

7. Kombinatoriální syntéza peptidů

S rozvojem syntézy peptidů rostly požadavky
na kvantitu syntetizovaných peptidů pro bioaplikace.

Od 80. let se začínají rozvíjet techniky **vícenásobné paralelní syntézy**,
tzv. multiple parallel synthesis.

Poté už byl jen krok ke

kombinatoriální syntéze peptidů,

tzv. combinatorial peptide synthesis,

nebo-li syntéze **knihoven peptidů (peptide libraries)**, typicky ve formě **směsí**.

Např. použití 20 aminokyselin může vygenerovat až 20^6 hexapeptidů,
tj. 64 miliónů.

Výhodou kombinatoriální syntézy směsí proti paralelní syntéze jednotlivých peptidů
je, že je k tomu třeba mnohem méně reakcí.

Na **kombinatoriální syntézu** navazují i speciální techniky **testování** knihoven látek.

Principem kombinatoriální syntézy peptidů je
syntéza všech možných permutací sekvence peptidu o dané délce
a za použití daného množství aminokyselin
a jejich, pokud možno, současných, a co nejefektivnější testování.

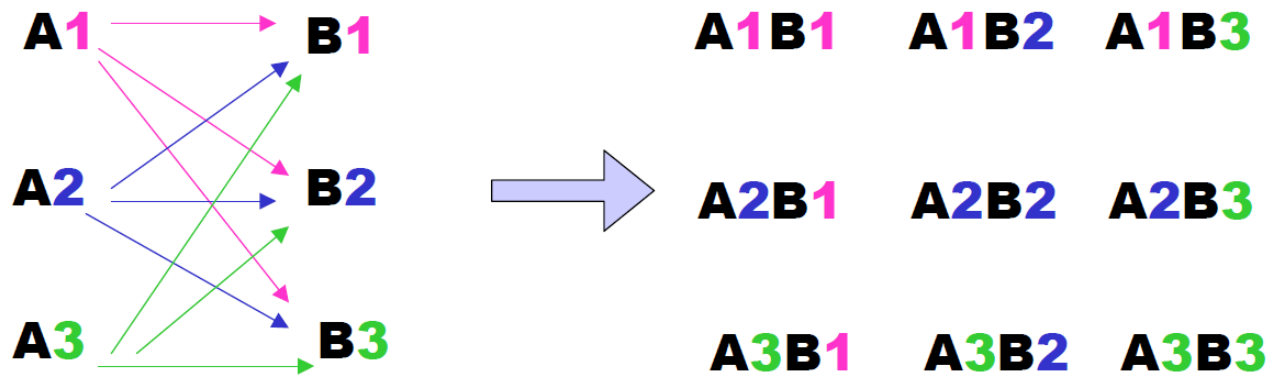
Zjednodušeně řečeno, kombinatoriální peptidová chemie spočívá v přípravě a testování
velkého množství látek (peptidů) současně a často ve směsích

Combinatorial Chemistry
searching for a needle in a haystack



Kombinatoriální syntéza peptidů: syntéza všechny možných permutací

Např. 2 pozice (A a B, dipeptidy AB), 3 aminokyseliny (1-3), tj. $3^2 = 9$ peptidů



9 different compounds

Např. při použití 20 aminokyselin:

Dipeptidy	400
Tripeptidy	8,000
Tetrapeptidy	160,000
Pentapeptidy	3,200,000
Hexapeptidy	64,000,000
Heptapeptidy	1,280,000,000

Např. syntéza 3,2 milionů pentapeptidů zvlášť (10 aminokyselin denně) by trvala 1,6 milionů dní, tedy 4400 let nepřerušované práce.

Nejjednodušší příklad: knihovna dipeptidů

Např. chceme otestovat všechny varianty dipeptidů složených z 20 aminokyselin (A_1 - A_{20}).

Takových dipeptidů je 400, tj. 20^2 (počet použitých aminokyselin^{počet pozic})

Při **paralelní syntéze** by bylo třeba k jejich přípravě 400 jednotlivých syntéz.

Kombinatoriální syntéza používá metodiky, které šetří práci:

A_x je směs
20 aminokyselin
tj. A_1 - A_{20}

Syntézou připravíme 20 směsí, tj. A_1A_x až $A_{20}A_x$

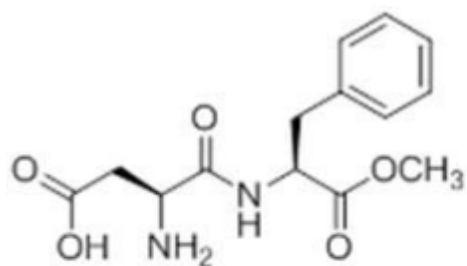
Každá z 20 směsí obsahuje 20 peptidů.

Tyto směsi otestujeme a vybereme nejlepší, tj.
např. A_7A_x .

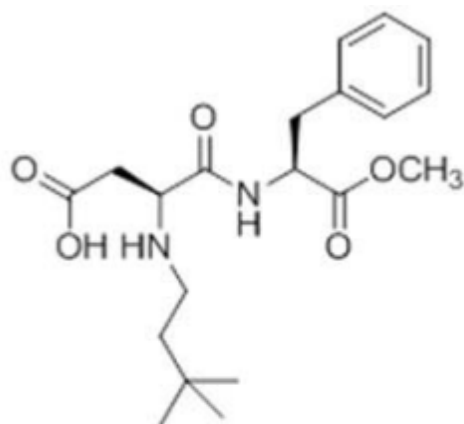
Pak už jen připravíme peptidy v této směsi obsažené,
tj. A_7A_1 až A_7A_{20} a otestujeme je a vybereme nejlepší.

K biologickému testování 400 peptidů tedy postačilo jen 40 syntéz/testů.

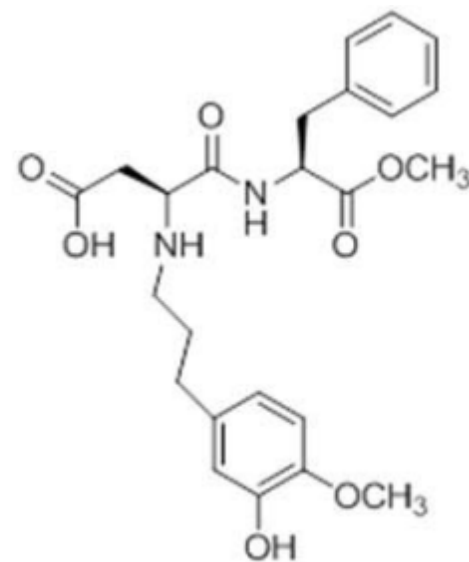
I malé dipeptidy mají smysl



Aspartame



Neotame



Advantame

37 000 x sladší než glukóza

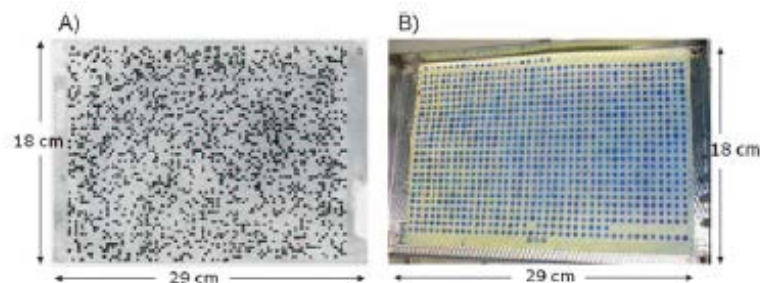
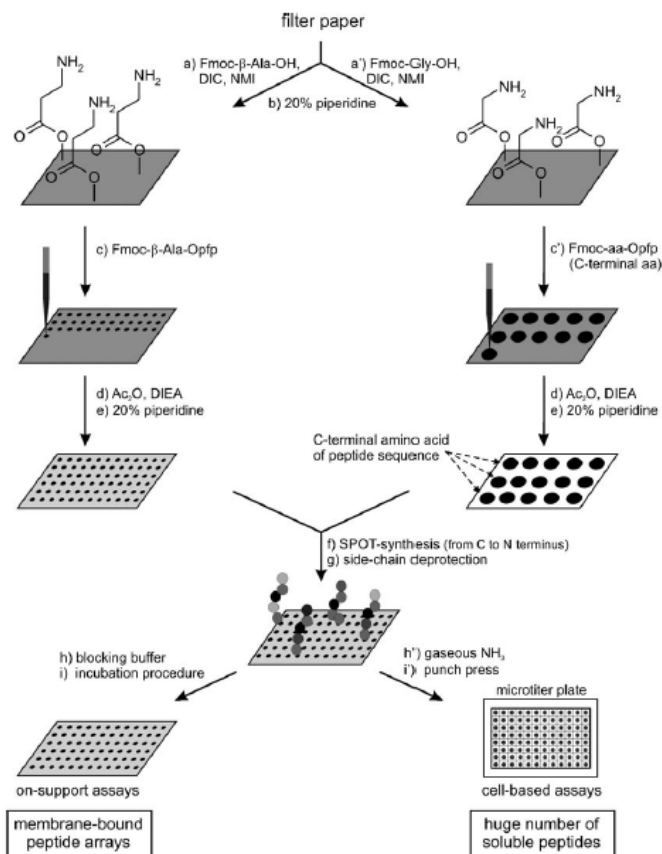
Na počátku kombinatoriální syntézy byla

Paralelní vícenásobná syntéza peptidů

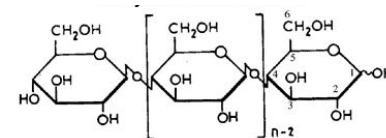
tzn. syntéza mnoha peptidů současně, ale ještě ne ve směsi

Ronald Frank v Německu, syntéza na papírových (celulózových) discích,
nejprve nukleotidy, pak peptidy, tzv. spot synthesis.

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.



Např. syntéza na bavlněném laboratorním plášti
či filtračním papíru, tj. celulóze.



Esterifikace OH skupin celulózy.

estery nejsou stálé v bazickém vodném prostředí,

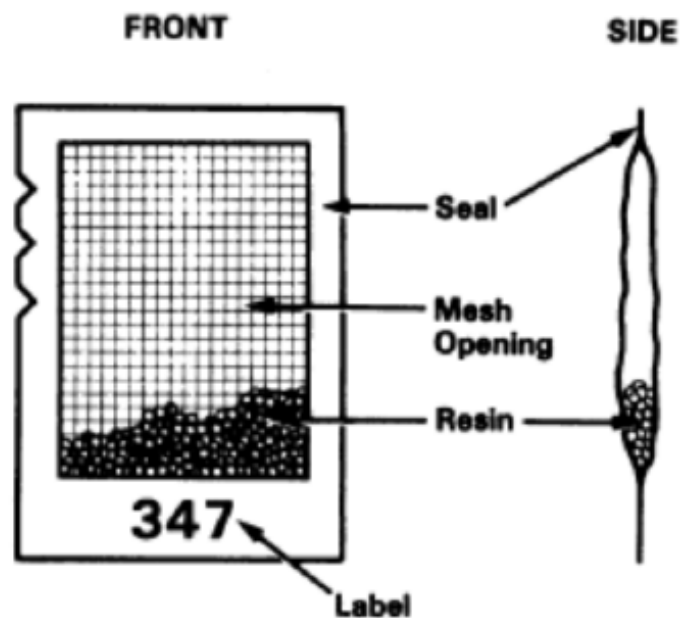
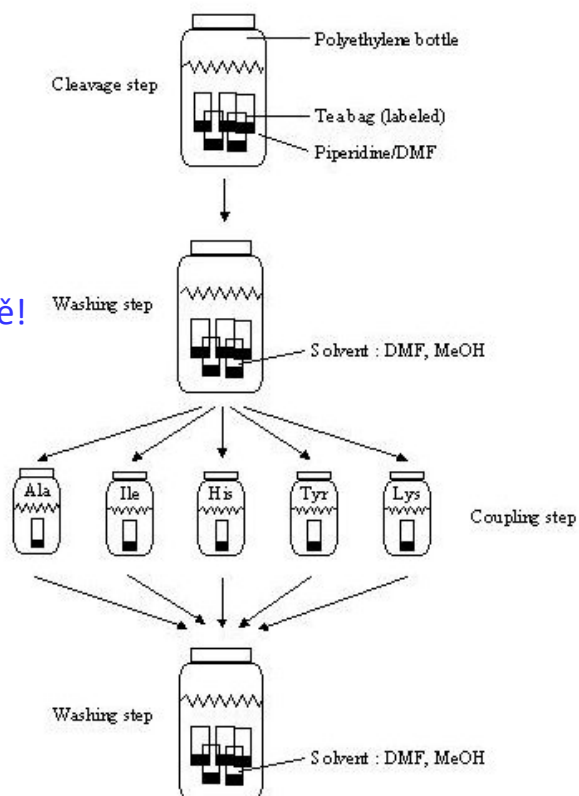
což umožňuje uvolnění peptidů do roztoku po syntéze

Paralelní syntéza peptidů

Richard Houghten v USA, syntéza v „čajových sáčkích“ (tea bags)

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.

Některé operace
se dělají společně!
Šetří to čas.



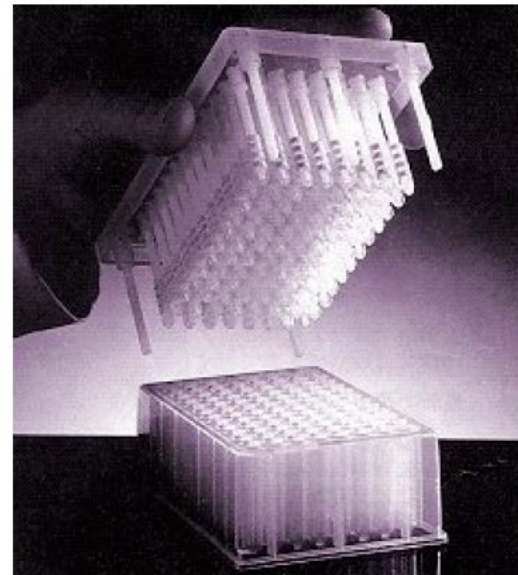
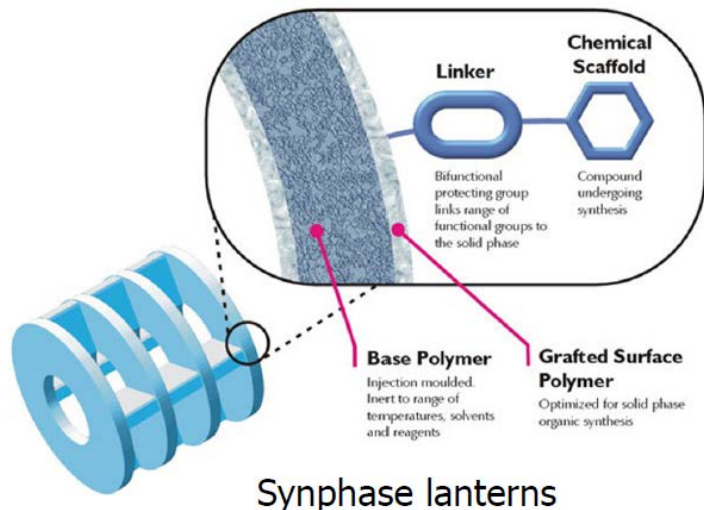
Plastový děrovaný pytlíček

Paralelní syntéza peptidů

Mario Geysen v Austrálii, syntéza na plastových tyčinkách, ztv. Multipin method

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.

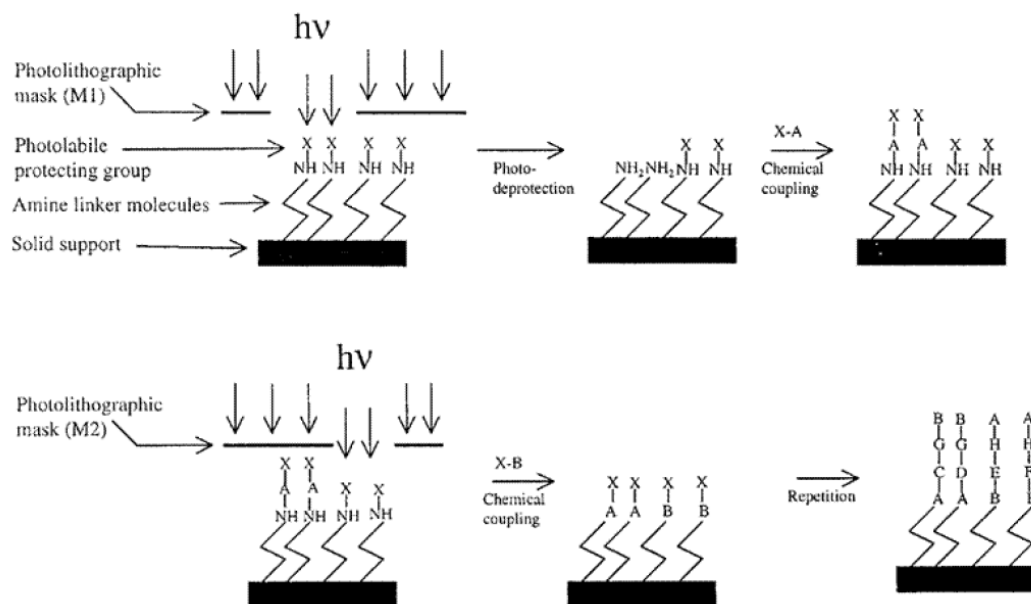
- Array of polyethylene pins (40 mm long, 4 mm in diameter) spaced to fit into the wells of conventional MTP
- Pins functionalized with linkers fitted for different purposes so that today many different applications are possible
- Loading of each pin: 100 nmol – 50 μ mol



Paralelní syntéza peptidů

Stephen Fodor, USA, průkopnická práce pro rozvoj **čipových** syntéz
Převzala firma Affymax

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.



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

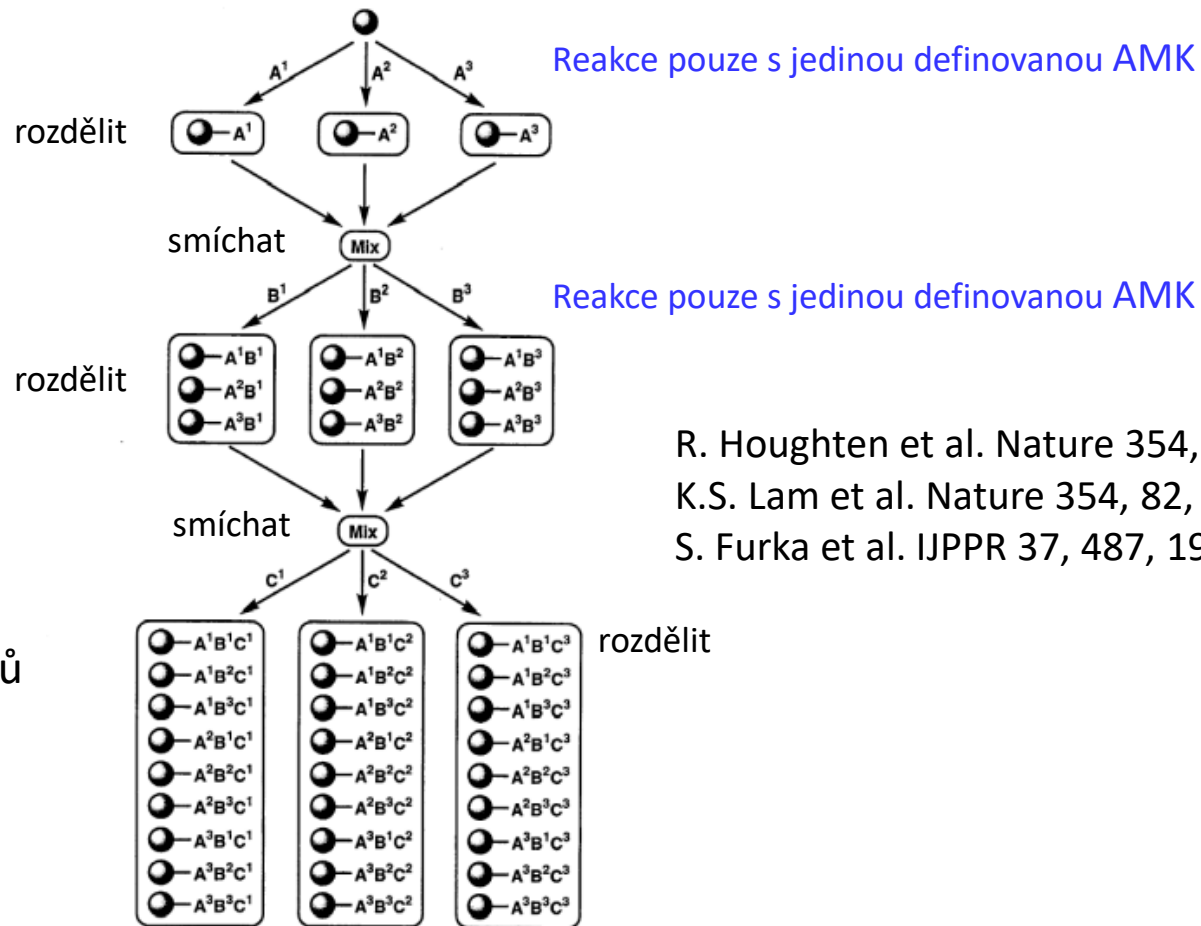
Metody syntézy a charakterizace

kombinatoriálních knihoven peptidů lze rozlišovat podle:

- Typu pevného nosiče pro syntézu (zrna pryskyřice, čipy, bavlna)
- Způsobu vytváření směsí aminokyselin (inkorporace směsi či jednotlivě)
- Způsobu jakým jsou knihovny testovány (v roztoku či imobilizované)
- Způsobu jakým jsou jednotlivé peptidy v knihovnách identifikovány

Knihovny připravené metodou syntézy typu „rozděl-smíchej“

(divide-couple-recombine, split-and-mix či portioning mixing)



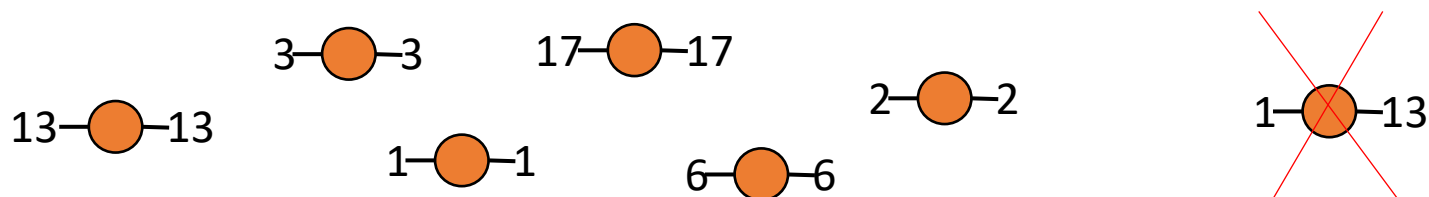
Tripeptid A-B-C
(3 pozice),
tři aminokyseliny
(1,2 a 3),
tj. $3^3 = 27$ peptidů

R. Houghten et al. Nature 354, 84, 1991
K.S. Lam et al. Nature 354, 82, 1991
S. Furka et al. JPPR 37, 487, 1991

Výsledná knihovna, tři směsi látek, se může ponechat rozdělená (podle C1, C2 a C3) či smíchat dohromady.

Syntéza typu „rozděl-smíchej“ na pryskyřici složené z kuliček polymeru generuje:

na každé kuličce pouze jeden druh peptidu (one-bead-one-compound, OBOC).



Peptidy mohou být odštěpeny z pryskyřice a testovány v roztoku, nebo testovány na pryskyřici.

Přítomnost pouze jednoho peptidu na kuličce usnadňuje identifikaci aktivních peptidů.

Je třeba použít takový počet zrn pryskyřice, který je alespoň několikrát větší než počet peptidů, aby byl každý peptid přítomen se statistickou pravděpodobností (dochází k ztrátám).

1 g typické pryskyřice (zrna o průměru 100 μm) obsahuje jeden asi milión zrn (asi 10^6).

Jedno zrno pryskyřice obvykle obsahuje okolo 200 pmol látky,

tj. okolo 0.1 μg peptidu s $M_r = 500 \text{ g/mol}$.

Smíchání pryskyřic dohromady také šetří čas protože promývání či deprotektce mohou být provedeny najednou.

První kombinatoriální knihovna peptidů připravená metodou „rozděl-smíchej“, 1982:



Arpád Furka
maďarský chemik

S. Furka et al. JPPR 37, 487, 1991

Neuvědomil si asi zcela
dosah svého objevu;
tj. OBOC + testování.

TANULMÁNY, GYÓGYÁSZATIILAG HASZNOSITHATÓ PEPTIDEK SZISZTEMATIKUS FELKUTATÁSÁNAK LEHETŐSÉGEIRŐL

Készítette Dr. Furka Árpád egyetemi
tanár, Budapest, 1982 május 29.

Többek között az eddig felfedezett peptidhormonok példája is tanúsítja, hogy a hosszabb-rövidebb peptidok az élő szervezetben számos fontos funkciót láthatnak el. Feltehető, hogy ezeknek a biológiailag aktív, és potenciális terápiás hatással bíró peptidoknak eddig csak egy kis töredékét ismerjük. Ez indokolja, hogy ezen a területen világszerte és hazánkban is, intenzív kutatómunka folyik.

Az újfajta biológiai hatással rendelkező peptidok felkutatására kétféle elvi lehetőség kínálkozik:

1. A peptidok izolálása az élő szervezetből, előzetesen felismert biológiai hatásuk alapján.

2. A peptidok szintetikus előállítása és biológiai hatásuk utólagos felderítése.

Eddig az izolációs módszer bizonyult járhatóbbnak annak ellenére, hogy ez is igen munkaigényes. Ennek az a magyarázata, hogy az adott tagszámú peptidok lehetséges száma olyan gyorsan nő a tagszámmal, hogy már a tetrapeptidok teljes számban /160 ezer/ történő előállítása is a gyakorlatban megoldhatatlan feladatnak tűnik. Ha a 20 főle fehérjealkotó aminosavat vesszük alapul, a lehetséges peptidok számát N_n a következő egyenlet fejezi ki a tagszám n -függvényében:

$$N_n = 20^n$$

Ha a peptidokat lépésenként és egymástól függetlenül állítjuk elő, az n tagú peptidok esetében az ehhez szük-

Technika ale opravdu prorazila až díky



Kit S. Lam (Nature 354, 82, 1991)
One-bead-one-compound (OBEC)



Richard Houghten (Nature 354, 84, 1991)
Iterative deconvolution vs positional scanning



Michal Lebl

**Synthetic library techniques:
Subjective (biased and generic) thoughts and views**

Viktor Krchňák* and Michal Lebl*

Selectide Corporation, a subsidiary of Hoechst Marion Roussel, 1580 E. Hanley Boulevard, Tucson, AZ 85737, U.S.A.

Molecular Diversity, 1 (1995) 193–216



Viktor Krchňák

The “One-Bead-One-Compound” Combinatorial Library Method

Kit S. Lam,^{*,†} Michal Lebl,[‡] and Viktor Krchňák[‡]

*Arizona Cancer Center, Department of Medicine, Department of Microbiology and Immunology, 1501 N. Campbell Avenue, Tucson, Arizona 85724,
and Houghten Pharmaceuticals Inc., 3550 General Atomics Court, San Diego, California 92121*

Chem. Rev. 1997, 97, 411–448

Parallel Personal Comments on “Classical” Papers in Combinatorial Chemistry

Michal Lebl*

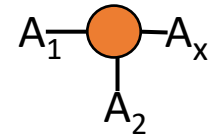
Trega Biosciences, 9880 Campus Point Drive, San Diego, California 92121

J. Comb. Chem. 1999, 1, 3–24

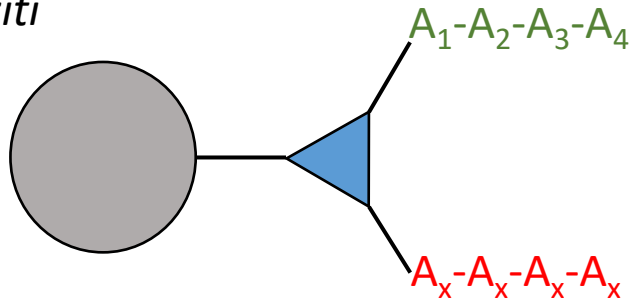
Knihovna připravená reakcí se směsí aminokyselin

Je to alternativní metoda vytváření směsí peptidů vůči metodě „rozděl-smíchej“.

Reakce se směsí AMK ale vytváří na jednom zrně pryskyřice více peptidů.



Příklad použití



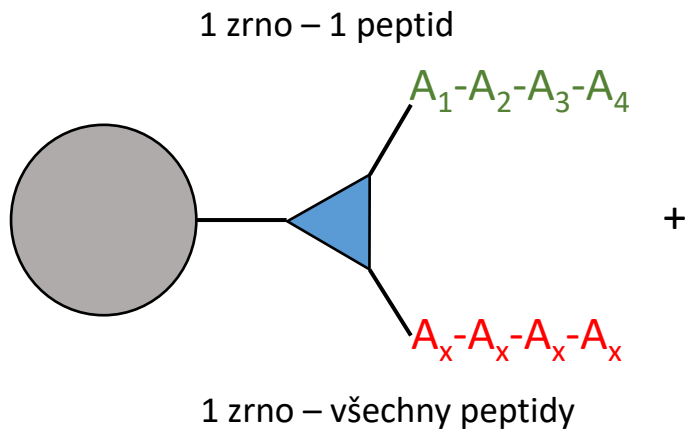
Syntéza metodou „rozděl-smíchej“
(one-bead-one-peptide)

Reakce se směsí aminokyselin
(každé zrně obsahuje všechny sekvence)

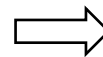
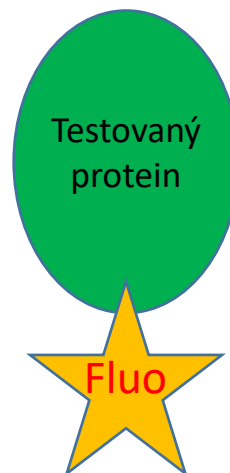
Čtyři pozice, 19 AMK, tj. $19^4 = 130\,321$ peptidů na každém rameni,
ale celkově $130\,321^2 = 16\,983\,563\,041$ látek celkem.

Kdyby se to dělalo na obou ramenech metodou „rozděl-smíchej“,
bylo by třeba nejméně 16,9 kg pryskyřice (každý peptid přítomen aspoň jednou na 1 zrně).

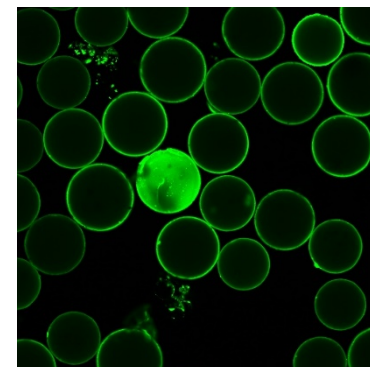
V tomto případě postačil pouze 0.5 g pryskyřice (asi 500 000 zrn s 130 321 peptidy).



+

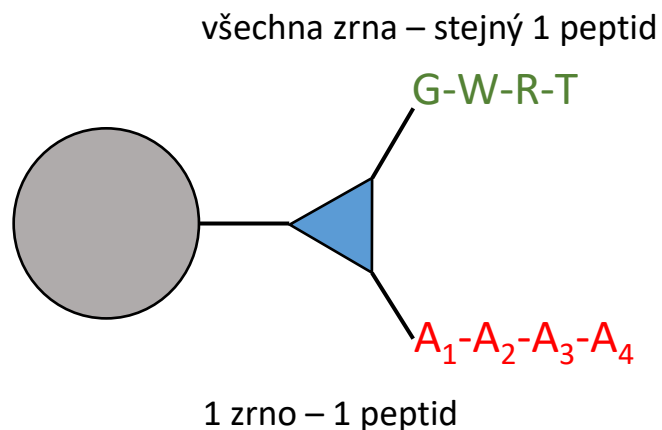


Selekce **fluo+** zrn



Sekvenace „**zeleného**“ peptidu (např. **G-W-R-T**), AA v červeném peptidu se projeví jako šum (4/20)

„**Zelené**“ peptidy jsou testovány v kontextu všech možných „**červených**“ peptidů na každém zrně.



V druhém kole zafixujeme identifikovaný „**zelený**“ peptid a sekvenace „**červeného**“ peptidu je optimalizována stejným způsobem (po syntéze metodou „*rozděl-smíchej*“).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 92, pp. 5426–5430, June 1995
Pharmacology

Library of libraries: Approach to synthetic combinatorial library design and screening of “pharmacophore” motifs

NIKOLAI F. SEPETOV*, VIKTOR KRCHNÁK*, MAGDA STANKOVÁ*, SHELLY WADE*, KIT S. LAM†, AND MICHAL LEBL*

*Selectide Corporation, 1580 East Hanley Boulevard, Tucson, AZ 85737; and †Arizona Cancer Center and Department of Medicine, University of Arizona College of Medicine, Tucson, AZ 85724

Způsoby syntézy se směsí aminokyselin

Chráněné aminokyseliny ale nemají stejnou reaktivitu.

*Reakce se AA v různém poměru
podle jejich reaktivity*

a celkově ve velkém přebytku
vůči pryskyřici, 5-10 ekvivalent

*Reakce se AA ve stejném ekvimolárním poměru,
ale v celkově v menším množství
vzhledem k amino-komponentě a použít
dlouhé reakční časy.*

Table 1 Relative Molar Ratio of Amino Acids in the Coupling Mixture When Using a 10-Fold Molar Excess^[30]

Boc-Protected Amino Acid	Relative Molar Ratio (Mol%)
Ala	3.58
Asp(OBzl)	3.70
Glu(OBzl)	3.84
Phe	2.66
Gly	3.04
His(Dnp)	3.76
Ile	18.3
Lys[Z(2-Cl)]	6.56
Leu · 0.5H ₂ O	5.23
MetO	2.42
Asn	5.64
Pro	4.56
Gln	5.61
Arg(Tos)	6.87
Ser(Bzl)	2.93
Thr(Bzl)	5.04
Val	11.9
Tyr[Z(2-Br)]	4.36

Např. při první reakci použít 0,95 ekv.
směsi 20 aminokyselin, přičemž každá AA je
v poměru 0,0475 ekv. vůči pryskyřici (1 ekv.)

Při druhé reakci použít stejnou směs
ale již v přebytku.

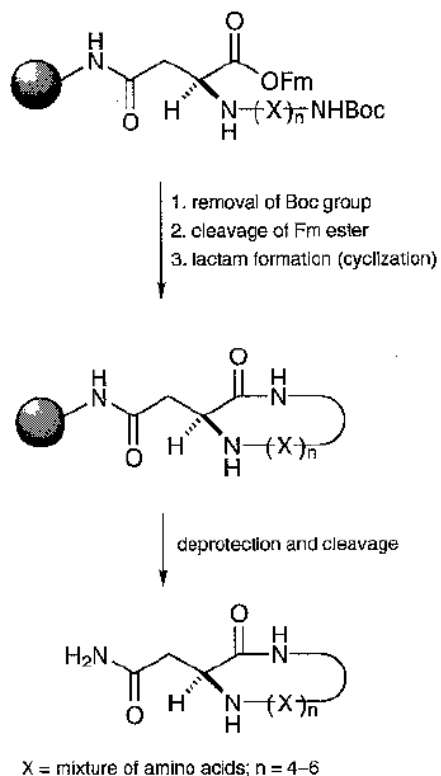
Tab. 3 Složení aminokyselinové směsi pro kondenzaci v ekvimolárním množství (Izokinetický poměr). Poměr závisí silně na chránících skupinách a postupu aktivace (levý sloupec DIC aktivace, pravý sloupec kondenzace esterů).

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

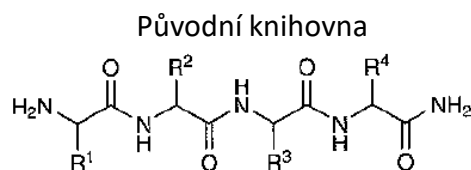
Peptidové knihovny se specifickými strukturními rysy

Je možné cokoliv co chemie dovolí, např.:

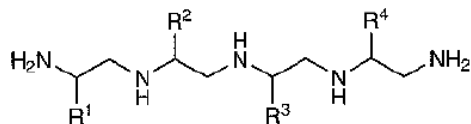
Knihovny cyklických peptidů



Knihovny peptidomimetik



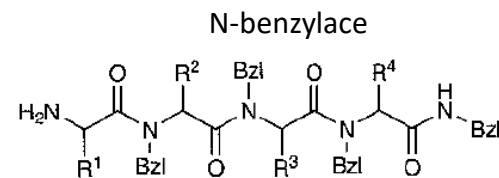
1 tetrapeptide library



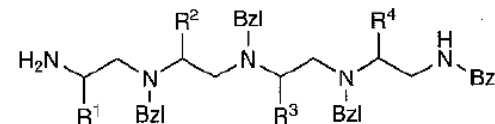
3 pentamine library

R¹–R⁴ = amino acid side chains

Oxidace peptidové vazby



2 N-benzylated tetrapeptide library



4 N-benzylated pentamine library

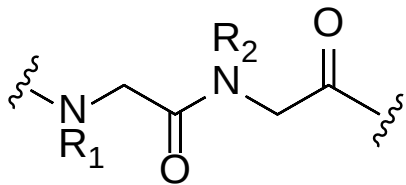
Oxidace a N-benzylace

Rozdělením původní knihovny se dramaticky zvětšila chemická diversita a chemické vlastnosti knihovny.

Houghten et al. Mol. Div. 2, 41, 1996.

Eichler et al. Mol. Div. 1, 233, 1996.

Knihovny peptoidů,
složených z N-substituovaných glycinů



Simon et al, PNAS 89, 9367, 1992

Konformačně definované
peptidové knihovny

Např. helikální peptidy

YKXXKKXXKKXKKXXKKX-NH₂

randomizované v X pozicích

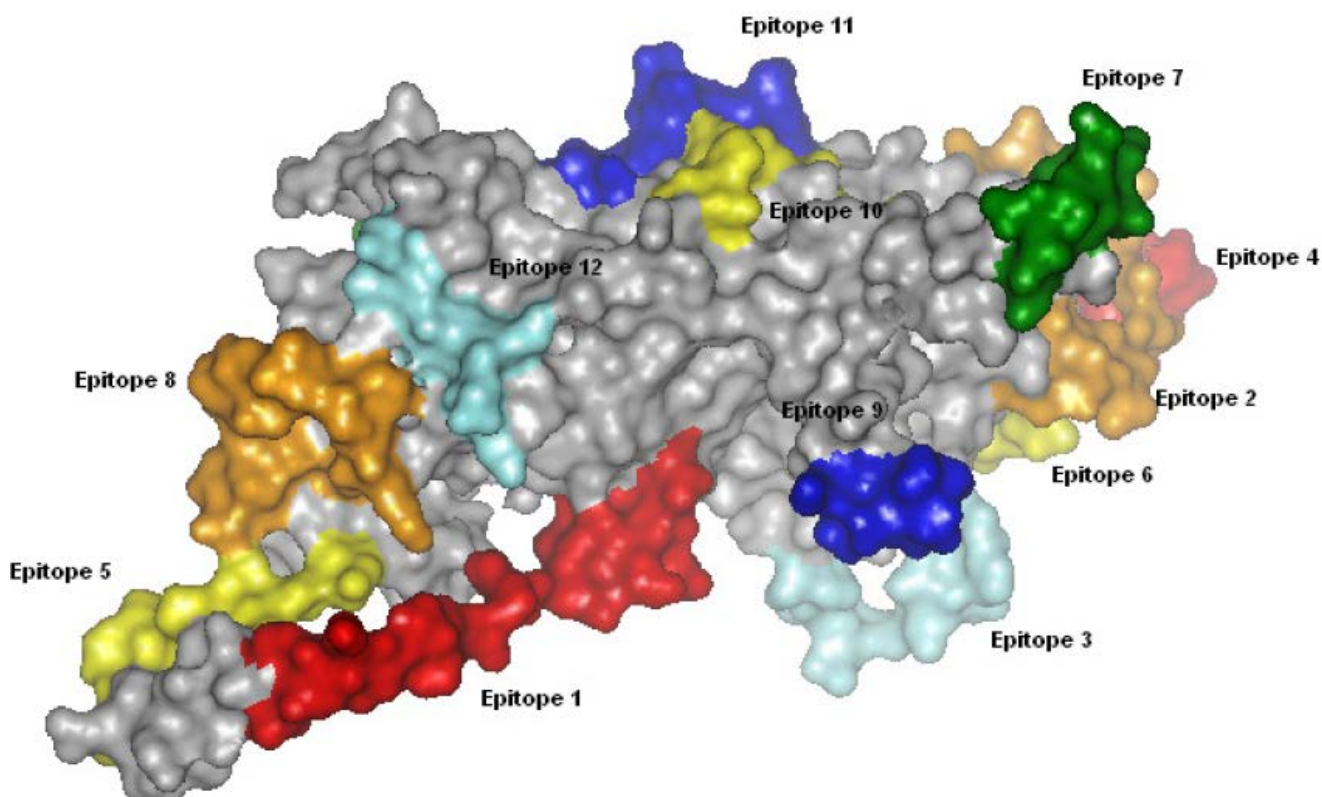
vykazovaly enzymatickou aktivitu

Pérez-Payá et al, JBC 271, 4120, 1996

Peptidové knihovny založené na molekulárních skeletech (scaffoldech)

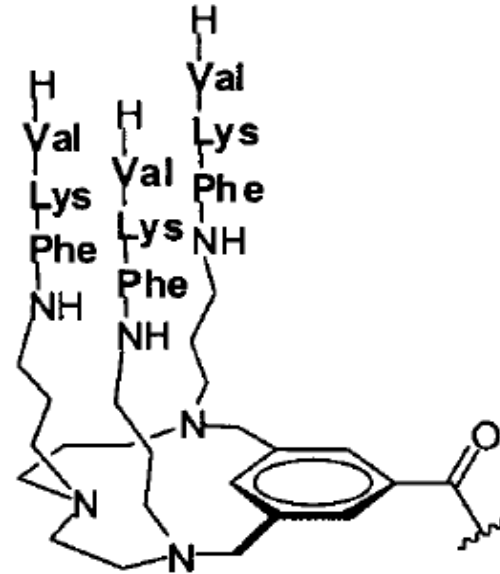
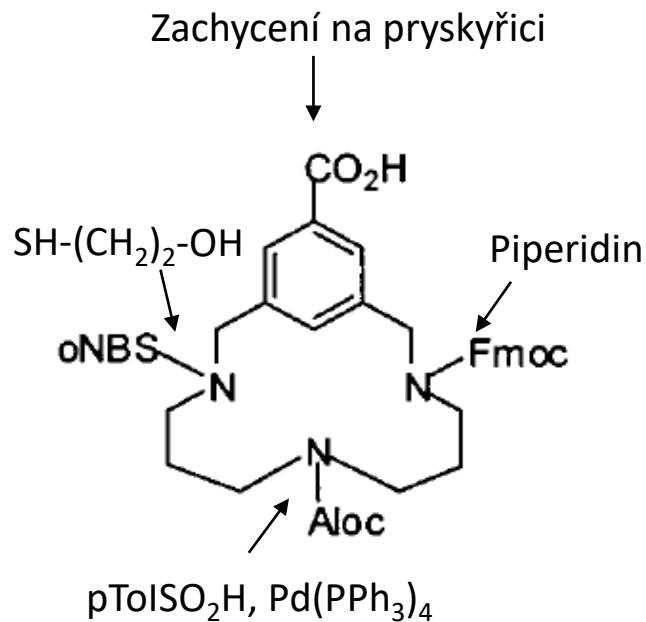
Vazebná místa (epitopy) v proteinech jsou často diskontinuální a dosti rozlehlá.

Taková od sebe vzdálená místa je těžké napodobovat/mimikovat malými molekulami či klasickými peptidy.

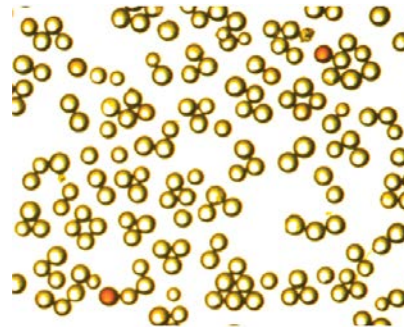
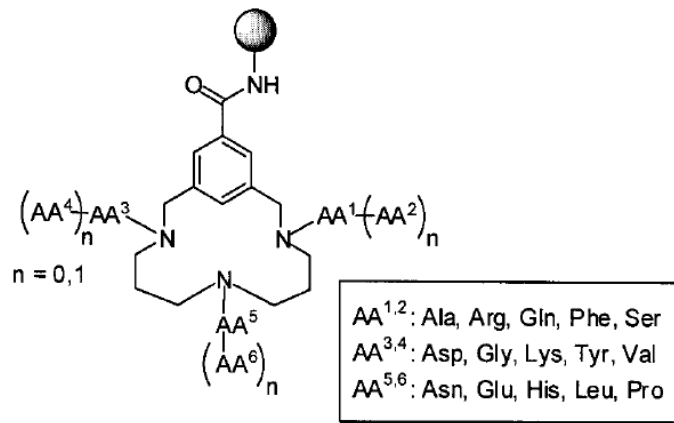


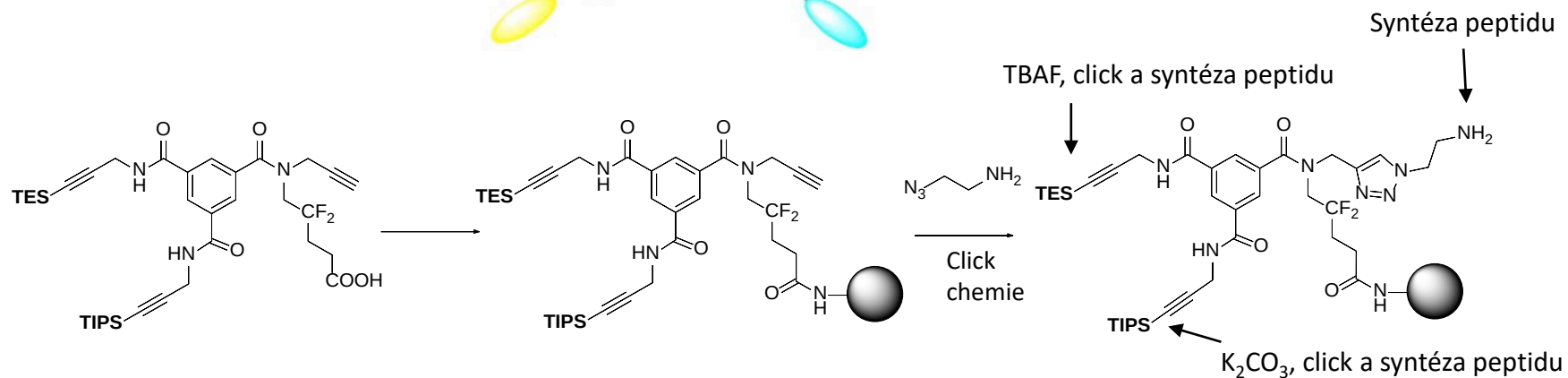
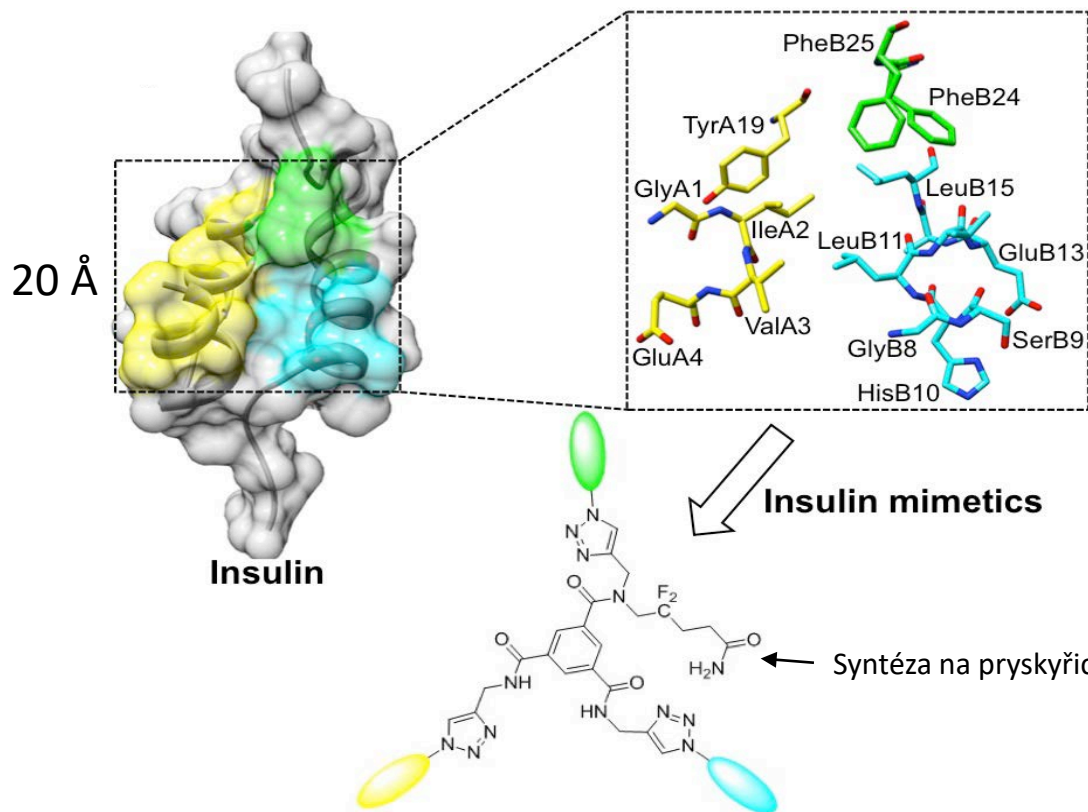
Někdy ale existují tzv. **hot-spots** – menší části vazebných míst zodpovědné za většinu afinity.

Molekulární, vícefunkční skelety (scaffoldy) mohou složit jako platformy pro syntézu několika peptidů v jedné molekule.



Byla připravena knihovna 27000 tří-ramenných látek, které byly testovány na vazbu Fe^{3+} .
Opatz et al. J. Comb. Chem. 4, 275, 2002.



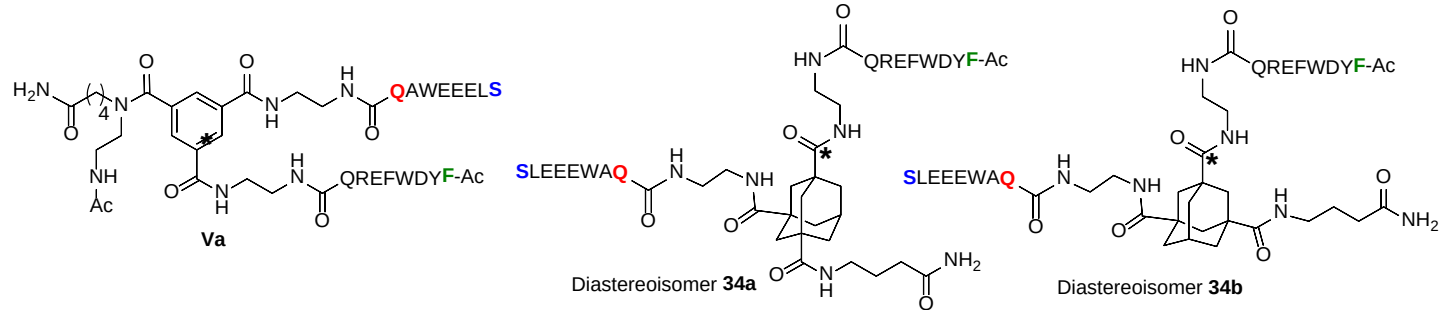


Do scaffoldu je click chemií inkorporováno raménko s aminoskupinou.

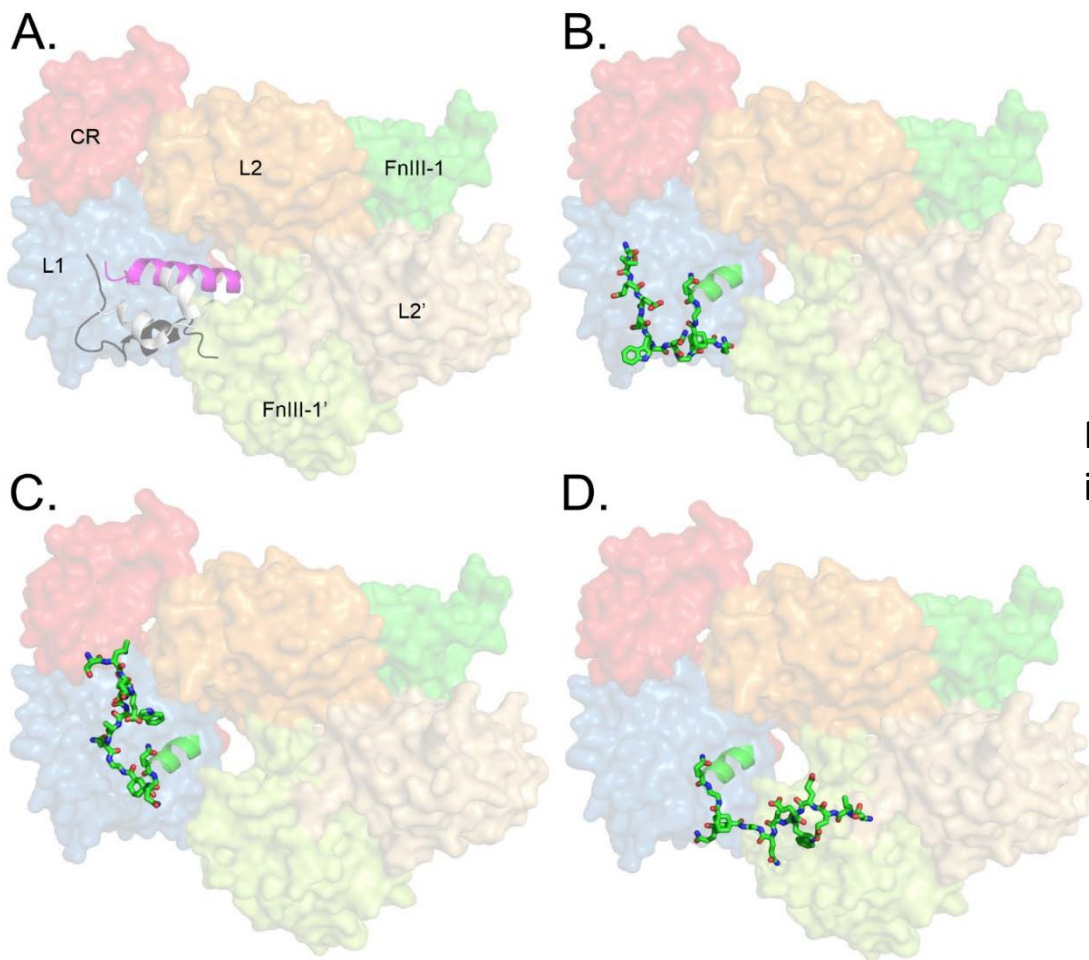
Volná aminoskupina umožňuje syntézu peptidu v první pozici.

Dále je odštěpen TES a modifikována druhá pozice, nakonec odštěpen TIPS a modifikována třetí pozice.

(Nepublikované výsledky)



Látky se vážou na receptor insulin s Kd 0,5-30 μ M



Modelování látek do komplexu insulin-receptor

Klasifikace knihoven podle způsobu, kterým jsou aktivní látky v knihovně identifikovány (tzn. *dekonvoluce*)

Iterativní knihovny

Syntéza 20 směsí O_1 -X-X-X až O_{20} -X-X-X

V testování je nejlepší O_7

Syntéza O_7 - O_1 -X-X až O_7 - O_{20} -X-X

V testování je nejlepší O_5

Syntéza O_7 - O_5 - O_1 -X až O_7 - O_5 - O_{20} -X

V testování je nejlepší O_{15}

Syntéza O_7 - O_5 - O_{15} - O_1 až O_7 - O_5 - O_{15} - O_{20}

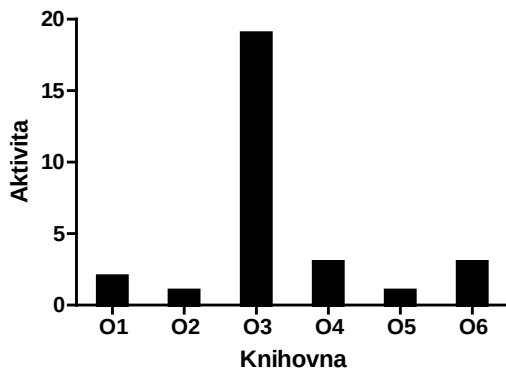
V testování je nejlepší O_{11}

Výsledný neaktivnější peptid O_7 - O_5 - O_{15} - O_{11}

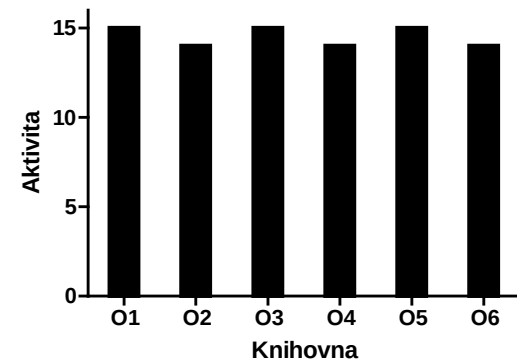
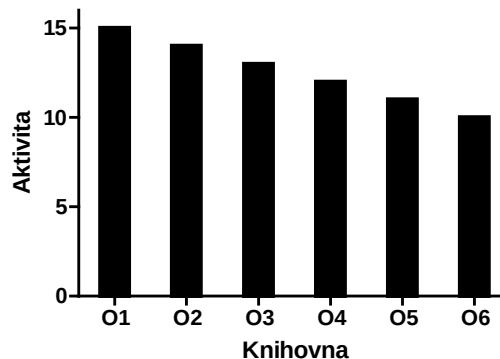
Výhodou zde je, že s postupnou iterací neustále ubývá peptidů v knihovnách.

Klesá tak riziko, že pokud je v knihovně aktivní jen jeden, nebude objeven díky jeho přílišnému ředění nebo ztrátě.

Ideální případ



Někdy může být selekce obtížná



Posiční skenování (positional scanning)

1st sublibrary	2nd sublibrary	3rd sublibrary	4th sublibrary	5th sublibrary	6th sublibrary
AXXXXX	XAXXXX	XXAXXX	XXXAXX	XXXXAX	XXXXXA
CXXXXX	XCXXXX	XXCXXX	XXXCXX	XXXXCX	XXXXXC
DXXXXX	XDXXXX	XXDXXX	XXXDXX	XXXXDX	XXXXXD
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
VXXXXX	XVXXXX	XXVXXX	XXXVXX	XXXXVX	XXXXXV
WXXXXX	XWXXXX	XXWXXX	XXXWXX	XXXXWX	XXXXXW
YXXXXX	XYXXXX	XXYXXX	XXXYXX	XXXXYX	XXXXXY

X = mixture of amino acids

Testování:

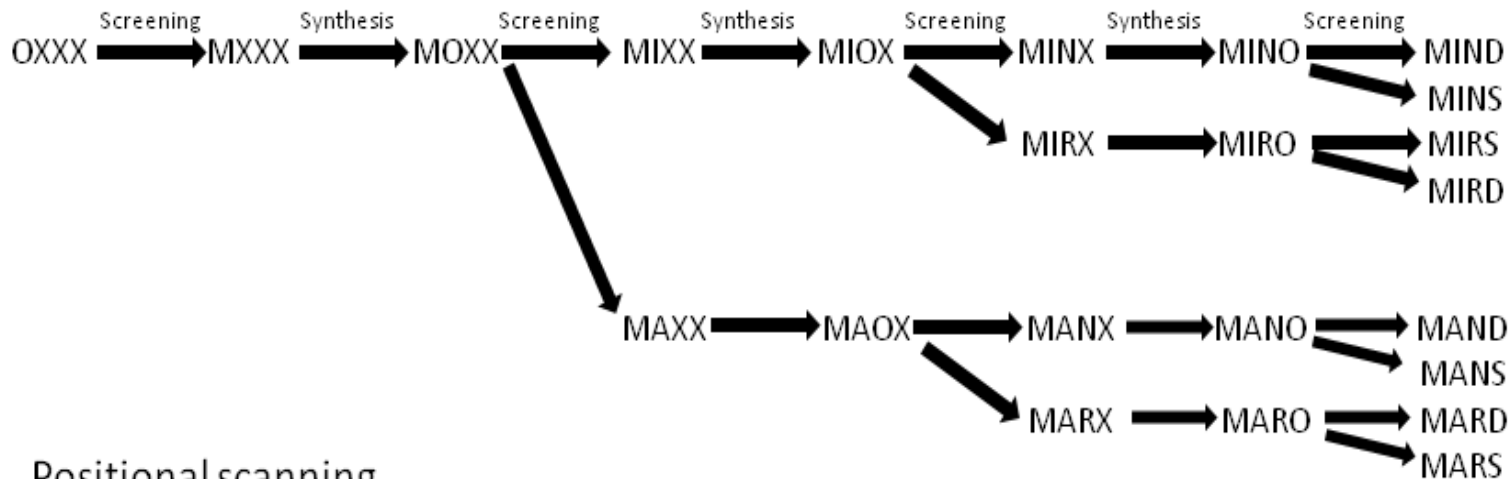
↓	↓	↓	↓	↓	↓
D, E	K	I, L, V	F, Y	N, Q	W

Syntéza a testování všech kombinací peptidů: $2 \times 1 \times 3 \times 2 \times 2 \times 1 = 24$ peptidů

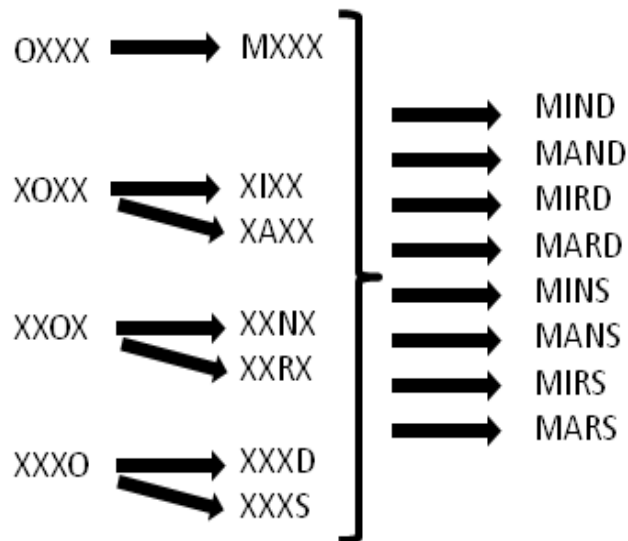
Výhodou je, že by nemělo dojít k opomenutí některé z látek.

Nevýhodou je, že látky jsou stále testovány ve formě velmi komplexních směsí, ve velkém ředění, takže může dojít k opominutí aktivní látky.

Iterative



Positional scanning



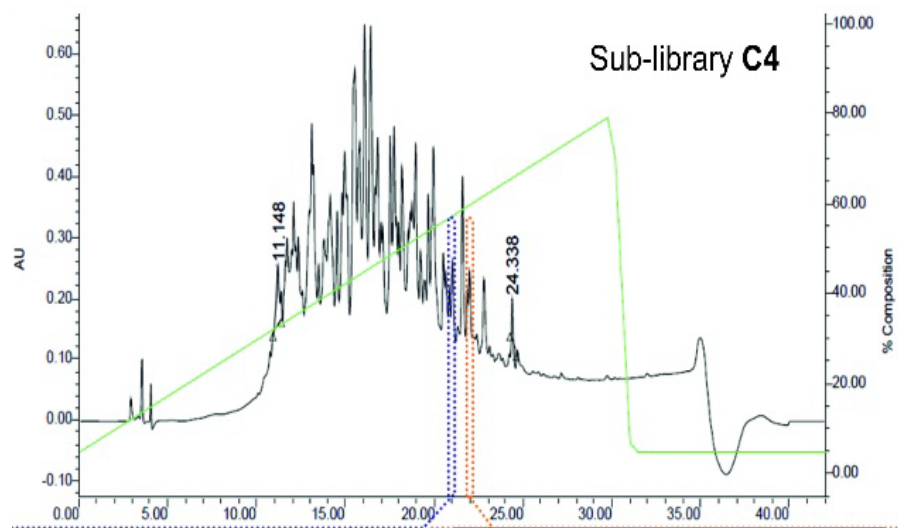
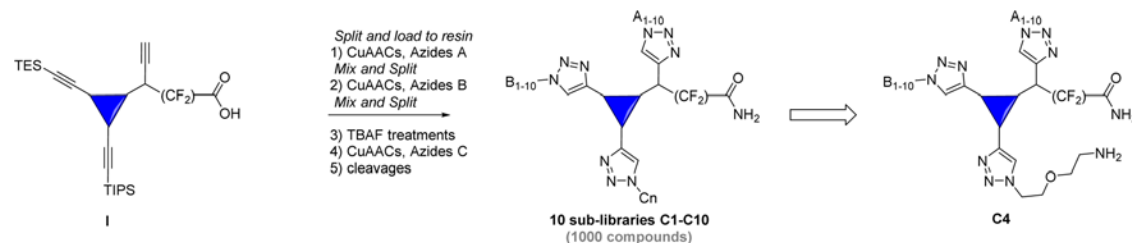
Porovnání obou technik
Výsledek by měl být stejný

OXXX = AXXX, DXXX, EXXX, FXXX, GXXX, ..., YXXX (O = defined position, X = mixed position, other letter = individual amino acid)

Analýzy peptidových knihoven

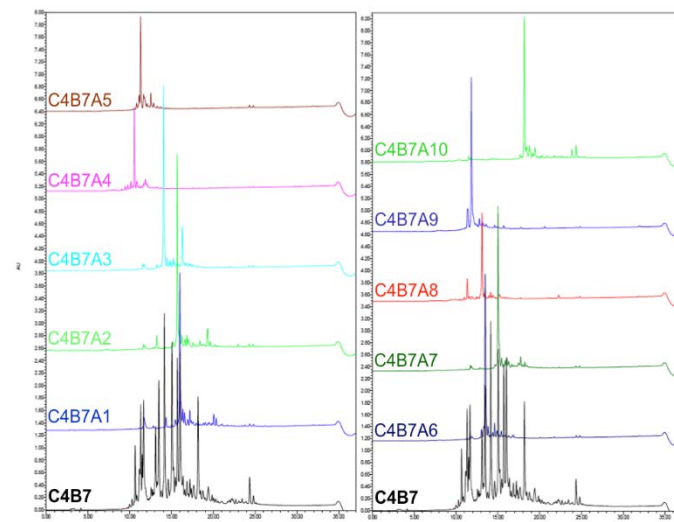
HPLC: V případě komplexnějších směsí (100 látek) je chromatografická analýza obtížná.

First Library

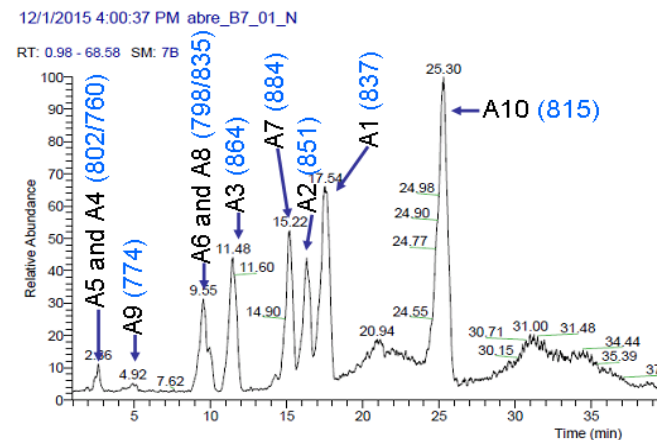


100 látek, klasické HPLC

10 látek, HPLC porovnání



10 látek, LC-MS



Analýzy peptidových knihoven (směsí látek)

Aminokyselinová analýza – informace o ekvimolárním zastoupení, ale ne o sekvenci

Hmotnostní spektrometrie – analýzu je možné porovnat s teoreticky vypočítaným spektrem
např. Peptide Companion software

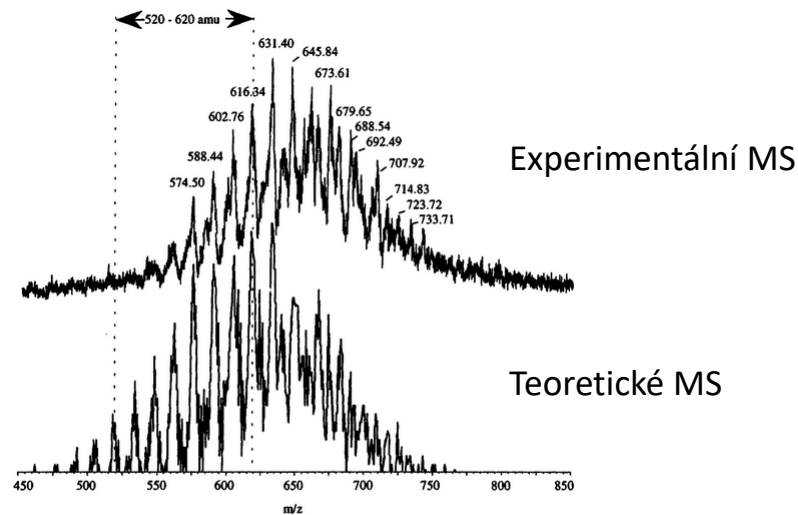
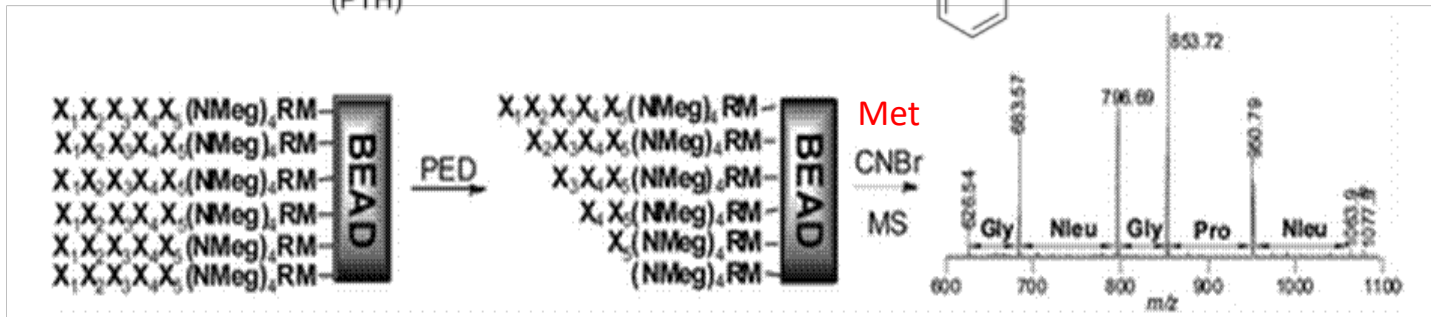
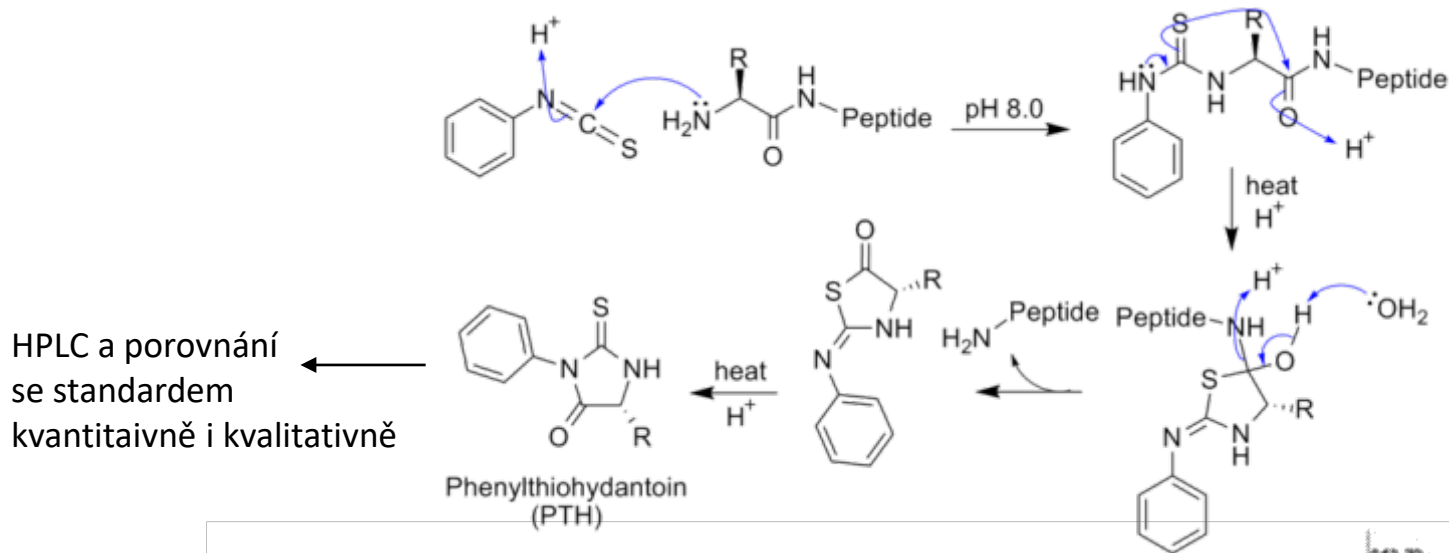


Figure 7-12. ESI mass spectrum of the 5832-component cyclic hexapeptide mixture c[FAXXXG] (X = 17 L-amino acids and Gly except Cys and Trp) (top) and calculated mass distribution of the $[M + H]^+$ ions (bottom).

Hmotnostní spektrometrie – fragmentační spektra, identifikace sekvence peptidu

N-terminální sekvenace (Edmanovo odbourávání) – informace o aminokyselinách v jednotlivých pozicích

Edmanovo odbourávání



- Příklad rychlé sekvenční analýzy částečnou Edmanovou degradací (PED), následovanou MALDI hmotnostní spektrometrií

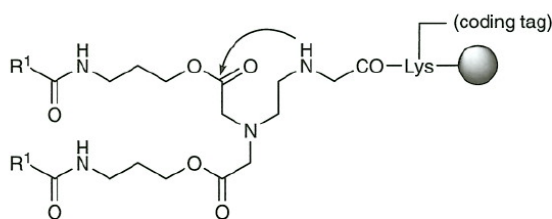
Kuličky nesoucí unikátní sekvenci se podrobí několika cyklům reakce se směsí fenyl isothiokyanátu (PITC) a 9-fluorenylmethyl chlormravenčanu (Fmoc-Cl) v poměru 1:3 (mol/mol). Tím je získána řada N-terminálně zkrácených produktů. Nakonec je Fmoc skupina odstraněna pomocí piperidinu. Výsledná směs s plnou délkou sekvence a všemi jeho zkráceními je pak analyzována MALDI hmotnostní spektrometrií.

Značení knihoven (tagging)

dobré např. případě, že knihovny obsahují **nesekvenovatelné** sekvence, je obtížné látky identifikovat, anebo když se část peptidu odštěpuje pro testování.

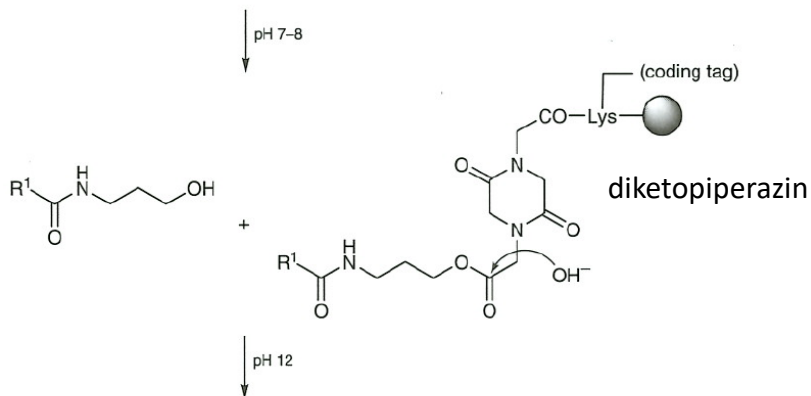
Vícefázové uvolňování látek z pryskyřice (IDA-DC linker)

Dvě kopie stejných látek



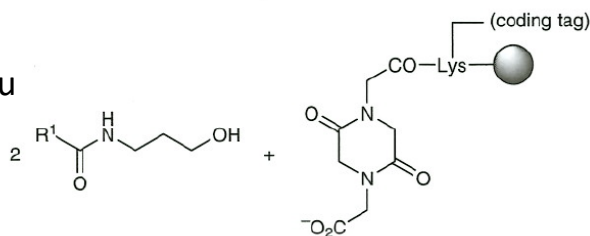
Třetí kopie látek,
případně peptidová značka

Testování v roztoku



diketopiperazin

Případně druhé testování v roztoku



Možnost sekvenace peptidů značky

Lebl et al, Methods, 1995

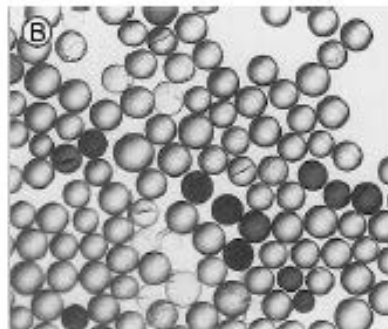
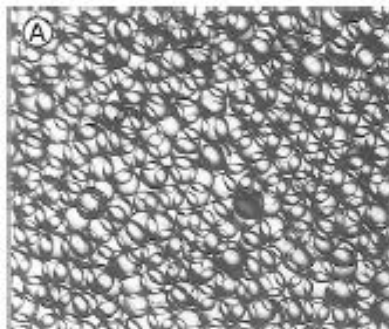
Metody testování knihoven

Přímé měření biologické aktivity s peptidy na pryskyřici.

Je to typické pro **one-bead-one-peptide** (OBOC) knihovny.

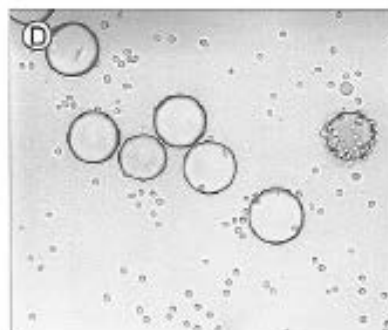
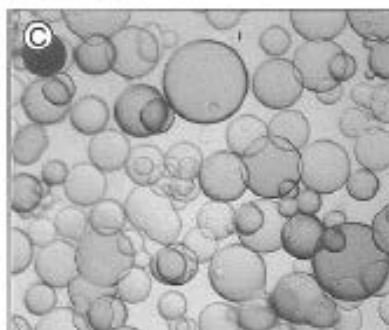
"One-Bead-One-Compound" Combinatorial Library Method

Chemical Reviews, 1997, Vol. 97, No. 2 483



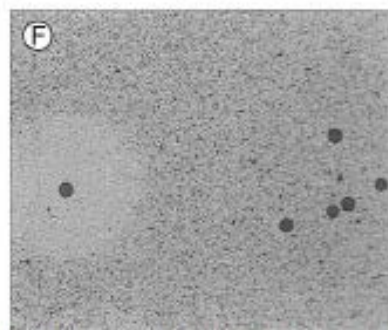
Kolorimetrický esej s enzymem,
Např. štěpení „zhášeného“
fluorescenčního substrátu

Je přidán fluorescenčně značený protein.
Různě zabarvená zrna.
Čím tmavší, tím aktivnější.



Kolorimetrický esej s enzymem.

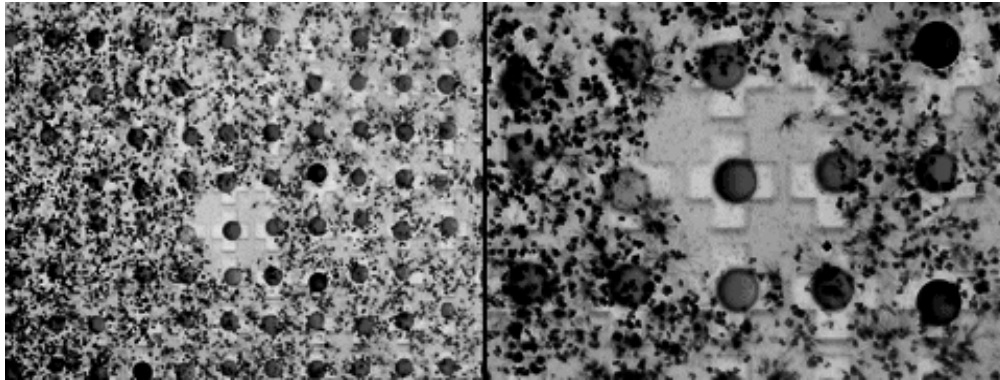
Přímý esej zrn s buňkami.



Kolorimetrický esej s enzymem.

Světlá zóna okolo zrna uvolňujícího
peptidy značí aktivitu proti
rakovinným buňkám či bakteriím.

Test vlivu látek na pryskyřici na přežití buněk



- Test životaschopnosti buněk
- Dedikovaná mikrofabrikovaná mikrotitrační destička
- Mikronádobky pro pouze jednu kuličku (120 μm)
- „Okénko“ v buněčném trávníku - zdroj cytotoxického peptidu

Morten Meldal
 Carlsberg Laboratory,
 Department of Chemistry,
 Gamle Carlsberg Vej 10,
 DK-2500 Valby,
 Denmark

The One-Bead Two-Compound Assay for Solid Phase Screening of Combinatorial Libraries

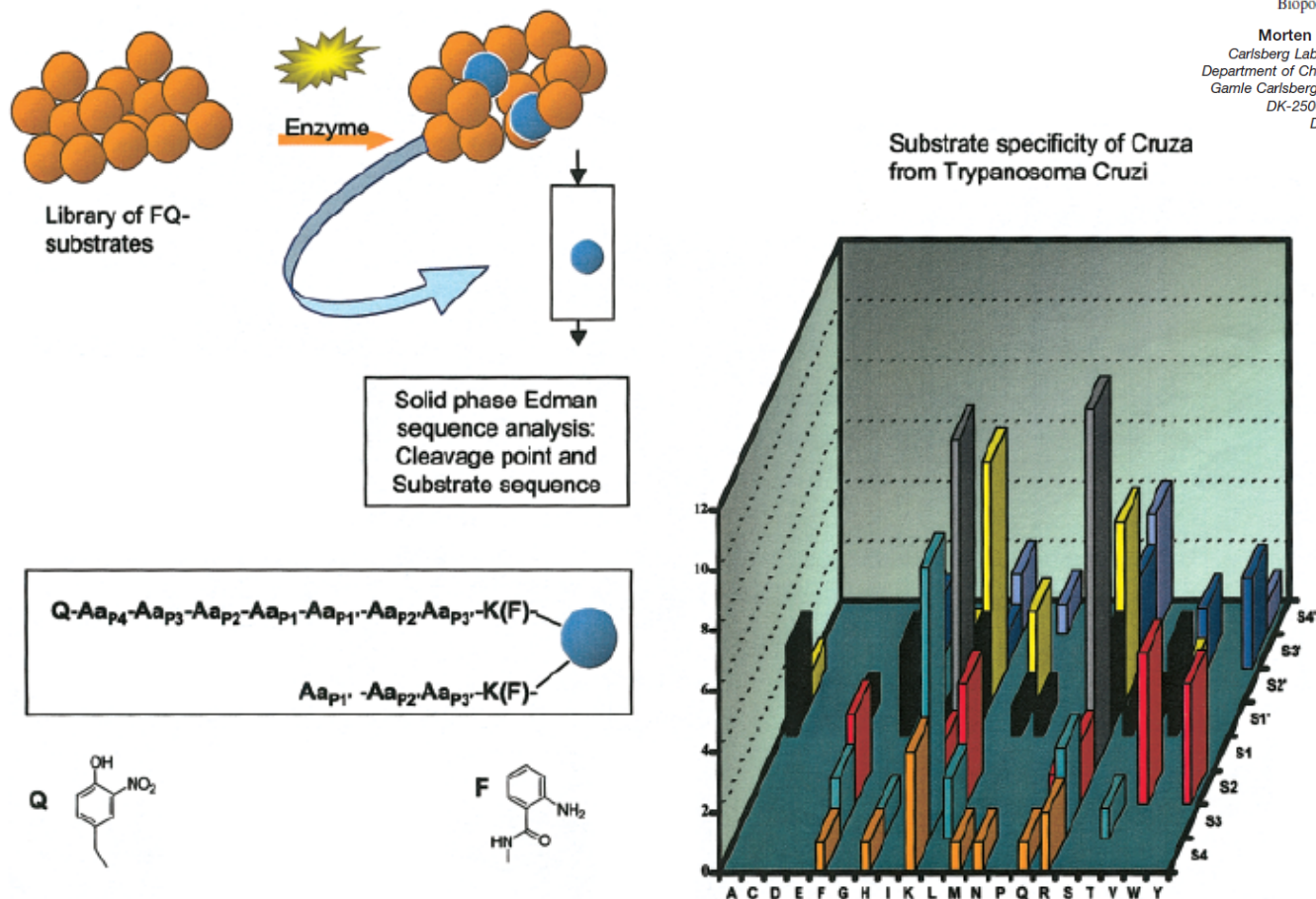


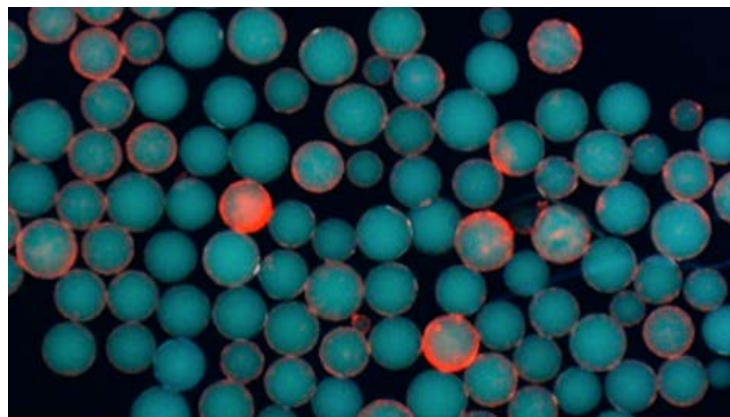
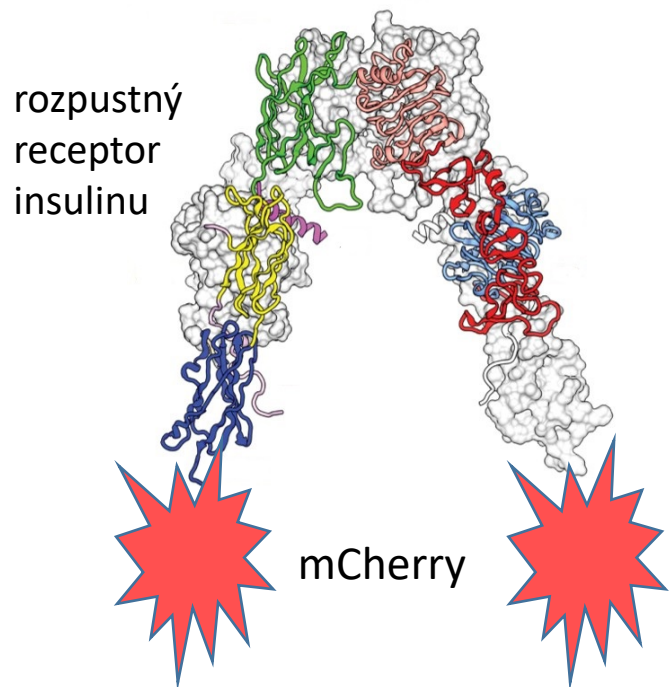
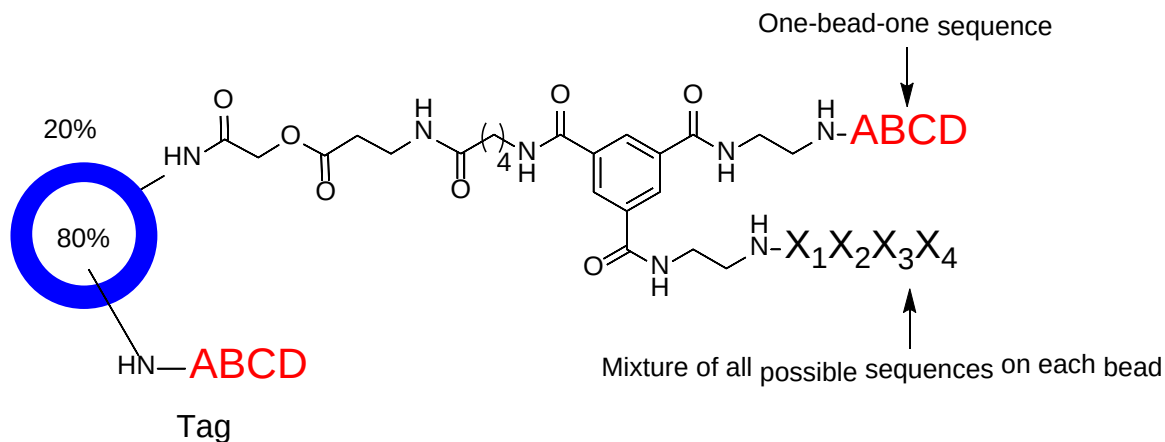
FIGURE 1 The principle of the single-bead FRET substrate assay. Cleavage of the fluorescence-quenched substrate by the enzyme leads to increased fluorescence, and active beads are subjected to Edman sequence analysis to provide both the preferred substrates for the enzyme as well as the cleavage point. The statistical distribution of residues is plotted against subsite for Cruzain.

Meldal a spol.¹⁸ připravili knihovnu interně zhasených 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.

Naše knihovny

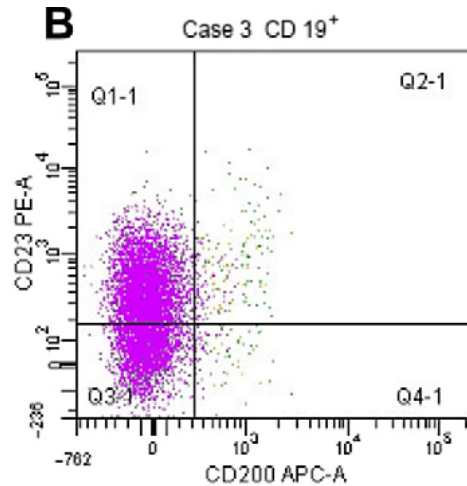
"Library of libraries (Michal Lebl)"

Dvouvrstvá and „tagovaná“ zrna
pro snazší identifikaci peptidu



Výsledek screeningu

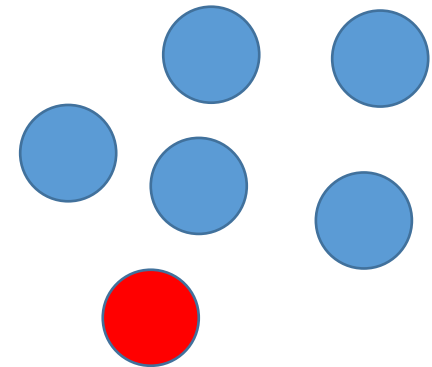
Identifikace aktivních (fluoreskujících) zrn pryskyřice pomocí FACS (fluorescent activated cell sorting)



Protein našeho zájmu s **Fluo značkou**



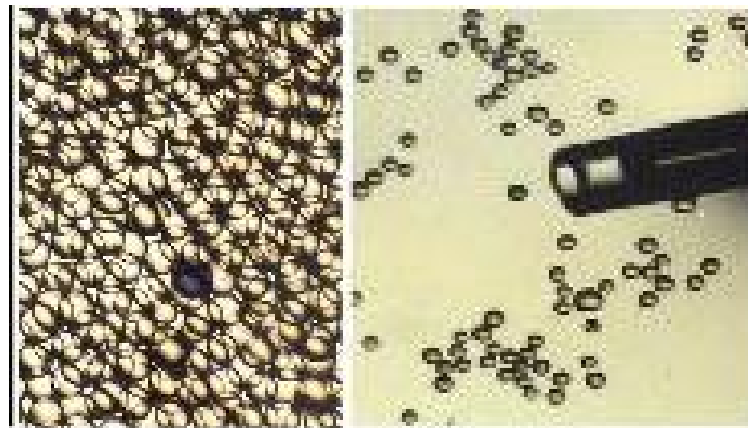
knihovna zrn s ligandy



FACS selekce zrna s aktivním ligandem,
na který se „nalepil“
protein se značkou



Manuální selekce aktivního zrna pod mikroskopem



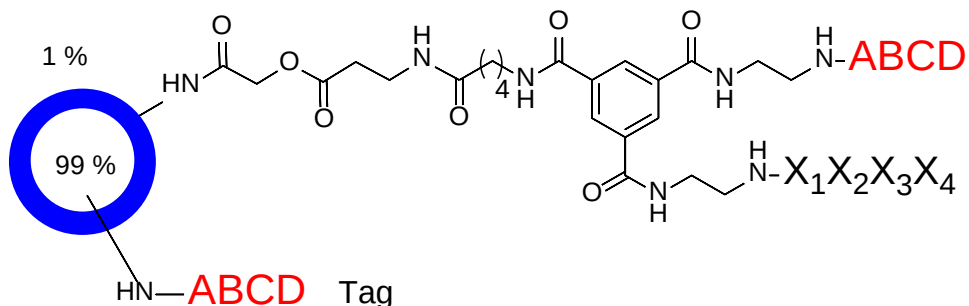
Problém nespecifické vazby při přímém testování na zrnech

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 deseti-peptidu 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.

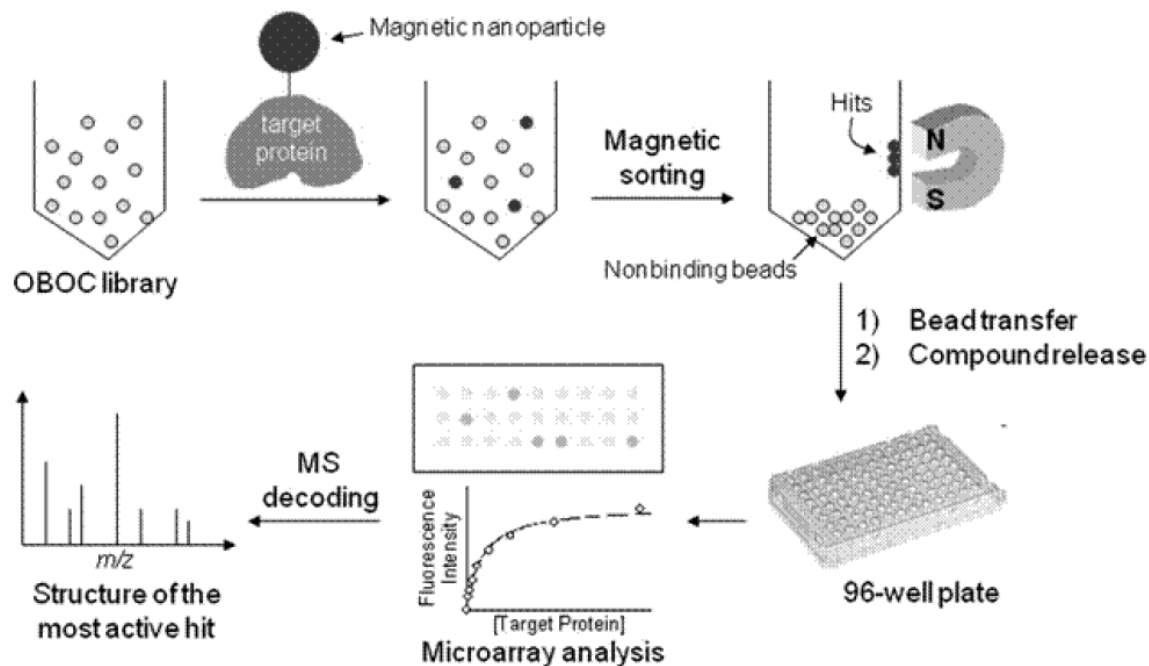
Řešením může být snížení koncentrace na povrchu zrn až na 1-0,1% původní hustoty a dvouvrstvá zrna (na povrchu nízká substituce, uvnitř vysoká).

Protein nevstupuje dovnitř zrn.



Izolace aktivních zrn pomocí proteinu zachyceného na magnetických nanočásticích

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.



Obr. 11 Schéma integrovaného magnetického screeningu a testování interakce pomocí polí na destičce (microarrays). TentaGelové kuličky (75 μm) 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 nanесou na podložní skříčko 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.

Testování biologické aktivity po uvolnění látek do roztoku.

Je to typické pro peptidy připravované v definovaných směsích.

Příklad metody *iterativní dekonvoluce*, která zahrnuje opakování cyklu „syntéza, testování, výběr“

Table 2 Screening and Iterative Deconvolution of a Dual-Defined Hexapeptide Library against mAb 17/9^[52]

Step	Peptide Mixture ^a	Number of Mixtures× Peptides per Mixture	Total Number of Peptides	IC ₅₀ (nM)
screening	Ac-OOXXXX-NH ₂	400×130321	52128400	58000
selection	Ac-DVXXXX-NH ₂	1×130321	130321	
screening	Ac-DVOXXX-NH ₂	20×6859	137180	15000
selection	Ac-DVPXXX-NH ₂	1×6859	6859	
screening	Ac-DVPOXX-NH ₂	20×361	7220	1100
selection	Ac-DVPDXX-NH ₂	1×361	361	
screening	Ac-DVPDOX-NH ₂	20×19	380	40
selection	Ac-DVPDYX-NH ₂	1×19	19	
screening	Ac-DVPDYO-NH ₂	20×1	20	2
selection	Ac-DVPDYA-NH ₂	1×1	1	

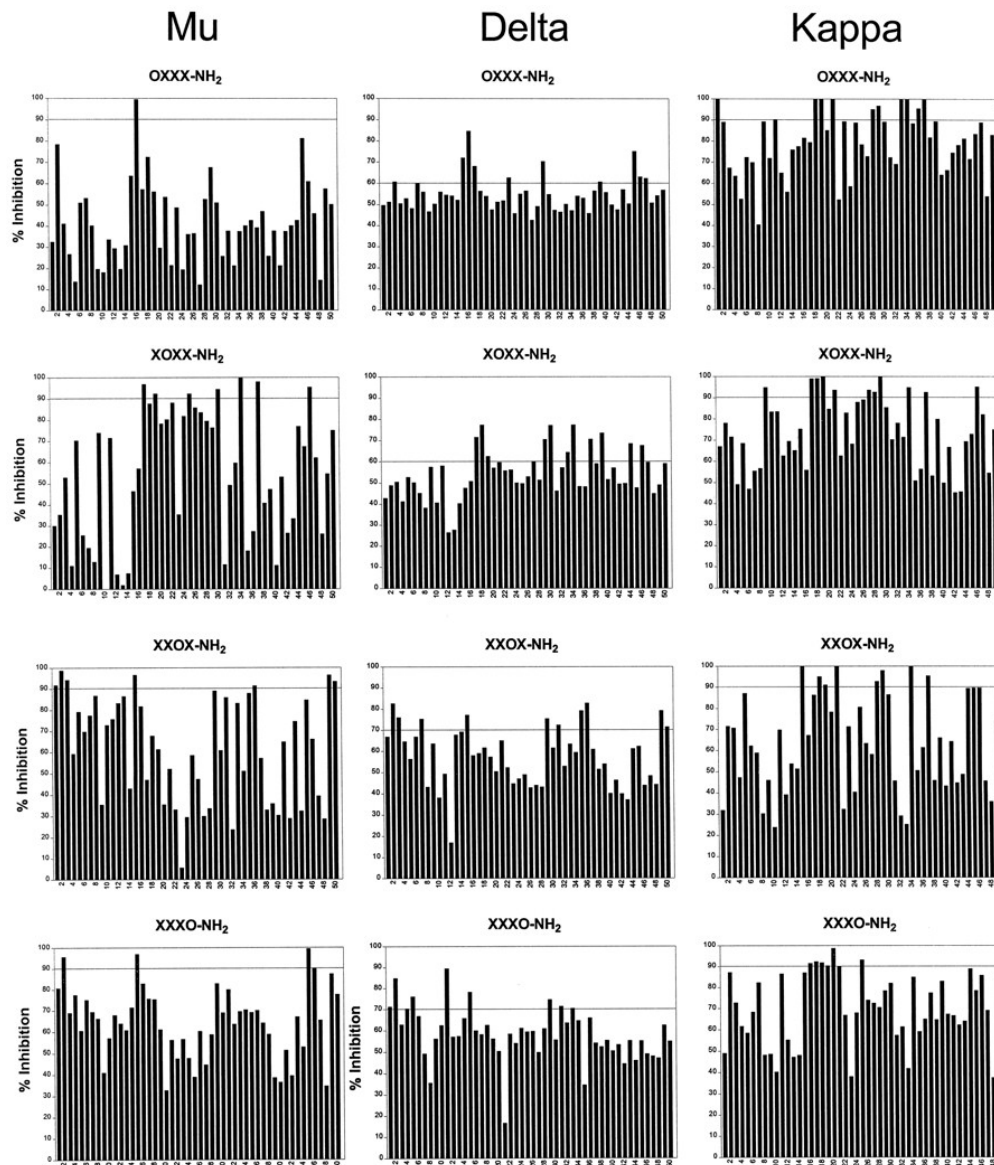
^a O = one of the 20 proteinogenic amino acids; X = a mixture of 19 proteinogenic amino acids excluding Cys (see Section 4.3.7.3.2.1).

Postupným testováním a zužováním výběru by se mělo dospět k neaktivnější látce.

Příklad aplikace pozičního skenování

Skenování tetrapeptidové
knihovny pro inhibici vazby
selektivních ligandů μ , δ , a κ
receptorů

Dooley, C.T., et al. *J. Biol. Chem.*
273,18848-18856 (1998).



Vývoj selektivních inhibitorů peptidáz 24-15 a 24-16 za pomoci kombinatoriální chemie

Endopeptidáza 24-15 (thimet oligopeptidáza, 3.4.24.15)

Endopeptidáza 24-16 (neurolysin, 3.4.24.16)

Velmi podobné enzymy, *in vitro* štěpí podobné substráty.

Pro studium jejich funkce *in vivo* bylo třeba vyvinout selektivní a silné inhibitory.

Neselektivní nanomolární inhibitor obou peptidáz

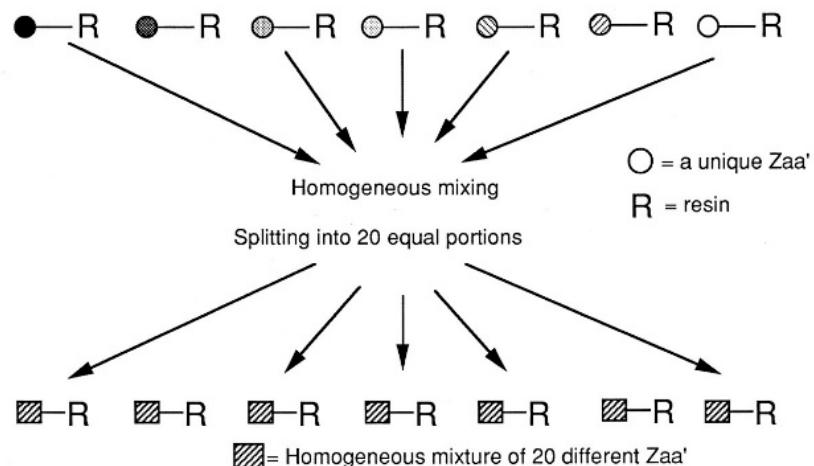
Inhibitors $-P_1$ — $P_1'-P_2'-P_3'-$	K_{i24-15}	K_{i24-16}	Selectivity
	<i>nM</i>	<i>nM</i>	
$Z_{(L)}Phe\Psi(PO_2NH)Gly-Pro-Nle$ (1)	3	5	1.7
$Z_{(L)}Phe\Psi(PO_2CH_2)Gly-Pro-Nle$ (2)	10	12	1.2
$Z_{(D)}Phe\Psi(PO_2CH_2)Gly-Pro-Nle$ (3)	200	320	1.6
$Z_{(L)}Phe\Psi(PO_2CH_2)Gly-_{(D)}Pro-Nle$ (4)	3400	7700	2.3
$Z_{(L)}Phe\Psi(PO_2CH_2)Gly-Pro-_{(D)}Nle$ (5)	4800	2900	0.6
$Z_{(L)}Phe\Psi(PO_2CH_2)Gly-Pro-Nle-OMe$ (6)	830	750	0.9



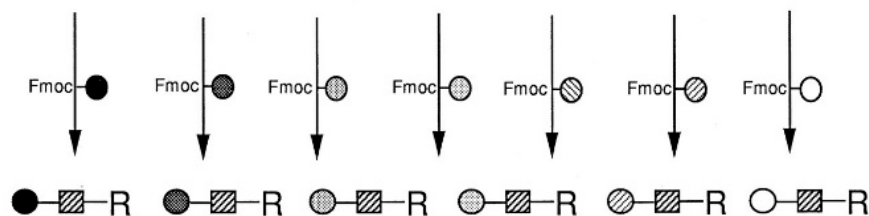
Plán byl randomizovat pozice P2 a P3 (Pro a Nle) s cílem nalézt selektivní a silnou sekvenci.

Klasická split-and-mix syntéza na 2-Cl-chlorotritylové pryskyřici

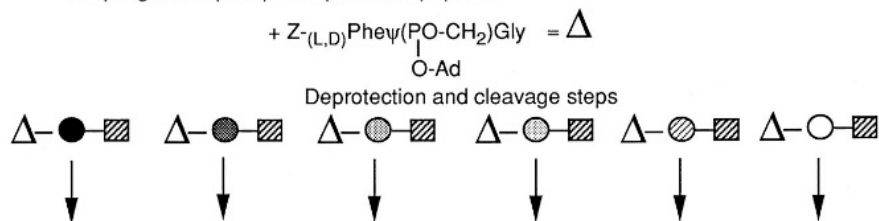
- 1 Peptide mixtures are prepared by combining twenty different Zaa'-R samples, where Zaa' represented all the natural amino acids (Cys is replaced by Nle). The Zaa' concentration is the same in each sample.



- 2 Coupling a unique amino acid to each portion



- 3 Coupling of the phosphinic pseudo-dipeptide



- 4 Determination of the potency of each sample

Získáno 20 směsí peptidů, v každé 20 peptidů

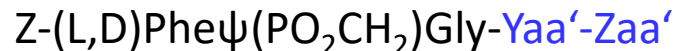


Advanced ChemTech 357 MPS

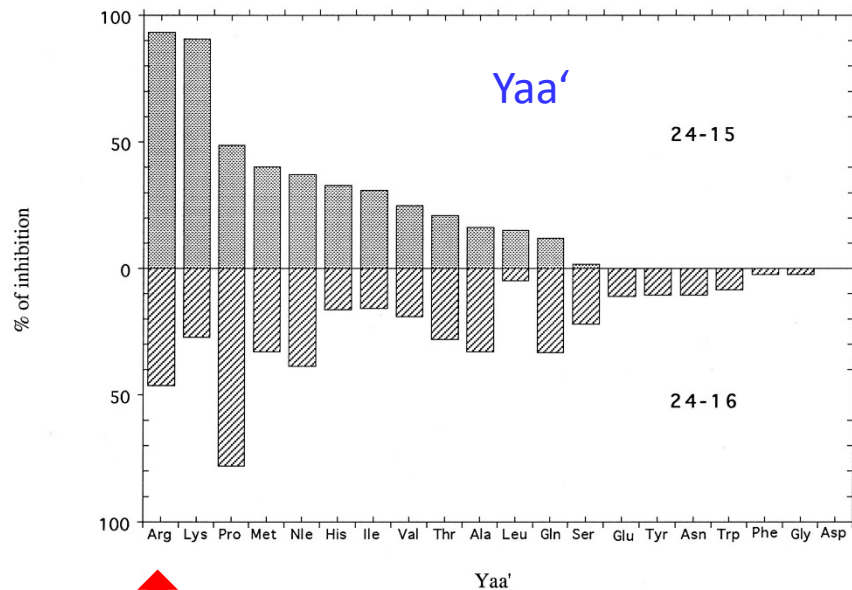
První syntetizátor schopný syntetizovat paralelně 36 peptidů a schopný pryskyřici smíchat a poté ji i znovu rozdělit zpět do reaktorů.

jedna AA

směs 20 AA

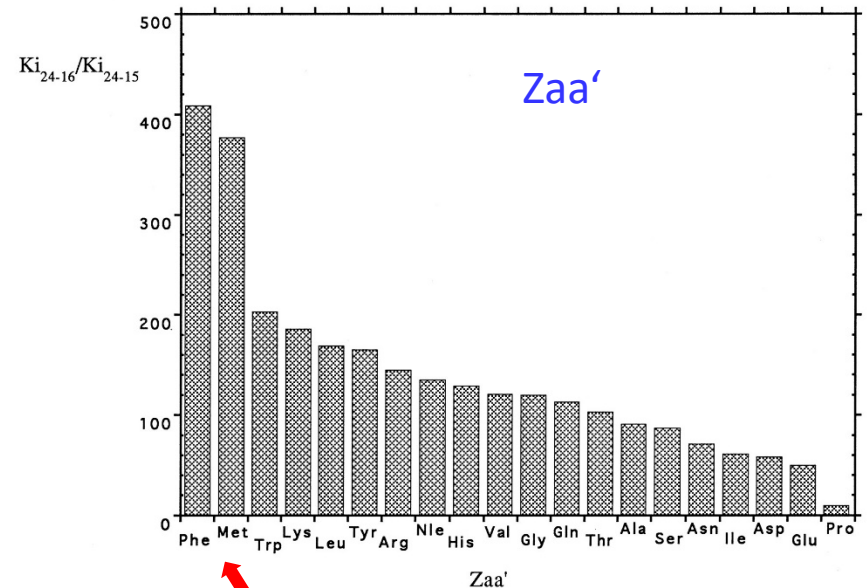


Síla inhibice směsí inhibitorů
 $Z\text{-(L,D)Phe}\psi(\text{PO}_2\text{CH}_2)\text{Gly-Yaa}'\text{-Zaa}'$
 vůči oběma enzymům při 500 nM
 koncentraci



Vybrána knihovna s Arg v P2 (Yaa')
 a připraveno všech 20 inhibitorů zvlášť.

Porovnání K_i jednotlivých inhibitorů
 vůči oběma peptidázám, tj. faktor selektivity.



Vysoce selektivní inhibitory
 Endopeptidázy 24-15

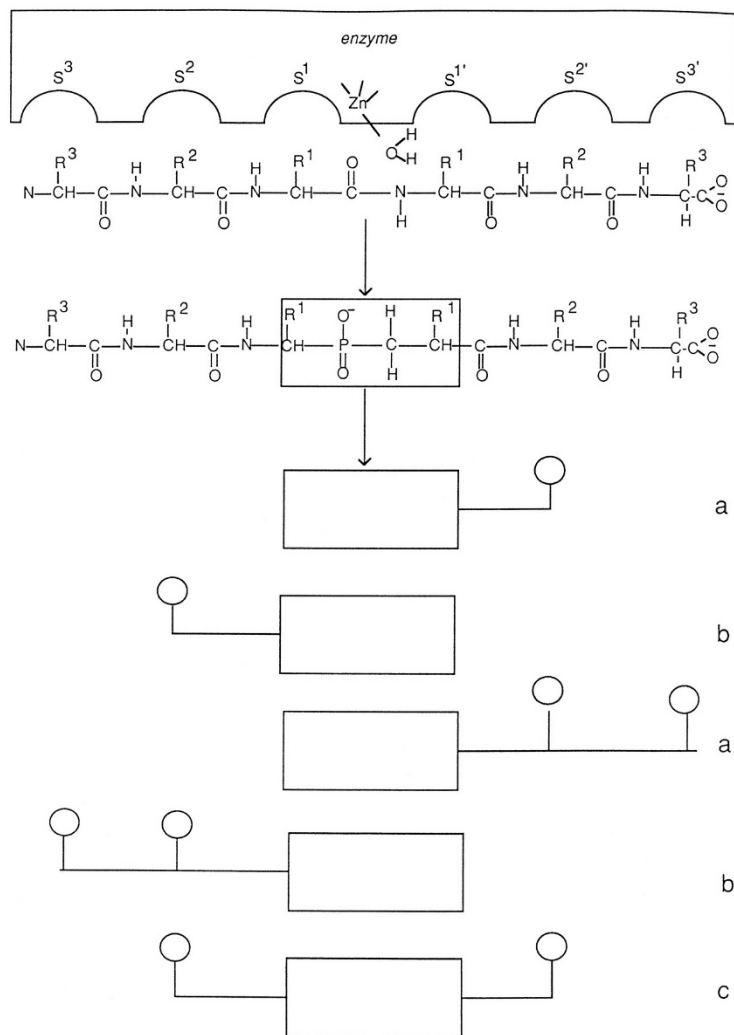
TABLE II
Inhibition constants of phosphinic peptides having the
general formula $Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Zaa$ for
endopeptidases 24-15 and 24-16

Experimental conditions are as described in Table I.

Inhibitors $-P_1- -P_1'-P_2'-P_3'-$	K_{i24-15}	K_{i24-16}
	<i>nM</i>	<i>nM</i>
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Zaa$		
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Met$	0.35	135
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Nle$	1.6	215
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Ala$	2.2	200
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Phe$	2.7	1100
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Tyr$	3.6	600
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Leu$	5.0	845
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Gln$	6.0	680
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Val$	9.5	1150
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Ile$	9.5	580
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Trp$	13	2650
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Gly$	14	1700
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Arg$	14	2050
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Asn$	20	1450
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-His$	23	2950
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Ser$	29	2500
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Thr$	35	3600
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Lys$	140	26000
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Glu$	160	8000
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Asp$	350	20300
$Z_{-(L,D)}Phe\psi(PO_2CH_2)Gly-Arg-Pro$	3500	35000

Selektivní (300-400 x),
ale i vysoce potentní

Inhibitory typu Z-(L,D)Phe ψ (PO₂CH₂)Gly-Yaa'-Zaa' nebyly ale selektivní vůči endopeptidáze 24-16, proto byl zvolen nový přístup.



Schematic representation of a general approach to develop potent and selective inhibitors of zinc metalloproteases by combinatorial chemistry of phosphinic peptides. For a given peptide size (tripeptide or tetrapeptide in this figure), different peptide mixtures (*a*, *b*, and *c*) can be developed according to the position of the phosphinic bond in the sequence. In addition, for each mixture type, by varying the state of the peptide extremity (with no protecting group or a single or double protecting group), four subtype mixtures can be obtained. The *circle* represents a position containing in equimolar amounts 20 different amino acids. The determination of potency for each mixture allows assessment of the influence of the size of the peptide and the position of the phosphinic bond on the inhibitory potency and selectivity, independently of the amino acid composition of these peptides.

Byly připraveny knihovny (směsi) inhibitorů, různého typu
a zjištěna jejich inhibiční selektivity vůči peptidázám

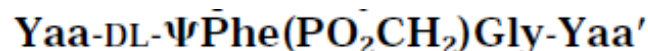
TABLE 1

Inhibitory potency and selectivity of phosphorus-containing tripeptide mixtures of the general formula Yaa-LD-ΨPhe(PO₂CH₂)Gly and LD-ΨPhe(PO₂CH₂)Gly-Yaa' for endopeptidases 24-16 and 24-15

Values for K_i were determined as described under "Materials and Methods." Assays were carried out in 5 mM Tricine/NaOH, 0.1 mg/ml bovine serum albumin in the presence (endopeptidase 24-15) or absence (endopeptidase 24-16) of 0.1 mM dithiothreitol. Selectivity corresponds to the ratio $IC_{50(24-15)}/IC_{50(24-16)}$.

Inhibitors		$IC_{50(24-16)}$	$IC_{50(24-15)}$	Selectivity
P_2 ----- P_1 ----- P_1' -- P_2'				
		μM	μM	
LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂)Gly-Yaa'	(1)	5	880	176.0
N-Ac-LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂)Gly-Yaa'	(2)	600	1020	1.7
LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂)Gly-Yaa'-NH ₂	(3)	150	215	1.4
N-Ac-LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂)Gly-Yaa'-NH ₂	(4)	585	880	1.5
Yaa-LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂)Gly	(5)	18	60	3.3
N-Ac-Yaa-LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂)Gly	(6)	8	15	1.9
Yaa-LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂)Gly-NH ₂	(7)	14	380	27.1
N-Ac-Yaa-LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂)Gly-NH ₂	(8)	167	300	1.8

Na základě inhibičních výsledků byl jako templát vybrán typ peptidů



„pokrývající“ obě vazebná místa P2' (Yaa') až P2 (Yaa),

která obsahovala směs 20 aminokyselin

Testování pozice P₂

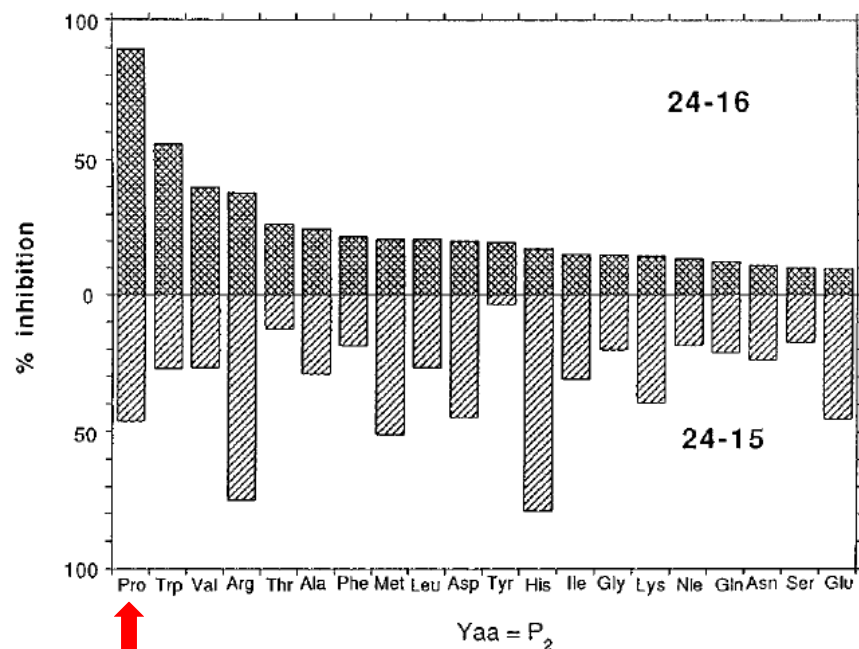
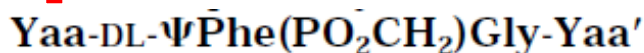


FIG. 2. Influence of the P₂ position (Yaa) on the inhibition of 24-16 (upper part) and 24-15 (lower part) by inhibitor mixtures of the general formula Yaa-DL-ΨPhe(PO₂CH₂)Gly-Yaa' (Yaa' contains a mixture of 20 different amino acids). The concentration of phosphinic peptides in each mixture was 1 μM for 24-16 and 10 μM for 24-15.



Testování pozice P₂'

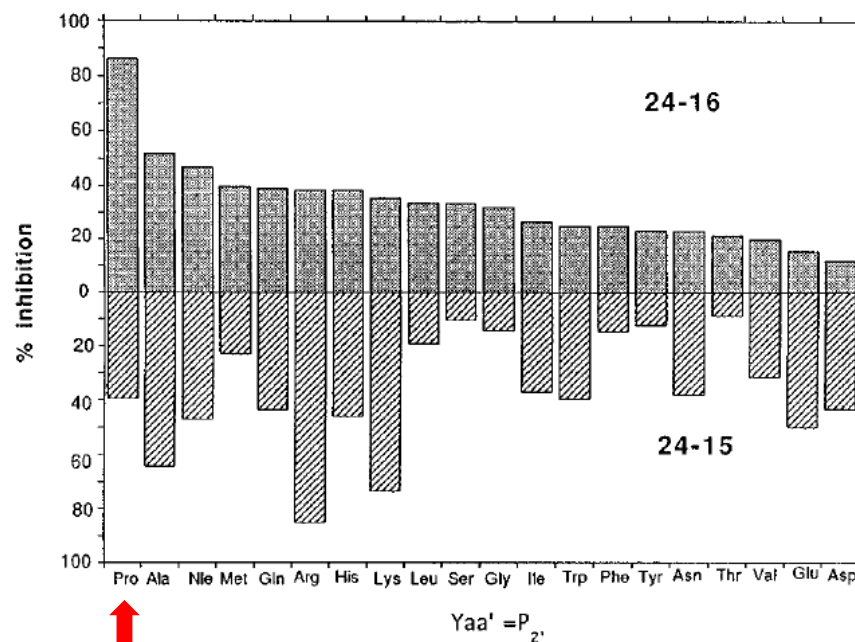
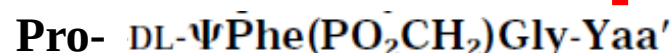


FIG. 3. Influence of the P₂' position (Yaa') for the inhibition of 24-16 (upper part) and 24-15 (lower part) by inhibitor mixtures of the general formula Pro-DL-ΨPhe(PO₂CH₂)Gly-Yaa'. The concentration of phosphinic peptides was 100 nM for 24-16 and 40 μM for 24-15.



Byly identifikovány vysoce selektivní a potentní inhibitory endopeptidázy 24-16

TABLE II

Inhibition constants and selectivity of phosphorus-containing peptides for endopeptidases 24-16 and 24-15

Experimental conditions are described in Table I. Selectivity corresponds to the ratio $K_I(24-15)/K_I(24-16)$.

Inhibitors $P_3 \cdots P_2 \cdots P_1 \cdots P_1 \cdots P_2 \cdots P_3$	$K_I(24-16)$	$K_I(24-15)$	Selectivity
	<i>nM</i>	<i>nM</i>	
Pro-LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂) Gly-Pro (1)	12	21,800	1820
N-Ac-Pro-LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂) Gly-Pro (2)	9840	NI ^a	
Pro-LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂) Gly-Pro-NH ₂ (3)	26	31,700	1220
N-Ac-Pro-LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂) Gly-Pro-NH ₂ (4)	21,000	NI	
Gly-Pro-LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂) Gly-Pro (5)	111	41,000	370
Pro-LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂) Gly-Pro-Nle (6)	1.9	75	39
Gly-Pro-LD-PheΨ(PO ₂ CH ₂) Gly-Pro-Nle (7)	0.4	21	53
Pro-L -PheΨ(PO ₂ CH ₂) Gly-Pro (8)	4	8100	2025

^a NI, no inhibition.

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
© 1996 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Vol. 271, No. 32, Issue of August 9, pp. 19606-19611, 1996
Printed in U.S.A.

Development of the First Potent and Selective Inhibitor of the Zinc Endopeptidase Neurolysin Using a Systematic Approach Based on Combinatorial Chemistry of Phosphinic Peptides*

(Received for publication, February 21, 1996, and in revised form, April 19, 1996)

Jiří Jiráček^{‡§}, Athanasios Yiotakis[¶], Bruno Vincent^{||}, Frédéric Checler^{||}, and Vincent Dive^{‡**}

From the [‡]Commissariat à l'Energie Atomique, Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, DSV, CE-Saclay 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France, the [¶]Department of Organic Chemistry, Laboratory of Organic Chemistry, University of Athens, Panepistimiopolis, Zografou, Athens 15771, Greece, and ^{||}Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Nice Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France

Selektivní inhibitory obou enzymů byly poté použity v in vivo studiích ke studiu funkce endopeptidáz v potkanech a myších.

Bylo zjištěno, že se **obě endopeptidázy účastní degradace peptidu neurotensinu.**

Neurotensin is a 13 amino acid neuropeptide that is implicated in the regulation of luteinizing hormone and prolactin release and has significant interaction with the dopaminergic system.

Neurotensin was first isolated from extracts of bovine hypothalamus based on its ability to cause a visible vasodilation in the exposed cutaneous regions of anesthetized rats.

Neurotensin is distributed throughout the central nervous system, with highest levels in the hypothalamus, amygdala and nucleus accumbens. It induces a variety of effects, including: **analgesia, hypothermia and increased locomotor activity.** It is also involved in regulation of dopamine pathways. In the periphery, neurotensin is found in enteroendocrine cells of the small intestine, where it leads to secretion and smooth muscle contraction.

Na začátku minulého desetiletí jsme se pokusili
spojit kombinatoriální peptidovou syntézu a afinitní chromatografii
s cílem identifikovat nové proteinové cíle pro pseudopeptidy fosfináty.

Inhibitory/afinitní ligandy typu: Ac-Xaa-Ala(PO₂CH₂)Leu-Yaa

Byla připravena knihovna látek

Ac-Xaa-Ala(PO₂CH₂)Leu-Yaa-(βAla)₂-FL-PEGA

v Xaa vždy jen jedna AA a v Yaa směs 19 AA

PEGA - Polyetylen glykolová pryskyřice je hydrofilní

FL – fotolabilní linker, umožňuje uvolnění látek z pryskyřice

Knihovny (afinitní kolonky) byly inkubovány s homogenátem z potkaních jater a zachycené proteiny eluovány s těmi samými látkami co byly na příslušných kolonkách nebo roztokem guanidinu.

Ac-**Xaa**-Ala(PO₂CH₂)Leu-Yaa-nosič

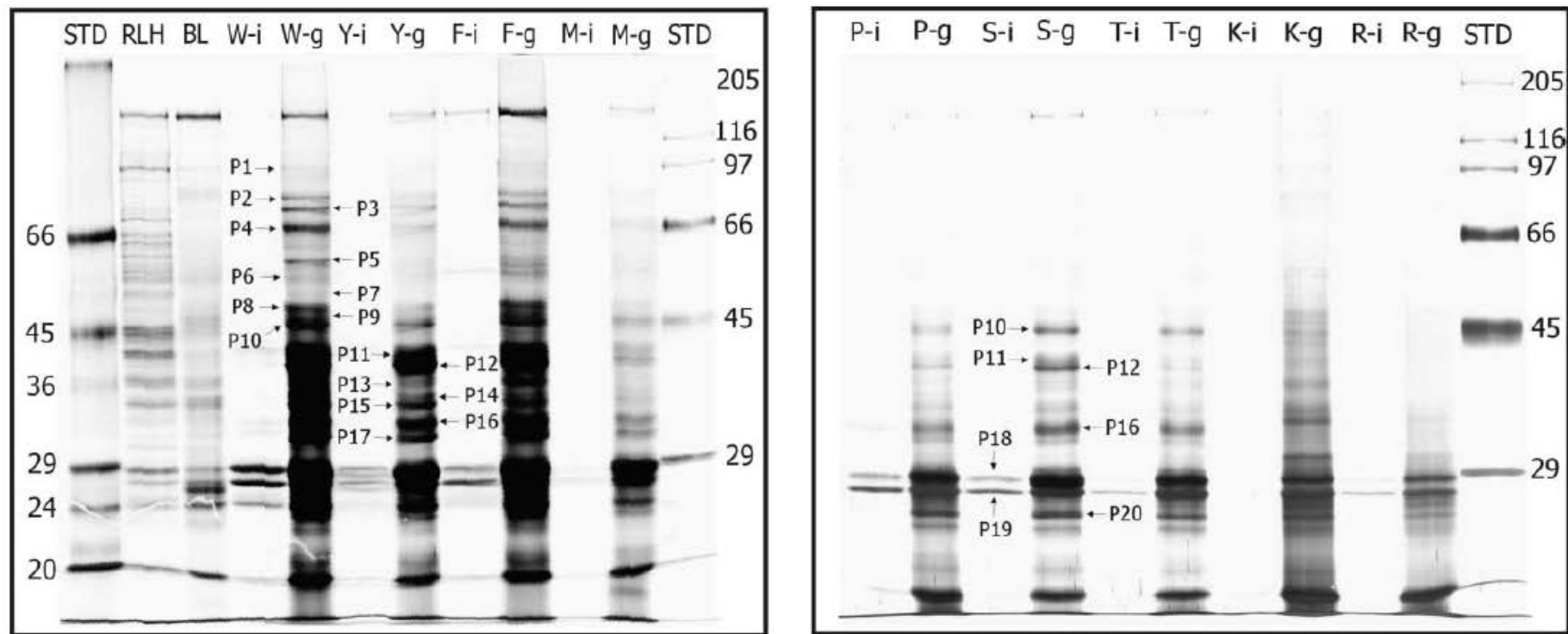


Figure 1. Electrophoretic Analysis of Fractions Obtained from Affinity Supports Ac-X_{aa}-DL-Ala-ψ[PO₂⁻-CH₂]-DL-Leu-X_{aa}'-(βAla)₂-PL-PEGA

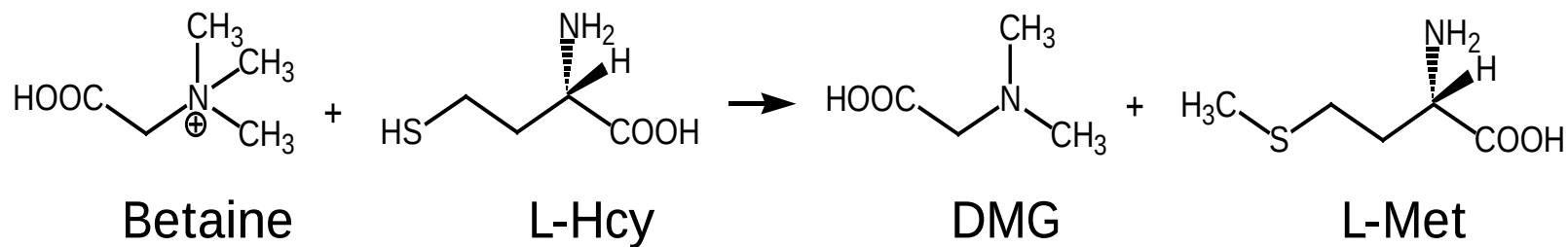
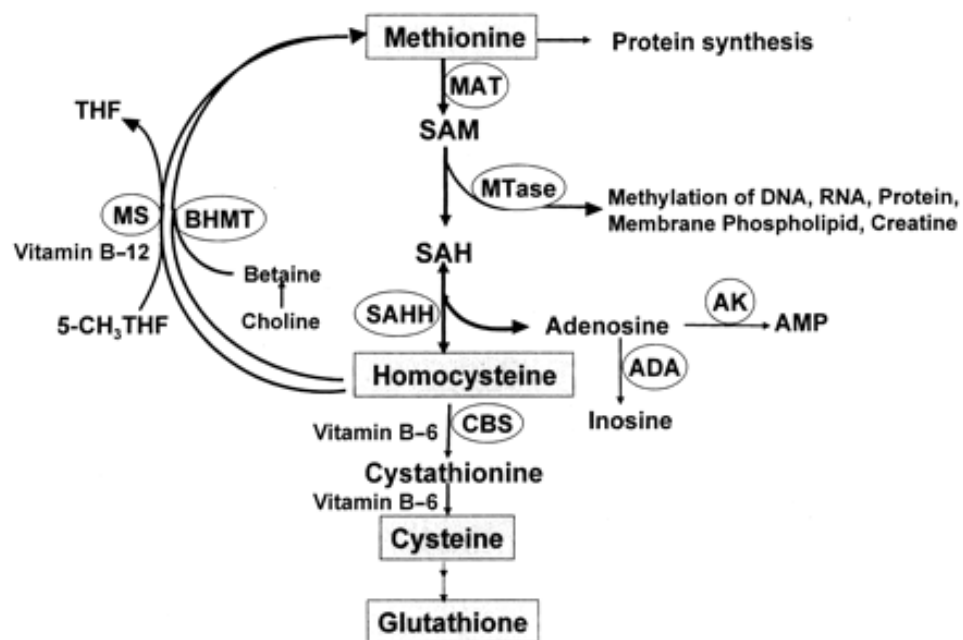
Eluované proteiny byly analyzovány elektroforézou a po přebílotování N-terminální sekvenací.

Table 1. *N*-Terminal Sequencing of Isolated Proteins

Protein band	<i>N</i> -terminal sequence found	Protein identified	
P1–P7	nd	nd	
P8	IPPAPLAKTD	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase mitochondrial precursor (lacking residues 1–38), EC 4.1.3.5	
P9	GIDKRTIEKFEK	Elongation factor-1 alpha (lacking residues 1–32)	
P10	APIAGKKAKRGI	Betaine: homocysteine <i>S</i> -methyltransferase EC 2.1.1.5	
P11, P12	nd	nd	
P13	ATQQDFENAMN	Rat homologue of mouse peroxisomal $\Delta 3, \Delta 2$ -Enoyl-CoA isomerase, EC 5.3.3.8	
P14–P16	nd	nd	
P17	KKILIKHVTV	L-3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase Mitochondrial precursor (lacking residues 1–22), EC 1.1.1.35	
P18	GANFQYIITEKKG	Enoyl-CoA hydratase 1, mitochondrial precursor (lacking residues 1–29), EC 4.2.1.17	
P19	GLELYLDLLSQP	Glutathione <i>S</i> -transferase subunit 12, class-theta, EC 2.5.1.18	
P20	PMTLGYWDIRG	Glutathione <i>S</i> -transferase chain 4, class-mu, EC 2.5.1.18	
P21	APIAGKKAKRGI	Betaine: homocysteine <i>S</i> -methyltransferase EC 2.1.1.5	
P22	APAGGPRVKKGILESLD	Rat homologue of mouse betaine: homocysteine <i>S</i> -methyltransferase 2	
P23	YVAEKISGQKVNEAAXD VAEKISGQKVNEAAXDI	Betaine: homocysteine <i>S</i> -methyltransferase (lacking residues 1–88 or 1–89), EC 2.1.1.5	

Results of *N*-terminal sequencing of proteins P1–P20 shown in Figure 1 and of proteins P21–P23 shown in Figure 4B. nd means not determined (due to the *N*-terminal blocking).

Rekombinantní lidskou BHMT dodal spolupracující Tim Garrow (Urbana, IL)



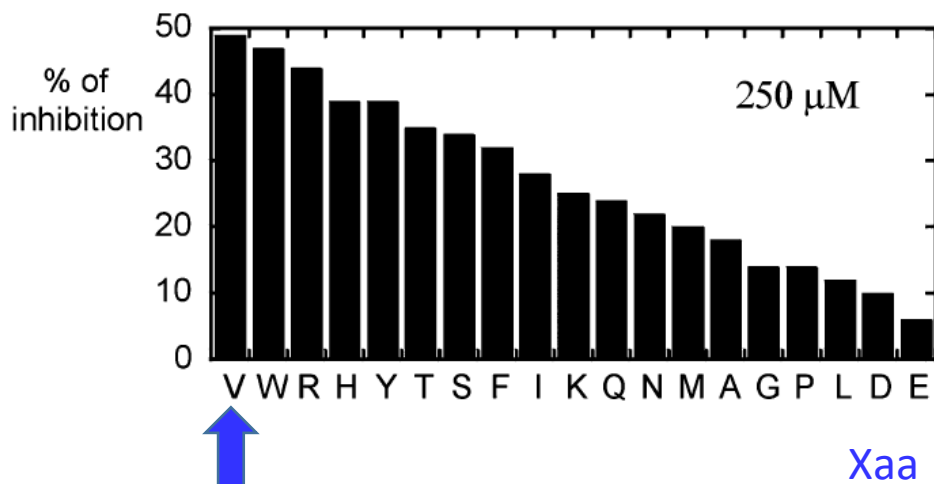
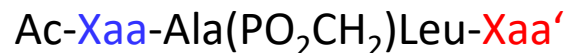


Figure 2. Inhibition of Human Recombinant BHMT by Soluble Phosphinic Pseudopeptide Mixtures Ac-X_{aa}-DL-Ala- ψ [PO₂⁻-CH₂]-DL-Leu-X_{aa}'-NH₂

Amino acids in the X_{aa} position are shown in a single letter code. The mixtures were tested at 250 μM concentration and the values are means of three independent measurements. For details, see Experimental Procedures.

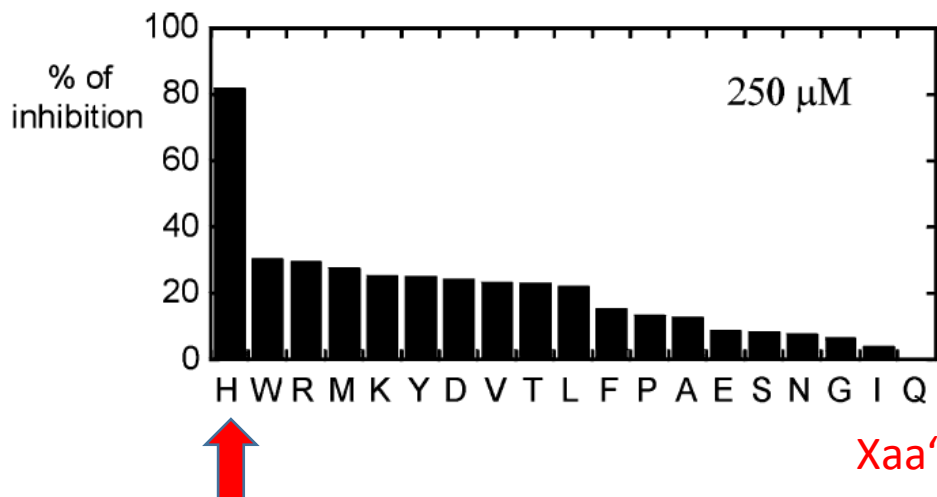


Figure 3. Inhibition of Human Recombinant BHMT by Single Soluble Phosphinic Pseudo-peptides Ac-Val-DL-Ala- ψ [PO₂⁻-CH₂]-DL-Leu-X_{aa}'-NH₂

Amino acids in the X_{aa}' position are shown by single letter code. The compounds were tested at 250 μM concentration and the values are means of three independent measurements. For details, see Experimental Procedures.

Optimalizace struktury inhibitorů

Table 2. Inhibition of Human BHMT by Phosphinic Pseudopeptide Analogs

Compound, 100 μ M	% of Inhibition
1 Ac-Val-DL-Ala- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-DL-Leu-His-NH ₂	57.4
2 Ac-Val-DL-Ala- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-DL-Leu-Cys-NH ₂	0.0
3 Ac-Val-DL-Phe- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-DL-Leu-His-NH ₂	53.7
4 Ac-Val-DL-Phe- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-DL-Ala-His-NH ₂	8.7
5 Ac-Val-Ala-Leu-His-NH ₂	25.9
6 Ac-DL-Ala- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-DL-Leu-NH ₂	0.0
7 Ac-Val-DL-Ala- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-DL-Leu-His	0.0
8 Val-DL-Ala- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-DL-Leu-His-NH ₂	70.6
9 Val-DL-Phe- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-DL-Leu-His-NH ₂	80.3

Table 3. Inhibition of Human BHMT by Individual Diastereoisomers of Compounds 8 and 9

	Compound	% of Inhibition 50 μ M	IC ₅₀ (μ M)	
			pH 6.9	pH 7.5
8a	Val-Ala- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-Leu-His-NH ₂	54.5	nd	nd
8b	Val-Ala- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-Leu-His-NH ₂	49.1	nd	nd
8c	Val-Ala- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-Leu-His-NH ₂	22.2	nd	nd
8d	Val-Ala- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-Leu-His-NH ₂	22.5	nd	nd
9a	Val-Phe- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-Leu-His-NH ₂	82.9	1.0	2.4
9b	Val-Phe- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-Leu-His-NH ₂	44.2	9.0	12.0
9c	Val-Phe- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-Leu-His-NH ₂	87.2	1.7	2.0
9d	Val-Phe- ψ [PO ₂ ⁻ -CH ₂]-Leu-His-NH ₂	64.8	3.7	5.0
	L-Met	nd	nd	250

Afinitní purifikace enzymu z potkaních jater na jediném imobilizovaném inhibitoru

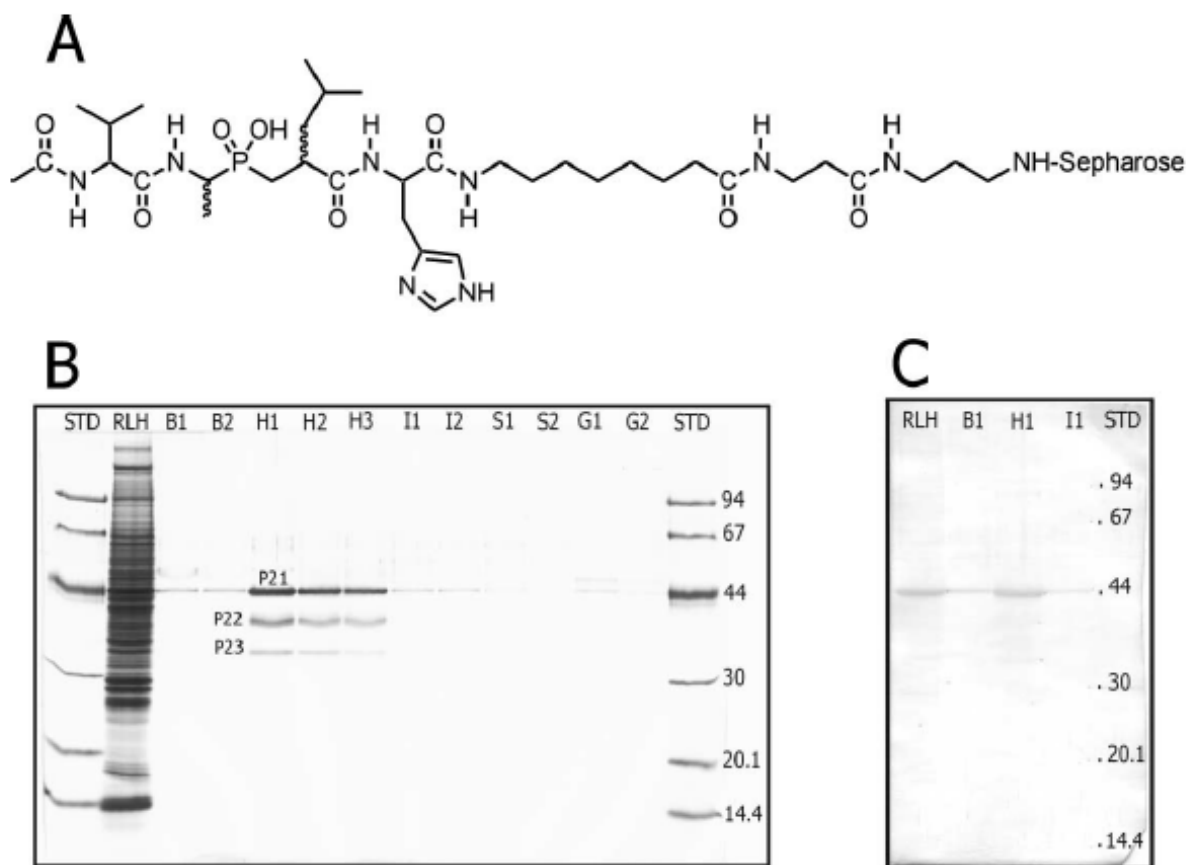
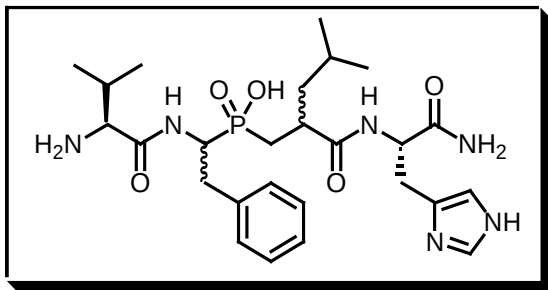
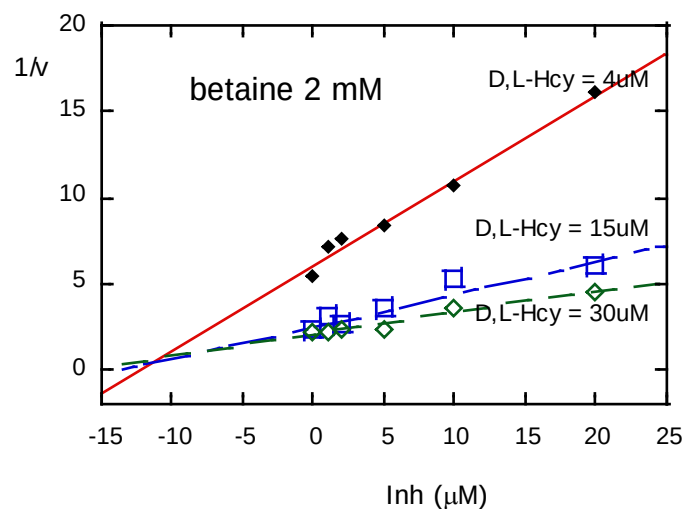
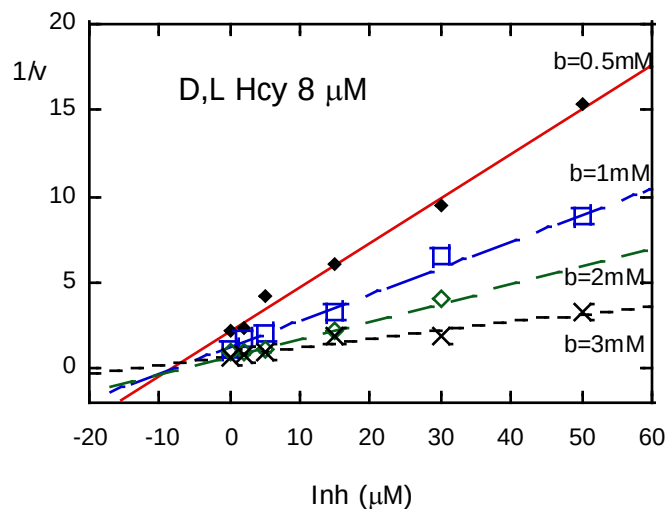


Figure 4. Affinity Purification of Rat Liver BHMT



$K_{iapp} \sim 10 \mu\text{M}$ pro oba substráty

Nekompetitivní inhibice

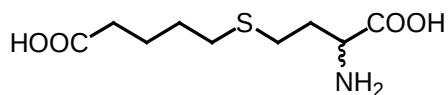


Chemistry & Biology, Vol. 10, 113–122, February, 2003, ©2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved. DOI 10.1016/S1074-5521(03)00008-5

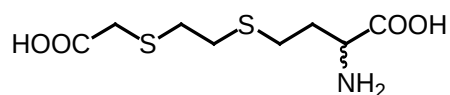
Combining Combinatorial Chemistry and Affinity Chromatography: Highly Selective Inhibitors of Human Betaine: Homocysteine S-Methyltransferase

Michaela Collinsová,¹ Carmen Castro,²
Timothy A. Garrow,² Athanasios Yiotakis,³
Vincent Dive,⁴ and Jiří Jiráček^{1,*}

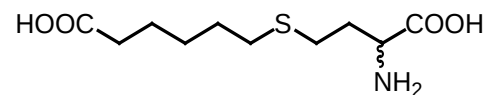
Práce s enzymem nás během dalších let dovedla
k mnohem silnějším kompetitivním inhibitorům enzymu.
Tyto látky byly použity ke studiu role BHMT in vivo.
S enzymem jsme pracovali až do roku 2014.



IC₅₀ 0.087 μM



IC₅₀ 0.096 μM



IC₅₀ 0.2 μM