

VYUŽITÍ POLYSACHARIDŮ V SYNTÉZE PEPTIDŮ NA PEVNÉ FÁZI

SERGEJ KAREL^a, MARTIN FLEGEL^b, PAVEL DRAŠAR^b a VLADIMÍR VELEBNÝ^a

^a Contipro a.s., Dolní Dobrouč 401, 561 02 Dolní Dobrouč,

^b Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
sergej.karel@contipro.com

Došlo 7.5.20, přijato 26.2.21.

Klíčová slova: kyselina hyaluronová, polysacharidy, peptidy, syntéza peptidů na pevné fázi, adhezivní peptidy, celuloza, bavlna

Obsah

1. Úvod
2. Polysacharidy jako nosiče pro syntézu peptidů na pevné fázi
 - 2.1. Kyselina alginová
 - 2.2. Celuloza
 - 2.3. Bavlna
3. Kyselina hyaluronová jako nosič pro syntézu peptidů na pevné fázi
4. Závěr

1. Úvod

Řízené uvolňování látek z biokompatibilních a biodegradabilních nosičů umožňuje cíleně a kontrolovaně podávat léčiva¹ a také moderovat jejich terapeutické účinky. Byly tak vyvinuty nové materiály pro hojení ran², podporu a léčbu kostí³ a chrupavek⁴ a náhrady kůže a sliznic⁵.

Polysacharidy^{6–33} byly v tomto smyslu využity pouze jako nosiče v syntéze peptidů na pevné fázi (SPPS), které umožňují snadnější a snad efektivnější přípravu peptidů v porovnání se syntézou v roztoku nebo rekombinantními přístupy. Biologicky aktivní peptidy byly pak z nosiče odštěpeny a dále využity. Nosič na bázi kyseliny hyaluronové^{34–40} (hyaluronan, HA) tento šťepící krok nevyžaduje, protože jak uvolněný peptid, tak i hyaluronový nosič podléhají biodegradaci a jsou *in vivo* enzymaticky odbourány⁴¹. Vznikla tak možnost využít HA s navázaným peptidem jako celek, kdy mohou být využity biologické vlastnosti obou komponent. Takto připravený materiál může proto nabídnout v lékové formě vhodnější dávkování a usnadnit dostupnost biologicky aktivních peptidů.

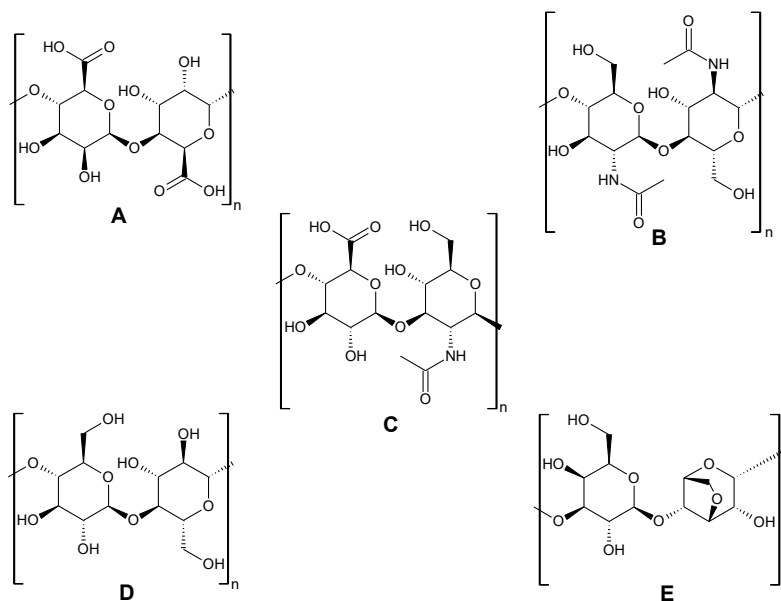
2. Polysacharidy jako nosiče pro syntézu peptidů na pevné fázi

Využití polysacharidů (obr. 1) jako nosičů pro syntézu peptidů bylo popsáno u alginátu^{6,7}, chitinu⁸, dextransu^{9–11}, celulosy^{12–27}, bavlny^{28–33} či kyseliny hyaluronové^{34–40}. Příklady peptidových sekvencí, které byly připraveny na nosičích na bázi polysacharidů, jsou uvedeny v tab. I. Většinu výše zmíněných sacharidů však není možné aplikovat v humánní medicíně kvůli neschopnosti lidského těla tyto cukry odbourat přirozenou metabolickou cestou⁴². Proto byly dosud peptidy ze sacharidového nosiče po ukončení syntézy odštěpeny. Polysacharidy byly tedy používány jen jako nosiče pro syntézu, podobně jako běžné polystyrenové pryskyřice (Wang, Rink Amid, atd.). Kombinace polysacharidu s peptidem však může dodat vzniklému materiálu zajímavé vlastnosti. Při pokusu využít polyethylenglykol či kopolymer *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu však došlo po navázání peptidu k potlačení žádoucích biologických vlastností ukotveného peptidu⁴³. Naopak v případě využití alginátu toto pozorováno nebylo a plná biologická funkce připojeného peptidu byla zachována⁶. Navíc přidanou hodnotou kombinace tohoto sacharidu s peptidy může být skutečnost, že algináty mají imunostimulační aktivitu⁶.

Z literatury jsou známy postupy SPPS na sacharidových nosičích využívající při syntéze peptidů jak Boc/Bzl (cit. ^{9–11,22,25,29}), tak Fmoc/*t*Bu^{8,12–32,34–38,44} strategii. Při aplikaci Boc/Bzl přístupu byly během přípravy peptidů zjištěny syntetické či stabilitní problémy^{10,28,29}, což bylo později prokázáno při HPLC srovnání peptidů získaných aplikací obou syntetických přístupů. Při použití Boc/Bzl metodiky byly peptidy méně čisté než peptidy připravené Fmoc/*t*Bu strategií²⁹, proto byla Boc/Bzl strategie shledána jako méně vhodná.

2.1. Kyselina alginová

Nejčastěji používaným nosičem pro reakce peptidů a aminokyselin s polysacharidy jsou algináty. Kyselina alginová je lineární negativně nabitý polysacharid z opakujících se monomerních jednotek kyseliny β-D-mannuronové a kyseliny α-L-guluronové spojených (1→4) *O*-glykosidovými vazbami. Algináty byly vyvinuty jako systémy pro dávkování léčiv^{45,46}, ale většina studií popisuje metody zahrnující nekovalentní zachycení léčiv v alginátové matici nebo v gelu alginátu vápenatého. Peptidy lze imobilizovat v alginátovém gelu díky fyzikálním interakcím mezi karboxylovými skupinami kyseliny β-D-mannuronové či α-L-guluronové a aminoskupinami peptidů^{44,45}. Algináty ve formě gelu byly použity v analytických metodách pro nekovalentní zachycení pro-



Obr. 1. Polysacharidy používané v SPPS: A – kyselina alginová; B – chitin; C – kyselina hyaluronová; D – celuloza; E – agarosa

teinů o vysoké molekulové hmotnosti, zejména enzymů, buněčných organel nebo celých buněk^{44,45}.

Kovalentní navázání peptidů a léčiv na biologicky odbouratelné nosiče nabízí možnost jejich použití jako sofistikovaných systémů dávkování, které zlepšují farmakokinetiku a biologickou dostupnost, což zvyšuje klinický potenciál léčiva^{7,47}. Tato metodika umožňuje kovalentní připojení terapeutik obsahujících primární aminoskupiny na řetězec alginátu, kdy vzniká amidová vazba mezi karboxylovou skupinou alginátu aktivovanou karbodiimidem a aminoskupinou peptidu^{44,45,48}. Algináty s kovalentně vázanými peptidy lze pak využít při léčbě zranění⁴⁸. Jednou z léčebných možností pro hojení ran je ovlivnění procesu hojení pomocí přirozeně se vyskytujících stimulačních činidel, jako je například růstový faktor⁴⁹.

2.2. Celuloza

Z pohledu chemické struktury je celuloza lineární polysacharid skládající se z opakujících se monomerních jednotek D-glukosy spojených $\beta(1\rightarrow4)$ O-glykosidovými vazbami.

Využití celulosových kuliček (PerlozaTM) pro SPPS popsal již Bruce Merrifield, ale pak došel k závěru, že jsou pro tuto metodiku nevhodné⁵⁰. Téměř o třicet let později byla Perloza znovu aplikována pro syntézu peptidů na pevné fázi využívající Boc/Bzl strategii^{25,27}. První

z přístupů popisuje přípravu tetrapeptidu LAGV* přímo na kuličkách aminopropyl-Perlozy²⁷. Na obr. 2 je shrnuta příprava aminopropyl-Perlozy včetně ukotvení první aminokyseliny. Protože se tento přístup ukázal jako vyhovující, bylo v následných studiích využito přípravy peptidů ukotvených k Perloze přes C-terminální bazicky odštěpitelný glykolamidový linker^{22,23,27}. Syntéza peptidů na takto modifikované Perloze probíhala postupným připojováním Boc-aminokyselin, které byly aktivovány jako aktivní estery s HOBt. Takto byla připravena série krátkých peptidů, které byly následně odštěpeny z nosiče alkalickou hydrolýzou^{22–25,27}.

Při syntéze peptidů na kuličkách Perlozy byla využita také Fmoc/*t*Bu strategie²⁶. Ukotvení jednotlivých Fmoc-ochráněných aminokyselin probíhalo přes aktivní ester příslušné aminokyseliny s 2,4-dichlorfenolem, popřípadě aktivací reakční směsí DCC/HOBt/DMAP^{20,28,29}. V obou případech byly peptidy připojeny k aminopropyl-Perloze přes hydrofilní linker, kterým byla 4-hydroxymethylfenoxycetová kyselina (obr. 3). Využitím aktivních 2,4-dichlorfenyl esterů^{22,23,26,27} byla potlačena racemizace C-koncové aminokyseliny¹⁷.

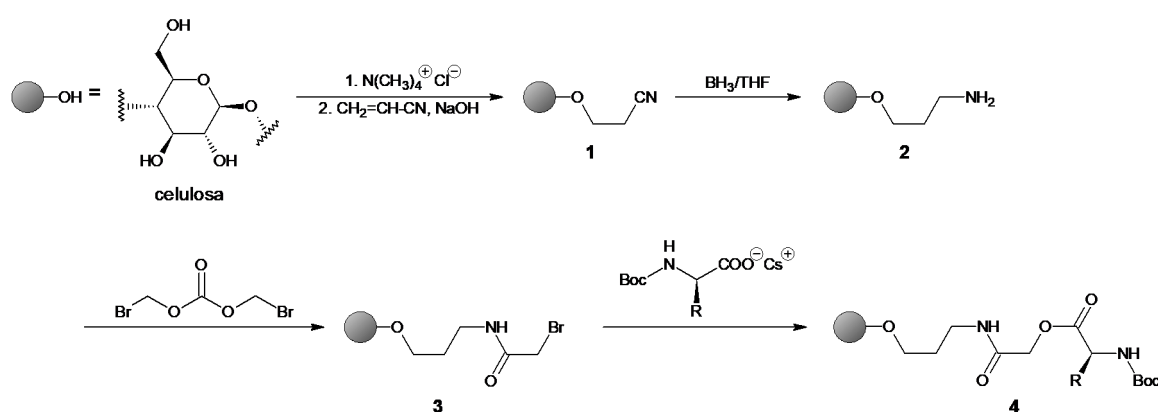
Pro přípravu peptidů byla využita také celuloza ve formě papíru (filtrační papír Whatman[®] Grade 540)^{14,18,20,21}. První aminokyselina byla ukotvena k hydroxylovým skupinám papíru (celulose) esterovou vazbou a další aminokyseliny byly dále připojovány po-

* Z důvodu přehlednosti zápisu sekvencí peptidů bylo zvoleno jednopísmenné značení aminokyselin vycházející z doporučení IUPAC: Pure Appl. Chem. 56 (5), 595 (1984).

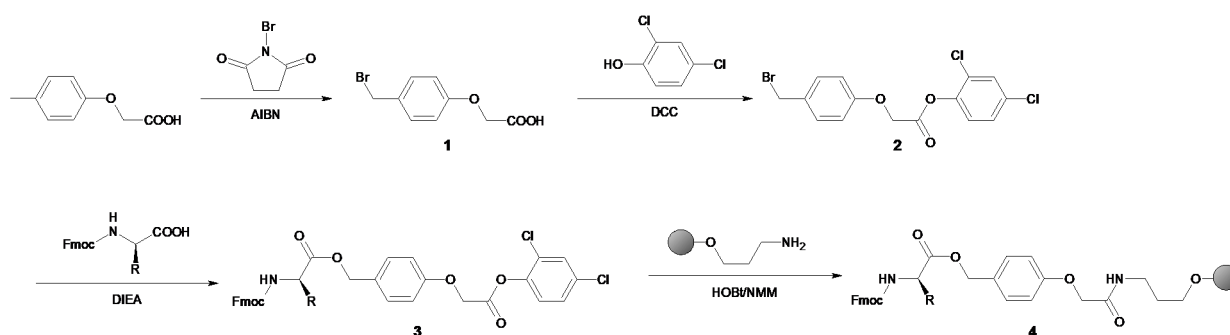
Tabulka I

Přehled peptidových sekvencí připravených s využitím polysacharidových nosičů

Polysacharid	Forma	Sekvence peptidu	Pozn.	Lit.
Kyselina alginová	kuličky	GGGGRGDY	adheze kardiomyocytů	6
	netkaná textilie	SIKVAV	hojení ran	48
Chitin	lyofilizát	VQAAIDYING-NH ₂	model	8
Dextran	kuličky	oxytocin	model	10
Celulosa (Perloza)	kuličky	LAGV	model	27
		DRVYIHPFHL	angiotensin I	26
		YGGFL	leucin-enkefalin	27
		VQAAIDYING	ACP(65-74) ^a	27
		YPTKFLGKAFV	model	14
Celulosa (papír)	arch	SLSSL	imunologické studie	18
		LDNDLMN	imunologické studie	18
	disk	WMQRC	model	15
		VRFQA	model	15
Celulosa (bavlna)	stuha	GRWEYGSFF	imunologické studie	29
		RWTKDHY	model	29
		YGGFL a analoga	methionin-enkefalin	30
		YGFM	model	31
		LFPVA	model	31
		KAaK ^b	antimikrobiální	32
Kyselina hyaluronová	vlákno	AAAAAAAK	model	37
		RGD	buněčná adheze	37,38, 40
	netkaná textilie	RGD	buněčná adheze	37,38
		(S)IKVAV	buněčná adheze	37,38
		GGEGYGGYIGSR	adheze kardiomyocytů	36

^a ACP = acyl carrier protein, ^b a = D-Ala

Obr. 2. Příprava aminopropyl-Perlozy a ukotvení první aminokyseliny. Celulosa je modifikována akrylonitrilem v bazickém prostředí za vzniku kyanoethylcelulosity (1), která je následně redukována hydridem boritým na aminopropyl-celulosu (2). Aktivace nosiče využívá reakce s anhydridem kyseliny bromoctové za vzniku příslušného bromderivátu (3), který dále reaguje s cesnými solemi Boc-aminokyseliny (4).



Obr. 3. Ukotvení Fmoc-aminokyseliny k aminopropyl-Perloze. Radikálová bromace 4-methylfenoxyoctové kyseliny poskytne 4-(brommethyl)fenoxyoctovou kyselinu (1), která je následně převedena na aktivní ester (2) kondenzací s 2,4-dichlorfenolem. Esterifikací Fmoc-aminokyseliny vznikne derivát 3, který reaguje s aminopropyl-Perlozou a tím dochází k ukotvení Fmoc-aminokyseliny k nosiči prostřednictvím hydrofilního linkeru (4).

mocí postupu s Fmoc/*t*Bu kombinací chránících skupin. Aktivované aminokyseliny byly opakovaně nanášeny na papír po kapkách o objemu 1 μ l do odbarvení skvrny bromfenolové modří indikující ukončení acylační reakce⁵¹. Po ukončení syntézy vybrané sekvence a odštěpení chránících skupin z postranních řetězců bylo na celém archu modifikovaného papíru přímo provedeno imunologické testování^{18,21}. Pro popis epitopu imunogenní oblasti lidského cytomegaloviru^{19,21} byla tak připravena série 49 dekapetidů na diglycinovém linkeru. Tyto peptidy bez chránících skupin a stále ukotvené k papíru byly použity v ELISA testu ke stanovení antigenů^{18,19,21} a byly tak následně vybrány pouze účinné sekvence^{38,40,41}. Případně odštěpení peptidů z papírového nosiče lze provést alkalickou hydrolyzou¹⁴.

Metodika syntézy peptidů na papíře má spíše analytický význam, zejména s ohledem na velmi nízkou dosaženou substituci^{14,18,21}. S využitím celulosy jako nosiče byla připravena celá řada peptidů^{14–18,20,21,33,52}, avšak jisté obtíže působila nízká mechanická stabilita papíru^{20,29}. Výhodou byla možnost 2D screeningu biologických vlastností ukotvených peptidů v jednom testu^{15,19}.

2.3. Bavlna

Bavlna je nejčistší formou celulosy, s výjimkou celulosy mikrobiální, a je možné ji získat v rozličných formách a tvarech. Bylo studováno využití bavlny jako nosiče pro SPPS, kdy ukotvení peptidu bylo provedeno prostřednictvím esterové vazby mezi primární hydroxylovou skupinou jednotek D-glukosy a karboxylovou skupinou peptidu^{28,29}. Přístup k metodice vycházel z popsaného postupu pro syntézu peptidů na celuloze (Fmoc/*t*Bu strategie)¹⁴. Kondenzace byla prováděna v prostředí DIC/HOBt/DMAP v DMF, což vedlo k získání modifikovaného nosiče se substitucí 0,01–0,12 mmol aminokyseliny na 1 g nosiče^{28,29,31}.

Na základě analogie s dříve popsaným postupem¹⁴ byl připraven pentapeptid [Met⁵]enkefalin a tetrapeptid [desGly²,Met⁴]enkefalin na bavlněných páscích³⁰. Protokol

byl zvolen tak, aby demonstroval praktickou použitelnost bavlny pro kontinuální syntézu peptidů³¹. V případě modifikace bavlny Fmoc-glycinem, který sloužil jako linker, byly připraveny analogy enkefalinu^{28–30}. Při zavedení linkeru bylo ale zjištěno, že až 20 % reagující chráněné aminokyseliny bylo připojeno přímo k nosiči²⁸. Tuto skutečnost však není nutné považovat za nežádoucí vzhledem k tomu, že štěpení v kyselém prostředí (TFA) uvolnilo pouze peptid navázaný na linker, zatímco peptidy vázané přímo na sacharidový nosič mohly být štěpeny pouze alkalickou hydrolyzou^{28,29}.

Esterová vazba mezi aminokyselinami/peptidy a nosiči na bázi celulosy není stabilní^{14,28}. Bylo prokázáno, že během štěpení chránící Fmoc-skupiny v roztoku 20% piperidinu v DMF dochází současně k odštěpení až 6 % peptidového řetězce z nosiče a při štěpení roztokem 25% TFA v DCM byla pozorována až 9% ztráta peptidu^{14,28}. Stabilizace vazby aminokyseliny na nosič byla dosažena použitím 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazinu (kyanurchloridu), který sloužil jako linker¹⁴ a který je také běžně používán pro barvení materiálů na bázi celulosy⁵³.

Vzhledem k vyšší mechanické stabilitě bavlny v porovnání s papírem²⁰ byla bavlna studována také jako nosič pro automatickou peptidovou syntézu¹⁴, pro souběžnou syntézu více peptidů³⁰ či kontinuální peptidovou syntézu^{30,52,54–57}, při níž byl nosič ve formě dlouhé pásky (např. stuhu). Při takové reakci procházela bavlněná páska různými lázněmi, které obsahovaly reakční, promývací či štěpící roztoky, tak, že jednotlivé stupně syntézy daného peptidu probíhaly současně v různých částech tohoto typu nosiče^{14,30}. Konkrétně se jednalo o pohyb pásky v kontinuálním zařízení tak, že vstupovala do série za sebou jdoucích promývacích lázní (DMF, ethanol, DCM), za které byl zařazen štěpící roztok sloužící k odstranění zvolené chránící skupiny (TFA či piperidin). Následovala opět série promývacích lázní a reakční roztok aminokyseliny včetně aktivačních činidel (DCC/HOBt/DMF). Po každém máčení nosiče v konkrétní lázni docházelo k odstranění zbytkových rozpouštědel mezi dvěma válci, které vytlačily tato rezidua z bavlněného nosiče. Takto upravený nosič

pak znovu a opakovaně vstupoval do syntézy (jednotlivých lázní), dokud nebylo dosaženo požadované sekvence peptidu. Následně byl připravený peptid z bavlny odštěpen alkalickou hydrolýzou, popřípadě amonolýzou³¹.

Byly představeny dva typy syntetizátorů využívajících bavlnu pro kontinuální syntézu peptidů. Prvním z modelů byl COMPAS 242 (Cotton Multiple Peptides Synthesizer) navržený v dílnách ÚOCHB AV ČR (cit.^{56,57}). Druhým navrženým zařízením byl syntetizátor^{54,55}, kde dochází k postupnému připojování aktivních složek k funkčním skupinám ukotveným na nosném funkcionalizovaném pásu. Všechna rozpouštědla a roztoky činidel jsou nasávány do nosiče a jejich odstranění je řešeno stlačením nosiče suchým porézním materiálem nebo odstředěním nosiče^{54,55}. Podobné postupy jsou používány v textilním průmyslu pro barvení látek.

3. Kyselina hyaluronová jako nosič pro syntézu peptidů na pevné fázi

Kyselina hyaluronová (hyaluronan, HA) je nesulfatovaný glykosaminoglykan, který je složený ze dvou opakujících se jednotek, D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu, spojených $\beta(1\rightarrow4)$ a $\beta(1\rightarrow3)$ glykosidovými vazbami. Molekulová hmotnost nativní kyseliny hyaluronové se pohybuje v rozsahu 50 kDa až 5 MDa. Tento značně hydrofilní polysacharid tvoří součást pojivových tkání, kůže, synoviální tekutiny kloubů a hraje významnou roli v řadě biologických procesů, jako je organizace proteoglykanů, hydratace a diferenciacie buněk. Vzhledem k tomu, že se jedná o biokompatibilní polymer, který je tělu vlastní a je zároveň degradovatelný, stává se vhodným substrátem pro tkáňové inženýrství nebo jako nosič biologicky aktivních látek^{2,58–61}.

Hyaluronová kyselina a její deriváty jsou dobře známa a využívána v kosmetice a pro hojení ran. Aby však

mohla být HA široce používána, je často nutné upravit její vlastnosti modifikací primární struktury⁵⁸. Modifikace hyaluronanu se provádí většinou na dvou reakčních centrech – na karboxylové skupině a na primární hydroxylové skupině. Po odštěpení N-acetylové skupiny může být rovněž využita aminoskupina. Přehled nejběžnějších chemických modifikací hyaluronové kyseliny je shrnut v tab. II. Není jasné, která z hydroxylových skupin sacharidové jednotky se účastní reakce. Mnoho výsledků^{62–67} však ukazuje na preferování primárního hydroxyly (C6) na N-acetyl-D-glukosaminové jednotce z důvodu nejvyšší reaktivity této skupiny.

V současné době jsou již dostupné nosiče na bázi hyaluronanu ve formě vláken^{68,69}, tenkých filmů⁷⁰ či netkaných textilií⁷¹. Vzhledem k vlastnostem hyaluronanu by mohlo využití jeho perspektivních forem odstranit některé popsání nedostatky již definovaných polysacharidových nosičů^{6–8,12–14,28,29,32,33}, zejména jejich biodegradaci *in vivo*^{72,73}.

V literatuře byly popsány pouze postupy pro modifikaci hyaluronanu peptidem⁵⁸ realizované v roztoku, tj. HA byl rozpuštěn a v roztoku následně modifikován připojením N-terminální aminoskupiny peptidu ke karboxylové skupině HA za vzniku amidové vazby. Takto vzniklý konjugát je pro přípravu ve formě hydrogelů využíván nejčastěji.

Kyselina hyaluronová ve formě vláken či netkaných textilií se v průběhu SPPS mechanicky nemění⁴⁰, jednalo se tedy o syntézu na pevném polymerním nosiči, kdy se peptid buduje po jednotlivých aminokyselinách nebo se připojuje jako celek k materiálu z hyaluronanu^{34–38}. Předpokládá se, že je peptid ukotven převážně na povrchu nosiče vzhledem k preferovanému přístupu reagentů k lépe solvatovaným reakčním centřům na povrchu nosiče. Byla popsána syntéza s postupným připojováním aminokyselinových zbytků. Takto byly připraveny lineární i rozvětvené (dendrimerní) lysinové peptidy nebo peptid obsahující

Tabulka II

Chemické modifikace kyseliny hyaluronové

Reakční centrum	Reakce	Reakční činidlo	Rozpouštědlo	Lit.
–COOH	amidace	karbodiimidy	voda (pH 4,75 – 7,5) nebo DMSO	77–80
		1,1'-karbonyldiimidazol	DMSO	81
		2-chlor-dimethoxy-1,3,5-triazin	voda/acetónitril	82
	esterifikace	2-chlor-1-methylpyridinium-jodid	DMF nebo DMSO	83
		alkylhalogenidy	DMSO	84
		diazomethan	DMSO	85
–OH	tvorba etheru	epoxydy	voda (pH > 13)	86–89
		divinylsulfon	voda (pH > 13)	90–92
	tvorba hemiacetalu esterifikace	glutaraldehyd	voda (pH 2)	93,94
		anhydrid	voda/THF	59,95
		O-acyl-O'-alkylkarbonát	DMSO	96
–NHCOCH ₃	deacetylace	síran hydrazinu	voda	77

7 alaninových zbytků^{37,38}, který se řadí mezi peptidy „s obtížně syntetizovatelnou sekvencí“⁷⁴. Tato metodika bohužel není použitelná pro přípravu peptidů, které obsahují aminokyseliny s kyselé štěpitelnými chránícími skupinami v postranních řetězcích. Vystavení nosičů HA roztokům kyseliny trifluoroctové, která se pro štěpení používá, vedlo k degradaci materiálu³⁷. Chráněné adhezivní peptidy (RGD, IKVAV či YIGSR) byly proto připraveny běžnými postupy SPPS na polystyrenové pryskyřici typu Wang a následně byly připojovány (konjugovány) k nosiči HA v jednom kroku^{37,38}. Byl také představen nový typ hydrofobního linkeru obsahující dvě 6-aminohexanoylové jednotky na C-konci, vznikla tak dostatečná vzdálenost adhezivního motivu od povrchu nosiče a bylo tak usnadněno rozpoznání buněčnými receptory^{75,76}. Tyto adhezivní nosiče obsahující zmíněný linker umožňovaly zachovat biologické vlastnosti připojovaného peptidu, což vedlo v provedených testech k rovnoměrnému pokrytí buněčnou kulturou^{35–37}.

4. Závěr

V současné době je snaha používat při přípravě nových typů léčivých látek nosiče, které mohou být biokompatibilní a případně také biodegradabilní. Proto se zvláště polysacharidy staly předmětem studia a možného využití v syntéze peptidů na pevné fázi. Kombinace polysacharidů a příprava peptidů s využitím polysacharidů jako pevného nosiče může dodat vzniklému materiálu nové vlastnosti a otevřít tím zajímavý směr aplikačních možností. Konjugáty peptid-HA mají velký aplikační potenciál. Mohou výrazně zlepšit vlastnosti používaných materiálů pro hojení ran (například náplastí a chirurgických obvazů), protože může být eliminována potřeba následného a často bolestivého odstranění podpůrných nosičů a léčebných materiálů, které nejsou pro organismus přijatelné. Přídavné funkce proadhezivních peptidů, zejména ovlivnění buněk *in situ*, lze s výhodou využít i pro aplikace, kde je vyžadováno prorůstání okolních buněk do funkcionalizovaného nosiče. Dalším krokem vývoje by pak mohlo být připojení biologicky aktivních peptidů, např. s regulačními funkcemi, které budou kovalentně vázány k HA.

Seznam použitých zkratk

Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
Bzl	benzyl
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
DMAP	4-(dimethyl)aminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
Fmoc	fluorenylmethyloxykarbonyl
HA	kyselina hyaluronová
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
kDa	kilodalton, 1 kDa = 1000 g mol ⁻¹
MDa	megadalton, 1 MDa = 1·10 ⁶ g mol ⁻¹

SPPS	syntéza peptidů na pevné fázi (solid phase peptide synthesis)
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyl
TFA	kyselina trifluoroctová

LITERATURA

1. Chow D., Nunalee M. L., Lim D. W., Simnick A. J., Chilkoti A.: *Mater. Sci. Eng.*, R 62, 125 (2008).
2. Longinotti C.: *Int. J. Burns Trauma* 2, 162 (2014).
3. Solchaga L. A., Temenoff J. S., Gao J., Mikos A. G., Caplan A. I., Goldberg V. M.: *Osteoarthritis Cartilage* 13, 297 (2005).
4. Bauer C., Berger M., Baumgartner R. R., Höller S., Zwickl H., Niculescu-Morzea E., Halbwirth F., Nehr S.: *Cartilage* 7, 265 (2016).
5. Galassi G., Brun P., Radice M., Cortivo R., Zanon G. F., Genovese P., Abatangelo G.: *Biomaterials* 21, 2183 (2000).
6. Shachar M., Tsur-Gang O., Dvir T., Leor J., Cohen S.: *Acta Biomater.* 7, 152 (2011).
7. Marks R., Abu-Rabeah K., Ben-Hamo Fadlon H. (The National Institute for Biotechnology in the Negev Ltd.): WO2012101612 (2012).
8. Neugebauer W., Williams R. E., Barbier J.-R., Brzezinski R., Willick G.: *Int. J. Pept. Protein Res.* 47, 269 (2009).
9. Orłowska A., Bankowski K., Drabarek S.: *Chem. Informationsdienst* 8, 131 (1977).
10. Zeltser I. E., Antonov A. A., Karelskii V. N., Prikhodkina E. A., Ovsepian A. M., Zhuravleva E. E.: *Chem. Nat. Compd.* 25, 94 (1989).
11. Dzubenko P. S., Medvedkin V. N., Mitin Y. V.: *Russ. J. Bioorg. Chem.* 15, 704 (1989).
12. Hilpert K., Winkler D. F. H., Hancock R. E. W.: *Nat. Protoc.* 2, 1333 (2007).
13. Fraczyk J., Walczak M., Kaminski Z. J.: *J. Pept. Sci.* 24, e3063 (2018).
14. Eichler J., Beyermann M., Bienert M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 54, 1746 (1989).
15. Blankemeyer-Menge B., Frank R.: *Tetrahedron Lett.* 29, 5871 (1988).
16. Blankemeyer-Menge B., Frank R., v knize: *Innovation and Perspectives in Solid Phase Peptide Synthesis* (Epton R., ed.), str. 465, Mayflower Scientific Limited, Birmingham 1990.
17. Blankemeyer-Menge B., Nimtz M., Frank R.: *Tetrahedron Lett.* 31, 1701 (1990).
18. Frank R.: *Tetrahedron* 48, 9217 (1992).
19. Frank R.: *J. Immunol. Methods* 267, 13 (2002).
20. Frank R., Döring R.: *Tetrahedron* 44, 6031 (1988).
21. Frank R., Guler S., Krause S., Lindenmaier W.: *Proceedings of the 21st European Peptide Symposium, September 2 – 8. 1990, Platja d'Aro – Spain* (Giralt E., Andreu D., ed.), str. 151. Escom, Leiden 1990.
22. Englebretsen D. R., Harding D. R.: *Pept. Res.* 7, 136 (1994).

23. Englebretsen D. R., Harding D. R.: *Pept. Res.* 7, 322 (1994).
24. Englebretsen D. R., Harding D. R.: *Pept. Res.* 6, 320 (1993).
25. Englebretsen D. R., Harding D. R. K.: *Proceedings of the 12th American Peptide Symposium, June 16. – 21. 1991*, Cambridge – Massachusetts, USA (Smith J. A., Rivier J. E., ed.), Escom, Leiden 1992.
26. Englebretsen D. R., Harding D. R. K.: *Int. J. Pept. Protein Res.* 43, 546 (1994).
27. Englebretsen D. R., Harding D. R. K.: *Int. J. Pept. Protein Res.* 40, 487 (1992).
28. Eichler J., Bienert M., Sepetov N. F., Stolba P., Krchnak V., Smekal O., Gut V., Lebl M., v knize: *Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis* (Epton R., ed.), str. 337, Mayflower Scientific Limited, Birmingham 1990.
29. Eichler J., Bienert M., Stierandova A., Lebl M.: *Pept. Res.* 4, 296 (1991).
30. Lebl M., Eichler J.: *Pept. Res.* 2, 297 (1989).
31. Lebl M., Gut V., Eichler J.: *Proceedings of the 11th American Peptide Symposium, July 9. – 14. 1989*, La Jolla – California, USA (Rivier J. E., Marshall G. R., ed.), str. 1059, Escom, Leiden 1990.
32. Orlandin A., Formaggio F., Toffoletti A., Peggion C.: *J. Pept. Sci.* 20, 547 (2014).
33. Edwards J., Fontenot K., Liebner F., Pircher N., French A., Condon B.: *Int. J. Mol. Sci.* 19, 840 (2018).
34. Karel S., Sulakova R., Sogorkova J., Frycak R., Pitucha T., Flegel M., Velebny V.: *J. Pept. Sci.* 22, S65 (2016).
35. Karel S., Sogorkova J., Marholdova L., Flegel M., Velebny V.: *J. Pept. Sci.* 24, S161 (2018).
36. Karel S., Sogorkova J., Nesporova K., Kubala L., Hermannova M., Marholdova L., Flegel M., Velebny V.: *Proceedings of the 10th International Peptide Symposium, December 3. – 7. 2018*, Kyoto – Japan (Futaki S., Matsuzaku K., ed.), str. 74, The Japanese Peptide Society, Kyoto 2018.
37. Karel S., Sogorkova J., Hermannova M., Nesporova K., Marholdova L., Chmelickova K., Bednarova L., Flegel M., Drasar P., Velebny V.: *Carbohydr. Polym.* 201, 300 (2018).
38. Karel S., Flegel M., Sulakova R., Frycak R., Sogorkova J., Betak J., Chmelar J., Zapotocky V., Velebny V. (Contipro a. s.): WO2018113802 (2018).
39. Karel S., Flegel M., Sulakova R., Frycak R., Sogorkova J., Nesporova K., Hermannova M., Velebny V.: *25th American Peptide Symposium, June 17. – 22. 2017*, Whistler – Canada. Book of Abstracts (bez editora), str. 98 (Poster no. YI-P104), Whistler 2017.
40. Karel S., Starigazdová J., Vágnerová H., Kulhánek J., Horácková L., Flegel M., Drašar P., Brožek J., Velebny V.: *Fibers Polym.* 21, 2707 (2020).
41. Stern R., Kogan G., Jedrzejewski M. J., Šoltés L.: *Biotechnol. Adv.* 25, 537 (2007).
42. Sannino A., Demitri C., Madaghiele M.: *Materials* 2, 353 (2009).
43. Larson N., Ghandehari H.: *Chem. Mater.* 24, 840 (2012).
44. Palmieri G., Cassani G., Fassina G.: *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 664, 127 (1995).
45. Morgan S. M., Al-Shamkhani A., Callant D., Schacht E., Woodley J. F., Duncan R.: *Int. J. Pharm.* 122, 121 (1995).
46. Tonnesen H. H., Karlsten J.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28, 621 (2002).
47. Sun J., Tan H.: *Materials* 6, 1285 (2013).
48. Hashimoto T., Suzuki Y., Tanihara M., Kakimaru Y., Suzuki K.: *Biomaterials* 25, 1407 (2004).
49. Gomes A., Teixeira C., Ferraz R., Prudencio C., Gomes P.: *Molecules* 22, E1743 (2017).
50. Merrifield R. B.: *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149 (1963).
51. Krchňák V., Vágner J., Šafář P., Lebl M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 53, 2542 (1988).
52. Lebl M.: *Biopolymers* 47, 397 (1998).
53. Zhang S., Tappe H., Helmling W., Mischke P., Rebsamen K., Reiher U., Russ W., Schläfer L., Vermehren P., v knize: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Elvers B., ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2017.
54. Lebl M., Eichler J., Pokorny V., Jehnicka J., Mudra P., Zenisek K., Stierandova A., Kalousek J., Bolf J. (Czech Academy of Science): US5202418A (1992).
55. Lebl M., Eichler J., Pokorny V., Jehnicka J., Mudra P., Zenisek K., Stierandova A., Kalousek J., Bolf J. (Czech Academy of Science): US5342585A (1992).
56. Pokorny V. a 11 spoluautorů, v knize: *Innovation and Perspectives in Solid Phase Peptide Synthesis* (Epton R., ed.), str. 643, Mayflower Worldwide Limited, Birmingham 1994.
57. Jezek J., Rinnova M., Lebl M.: *Proceedings of the 22nd European Peptide Symposium*, September 13. – 19. 1992, Interlaken – Switzerland (Schneider C. H., Eberle A. N., ed.), str. 306, Escom, Leiden 1992.
58. Schanté C. E., Zuber G., Herlin C., Vandamme T. F.: *Carbohydr. Polym.* 85, 469 (2011).
59. Šmejkalová D. a 10 spoluautorů: *Carbohydr. Polym.* 156, 86 (2017).
60. Huang G., Huang H.: *Drug Delivery* 25, 766 (2018).
61. Lequeux I., Ducasse E., Jouenne T., Thebault P.: *Eur. Polym. J.* 51, 182 (2014).
62. Wang X., Messman J., Mays J. W., Baskaran D.: *Biomacromolecules* 11, 2313 (2010).
63. Burdick J. A., Prestwich G. D.: *Adv. Mater.* 23, H41 (2011).
64. Ventura C., Maioli M., Asara Y., Santoni D., Scarlata I., Cantoni S., Perbellini A.: *J. Biol. Chem.* 279, 23574 (2004).
65. Bhattacharya D. S., Svehkarev D., Souček J. J., Hill T. K., Taylor M. A., Natarajan A., Mohs A. M.: *J. Mater. Chem. B* 5, 8183 (2017).
66. Lim D. K., Wylie R. G., Langer R., Kohane D. S.: *Biomaterials* 77, 130 (2016).
67. Khabarov V. N., Boykov P. Y., Selyanin M. A., v knize: *Hyaluronic Acid: Production, Properties,*

- Application in Biology and Medicine* (Polyak F., ed.), str. 216, John Wiley & Sons, New York 2015.
68. Betak J. a 12 spoluautorů (Contipro a. s.): WO2014082610 (2014).
 69. Scudlova J. a 10 spoluautorů (Contipro a. s.): WO2014082611 (2014).
 70. Foglarova M., Huerta-Angeles G., Nesporova K., Slesingrova K., Minarik A., Chmelar J., Sulakova R., Karel S., Velebny V. (Contipro a. s.): WO2016141903 (2016).
 71. Zapotocky V. a 14 spoluautorů: *Int. J. Biol. Macromol.* 95, 903 (2017).
 72. Nyska A., Schiffenbauer Y. S., Bami C. T., Maronpot R. R., Ramot Y.: *Polym. Adv. Technol.* 25, 461 (2014).
 73. Benedetti L., Cortivo R., Berti T., Berti A., Pea F., Mazzo M., Moras M., Abatangelo G.: *Biomaterials* 14, 1154 (1993).
 74. Hudson D.: *J. Comb. Chem.* 1, 403 (1999).
 75. Beer J. H., Springer K. T., Collier B. S.: *Blood* 79, 117 (1992).
 76. Singh R. a 21 spoluautorů: *Mol. Cancer Ther.* 15, 1311 (2016).
 77. Bulpitt P., Aeschlimann D.: *J. Biomed. Mater. Res.* 47, 152 (1999).
 78. Danishefsky I., Siskovic E.: *Carbohydr. Res.* 16, 199 (1971).
 79. Follain N., Montanari S., Jeacomine I., Gambarelli S., Vignon M. R.: *Carbohydr. Polym.* 74, 333 (2008).
 80. Oh E. J., Park K., Kim K. S., Kim J., Yang J.-A., Kong J.-H., Lee M. Y., Hoffman A. S., Hahn S. K.: *J. Controlled Release* 141, 2 (2010).
 81. Bellini D., Topai A. (Fidia Advanced Biopolymers s.r.l.): WO2000001733 (2000).
 82. Bergman K., Elvingson C., Hilborn J., Svensk G., Bowden T.: *Biomacromolecules* 8, 2190 (2007).
 83. Magnani A., Rappuoli R., Lamponi S., Barbucci R.: *Polym. Adv. Technol.* 11, 488 (2000).
 84. Pelletier S., Hubert P., Payan E., Marchal P., Choplin L., Dellacherie E.: *J. Biomed. Mater. Res.* 54, 102 (2001).
 85. Hirano K., Sakai S., Ishikawa T., Avci F. Y., Linhardt R. J., Toida T.: *Carbohydr. Res.* 340, 2297 (2005).
 86. Laurent T. C., Hellsing K., Gelotte B., Burton J. S., Stevens R.: *Acta Chem. Scand.* 18, 274 (1964).
 87. Nobuhiko Y., Teruo O., Yasuhisa S.: *J. Controlled Release* 22, 105 (1992).
 88. Tomihata K.: *Biomaterials* 18, 189 (1997).
 89. Zhao X. (Fermentech Medical Limited): WO2000046253 (2000).
 90. Balazs E., Leshchiner A. (Biomatrix Inc.): US4582865A (1985).
 90. Oh E. J., Kang S. W., Kim B. S., Jiang G., Cho I. H., Hahn S. K.: *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 86A, 685 (2008).
 91. Ramamurthi A., Vesely I.: *J. Biomed. Mater. Res.* 60, 195 (2002).
 92. Crescenzi V., Francescangeli A., Capitani D., Mannina L., Renier D., Bellini D.: *Carbohydr. Polym.* 53, 311 (2003).
 93. Tomihata K., Ikada Y.: *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 35, 3553 (1997).
 94. Huerta-Angeles G., Bobek M., Příkopová E., Šmejkalová D., Velebný V.: *Carbohydr. Polym.* 111, 883 (2014).
 95. Buffa R., Velebný V., Pospíšilová L., Příkopová E., Pravda M., Nikodým P., Palek L. (Contipro a.s.): WO2010105582 (2010).
- S. Karel^a, M. Flegel^b, P. Drašar^b, and V. Velebný^a**
^a Contipro a.s., ^b Department of Chemistry of Natural Compounds, University of Chemistry and Technology in Prague): **Polysaccharides in Solid Phase Peptide Synthesis**
- In the field of tissue engineering and wound healing, materials based on molecules naturally occurring in the organism, such as peptides, polysaccharides, etc., are being intensively developed and applied. In this paper, we reviewed the use of polysaccharides as carriers for solid state peptide synthesis, as they have been the subject of many studies and potential applications. The combination of polysaccharides and peptides can impart new properties to the materials obtained, and thus open an interesting new route to possible applications.
- Keywords: hyaluronic acid, polysaccharides, peptides, solid-phase peptide synthesis, cell adhesion peptides, cellulose, cotton