

Metode de obținere a secvențelor peptidice

Cuplarea pe lanțuri polimerice

VIOLETA MELINTE*, EMIL C. BURUIANĂ, TINCA BURUIANĂ

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Aleea Grigore Ghica Vodă, 41 A, 700487, Iași, România

The paper presents the modalities employed in the achievement of peptide chains and our contributions regarding the introduction of peptide moieties in the macromolecular structure.

Keywords: organic synthesis, peptide, biomacromolecules

Proteinele sunt componentele de bază ce alcătuiesc matricile naturale ale țesuturilor, motiv pentru care sinteza de peptide care mimează structura și proprietățile proteinelor naturale reprezintă un domeniu de top al științei moderne. Postularea de către Franz Hofmeister și Emil Fisher a faptului că structura proteinelor este cel mai bine reprezentată prin lanțuri de aminoacizi unite de legături amidice [1, 2], a fost precedată de sinteza primului derivat peptidic de către Curtius [3], urmat la puțină vreme și de către Fischer [4].

Formarea legăturii amidice între doi aminoacizi este o reacție endotermă, obținerea de amide din acizi carboxilici și amine fiind posibilă la temperaturi ridicate. Însă, temperaturile la care au loc aceste transformări depășesc cu mult limitele acceptabile pentru peptide, motiv pentru care sinteza peptidelor se realizează la temperatura camerei sau sub aceasta. De aceea, în scopul producerii de legături peptidice, una dintre grupările care vor constitui legătura amidică, fie cea carbonil, fie amino, trebuie să fie activate. Activarea grupărilor amino (*N-activare*) reprezintă o problemă delicată pentru care încă nu au fost găsite

soluții practice. Substituenții respingători de electroni ar trebui să mărească nucleofilicitatea atomului de azot, dar printr-o substituție adecvată, de exemplu cu grupare *terț* butil, viteza de acilare va fi de asemenea diminuată datorită substituentului voluminos.

Prin urmare, singura cale viabilă de rezolvare a problemelor de cuplare o constituie activarea grupării carboxil (*C-activare*) (fig. 1), unde X reprezintă un atom sau o grupare atrăgătoare de electroni care conferă atomului de carbon carboxilic suficientă electrofilie pentru facilitarea atacului nucleofil al grupării aminice. Intermediarul tetraedric format este stabilizat prin eliminarea fragmentului X, care este în general o grupare fugace. În alegerea grupărilor atrăgătoare de electroni există posibilități nelimitate și în consecință este relativ ușoară găsirea de noi metode de activare și cuplare. Formele activate reprezentative pentru unitățile carboxilice din aminoacizi sunt redată în figura 2, în ordinea creșterii complexității care corespunde de asemenea, cu puține excepții, și ordinii în care metodele au devenit disponibile. În continuare vor fi prezentate o serie de detalii privind metodologia de sinteza a lanțurilor peptidice.

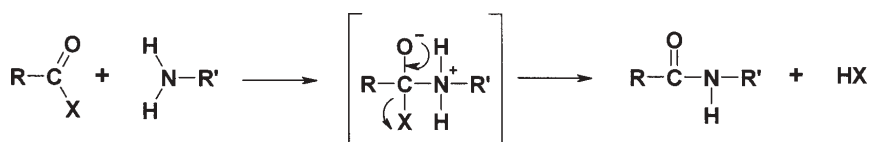


Fig. 1. Reprezentarea schematică a procesului de C-activare

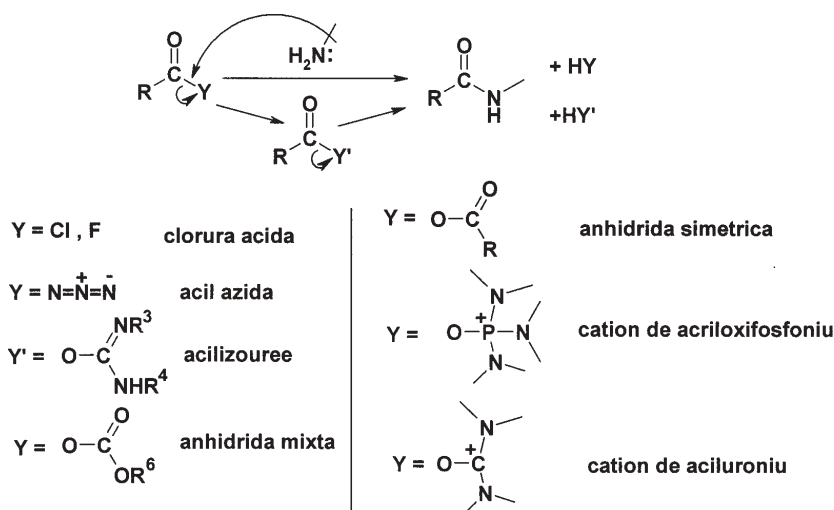


Fig.2. Metode de cuplare și formare activate

* Tel.: (+40) 0232 260332

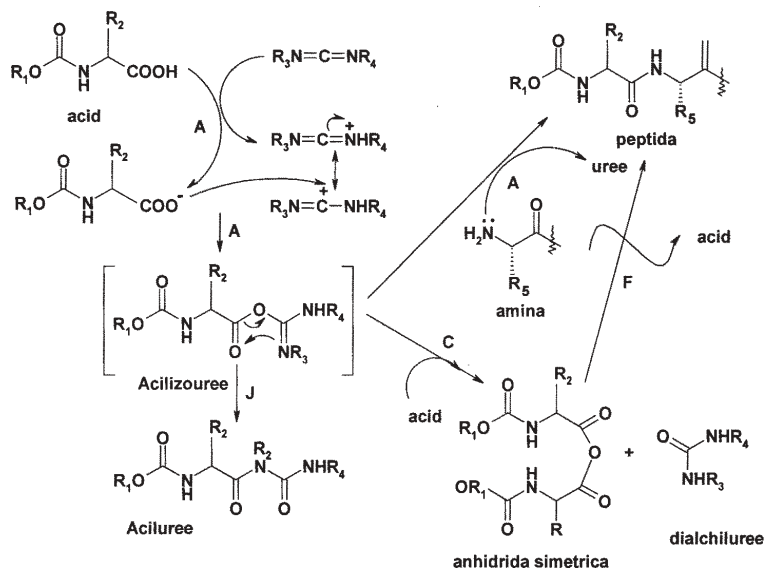


Fig. 3. Formarea de legături peptidice prin reacții ale N-alcoxicarbonilaminoacizilor mediate de carbodiimide

Formarea de legături peptidice prin reacții intermediare de carbodiimide

Cea mai populară metodă de obținere a legăturilor peptidice este cea prin intermediul dicitohexilcarbodiimidei (DCC). Carbodiimidele conțin doi atomi de azot u^oor bazici care catalizează reacția dintre carbodiimidă și acid generând un anion carboxilat și un atom de azot cuaternar (fig. 3). Delocalizarea formei protonate pe întreaga moleculă și apariția unui atom de carbon încărcat pozitiv determină atacul unității carboxilat asupra carbocationului cu formarea unei O-acilizouree. Prin urmare, prima etapă constă într-o reacție de carboxiadă, inițiată prin protonare. Deși intermediarul O-acilizoureeic al acidului N-alcoxicarbonilaminic nu a fost detectat, formarea acestuia a fost postulată prin analogie cu reacția carbodiimidelor cu fenolii care conduce la aceeași derivați cunoscuți ca reactivi de esterificare.

Cursul normal al reacției ar fi ca O-acilizoureea să sufere o reacție de aminoliză cu formarea peptidei (A), însă în anumite condiții unele dintre acestea sunt atacate de o a doua moleculă de acid și conduc la o anhidridă simetrică (C). Anhidrida este supusă unei reacții de aminoliză conducând la o peptidă și un acid care este reciclat (F). O a treia opțiune este aceea ca unele O-acilizouree să ciclizeze cu formarea de oxazolone care de asemenea, prin aminoliză formează peptide. Un curs nedorit al reacției și un randament scăzut pot apare datorită naturii O-acilizoureei care conține un atom de azot bazic în

vecinătatea carbonilului activat. Acest atom poate funcționa ca nucleofil dând naștere unei rearanjări (J) care produce N-aciluree, forma stabilă inactivă a acidului. Reacția este ireversibilă și consumă acidul de plecare fără generarea peptidei.

Formarea de legături peptidice prin reacții intermediare de anhidride simetrice ale acizilor N-alcoxicarbonilaminici

O alternativă la metoda clasică de sinteză a peptidelor utilizând ca intermediari carbodiimide o reprezintă varianta în care carbodiimida și acidul sunt mai întâi cuplați în absența nucleofilului, cu formarea unei anhidride simetrice (fig. 4). Anhidrida simetrică este mai puțin reactivă și prin urmare mai selectivă în reacție comparativ cu O-acilizoureea, deoarece ultima poate acila atât O-nucleofili cât și N-nucleofili, în timp ce anhidrida va acila doar N-nucleofili. Aceasta înseamnă că grupările hidroxil din catena laterală a serinei, treoninei sau tirozinei care nu au fost deprotonate, nu constituie acceptori pentru grupările acil din anhidride simetrice. O trăsătură adițională a metodei prezentate comparativ cu cea prin carbodiimide, este aceea a evitării posibilei reacții secundare dintre carbodiimidă și N-nucleofil cu obținerea guanidinei trisubstituite.

Formarea de legături peptidice prin reacții intermediare de anhidride mixte ale acizilor N-alcoxicarbonilaminici

A doua alternativă utilizată în realizarea de legături peptidice o reprezintă cea prin intermediul anhidridelor

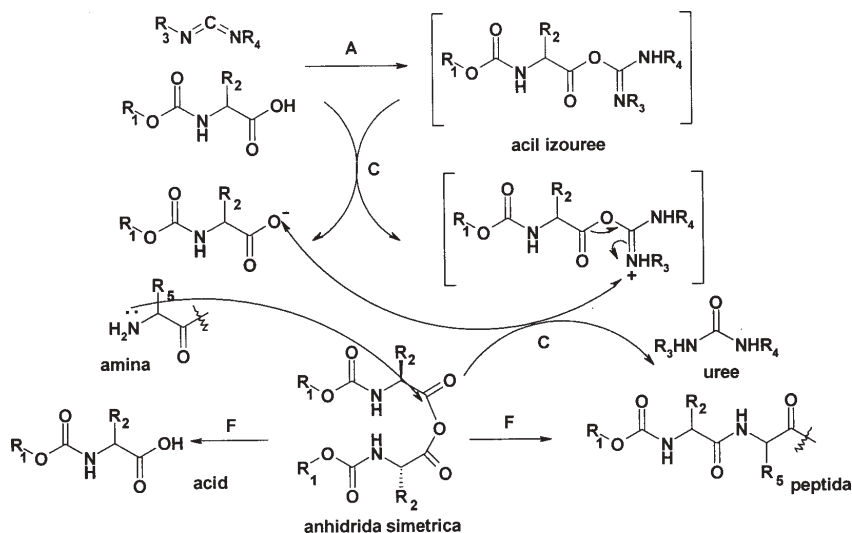


Fig. 4. Formarea de legături peptidice prin reacții ale N-alcoxicarbonilaminoacizilor prin intermediul anhidridelor simetrice

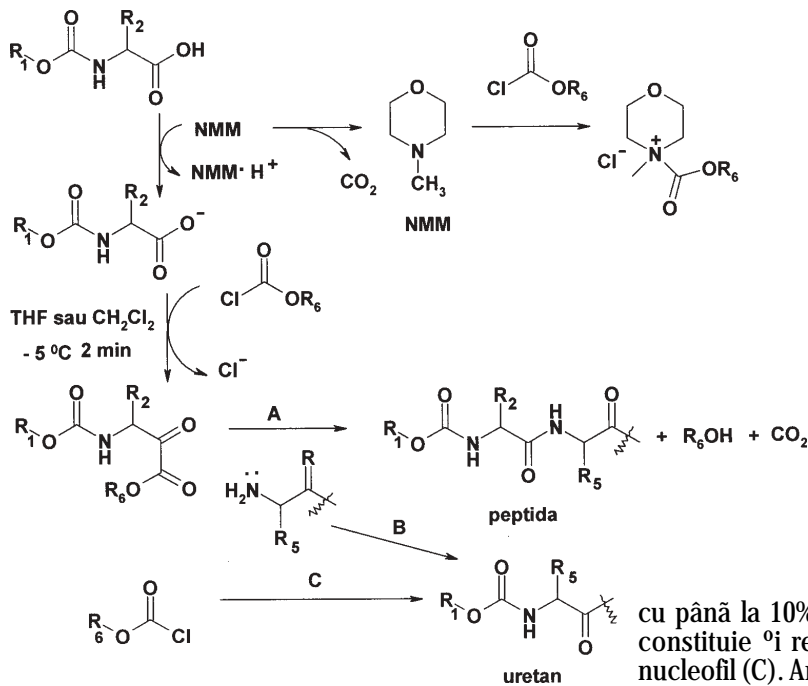


Fig. 5. Formarea de legături peptidice prin reacții ale N-alcoxicarbonilaminoacizilor prin intermediul anhidridelor mixte

mixte. Reactivii folosiți constau din cloroformiați de alchil, care însă nu pot fi denumiți ca reactivi de cuplare deoarece aceasta nu poate fi efectuată prin adăugarea directă a reactivului într-un amestec bicomponent. Procedul implică prepararea separată a unei anhidride mixte dintre un acid carboxilic și acid carbonic prin adăugarea reactivului în soluția ce conține anionul acidului N-alcoxicarbonilaminic, generat prin deprotonarea acidului în prezența unei amine terțiare (fig. 5). Reactivii utilizați în mod curent sunt cloroformiații de etil sau izobutil a căror activare decurge foarte repede (1-2 min), în timp ce procesul de aminoliză este complet în aproximativ o oră. Procesul de activare nu se poate desfășura în prezența unui N-nucleofil deoarece acesta interacționează cu cloroformiatul. Toate etapele reacției au loc la temperaturi scăzute pentru evitarea posibilelor procese secundare.

Principala reacție secundară asociată metodei care decurge prin intermediul anhidridelor mixte este reprezentată de aminoliza la carbonilul fragmentului carbonat (B), care conduce la obținerea de uretan. Datorită naturii grupării alchil R^6 , produsul secundar este stabil la toate metodele de deprotezare. În majoritatea cazurilor, reacția nu are importanță semnificativă însă pentru resturile împiedicate steric, în care R^2 este un lanț cu o grupare metil în poziția β se reduce randamentul în peptidă

cu până la 10%. O sursă minoră de legături uretanice o constituie și reacția dintre reactivul neconsumat și N-nucleofil (C). Aminoliza cloroformiatului decurge în exces de reactiv sau dacă reacția de obținere a anhidridei este incompletă (posibilă mai ales în cazul în care restul activat este împiedicat steric). Un alt proces secundar, poate fi disproporționarea anhidridei mixte la o anhidridă simetrică și pirocarbonat de dialchil.

Succesul formării legăturilor peptidice prin intermediul anhidridelor mixte este puternic dependent de selectarea adecvată a condițiilor de reacție. O atenție deosebită a fost acordată definirii parametrilor care vor conduce la o minimizare a epimerizării produse în timpul cuplării peptidelor. S-a concluzionat că rezultate îmbunătățite se obțin prin realizarea activării pentru 1-2 min la temperaturi mici (-5 și -15 °C) utilizând ca bază N-metilmorfolina în solvenți anhidri.

Formarea de legături peptidice prin reacții intermediare de esterii activi ai acizilor N-alcoxicarbonilaminici

O realizare unică în sinteza de peptide o reprezintă prepararea unui derivat al acizilor N-alcoxicarbonilaminici care să fie suficient de stabil încât să poată fi depozitat și destul de reactiv pentru a reacționa cu o grupare aminică. Astfel de compuși sunt creați prin transformarea unui acid într-un ester activat în urma reacției dintre acesta și un fenol sau o hidroxilamină substituie (HOR⁷) (fig. 6). Substituenții R^7 sunt aleși astfel încât să confere carbonilului din gruparea acil susceptibilitate la atacul nucleofil al unei

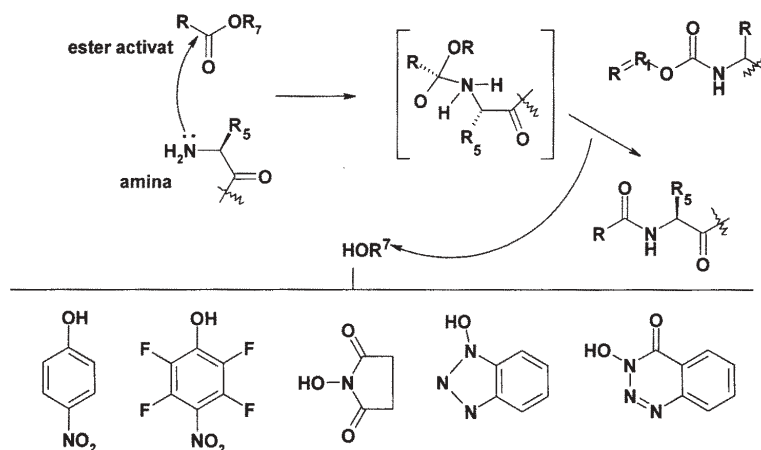


Fig. 6. Formarea de legături peptidice prin reacții ale N-alcoxicarbonilaminoacizilor prin intermediul esterilor activați

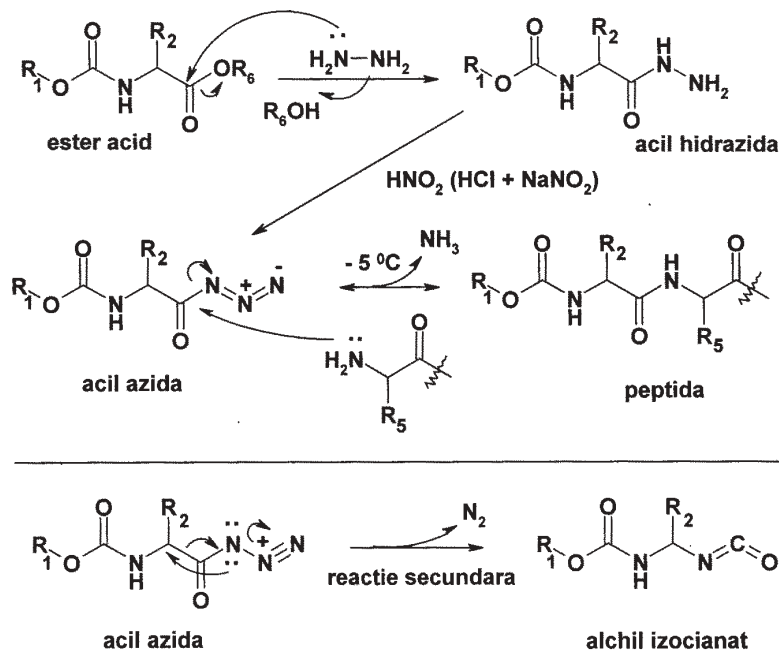


Fig. 7. Formarea de legături peptidice prin reacții ale azidelor N-alcoxicarbonilaminoacizilor

amine la temperatura camerei. Esterii suferă o reacție de aminoliză în două etape prin mijlocirea unui intermediar tetraedric, etapa determinantă de viteză fiind reprezentată de rearanjarea la peptidă și compusul hidroxilic de plecare. Esterii acizi sunt anhidride mixte formate între un acid carboxilic și un acid fenolic sau hidroxamic, în prezent fiind disponibile diferite tipuri de esteri activați (fig. 6).

Formarea de legături peptidice prin reacții intermediare de azide ale acizilor N-alcoxicarbonilaminici

Prima metodă folosită în formarea legăturilor peptidice a fost procesul prin intermediul azidelor al lui Curtius [5], frecvent utilizat și în prezent datorită aptitudinii sale de a împiedica racemizarea, conducând la produse optice pure. Pentru o lungă perioadă de timp s-a crezut că peptidele protejate, activate în forma azidelor acide, pot fi cuplate cu fragmentele aminice fără apariția procesului de racemizare. Experimente ulterioare au arătat că, în timp ce azidele peptidelor nu sunt ușor racemizabile, ele își pot pierde puritatea optică, în special în prezența unui exces de bază. Fără îndoială, procesul azidic oferă o serie de avantaje neobișnuite, dintre care cea mai atractivă o reprezintă posibilitatea transformării unei grupări carboxil protejată în una activatoare. Unitatea carboxilică poate fi protejată cu formarea unui ester alchilic (de ex. ester metilic) care poate fi convertit într-o hidrazidă acidă prin simpla expunere la o soluție de hidrazină în solvent organic. Ulterior, hidrazida este trecută într-o azidă reactivă prin tratarea cu acid azotos sau un nitrat alcalin (fig. 7).

Faptul că esterii alchilici sunt utili ca grupări protectoare este combinat aici cu eliminarea etapei de îndepărtare a grupării de blocare de la carboxil înainte de activare. Conversia esterilor la hidrazide este un proces simplu, deși condițiile de hidrazinoliză variază de la peptidă la peptidă. Majoritatea hidrazidelor acide sunt materiale maleabile, de obicei insolubile în solvenți organici din care se separă ușor. Transformarea hidrazidelor acide în azide acide reprezintă o reacție ușoară care are loc rapid chiar în soluții diluate la temperaturi scăzute, fiind contraindicată utilizarea unui exces de nitriți. Azida este extrasă cu un solvent organic iar peptida se obține prin lăsarea soluției anhidre în prezența aminei nucleofile la rece pentru câteva ore.

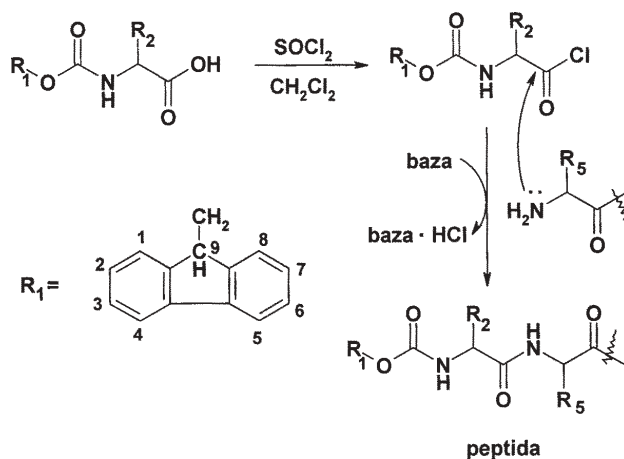


Fig. 8. Formarea de legături peptidice prin reacții ale clorurilor N-alcoxicarbonilaminoacizilor

Formarea de legături peptidice de la cloruri ale acizilor N-alcoxicarbonilaminici: clorura acidului N-9-fluorenilmetoxicarbonilaminic

Clorurile acide au fost disponibile din stadiile incipiente ale sintezei peptidelor. Glicil-peptidele au fost inițial obținute prin acilarea unui aminoacid cu clorura de cloroacetil, urmată de amonoliză, însă aplicabilitatea metodei a fost limitată până la descoperirea în 1932 a grupării labile benziloxycarbonil. O astfel de grupare permite formarea de legături peptidice prin utilizarea clorurilor acidului N-benziloxycarbonilaminic (fig. 8, R¹ = C₆H₅CH₂) obținute prin reacția dintre acidul de plecare și pentaclorura de fosfor.

Totuși, folosirea metodei a fost de scurtă durată datorită incompatibilității dintre cloruri acide și grupările protectoare *terț*butilice sensibile la acizi. Lucrurile s-au schimbat dramatic odată cu introducerea grupării N^α-protectoare stabilă la atacul acidului 9-fluorenilmetoxicarbonil (fig. 8). Clorurile Fmoc-aminoacizilor sunt preparate prin reacția acidului inițial cu clorura de tionil în diclorometan. Reacția de acilare a grupării aminice decurge rapid, în prezența unei baze care uneori transformă clorura acidă în 2-alcoxi-5(4H)-oxazolună, care suferă o reacție lentă de aminoliză. Într-o altă variantă, aminoliza este realizată într-un sistem bifazic cloroform/soluție apoasă de

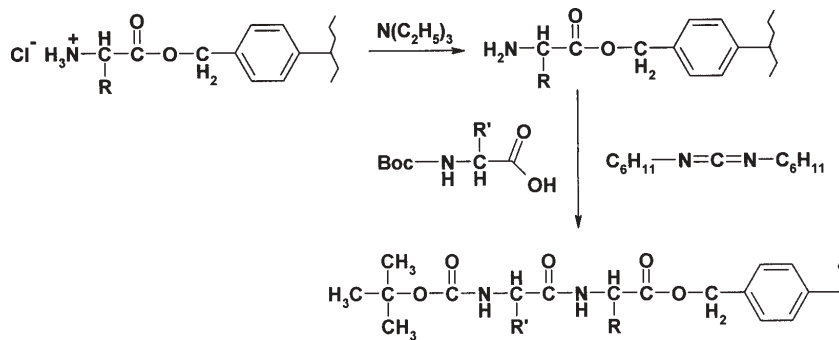


Fig. 9. Formarea legăturilor peptidice prin sinteză Merrifield

carbonat, pentru a reduce contactul dintre clorura acidă/bază. O altă opțiune constă în utilizarea sării de potasiu a 1-hidroxibenzotriazolului pentru neutralizarea acidului. Au fost stabilite condiții potrivite pentru asamblarea de lanțuri peptidice prin intermediul clorurilor de Fmoc-aminoacizi, însă metoda nu a fost adoptată pentru uz general datorită obstacolelor frecvente. Fără îndoială că acești compuși s-au dovedit a fi eficienți în sinteza în stare solidă pentru că au o grupare hidroximetilică a unei rășini de legare ca și pentru cuplarea resturilor împiedicate.

Sinteza peptidelor în fază solidă

Sinteza unui lanț peptidic ce cuprinde un număr ridicat de secvențe de aminoacid poate fi dificil de realizat iar proteinele cu peste o sută sau sute de resturi constituie obiective de neatins. Pașii de protecție, cuplare, deprotecție, izolare și caracterizare a intermediarilor reprezintă nu numai un efort de durată ci unul chiar descurajant. O sursă adițională de frustrare o reprezintă gama îngustă de solvenți potriviți pentru reacțiile ce implică intermediari de mase moleculare ridicate. Aceste dificultăți au condus la căutarea unei tehnici complementare care să faciliteze construirea de lanțuri peptidice lungi din aminoacizi. Prima realizare a unei astfel de idei se datorează lui Merrifield care a propus atașarea unui aminoacid pe un suport polimeric insolubil, urmând ca operațiile ulterioare să se desfășoare pe materialul peptidic legat de rășină [6].

Merrifield a prevăzut trei mari avantaje ale acestei metode:

- randamente ridicate prin forțarea finalizării reacțiilor
- o manipulare mai redusă și în consecință o durată a reacției mai scăzută
- minimizarea pierderilor de produși deoarece reacțiile și purificările au loc fără îndepărtarea suportului peptidic din vasul de reacție.

Majoritatea suporturilor polimerice insolubile folosite în această tehnică sunt geluri. Reacțiile conduse pe peptide atașate polimerilor au loc nu neapărat la suprafața polimerilor „solizi” ci în interiorul particulelor. Aceasta

implică umflarea polimerilor în solvenții utilizați și ca reacții să tranziteze aceste particule prin difuzie. Avantajul esențial al sintezei în fază solidă îl reprezintă ușurința cu care intermediarii blocați sunt separați de materialele de plecare, reactivi sau produse secundare. Derivatul peptidic, atașat de polimerul insolubil, rămâne nedizolvat după spălarea cu solvenți potriviți astfel încât izolarea laborioasă a intermediarilor prin extracție sau cristalizare devine inutilă. O problemă serioasă a sintezei de peptide și anume găsirea de solvenți pentru compuși cu mase moleculare ridicate a fost depășită prin utilizarea de solvenți în care polimerul se umflă. Relativ simplă devine și transformarea sării unui component aminic în amina liberă prin tratarea rășinii peptidice cu soluția unei baze terțiare și îndepărtarea sării de alchilamoniu formată prin spălare. Totuși, această metodă este însoțită de unele neajunsuri legate de purificarea intermediarilor și caracterizarea acestora.

În schema originală de sinteză în fază solidă, aminoacidul C-terminal a fost ancorat la suportul insolubil printr-o legătură esterică. Pentru aceasta, rășina - un copolimer al stirenului cu 1-2 % divinilbenzen - a fost transformată într-un derivat clorometilic, în speță un fragment de clorură de benzil conectat la matricea polimerică. Îndepărtarea grupării benzoiloxicarbonil prin tratare cu acid bromhidric în acid acetic nu a fost în totalitate selectivă și unele dintre legăturile esterice nou formate sunt rupte în reacție. O soluție la această problemă o constituie utilizarea grupării *tert*-butoxicarbonil (Boc) pentru protecția aminei. Eliminarea fragmentului Boc se realizează cu o soluție diluată de HCl/CH₃COOH sau cu un amestec de acid trifluoroacetic și diclorometan, etapă ce decurge fără o pierdere semnificativă a peptidei din polimer. Deprotonarea sării cuaternare de amoniu din peptidă se face cu o soluție de trietilamină, cu obținerea aminei libere care poate fi acilată de penultimul aminoacid, protejat de o grupare Boc (fig. 9). În majoritatea cazurilor, ca agent de condensare se utilizează dicyclohexilcarbodiimida iar reacții sunt în exces.

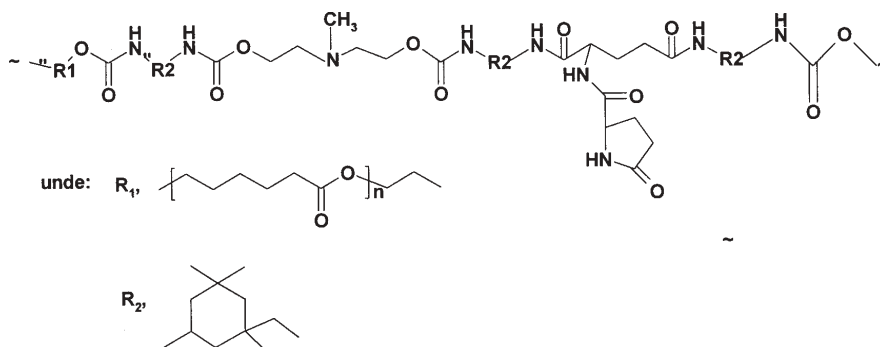


Fig. 10. Structura poliesteruretanului cu secvențe dipeptidice PU-PP

Ciclul de protejare/deprotejare continuă până când lanțul peptidic vizat este complet, moment în care peptida este îndepărtată de pe suportul insolubil prin acidoliza cu acizi tari (HBr în acid trifluoroacetic).

Recent, au fost preparate prin metoda în fază solidă o serie de peptide ce conțin în structură între 15 și 50 de meri de aminoacizi (alanină, fenilalanină, lizină, acid glutamic, tirozină și valină) [7], de lanțurile cărora au fost ancorate proteine de bază din mielină, proteine proteolipidice sau glicoproteine mielinice oligodendrocite, rezultate preliminare confirmând caracteristicile scontate.

O provocare în obținerea de biomateriale cu secvențe peptidice o reprezintă introducerea acestora în structuri polimerice fără alterarea calităților biologice. Astfel, în grupul nostru au fost sintetizate materiale polimerice incluzând secvențe dipeptidice de tipul acidului *S-piroglutamil-S-glutamic* a cărui sinteză este laborioasă [8]. Poliuretanii propuși s-au realizat prin poliadiția treptiformă dintre policaprolactona diol de masă moleculară 2000, izoforon diizocianat și un amestec de dipeptidă și N-metildietanol amină. Structura și implicit proprietățile polimerului rezultat sunt determinate în principal de natura și puritatea componentelor de plecare, de condițiile de sinteză (stoechiometrie, temperatură, cinetică de reacție) ca și de natura forțelor intermoleculare datorate legăturilor de hidrogen dintre elementele constitutive uretanice,

esterice, amidice din catena polimeră. Structura ideală a unui astfel de polimer (**PU-PP**) care conține grupări dipeptidice este prezentată în figura 10 [9].

Prin alegerea potrivită a componentelor de reacție care formează segmentele flexibile alături de cele rigide se pot influența o serie de proprietăți ale polimerilor. Pentru scopuri biomedicale se impune însă o caracterizare mai amplă a polimerului și a filmelor derivate pentru a stabili posibilitățile de modificare a rugozității și porozității suprafețelor, ca factori importanți pentru zona de aplicație vizată.

Bibliografie

1. HOFMEISTER, F., *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol.*, **1**, 1902, p. 759
2. FISCHER, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **39**, 1906, p. 530
3. CURTIUS, T. J. *Prakt. Chem.*, **24**, 1881, p. 239
4. FISCHER, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **35**, 1902, p. 1095
5. CURTIUS, T., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **35**, 1902, p. 3226
6. MERRIFIELD, R.B., *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 1963, p. 2149
7. FRIDKIS-HARELI, M., SANTAMBROGIO, L., STERN, J., FUGGER, L., BROSANAN, C., STROMINGER, J.L., *J. Clin. Invest.*, **109**, 2002, p. 1635
8. lucrare ecb/tb
9. BURUIANA, T., BURUIANA, E.C., OLARU, M., MELINTE V., International Conference on Biomaterials & Medical Devices BiomMedD'2006, 9-11 noiembrie, Iasi

Intrat în redacție: 2.07.2007

