

Aminokiseline, proteini

Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić

Značaj aminokiselina

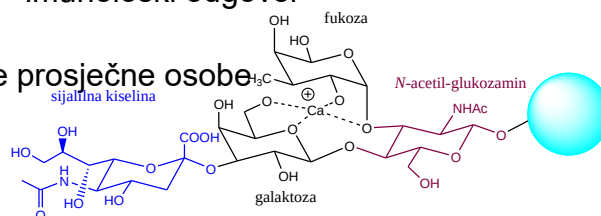
Vrste

- Strukturni
- Kontrakcija
- Transport
- Skladištenje
- Hormonalni
- Enzimi
- Protekcija

Primjeri

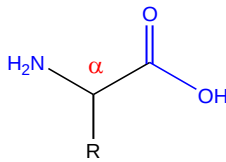
- tetiva, hrskavica, kosa, nokti
- mišići
- hemoglobin
- mlijeko
- insulin, hormon rasta
- katalitičke reakcije u stanici
- imunološki odgovor

- Čine 15 % mase prosječne osobe



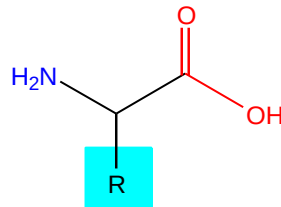
Aminokiseline

- Proteini pripadaju poliamidnoj klasi organskih spojeva
- Poliamidi su polimeri čije se monomerne jedinice vezane amidnom skupinom
- Monomerne jedinice proteina = α -aminokiseline



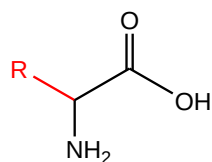
α -aminokiseline

- Aminokiseline – sadrže dvije funkcijske skupine: COOH i NH_2
- α -aminokiseline – amino skupina vezana na α C atom $\Rightarrow$ proteini
- Strukturna jedinica, $\text{RCH}(\text{NH}_3^+)\text{CO}_2^-$, R = pobočni lanac ili ogranak

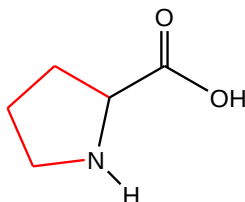


α -aminokiseline

- Od 20 α -aminokiselina sve su primarni amini osim prolina
- Prolin je sekundarni amin



osnovna jedinica
primarni amin

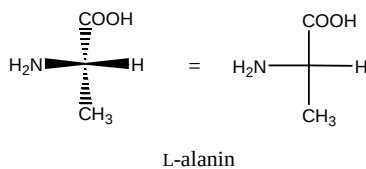


prolin
sekundarni amin

Stereokemija

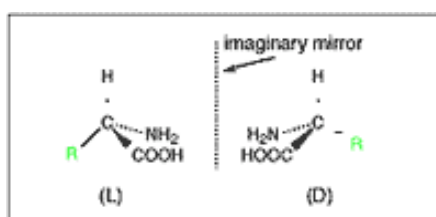
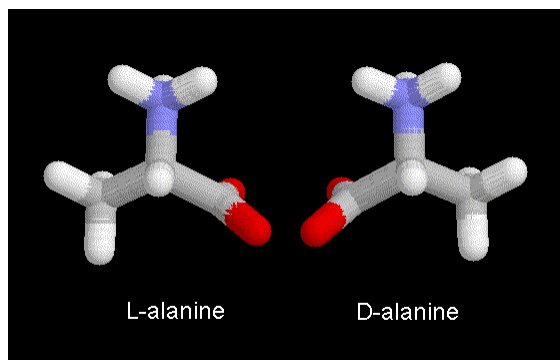
Relativna konfiguracija

- Fischerova projekcijska formula
- 20 aminokiselina koje se nalaze u prirodi imaju L-konfiguraciju



L-alanin

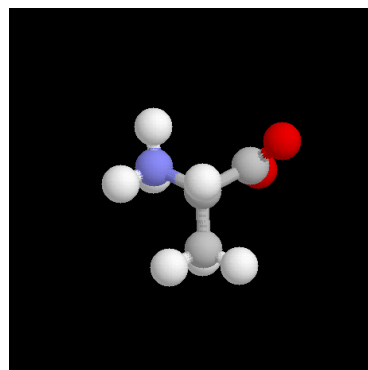
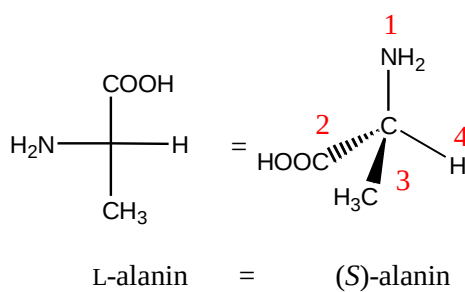
L- i D-izomeri alanina



Stereokemija

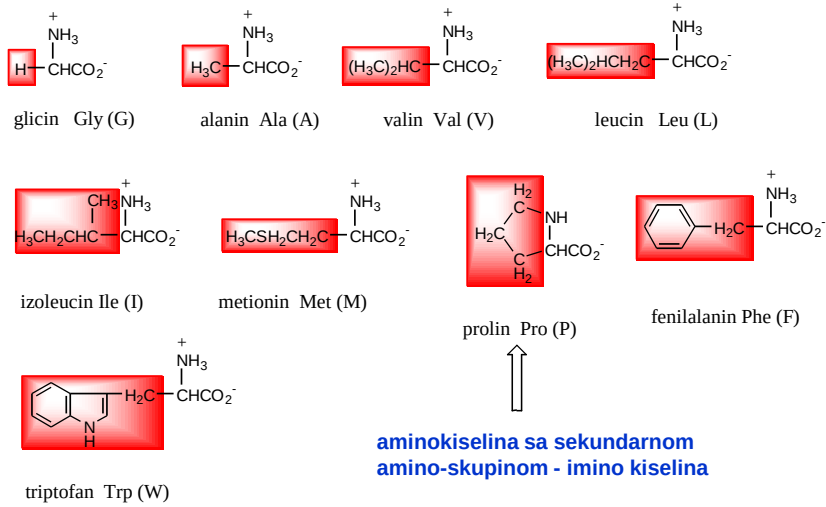
Apsolutna konfiguracija

- Sve AK u prirodi imaju S-konfiguraciju, osim cisteina ($R = \text{CH}_2\text{SH}$)

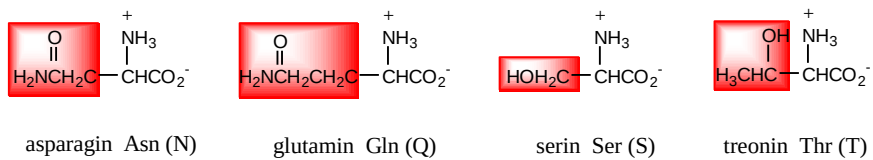


(S)-alanin

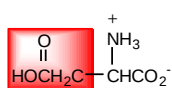
Aminokiseline s nepolarnim pobočnim lancima



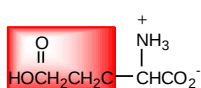
Aminokiseline s polarnim pobočnim lancima



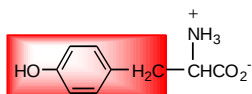
Aminokiseline s kiselim pobočnim lancima



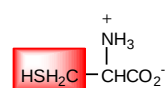
asparaginska
kiselina Asp (D)



glutaminska
kiselina Glu (E)

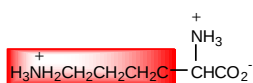


tirozin Tyr (Y)

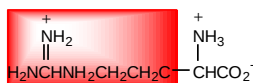


cistein Cys (C)

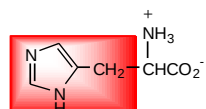
Aminokiseline s bazičnim pobočnim lancima



lizin Lys (K)



arginin Arg (R)



histidin His (H)

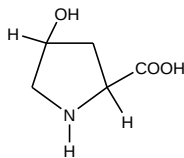
Esencijalne aminokiseline

- Od 20 aminokiselina koje grade proteine 10 AK se ne sintetiziraju u organizmu $\Rightarrow$ esencijalne AK
- Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val
- Te AK moramo unijeti prehranom: mliječni proizvodi, žitarice i povrće

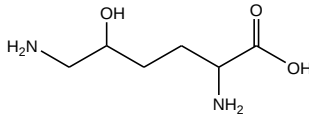


Rijetke i neobične aminokiseline

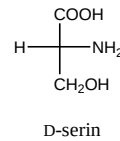
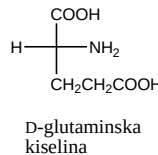
- 4-hidroksiprolin i 5-hidroksilizin su hidroksilirani derivati uobičajenih aminokiselina
- Nazivaju se rijetkim AK, izgrađuju kolagen
- U prirodi se također nalaze neuobičajeni D-izomeri AK:
 - D-glutaminska kiselina (gradi stanične stijenke nekih bakterija)
 - D-serin (gliste)



hidroksiprolin

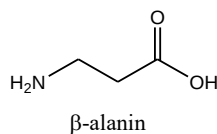
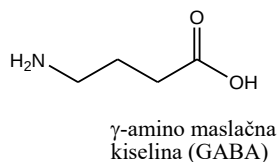


5-hidroksilizin



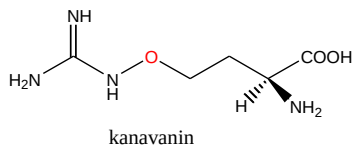
Rijetke i neobične aminokiseline

- Neke AK koje se nalaze u prirodi nisu α -aminokiseline:
 - γ -aminomaslačna kiselina (GABA) – neurotransmiter
 - β -alanin – gradi vitamin pantotensku kiselinu



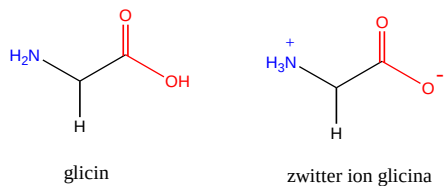
Rijetke i neobične aminokiseline

- Vinova loza *Vitis rotundifolia* (Dioscorea) sadrži kanavanin
- Zamijena arginina s kanavaninom (zamijena CH_2 s O) u svrhu "obrambenog mehanizma" od predatora
- Samo kukac *Caryedes brasiliensis* ima enzim koji prepoznaje razliku tih dviju AK i enzim koji razgrađuje kanavanin



Fizikalna i kemijska svojstva aminokiselina

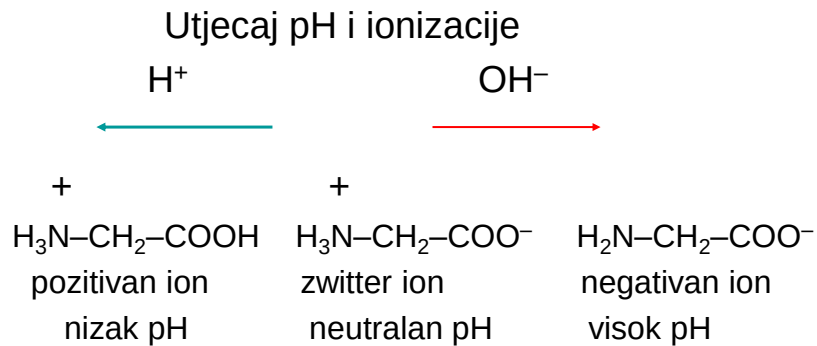
- Visoka točka tališta, uz raspadanje
- Odlična topljivost u vodi, netopljive u nepolarnim organskim otapalima (eter)
- Ionizacija -NH_2 i -COOH skupine
- Zwitter-ion sadrži oba naboja, + i – naboj
- Sveukupan naboj zwitter-iona α -aminokiselina (bez kiselih i baznih ogranaka) otopljenih u vodi kod pH7 je jednak 0



Fizikalna i kemijska svojstva aminokiselina

- Aminokiseline imaju veći dipolni moment (μ) od amina i kiselina:
 - glicin, $\mu = 14$ D, propilamin, $\mu = 1.4$ D, propionska kiselina, $\mu = 1.7$ D (izražena u debye-ima D, Peter Debye, Nobelova nagrada za kemiju 1936.)

Aminokiseline kao baze i kiseline



- α -aminokiseline – amfoterna svojstva jer reagiraju s kiselinom i bazom
- Djelotvorni puferi u biološkim sistemima

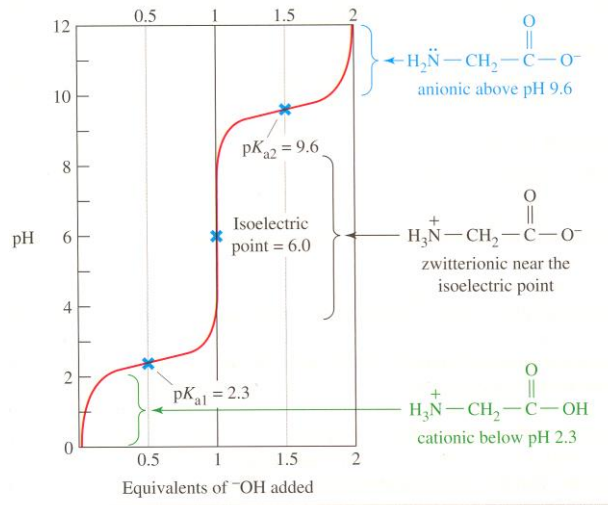
Aminokiseline kao baze i kiseline

- Niski pH - α -aminokiseline s cjelokupnim pozitivnim nabojem molekule
- Visoki pH - α -aminokiseline kao ioni s cjelokupnim negativnim nabojem
- Za svaku AK između tih vrijednosti postoji pH kod kojeg je sveukupni naboj molekule neutralan (pI)

Izoelektrična točka, pI

- **Izoelektrična točka** = pH kod kojeg je koncentracija amonijevih iona ($^+\text{NH}_3\text{CHRCOOH}$) jednaka koncentraciji karboksilnih ($\text{NH}_2\text{CHRCOO}^-$) iona

- Titracijska krivulja za glicin:
 - kationski oblik pH < 2.3
 - anionski oblik pH > 9.6
 - zwitter ion 2.3 > pH < 9.6



Izoelektrična točka

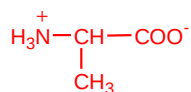
- Izoelektrična točka ovisna je o strukturi AK:
 - kisele AK: asparaginska (2.8) i glutaminska (3.2) kiselina
 - neutralne AK: 5.6 – 6.3
 - bazične AK: lizin (9.7), arginin (10.8), histidin (7.6)

Kemijska svojstva aminokiselina

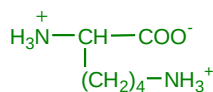
- Zbog ovakvih svojstava omogućena djelotvorna analiza i separacija AK iz smjese
- Pod utjecajem električnog polja kod pl vrijednosti aminokiseline ne putuju
- Tehnika odvajanja aminokiselina (proteina) – **elektroforeza** – molekule s različitim pl putuju u električnom polju kod određenog pH različitom brzinom

Elektroforeza

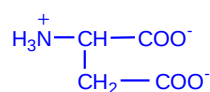
- Odvajanje aminokiselina s različitim izoelektričnim točkama iz smjese
- Smjesa AK na sredini akrilamidnog gela (ili filter papira) u pufer otopini, elektrode, napon - odvajanje molekula na gelu jer putuju različitom brzinom ovisno o njihovoj veličini i naboju
- Smjesa alanina (6.0), lizina (9.7) i asparaginske kiseline (2.8) u pufer otopini pH 6
- *Strukture AK kod pH 6:*



alanin
(naboj 0)

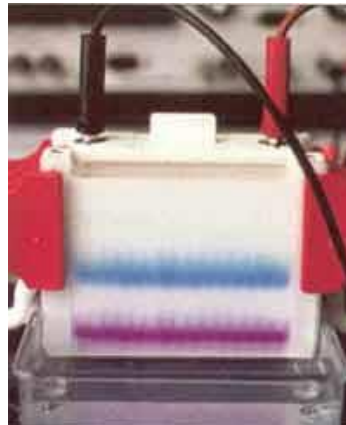


lizin
(naboj +1)



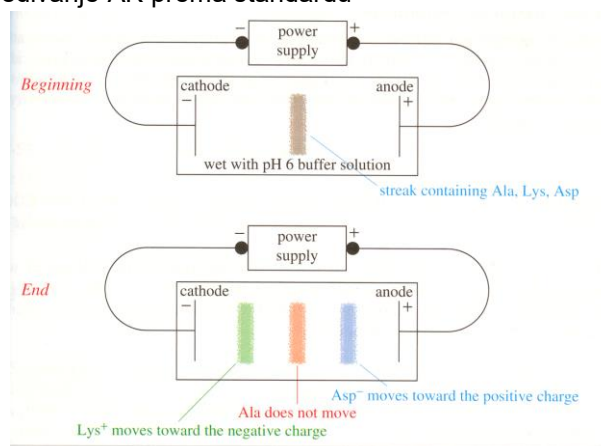
asparaginska kis.
(naboj -1)

Vertikalna gel-elektroforeza



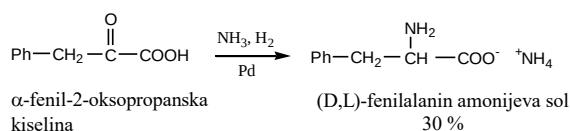
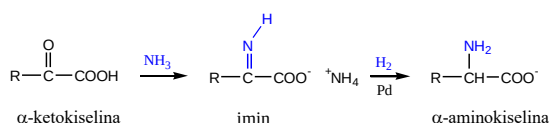
Elektroforeza

- *Horizontalna gel-elektroforeza*
- Lizin putuje prema katodi, a asparaginska kiselina prema anodi, alanin ne putuje
- Analitička metoda i metoda izolacije AK (separacija AK iz gela)
- Kod analitičke metode se koristi reagens ninhidrin za obilježavanje AK, određivanje AK prema standardu



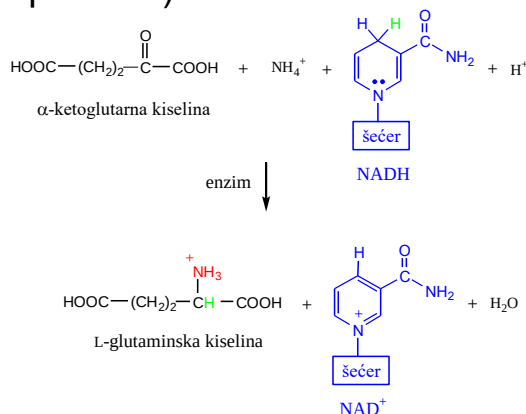
Sinteza aminokiselina

- **Reduktivno aminiranje** – priprava amina i aminokiselina
- α -ketokiselina s amonijakom $\rightarrow$ nastaje imin, potom redukcijom imina pomoću vodika i paladija kao katalizatora nastaje amin (karboksilna skupina se ne reducira)
- Produkt je u obliku racemične smjese



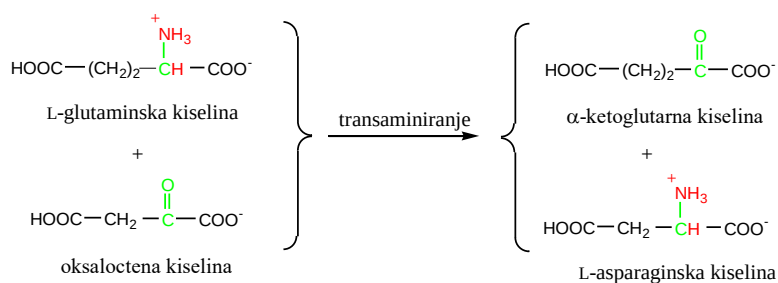
Sinteza aminokiselina

- Reduktivno aminiranje slično biološkoj sintezi aminokiselina $\rightarrow$ biomimetika (oponašanje bioloških procesa)



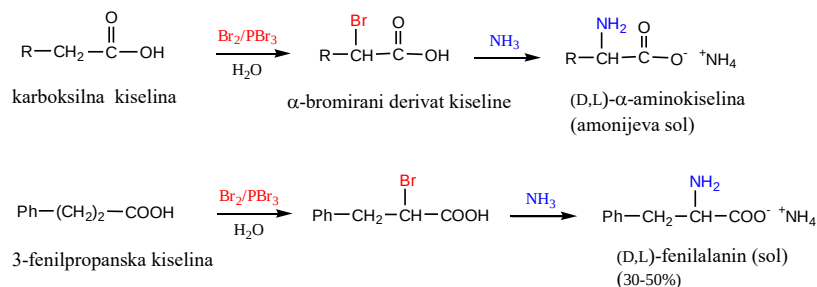
Biosinteza aminokiselina

- L-glutaminska kiselina kao donor amino funkcionalne skupine u sintezi drugih aminokiselina → transaminiranje (prijenos amino skupine s jedne molekule na drugu)
- Biosinteza katalizirana enzimom daje enantiomerno čist produkt, L-enantiomer



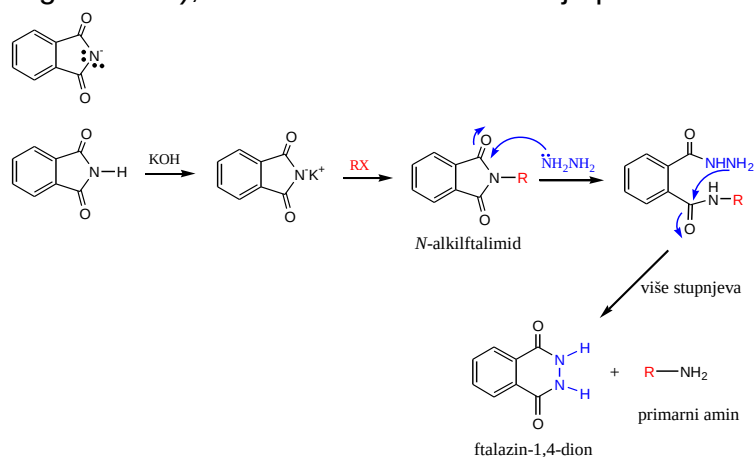
Sinteza aminokiselina

- Aminiranje α -halogenih kiselina*
- Hell-Volhard-Zelinsky reakcija – djelotvorna metoda za uvođenje atoma broma u α -položaj karboksilne kiseline
- Racemična smjesa α -brom-kiseline prevodi se direktnim aminiranjem (NH_3 u suvišku) u α -aminokiselinu u obliku racemične smjese



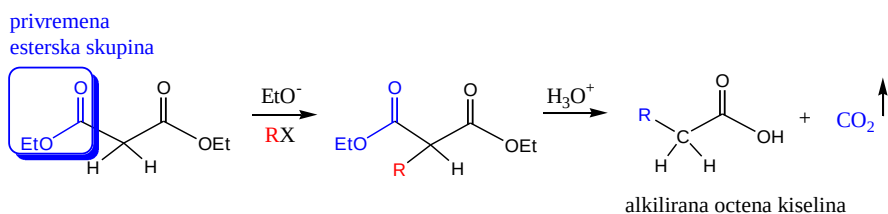
Sinteza aminokiselina

- Gabrijelova sinteza amina (1887.) – sinteza primarnih amina pomoću aniona ftalimida (dobar nukleofil koji zamjenjuje halogeni atom), zatim s hidrazinom nastaje primarni amin



Sinteza aminokiselina

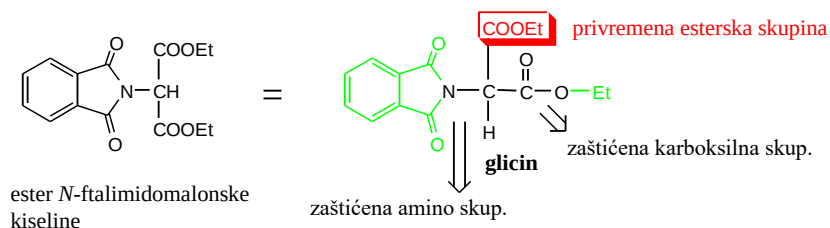
- Reakcije estera malonske kiseline
 - alkiliranje dietilnog estera malonske kiseline
 - hidroliza i dekarboksiliranje – alkilirani derivat octene kiseline



Sinteza aminokiselina

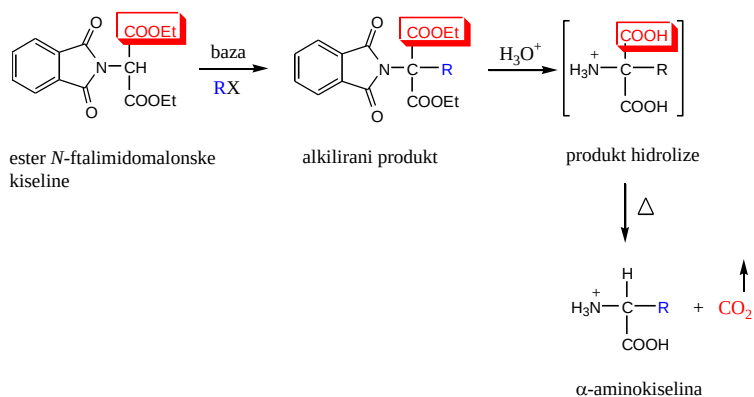
- Kombinirana sinteza modificirane *Gabrijelove sinteze i reakcije estera malonske kiseline*

1. Ester *N*-ftalimidomalonske kiseline



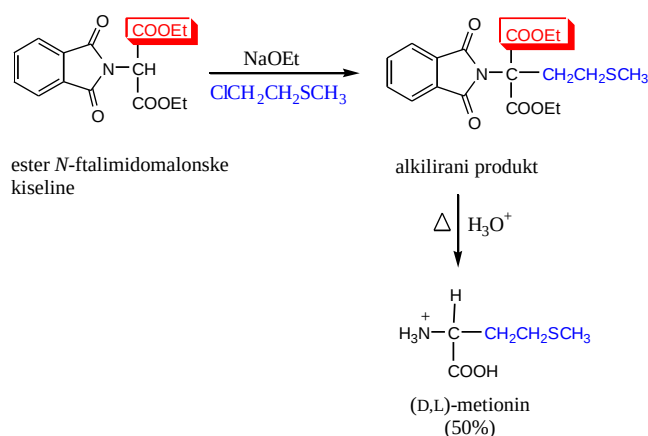
Sinteza aminokiselina

- Alkiranje estera *N*-ftalimidomalonske kiseline
- Hidroliza ftalimidne skupine i dviju esterskih skupina – alkilirana aminomalonska kiselina
- Dekarboksiliranje – racemična smjesa α -aminokiseline



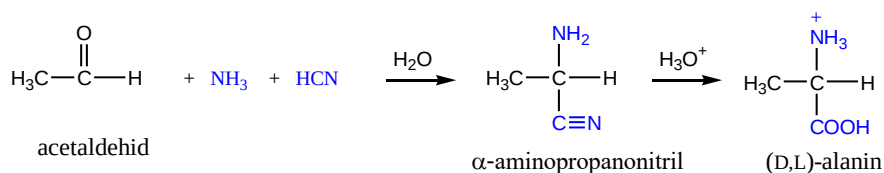
Sinteza aminokiselina

- Sinteza metionina



Sinteza aminokiselina

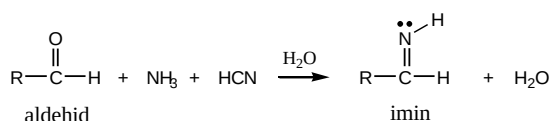
- Streckerova sinteza** (1850.) – acetaldehid u vodenoj otopini amonijaka i HCN $\rightarrow$ potom hidrolizom α -aminopropanonitrila nastaje racemična smjesa alanina



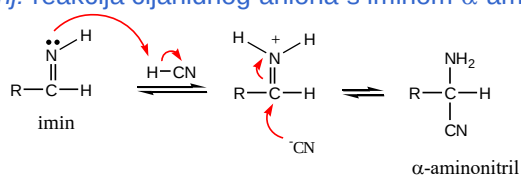
- Streckerovom sintezom nastaju mnoge aminokiseline iz odgovarajućih aldehida

Sinteza aminokiselina

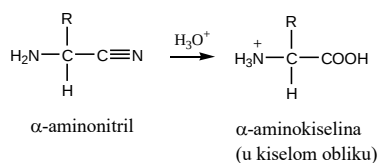
1. stupanj: aldehid s amonijakom daje imin



2. stupanj: reakcija cijanidnog aniona s iminom α-aminonitril

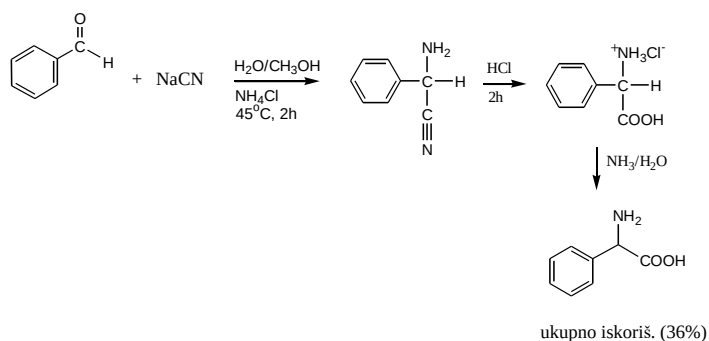


3. stupanj: hidroliza α-aminonitrila do α-aminokiseline



Sinteza aminokiselina

• Streckerova sinteza

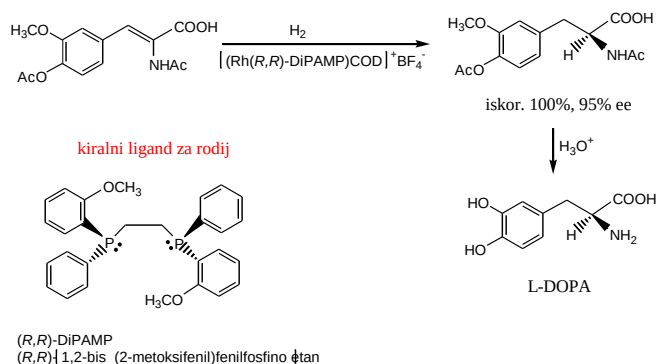


Asimetrična sinteza aminokiselina

- Asimetrična (enantioselektivna) sinteza – kojom nastaje samo ili uglavnom jedan enantiomer
- Metoda hidrogeniranja enamida pomoću prijelaznog metala kao kiralnog katalizatora
- Enantioselektivna sinteza L-DOPA, (S)-3,4-dihidroksifenilalanin (lijek za liječenje Parkinsonove bolesti), Knowles, 2001. god. Nobelova nagrada

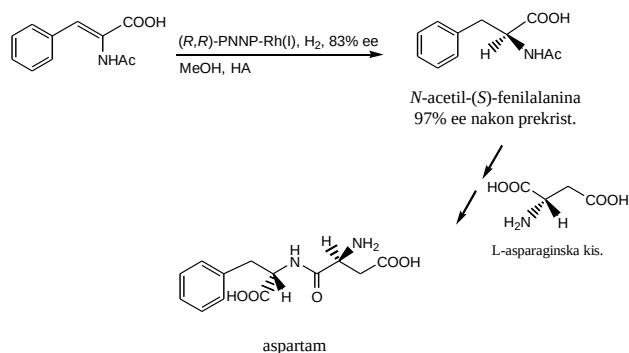
Asimetrična sinteza aminokiselina

- Sinteza L-DOPA primjenom kiralnog rodijevog fosfornog liganda, (R,R)-DiPAMP, reakcija hidrogeniranja u 95% enantiomernom suvišku, te potom skidanje zaštitnih skupina



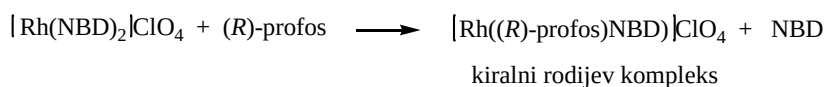
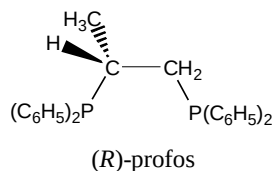
Asimetrična sinteza aminokiselina

- Primjena kod industrijske sinteze acetiliranog derivata L-fenilalanina koji se primijenjuje u sintezi umjetnog sladila aspartama
- *(R,R)*-PNNP, *N,N*-bis(difenilfosfino)bis[*(R)*-1-feniletil]etilendiamin - kiralni ligand za hidrogeniranje



Asimetrična sinteza aminokiselina

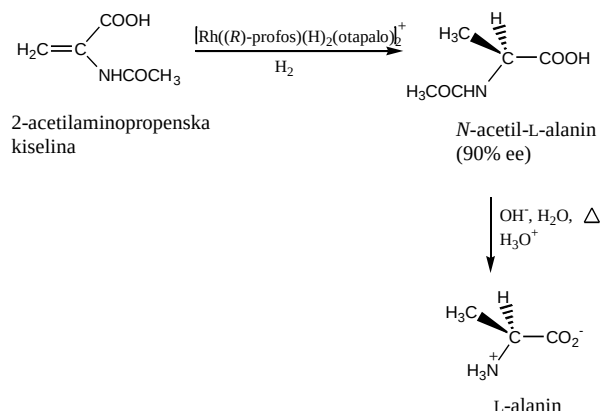
- Primjena kompleksa rodij-norbornadien(NBD)-(*R*)-profos



- Rodijev kompleks s vodikom u etanolu daje aktivni kiralni katalizator za reakciju hidrogeniranja

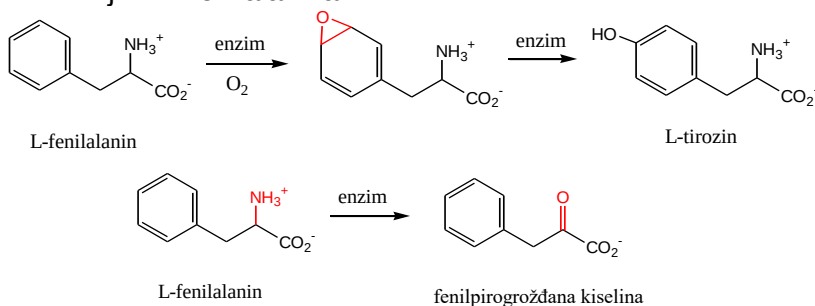
Asimetrična sinteza aminokiseline

- Hidrogeniranjem 2-acetilaminopropenske kiseline s kiralnim katalizatorom nastaje *N*-acetil-L-alanin u 90% ee, potom hidrolizom nastaje L-alanin



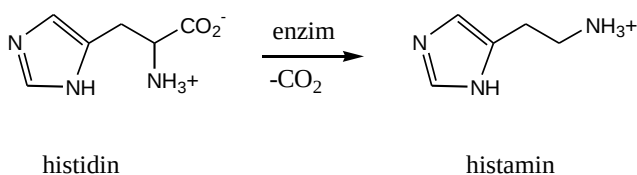
Biokemijske reakcije AK

- L-fenilalanin esencijalna AK, dok njezin *p*-hidroksi derivat, L-tirozin to nije
- Hidroksilacijom aromatskog prstena se prevodi L-fenilalanin u L-tirozin
- Neki ljudi nemaju enzim za transformaciju L-fenilalanin već tu AK prevode u fenilpirogroždanu kis.
- Može izazivati mentalnu retardaciju kod novorođenčadi – bolest nazvana fenilketonurija, PKU – kontrolirati ograničenim unošenjem L-fenilalanina



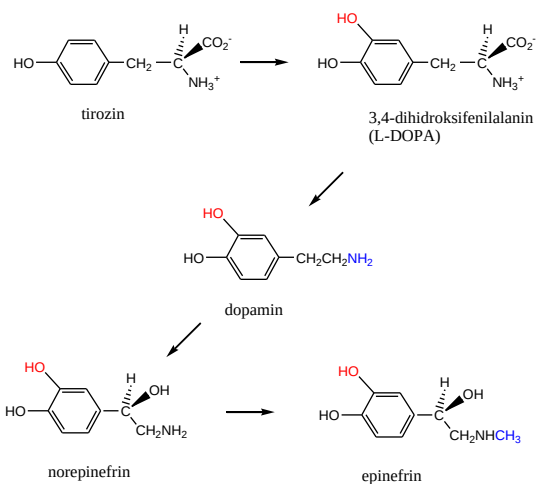
Biokemijske reakcije AK

- Histamin – odgovoran za mnoge simptome peludne groznice i drugih alergijskih reakcija
- Antihistaminici – ublažavaju simptome blokiranjem djelovanja histamina



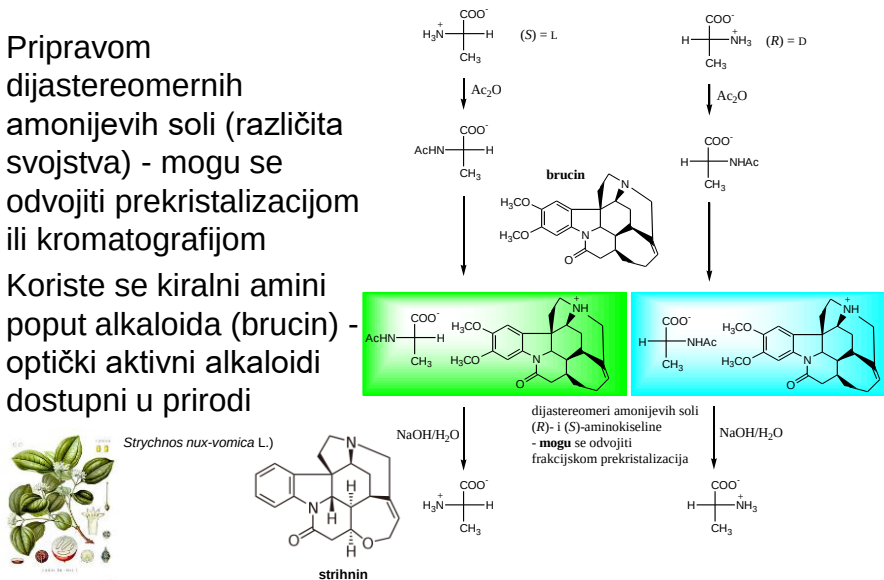
Biokemijske reakcije AK

- Neurotransmiteri
- Nastali strukturnim modifikacijama i dekarboksilacijom iz L-tirozina



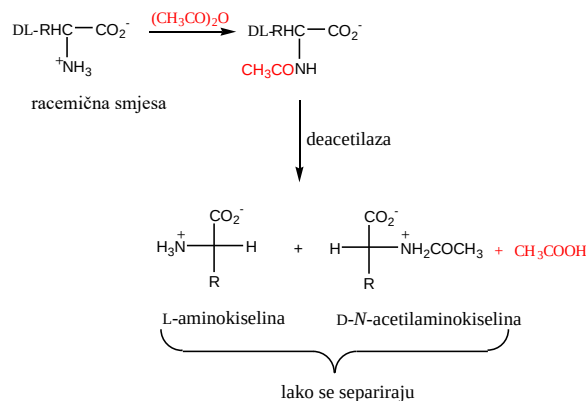
Rezolucija aminokiselina

- Pripravom diastereomernih amonijevih soli (različita svojstva) - mogu se odvojiti prekrizacijom ili kromatografijom
- Koriste se kiralni amini poput alkaloida (brucin) - optički aktivni alkaloidi dostupni u prirodi



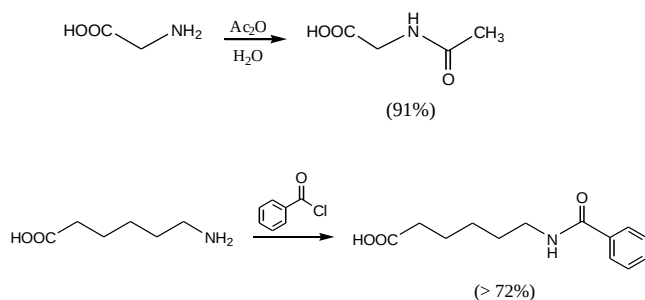
Rezolucija aminokiselina

- Rezolucija aminokiselina primjenom enzima *deacetilaze* – katalizira hidrolizu *N*-acetilaminokiselina u organizmu
- Zbog kiralnog aktivnog mjesta enzima odvija se hidroliza samo L-*N*-acetilaminokiselina



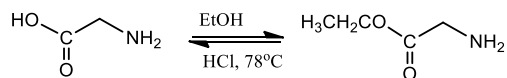
Reakcije aminokiselina

- Reakcije s amino i karboksilnom skupinom
- Aciliranje
 - aciliranje amino skupine pomoću acilirajućih reagensa (acetanhidrid, benzoil-klorid, acetil-klorid...)



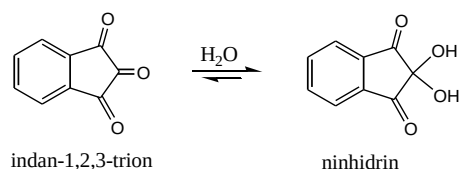
Reakcije aminokiselina

- Esterifikacija
 - esterifikacija karboksilne skupine aminokiselina



Reakcije aminokiselina

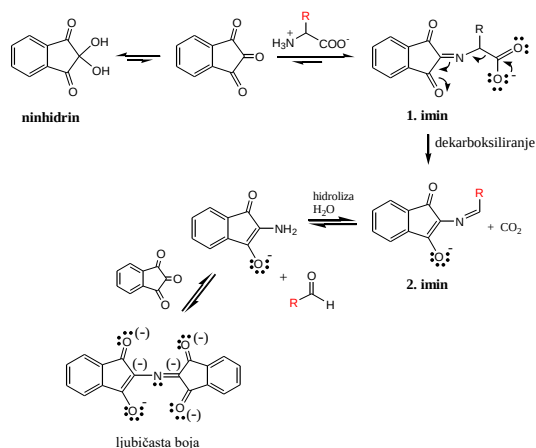
- Reakcije s ninhidrinom
 - aminokiseline (osim prolina i hidroksiprolina) s ninhidrinom stvaraju tamnoljubičastu boju – detekcija AK



- Ravnoteža hidratnog oblika i karbonilnog derivata ninhidrina

Reakcije aminokiselina

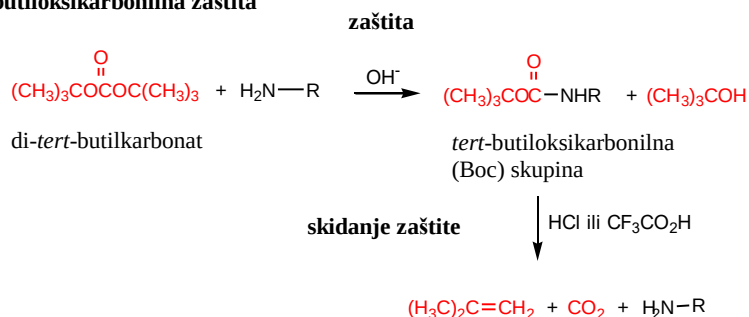
- Aminokiselina s trionom daje 1. imin $\rightarrow$ dekarboksiliranje, 2. imin $\rightarrow$ hidroliza, gubitak ogranka R aminokiseline, nastaje amin $\rightarrow$ reakcija amina s drugom molekulom ninhidrina, konjugirani produkt



Sinteza polipeptida: primjena zaštitnih skupina

- Tert*-butiloksikarbonilna (Boc) skupina može se skinuti s pomoću trifluoroctene kiseline ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) u octenoj kislini

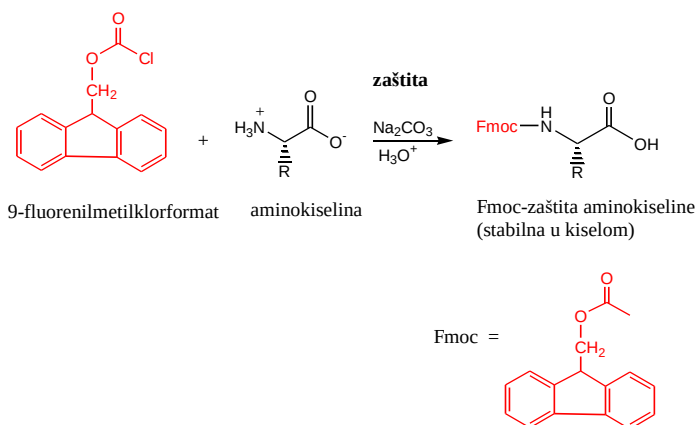
Tert-butiloksikarbonilna zaštita



Sinteza polipeptida: primjena zaštitnih skupina

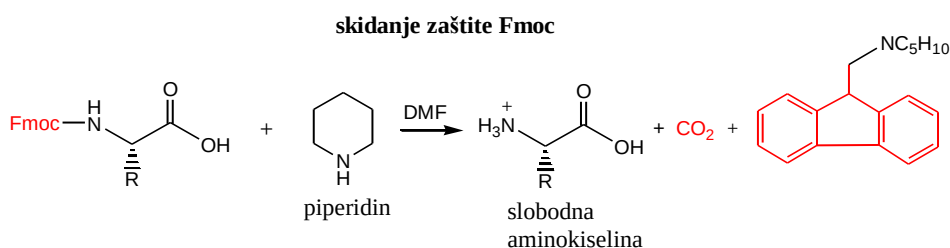
- 9-Fluorenilmetoksikarbonilna (Fmoc) skupina stabilna je u kiselim uvjetima

9-fluorenilmetoksikarbonilna zaštita



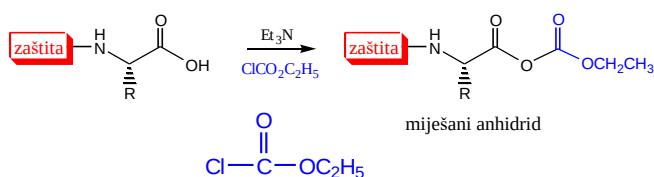
Sinteza polipeptida: primjena zaštitnih skupina

- Uklanjanje Fmoc skupine provodi se u blagim bazičnim uvjetima primjenom piperidina



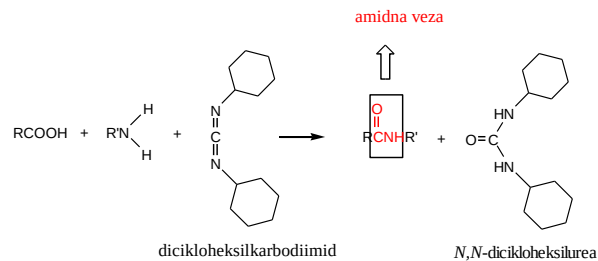
Sinteza polipeptida: primjena zaštitnih skupina

- **Aktiviranje karboksilne skupine**
- U ranoj metodi sinteze peptida prevođenje karboksilne skupine u acil-kloridnu skupinu – nedostatak: velika reaktivnost i nus-reakcije
- Primjena etilklorformata – nastaje miješani anhidridni derivat AK koji se može nadalje koristiti za stvaranje amidne veze, vezanje s drugom AK



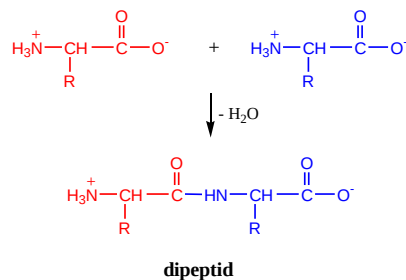
Sinteza polipeptida: primjena zaštitnih skupina

- **Aktiviranje karboksilne skupine**
- Dicikloheksilkarbodiimid (DCC) - često korišteni reagens



Polipeptidi i proteini

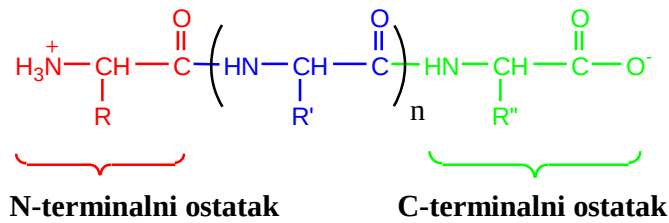
- Polimerizacija aminokiselina pomoću enzima u živim organizmima – povezivanje AK preko amino i karboksilne skupine → PEPTIDI



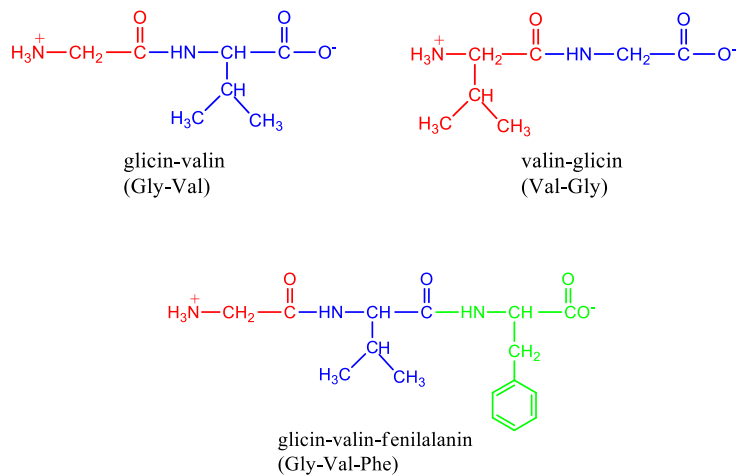
- Dipeptidi (2 AK), tripeptidi (3 AK), oligopeptidi (3-10 AK) i polipeptidi
- Proteini su polipeptidi koji se sastoje od jednog ili više polipeptidnih lanaca

Polipeptidi i proteini

- Polipeptidi su linearni polimeri
- Na jednom kraju lanca je slobodna NH_3^+ skupina, dok je na drugom kraju lanca slobodna CO_2 skupina
- N-terminalni ostatak na lijevoj, a C-terminalni ostatak na desnoj strani polipeptidnog lanca

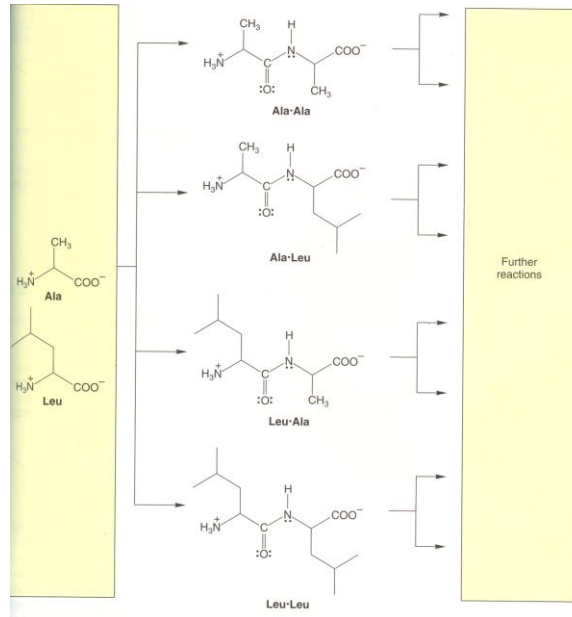


Polipeptidi i proteini



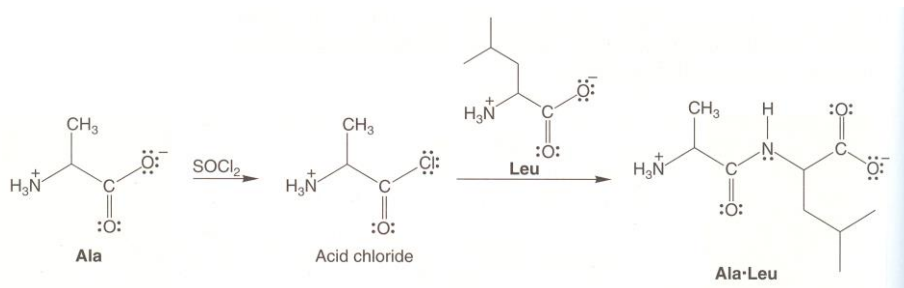
Sinteza polipeptida

- U sintezi dipeptida Ala-Leu možemo dobiti 4 dimerne molekule i ostale veće peptide



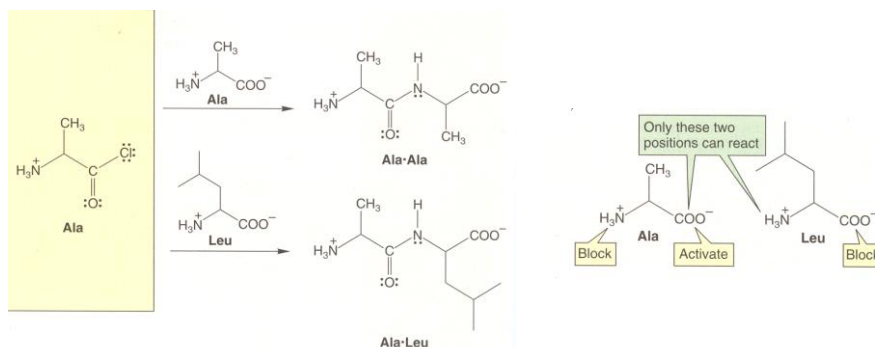
Sinteza polipeptida

- Strategija
 - aktivirati karboksilnu skupinu alanina prevođenjem u acilni klorid ili mješoviti anhidrid
 - nakon toga reakcija s leucinom



Sinteza polipeptida

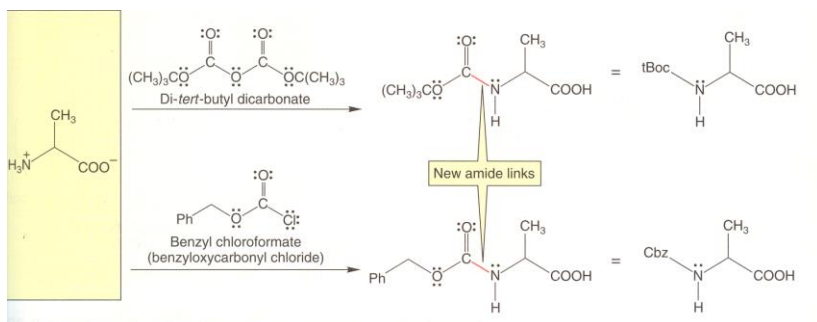
- Reakcijom acil-klorida s amino skupinom alanina i leucina dobijemo smjesu produkata



- Blokirati karboksilnu skupinu leucina i amino skupinu alanina!
- Moramo imati na umu da ćemo zaštitne skupine uklanjati!

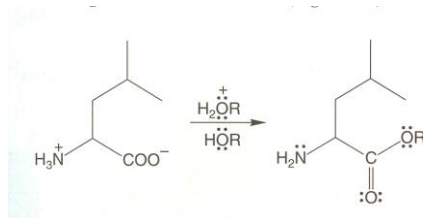
Sinteza polipeptida

- Deaktiviranje amino skupine transformacijom (adicija-eliminacija) u *tert*-butiloksikarbonilnu (Boc) i benziloksikarbonilnu skupinu (Cbz)



Sinteza polipeptida

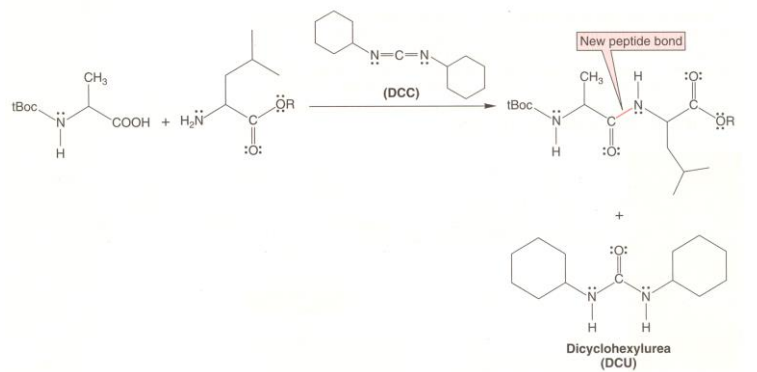
- Deaktiviranje karboksilne skupine leucina jednostavnim prevođenjem u ester



- Povezati nezaštićenu amino skupinu Leu i karboksilnu skupinu Ala u blagim uvjetima
- Dicikloheksilkarbodiimid (DCC) za stvaranje peptidne veze
- Nastajanje amidne veze je reakcija dehidratiranja, DCC snažan reagens za dehidratiranje

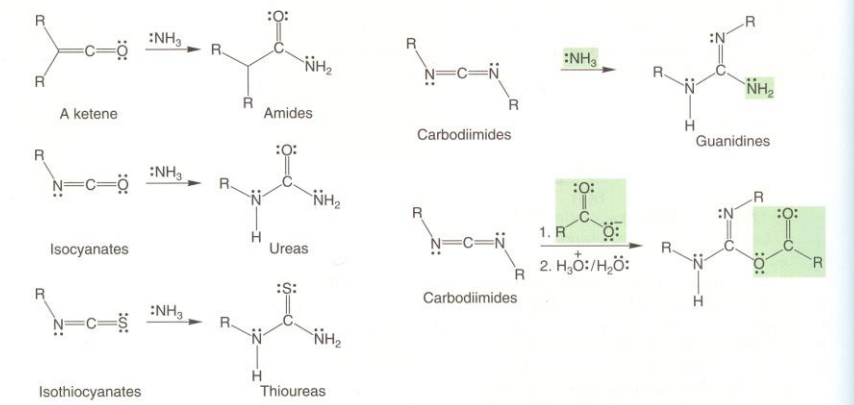
Sinteza polipeptida

- DCC se prevodi u hidratirani oblik dicikloheksilureu (DCU)



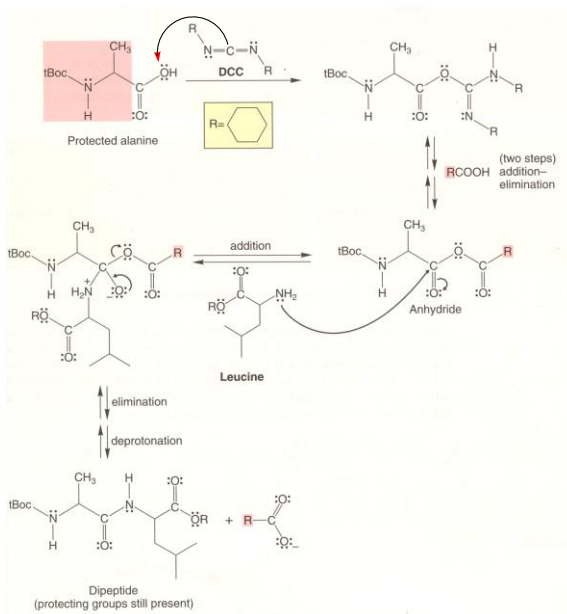
Sinteza polipeptida

- Keteni, izocijanati i izotiocijanati: spojevi s kumuliranim dvostrukim vezama snažno reagiraju s nukleofilima
- DCC reagira s aminima i nastaje gvanidin
- Reakcija DCC-a s karboksilatima



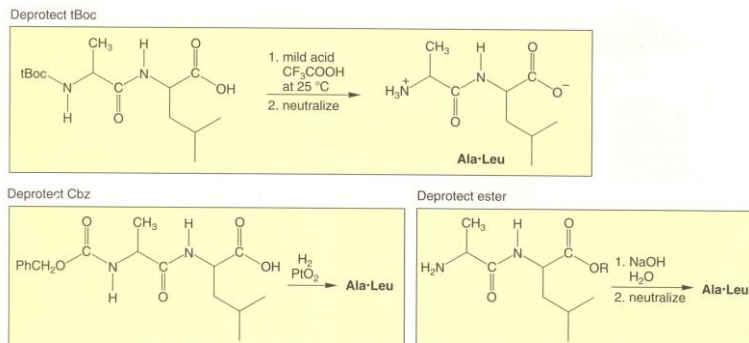
Sinteza polipeptida

- Nezaštićena karboksilna skupina u Ala i DCC → intermedijar koji reagira s karboksilnom kis. → anhidrid koji adic.-elim. meh. s Leu tvori dipeptid sa zaštićenim skupina



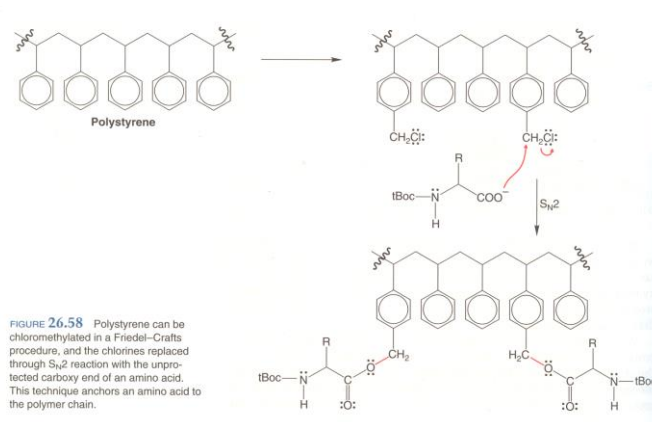
Sinteza polipeptida

- Slijedi skidanje zaštite Boc u blago kiselim uvjetima (nema cijepanja amidne veze) ili zaštite Cbz katalitičkim hidrogeniranjem
- Tretiranje estera s bazom → regeneriranje kis. → **Ala-Leu**
- Višestupnjevite sinteze većeg peptida ili proteina, nedostatak: nisko ukupno iskorištenje



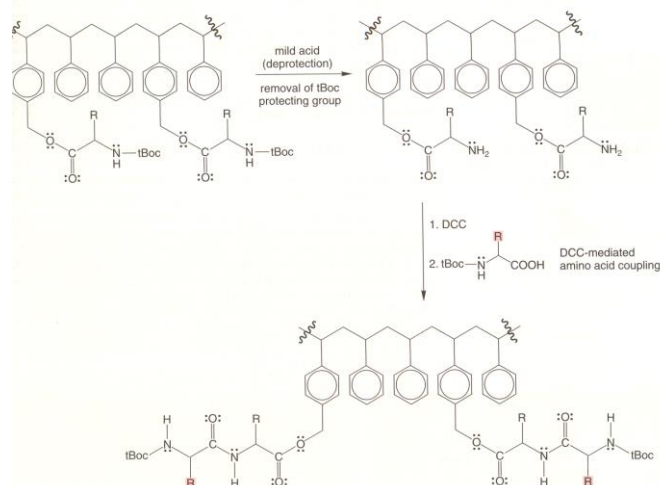
Sinteza polipeptida

- Automatizirane sinteze - **Merrifieldov** postupak
- Vezanje karboksilne skupine Boc-zaštićene AK na polimerni materijal izgrađen od polistirena u kojem su neki fenilni prstenovi supstituirani s klometilnim skupinama
- S_N2 reakcijom atom klora zamijenjuje se s AK



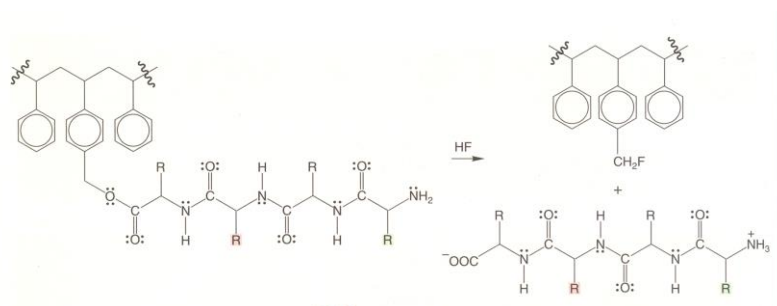
Sinteza polipeptida

- Skidanje zaštite Boc – slobodne amino skupine, povezivanje s AK primjenom dicikloheksilkarbodiimida (DCC)
- Ponavljanje ovog stupnja ovisno o duljini željenog peptida koji je vezan na polistiren



Sinteza polipeptida

- Završni stupanj je skidanje sintetiziranog peptida s nosača reakcijom s fluorovodičnom (HF) ili drugom kiselinom



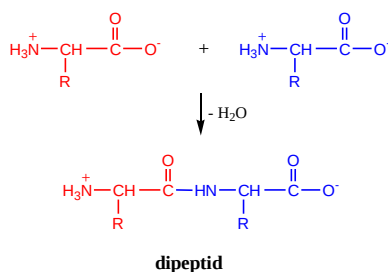
- Prvim automatiziranim postupkom Merrifield je sintetizirao peptidni lanac od 124 AK (iskorištenje 17%)
- Sinteza peptida na čvrstoj fazi - Nobelova nagrada 1984. god.

Reakcije povezivanja ogranaka AK

- Kod većine proteina α -AK kovalentno povezane – R skupine međusobno reagiraju
- Najčešća povezanost ogranaka pomoću disulfidnog mosta (-S-S-) – nastaje iz dvije molekule cisteina, unakrsno povezivnje (“cross-link”) važan u formiranju 3D strukture proteina
- Nastajanje i kidanje disulfidne veze je redoks reakcija

Reakcije kondenzacije

- U snažnijim reakcijskim uvjetima amino-skupina jedne molekule i karboksilna skupina druge se povezuju $\Rightarrow$ sekundarni amid
- Reakcija kojom organizmi grade proteine iz α -aminokiselina
- Zašto je kemičarima problem tom konvencionalnom tehnikom sintetizirati proteine?

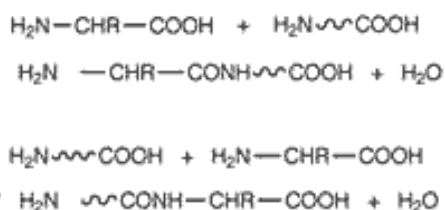


Reakcije kondenzacije

- Problemi s kojima se susreće sintetski organski kemičar:
 1. Skupina -COOH u α -aminokiselinama nedovoljno reaktivna za kondenzaciju s -NH_2 skupinom u blagim uvjetima
 2. Polipeptidni lanac gradi se jedinicu po jedinicu – ne izlagati sintetizirani peptid uvjetima u kojima će se nastala peptidna veza hidrolizirati
 3. Mnoge α -aminokiseline sadrže pobočne lance s funkcionalnim skupinama koje reagiraju u reakcijskim uvjetima za izgradnju peptidne veze

Reakcije kondenzacije

4. Polipeptidni lanac ima dva reaktivna kraja (COOH , NH_2), sintetski kemičar mora biti siguran da se svaka nova NH_2 skupina doda na ispravan kraj lanca



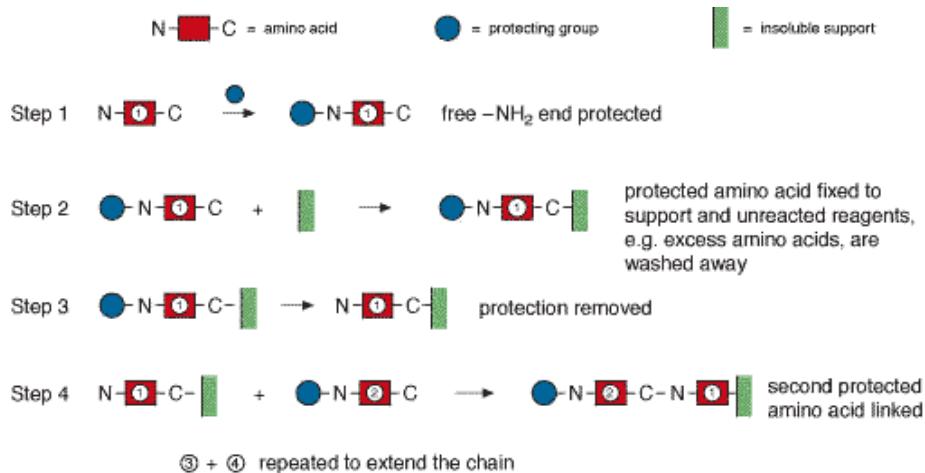
5. Svako produljavanje peptidnog lanca za jednu AK je jedan stupanj reakcije nakon kojeg slijedi pročišćavanje i izolacija produkta – svaki stupanj mora imati visoko iskorištenje

Reakcije kondenzacije

- Kemičari su probleme riješili na sljedeće načine:
 - problemi 1 i 2 - primjenom reagensa koji povećava reaktivnost - COOH skupine u blagim uvjetima
 - problem 3 – zaštitom reaktivnih funkcijskim skupina sa zaštitnim skupinama koje se na kraju mogu skinuti u blagim uvjetima
 - problem 4 – zaštitom skupina α -AK i polipeptida koje se ne povezuju sa zaštitnim skupinama koje se na kraju mogu lako skinuti
 - problem 5 – vezivanjem rastućeg polipeptidnog lanca za netopljiv nosač izgrađen od smole, ispiranje topljivih nus-produkata i neizreagiranog reagensa prije dodatka sljedeće α -AK. Nakon završene sinteze polipeptidni lanac se skida sa smole

Sinteza peptida na čvrstoj fazi

- Stupnjevi uključeni u sintezi peptida na čvrstoj fazi:

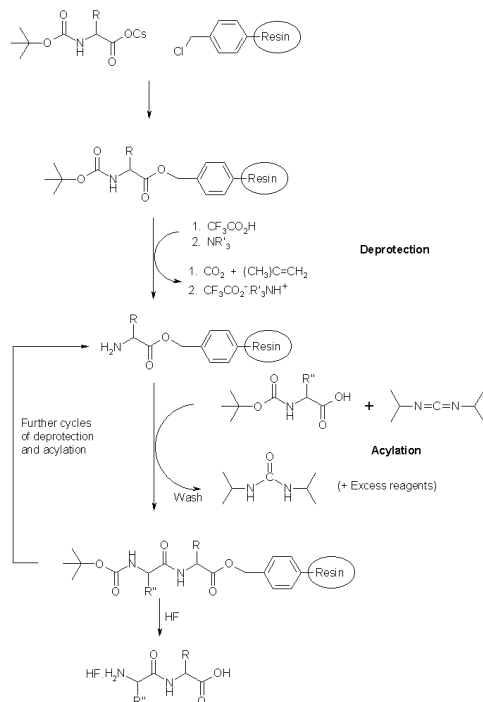


Sinteza peptida na čvrstoj fazi – Merrifieldova sinteza

- R. B. Merrifield - Nobelova nagrada 1984. god. za automatiziranu tehniku sinteze hormona inzulina (51 α -AK)
- Vezivanje aminokiseline na inertni netopljivi nosač (polistiren, polietilenglikol) - nosač supstituiran s klormetilfenilnom skupinom
- Produkt svakog stupnja krutina - laka izolacija, ispiranje i pročišćavanje produkta prije svakog sljedećeg stupnja
- Automatizirana sinteza - sinteza inzulina za 8 dana, ribonukleaze (124 AK) više od mjesec dana
- Prednost metode - 99% iskorištenje svakog stupnja, u sintezi ribonukleaze (369 reakcija, sveukupno iskorištenje 17%)

Merrifieldova sinteza

1. Zaštita amino skupine (*tert*-BOC)
2. Prva AK se veže na nosač supstitucijom klorida sa cezijevom soli BOC-aminokiseline – benzilni ester AK
3. Vezivanje aminokiseline - dicikloheksilkarbodiimid (DCC) reagens za sintezu peptidne veze



Merrifieldova sinteza

4. Jedna po jedna aminokiselina se veže na rastući polipeptidni lanac
5. Deprotekcija BOC skupine – 20-50 % otopina trifluorooctene kiseline (TFA) i neutralizacija amonijeve soli s tercijarnom bazom
5. Završno cijepanje AK i nosača, deprotekcija benzilirane zaštitne skupine uz jaku kiselinu (HF)