

**SYNTÉZA PEPTIDŮ NA PEVNÉ FÁZI A KOMBINATORIÁLNÍ CHEMIE**  
*SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS AND COMBINATORIAL  
CHEMISTRY*

**Michal Lebl**

**Anotace**

Syntéza peptidů s využitím připojení na polymerní nosič zjednodušila proces syntézy peptidů a umožnila studium jejich vlastností v rozsahu zcela nemyslitelném před objevem této metodiky. Logickým rozšířením metodiky syntézy na pevné fázi byl objev technologie kombinatoriální chemie a následná příprava knihoven peptidů umožňující vyhledávání peptidů s novými vlastnostmi. Rozsah využití těchto technologií pro přípravu nových materiálů, zvláště pak nových léčiv, je limitován pouze představitostí moderních chemiků, biochemiků a biologů.

**Abstract**

Peptide synthesis using attachment to the polymeric carrier has simplified the process of peptide synthesis, allowing the study of their properties quite unthinkable before the discovery of this methodology. A logical extension of method of solid phase synthesis has been the discovery of combinatorial chemistry and the subsequent preparation of libraries of peptides which can be searched for peptides with novel properties. The scope of the use of these technologies for finding new materials, especially new drugs, is limited only by the imagination of modern chemists, biochemists and biologists.

**OBSAH**

**ANOTACE**

**ABSTRACT**

**6 SYNTÉZA PEPTIDŮ NA PEVNÉ FÁZI**

**6.1 Úvod**

**6.2 Pevná fáze**

**6.3 Problematické sekvence**

## **6.4 Připojení k pevné fázi**

# **7 KOMBINATORIÁLNÍ CHEMIE**

## **7.1 Úvod**

## **7.2 Paralelní syntéza peptidů**

## **7.3 Syntézy využívající kompartmentalizace a třídění**

## **7.4 Syntéza peptidových polí**

## **7.5 Syntéza směsí peptidů**

## **7.6 Syntéza peptidů na směsi částic**

## **7.7 Využití knihoven na částicích**

## **7.8 Stanovení struktury peptidu na individuální kuličce**

## **7.9 Screening OBOC knihoven v roztoku**

## **7.10 Budoucnost peptidových knihoven**

## **Přehled použité literatury a zdrojů**

## **Klíčová slova**

## **Slovník pojmů**

## **Seznam doporučené literatury a odkazy na internetové zdroje**

## 6 SYNTÉZA PEPTIDŮ NA PEVNÉ FÁZI

### 6.1 Úvod

Jako téměř vždy když někdo přijde s převratným řešením vědeckého problému, tak i v případě profesora Merrifielda, který navrhl naprosto samozřejmou myšlenku jak zjednodušit syntézu peptidů tím, že připojí první aminokyselinu na nerozpustný nosič a provede připojení dalších aminokyselin suspendováním aminochráněných aktivovaných aminokyselin s tímto nosičem, zvedla jeho práce publikovaná v časopise americké chemické společnosti<sup>1</sup> vlnu odporu. Klasičtí organičtí chemici viděli v tomto přístupu znevážení syntetické práce založené na precizní identifikaci a charakterizaci všech meziproductů. Přirovnávali Merrifieldovu syntézu k technologiím které je možno svěřit cvičeným opicím. (S odstupem času lze říci, že tito chemici ze „staré školy“ měli však pravdu – dnes syntézu peptidů provádějí stroje mající méně inteligence než průměrný orangutan.) Tábor peptidových chemiků jejichž idolem byla syntéza kterou, jak říkal profesor Carruthers, „...může provádět jednoruký slepec ve staré výlevce a kde produkt odtéká výpustí ve stoprocentní čistotě a výtěžku“, však nový způsob přijal s nadšením a dnes již najdeme jen velmi zřídka chemika který by připravoval peptidy syntézou v roztoku. Rozporný názor na technologii syntézy na pevné fázi lze též demonstrovat na faktu, že Nobelova cena za chemii byla profesoru Merrifieldovi udělena až v roce 1984 („za rozvoj metodologie chemických reakcí na pevných maticích“). Zajímavým faktem je i to, že (jak říkal profesor Rudinger, “žádný nápad není tak stupidní, aby na něm nepracovali alespoň dva vědci na opačných stranách zeměkoule najednou”) ideu jak syntetizovat nukleové kyseliny za pomoci pevné fáze rozpracovával ve stejné době professor Letsinger<sup>2</sup> a publikoval ve stejném časopise o několik týdnů později.

I když byla chemie na pevné fázi navržena rovněž pro syntézu dalších typů organických molekul, nebyly tyto první pokusy brány vážně a byly považovány spíše za kuriozitu než za technologický pokrok. Leznoff byl jedním z prvních kdo rozpoznal potenciál reakcí v pevné fázi pro organickou chemii a předpověděl, že organické reakce na pevné fázi bude snadné automatizovat<sup>3</sup>. V současné době existuje mnoho příkladů syntéz, které mohly být realizovány pouze použitím pevných nosičů, nebo ve kterých pevná fáze působí jako vhodné "pseudo-ředidlo" umožňující reakce, jako na příklad cyklizace, ve zvládnutelných objemech. Skutečnost, že většina chemických přeměn může být provedena na pevné fázi, někdy dokonce účinněji než v roztoku, je nyní obecně přijata, a tak se zdá velmi zvláštní, že syntéza v pevné fázi se setkala na samém začátku s takovým odporem. I v aréně syntézy peptidů, se značný počet laboratoří bránil přechodu na pevnou fázi po desetiletí. Pouze úspěchy jak ve výzkumných laboratořích tak i v průmyslových procesech, v měřících od miligramů po kg a více (tuny farmaceuticky významného peptidu Fuzeon byly vyrobeny s použitím pevné fáze firmou Roche), přesvědčily skeptiky, že syntéza na pevné fázi je technologie budoucnosti. Syntéza na pevné fázi byla popsána v řadě přehledů - zde uvádíme jen ten nejdůležitější<sup>4</sup>. Doporučenímhodný je souhrnný článek shromažďující vzpomínky a osobní příběhy vědců věnujících se vývoji různých typů materiálů a technik<sup>5,6</sup>.

### 6.2 Pevná fáze

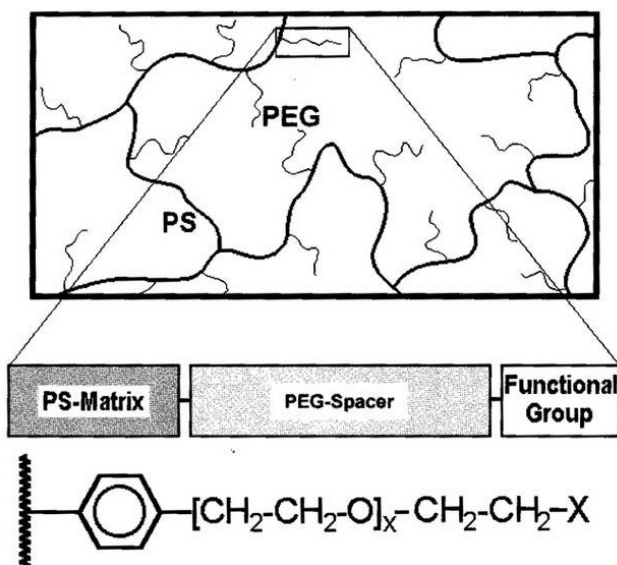
Jak se tedy syntéza na pevné fázi provádí? Nejprve je nutno vybrat vhodnou pevnou fázi neboli nosič (budeme používat tento termín – z anglického solid phase - i když možná výstižnější by byl termín nerozpustná fáze nebo matrice), rozhodnout se jakou strategii syntézy zvolíme, jakým způsobem první stavební blok připojíme, a jak posléze hotový peptid od nosiče odštěpíme. Vhodným nosičem je materiál který dovolí přístup reagentů k imobilizovanému rostoucímu peptidu. Tento požadavek se zdá samozřejmý, nicméně výběr vhodných nosičů zabral značnou část konce minulého století. Je třeba si uvědomit, že například zesíťovaný polystyrén má sice velmi dobré fyzikální charakteristiky, je však zcela nekompatibilní s vodnými roztoky a jeho přístupnost závisí na procentu síťování. Tak jak totiž peptid roste, přibývá na hmotnosti a není výjimkou, že peptidová složka převáží nad hmotou vlastního nosiče. Pokud by tedy polymer nebyl schopen expanze, v určitém okamžiku by syntéza mohla pokračovat pouze na povrchu a vznikl by velmi nehomogenní produkt. To že rostoucí peptid je distribuován rovnoměrně v polymerním nosiči a ne pouze na jeho povrchu, dokázal Merrifield hezkým experimentem v němž připravil radioaktivní peptid, z polymerní částice pak vyřízl plátek, imobilizoval jej na fotografické emulzi a pomocí mikroskopu pak uviděl homogenní distribuci radioaktivity. Dnes se pro syntézu používají polymery na bázi polystyrénu se síťováním 0,5 – 1% divinylbenzenu, které jsou schopné expanze objemu až na desetinásobek. Příklady dalších používaných polymerů jsou uvedeny v Tabulce 1. Obrázek 1 ukazuje strukturu TentaGelu, jednoho z nejpoužívanějších polymerů posledních let.

Tabulka 1. Polymery používané pro syntézu na pevné fázi

Polymer	Struktura	Kapacita (mmol/g)	Bobtnavost (mL/g)		
			H <sub>2</sub> O	DMF	DCM
PSty	Aminomethylovaný polystyren zesítný 1% divinylbenzenu	1,0	1,8	5,9	9,2
TentaGel	Kopolymer polystyrenu a polyethylenglykolu	0,3	3,6	4,7	6,3
PEGA	Kopolymer akrylamidu a polyethylenglykolu	0,4	14,2	10,7	14,7
CLEAR	Zesítný polyakrylát	0,35	6,0	7,2	8,0
Bavlna	Celulosa (poly β(1→4) D-glukosa)	0,2	1	1	1

Pro strategii syntézy máme v podstatě tři možnosti – připojení za karboxylový konec, za amino konec, nebo připojení pomocí postranního řetězce. První způsob je používán v 99% případů z důvodu toho, že při aktivaci karboxylu peptidu, které by bylo nezbytné při připojení amino skupinou, by docházelo k rozsáhlé racemizaci které je zabráněno při aktivaci karboxylové skupiny aminokyseliny chráněné vhodnou chránicí skupinou (viz dříve v této sekci). Připojení pomocí postranního řetězce je používáno ve speciálních případech, například tehdy, je-li požadován jako výsledek C to N cyklizovaný peptid, nebo peptid modifikovaný na C-konci<sup>6a</sup>.

Samotná syntéza peptidu je pak vlastně jen opakováním dvou reakcí - kondenzace chráněné aminokyseliny na aminoskupinu rostoucího peptidu a odstranění chránicí skupiny po ukončení kondenzace. Díky tomu je poměrně snadné navrhnout a zkonstruovat automatický syntetizátor peptidů. Jako první se o to pokusili Merrifield a Stewart a jejich první syntetizátor je dnes uložen v muzeu Smithsonian Institutu ve Washingtonu. To, že všechny peptidy není možno získat automatickou syntézou je způsobeno faktem, že připojení další aminokyseliny na rostoucí řetězec je závislé na reaktivitě tohoto intermediátu a ta se dá velmi těžko předpovědět. Připojení další aminokyseliny musí být téměř kvantitativní, pokud chceme očekávat rozumný výtěžek kýženého peptidu. Je zřejmé, že výtěžek ( $V$ ) můžeme předpovědět podle vzorce  $V = k^n$ , kde  $k$  je průměrná hodnota kompletnosti kondenzace a  $n$  je

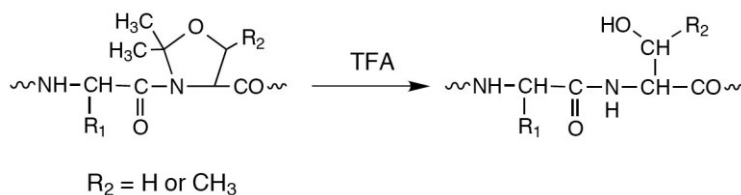


Obr. 1 Schematická reprezentace struktury TentaGelu

počet kroků syntézy. Pokud připravujeme desetipeptid, pak při 90 procentní kompletnosti kondenzace získáme jen 35 procent produktu, což je možno pokládat za výsledek akceptovatelný organickými chemiky, nikoli však chemiky zabývajícími se syntézou peptidů. V případě přípravy zajímavějších (delších) peptidů je totiž výtěžek tak nízký, že izolace žádaného produktu je téměř nemožná. Padesátipeptid bychom získali jen v 0,5 procentním výtěžku. Pro delší peptidy je akceptovatelný jen výtěžek průměrné kondenzace v oblasti lepší než 99%. Je totiž nutno vždy předpokládat že některá z reakcí nebude průměrná ale naopak obtížná. Kompletnost reakce je samozřejmě důležitá nejen při kondenzaci aminokyselin, ale rovněž při odstraňování přechodné chránící skupiny. Na tento fakt je však překvapivě často zapomínáno.

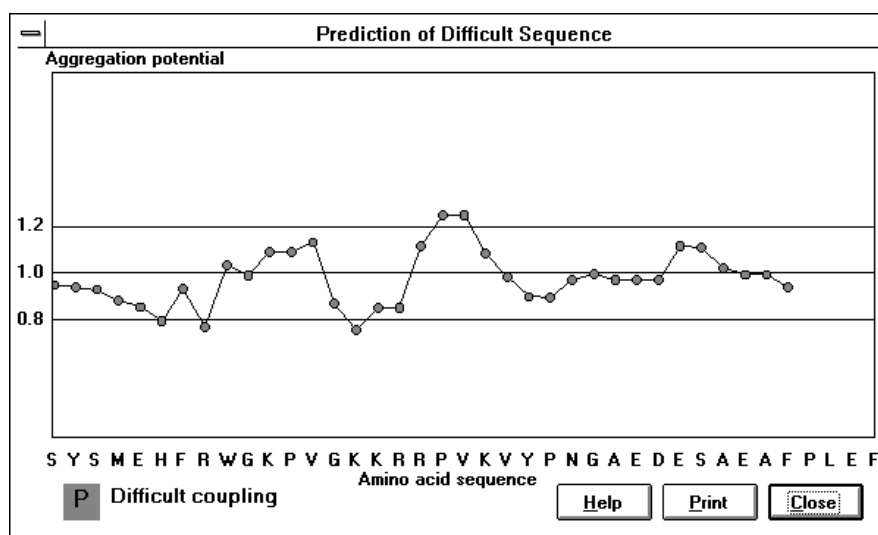
### 6.3 Problematické sekvence

Při syntéze dlouhých peptidů není neobvyklé nejprve v pilotním experimentu nalézt obtížná místa syntézy a jim se pak věnovat se zvláštní pozorností. Z triků pro překonání takzvaných „difficult couplings“ je možno zmínit použití různých kondenzačních činidel, případně zvýšené teploty či mikrovln pro rozvolnění pseudokrystalických struktur, které jsou zodpovědné za znepřístupnění volné aminoskupiny rostoucího peptidu. Je možné použít různá rozpouštědla či jejich směsi, případně přídavky rozličných aditiv. Pokud žádná z těchto metod neuspěje, je možno přikročit k obměně systému chránících skupin na postranních řetězcích aminokyselin, případně použít deriváty aminokyselin s chránící skupinou na alfa aminoskupině. V případě výskytu serinu či threoninu v sekvenci lze použít jejich deriváty v cyklické formě tak zvaných



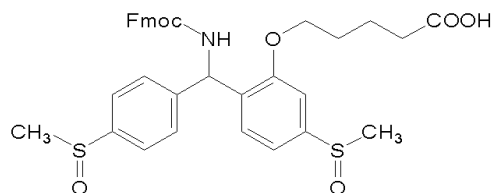
**Obr. 2** Zabudování pseudoprolinové struktury do peptidového řetězce a regenerace serinu (R=H) nebo threoninu (R=CH<sub>3</sub>) pomocí kyseliny trifluoroctové

pseudoprolinů (viz obr. 2). Všechny tyto postupy změni strukturu rostoucího řetězce a zabrání jejímu „kolapsu“. Vznik pseudokrystalických struktur lze sledovat vizuálně. Normálně probíhající syntéza se vyznačuje lineárně rostoucím objemem pevné fáze v každém kroku syntézy. Pokud objem pevné fáze nenarůstá, či pokud dokonce její objem náhle dramaticky klesne, znamená to, že rostoucí peptid vytvořil pravidelné struktury a můžeme očekávat problémy s připojením další aminokyseliny. Tento fenomén využil



**Obr. 3** Predikce problémových oblastí při syntéze 39 aminokyselinového peptidu ACTH. Aminokyseliny s hodnotou agregačního potenciálu vyšší než 1,2, mají značnou pravděpodobnost obtížného připojení.





**Obr. 4** Struktura linkeru SCAL

odštěpit spolu s chránícími skupinami v postranních řetězcích pomocí trifluoroctové kyseliny. Mnohem stabilnější linker je třeba pro syntézy prováděné Boc/Bzl strategií - přechodné chránění pomocí Boc skupiny štěpitelné kyselinou trifluoroctovou a chránění postranních řetězců pomocí skupin benzylového typu. V těchto případech se pro štěpení používají velmi silné kyseliny jako například kapalný fluorovodík, nebo kyselina trifluormethansulfonová.

Ideální by byl linker který by byl stabilní v průběhu syntézy (bez ohledu na použitou strategii), a který by bylo možno jednoduchou manipulací převést na snadno štěpitelnou formu pro odštěpení peptidu z nosiče. Jedním z takových linkerů je i český SCAL (obr. 4), jehož jedinou nevýhodou je jen jeho komerční nedostupnost. Ve formě bis-sulfoxidu (silné odčerpávání elektronů z aromatického systému) je zcela stabilní i v kapalném fluorovodíku a ve formě bis-sulfidu (aktivace aromatického systému donory elektronů) je snadno štěpitelný i kyselinou trifluoroctovou.

Jako kuriozitu si dovoluji zmínit syntézu na silikagelu. Tento nosič je možno modifikovat připojením aminoskupiny a na ní provést syntézu peptidu. V posledním stupni syntézy je tento nosič uveden do styku s kapalným fluorovodíkem a dojde k jeho desintegraci na vodu a  $\text{SiF}_4$ . Vzhledem k tomu že produkty rozkladu lze odpařit, zbytkem po reakci jsou jen volný peptid a produkty degradace chránících skupin.

Velmi důležitým bodem syntézy peptidů na pevné fázi je to, jak se chemik vyrovná s produkty degradace chránících skupin. Je jasné, že například Boc skupina při reakci s kyselinou vytvoří terc.butylový kation, který je velice reaktivní a velmi snadno napadne aromatické postranní řetězce tyrosinu a tryptofanu. Pokud těmto reakcím nezabráníme, pak se nám snadno může stát, že žádný peptid se správnou molekulovou váhou nezískáme. Produkty budou jen nežádoucí deriváty s přidanými terc.butylovými skupinami. Těmto vedlejším reakcím lze předejít přidáním „zametačů“ (scavengers) typu reaktivních aromatických rozpouštědel (anisol, fenol, thioanisol), thiolů, silanů a vody. Nejpoužívanější magickou směsí je tzv. „směs K“ - 82.5% TFA : 5% fenolu : 5%  $\text{H}_2\text{O}$  : 5% thioanisu : 2.5% ethandithiolu. Peptid je pak většinou izolován precipitací etherem.

## 7 KOMBINATORIÁLNÍ CHEMIE

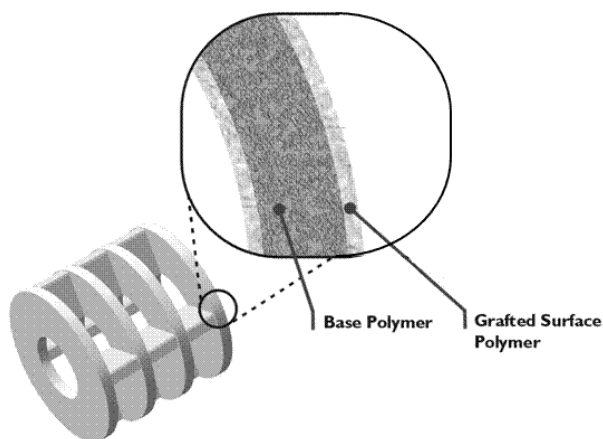
### 7.1 Úvod

Pojem kombinatoriální chemie se objevil v roce 1990 a v retrospektivě je s podivem, že to trvalo tak dlouho, aby byl přijat do arzenálu moderních chemiků. Dnes se zdá být tak samozřejmé, že sloučeniny mohou být syntetizovány paralelním způsobem mnohem rychleji a levněji než jedna po druhé. Nejprve přišla paralelní syntéza peptidů, propagovaná Geysenem<sup>7</sup> a Houghtenem<sup>8</sup>, jakožto pokračování syntézy na pevné fázi vynalezené Merrifieldem<sup>1</sup> a Letsingerem<sup>2</sup>. Peptidy byly jasnou volbou pro použití paralelní syntézy, neboť jejich chemie byla dobře vyvinutá a nepotřebovala dlouhé reakční časy, inertní atmosféru, nebo zvýšenou teplotu a tlak. Termín kombinatorické syntézy, neboli syntézy knihoven byl vytvořen po uveřejnění dvou vlivných příspěvků v roce 1991. Skutečnost, že nastal ten správný čas pro příchod nové techniky byl potvrzen tím že tyto dva dokumenty byly publikovány v tomtéž čísle časopisu Nature. Houghten<sup>9</sup> popsal generaci peptidových směsí, kterou lze po biologických testech dekonvolovat k identifikaci účinné složky směsi. Lam<sup>10</sup> představil generaci milionů částic (kuliček, beads) z nichž každá obsahuje pouze jeden typ peptidu. Tato směs částic může být testována k vazbě na molekuly (receptory, protilátky, enzymy) a kuličky s ligandy vykazující vazbu mohou být izolovány a struktury peptidů určeny sekvenováním. Obě tyto práce používají techniku zvanou „rozděl a zamíchej“ ("split a mix"), nebo "rozděl, z kondenzuj a přeskup" ("divide, couple and recombine"), který vlastně publikoval dříve Furka<sup>11</sup> aniž si

uvědomil dosah svého objevu. Průkopníci kombinatorické chemie byli později vyzváni k napsání svých vzpomínek na historii objevu jejich techniky, a jejich vzpomínky byly shromážděny<sup>12</sup> v úvodním článku nového časopisu věnovaného kombinatorické chemii, vhodně pojmenovaného "Journal of Combinatorial Chemistry". Kombinatorická syntéza byla vyvinuta pro chemii peptidů, ale nyní je již velmi obtížné najít třídu molekul, které by nebyly podrobeny do určité míry kombinatorické technologii. Tento text je věnován chemicky syntetizovaným peptidům a peptidovým knihovnám (biologické knihovny jsou zahrnuty v jiné kapitole), ale většina z diskutovaných principů je použitelná na všechny chemické entity.

## 7.2 Paralelní syntéza peptidů

Myšlenka, že peptidová syntéza může být zrychlena automatizací, nebo tím, že se syntetizuje více než jeden peptid najednou, existovala již od zavedení syntézy v pevné fázi, ale vyžadovalo to mentální skok přejít z pouhých několika paralelních reakcí na několik stovek reakcí. Počátky masivně paralelních syntetických přístupů lze nalézt ve třech pracích – prof. Frank v Německu publikoval syntézu na papírových discích<sup>13</sup>, Houghten v USA popsal techniku syntézy v tzv. čajových sáčkích<sup>14</sup>, a Geysen v Austrálii vymyslel syntézu na plastických tyčinkách<sup>7</sup>. Ronald Frank používal označené kusy celulózového papíru jako substrát pro syntézu DNA (později tuto techniku rozšířil na syntézu peptidů) a bylo prokázáno, že oddělování segmentů, které vyžadují připojení stejného stavebního bloku do stejné reakční nádoby zvýší podstatně produktivitu syntézy. Houghtenův přístup je založen na stejném konceptu, používá však polypropylenové sáčky obsahující klasický nosič. Sáčky byly použity pro syntézu v rozsahu od miligramů až po stovky gramů peptidu.



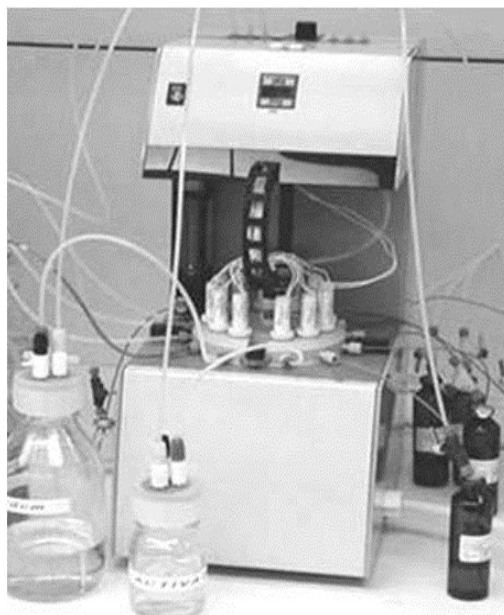
Obr. 5 Struktura SynPhase "lampy"

Geysen používá pro svou syntézu polypropylenové tyčinky (piny) pokryté na povrchy funkcionalizovaným polystyrenem vhodným pro syntézu peptidů. Tyto tyčinky jsou seřazeny do mřížky o rozměrech 96ti miskových mikrotitračních destiček. Mřížky jsou pak v průběhu syntézy namáčeny do destiček s předem připravenými činidly. Materiál, tvar a funkcionalizace pinů prošel několika generacemi. Optimalizovaná verze této technologie používá SynPhase "lucerny", nebo "koruny" - polymerní soudky ve tvaru korunky nebo miniaturizovaných čínských luceren (obr. 5). Tato geometrie umožňuje připevnění jednotlivých „luceren“ (jedna nebo více na pin) na držáky buď pro individuální syntetické kroky, nebo spojení všech luceren pro obecné stupně syntézy. Lucerny mohou být barevně odlišeny nebo označeny pomocí radiofrekvenčních vysílačů.

Pohodlná a obecná metoda peptidového štěpení z pevného nosiče je použití plynného amoniaku. Vzhledem k tomu, že amoniak nezpůsobí extrakci peptidu, je možné štěpení celé šarže pinů najednou ve směsi a provést třídění polymerů (pytlíků, svítilen, listů, kuliček) později v suchém stavu. Poté následuje uvolnění peptidů v individuálních kompartmentech přidáním rozpouštědla.

Řada laboratoří používá pro syntézu mikrotitrační destičky nebo specializované bloky mající jamky vybavené filtrem. Největším syntetizátorem tohoto typu je tzv. Big Bird (postavený na syntézu DNA) ve firmě Illumina, schopný syntézy 13824 látek v jedné šarži. Provedení syntézy v těchto blocích spočívá v





**Obr. 6** Jednoduchý automatický syntetizátor

prostém přidávání činidel, inkubaci uzavřených reaktorů a odsání roztoku. Zajímavou modifikací tohoto protokolu je technika používající standardní destičky bez filtru, kde odstranění kapalin je provedeno „holením“ povrchu kapaliny. Předpokladem úspěchu je sedimentace suspendovaného nosiče. K povrchu kapaliny se pak přibližuje kapilára skrz kterou je odsávána okolní atmosféra. Aniž by se kapilára dotkla povrchu, kapalina je strhávána do kapiláry a je možno odstranit většinu kapaliny bez narušení usazeného nosiče.

„Nakloněné odstředování“ je další technikou pro odstranění kapaliny z klasických microtiterplates se sedimentující pevnou fází. Syntetické desky jsou umístěny na obvodu odstředivky, a mírně nakloněny směrem ke středu otáčení. Rotace vytváří "kapsu" na daný objem, v závislosti na vzdálenosti od středu otáčení, rychlosti otáčení, a náklonu desky, ze které pevná fáze nemůže uniknout. Tato technika může zpracovávat mnoho desek současně a velmi rychle a stala se základem několika automatizovaných syntetizátorů. Jednoduchý syntetizátor založený na stejném principu postavený na přípravu 24 peptidů je uveden na obr. 6.

Thuramed (<http://thuramed.com>) představil elegantní řešení syntetizátoru peptidů. Jejich stroj, Tetras, je schopen 106 paralelních syntéz, kde každý reaktor může pracovat v jiném měřítku a pomocí různých syntetických protokolů. Reaktorové kazety jsou umístěny na obvodu rotoru, který umožňuje umístění každého reaktoru pod specializované trysky dodávající reagentie nebo promývací rozpouštědla. Tato konstrukce eliminuje nebezpečí kontaminace a zamezuje plýtvání činidel potřebných pro promývání. Nevýhodou tohoto stroje je pouze jeho cena.

Všechny techniky, které odstraňují kapaliny paralelně, ale dodávají roztoky sériově jsou jistě méně účinné než techniky kde přidávání a odebírání je časově vyvážené. Ideální proces syntézy provádí všechny kroky syntézy současně na jiné části nosiče (v jiném kompartmentu stroje), jak si je možno představit na příkladu syntézy využívající bavlněný pás jako pevný nosič. Vysokovýkonný syntezátor byl realizován pro paralelní syntézu 13824 sekvencí DNA. Tento syntetizátor má 36 384-jamkových destiček uspořádaných v kruhu, pohybující se po 10 vteřinových krocích podle stanic určených k provádění jednoho kroku syntézy (dodání stavebních bloků, aktivace, promývání, deprotektce), tak, že každá deska je v jiné fázi individuálního cyklu syntézy ve stejnou dobu. Po jednom kole průchodu kruhem je jeden stavební blok připojen k rostoucímu polymeru ve všech jamkách destičky a proces pokračuje dalším cyklem.

### **7.3 Syntézy využívající kompartmentalizace a třídění**

Dříve zmíněné technologie čajových sáčků nebo papírových disků jsou příklady syntetických metod využívajících třídění a reorganizaci syntetických kompartmentů, a to způsobem, který v každém kroku

syntézy umožňuje připojení stejného stavebního bloku (aminokyseliny) na mnohé kompartmenty v jedné reakční nádobě. To vyžaduje buď nějaký způsob označování jednotlivých kontejnerů, nebo udržení kompartmentů v pořadí, tak, že v každém okamžiku je totožnost každého kompartmentu známa. Ke značení je možno použít prosté psaní kódu na čajový sáček, přiložení radiofrekvenčního (RF) tagu, nebo použití jedno-nebo dvou-dimenzionálních čárových kódů. RF tagy nebo čárové kódy umožňují automatizaci procesu třídění. Moderní technologie mohou být navrženy pomocí čárových kódů miniaturizovaných na úroveň, kde každá částice pevné fáze má svůj vlastní "čárový kód" - bohužel, na této úrovni miniaturizace, náklady na jednotlivé částice a na potřebu specializovaných zařízení používaných pro jejich čtení mohou být prohibitivní pro široké použití. Dvourozměrným čárovým kódem označené "MiniKans, MicroKans nebo NanoKans" jsou komerčně dostupné od firmy Irori (později Discovery Partners International) a společně s třídíči schopnými rozředit desítky tisíc „Kanů“ v přiměřené lhůtě, umožňují syntézu multi miligramových množství desítek tisíc peptidů.

Krchňák zavedl použití plastických injekčních stříkaček vybavených fritou. Tato manuální metoda byla později automatizována a byl postaven robot používající stříkačky. Ruční manipulace s více stříkačkami může být také zjednodušena použitím tzv. Domino bloků. Slibný způsob rozčlenění pevné podpory je slinování jeho částic ve směsi s inertním polymerem do tzv. "ucpávek" (plugs). Tyto válečky byly komerčně dostupné od Polymer Laboratories, nyní část Agilent Technologies. Pohodlné kontejnery (částice) pro syntézu založenou na bázi třídění jsou SynPhase „lucerny“, zmiňované již dříve. Mohou být vybaveny radiofrekvenčními značkami, nebo mohou být uspořádány na kolíky nebo do řetězců v definovaném pořadí. Pokud jsou lucerny převedeny podle definovaného algoritmu z jednoho pořadí do druhého bez chyb, můžeme vytvářet sestavy ("náhrdelníky"), které poté mohou být použity pro připojení další aminokyseliny. Identita každé částice (lucerny) je založena na konci syntézy v poloze na konkrétním náhrdelníku (kolíku).

Pevné nosiče schopné snadné kompartmentalizace tedy i paralelní syntézy jsou funkcionalizované polymerní listy a disky, membrány, papír, celulóza, bavlna, nebo funkcionalizované akrylátové roubované polypropylenové fólie. Bavlna je nejlevnější pevnou fází, která, vzhledem k její polysacharidové struktuře, umožňuje efektivní syntézu složitých sekvencí, může být snadno rozčlenitelná, a může být použita v automatických vícenásobných, nebo kontinuálních syntetizátorech.

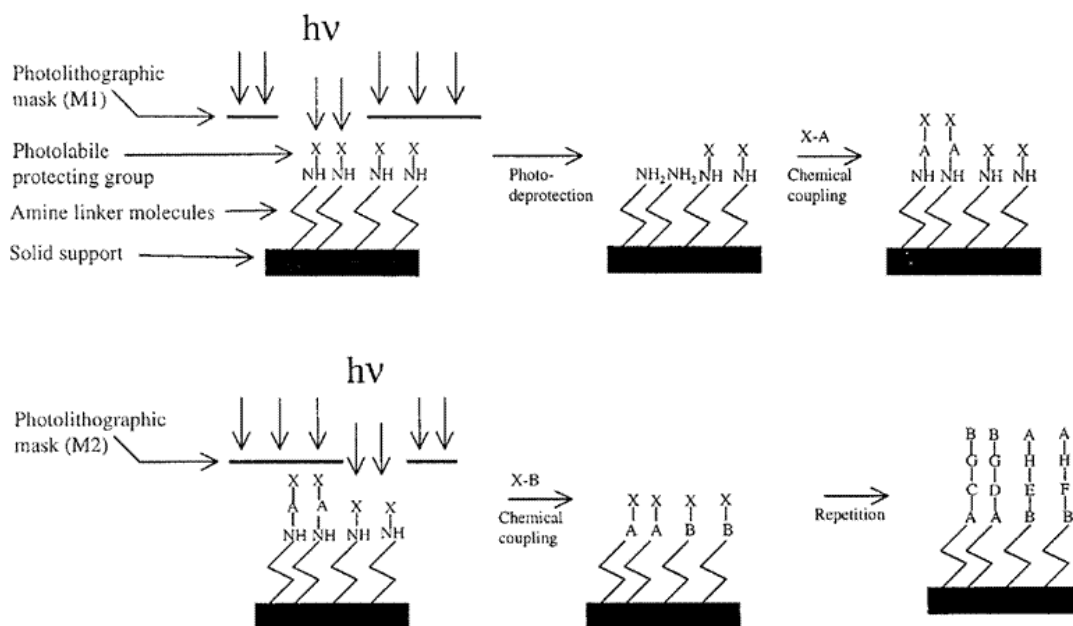
Na hranici mezi náhodnou syntézou knihoven a syntézou pomocí třídění je strategie používající dělitelný materiál (tkaninu, papír, polymerní fólie), kde materiál je rozdělen po každém syntetickém kroku. Tato technika neposkytne kódované jednotlivé kompartmenty, ale zaručuje, že všechny součásti knihovny byly syntetizovány a žádný z nich nebyl syntetizován ve více než jednom vyhotovení.

#### 7.4 Syntéza peptidových polí

Pro řadu aplikací dostupnost jednotlivých peptidů pro testování v roztoku není nutná. Například, hodnocení vazby na biologicky relevantní cíl může být provedeno s peptidem stále imobilizovaným na nosiči. Screening pak může být snadno proveden na "čipech", které obsahují stovky až stovky tisíc jednotlivých peptidů na jejich povrchu. První pole peptidů byla připravena na listech celulóзовého papíru Ronaldem Frankem. Na aktivovaný papír byl natečkován (důvod pro název této techniky SPOT syntézou) roztok Fmoc chráněných aktivovaných aminokyselin. Po připojení prvního stavebního bloku, zbývající volné funkční skupiny na povrchu byly acetylovány, a bylo tak vytvořeno pole dostupných syntetických míst. Skupina Fmoc je odstraněna tím, že listy papíru jsou ponořeny do piperidinového roztoku a po promytí jsou skvrny obsahující volnou amino skupinu odhaleny použitím roztoku bromfenolové modři. Syntéza pak pokračuje opakovanými cykly tečkování aktivovaných aminokyselin, inkubací a deprotekcí. Tento proces byl později automatizován a je úspěšně praktikován společností Jerini Peptide Technologies - JPT (<http://www.jpt.com/>).

Průkopnický přístup k syntéze peptidů na čipech byl publikován Fodorem<sup>15</sup> a stal se základem vzniku firmy Affymax (<http://www.affymax.com/>). Princip této technologie, na základě fotolitografie, je znázorněn na obr. 7. Povrch čipu chráněný fotolyticky štěpitelnou chránicí skupinou je ochráněn v maskou definovaných oblastech světelným zářením. Čip je pak zaplaven roztokem aktivované aminokyseliny, která zreaguje s ochráněnými oblastmi povrchu. Po dokončení reakce je aktivovaná aminokyselina odstraněna promytím, další sada regionů je ochráněna světlem, a další aminokyselina je připojena k ochráněné oblasti. Tento proces se opakuje, dokud všechny aminokyseliny potřebné pro první krok syntézy nejsou použity. Aminokyseliny pro druhý cyklus peptidové syntézy jsou připojeny stejným

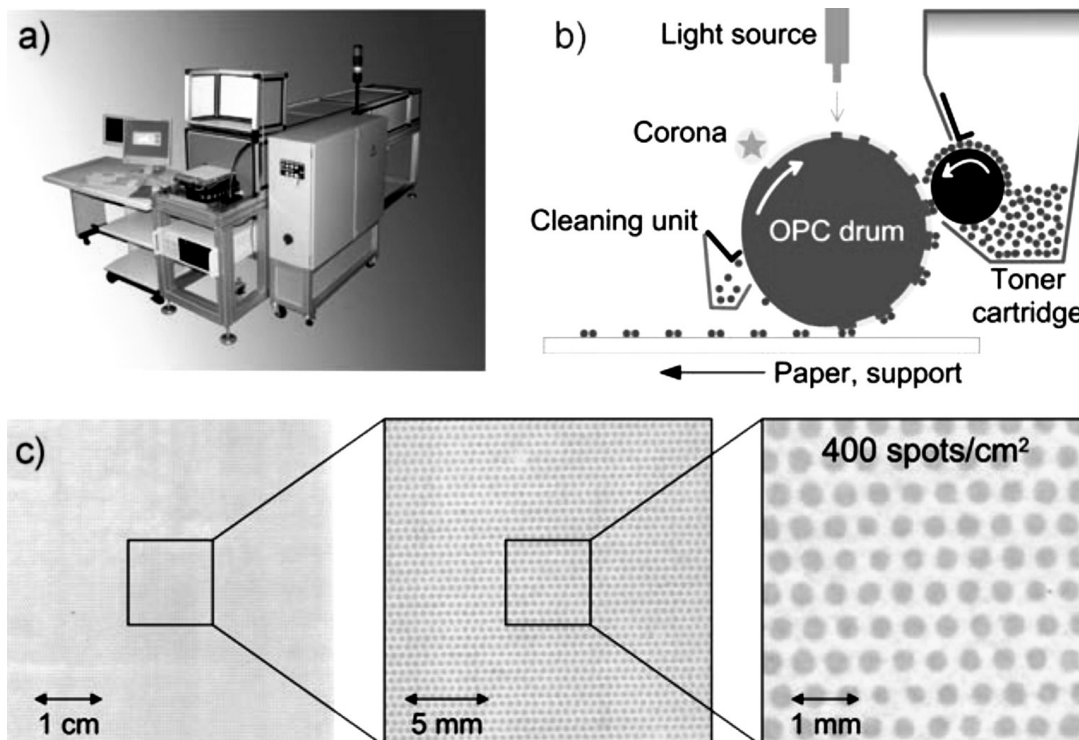
způsobem a proces se opakuje, dokud syntéza všech peptidů není dokončena. Zřejmou nevýhodou



**Obr. 7** Schéma fotolitografické peptidové syntézy. Ozáření povrchu pokrytého rostoucími peptidy chráněnými na amino konci fotoštěpitelnou chránící skupinou přes masku vytváří vzorovaný povrch s odchráněnými místy, na kterých může být připojena další aminokyselina. Nová maska pak odchrání další sadu lokalit.

tohoto postupu je množství opakování potřebných pro každý krok syntézy a nutnost použít aktivovaný roztok na celé ploše, i když jen zlomek z toho se skutečně podílí na reakci prodloužení peptidového řetězce. Každý krok procesu také vyžaduje speciální masku. Problém potřeby mnoha masek byl později odstraněn použitím mikrozrcadlových čipů pro selektivní ozařování syntetického povrchu čipu. Tato technologie vedla k vytvoření další firmy, NimbleGen ([www.nimblegen.com](http://www.nimblegen.com)), která se však zcela věnuje syntéze DNA polí.

Zajímavá alternativa k přístupu popsanému výše, je založena na fotolytické generaci kyseliny v určitém místě v čipu. Tato in situ generovaná kyselina pak odchrání Boc chráněné peptidové fragmenty pro připojení další aminokyseliny. Při této technologii není třeba používat aminokyseliny chráněné fotolyticky štěpitelnou chránící skupinou, ale vyhoví i standardní Boc amino kyseliny. K odštěpení Boc skupiny je zapotřebí generace poměrně silné kyseliny a rovněž je důležité zajistit, aby se generovaná kyselina nešířila do sousedního místa a neodchránila nežádoucí lokaci. Toho bylo dosaženo použitím polymerní vrstvy, která zpomalila difúzní rychlost kyseliny. Syntetický čip obsahuje buď 4000 nebo 8000 komor na ploše o něco málo více než jeden centimetr čtvereční. Každá komora slouží jako nezávislá reakční nádobka pro syntézu jednoho peptidu. Podobný koncept syntézy generuje stěpící kyselinu použitím aplikace elektrického proudu na pole mikroelektrod. Kyselina byla vytvořena za použití 3 V na matici platínových elektrod v roztoku difenylhydrazinu. Difúze kyseliny byla eliminována tím, že difenylhydrazin je slabá báze, které neutralizuje kyselinu všude kromě bezprostřední blízkosti aktivních elektrod. I když tato technologie byla vyvinuta pro peptidové syntézy, stala se základem pro syntézu DNA čipů ve společnosti Combimatrix.



**Obr. 8** Syntetizátor peptidů na bázi laserové tiskárny. A) Peptidová laserová tiskárna s 20 různými tiskovými jednotkami. Držák na skleněný substrát je vidět na přední straně tiskárny. b) Zdroj světla (LED) se rozsvítí a tím neutralizuje vybrané oblasti OPC válce, který je předtím homogenně nabit pomocí koróny. Třením nabitě částice toneru jsou převedeny do těchto neutralizovaných oblastí a odtud pomocí silného elektrického pole na pevný nosič. c) Aminokyselinový „toner“ byl vytištěn peptidovou laserovou tiskárnou na sklo derivatizované volnými aminoskupinami. Aktivní pentafluorophenyl estery vložené do částic byly uvolněny teplem, zbytkový materiál odplaven DMF, a zbývající volné amino skupiny byly blokovány 10% ním anhydridem kyseliny octové v DMF. Nakonec byly Fmoc chránící skupiny odstraněny 20% ním piperidinem v DMF, a nově zavedené volné aminoskupiny byly barveny 0,1% bromfenolové modří v methanolu.

Všechny tyto technologie vyžadují opakování každé kondenzace  $n$ -krát, kde  $n$  je počet aminokyselin potřebných pro kondenzaci v tomto konkrétním kroku, což má za následek velmi pomalý proces. Revoluční přístup k přípravě peptidových polí je vyvíjen firmou PepPerPrint v německém Heidelbergu<sup>16</sup>. Jejich skleněné čipy modifikované multifunkčním polymerem na bázi polyethylenglykolu umožňují univerzální modifikaci aminokyselinou o hustotě skupiny na povrchu až do 40 nmol/cm<sup>2</sup>.

Základní stavební bloky jsou nanášeny na skleněný substrát ve formě speciálně formulovaného toneru elektrostatickou depozicí analogicky tisku pomocí "Xeroxu". Tato "tiskárna" má dvacet nebo více inkoustových kazet. Toner je vytvořen pomocí zapouzdření Fmoc chráněného pentafluorofenylesteru příslušné chráněné aminokyseliny v difenylformamidu. Difenylformamid je pevná látka při teplotě místnosti a částice aktivovaných aminokyselin velikosti mikronů lze skladovat několik měsíců bez ztráty aktivity. Po depozici aminokyselin na potřebných místech jsou částice "prachu" roztaveny při zvýšené teplotě a dojde ke kondenzaci pentafluorofenylových esterů. Po dokončení kondenzace je skleněný substrát převeden do prostoru ve kterém se provádí promývání a deprotektce. Při použití standardní Fmoc chemie byla připravena peptidová pole o hustotě až 40 000 míst na čtvereční centimetr. Schéma syntetizátoru je znázorněno na obrázku 8.

Tato metoda řeší problém technologií využívajících foto- nebo elektro- deprotektci (litografii) vyžadujících až 20 různých aminokyselin a tudíž 20 opakovaných kondenzací na jeden syntetický stupeň. Syntéza vycházející z elektricky nabitých pevných částic aminokyselin je mnohem efektivnější. Laserová tiskárna

přivádí různé nabitě částice postupně na pevný nosič, kde je celá vrstva pevných aminokyselin částic roztavena najednou. To umožňuje připojení všech 20 různých aminokyselin na čip v jedné reakci.

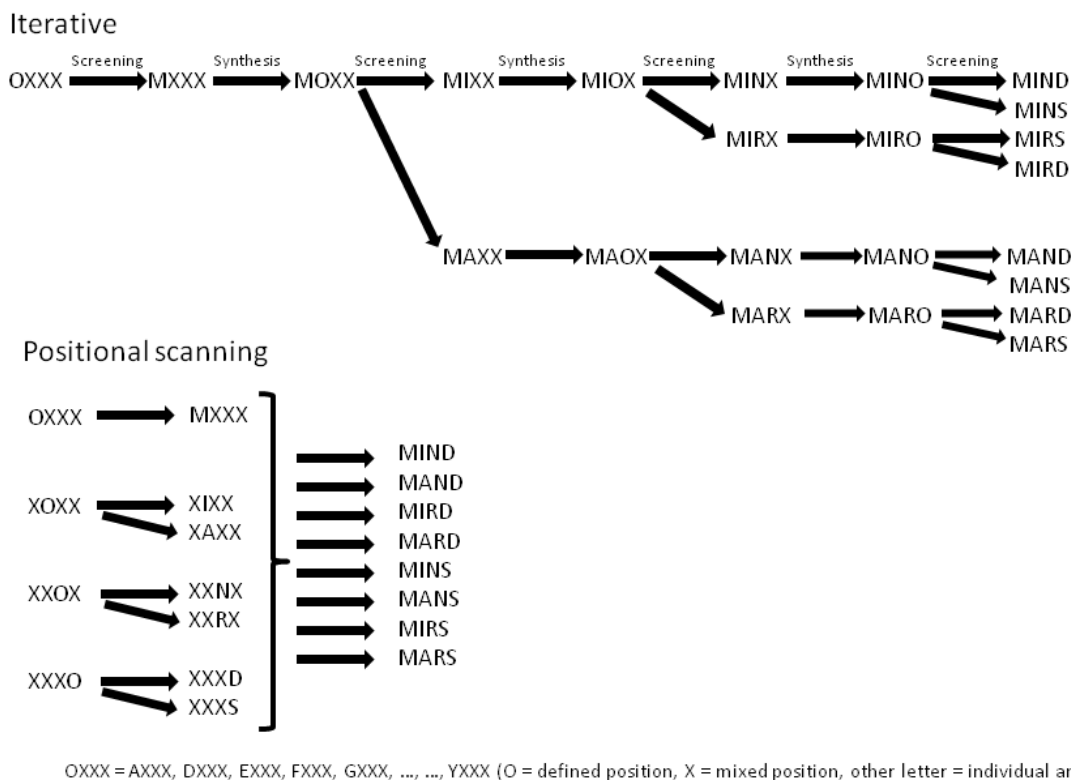
### 7.5 Syntéza směsí peptidů

Furka si uvědomil, že opakujícím se procesem kondenzace, míchání a rekombinace pevné fáze se dá vytvořit téměř ekvimolární směs peptidů<sup>11</sup>. Ke stejnému závěru došel nezávisle i Houghten<sup>9</sup>, a jeho skupina ukázala, že provedením posledních dvou kondenzací bez míchání a rekombinace je možno vytvořit směsi lišící se pouze dvěma aminokyselinami. To pak umožňuje testování těchto směsí v jakémkoli biologickém testu a zjišťování, zda definované pozice hrají významnou roli v biologické aktivitě těchto peptidů. V dalším kroku se připraví druhá generace peptidových směsí, tentokrát s definováním další pozice sekvence. Opakování tohoto procesu definuje, pomocí jednodušších a jednodušších směsí neaktivnější sekvence z originálních směsí. Tato technika byla použita pro identifikaci protilátek a mapování epitopů, objev substrátů a inhibitorů, receptorových ligandů, nebo identifikaci látek zodpovědných za fyziologické účinky *in vivo* testech.

Namísto techniky „rozděl a zamíchej“ pro generování ekvimolárních směsí peptidů ve "smíšených pozicích", je možno použít tzv. equikinetické směsi aminokyselin. V této metodě se nejprve stanoví relativní reaktivity stavebních bloků, a pak se aminokyseliny smíchají v takovém poměru, že rychlost všech možných kondenzačních reakcí je stejná (normalizovaná). Příklad poměru aminokyselin používaných v kondenzaci používající diisopropylkarbodiimid a pentafluorofenyl estery lze nalézt v tabulce 3. Tento poměr musí být stanoven empiricky nejen pro různé aminokyseliny a různá kondenzační činidla, ale i pro různé chránící skupiny postranních řetězců. A vzhledem k tomu že nelze brát v úvahu rozdílné chování volné aminoskupiny rostoucího peptidu v závislosti na sekvenci, téměř nikdy není dosaženo kompletní rovnoměrnosti rozložení připojených aminokyselin. Alternativní postup jak připojit všechny aminokyseliny v ekvimolárním poměru je založen na kondenzaci mírně sub-ekvivalentního množství směsi, která obsahuje stejné množství všech aminokyselin, následovanou druhou kondenzací s přebytkem stejné směsi. První kondenzační krok zaručuje, že žádná aminokyselina není začleněna přednostně, a druhý krok zajišťuje úplnost reakce.

**Tab. 3** Složení aminokyselinové směsi pro kondenzaci v ekvimolárním množství (Izokinetický poměr). Poměr závisí silně na chránících skupinách a postupu aktivace (levý sloupec DIC aktivace, pravý sloupec kondenzace esterů).

Aminokyselina	Molární poměr	Aminokyselina	Molární poměr
Boc-Ala	1.18	Fmoc-Ala-OPfp	1.20
Boc-Arg(Tos)	2.26		
Boc-Asn	1.86	Fmoc-Asn-OPfp	5.05
Boc-Asp(OBzl)	1.22	Fmoc-Asp(OBut)-OPfp	1.00
Boc-Gln	1.85	Fmoc-Gln(Trt)-OPfp	1.66
Boc-Glu(OBzl)	1.26	Fmoc-Glu(OBut)-OPfp	1.35
Boc-Gly	1.00	Fmoc-Gly-OPfp	1.11
Boc-His(Dnp)	1.24	Fmoc-His(Trt)-OPfp	2.49
Boc-Ile	6.02	Fmoc-Ile-OPfp	13.01
Boc-Lys(2-Cl-Z)	2.16	Fmoc-Lys(Boc)-OPfp	1.84
Boc-Leu	1.72	Fmoc-Leu-OPfp	1.39
Boc-Met(O)	0.80		
Boc-Phe	0.88	Fmoc-Phe-OPfp	1.15
Boc-Pro	1.50	Fmoc-Pro-OPfp	2.00
Boc-Ser(Bzl)	0.97		
Boc-Thr(Bzl)	1.66		
Boc-Trp(For)	1.32	Fmoc-Trp(Boc)-OPfp	1.74
Boc-Tyr(2-Br-Z)	1.44	Fmoc-Tyr(But)-OPfp	1.22
Boc-Val	3.91	Fmoc-Val-OPfp	9.62



**Obr. 9** Srovnání iterativní a pozičně skenovací techniky

„Pozičně skenovací“ knihovny byly později vyvinuty v Houghtenově laboratoři jakožto alternativa iterativního přístupu vyžadujícího množství syntetických operací. V této verzi skrínungu směsí jsou nejprve připraveny knihovny, ve kterých jsou definovány všechny pozice pomocí všech aminokyselin. Tyto směsi jsou otestovány a ty které vykázaly nejvyšší aktivitu v dané pozici, jsou základem přípravy individuálních peptidů. Ilustrativní (imaginární) příklad nalezení aktivní sekvence touto technikou je uveden na obr. 9. Osmdesát směsí 8000 tetrapeptidů (složených ze všech 20 přírodních aminokyselin) bylo připraveno s použitím všech 20 aminokyselin definovaných v každé poloze peptidového řetězce. V tomto případě je v těchto osmdesáti směsích zastoupeno 160 000 jednotlivých peptidů. Nejaktivnější směs s definovanou polohou 1 je ta která obsahuje methionin jako definovanou aminokyselinu. Nejvíce aktivní směsi s definovanou pozicí 2 obsahovaly isoleucin a alanin, pozice 3 prokázala výrazně vyšší vazebnou aktivitu v případě asparaginu a argininu, a pozice 4 ukázala silnou preferenci pro kyselinu asparagovou a serin. Pro otestování všech možných sekvencí s danými aminokyselinami v daných pozicích bylo nutné resynthesizovat pouze osm peptidů představujících kombinaci všech vybraných možností. Pokud by byl stejný postup proveden iterativní technikou, pak by bylo nutné syntetizovat nové knihovny po každém testovacím kroku (sedm knihoven - 140 směsí celkem) a tyto knihovny by byly zřejmě bezcenné pro jiná testování. „Pozičně skenovací“ knihovny jsou obecné povahy a mohou být použity proti četným cílům. Nevýhodou iterativního skenování je, že aminokyselinové zbytky definované na začátku testu nemusí být optimální a všechny následně syntetizované knihovny upřednostňují tyto dříve definované části sekvence. „Pozičně skenovací“ knihovny byly úspěšně použity k definování struktury peptidu z knihoven reprezentujících až  $10^{12}$  peptidů, kde by screening používající jiné techniky nebyl možný.

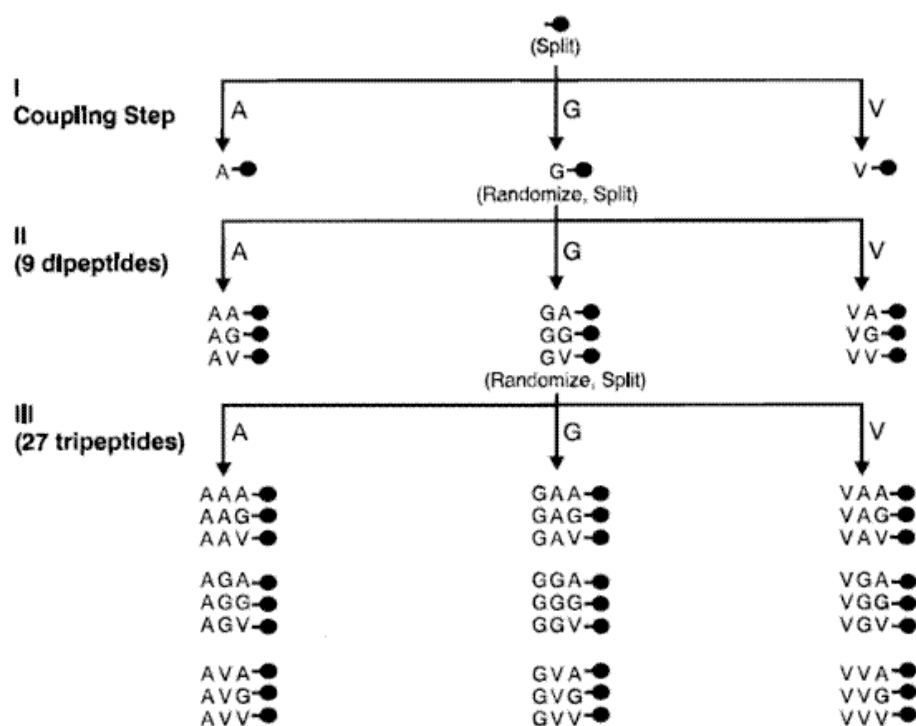
V tzv. "ortogonálních" knihovnách používaných Deprezem a spol.<sup>17</sup> každý člen knihovny je přítomen ve dvou (nebo třech) různých směsích, a jakékoli dvě (nebo tři) knihovny (směsi) mají jeden, a pouze jeden, společný peptid. V důsledku toho by testování těchto knihoven mělo ukázat aktivitu směsí, které obsahují účinnou látku v každé subknihovně. Pokud pouze jedna látka v knihovně je aktivní, identifikace této sloučeniny podle "duševní dekonvoluce" je jednoduchá. Nicméně, pokud je aktivita pozorována v několika dílčích knihovnách, může identifikace účinných složek být příliš komplikovaná.

Koncept vytváření ortogonální směsi může být vysvětlen na míchání sloučenin syntetizovaných ve sto 96jamkových microtitračních destiček. Pokud alikvoty jsou vzaty ze všech jamek na destičce, můžeme vytvořit 100 "destičkových směsí" smísením všech 96 látek v destičce. Pak můžeme vzít alikvoty ze všech jamek A1 všech desek a vytvořit 96 "jamkových směsí" obsahujících 100 sloučenin. Jestliže se biologická aktivita nachází pouze v jedné destičkové a jedné jamkové směsi, pak účinná látka může být nalezena na základě analýzy 196 směsí namísto testování 9600 jednotlivých peptidů. K potvrzení nálezu mohou být také vytvořeny "sloupcové, řádkové, úhlopříčkové, ..." směsi. "Ortogonální" knihovny podle Depreze jsou samozřejmě syntetizovány jako směsi a nejsou vytvořeny smícháním jednotlivých sloučenin.

Jiné druhy rozpustných knihoven peptidů byly připraveny kondenzací peptidů s DNA nebo PNA tagy. Po biotransformaci peptidové knihovny v testovaném roztoku (štěpení proteázou, fosforylaci pomocí kinázy), byl pak modifikovaný (rozštěpený nebo fosforylovaný) substrát zachycen na komplementárním poli DNA a struktura peptidového substrátu byla definována.

## 7.6 Syntéza peptidů na směsi částic

Furka<sup>11</sup> sice syntetizoval knihovny už v roce 1988, ale neuvědomil si skutečnost, že každá jednotlivá částice vzniklá strategií „rozděl a zamíchej“ (split and mix), obsahuje pouze jednu peptidovou sekvenci. Pokud zlomek pryskyřice v každém kroku je vystaven pouze jedné aminokyselině, pak jen jedna peptidová sekvence je budována na každé částici (obr. 10). Po smíchání všech částic dohromady nelze již totožnost částic určit, ale po dalším rozdělení do jednotlivých reaktorů, opět, pouze jedna aminokyselina je připojena k rostoucímu řetězci. Tato skutečnost neunikla připravené mysli Kita Lama<sup>10</sup>, který přišel s nápadem na syntézu používající stejnou strategii pro vytvoření směsi částic, které obsahují



**Obr. 10** Princip kombinatorické syntézy „rozděl a zamíchej“. Šarže pevných částic (např. 1000000 polystyrenových mikrokuliček o průměru 100 mikrometrů) je rozdělena na tři alikvoty a každý alikvot je kondenzován s jinou aminokyselinou. Kuličky jsou smíchány dohromady a celý proces se dvakrát opakuje. Na konci této syntézy tripeptidů, je vytvořeno 27 populací tvořených přibližně 37000 kuliček z nichž každá má jedinečnou sekvenci. Je zřejmé, že pokud bychom se snažili syntetizovat hexapeptid s využitím všech 20 aminokyselin v každé kondenzaci, připravili bychom s použitím jednoho milionu kuliček pouze 1,5% ze všech možných struktur (hexapeptid obsahuje 64 milionů možných sekvencí).

jen jednu sekvenci na každé částici (jedna částice (bead) - jedna sloučenina (compound) (OBOC technologie). Připravená knihovna, ve které jsou peptidy stále připojené na částice pevného nosiče, pak může být podrobena biologickému či chemickému testu, a po izolaci částic vykazujících vazbu s testovanou substancí (pozorováním barvy, fluorescence, radioaktivity, nebo detailním pozorováním buněk vázaných na povrch částice), struktura aktivního peptidu může být stanovena Edmanovým odbouráváním, hmotnostní spektrometrií, nebo čtením kódu postaveného v průběhu konstrukce knihovny. I když byl postaven syntetizátor pro přípravu knihoven tohoto typu, skutečnost, že požadované knihovny se výrazně liší v řadě randomizovaných pozic a použitých stavebních bloků, jsou tyto knihovny obvykle připravovány manuální syntézou.

## 7.7 Využití knihoven na částicích

Aplikace těchto OBOC knihoven byla předmětem řady přehledných prací a výsledky získané jejich použitím zde nebudou uvedeny. Zaměříme se spíše na různé techniky použitelné pro jejich výrobu a testování.

V posledním čtvrtstoletí od vynálezu OBOC technologie, bylo velké úsilí věnováno odstranění jeho nedostatků a zvýšení efektivity a spolehlivosti. Největším problémem je to, že screening se provádí na povrchu polymerních kuliček a ne v roztoku (tento problém bude diskutován dále), a že generovaný signál v mnoha případech, nekoreloval s afinitou ligandu na povrchu kuliček. Za prvé, je nutno vyloučit nespecifické vazby vzniklé interakcí s komponentami detekčního systému, například pomocí dvoubarevného systému testování, nebo naskenováním imobilizovaných kuliček, které se inkubují postupně dvěma různými označenými proteiny nebo proteinovými směsami. Odečtením obou optických záznamů je možné definovat kuličky vázané jednoznačně pouze na jednu bílkovinu ve směsi, a ne na bílkoviny, které jsou společné oběma směsím nebo komponentám testu samotného.

Ve skutečnosti může ligand na povrchu vykazovat různé vazebné vlastnosti. Pryskyřice obvykle používané pro syntézu knihoven mají vysokou substituci (např. 90-um pryskyřice TentaGel se substitucí 0,3 mmol/g má hustotu ligandů 100 mM). Tato vysoká substituce je však vhodná pouze pro následnou identifikaci hitu a ne pro aktuální vazby biomolekul. Vysoká hustota ligandu může přispět k nežádoucím vazbám cílové molekuly na ligandy s nízkou afinitou (z důvodu vysoké lokální koncentrace ligandů) a může také vést k nezamýšleným mnohočetným interakcím s cílovou molekulou. V důsledku této známé skutečnosti je běžná resyntéza a testování jednotlivých hitů v roztoku. Vzhledem k tomu, screening velké knihovny může produkovat stovky hitů, není neobvyklé (vzhledem k nákladům na sekvenování a resyntézu) definovat strukturu a resyntetizovat jen zlomek "hitů", a riskovat tak nenalezení nejlepšího ligandu.

Tuto situaci si lze nejlépe ilustrovat na poněkud zvětšeném modelu. Pokud bychom zvětšili syntetickou kuličku na rozměr zeměkoule, pak potenciální ligand velikosti desetipeptidu by byl velikosti Eiffelovy věže a kdyby se skácel na povrch, pak by pravděpodobně narazil do další stejné věže. Příchozí protein může mít dosedací plochu velikosti Paříže. Pak si lze snadno představit že protein najde ligand bez velkého hledání a jeho vazba na povrch je ovlivněna těsným sousedstvím dalších stejných ligandů které způsobí zesílení i velmi slabých interakcí pomocí efektu vysoké lokální koncentrace.

Alternativou ke studování vazby na jednotlivé kuličky je technika „otisků kuliček“. Knihovna kuliček se inkubuje s proteinem nebo proteinovou směsí a kuličky jsou pak imobilizovány na porézním povrchu. Proteiny z kuliček jsou pak eluovány na povrch a zachyceny na membráně překrývající kuličky. Lokalizace cílového proteinu je pak definována konkrétní imunoprecipitací a kulička odpovědná za jeho vazbu je použita pro zjištění struktury ligandu. Tato metoda umožňuje vyhodnocení vazeb množství bílkovin obsažených v původní inkubační směsi, pro které je k dispozici selektivní značená protilátka.

Meldal a spol.<sup>18</sup> připravili knihovnu interně zhášejících fluorescenčních substrátů na polymeru, který umožňuje pronikání proteolytických enzymů do jeho struktury (PEGA). Vznik fluorescence na kuličkách po inkubaci pak prokazuje že daná kulička obsahuje dobrý substrát pro konkrétní enzym. Tato technika byla upravena do "jedna kulička - dvě sloučeniny" testu, ve kterém kulička polymeru vedle kombinatorické knihovny obsahuje rovněž „sloučeninu reportéra“, která může působit jako maják který sleduje aktivitu člena knihovny. Při testování potenciálních inhibitorů enzymatické aktivity, kuličky obsahují „interně uhašený“ substrát a knihovnu potenciálně inhibičních peptidů. Po inkubaci knihovny s enzymem, kuličky postrádající fluorescenční signál pravděpodobně obsahují inhibitor a mohou být vybrány a sekvenovány.

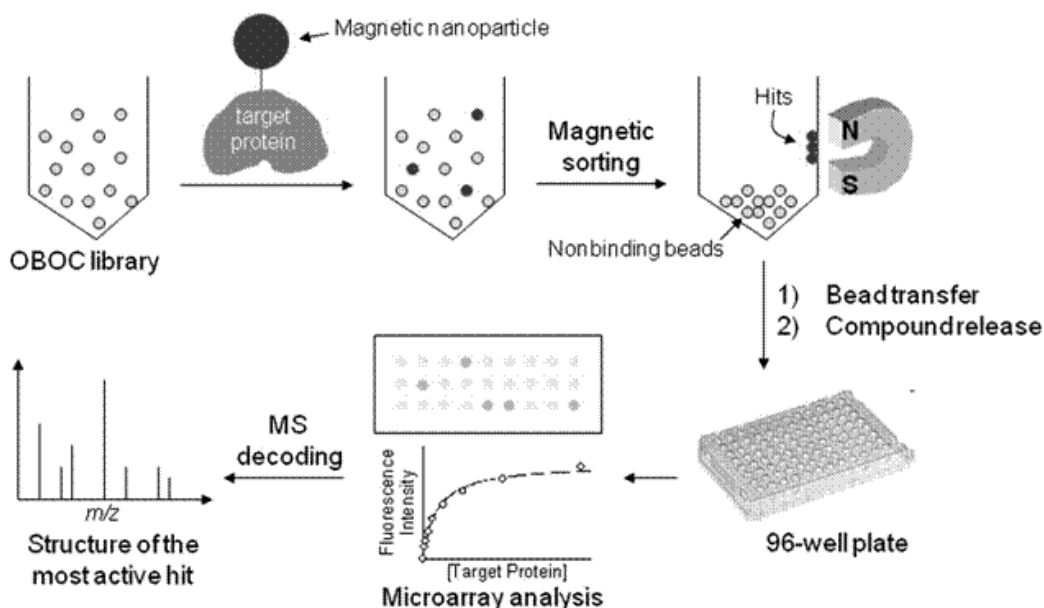


Tento test může být obecně aplikován ve všech oblastech kombinatoriální chemie, včetně léčiv, katalyzátorů a návrhů nových materiálů.

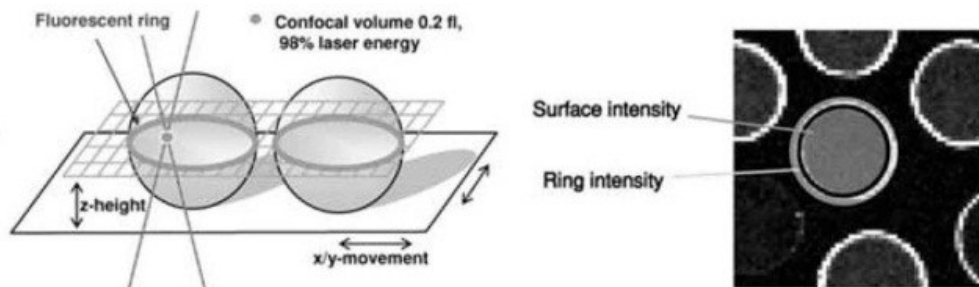
Lam spekoval, že snížením substituce na povrchu kuličky umožní zvýšit přísnost (stringency) testu. Snížení substituce dosáhl oddělením vnitřního objemu kuliček od povrchové vrstvy. Vnitřní objem obsahuje dostatek materiálu pro sekvenování a může být ve skutečnosti odlišný od povrchu. To umožňuje kódování nesequenovatelných částí peptidu nebo nepeptidové struktury na povrchu kuliček. Segregace vnitřku a povrchu rovněž umožňuje zvýšení efektivity Edmanovy degradace tím, že známá část (ta část kterou není třeba sekvenovat) peptidové struktury (pokud existuje) není obsažena v interiéru kuličky. Experimentálně bylo zjištěno, že ve skutečnosti 99,9% ligandů musí být odstraněno z povrchu, aby se zabránilo bidentátní vazbě proteinu. Tudíž pokles povrchové substituce je nejlepším způsobem, jak snížit nespecifickou vazbu k makromolekulárnímu cíli.

První pokusy oddělit povrch a vnitřní objem kuliček používaly enzymy ke štěpení substrát-linkerové konstrukce pouze na povrchu kuličky. Vzhledem k tomu, že vnitřek kuličky je enzymu nepřístupný, je tímto způsobem možno "oholit kuličku". "Oholená" kulička pak může být modifikována jinou chránící skupinou a je tak možno oddělit dva prostory - povrch a vnitřek. Tato technika byla později nahrazena jednoduchou acylací amino skupin kuliček v prostředí dvofázového rozpouštědla. Vodou nabobtnalé kuličky Tentagelu jsou na povrchu vystaveny organickému rozpouštědlu, které obsahuje derivatizační činidlo (např. Fmoc-OSu nebo Alloc-OSu), zatímco interiéru kuličky zůstane ve vodě a činidlo k němu nepronikne. Tímto způsobem je pak modifikována pouze vnější vrstva kuličky. Změnou poměru diethyletheru a dichlormethanu a úpravou množství Fmoc-OSu je možno řídit tloušťku vnější vrstvy.

Astle a spol.<sup>19</sup> zjednodušil proces izolace hitu prostřednictvím magnetického třídění kuliček. Cílový protein byl označen magnetickými nanočásticemi. Vazba cílového proteinu na kuličky tyto částice



**Obr. 11** Schéma integrovaného magnetického screeningu a testování interakce pomocí polí na destičce (microarrays). TentaGelové kuličky (75  $\mu\text{m}$ ) z OBOC knihovny jsou inkubovány s cílovým proteinem, a po promytí se inkubují s protilátkou proti cílovému proteinu modifikovanou kovalentně připojenými částicemi obsahujícími oxid železitý (Dynabeads). Kuličky, které se vážou na cílovou bílkovinu jsou nyní magneticky označeny a shromážděny na straně zkumavky pomocí magnetu, zatímco negativní kuličky jsou odstraněny. Každá z vybraných magnetických částic je oddělena do jamky mikrotitrační destičky, a sloučeniny jsou odštěpeny z kuliček. Tyto sloučeniny se pak nanášou na podložní sklíčko a vytvoří se pole které se inkubuje s různými koncentracemi cílového proteinu pro určení afinity každé sloučeniny. Struktura vybraných hitů se pak odvodí pomocí tandemové hmotové spektrometrie. Použití této technologie umožňuje přistoupit k resyntéze hitů teprve když jsou definovány nejsilnější ligandy.

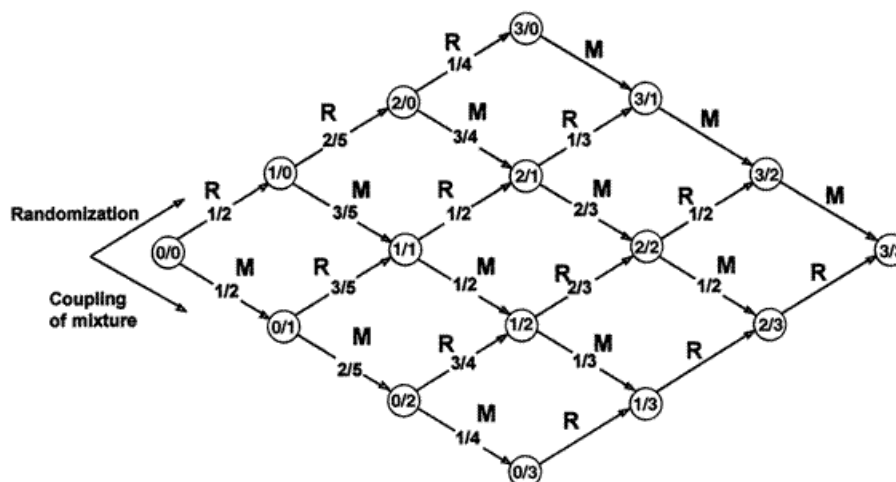


**Obr. 12** Princip automatizovaného screeningu OBOC knihoven pomocí konfokální mikroskopie. Kuličky v monovrstvě jsou přesouvány v rovině X / Y, kde konfokální rovina je ustavena asi v polovině průměru kuliček. Pozorování zvýšené "prstencové" intenzity představuje vazbu na makromolekulární fluorescenčně značený cíl. Fluorescence uprostřed kuličky představuje autofluorescenci materiálu kuličky nebo syntetizované sloučeniny a nemá žádný vliv na biologickou interakci s cílovou makromolekulou.

zmagnetizovala a pozitivní (obsahující ligand s affinitou k proteinu) kuličky pak mohly být odděleny od zbytku knihovny umístěním magnetu na stěně zkumavky (obr.11). Pozitivní (magnetické) kuličky byly rozděleny do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky a tam byly vystaveny působení CNBr (methionin, který byl použit jako součást linkeru, může být tímto činidlem velmi selektivně rozštěpen). Polovina získaného roztoku se pak nanese na čip, který je následně inkubován s různou koncentrací fluorescenčně značeného cílového proteinu pro potvrzení jeho vazby k danému ligandu (jehož identitu zatím neznáme). Vyhodnocení intenzity fluorescence v závislosti na koncentraci bílkoviny pak poskytne disociační konstantu interakce. Totožnost neaktivnějších ligandů je následně definována MALDI hmotnostní spektrometrií.

Původní Lamova práce učí izolaci "pozitivních" kuliček pod mikroskopem. Tato technika je samozřejmě překážkou v aplikacích využívajících velké knihovny, a rovněž je negativně ovlivněna subjektivním výkladem barevných intenzit kuliček. Vědci firmy Affymetrix úspěšně aplikovali automatické fluorescenčně aktivované sortery buněk pro výběr aktivních kuliček z peptidové knihovny kódované DNA značkami. Později se speciální sorter částic pro OBOC technologii COPAS (Union Biometrica, MA) stal komerčně dostupným a byl úspěšně použit například pro screening fluorescenční vnitřně zhasené knihovny. Úspěch této techniky lze přičíst na vrub použití vysoce porézního polymerního nosiče s minimální autofluorescencí. Alternativně mohou být knihovny nejprve presortovány a kuličky s vysokou autofluorescencí mohou být odstraněny, nebo je možno použít pro fluorescenční značení jiné činidlo (například kvantové tečky) s odlišnou vlnovou délkou fluorescenční emise.

Spolupráce vědců z University of Edinburgh, Novartis a Evotec (nyní Perkin Elmer) vedlo k vývoji automatizovaného systému pro identifikaci a výběr fluorescenčně označených pozitivních kuliček na bázi konfokální mikroskopie (obr. 12). Detekce pozitivních kuliček založená na fluorescenci je komplikována autofluorescencí materiálu kuliček nebo syntetizovaných sloučenin, které mohou být vyšší než fluorescence vázané cílové makromolekuly. Pro rozlišení mezi autofluorescencí a fluorescencí molekul vázaných na povrch kuličky je však možné využít skutečnosti, že makromolekulární fluorescenčně označený cíl neproniká do interiéru polymerní kuličky. Konfokální mikroskopie se zaměřuje pouze na několik mikrometrů tlustý "plátek" z kuliček a vazba fluoroforem označeného cíle je jasně viditelná jako kruh kolem obvodu kuličky - na rozdíl od autofluorescence, která je distribuována po celém materiálu kuličky. Knihovna po inkubaci s fluorescenčně značeným cílem je rozprostřena jako monovrstva kuliček do jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky se skleněným dnem. Každá jamka obsahuje přibližně 2000 kuliček. Deska se umístí do polohy xy nad obrácený objektiv konfokálního mikroskopu schopného zaostření pomocí autofokusace mírně pod střed polymerní kuličky. Jednotlivé jamky jsou pak snímány po zhruba 4 minutách (96-jamková destička s 200,000 kuličkami lze oskenovat za 7 hodin). Výsledky jsou pak použity pro vybudování tabulky lokalit a fluorescenčních intenzit. Pozitivní kuličky jsou seřazeny podle jejich intenzity a nejslibnější kuličky jsou pak přeneseny pomocí artikulované kapiláry do individuálních kontejnerů pro zjištění struktury připojeného ligandu. Proces sběru je pomalejší a je schopen přenést zhruba jednu kuličku za minutu. Resyntéza a opakované testování účinných látek



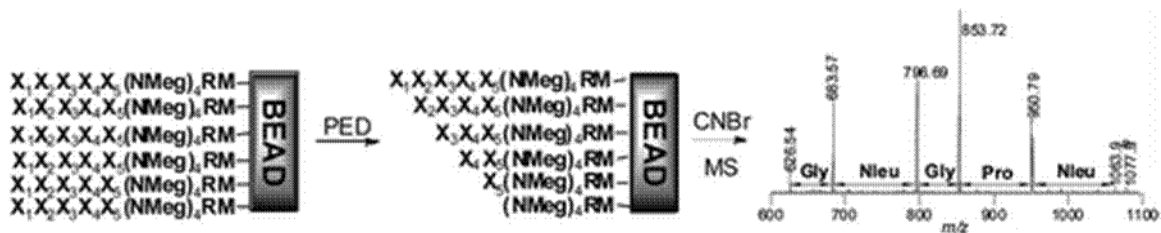
**Obr. 13** Schéma syntézy hexapeptidové knihovny knihoven s tří-aminokyselinovým motivem. Šipky nesoucí symbol R představují provedenou randomizaci, a šipky nesoucí symbol M znamená, že byla připojena směs aminokyselin. Čísla uvnitř kruhu ukazují počet randomizovaných pozic a pevných pozic v konkrétní části knihovny v tomto konkrétním bodě - dokončená knihovna (3/3) má tři pevné a tři smíšené pozice. Čísla v šipkách určují poměr, ve kterém byla část knihovny z předchozího kroku rozdělena pro provedení OBOC procesu a pro připojení smíšených aminokyselin.

ukázalo, že povrchová nehomogenita brání stanovení přesného pořadí kvality ligandů založené na čtení fluorescence ligandu stále připojeného na pevné částici (obr. 12).

Spojení OBOC technologie a knihoven využívajících dekonvoluce směsí je tzv. "knihovna knihoven" (často zaměňována s knihovny z knihoven, kde jeden typ knihovny je globálně transformován do jiného typu knihovny chemickou reakcí). Knihovna knihoven je soubor jednotlivých kuliček, kde každá kulička obsahuje určitou podknihovnu, která se vyznačuje několika definovanými pozicemi v její sekvenci. Například hexapeptidová knihovna knihoven se třemi definovanými polohami se skládá ze 160000 různých typů kuliček, z nichž každá obsahuje 8000 různých peptidů se třemi definovanými polohami v jejich sekvenci. To představuje obrovskou úsporu ve srovnání s knihovnou OBOC, kde bychom pro pokrytí stejné rozmanitosti potřebovali 64000000 kuliček. Nicméně, vzhledem k mírně komplikovanému syntetickému schématu (viz obr. 13), nebyl potenciál tohoto typu knihovny pro rychlou definici peptidových farmakoforů plně využit. Koncept knihovny knihoven je použitelný rovněž pro knihovny postavené na rovinných substrátech nebo na označených makroskopických částicích.

### 7.8 Stanovení struktury peptidu na individuální kuličce

Pro stanovení sekvence peptidů na "aktivních" kuličkách je stále používáno Edmanovo odbourávání. Tato technika je však pomalá, nedokáže rozlišit mezi L a D konfigurací stavebních bloků, a nesequenovatelné bloky (všechno kromě alfa aminokyselin) zabrání přečtení celé sekvence. Proto byly studovány alternativní techniky stanovení struktury hitů. Při jedné z těchto metod je v průběhu generace knihovny malá část rostoucího peptidového řetězce zablokována (capped) v každém kroku, takže na konci každé syntézy každá kulička obsahuje "historii" syntézy. Tato historie je pak snadno převedena do peptidové sekvence pomocí hmotnostní spektrometrie. Zjednodušení dekódování peptidické struktury bylo dosaženo použitím částečné Edmanovy degradace (PED), po níž následuje hmotnostní spektrometrie používající laserovou desorpční maticí asistovanou ionizaci (MALDI). Kuličky nesoucí unikátní sekvenci se podrobí několika cyklům reakce se směsí fenyl isothiokyanátu (PITC) a 9-fluorenylmethyl chlormravenčanu (Fmoc-CI) v poměru 1:3 (mol/mol). Tím je získána řada N-terminálně zkrácených produktů. Nakonec je Fmoc skupina odstraněna pomocí piperidinu. Výsledná směs s plnou délkou sekvence a všemi jeho zkráceními je pak analyzována MALDI hmotnostní spektrometrií. Z typického spektra, které ukazuje obr. 14, může být pořadí zbytků snadno odvozeno.



**Obr. 14** Příklad rychlé sekvenční analýzy částečnou Edmanovou degradací (PED), následovanou MALDI hmotnostní spektrometrií

Peptid může být také označen na N-konci sulfobenzoovou kyselinou, která zavede efektivní náboj na N-konec molekuly a pomůže vytvořit jedinou sérii C-terminálních fragmentů ( $\gamma$ -ionty). Další metoda používá štěpitelný linker, který je hydrofilní a který pomáhá snižovat nespecifickou vazbu na biologické vzorky a umožňuje připojení halogenových tagů, které výrazně usnadňují sekvenaci tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Linker je založen na jednotce kyseliny vinné, která při štěpení z pryskyřice generuje C-terminální aldehyd. Tento aldehyd může pak být derivatizován bromem obsahující sloučeninou s hydroxylaminovou skupinou, která slouží jako izotopický tag pro následnou MS/MS analýzu  $\gamma$ -iontových fragmentů.

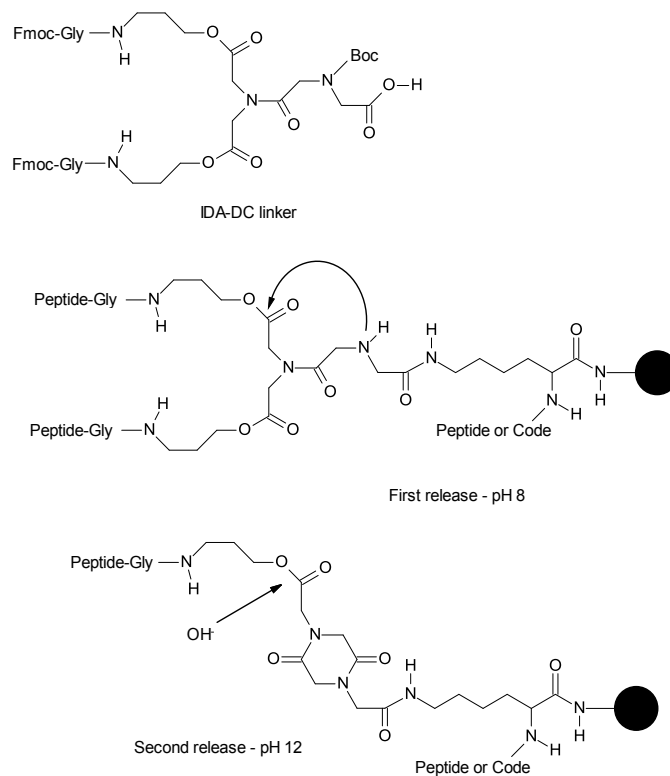
Protože techniky knihoven jsou použitelné nejen na peptidy, ale i na malé organické molekuly, byly vyvinuty různé techniky pro kódování / dekódování struktury nalezené sloučeniny (která může být složitější a k dispozici v omezeném množství) na povrchu kuličky pomocí nějakého subjektu ukrytého uvnitř kuličky (jednoduše zjistitelného a dostupného v relativně dostatečném množství). Kódování se stalo obzvláště důležité s možností účinně rozlišit povrch a vnitřek kuliček.

Vzhledem k tomu, hmotnostní spektrometrie je stále citlivější a snadněji dostupná, stává se tato technika standardem pro stanovení struktury. Jedna kulička může být i fyzicky nakrájena na několik kusů a ty stále obsahují dostatečné množství peptidů pro tento typ analýzy. Interpretaci spekter získaných elektrosprejovou hmotnostní spektrometrií může zjednodušit výměna vodíku za deuterium. Pokud je knihovna syntetizována na linkeru hydroxymethyl benzoové kyseliny (HMBA), je možno peptidy odštěpit z kuliček plynným amoniakem. Ukázalo se, že i krátké (5 minut) vystavení vysokému tlaku (10 atm) amoniaku oddělí většinu peptidu z linkeru. Jednotlivé kuličky jsou pak umístěny na povrchu skla. Nanomanipulátor pak přiblíží 1  $\mu\text{m}$  nanoelektrosprejovou špičku vedle kuličky a dodá extrakční rozpouštědlo. Po 30 sekundách se rozpouštědlo nasaje zpět do nanoelektrosprejové špičky a ta se zavede do hmotnostního spektrometru. MS/MS analýza pak poskytne vysoce kvalitní data ve 100% testovaných případech.

## 7.9 Screening OBOC knihoven v roztoku

Nevýhoda OBOC knihoven v jejich omezení na testy vazby na jejich povrch byla rychle rozpoznána Lamem a spol. Byly proto vyvinuty selektivně štěpitelné linkery, které umožnily testování knihoven v roztoku. Vzhledem k tomu, identita testovaného peptidu není známa, dokud není sekvence přečtena z "aktivní" kuličky, musí test zaručit, že pozorovaná aktivita může být zpětně spojena s kuličkou, ze které byla aktivní sloučenina odštěpena. A navíc, musí na ní zůstat ještě dost peptidu pro zjištění jeho struktury. Existují dva obecné přístupy k screeningu OBOC knihovny v roztoku: (i) dvoustupňové odštěpení následované testováním v mikrotitrační destičce, a (ii) in situ-štěpení používající imobilizované kuličky. V obou případech jsou ligandy připojeny na pevný nosič štěpitelným linkerem. Ligandy jsou pak uvolněny z každé kuličky do roztoku, kdy probíhají biologické testy. Mateřská kulička pozitivního roztoku je následně identifikována, a izolována pro stanovení struktury. Prostorový vztah mezi aktivní kuličkou a aktivitou lze realizovat vložením kuliček do polotuhého média (např. gelu), kterým se peptid postupně uvolňovaný z kuliček pomalu šíří. Kuličky mohou být také imobilizovány v mikro nádobkách, ve kterých se pak aktivita testuje.

V 96-jamkovém dvoustupňovém testu je dvojnásobně ortogonálně štěpitelný linker (obr. 15) použit při přípravě knihovny. Přibližně 100-500 kuliček je přidáno do každé jamky 96-jamkové filtrační destičky (např. Millipore). Po neutralizaci je první alikvot z knihovny uvolněn za vytvoření diketopiperazinové struktury na kuličce. Po inkubaci přes noc, se roztok odsaje tak, aby filtráty (každý s 100-500 sloučenin)

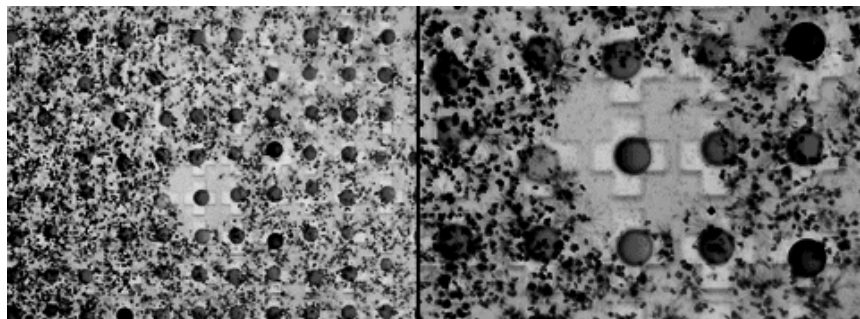


**Obr. 14** Schéma postupného uvolňování z dvojnásobně štěpitelného linkeru [308]. Pokud je linker připojen přes trojfunkční aminokyseliny (Lys), je kopie neuvolnitelného peptidu (nebo kód) stále připojen ke kuličce po obou stupních odštěpení.

byly přeneseny do další 96-jamkové desky. Filtráty jsou potom analyzovány na biologickou aktivitu v roztoku. Kuličky z pozitivních jamek jsou pak přerozděleny do filtračních desek, nyní jen s jednou kuličkou v každé jamce. Alkálií (např. plynným amoniakem), je uvolněn druhý alikvot z knihovny, a filtráty z každé jamky jsou pak opět testovány na biologickou aktivitu. Kuličky, které odpovídají jamkám s aktivními sloučeninami jsou pak použity pro stanovení struktury. Kulička o velikosti 100  $\mu\text{m}$ , může poskytnout přibližně 100 pmol sloučeniny, což v zásadě umožňuje získání koncentrace 1  $\mu\text{M}$  (v případě, že konečný objem je 100  $\mu\text{L}$ ).

Pro testování pomocí *in situ* uvolnění je možno pro znehybnění kuliček použít měkký agar. Jiná metoda imobilizuje kuličky knihovny na tenkou vrstvou polyethylenu a po vystavení plynné kyselině trifluoroctové a po neutralizaci plynným amoniakem jsou kuličky přivedeny do kontaktu s miskou ve které je kolonie rostoucích buněk v měkkém agaru. V blízkosti pozitivních kuliček pak dojde k transformaci studovaných buněk. Tento test byl použit k objevu látek s protinádorovou aktivitou. *In situ* test je vysoce efektivní a v zásadě je třeba pouze jednou štěpitelný linker, protože kuličky jsou již prostorově odděleny. Koncentrace uvolněné sloučeniny mohou být poměrně vysoké (např. > 10  $\mu\text{M}$ ) v těsné blízkosti kuličky a účinnost sloučeniny může být odhadnuta na základě velikosti prstence obklopujícího každou pozitivní kuličku (obr. 15).

Nedávno publikovaná technika používá fotolitograficky mikrofabrikovanou desku, v níž každá mikronádobka je dimenzována tak, aby mohla přijmout pouze jednu kuličku. Tato deska pojme 10 000 kuliček a ty jsou pokryty suspenzí nádorových buněk v gelu k vytvoření 3D buněčné kultury. Poté, co buněčné kolonie dosáhnou požadované konfluency, jsou sloučeniny knihovny, které byly připojeny disulfid obsahujícím linkerem, uvolněny použitím pufru obsahujícího dithiothreitol. Po další inkubaci jsou oblasti, v nichž byla obsažena cytotoxická aktivita, jasně pozorovatelné snížením životaschopnosti buněk spojených s jednotlivými kuličkami. Tyto kuličky jsou pak vyjmuty a struktura stanovena Edmanovou



**Obr. 15** Test životaschopnosti buněk na dedikované mikrofabrikované mikrotitrační destičce. Jednotlivé mikronádoby mohou přijmout pouze jednu kuličku (velikosti 120  $\mu\text{m}$ ). „Okénko“ v buněčném trávníku jednoznačně definuje umístění zdroje cytotoxického peptidu.

degradací.

V některých případech může být výhodné kombinovat testy v roztoku s testy na povrchu kuliček. Pozitivní kuličky izolované po tomto postupu mají větší pravděpodobnost být skutečným hitem. Tato strategie může mít vyšší propustnost než dříve diskutované systémy pro automatizované vybírání kuliček z vazebných testů následované vyhodnocením vazebných konstant v roztoku, nicméně budoucnost jasně favorizuje automatizované systémy. Teprve se uvidí, zda velké farmaceutické společnosti budou moci oživit výzkum nových farmaceutik použitím nových (vysoce automatizovaných a drahých) technologií, nebo zda jednoduché semi-automatizované nebo kompletně manuální techniky použité v malých biotechnologických firmách nebo vědeckých laboratořích budou stále hlavním zdrojem v hledání nových léčiv.

### 7.10 Budoucnost peptidových knihoven

Jak lze vidět, existuje velké množství konceptů pro generování rozmanitosti peptidů a peptidových struktur. Všechny z nich mají jasný cíl objevování nové funkční molekuly, která může být použita v praktické aplikaci (jako farmaceutikum, diagnostikum, katalyzátor, nebo cokoliv, co si lze představit). Jaká technologie bude v budoucnosti dominantní lze v tuto chvíli těžko předpovídat, je však zřejmé že vyhraje technika, která bude vysoce automatizovaná, jednoduchá, s nízkou spotřebou reagentů, a co je nejdůležitější, která bude poskytovat nejspolehlivější a ověřené výsledky. Autorova osobní předpověď je, že by to mohla být automatická OBOC technologie používající strategii knihovny knihoven.

### Přehled použité literatury a zdrojů

1. Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
2. Letsinger, R. L.; Kornet, M. J. Popcorn polymer as a support in multistep syntheses. *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3045-3046.
3. Leznoff, C. C. 1999 Alfred Bader Award Lecture: From early developments in multi-step organic synthesis on solid phases to multi-nuclear phthalocyanines. *Canadian Journal of Chemistry* **2000**, *78* (2), 167-183.
4. Giralt, E.; Albericio, F.; Rapp, W.; Stewart, J. M.; Loffet, A.; Guibe, F.; Holmes, C. P.; Rolland, M.; Amblard, M.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J.; Rivier, J. E.; Miranda, M. T. M.; Otteson, K. M.; Kates, S. A.; Eichler, J.; Houghten, R. A.; Antonenko, V. Synthesis of peptides on solid supports. In *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Goodman, M., Felix, A., Moroder, L., Toniolo, C., Eds.; Thieme: Stuttgart, 2004; Vol. E22a, pp 665-877.

5. Hudson, D. Matrix assisted synthetic transformations: A mosaic of diverse contributions. I. The pattern emerges. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1* (5), 333-360.
6. Hudson, D. Matrix assisted synthetic transformations: A mosaic of diverse contributions. II. The pattern is completed. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1* (6), 403-457.
- 6a. Cherkupally, P., Acosta Suhas Ramesh, G.A., De la Torre, B.G., Govender, T., Kruger, H.G., Albericio, F. Solid-phase peptide synthesis (SPPS), C-terminal vs. side-chain anchoring: a reality or a myth. *Amino Acids*, DOI 10.1007/s00726-014-1746-7, 2014.
7. Geysen, H. M.; Meloen, R. H.; Barteling, S. J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998-4002.
8. Houghten, R. A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 5131-5135.
9. Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E.; Appel, J. R.; Dooley, C. T.; Cuervo, J. H. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature* **1991**, *354*, 84-86.
10. Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* **1991**, *354*, 82-84.
11. Furka, A.; Sebastyen, F.; Asgedom, M.; Dibo, G. General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Int. J. Peptide Prot. Res.* **1991**, *37*, 487-493.
12. Lebl, M. Parallel personal comments on "classical" papers in combinatorial chemistry. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1* (1), 3-24.
13. Frank, R.; Heikens, W.; Heisterberg-Moutsis, G.; Blocker, H. A new general approach for the simultaneous chemical synthesis of large numbers of oligonucleotides: Segmental solid supports. *Nucl. Acid. Res.* **1983**, *11*, 4365-4377.
14. Houghten, R. A.; DeGraw, S. T.; Bray, M. K.; Hoffmann, S. R.; Frizzell, N. D. Simultaneous multiple peptide synthesis: The rapid preparation of large numbers of discrete peptides for biological, immunological, and methodological studies. *BioTechniques* **1986**, *4*, 522-528.
15. Fodor, S. P. A.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; Solas, D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **1991**, *251*, 767-773.
16. Beyer, M.; Nesterov, A.; Block, I.; Konig, K.; Felgenhauer, T.; Fernandez, S.; Leibe, K.; Torralba, G.; Hausmann, M.; Trunk, U.; Lindenstruth, V.; Bischoff, F. R.; Stadler, V.; Breitling, F. Combinatorial synthesis of peptide arrays onto a microchip. *Science* **2007**, *318* (5858), 1888.
17. Deprez, B.; Williard, X.; Bourel, L.; Coste, H.; Hyafil, F.; Tartar, A. Orthogonal combinatorial chemical libraries. *J. Amer. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5405-5406.
18. Meldal, M. The one-bead two-compound assay for solid phase screening of combinatorial libraries. *Biopolymers* **2002**, *66* (2), 93-100.
19. Astle, J. M.; Simpson, L. S.; Huang, Y.; Reddy, M. M.; Wilson, R.; Connell, S.; Wilson, J.; Kodadek, T. Seamless bead to microarray screening: rapid identification of the highest affinity protein ligands from large combinatorial libraries. *Chem. Biol.* **2010**, *17* (1), 38-45.

## Klíčová slova

• solid phase synthesis, peptide synthesis, combinatorial chemistry, library techniques, array technologies, screening

## Slovník pojmů

- Boc           terc.butyloxykarbonyl
- Fmoc       fluorenylmethyloxykarbonyl
- Bzl         benzyl
- TFA        trifloroctová kyselina
- DNA       desoxyribonukleová kyselina
- DIC        diisopropylkarbodiimid
- Dnp        dinitrofenyl
- Tos        tosyl, p-toluensulfonyl
- For        formyl
- Z          benzyloxykarbonyl
- But        terc.butyl
- PNA        peptide nucleic acid, nukleová kyselina s peptidovým řetězcem
- OBOC      one-bead-one-compound, jedna-kulička-jedna-struktura
- PEGA      akrylamid – polyethylenglykol kopolymer
- Osu        hydroxysukcinimid
- Alloc      allyloxykarbonyl
- MS-MS     hmotová spektrometrie
- MALDI     matrix assisted laser desorption ionization

## Seznam doporučené literatury a odkazy na internetové zdroje

1. Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchnak, V. The "one-bead-one-compound" combinatorial library method. Chem. Rev. 1997, 97 (2), 411-448. <http://www.5z.com/mlebl/publications/1997ChemRev.pdf>
2. Lebl, M.; Hachmann, J. P. High-throughput peptide synthesis. Howl, J., Ed.; Humana Press, Inc.: Totowa, NJ, 2005; pp 167-194. <http://www.5z.com/mlebl/publications/2005MethMolBiol.pdf>
3. Lebl, M. Parallel personal comments on "classical" papers in combinatorial chemistry. J. Comb. Chem. 1999, 1 (1), 3-24. [http://www.5z.com/mlebl/publications/1999JCombChem\\_003.pdf](http://www.5z.com/mlebl/publications/1999JCombChem_003.pdf)
4. Lebl, M. Solid-phase synthesis on planar supports. Biopolymers (Pept. Sci.) 1998, 47 (5), 397-404. [http://www.5z.com/mlebl/publications/1998PeptSci\\_397.pdf](http://www.5z.com/mlebl/publications/1998PeptSci_397.pdf)