

Trabajos

Ciclación de péptidos sintéticos a través de la formación de lactamas y puentes disulfuro. Aplicación a diferentes modelos de interés biológico.

RECIBIDO: 20/5/08

ACEPTADO: 14/8/08

Santi, M.N. • Lorenzón, E. • Costabel, F. • Tonarelli, G.G.

Dpto. de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (U.N.L). Ciudad Universitaria - Paraje El Pozo, C.C. 242- Santa Fe. Argentina.

Correspondencia: Georgina G. Tonarelli. Departamento de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, U.N.L., C.C 242, C.P. 3000 Ciudad Universitaria, Santa Fe, Argentina.

Email: tonarelli@fbcb.unl.edu.ar.

Tel: 54-342-4575206 int.224, Fax: 54-0342-4575221

RESUMEN: Los péptidos cíclicos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y poseen un amplio espectro de actividad biológica. Por lo tanto, son considerados como compuestos líderes en el descubrimiento de fármacos.

Con la finalidad de estudiar la factibilidad de reemplazar los puentes disulfuro por enlaces amida en la síntesis de péptidos cíclicos, se eligieron moléculas con secuencias y tamaño de anillo diferentes. Se utilizaron tres modelos de estudio: -la cadena A de la hormona relaxina humana y -dos péptidos antigénicos del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE) correspondientes a la glicoproteína de transmembrana gp45, y a la proteína de la cápside p26; las secuencias nativas contienen puentes disulfuro tipo cadena lateral-cadena lateral.

Los resultados demuestran que diferentes factores estructurales, entre ellos el tamaño del ciclo, la hidrofobicidad y la estructura secundaria de las secuencias pueden influir en etapas clave de las ciclaciones por puente lactama, realizadas en fase sólida.

PALABRAS CLAVE: Síntesis en fase sólida, péptidos cíclicos, lactamas, disulfuro.

SUMMARY: *Cyclization of synthetic peptides through the formation of lactams and disulfide bridges. Applicability to different models of biological interest.*

Cyclic peptides are broadly distributed in nature and they possess a wide spectrum of biological activity. Therefore, they are considered as leading compounds for drug discovery.

With the purpose of studying the feasibility of replacing the disulphide bridges by

amide bonds in the synthesis of cyclic peptides, molecules were chosen with different sequences and ring size.

Three models were used in this study: - the chain A of human relaxin hormone and -two antigenic peptides from the equine infectious anemia virus (VAIE), corresponding to the transmembrane glycoprotein gp45 and to the capsid protein p26; the native sequences contain

side chain-side chain disulphide bridges. Results demonstrate that different structural factors, among them the size of the cycle, the hydrophobicity and the secondary structure of the sequences, may influence key steps of lactam bridge cyclizations performed in solid-phase.

KEYWORDS: Solid phase synthesis, cyclic peptides, lactams, disulphide.

Introducción

En los últimos años se ha dedicado una atención especial al desarrollo y optimización de metodologías para la preparación de péptidos cíclicos [1, 2], los que son conocidos a partir del descubrimiento del antibiótico Gramicidina S durante los años '40 [3]. Desde ese momento y hasta la fecha el interés por este tipo de moléculas se ha incrementado notablemente. Esto es comprensible si se tiene en cuenta que un gran número de péptidos cíclicos bioactivos han sido encontrados en la naturaleza, y por otra parte, péptidos con importantes propiedades farmacológicas presentan en su mayoría estructura cíclica [4].

Debido a su rigidez estructural, estas moléculas presentan una incrementada actividad biológica, especificidad y gran estabilidad metabólica frente a la acción de las enzimas proteolíticas. La misma característica les confiere mayor selectividad en su afinidad por las cavidades del receptor [5].

Desde el punto de vista estructural, se los puede dividir en homodéticos y heterodéticos. El primer caso corresponde a estructuras conteniendo sólo enlaces peptídicos, incluido el anillo del ciclo (enlace lactama o puente amida); en el segundo, la estructura contiene los enlaces peptídicos correspon-

dientes a la secuencia lineal, pero el anillo puede estar formado por puentes disulfuro, lactona, éter o tioéter [6].

Dentro de los péptidos homodéticos se pueden describir cinco variedades, dependiendo de la posición de los residuos aminoácidos involucrados en la formación del ciclo: (a) *head to tail*, en la cual los residuos N y C terminales forman el anillo; (b) *side chain-to-side chain*, donde se conectan grupos funcionales de las cadenas laterales de dos residuos; (c) *side chain-to-end*, en la cual un grupo amino o ácido de la cadena lateral de un residuo se conecta con el N ó C terminal; (d) *backbone-to-backbone*, donde átomos de nitrógeno amídicos que forman parte del esqueleto de la cadena polipeptídica se conectan a través de un puente que consiste en grupos alquilo y un enlace amida y (e) *branched*, donde dos enlaces lactamas conectan dos cadenas peptídicas [7, 8].

En general, los péptidos cíclicos han sido sintetizados enteramente en solución mediante los métodos clásicos, o alternativamente, sintetizando la secuencia lineal en fase sólida y luego realizando la ciclación en solución [9].

Sin embargo, el extenso desarrollo de la Síntesis en Fase Sólida (SPPS) [10-12]

permitió disponer de un número cada vez mayor de grupos protectores para grupos funcionales amino y carboxilo selectivamente eliminables [13], presentándose diversas estrategias para la síntesis de péptidos cíclicos [14]. Una de las estrategias es la que emplea el sistema de grupos protectores alilo y aloc (aliloxicarbonilo) para la protección de los grupos carboxilo y amino de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales [15-18]. Estos protectores basados en el sistema alílico son completamente ortogonales con la química del 9-fluorenilmetoxicarbonilo-ter-butilo (Fmoc/t-Bu) [13]. En los últimos veinte años se han descrito numerosas ciclaciones en fase sólida, en las que el péptido permanece unido al soporte polimérico durante la reacción de ciclación [19]. Esta metodología presenta algunas ventajas con respecto a la ciclación en solución; entre ellas, el fenómeno de pseudodilución que favorece las reacciones intramoleculares con respecto a las intermoleculares. Además, la ciclación completa puede ser alcanzada mediante el agregado de un exceso de reactivos, los cuales pueden ser fácilmente eliminados por una técnica sencilla como es la filtración [20].

Sin embargo, la síntesis de péptidos cíclicos aún constituye una difícil tarea y requiere el empleo de grupos protectores ortogonales. Las oligomerizaciones y la epimerización del residuo C-terminal son las dos principales reacciones laterales que afectan las ciclaciones en fase sólida [21].

La ciclación por enlaces lactama tiene un marcado interés biotecnológico ya que permite acceder a moléculas más estables [20], ya se trate de antígenos e inmunógenos, agonistas de hormonas peptídicas [4] o péptidos con actividad antimicrobiana, entre otros.

En el presente trabajo se estudió la factibilidad de llevar a cabo ciclaciones tipo lactama (*side chain-to-side chain*) sobre tres péptidos modelo, los que en su estructura nativa presentan puentes disulfuro intramoleculares: -la cadena A de la hormona relaxina humana 2 [22, 23], -un péptido antigénico de la glicoproteína de membrana del VAIE ubicado en la región 533-547 de la proteína, y -un péptido antigénico de la proteína p26 del VAIE, región 318-346 [24, 25].

En el caso de los péptidos antigénicos se sintetizaron también las secuencias nativas cíclicas por formación de puentes disulfuro, a fin de evaluar si existían limitaciones sintéticas, y por otro lado para analizar la estructura secundaria.

Materiales y Métodos

1. Fmoc-aminoácidos: Para la síntesis de los diferentes péptidos se utilizaron los siguientes derivados: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Lys(Aloc)-OH y Fmoc-Orn(Aloc)-OH, (Calbiochem- Novabiochem Corp, California, USA). Todos los solventes utilizados fueron calidad grado HPLC y los reactivos grado síntesis.

2. Síntesis en fase sólida de secuencias nativas y de análogos de sustitución

2.1. Síntesis de análogos de la cadena A de la hormona relaxina por la química alilo-aloc

La síntesis de los análogos de la cadena A (Tabla N° 1) se realizó en fase sólida [10-12], en forma automática empleando la química Fmoc [26], en un equipo Applied

Tabla 1: Secuencias nativas y análogos de sustitución empleados en la síntesis de péptidos cíclicos mediante enlaces lactama y disulfuro.

Identificación	Secuencias
Anal. 1 relax.A(*)	PyrE-L-Y-S-A-L-A-N-K-[E-C(Acm)-H-V-G-K]c-T-K-R-S-L-A-R-F-C-OH
Anal.2 relax. A(*)	PyrE-L-Y-S-A-L-A-N-K-[E-C(Acm)-H-V-G-O]c-T-K-R-S-L-A-R-F-C-OH
gp45-loop(**) (nativa)	L-I-G-[C-I-E-R-T-H-V-F-C]c-H-T-G-NH2
Anal. I gp45(**)	L-I-G-[E-I-E-R-T-H-V-F-K]c-H-T-G- NH2
Anal. II gp45(**)	L-I-G-[K-I-E-R-T-H-V-F-E]c-H-T-G- NH2
p26-1(**)(nativa)	A-N-E-E-[C-R-N-A-M-R-L-H-R-P-E-D-T-L-E-E-K-M-Y-A-C]c-R-D-I-G- NH2
Anal. p26-1(**)	A-N-E-E-[K-R-N-A-M-R-L-H-R-P-E-D-T-L-E-E-K-M-Y-A-E]c-R-D-I-G- NH2

(*) extremo C- terminal: ácido; (**) extremo C- terminal: amida; c: aminoácidos involucrados en el ciclo

Biosystems 433A. Se empleó la resina 2-clorotritilo [27] para la preparación de péptidos tipo ácido (funcionalización del extremo C-terminal: -COOH), a fin de evitar los problemas de racemización que presenta la cisteína. El primer aminoácido fue incorporado manualmente con la finalidad de disminuir el grado de sustitución inicial de la resina (1.5 mmol/g) a 0.75 mmol/g. La resina se solvató con diclorometano (DCM), se agregaron Fmoc-Cys(Trt)-OH y diisopropil-etilamina (DIEA), agitando mecánicamente durante 1 h. La reacción se detuvo con metanol [28], y los lavados se realizaron con DCM. Los restantes aminoácidos fueron incorporados automáticamente, siguiendo el siguiente protocolo: -la eliminación de los grupos Fmoc de los aminoácidos se realizó con piperidina al 20 % en N, N-dimetilformamida (DMF). La activación de los grupos carboxilo [29] se realizó con 0.45 M de tetrafluorborato de O-(benzotriazol-1-il)- tetrametiluronio (TBTU), 0.45 M de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) en DMF y 2M de DIEA en N-metilpirrolidona (NMP). Al finalizar la síntesis, el lavado de la resina-péptido se realizó con DMF y DCM.

Los controles de las etapas de desprotección y acoplamiento se realizaron mediante el método de Kaiser [30].

Luego de la eliminación de los grupos protectores alilo y aloc [16], y de la ciclación, los análogos fueron sometidos al clivaje y desprotección total de las cadenas laterales de los aminoácidos [11, 12], para lo cual se empleó un protocolo estándar empleando ácido trifluoroacético (TFA) y como captadores agua, etanoditiol (EDT) y triisopropilsilano (TIS) en la proporción 94:2.5:2.5:1.0 (v/v), respectivamente. La precipitación se realizó con diisopropilmetiléter y la centrifugación se efectuó a 5°C. Como el último aminoácido incorporado fue el ácido piroglutámico no fue necesaria la eliminación del grupo Fmoc. El péptido seco se disolvió en ácido acético al 10 % y luego se liofilizó. La pureza se determinó por HPLC en fase reversa, y el PM por la técnica de desorción por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (Maldi-Tof).

2.2. Síntesis de secuencias nativas y análogos de gp45-loop y p26-1

La síntesis de los análogos (Tabla N° 1) se llevó a cabo en forma manual emplean-

do la química Fmoc/t-Bu, funcionalizados como amida en el extremo C-terminal. Para gp45-loop nativo, y los Análogos I y II se utilizó la resina Rink amida AM (4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetoamido-norleucilamidometilo), con una capacidad de 0.66 mmol/g; para el péptido p26-1 nativo y p26-1 análogo se empleó la resina Rink amida MBHA (4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetoamido-norleucil), con una capacidad de 0.61 mmol/g. Como reactivo de activación se empleó TBTU (2 eq.) y DIEA (4 eq.) disueltos en DMF. Para los Análogos I y II de gp45 se utilizó como mezcla de clivaje: 95% TFA, 2.5% H₂O y 2.5% TIS. Para el Análogo p26-1 la mezcla de clivaje utilizada fue 94% TFA, 2.5% H₂O, 2.5% EDT y 1% TIS. La precipitación de los péptidos se realizó con éter etílico frío. Los productos fueron liofilizados y analizados por HPLC y Maldi-Tof.

2.3. Desprotección de los aminoácidos con grupos protectores alilo y aloc

La eliminación de los protectores alilo y aloc se realizó mediante tetrakis (trifenilfosfina) paladio(0) (Pd(PPh₃)₄) y fenilsilano (PhSiH₃) en DCM bajo atmósfera de Argón o Nitrógeno durante un tiempo de 15 min. para cada desprotección [16, 17].

2.4. Ciclaciones

2.4.1. Formación de lactamas

Los procedimientos se realizaron en fase sólida, previa eliminación de los protectores aloc y alilo de los residuos de Lys/Orn y Glu. Se llevaron a cabo una serie de pruebas de ciclación para el análogo de la cadena A conteniendo Lys₁₅ y Glu₁₀, teniendo en cuenta los siguientes parámetros: tiempos de acoplamiento, reactivos activantes, disolventes, temperatura.

Reactivos de acoplamiento y solventes utilizados

1) Empleando como activante 4 eq. de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidin-fosfonio (PyBOP), 4 eq. de HOBT y 8 eq. de DIEA en DMF. Las reacciones fueron realizadas en los siguientes solventes: a-DMF, b-DCM, c-acetonitrilo (ACN), d-dimetilsulfóxido (DMSO), e-cloroformo-trifluoretanol (3:1), f- cloroformo-fenol (3:1), g-N-metilpirrolidona (NMP), h-tetrahidrofurano (THF), i-DMF-DCM (1:3).

2) Empleando 4 eq. de PyBOP, 4 eq. de 1-hidroxi-7-azobenzotriazol (HOAt) y 8 eq. de DIEA en DMF.

3) Empleando 3 eq. de N,N-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) en DCM.

En todas las pruebas mencionadas (1-3) se emplearon tiempos de reacción de 10, 15, 24 y 48 h, renovando los reactivos cada 2h 30 min.

4) Finalmente se realizó la ciclación en DMF a 50° C, durante 10 h, empleando como activante PyBOP/HOBT/DIEA en DMF.

2.4.2. Formación de puentes disulfuro

Los péptidos nativos p26-1 y gp45 loop se prepararon en sus versiones cíclicas mediante la formación de puentes disulfuro por oxidación al aire en buffer bicarbonato de amonio pH 7.9, y empleando soluciones de péptidos con baja concentración (0.1-0.3 mg/ml), a fin de favorecer las reacciones intramoleculares sobre las intermoleculares. En todos los casos, las mismas fueron controladas por el test de Ellman [31] y por HPLC.

3. Análisis por Dicroísmo Circular de los péptidos gp45-loop y p26-1 nativos

Los espectros de Dicroísmo Circular (DC) fueron obtenidos en un espectropolarímetro Jasco J715 (Jasco Corporation, Ja-

ción), trabajando en el rango de longitudes de onda de 190 a 250 nm, a 25°C, mediante el empleo de una celda de cuarzo de 1 mm de paso óptico, a concentraciones de 0.4 mg/ml para gp45-loop y 0.8 mg/ml para p26-1, en agua (v/v).

Estimación del contenido de estructura secundaria

La deconvolución de los espectros obtenidos se realizó empleando el programa Self Consistent Method (Selcon-2), desarrollado por Sreerama y Woody, que permite determinar las fracciones de estructura secundaria en las distintas secuencias. Para el análisis de estructura secundaria los espectros fueron transformados en elipticidad molar $[\theta]$, considerando el peso molecular del residuo medio y la concentración [32-34].

Resultados y Discusión

Utilización de un esquema

de protección ortogonal tridimensional

En este trabajo se han utilizado tres péptidos como modelo a fin de evaluar la factibilidad de la síntesis de péptidos cíclicos mediante la formación de lactamas. La síntesis de todos los análogos se realizó mediante la estrategia en fase sólida (Química Fmoc) [10-12], aplicando un esquema de protección ortogonal tridimensional (Fmoc/t-Bu/Al), ampliamente usado en la obtención de estructuras cíclicas [13].

La cadena A de la hormona relaxina 2 contiene 24 residuos de aminoácidos y un puente disulfuro intramolecular (Cys10-Cys15), formando un ciclo de 6 miembros. Fueron sintetizados dos análogos; en el Anal.1, Cys10 y Cys15 fueron reemplazadas por los aminoácidos Glu10 y Lys15, y en el Anal.2, Lys15 fue reemplazada por Orn15.

En estos análogos el residuo de Cys11 permaneció protegido con el grupo Acn,

con el objetivo de posteriormente efectuar la síntesis completa de la hormona, mediante el ensamblaje de las cadenas A y B.

El péptido antigénico de la glicoproteína de membrana del VAIE, correspondiente a la región 533-547 (gp45-loop) contiene un total de 15 residuos de aminoácidos, 9 de los cuales están involucrados en el ciclo (Cys4 - Cys12). Se sintetizaron dos análogos: Análogo I, donde las Cys 4 y 12 fueron reemplazadas por Glu y Lys respectivamente y el Análogo II, donde se invirtió el orden de los aminoácidos mencionados.

En relación al antígeno p26-1 (región 318-346) de la proteína de la cápside del VAIE, el mismo contiene 29 residuos de aminoácidos, 21 de los cuales están involucrados en la formación del ciclo (Cys5-Cys25). En este caso se sintetizó un análogo donde las Cys en posición 5 y 25 fueron reemplazadas por los aminoácidos Lys y Glu respectivamente.

Desprotección de los grupos alilo y aloc

Los grupos protectores alilo y aloc generalmente son eliminados en condiciones prácticamente neutras, empleando un catalizador de paladio en diferentes mezclas de solventes, y en presencia de un nucleófilo adecuado como capturador de los grupos alilo. La elección del nucleófilo es crucial para evitar la formación de alilaminas como productos secundarios.

En el presente trabajo se emplearon Pd(PPh₃)₄ como catalizador, PhSiH₃ como nucleófilo [16] y DCM como disolvente. Los resultados fueron satisfactorios en el caso de la cadena A de la hormona relaxina, siendo completa la desprotección para ambos análogos. Para el análogo donde Cys15 fue reemplazada por Lys15 (Análogo 1), el espectro Maldi-ToF mostró un pico mayoritario con relación masa/carga (m/z): 2777.34 correspondiente al ión (M+H)⁺ del péptido li-

neal totalmente desprotegido. Para el análogo donde Cys15 fue reemplazada por Orn15 (Análogo 2), el valor experimental de m/z : 2787.41 corresponde al ión $(M+H)^+$ del péptido completamente desprotegido.

La desprotección de las cadenas laterales del análogo p26-1 también fue óptima. El espectro Maldi-Tof de la Figura 1 muestra el pico con m/z : 3501.7 correspondiente al ión $(M+H)^+$ del péptido completamente desprotegido. La presencia de un elevado porcentaje de aminoácidos hidrofílicos en

la secuencia (57%) estaría favoreciendo su solvatación mientras permanece unido al soporte, y probablemente esto también favorece la desprotección.

A diferencia de lo observado con los análogos de relaxina y p26-1, la eliminación de los grupos alilo y alloc en los Análogos I y II de gp45 fue incompleta, lográndose en ambos casos aproximadamente un 50% de desprotección.

En la Figura 2 se muestra el RP-HPLC del Análogo II gp45, donde se observan dos pi-

Figura 1: Espectro Maldi-Tof del Análogo p26-1. En este análogo las Cys5 y Cys25 de la secuencia nativa fueron sustituidas por Lys y Glu respectivamente. El pico a m/z 3501.7 corresponde al ión molecular $(M+H)^+$ de dicho análogo completamente desprotegido

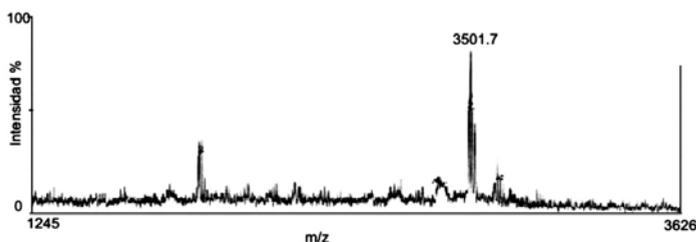
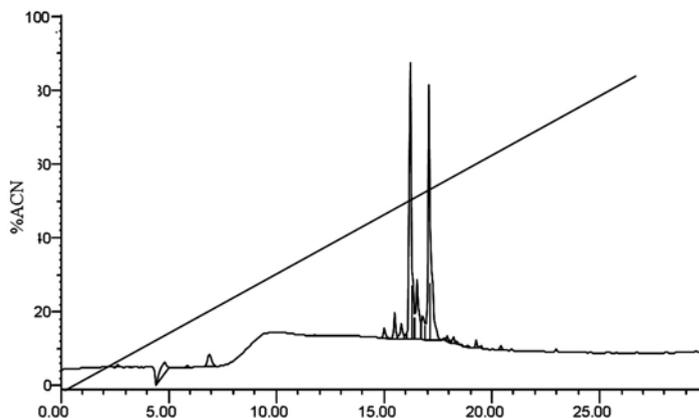


Figura 2: HPLC en fase reversa del Análogo II gp45. En este análogo las Cys4 y Cys12 fueron reemplazadas por Glu y Lys respectivamente. El pico con t_r 16.2 min corresponde al péptido desprotegido (aproximadamente 51%) y el pico con t_r 17.1 min al péptido protegido con el grupo alilo.



cos mayoritarios con tr 16.2 y 17.1 min. Los picos fueron separados por HPLC semipreparativa en fase reversa. El análisis por Mal-di-Tof evidenció que el pico con tr 16.2 min corresponde al péptido desprotegido (aproxima-

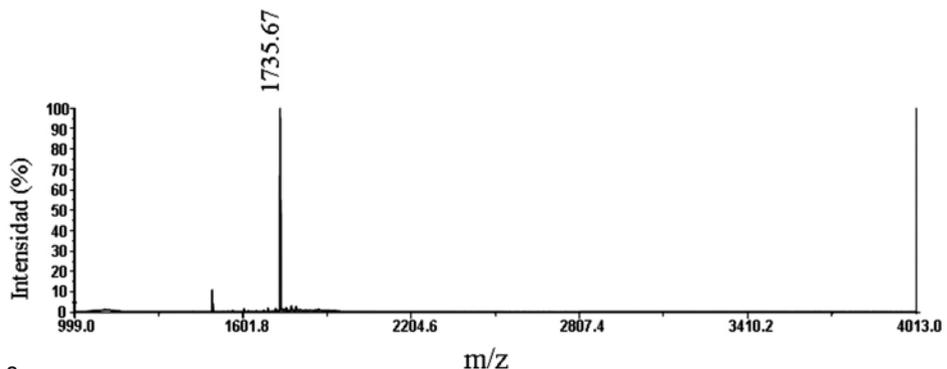
mente 51%) y el de tr 17.1 min al péptido con el protector alilo (Figuras 3a y 3b).

Diversos factores podrían estar impidiendo la completa desprotección de los grupos alilo y aloc en los dos análogos de

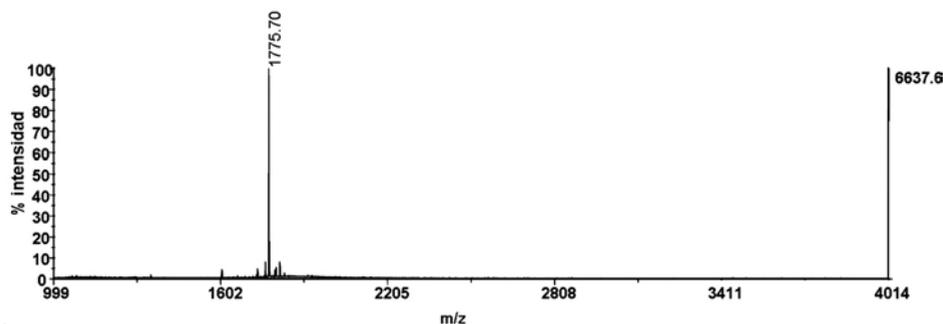
Figura 3: Espectros Mal-di-Tof del Análogo II gp45.

a. El espectro muestra el ión con m/z: 1735.57 correspondiente al análogo desprotegido.

b. El pico con m/z 1775.73 corresponde al péptido protegido con el grupo alilo.



a.



b.

gp45. La cercanía al soporte polimérico de los residuos aminoácidos protegidos con alilo y/o aloc sería uno de los factores a tener en cuenta. Por otra parte, las interacciones hidrofóbicas y el impedimento estérico ocasionado por los residuos His13(Trt), Phe11 adyacentes a Cys12, y de Ile2 e Ile5 próximos a Cys4, dificultan la accesibilidad a los reactivos para la desprotección y limi-

tan la solvatación de las cadenas. Esta región de la glicoproteína de transmembrana gp45 presenta componentes de estructura secundaria tipo lámina β y turn, siendo muy probable que el péptido protegido unido al soporte adopte también este tipo de conformación.

El uso de paladio (0) como catalizador para eliminar los grupos alilo y aloc no

siempre da buenos resultados [12], y por tal motivo esta técnica de ciclización no es universalmente aplicada, a diferencia de lo que ocurre con las ciclaciones “cabeza-cola” y las ciclaciones por puentes disulfuro, las que pueden realizarse por metodologías convencionales (en solución). Esto enfatiza la necesidad de optimizar la desprotección para cada secuencia en particular.

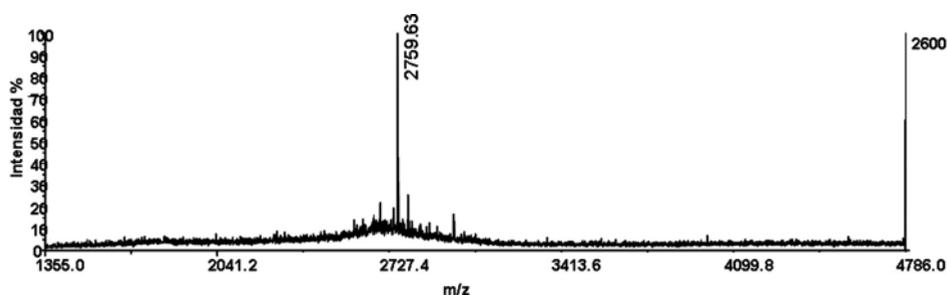
Ciclación por puente amida

Estudios orientados a la síntesis de esta clase de péptidos cíclicos han demostrado que el grado de sustitución de la resina, el solvente/s utilizado/s y los distintos reactivos de ciclación, constituyen variables fundamentales a optimizar y que influyen decididamente sobre los rendimientos [20].

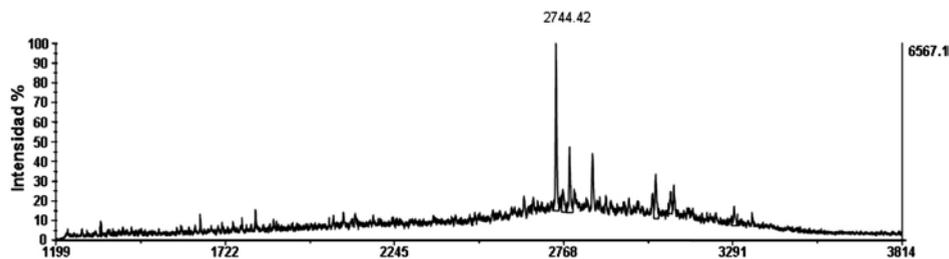
Las pruebas de ciclación de los análogos de la cadena A de relaxina se realizaron variando los siguientes parámetros: tiempos de acoplamiento, reactivos activantes, solventes y temperatura. Las condiciones óptimas para la ciclación de los dos análogos fueron las siguientes: PyBOP, HOBt y DIEA (4:4:8), solvente DMF, temperatura ambiente, durante 10h con agitación mecánica. Tiempos de reacción más prolongados generaron polimerizaciones que disminuyeron los rendimientos. En las Figuras 4a y 4b se muestran los espectros Maldi-ToF de dichos análogos cíclicos. El ión con m/z : 2759.63 corresponde al ión $(M+H)^+$ del análogo cíclico de la cadena A conteniendo Lys, y el valor de m/z : 2744.42 corresponde al análogo cíclico conteniendo Orn.

Figura 4: Espectros Maldi-ToF de los Análogos 1 y 2 de la cadena A.

- El ión con m/z : 2759.63 corresponde al $(M+H)^+$ del péptido cíclico conteniendo Lys en sustitución de Cys15.
- El pico con m/z : 2744.42 corresponde al péptido cíclico conteniendo Orn en reemplazo de Cys15.



a.



b.

En relación a la ciclación tipo lactama para el análogo p26-1, y teniendo en cuenta que la solvatación suele ser un problema crítico en las reacciones en fase sólida, se eligió en primer lugar, un protocolo idéntico al que dió resultados óptimos para la ciclación del análogo Cadena A de la hormona relaxina (reactivos, tiempo, solvente). Los resultados fueron negativos en esta primera prueba. Se modificó la variable tiempo de reacción (15, 24 y 48 h) siendo los resultados también negativos en todos los casos.

Varios trabajos dan cuenta de la influencia del solvente en la reacción de ciclación por puente lactama, no existiendo un criterio único al respecto. El empleo de solventes de polaridad elevada ayuda a disminuir los niveles de polimerización proporcionando mejores rendimientos. Entre los solventes más comúnmente empleados se encuentran, además de la DMF, la NMP y el DMSO, los cuales presentan muy buena solvatación para la mayoría de las secuencias [20]. En estudios realizados donde la ciclodimerización era un problema, la mezcla DMSO/NMP proporcionó excelentes resultados [21].

Teniendo en cuenta lo expuesto, se eligieron como nuevas alternativas para la ciclación del Análogo p26-1, el solvente DMSO y

la mezcla DMSO/NMP. Las pruebas se realizaron nuevamente variando los tiempos de reacción. En ninguna de las experiencias se formó el ciclo. Estos resultados sugieren que el tamaño del anillo, en este caso involucrando a 21 residuos de aminoácidos podría ser una de las principales limitantes para la formación del compuesto cíclico en fase sólida. A fin de continuar estudiando la formación de estos macrociclos, sería oportuno evaluar si la utilización de resinas con baja sustitución (en el orden de 0.2 mmol/g) es una alternativa favorable.

En lo referente a los Análogos gp45 I y II, los rendimientos de la ciclación fueron muy bajos, en el orden del 3%. Los mismos factores que impiden la eliminación completa de los grupos alilo y aloc en estos análogos, estarían dificultando también las ciclaciones en fase sólida.

Ciclación por formación de puentes disulfuro

En el caso de gp45-loop nativo el tiempo óptimo para la ciclación fue de 18 h 30 min, mientras que para p26-1 nativo el mismo fue de 9 h 30 min. En todos los casos, las reacciones fueron controladas por el test de Ellman y por HPLC. El espectro de DC de p26-1 nativo cíclico (Figura 5) muestra la presencia

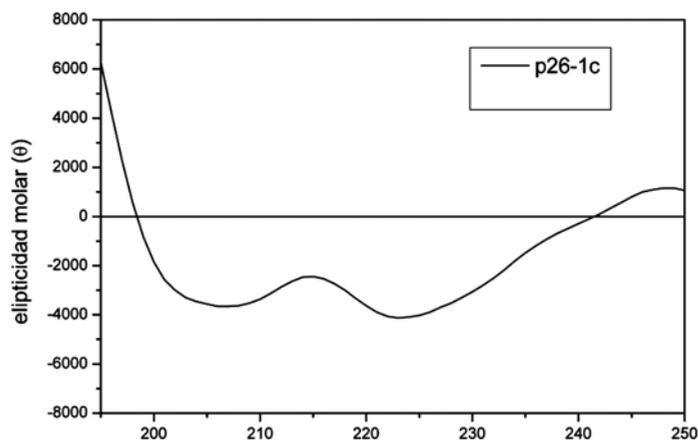


Figura 5: Espectro de DC de p26-1 nativo en su forma cíclica. Concentración 0.8 mg/ml en agua. Elementos de estructura secundaria calculados por el Programa Selcon: α -hélice 60%.

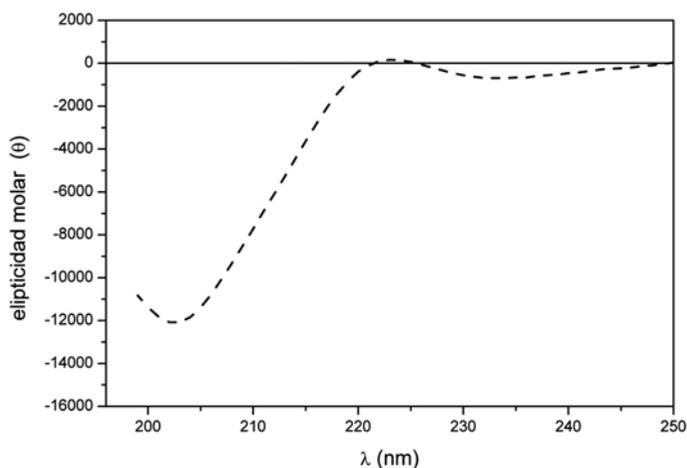


Figura 6: Espectro de Dicroísmo Circular del antígeno gp45-loop nativo cíclico. Concentración: 0.4mg/ml en agua. Elementos de estructura secundaria calculados por el Programa Selcon: α -hélice 0.7%, β -total 45.3%, turn 27%, no ordenada 19.7%.

de dos mínimos a 206 y 223 nm, típicos de espectros de proteínas que contienen α -hélice en sus estructuras. La deconvolución del espectro de DC mediante el programa Selcon-2 indica un 60 % de estructura helicoidal. El espectro de DC de gp45-loop nativo cíclico (Figura 6) presenta un mínimo a 203 nm. La deconvolución del espectro indicó un contenido de estructura β -total (paralela y antiparalela) del 45.3 %, 27 % de turn y 19.7% de estructura no ordenada.

Estos resultados destacan que la ciclación en solución del péptido gp45-loop nativo por formación de puentes disulfuro es significativamente más dificultosa que la del péptido p26-1 nativo, hecho que estaría relacionado con las diferentes estructuras secundarias y con la baja hidrofiliidad del péptido gp45 (13% de residuos hidrofílicos), en relación a p26-1 (57% de residuos hidrofílicos).

Conclusiones

Los resultados de este trabajo demuestran que la factibilidad de obtener péptidos cíclicos por formación de enlaces lactamas, en los que se conectan grupos funcionales de las cadenas laterales de dos residuos (side chain-to-side chain) median-

te ciclaciones en fase sólida, depende de diferentes factores, entre ellos: la cercanía del ciclo al soporte polimérico, el tamaño del ciclo a formar, la hidrofobicidad y la estructura secundaria de las secuencias. Hemos demostrado que estos factores no solamente afectan a las ciclaciones en fase sólida, sino además a las ciclaciones que se realizan en solución.

Los resultados sugieren que para la síntesis de péptidos cíclicos tipo lactama que presentan limitaciones sintéticas, por los motivos antes expuestos, debería explorarse las ventajas de emplear resinas con bajo grado de sustitución, y alternativamente la posibilidad de realizar las ciclaciones en solución.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco de los proyectos PICTR2002-00063(ANPCyT), PICTO2003-14-13215(UNL-ANPCyT) CAI+D 2002 N°18-Prog. 126

Los autores agradecen al Dr. Fernando Albericio y a la Dra. Eliandre de Oliveira del Parque Científico de Barcelona, España, por la realización de los espectros Maldi-Tof, y a la Dra. Leila Beltramini del Instituto de Física

de San Carlos, Universidad de San Pablo, Brasil, por la realización de los espectros de Dicroísmo Circular.

Bibliografía

1. Albericio, F. 2004. Developments in peptide and amide synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**: 211-221.
2. Alsina, J.; Rabanal, F.; Giralt, E. and Albericio, F. 1994. Solid-Phase Synthesis of Head-to-tail Cyclic Peptide via Lysine Side-Chain Anchoring. *Tetrahedron Lett.* **35**, 51: 9633-9636.
3. Condsen, R. J.; Gordon, A. H.; Martin, A. J. P.; Syngde, R. D. M. 1947. Gramicidin S: the Sequence of the Amino-acid Residues. *J. Biochem.* **41**: 596-602.
4. Spatola, A. F. 1998. "Peptide Hormones in Biorganic Chemistry: Peptide and Proteins". Sydney M. Hecht Ed., Oxford University Press, (Oxford, Great Britain).
5. Kohli, R. M.; Walsh, C. T.; Burkart, M. D. 2002. Biomimetic synthesis and optimization of cyclic peptide antibiotics. *Nature* **418**: 658-661.
6. Li, P.; Roller, P. P. and Xu, J. 2002. Current Synthetic Approaches to Peptide and Peptidomimetic Cyclization. *Curr. Org. Chem.*, **6**, 5: 411-440.
7. Kates, S. A.; Solé, N. A.; Albericio, F.; Barany, G. 1994. "Peptides: Design, Synthesis and Biological Activity". Basava, C., Anantharamaiah, G. M. Eds.; Birkhaeuser, (Boston, USA).
8. Spatola, A. F. and Romanovskis, P.; 2002. "Selected Structural Aspect in Chemistry, Biochemistry and Material Science". Arthur Greenberg, Curt M. Breneman and Joel F. Lielman Eds.; John Wiley & Sons, (USA).
9. Nubbemeyer, U. 2001. Synthesis of Medium-Sized Ring Lactams. *Top. Curr. Chem.* **216**: 125-196.
10. Merrifield, R. B. 1995. "Solid-phase peptide synthesis". In "Peptides: Synthesis, Structures and Applications", Academic Press (San Diego, USA), 93-169.
11. Lloyd-Williams P.; Albericio F.; Giralt E. 1997. "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins". CRC Press, Boca Raton, (Florida, USA).
12. Chan, W. C. and White, P. D. 2002. "Fmoc solid phase peptide synthesis. A practical approach". Oxford University Press. (Oxford, Great Britain).
13. Kates, S. A.; Solé, N. A.; Johnson, C. R.; Hudson, D.; Barany, G.; Albericio F. 1993. A novel, convenient, three-dimensional orthogonal strategy for solid-phase synthesis of cyclic peptides. *Tetrahedron Lett.* **34**, 10: 1549-1552.
14. Valero, M. L.; Giralt, E.; Andreu, D. 1999. A comparative study of cyclization strategies applied to the synthesis of head-to-tail cyclic analogs of a viral epitope. *J. Peptide Res.* **53**: 56-67.
15. Kates, S. K.; Daniels, S. B.; Albericio, F. 1993. Automated Allyl cleavage for continuous-flow synthesis of cyclic and branch peptides. *Anal. Biochem.* **212**: 303-310.
16. Thieriet, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibé, F.; Albericio, F. 1997. Use of Alloc-amino Acid in Solid-Phase Peptide Synthesis. Tandem Desprotection-Coupling Reaction Using Neutral Conditions. *Tetrahedron Lett.* **38**, 41: 7275-7278.
17. Grieco, P.; Gitu, P. M.; Hruby, V. J. 2001. Preparation of 'side-chain-to-side-chain cyclic peptides by Allyl and Alloc strategy: potential for library synthesis. *J. Pept. Res.* **57**: 250-256.
18. Bennett, W. D.; 2002. Removal of Allyl and Alloc Protecting Groups in Solid Phase Synthesis. *Advanced ChemTech. Application Note.* 001-0401-BB.
19. Rovero, P. 2000. "Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide". Kates, S. A.; Albericio, F.; Eds.; Marcel Dekker, (New York, USA), 331-364.
20. Taylor, J. W.; 2002. The Synthesis and Study of Side-Chain Lactam-Bridge Biopolymers (*Pep. Sci.*) **66**: 45-75.
21. Zhang, W.; Taylor, J. W. 1996. Efficient Solid-Phase Synthesis of Peptides with Tripodal

Side-Chain Bridge and Optimization of the Solvent Conditions for Solid-Phase cyclizations. *Tetrahedron Lett.* **37**, 13: 2173-2176.

22. Sherwood, O. D. 1994. "The Physiology of Reproduction". Knobil E. and Neill J. D. Eds., Raven Press, (New York), I. 861-1009.

23. Büllsbach, E. E.; Scwabe, C. 1991. Total synthesis of human relaxin and human relaxin derivatives by solid-phase peptide synthesis and site-directed chain combination. *J. Biol. Chem.* **266**: 10754-10761.

24. Montelaro, R. C.; Parekh, B.; Orrego, A.; Issel, C. J. 1984. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. *J. Biol. Chem.* **259**, 16: 10539-10544.

25. Soutullo, A.; Santi, M. N.; Perin, J. C.; Beltramini, L. M.; Borel, I. M.; Frank R.; Tonarelli, G. G. 2007. Systematic epitope analysis of the p26 EIAV core protein. *J. Mol. Recognit.* **20**, 4: 227-37.

26. Fields, G. B. and Noble, R. L. 1990. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *J. Pep. Protein Res.* **35**: 161-214.

27. Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, J.; Papaphotiu, G.; Sotiriou, P.; Yao, W.; Schaefer, W. 1989. Preparation of protected peptide fragments using triphenylmethyl resins. *Tetrahedron Lett.* **30**: 3943-3946.

28. Caba, J. M.; Rodriguez, I. M.; Manzanares, I.; Giralt, E.; Albericio, F. 2001. Solid-Phase Total Synthesis of Trunkamide A. *J. Org. Chem.* **66**: 7568-7574.

29. Albericio, F.; Chinchilla, R.; Dodsworth, D. J.; Najera, C. 2001. New trends in peptide coupling reagents. *Org. Prep. Proced. Int.* **33**: 203-303.

30. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **34**, 2: 595-608.

31. Ellman G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**: 70-77.

32. Sreerama N. and Woody, R. W. 1993. A self

consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* **209**: 32-42.

33. Woody, R. W. 1996. "Theory of circular dichroism of proteins". In "Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules". G. D. Fasman Ed., Plenum Press, (New York, USA), 25-67.

34. Sreerama N. and Woody, R. W. 2000. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **282**: 252-260.