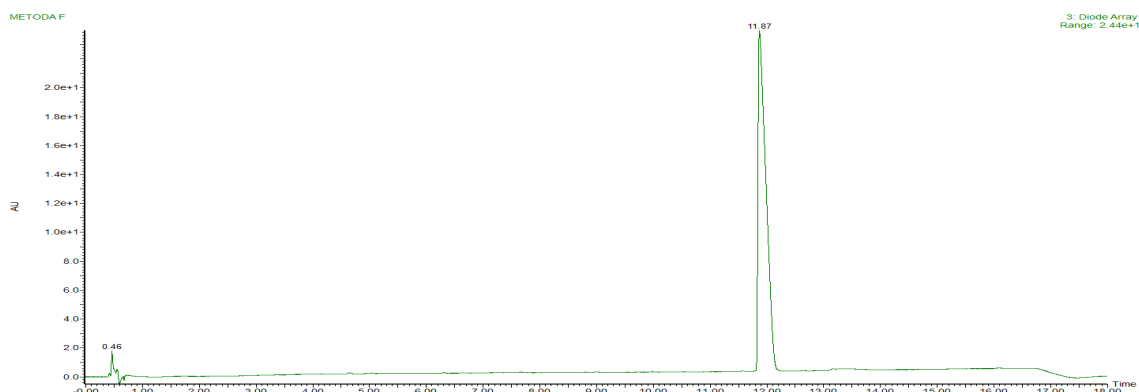
**Obrázek P13:** Chromatogram pentapeptidu připraveného Metodou C.



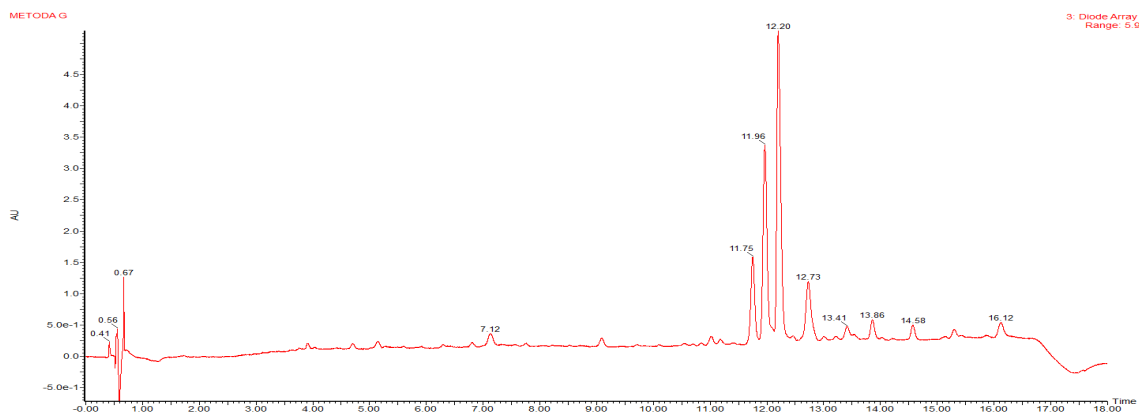
**Obrázek P14:** Chromatogram pentapeptidu připraveného Metodou D.



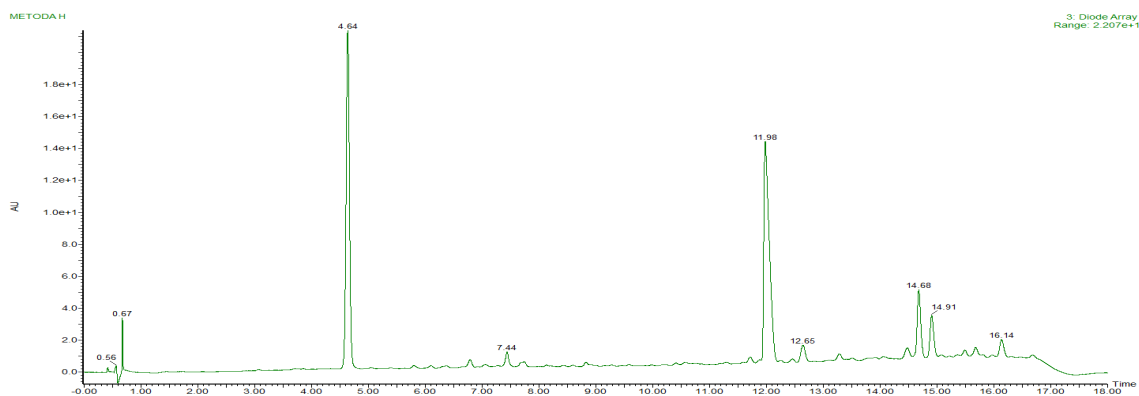
**Obrázek P15:** Chromatogram pentapeptidu připraveného Metodou E.



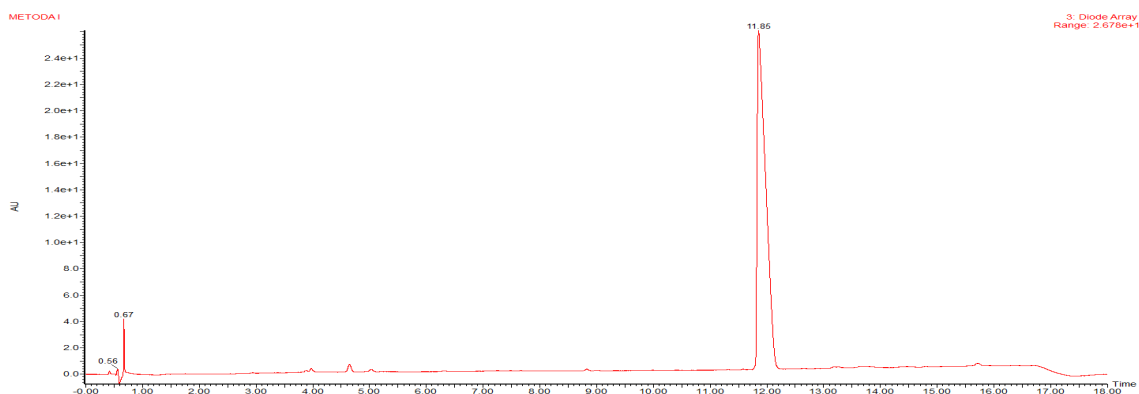
**Obrázek P16:** Chromatogram pentapeptidu připraveného Metodou F.



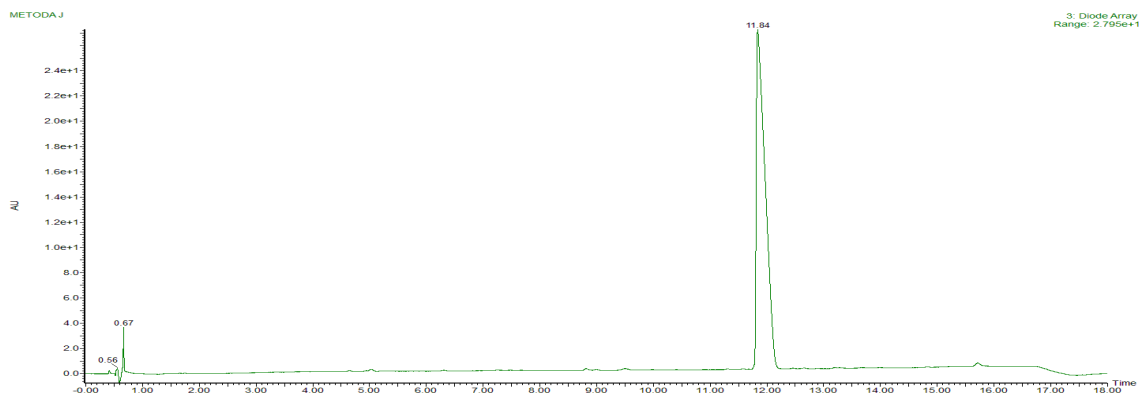
**Obrázek P17: Chromatogram pentapeptidu připraveného Metodou G.**



**Obrázek P18: Chromatogram pentapeptidu připraveného Metodou H.**

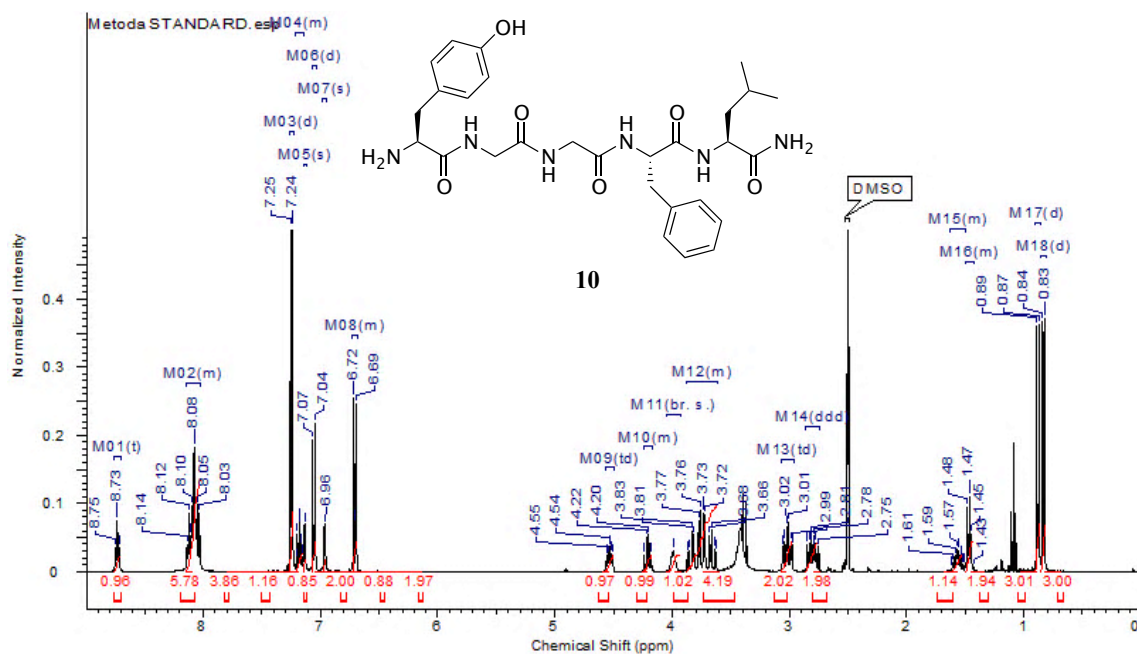


**Obrázek P19: Chromatogram pentapeptidu připraveného Metodou I.**

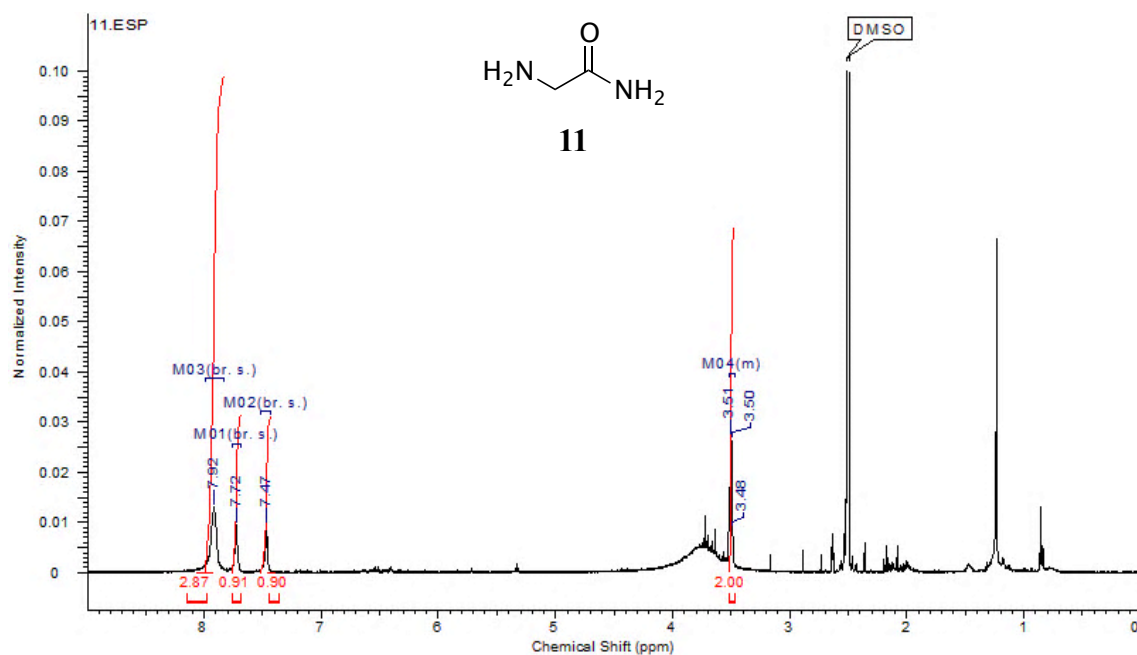


**Obrázek P20: Chromatogram pentapeptidu připraveného Metodou J.**

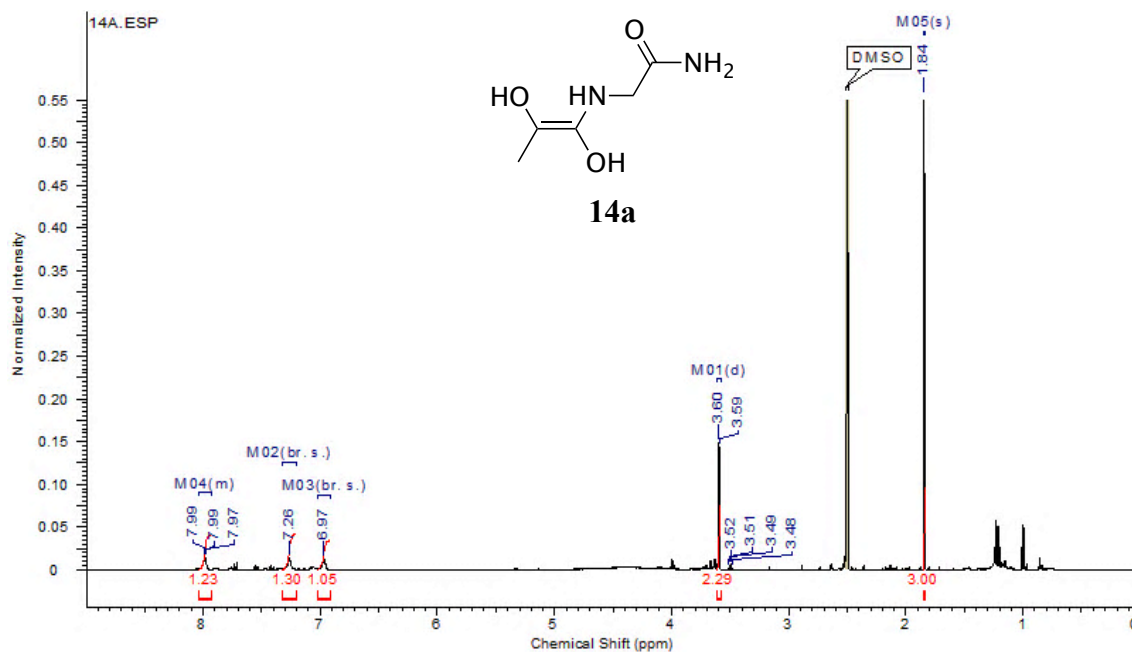
**$^1\text{H}$  NMR spektrum pentapeptidu Leu-enkefalin- $\text{NH}_2$  (10) připraveného metodou standard.**



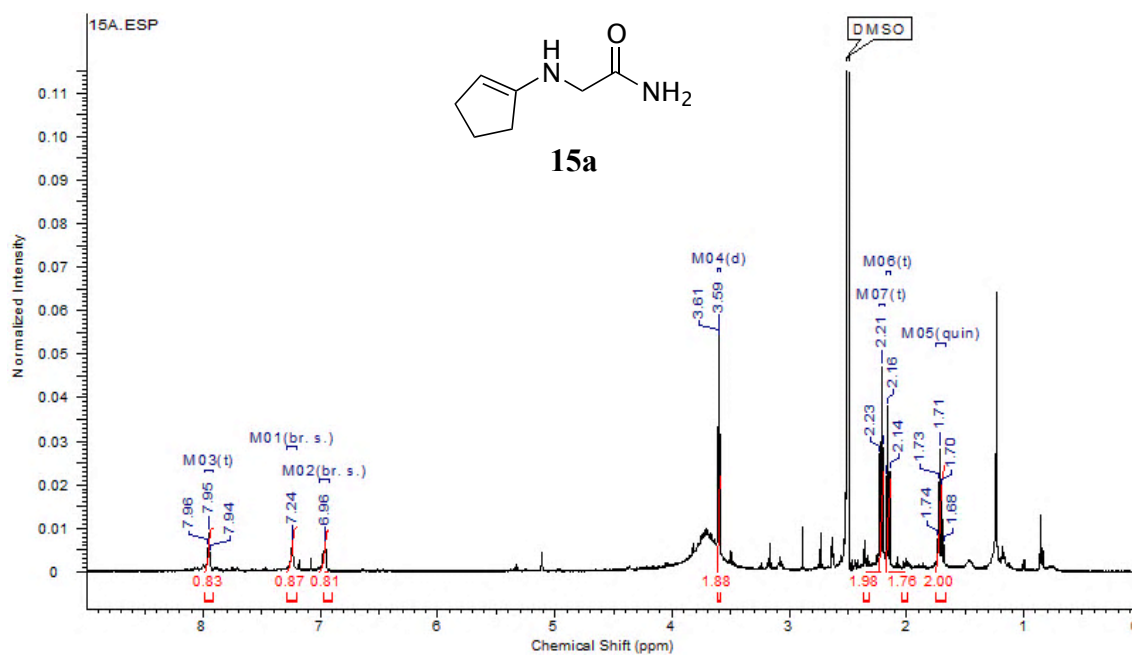
**$^1\text{H}$  NMR spektrum 2-aminoacetamidu (11)**



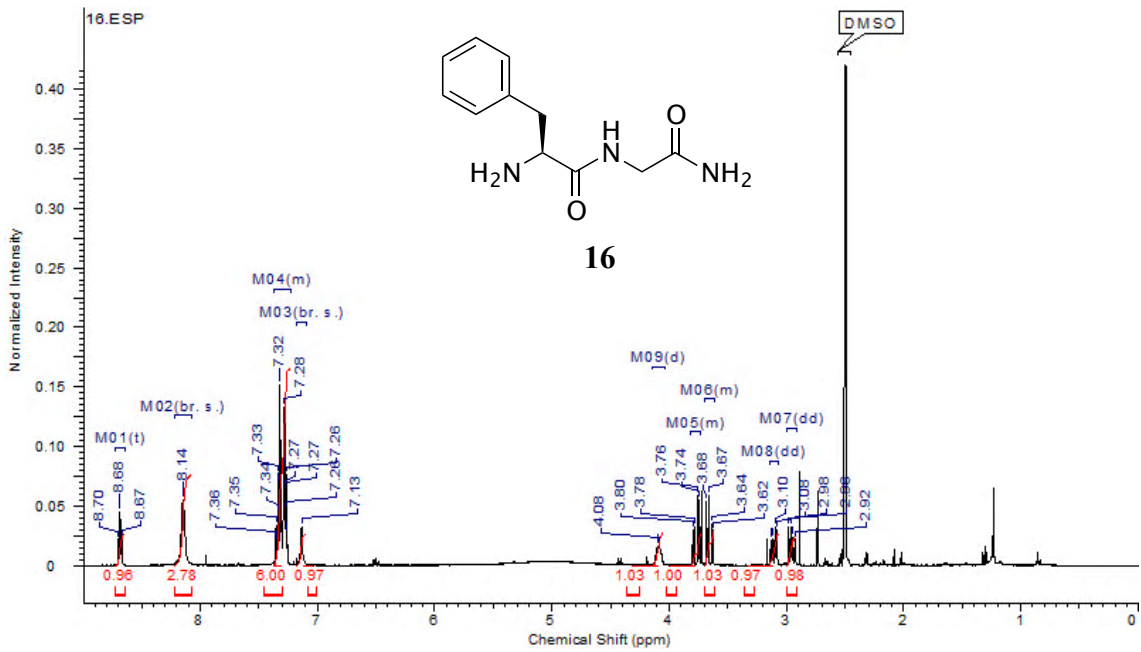
**<sup>1</sup>H NMR spektrum (*E*)-2-((1,2-dihydroxyprop-1-en-1-yl)amino)acetamidu (14a)**



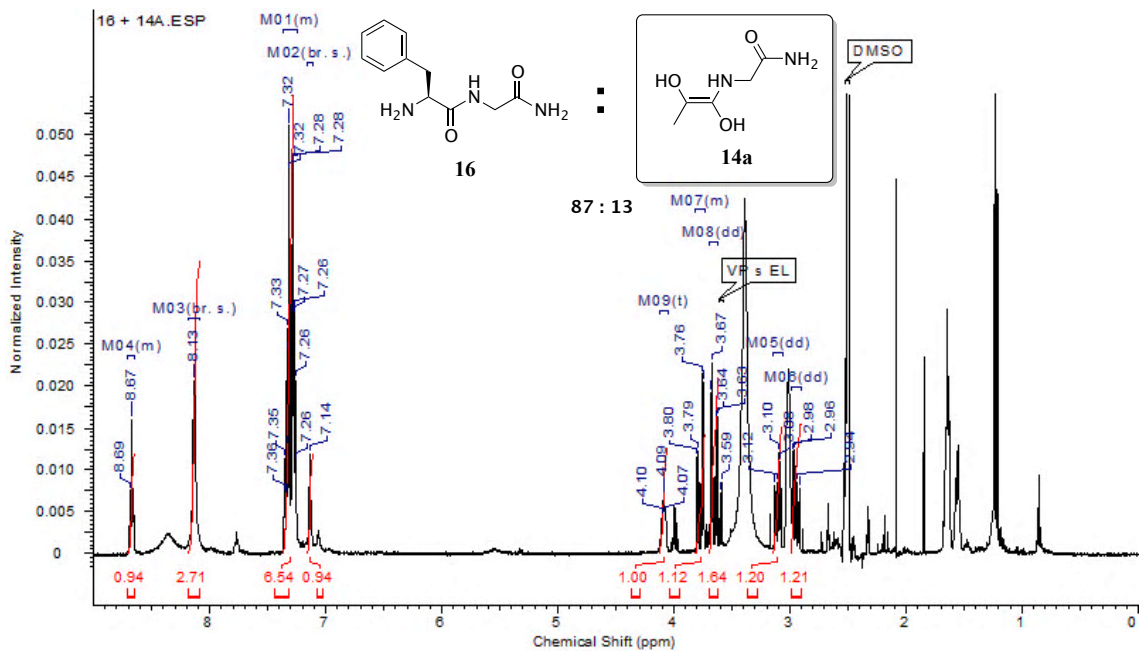
**<sup>1</sup>H NMR spektrum 2-(cyklopent-1-en-1-ylamino)acetamidu (15a)**



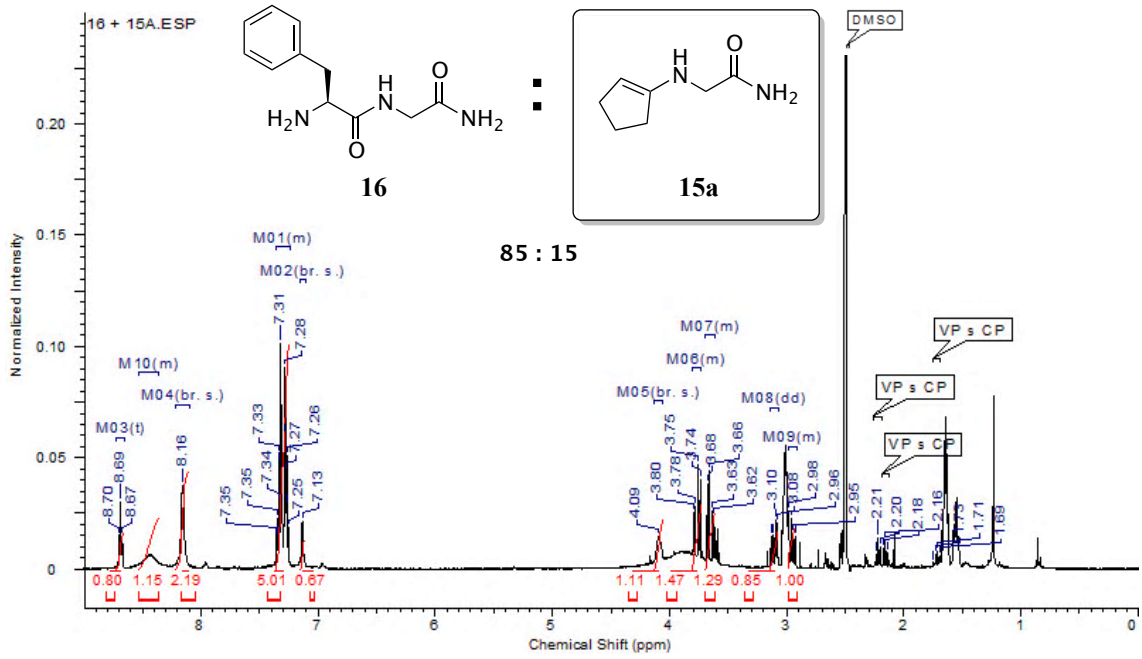
**<sup>1</sup>H NMR spektrum (S)-2-amino-N-(2-amino-2-oxoethyl)-3-fenylpropanamidu (16)**



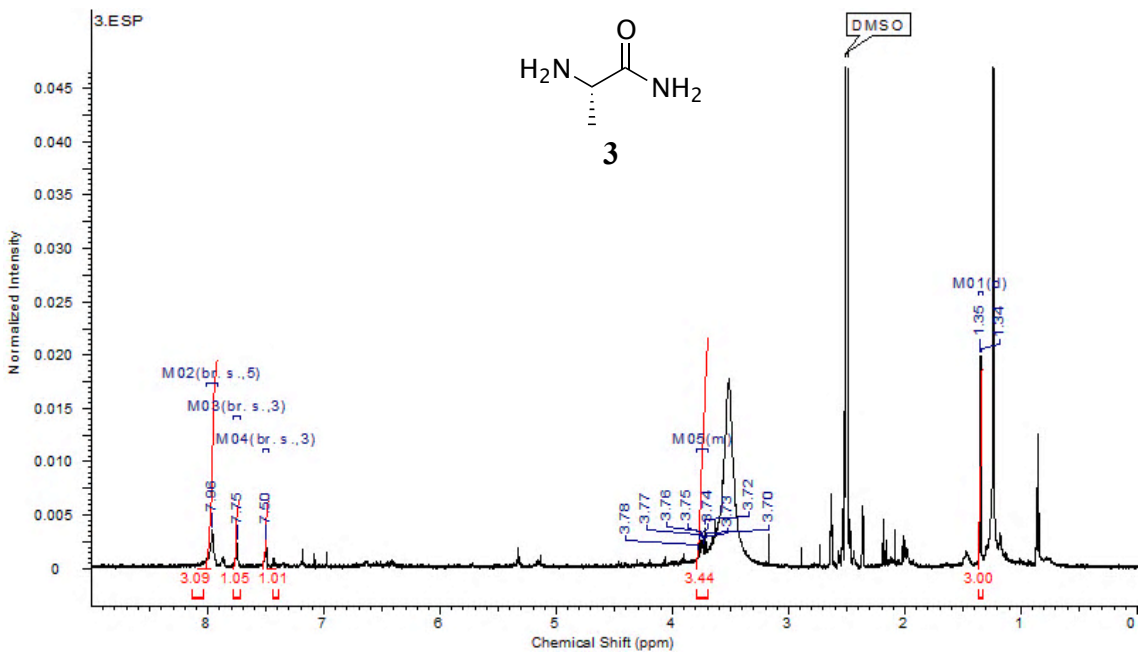
**<sup>1</sup>H NMR spektrum (16) + (14a)**



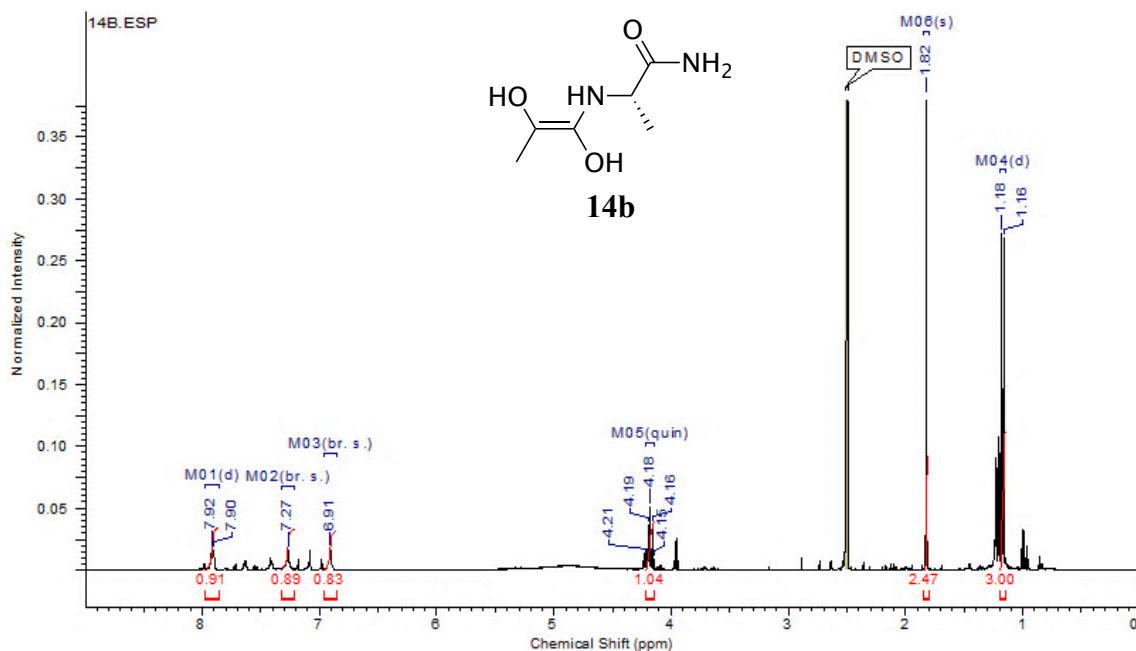
<sup>1</sup>H NMR spektrum (16) + (15a)



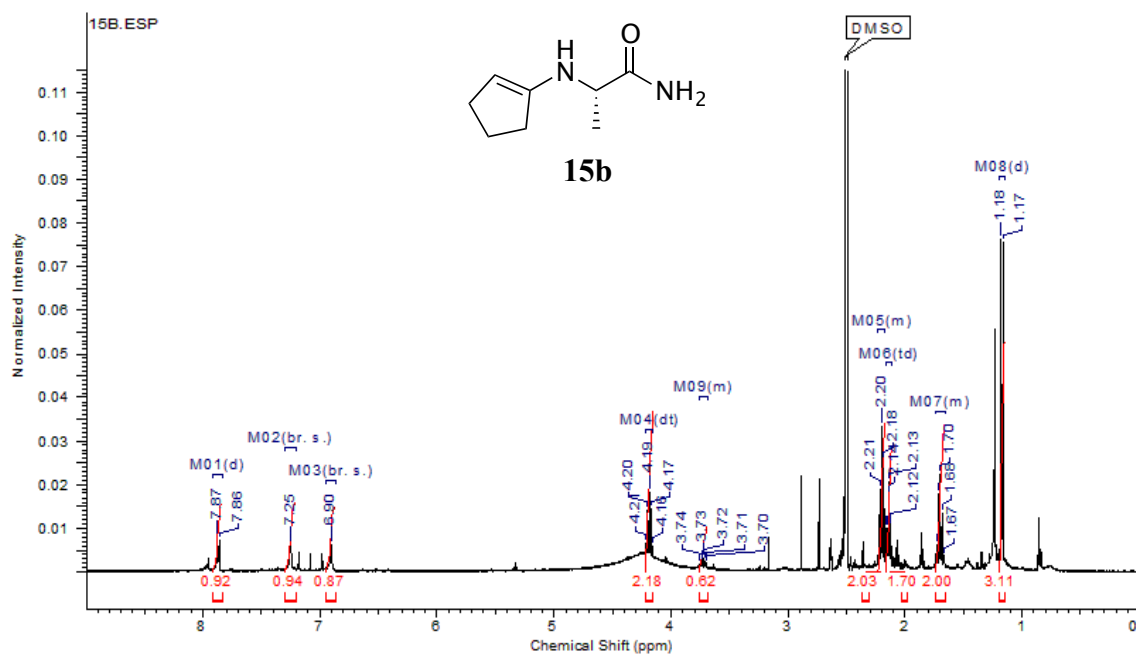
<sup>1</sup>H NMR spektrum (S)-2-aminopropanamidu (3)



**<sup>1</sup>H NMR spektrum (*S,E*)-2-((1,2-dihydroxyprop-1-en-1-yl)amino)propanamidu (14b)**

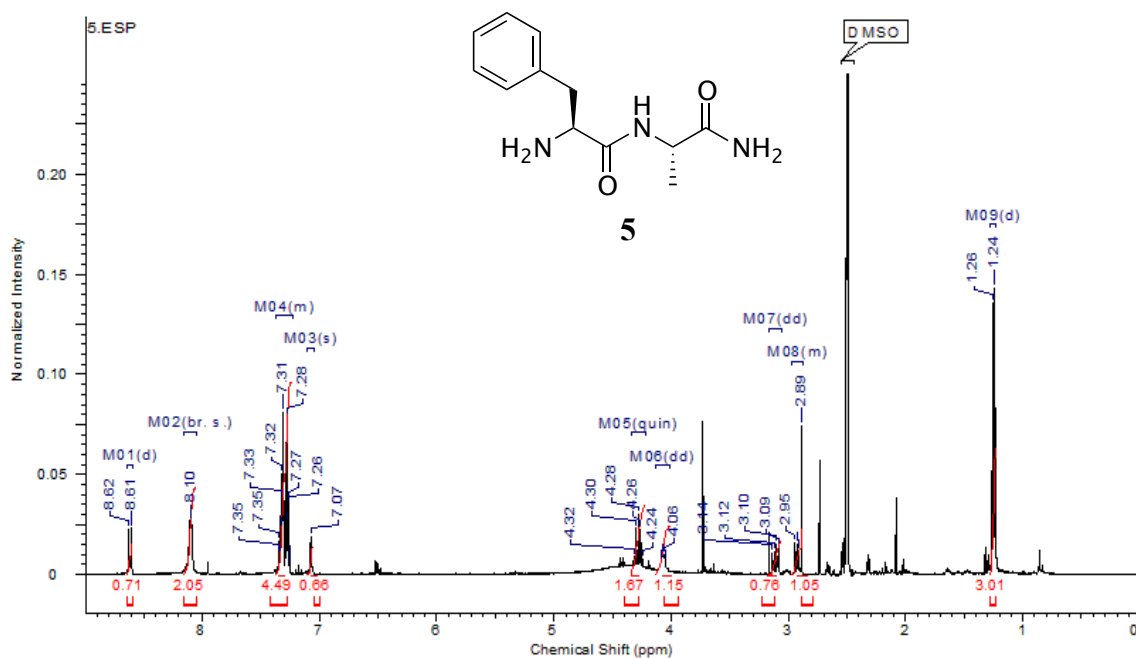


**<sup>1</sup>H NMR spektrum (*S*)-2-(cyklopent-1-en-1-ylamino)propanamidu (15b)**

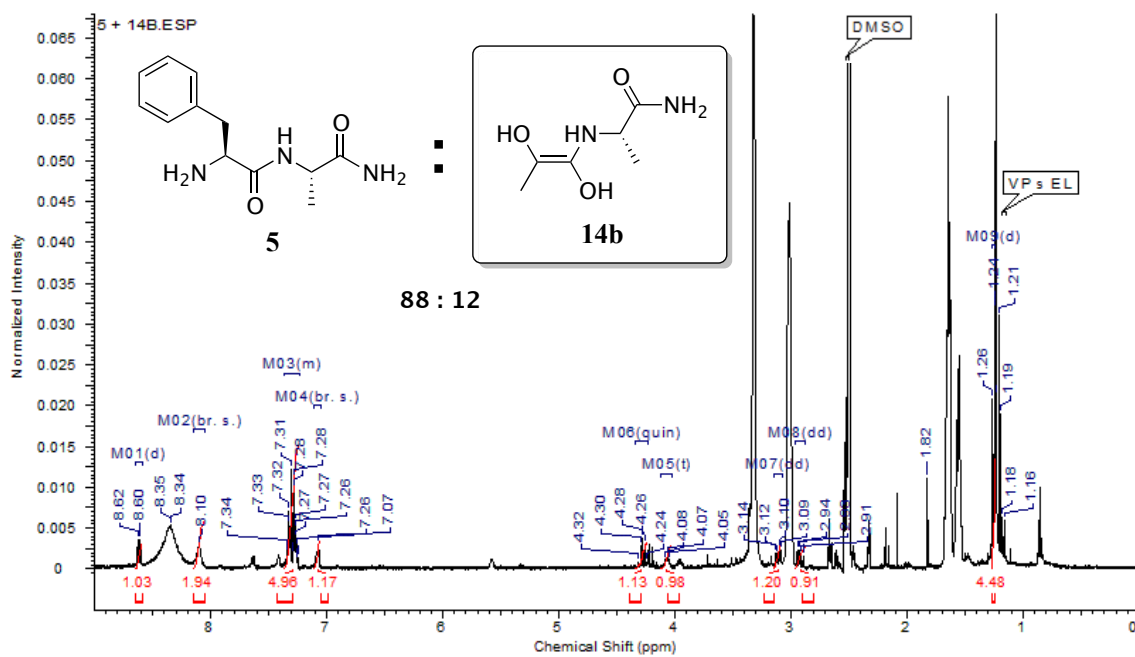




<sup>1</sup>H NMR spektrum (S)-2-amino-N-((S)-1-amino-1-oxopropan-2-yl)-3-fenylpropanamidu (5)



<sup>1</sup>H NMR spektrum (5) + (14b)



<sup>1</sup>H NMR spektrum (5) + (15b)

