

SINTESI DI PEPTIDI

Introduzione

I peptidi possono essere sintetizzati legando tra loro, nella giusta sequenza, gli amminoacidi di cui sono composti. Ci sono due tipi di motivi che possono spingere a sintetizzare un peptide.

1) Motivi di tipo **chimico**. Possono riguardare la ricerca e la messa a punto di nuove tecniche di sintesi oppure possono riguardare l'indagine sulle complesse relazioni tra struttura e funzione di una proteina. Per esempio si può studiare l'effetto provocato sull'attività biologica di un enzima dalla sostituzione di un amminoacido con un altro.

2) Motivi di tipo **farmacologico**. Possono riguardare la ricerca di nuovi farmaci o la produzione di altri già noti. Infatti molti peptidi hanno una forte azione farmacologica, per esempio l'ossitocina, un ormone di 9 amminoacidi, stimola la contrazione uterina durante il parto. Le encefaline, pentapeptidi prodotti nell'encefalo, hanno un'azione simile alla morfina. Infine frammenti sintetici di proteine virali sono utilizzati per cercare di produrre nuovi vaccini che sfruttano la relazione antigene-anticorpo.

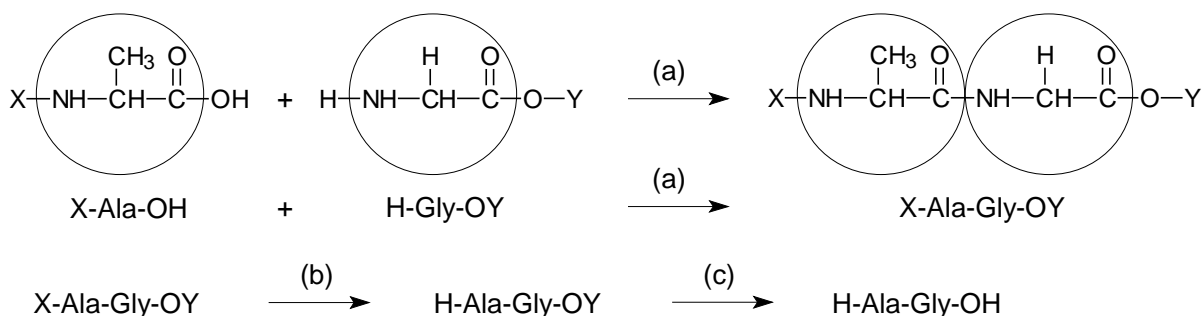
La sintesi di peptidi è un'operazione molto complessa anche se consiste nel realizzare sempre un solo tipo di legame, quello ammidico, tra il gruppo carbossilico di un amminoacido e quello amminico del successivo. Gli amminoacidi infatti sono molecole bifunzionali, alcuni anche trifunzionali, e quindi non è sufficiente realizzare il legame ammidico desiderato, ma è necessario che non si formi nessuno degli altri legami possibili. La sintesi risulta poi ancora più difficile per la presenza di gruppi funzionali nelle catene laterali degli amminoacidi e per la necessità di conservare l'attività ottica dei carboni chirali in posizione α .

Gruppi protettori

La sintesi di un dipeptide, ad es. alanil-glicina, Ala-Gly, permette di comprendere il problema della formazione del legame peptidico. Se si cercasse di ottenere questo dipeptide per semplice riscaldamento di una miscela dei due amminoacidi, alanina e glicina, si otterrebbe una miscela complessa di dipeptidi, tripeptidi e oligopeptidi con sequenze casuali. I soli dipeptidi sarebbero quattro: Ala-Gly, la molecola che si voleva ottenere, e inoltre Gly-Ala, Ala-Ala, Gly-Gly.

Per sintetizzare correttamente il dipeptide Ala-Gly è necessario che siano **liberi di reagire solo due gruppi funzionali**: il gruppo carbossilico dell'alanina e quello amminico della glicina. Gli altri due gruppi funzionali non devono reagire durante la formazione del legame ammidico e per questo devono essere legati a molecole chiamate **gruppi protettori**.

La sintesi del dipeptide Ala-Gly, quindi, può essere realizzata correttamente solo se alanina e glicina vengono utilizzate protette nella forma X-Ala-OH e H-Gly-OY, dove X e Y rappresentano due generici protettori rispettivamente del gruppo amminico e di quello carbossilico. Alla fine della sintesi i gruppi protettori devono poter essere rimossi senza danneggiare il peptide ottenuto.



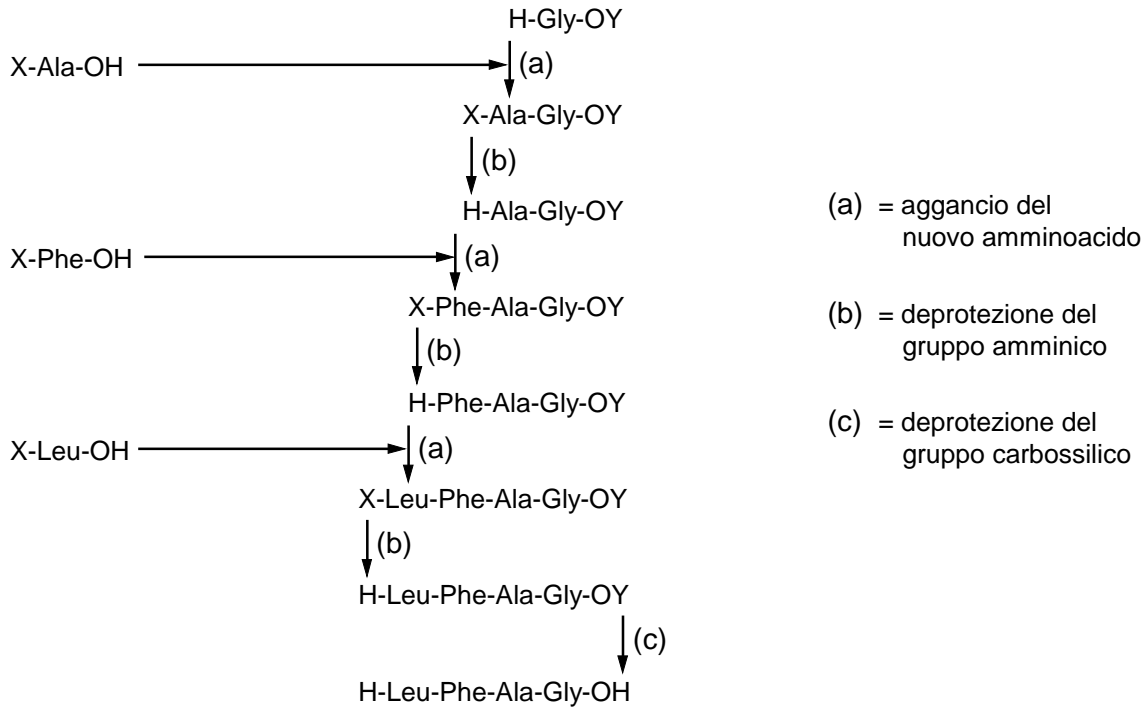
Si forma dapprima, nella reazione (a), il dipeptide X-Ala-Gly-OY completamente protetto. Da questo si può ottenere il dipeptide libero Ala-Gly attraverso le due reazioni (b) e (c) di deprotezione del gruppo amminico e del gruppo carbossilico.

La sintesi di un peptide di quattro o più amminoacidi si può eseguire secondo due vie alternative:

1) per **allungamento graduale** della catena che consiste nell'incorporare nel peptide un amminoacido alla volta a partire dal terminale carbossilico.

2) per **condensazione di segmenti** che si realizza unendo piccoli peptidi di sequenza appropriata per formare dei segmenti intermedi più lunghi che vengono poi agganciati tra loro per ottenere la sequenza peptidica finale.

Viene qui illustrata la sintesi per allungamento graduale di un tetrapeptide leucil-fenilalanil-alanil-glicina Leu-Phe-Ala-Gly. Si inizia dalla parte COOH terminale, quindi dalla glicina. Si prepara dapprima il dipeptide Ala-Gly a cui successivamente viene unita fenilalanina e per ultima leucina. Come si vede dallo schema seguente, il primo amminoacido, la glicina, viene introdotto con il gruppo carbossilico protetto nella forma H-Gly-OY, mentre ogni amminoacido successivo viene introdotto con il gruppo amminico protetto nella forma X-AA-OH.



La sintesi inizia con la preparazione del dipeptide Ala-Gly attraverso la reazione (a) tra X-Ala-OH e H-Gly-OY. Si ottiene il dipeptide completamente protetto X-Ala-Gly-OY. Prima di aggiungere il terzo amminoacido, Phe, è necessario restituire la reattività al gruppo amminico terminale del dipeptide e quindi bisogna staccare il gruppo protettore X. È importante che questa operazione (b) avvenga in modo selettivo cioè senza staccare anche il protettore Y perché il gruppo carbossilico terminale del peptide non deve mai reagire per tutto il corso della sintesi. Si ottiene così il dipeptide protetto al carbossile, ma con il gruppo amminico libero H-Ala-Gly-OY. La sintesi a questo punto si ripete sempre uguale, vengono ripetute le stesse reazioni per ogni amminoacido che si vuole introdurre. Si esegue prima la reazione (a) di agganciamento (in inglese coupling) con il nuovo amminoacido che deve avere il gruppo amminico protetto e poi la reazione (b) di deprotezione selettiva del gruppo amminico del peptide. Solo quando si è ottenuta la sequenza desiderata si procede alla deprotezione (c) del gruppo carbossilico che è rimasto protetto per tutta la durata della sintesi.

Da quanto visto finora si può dedurre un fatto di validità generale: la stabilità dei legami coinvolti nella sintesi di peptidi deve appartenere a tre categorie diverse:

1) **Legami labili**: il legame col protettore X del gruppo amminico in posizione α .

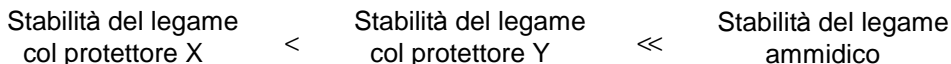
Il protettore X deve essere rimosso prima della reazione di agganciamento del peptide con ciascun amminoacido. Questa operazione si compie tante volte nel corso della sintesi quanti sono gli amminoacidi che si vogliono agganciare, quindi il protettore X deve poter essere staccato in condizioni blande nelle quali sia stabile il protettore Y del gruppo carbossilico terminale e anche i protettori di eventuali gruppi in catena laterale.

2) **Legami di media stabilità**: il legame col protettore Y del gruppo carbossilico terminale e con i protettori dei gruppi in catena laterale.

Questi protettori devono restare legati in modo stabile durante le ripetute operazioni di distacco dei protettori X del gruppo amminico in α , vengono tolti solo alla fine usando condizioni di reazione più drastiche nelle quali però sia stabile il legame ammidico.

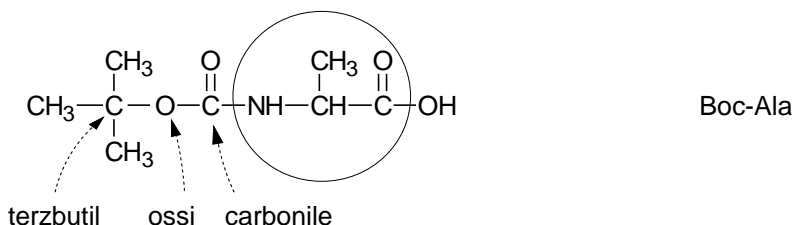
3) **Legami stabili**: il legame ammidico.

L'obiettivo della sintesi è proprio realizzare i legami ammidici che tengono unito il peptide, quindi questi legami devono resistere a tutte le condizioni a cui è necessario sottoporre il peptide per staccare i gruppi protettori.

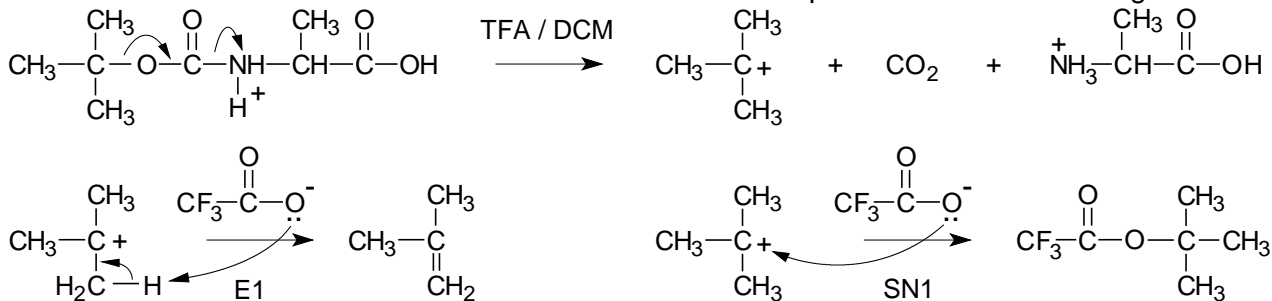


Protezione del gruppo amminico

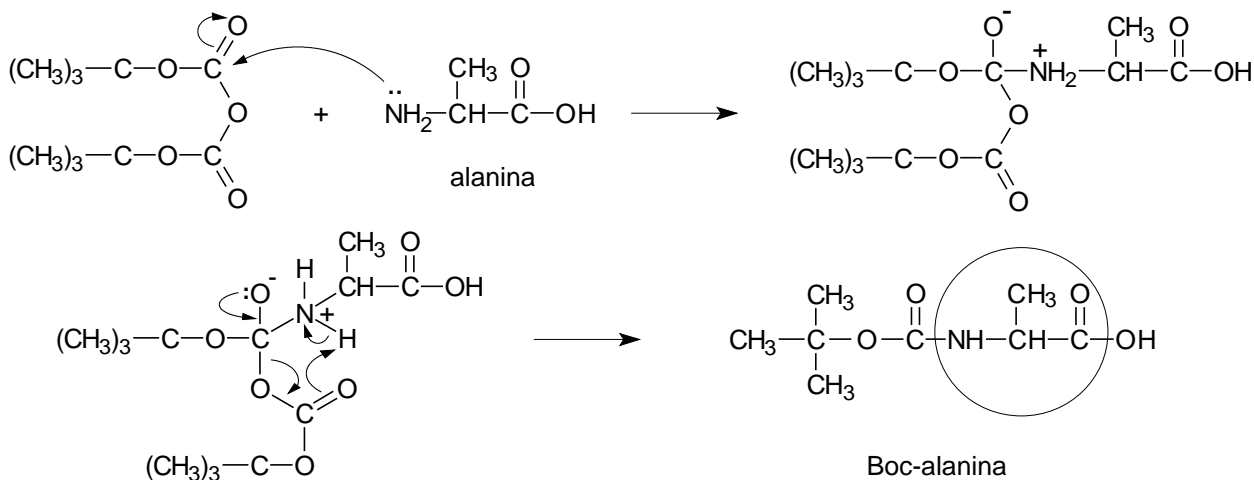
Uno dei più usati protettori del gruppo amminico in α è il **terzbutil-ossi-carbonile, Boc**. E' un protettore di tipo **uretanico** che inibisce la reattività del gruppo amminico trasformandolo in una ammide. La Boc-alanina ha la seguente struttura:



Il Boc è labile in ambiente acido e viene staccato con acido trifluoroacetico, TFA, in diclorometano, DCM, in rapporto 1:1. La sua labilità agli acidi dipende dal fatto che sono presenti due ottimi gruppi uscenti: la CO_2 , che si sottrae all'equilibrio come gas, e il catione terzbutilico che è relativamente stabile in ambiente acido. Questo, in un secondo tempo, può dare una eliminazione E1 formando 2-metilpropene oppure può dare una sostituzione $\text{SN}1$ con l'acido trifluoroacetico per formare terzbutil trifluoroacetato. Il meccanismo dello sblocco del Boc per la Boc-alanina è il seguente:



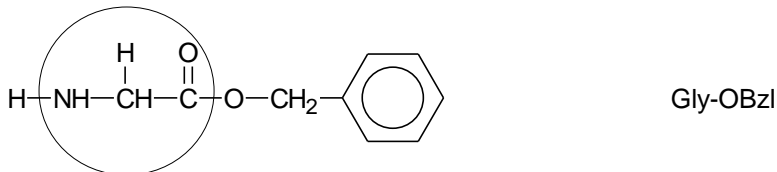
I Boc-amminoacidi si preparano per reazione dell'amminoacido con diterzbutil-dicarbonato:



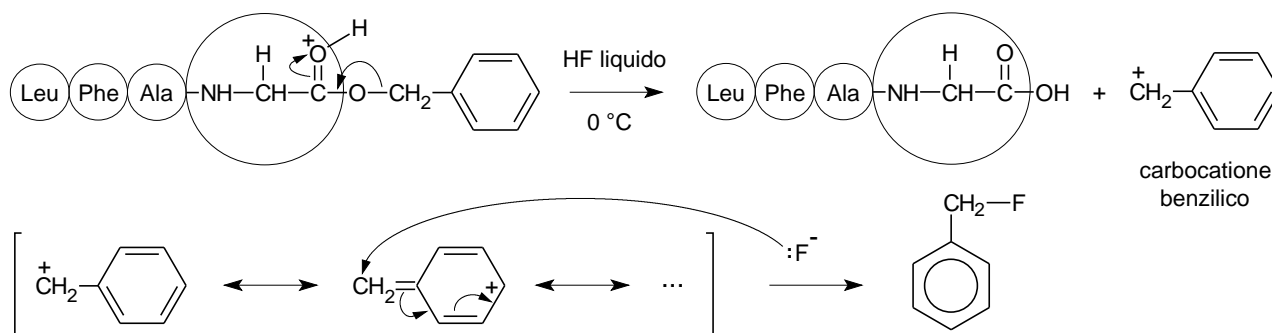
La struttura di tipo uretanico del Boc offre un altro grande vantaggio: difende dalla racemizzazione il Boc-amminoacido attivato al carbossile in quanto impedisce la formazione di ossazoloni. Questo aspetto verrà discusso più avanti.

Protezione del gruppo carbossilico

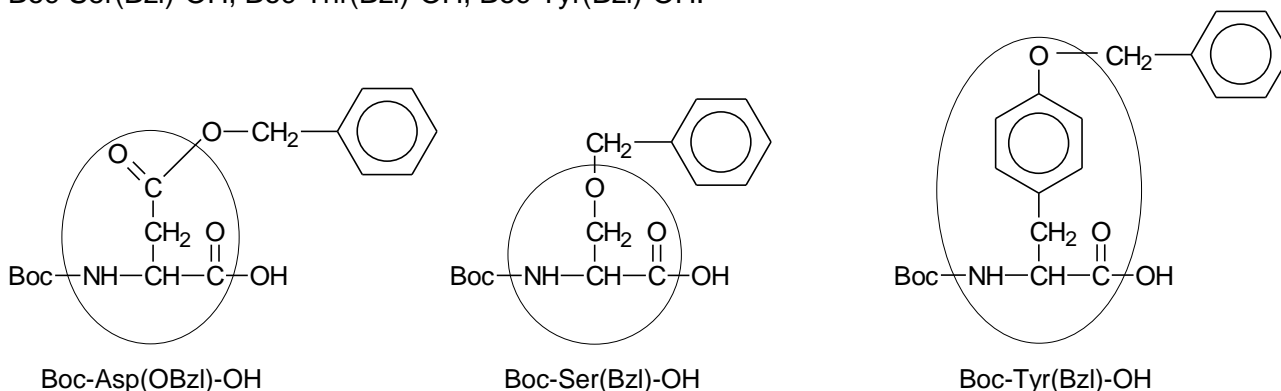
Uno dei più usati protettori del gruppo carbossilico terminale è il **gruppo benzilico, Bzl**. Questo inibisce la reattività del carbossile trasformandolo in un estere benzilico. La glicina protetta come Gly-OBzl ha la seguente struttura:



L'estere benzilico è stabile nelle condizioni di sblocco del Boc con TFA / DCM (1:1), ma viene scisso in **HF liquido anidro a 0 °C**, ambiente in cui il legame ammidico è stabile. Le ammidi, infatti, per essere scisse richiedono la presenza di un nucleofilo come l'acqua con il quale danno una reazione di sostituzione nucleofila (SN acilica). In HF liquido anidro non ci sono buoni nucleofili, quindi il legame ammidico è stabile. L'estere benzilico, invece, si scinde dato che può reagire con un meccanismo di tipo diverso, SN1, grazie alla **stabilità del carbocatione benzilico**. Lo sblocco del gruppo benzilico nel tetrapeptide Leu-Phe-Ala-Gly-OBzl è illustrato di seguito:



Il gruppo benzilico è anche usato come protettore di gruppi funzionali che si trovano nella **catena laterale** di alcuni amminoacidi. Per esempio, i carbossili β e γ degli acidi aspartico e glutammico vengono protetti come **esteri benzilici**; gli ossidrili di serina, treonina e tirosina vengono protetti come **eteri benzilici**. Questi amminoacidi vengono utilizzati nella sintesi di peptidi con una **doppia protezione** al gruppo amminico in α e al gruppo funzionale in catena laterale. Il protettore in catena laterale viene indicato tra parentesi, avremo quindi: Boc-Asp(OBzl)-OH, Boc-Glu(OBzl)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Tyr(Bzl)-OH.



In questo modo anche gli amminoacidi più complessi, quando vengono agganciati alla catena peptidica, sono reattivi in un unico punto della molecola, nel loro gruppo carbossilico principale.

Attivazione del gruppo carbossilico

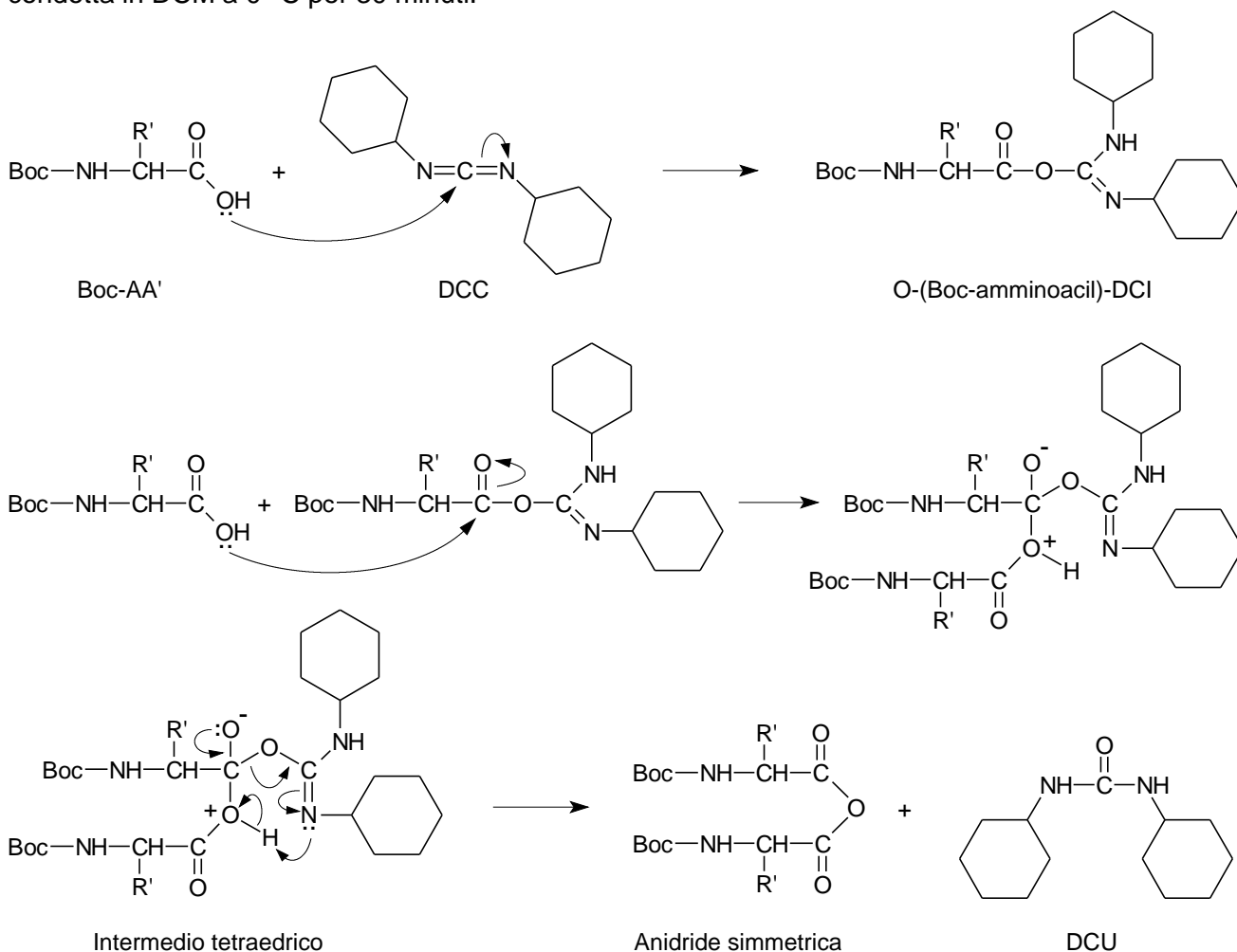
Nella sintesi di peptidi per allungamento graduale di catena, il legame ammidico viene realizzato facendo reagire un **Boc-amminoacido attivato al carbossile** con il gruppo amminico di un peptide protetto al carbossile. Nei prossimi paragrafi prenderemo in esame quattro diverse tecniche di attivazione: la preparazione di cloruri acilici, anidridi simmetriche, esteri attivi e la attivazione con DCC aggiunta in situ.

Cloruri acilici

Il gruppo carbossilico di un Boc-amminoacido può essere attivato trasformandolo nel corrispondente cloruro acilico. La reazione di questo con il gruppo amminico di un peptide può sembrare il modo più semplice per sintetizzare il legame ammidico. In effetti questa tecnica è stata usata nei primi anni della sintesi di peptidi, ma è stata poi del tutto abbandonata. Infatti la preparazione del cloruro acilico richiede l'impiego di reattivi troppo violenti come SOCl_2 o PCl_5 che non sono compatibili con molti amminoacidi. Inoltre i cloruri acilici dei Boc-amminoacidi e dei peptidi, sono derivati troppo attivati che ciclizzano spontaneamente per dare gli ossazoloni, intermedi ciclici che possono facilmente racemizzare e quindi portare alla formazione di peptidi racemizzati come verrà discusso più avanti.

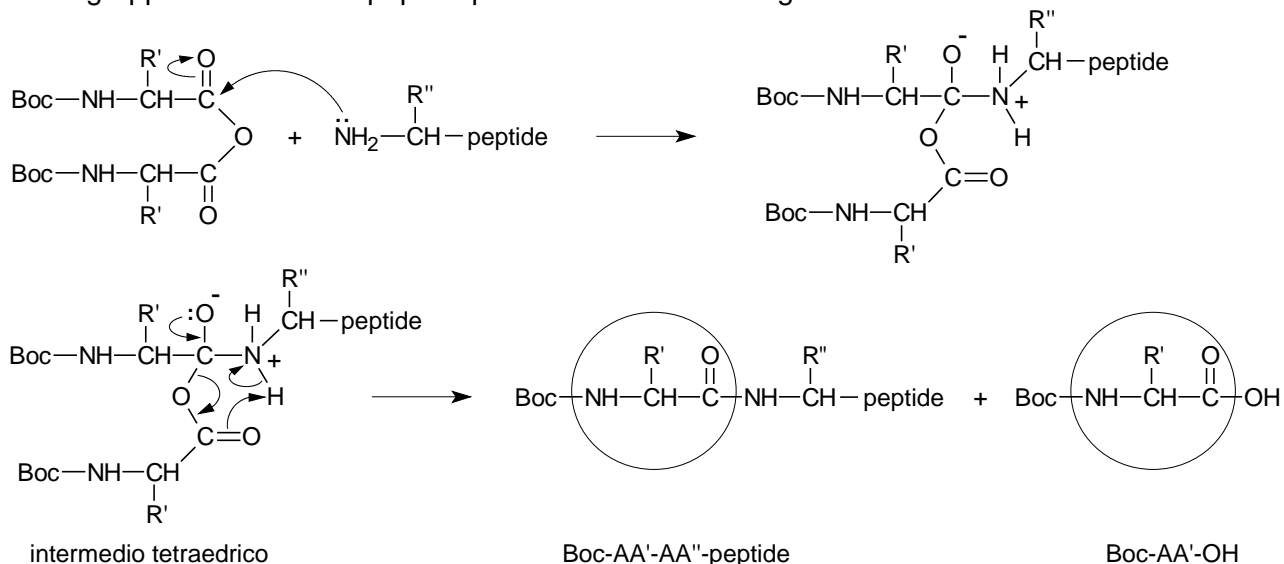
Anidridi simmetriche

Le anidridi simmetriche dei Boc-amminoacidi si possono preparare facendo reagire il Boc-AA con un blando disidratante, la N,N'-dicicloesilcarbodiimide, DCC, nel rapporto 2 : 1. La reazione va condotta in DCM a 0 °C per 30 minuti.



La reazione tra DCC e Boc-AA forma dapprima O-(Boc-amminoacyl)-N,N'-dicicloesilisourea, DCI. Questo è un forte acilante e può reagire con molti nucleofili per esempio con un secondo Boc-

amminoacido, come in questo caso, oppure con un ossidrile, come nella sintesi degli esteri attivi, o infine con una ammina, come nella sintesi diretta del legame ammidico con DCC aggiunta in situ. La reattività della DCI dipende da due fattori: 1) dal fatto che la molecola ha un ottimo gruppo uscente, la dicicloesilurea, DCU, ma soprattutto 2) dalla struttura della DCI che, formando un ciclo a sei atomi nell'**intermedio tetraedrico**, può portare un atomo di azoto vicino all'H⁺ che rende positivo il Boc-AA. L'atomo di azoto può dare **assistenza anchimerica** alla reazione strappando l'H⁺. In questo modo il miglior gruppo uscente non è più il Boc-AA, ma la DCU protonata. L'anidride simmetrica, in un secondo momento, può subire amminolisi quando viene fatta reagire con il gruppo amminico del peptide per la formazione del legame ammidico.



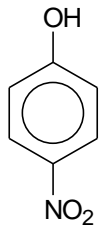
Anche l'anidride simmetrica, come la DCC, ha una reattività che è molto influenzata dalla sua struttura tridimensionale. Gli atomi, nell'intermedio tetraedrico, possono assumere un assetto ad esagono che porta il carbonile dell'anidride vicino all'H⁺ del gruppo amminico. Il carbonile fornisce **assistenza anchimerica** alla reazione strappando questo H⁺. Di conseguenza non è più l'azoto il miglior gruppo uscente, ma il carbossile del secondo Boc-amminoacido e questo spinge la reazione verso destra.

Le anidridi simmetriche dei Boc-amminoacidi sono stabili e non ciclizzano per dare ossazolone. Le anidridi simmetriche dei peptidi, invece, non sono utilizzabili perché portano a prodotti racemizzati via ossazolone come verrà discusso più avanti.

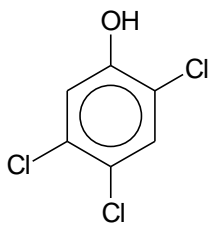
Esteri attivi

Gli esteri attivi sono una classe di esteri particolarmente reattivi perché contengono alcoli che sono ottimi gruppi uscenti. Questo può essere dovuto a due motivi:

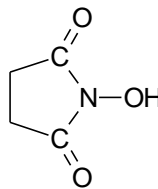
- 1) l'alcol ha caratteristiche acide e quindi il suo alcossido è stabile. In questa categoria ci sono alcuni derivati del fenolo come p-nitrofenolo e 2,4,5-triclorofenolo.
- 2) l'alcol, anche senza essere particolarmente acido, ha una struttura tale da fornire assistenza anchimerica durante la reazione di amminolisi. In questa categoria ci sono i derivati della idrossilammina come N-idrossisuccinimide, HOSu, e N-idrossibenzotriazolo, HOBt.



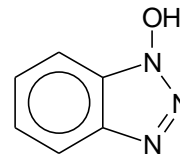
p-nitrofenolo



2,4,5-triclorofenolo



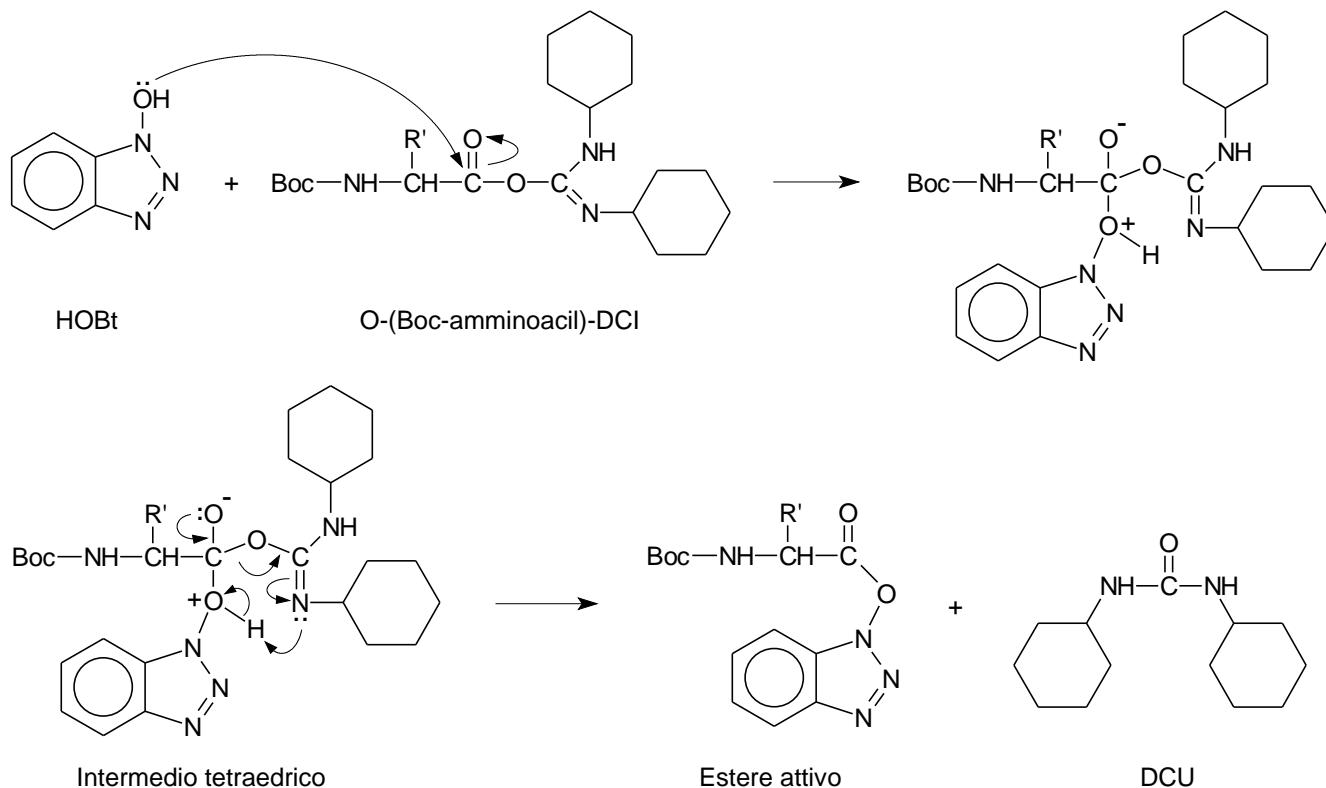
HOSu



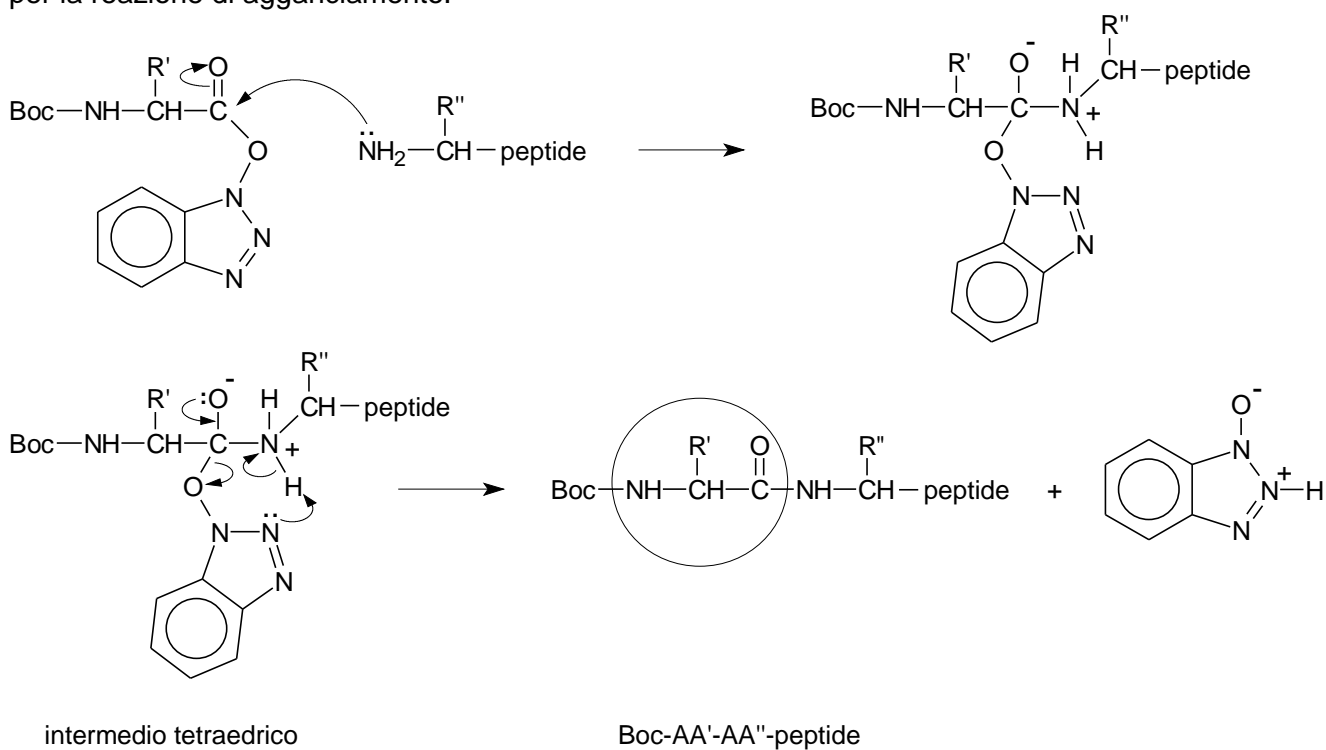
HOBt

Un estere attivo molto usato è quello con HOBt, lo si prepara mescolando il Boc-amminoacido, HOBt e DCC nell'ordine in rapporto 1:1:1. La reazione va condotta in DCM a 0 °C per 30 minuti.

Il Boc-AA reagisce inizialmente con DCC formando dicicloesilisourea, DCI, secondo la reazione già illustrata a pagina 5. Qui viene mostrata la successiva reazione di HOBT con DCI che è un agente acilante molto reattivo.

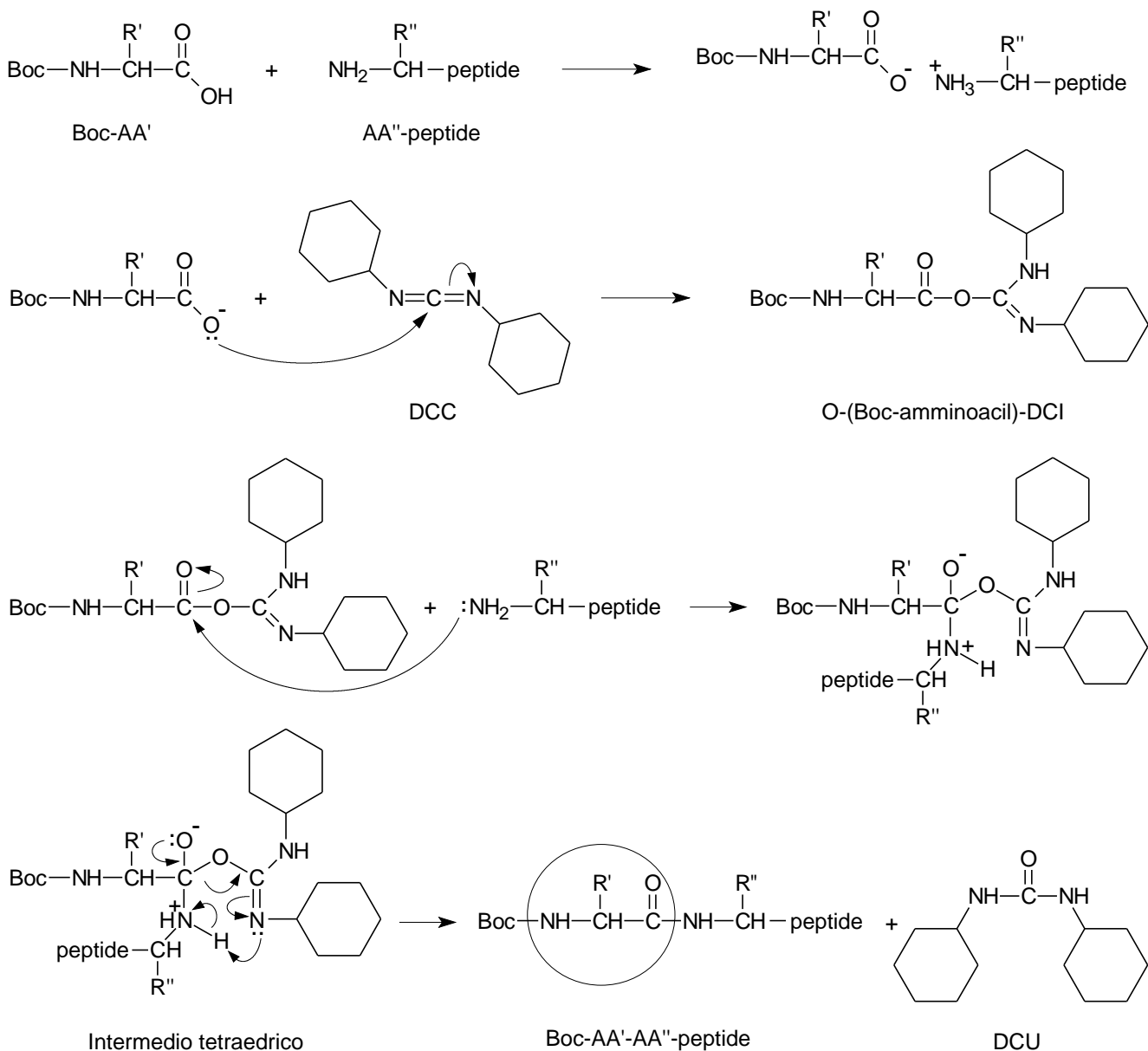


La dicicloesilisourea, DCI, reagisce preferenzialmente con l'ossidrilico di HOBT che è molto più nucleofilo del carbossile di un amminoacido. Anche qui la reazione è facilitata dall'assistenza anchimerica. La dicicloesilurea, DCU, precipita e può essere eliminata per filtrazione. Si ottiene l'estere attivo del Boc-AA che viene fatto reagire direttamente con il gruppo amminico del peptide per la reazione di agganciamento.



Attivazione con DCC aggiunta in situ

L'aggiunta di dicicloesilcarbodiimide, DCC, ad una miscela di Boc-amminoacido e peptide col gruppo amminico libero costituisce il **metodo più semplice ed immediato** per sintetizzare il legame ammidico. Il Boc-AA forma inizialmente un sale con il gruppo amminico del peptide, l'aggiunta di DCC porta alla formazione di O-(Boc-amminoacil)-dicicloesilisourea, DCI, che poi reagisce direttamente con il gruppo amminico del peptide per formare il legame ammidico.



Anche l'attivazione con DCC aggiunta in situ procede con assistenza anchimerica come si vede dal meccanismo che coinvolge l'intermedio tetraedrico.

Una parte della DCI, invece che con il gruppo amminico del peptide, può reagire con una seconda molecola di Boc-AA formando l'anidride simmetrica. L'agente acilante che introduce l'amminoacido nel peptide, quindi, non è solo la O-(Boc-amminoacil)-isourea, ma anche l'anidride simmetrica.

La tecnica della attivazione con DCC aggiunta in situ è una delle più utilizzate nella sintesi progressiva e permette di ottenere peptidi non racemizzati. Nella sintesi per condensazione di segmenti, invece, questa tecnica non è utilizzabile perché produce peptidi con un notevole grado di racemizzazione. Si è osservato che l'aggiunta di HOBt insieme alla DCC durante la reazione di agganciamento produce peptidi otticamente puri anche nella condensazione di segmenti. Questo aspetto verrà discusso nel prossimo paragrafo.

Racemizzazione nella sintesi di peptidi

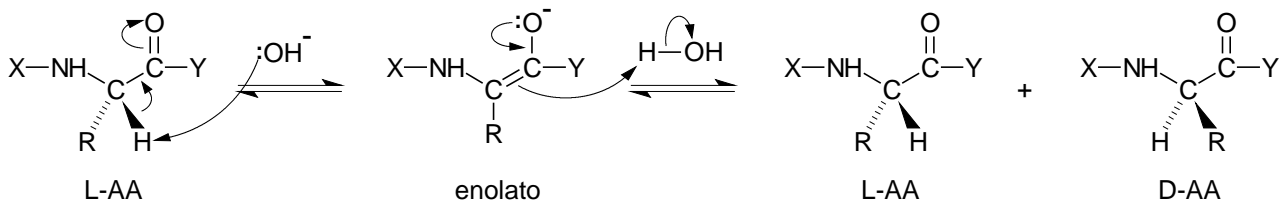
Per **racemizzazione** si intende un processo irreversibile di trasformazione di una molecola chirale in una miscela di due enantiomeri, detta miscela racemica. Un L-AA racemizza quando viene trasformato in una miscela di D-AA ed L-AA. Se in una molecola sono presenti più centri chirali e la perdita della integrità chirale riguarda uno solo di questi, allora si dice che c'è stata **epimerizzazione**. La molecola originale e quella trasformata non sono enantiomeri, ma diastereoisomeri. Nonostante questa distinzione teorica, è ormai entrato nell'uso comune il termine di racemizzazione anche nel caso di un peptide che ha perso l'integrità chirale in uno o più dei suoi amminoacidi e anche qui per semplicità useremo il termine racemizzazione in senso esteso.

Le proteine naturali sono composte solo di L-amminoacidi. Durante la sintesi di una proteina può accadere che uno o più amminoacidi subiscano accidentalmente racemizzazione al momento di essere introdotti nella catena peptidica. Questo produce nella proteina una irregolarità strutturale dato che un D-AA ha una struttura speculare rispetto ad un L-AA. Se l'amminoacido racemizzato si trova in un punto critico della proteina o se vengono racemizzati più amminoacidi, allora la struttura tridimensionale della proteina modificata può essere così diversa da quella nativa da comportare una totale perdita di attività biologica.

La racemizzazione è stata sempre un grave problema nella sintesi di peptidi e ne ha limitato a lungo lo sviluppo. La comprensione dei meccanismi con cui questa può avvenire ha permesso di mettere a punto nuove tecniche di sintesi sostanzialmente libere da racemizzazione.

Vi sono due meccanismi con i quali un L-amminoacido può racemizzare: 1) attraverso una enolizzazione diretta o 2) attraverso la formazione di un intermedio ciclico chiamato ossazolone.

1) La **enolizzazione diretta** per tautomeria cheto-enolica può spiegare la racemizzazione molto lenta alla quale sono soggetti sia gli amminoacidi che i peptidi non attivati al carbossile.

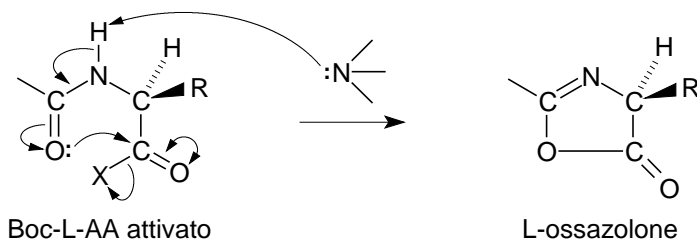


Qui è mostrato il meccanismo di reazione con catalisi basica, ma la tautomeria può avvenire anche con catalisi acida. L'enolato che si forma da un L-amminoacido ha una struttura planare e quindi ha perduto la configurazione L. Quando si riforma il carbonile, l'idrogeno può essere legato sopra o sotto il piano molecolare formando un L o un D-amminoacido. Questa reazione è fortemente influenzata dalla basicità e dalla temperatura della soluzione e inoltre dalla natura elettronegativa dei sostituenti X, R e Y.

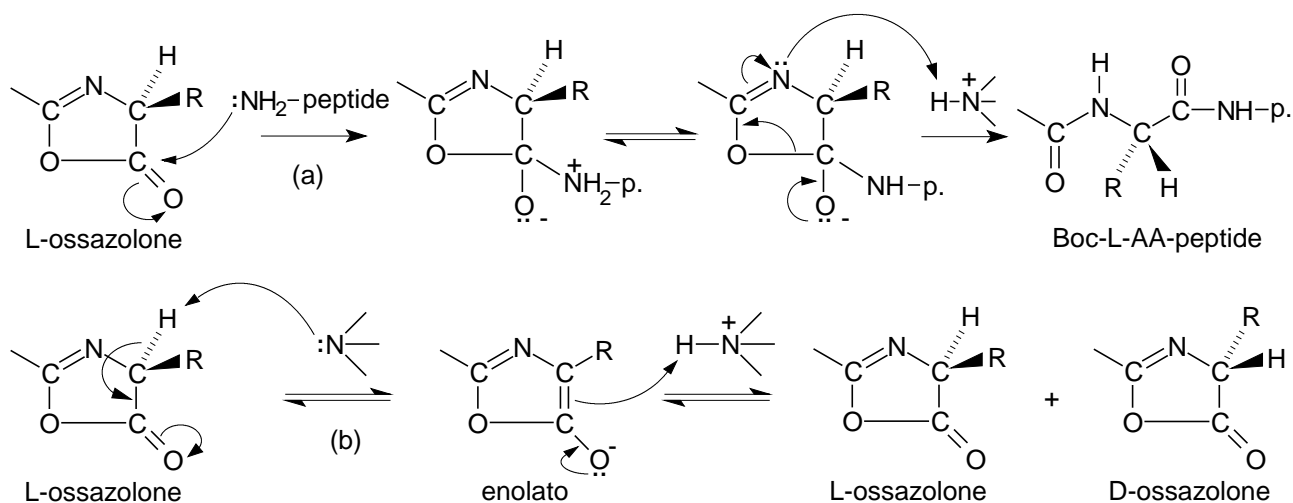
Nelle normali condizioni della sintesi di peptidi la racemizzazione per enolizzazione diretta avviene così lentamente da essere trascurabile. Questo meccanismo diventa significativo solo se un peptide è sottoposto a condizioni molto basiche e/o ad alte temperature. L'idrolisi basica di una proteina, con NaOH 1M a 100 °C per 1 ora, produce amminoacidi completamente racemizzati. **L'idrolisi acida**, invece, con HCl 6M a 110 °C per 22 ore, produce un livello di racemizzazione compreso tra 0,8 e 6%, un valore appena superiore a quello che si sarebbe ottenuto a pH 7. Per questo motivo le proteine, per l'**analisi degli amminoacidi**, vengono idrolizzate sempre in condizioni acide. La dipendenza della velocità di racemizzazione dalla temperatura può essere valutata dai seguenti dati: in soluzione acquosa neutra a 20 °C la racemizzazione praticamente non avviene infatti il tempo di semireazione è di 180⁰⁰⁰ anni, a 100 °C il tempo di semireazione è di 600 giorni, mentre a 200 °C è di sole 2 ore.

2) La **formazione di un intermedio ciclico ossazolone** è responsabile della racemizzazione di amminoacidi e peptidi attivati al carbossile. Questo processo è molto più veloce della enolizzazione diretta e per questo rappresenta il vero pericolo di racemizzazione durante la sintesi di peptidi. La ciclizzazione può avvenire solo in un amminoacido con il carbossile attivato e il gruppo amminico legato con legame ammidico. Questo accade nei **peptidi attivati** al carbossile che si utilizzano nella sintesi per condensazione di segmenti e nei **Boc-amminoacidi attivati** che si utilizzano nella sintesi progressiva.

Nella figura seguente il gruppo attivante generico è indicato con X, il gruppo legato all'azoto non è disegnato ad eccezione del carbonile che partecipa alla reazione. Sull'azoto possiamo quindi immaginare che sia legato sia il Boc che un intero peptide.



La chiusura dell'anello è catalizzata dalle basi e quindi anche dal gruppo amminico del peptide al quale deve agganciarsi il Boc-L-AA attivato. Si forma un eterociclo chiamato L-ossazolone che può dare due reazioni distinte: (a) amminolisi e (b) racemizzazione.



(a) **Amminolisi.** Il fatto che un Boc-amminoacido attivato formi l'ossazolone non lo rende meno attivato. L'ossazolone è molto reattivo come acilante e può reagire con i nucleofili per esempio con il gruppo amminico libero di un peptide. In questo modo il Boc-L-AA viene regolarmente incorporato nella catena peptidica in crescita come Boc-L-AA-peptide.

(b) **Racemizzazione.** L'ossazolone può enolizzare per tautomeria cheto-enolica ad una velocità molto più alta rispetto alla semplice enolizzazione di un amminoacido. L'idrogeno legato al carbonio chirale è **più acido** perchè è in posizione α rispetto a due doppi legami, il carbonile e il doppio legame C=N. La struttura dell'ossazolone, infatti, ricorda quella dell'estere malonico che può enolizzare con grande facilità. Questa reazione fornisce una miscela racemica di L e D ossazolone. Ciascuno dei due isomeri può dare amminolisi (a) con il gruppo amminico della catena peptidica formando una miscela dei due epimeri Boc-L-AA-peptide e Boc-D-AA-peptide. Si dice allora che il peptide sintetizzato ha subito racemizzazione.

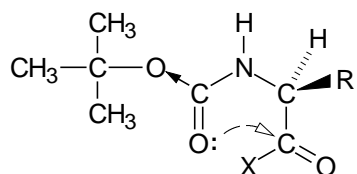
Le velocità delle due reazioni di amminolisi e di racemizzazione sono circa uguali, per questo motivo la formazione di ossazolone può danneggiare seriamente la sintesi di peptidi. Le strategie per evitare questo problema sono due: 1) impedire la formazione di ossazolone e 2) impedire la racemizzazione dell'ossazolone formato.

1) **Impedire la formazione di ossazolone.** Poiché l'ossazolone si forma in seguito all'attacco del carbonile al carbossile attivato, la velocità della reazione è influenzata (1.a) dalla attivazione del carbossile e (1.b) dalla nucleofilicità dell'ossigeno del carbonile.

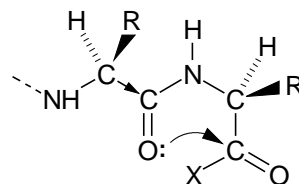
(1.a) **Attivazione del carbossile.** I derivati troppo attivati come i cloruri acilici danno ossazolone con grande velocità. L'attivazione moderata, fornita dalle anidridi simmetriche o dagli esteri attivi, riduce il rischio.

(1.b) **Nucleofilicità dell'ossigeno del carbonile.** I sostituenti elettron attrattori come gli uretani (**Boc**) riducono la nucleofilicità dell'ossigeno del carbonile legato all'azoto e ostacolano la formazione dell'ossazolone. Al contrario, i sostituenti elettron donatori come le catene alchiliche

(peptidi) ne aumentano la nucleofilicità e favoriscono la formazione dell'ossazolone come è illustrato nella figura seguente.



Boc-L-AA attivato al carbossile

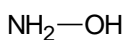


peptide attivato al carbossile

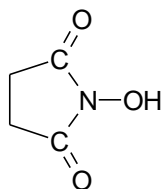
I Boc-amminoacidi moderatamente attivati non formano l'ossazolone, mentre i peptidi attivati lo possono formare. Per questo motivo la **strategia della sintesi di peptidi** prevede sempre di iniziare dalla parte C-terminale e **allungare la catena dalla parte N-terminale**. In questo modo il gruppo amminico libero del peptide reagisce con il carbossile attivato di un Boc-amminoacido in una reazione libera dal rischio di racemizzazione. Se invece la sintesi iniziasse dalla parte N-terminale, si dovrebbe allungare la catena dalla parte C-terminale. Questo obbligherebbe ad attivare il carbossile del peptide aprendo la strada alla racemizzazione in ogni reazione di aggancio con un nuovo amminoacido.

2) **Impedire la racemizzazione dell'ossazolone.** Ci sono due vie per impedire la racemizzazione dell'ossazolone: (2.a) rendere più veloce la reazione di apertura di anello e (2.b) diminuire l'acidità dell'ossazolone.

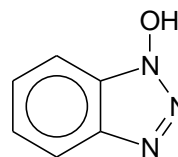
(2.a) **Rendere più veloce l'apertura di anello.** Il gruppo amminico di un peptide reagisce con l'ossazolone secondo le due reazioni di **racemizzazione** e di **apertura di anello** che avvengono con la stessa velocità. Alcuni composti derivati della idrossilammina, come N-idrossisuccinimide, HOSu, e N-idrossibenzotriazolo, HOBt, danno preferenzialmente la reazione di **apertura di anello** con il quale reagiscono 10 volte più velocemente di un'ammina.



idrossilammina



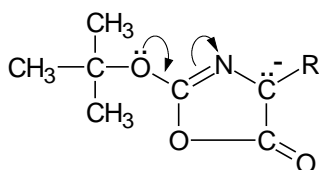
HOSu



HOBt

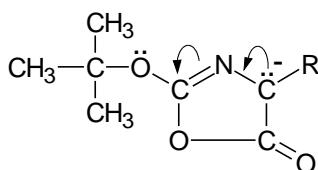
Con HOBt, per esempio, l'ossazolone dà la reazione di apertura di anello prima che si abbia racemizzazione. L'**estere attivo** che si forma può dare, in seguito, la reazione di agganciamento con il gruppo amminico del peptide. Nella reazione di condensazione di segmenti peptidici si può ottenere un basso livello di racemizzazione usando DCC e HOBt al posto della sola DCC per ottenere la formazione del legame ammidico.

(2.b) **Diminuire l'acidità dell'ossazolone.** I sostituenti del gruppo amminico di tipo uretanico, (**Boc**), diminuiscono l'acidità degli ossazoloni rispetto a quelli di tipo ammidico, come i **peptidi**.

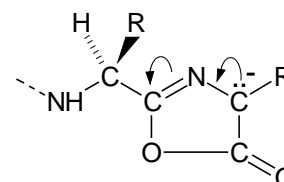


(a)

L'ossazolone di un Boc-AA è meno acido



(b)



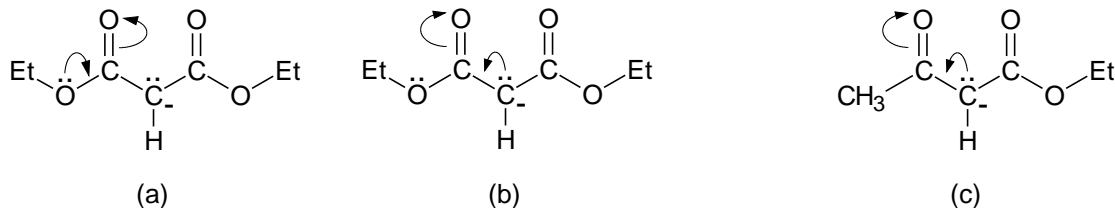
(c)

L'ossazolone di un peptide è più acido

Questo fatto può essere compreso valutando la stabilità dei due anioni disegnati in figura, basi coniugate degli ossazoloni. Nell'anione che si forma dall'ossazolone di un Boc-AA vi è una risonanza (a) tra il gruppo C=N e il secondo ossigeno dell'uretano. Gli elettroni del doppio legame C=N, quindi, sono meno disponibili per l'altra risonanza (b), che stabilizza la carica negativa sul carbonio che era chirale. Nell'anione che si forma dall'ossazolone di un peptide, invece, il gruppo

C=N è più disponibile per stabilizzare la carica negativa (c) e quindi il corrispondente ossazolone è più acido.

Lo stesso ragionamento permette di spiegare la differenza di acidità tra i due più famosi composti che possiedono α idrogeni acidi: l'**estere malonico** e l'**estere acetacetico**. Le due molecole differiscono solo per la presenza di due diversi sostituenti sul primo carbonile: un atomo di ossigeno nella prima, un gruppo CH₃ nella seconda. La risonanza (a) di questo ossigeno con il carbonile limita la risonanza (b) del carbonile con la carica negativa sul carbonio α . Per questo motivo l'estere malonico è circa 100 volte meno acido dell'estere acetacetico.



anione dell'estere malonico ($pK_a = 13$)

anione dell'estere acetacetico ($pK_a = 11$)

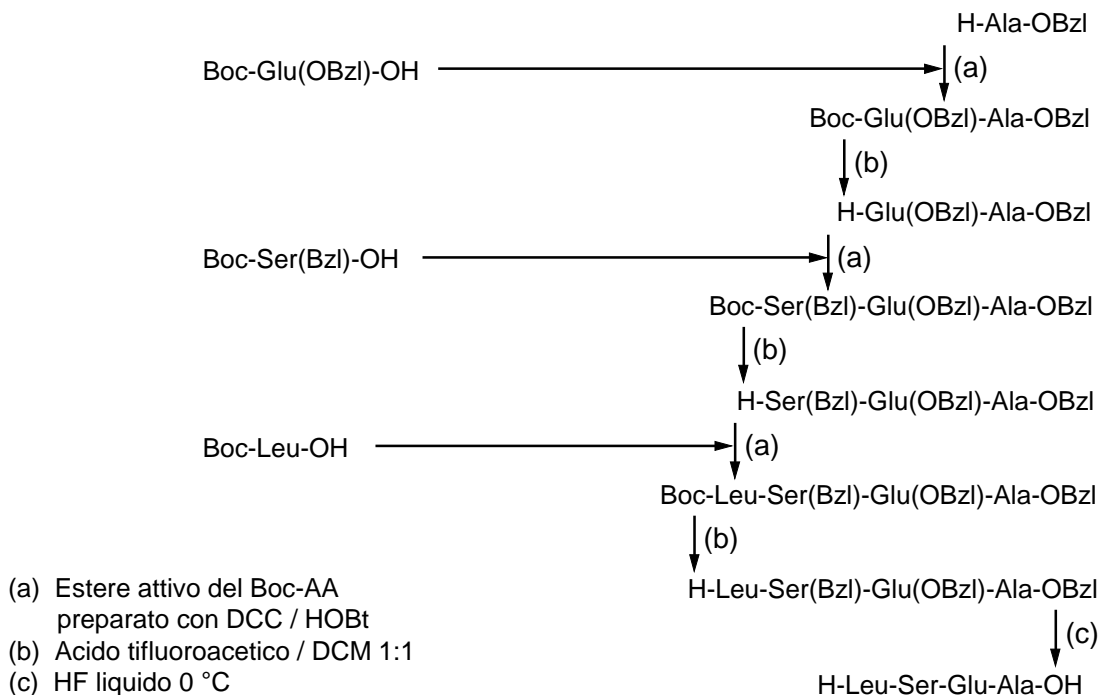
Per concludere, l'uso dei Boc amminoacidi permette di sintetizzare peptidi con livelli molto bassi di racemizzazione non solo perché i Boc-AA hanno poca tendenza a formare ossazoloni, ma anche perché gli eventuali ossazoloni formati hanno una bassa tendenza a racemizzare dato che sono meno acidi.

Sintesi di peptidi in soluzione

La sintesi di peptidi tradizionale avviene in soluzione. Può essere eseguita con la tecnica di allungamento graduale o con quella di condensazione di segmenti a seconda dei casi. Nella sintesi per allungamento graduale le operazioni necessarie sono le seguenti:

- Aggiungimento del nuovo Boc-AA
- Sblocco del Boc
- Sblocco del protettore C-terminale e di quelli in catena laterale

Viene qui riportato lo schema di sintesi per il tetrapeptide Leu-Ser-Glu-Ala.



La sintesi comincia dall'amminoacido C-terminale che viene introdotto come H-Ala-OBzl con il carbossile protetto come estere benzilico. Ogni successivo amminoacido viene introdotto con il gruppo amminico protetto come Boc-AA-OH. Il carbossile in catena laterale dell'acido glutammico

viene protetto come estere benzilico, così avremo Boc-Glu(OBzl)-OH. L'ossidrile in catena laterale della serina viene protetto come etere benzilico, così avremo Boc-Ser(Bzl)-OH. Le reazioni (a) di agganciamento vengono realizzate introducendo il Boc-AA come estere attivo preparato a parte con DCC e HOBt. Le reazioni (b) di sblocco del Boc sono condotte con TFA / DCM 1:1. La reazione finale (c) di sblocco del protettore sul carbossile terminale e dei protettori in catena laterale è condotta con HF liquido a 0°C.

Le due reazioni (a) e (b), che vengono ripetute ciclicamente durante la sintesi, sono relativamente brevi: è necessaria circa 1 ora per la reazione di aggancio e 15 minuti per lo sblocco del Boc. Da questi dati potrebbe sembrare possibile introdurre in una catena peptidica molti amminoacidi al giorno, ma in realtà i tempi richiesti sono di circa **una settimana per amminoacido**. Questo dipende non tanto dalle due reazioni citate, ma dalle **operazioni di purificazione** a cui è necessario sottoporre il peptide per isolare i prodotti di reazione dai reagenti in eccesso. Queste operazioni sono piuttosto lunghe e consistono principalmente in estrazioni con solvente e in cristallizzazioni. Inoltre spesso la sintesi è rallentata da difficoltà operative dovute alla **scarsa solubilità** che hanno i peptidi completamente protetti e quindi apolari. La sintesi in soluzione di peptidi con più di 15 amminoacidi si presenta spesso lunga e difficile. D'altra parte, però, fornisce peptidi di grande purezza dato che ad ogni passaggio è possibile eliminare le molecole che non hanno reagito correttamente.

Sintesi di peptidi in fase solida

L'estrema efficienza della **biosintesi delle proteine**, che avviene nel citoplasma delle cellule al ritmo di **20 amminoacidi al secondo**, è stata uno stimolo forte per esplorare nuove strade nel campo della sintesi di peptidi. Durante la biosintesi le proteine non si trovano in soluzione, ma sono ancorate con legame estereo ad una molecola di RNA transfer il quale, a sua volta, è legato al complesso ribosoma-RNA messaggero. Questo costituisce una sorta di supporto solido dal quale le proteine si staccano solo quando sono state completate.

Nel 1963 Merrifield ha messo a punto una tecnica di **sintesi di peptidi in fase solida** che richiama in parte la biosintesi delle proteine. L'idea chiave della sintesi in fase solida consiste nel far crescere una catena peptidica legata covalentemente, con il primo amminoacido, ad un polimero insolubile. In questo modo i reagenti in eccesso e i sotto prodotti della sintesi possono essere rimossi per semplice filtrazione e lavaggio del polimero al quale è legato il peptide.

Questa nuova tecnica ha reso **la sintesi di peptidi molto più veloce**: gli amminoacidi vengono introdotti al ritmo di uno ogni **2 ore**, cioè il tempo strettamente necessario per eseguire le reazioni. Infatti i lunghi tempi di purificazione, tipici della sintesi tradizionale, sono stati trasformati in semplici filtrazioni e lavaggi del peptide legato al supporto insolubile. Inoltre, data la semplicità delle operazioni richieste, **l'intero processo può essere automatizzato**. Una macchina automatica per la sintesi di peptidi in fase solida può introdurre fino a dodici amminoacidi al giorno.

Date queste premesse la sintesi in fase solida dovrebbe essere in grado di sintetizzare persino proteine, cioè sequenze peptidiche con più di 100 amminoacidi. In realtà, con questa tecnica, si possono preparare facilmente solo peptidi fino a 30 amminoacidi. I fattori che limitano l'efficienza della sintesi in fase solida sono due: 1) la mancanza di purificazioni intermedie e 2) il trattamento finale con HF liquido.

1) **Mancanza di purificazioni intermedie**. Se la reazione di aggancio di un certo amminoacido non va a completezza, si ottengono, accanto a catene peptidiche che sono cresciute correttamente, anche un certo numero di catene che non hanno incorporato l'amminoacido in questione. Dato che i peptidi sono legati covalentemente al supporto polimerico, non è possibile eliminare i peptidi errati, anzi ad ogni nuovo ciclo della sintesi il loro numero è destinato ad aumentare. Alla fine, accanto al peptide corretto, si ottengono molti altri peptidi simili tra loro, che possono differire anche per un solo amminoacido e che rendono le operazioni di purificazione finali piuttosto difficili. Per questo motivo è necessario che la **resa** della reazione con cui viene introdotto ogni amminoacido sia **il più possibile vicina al 100%**. Per chiarire questo fatto, consideriamo la sintesi di un peptide di 40 amminoacidi. Se ciascun amminoacido viene incorporato con una resa del 90%, la resa finale è $0,9^{40} = 1,5\%$ cioè si ottiene 1,5% di peptide corretto e 98,5% di sequenze peptidiche errate. Se la resa ad ogni ciclo è del 95%, la resa complessiva diventa $0,95^{40} = 13\%$. Solo con una resa per ogni amminoacido del 99% si ottiene una resa complessiva accettabile $0,99^{40} = 67\%$. All'aumentare della lunghezza della catena peptidica la resa finale diventa sempre

più bassa. Per esempio nella sintesi di un peptide di 100 amminoacidi, una resa media del 99% produce una resa complessiva del $0,99^{100} = 37\%$.

I peptidi errati, anche se non possono essere eliminati, possono almeno essere bloccati nella crescita acetilando il loro gruppo amminico libero con **anidride acetica**. In questo modo, anche se la resa complessiva non aumenta, è almeno più facile la purificazione finale.

2) **Trattamento finale con HF liquido**. In una sintesi standard l'efficienza media delle reazioni raggiunge il 99%, ma le rese finali sono più basse di quanto preveda la teoria. Questo dipende da reazioni collaterali indesiderate che si realizzano durante lo sblocco finale con HF liquido. Per limitare i danni che il peptide può subire si aggiungono alcune molecole, dette **scavengers** cioè spazzini, come **anisolo**, **dimetilsolfuro**, **etilmercaptano** ecc. Queste hanno lo scopo di intercettare i carbocationi reattivi generati dallo sblocco dei gruppi protettori e impedire che reagiscano con qualche catena laterale presente nel peptide. Il trattamento in HF liquido rimane in ogni caso dannoso per i peptidi dato che possono avvenire anche reazioni non controllabili. Per questo motivo si stanno cercando delle strategie diverse di protezione degli amminoacidi e di ancoraggio del peptide al polimero che permettano lo sblocco finale in condizioni più blande.

Il principio della sintesi in fase solida è stato applicato con successo non solo alla sintesi di peptidi, ma anche alla sintesi di altre classi di composti polimerici come **polinucleotidi** e **polisaccaridi**.

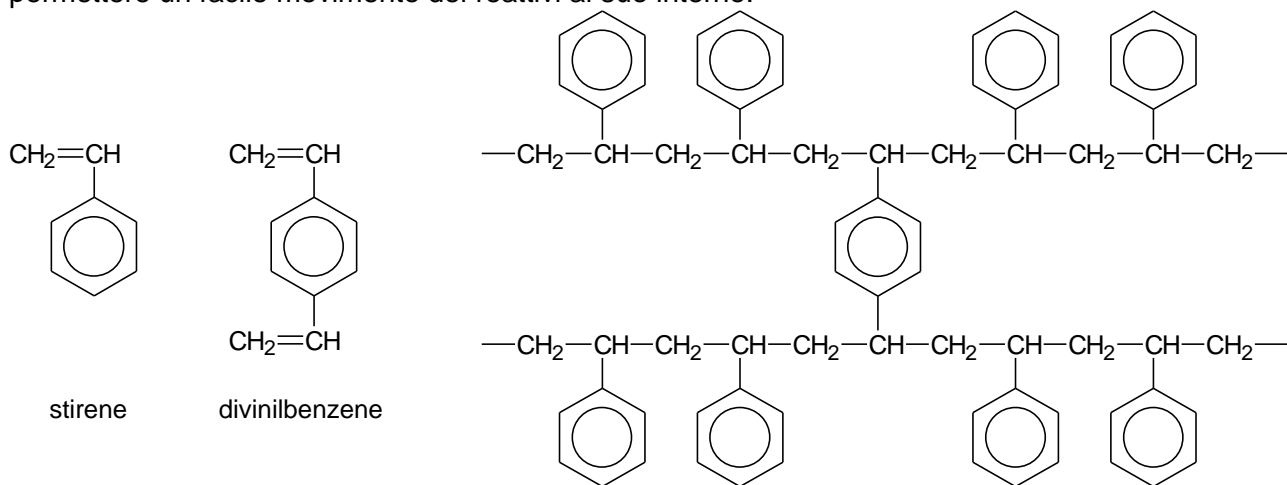
Le operazioni necessarie per condurre una sintesi di peptidi in fase solida sono le seguenti:

- | | | |
|----------|---|--|
| Un ciclo | { | 1) Attacco del primo Boc-AA alla resina |
| | | 2) Sblocco del Boc |
| | | 3) Neutralizzazione |
| | | 4) Aggancio del nuovo Boc-AA |
| | | 5) Acetilazione |
| | | 6) Sblocco del Boc |
| | | 7) Distacco del peptide dalla resina e sblocco dei protettori in catena laterale |

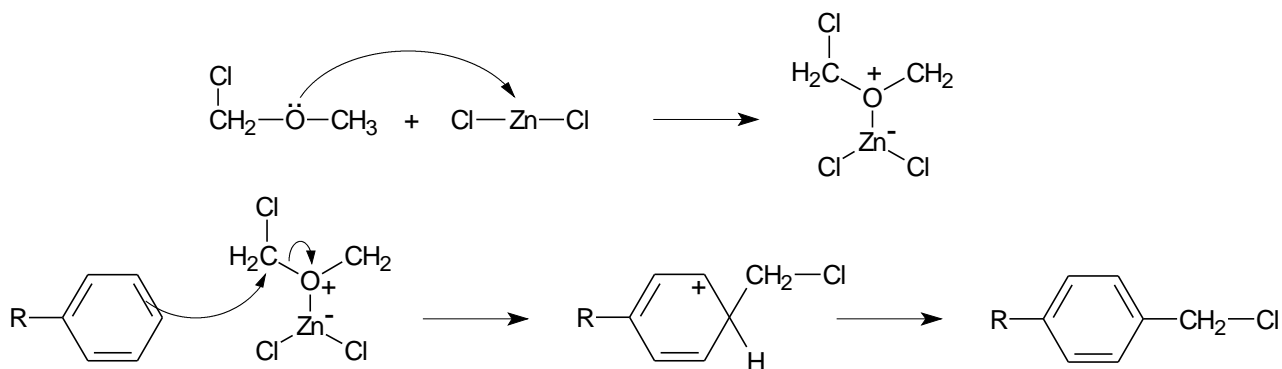
Le operazioni (2), (3), (4) e (5) costituiscono il ciclo di reazioni che viene ripetuto per ogni amminoacido introdotto nella catena peptidica. Quando si è ottenuta la sequenza di amminoacidi desiderata la sintesi viene conclusa con le operazioni finali (6) e (7).

Il supporto polimerico solido

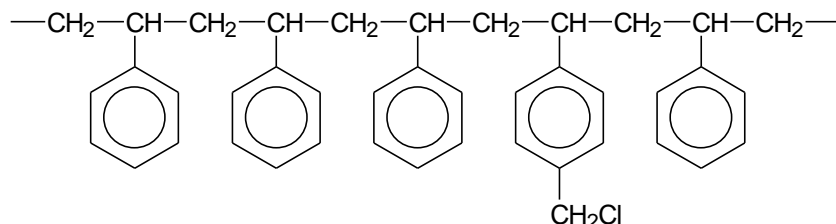
Come supporto polimerico è stata scelta una **resina polistirenica** copolimerizzata con il 2% di divinilbenzene. Quest'ultimo ha lo scopo di creare dei legami incrociati per rendere la resina insolubile nei solventi organici. Il livello di reticolazione non può superare il 2% per non irrigidire la resina che deve essere rigonfiabile come una spugna quando viene bagnata dal solvente per permettere un facile movimento dei reattivi al suo interno.



La resina polistirenica deve essere derivatizzata per introdurre i punti di ancoraggio sui quali il primo amminoacido si deve legare come estere benzilico. La resina più utilizzata contiene dei gruppi clorometilici che vengono introdotti per reazione con $\text{ClCH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, clorometil-metiletere, usando ZnCl_2 come catalizzatore.



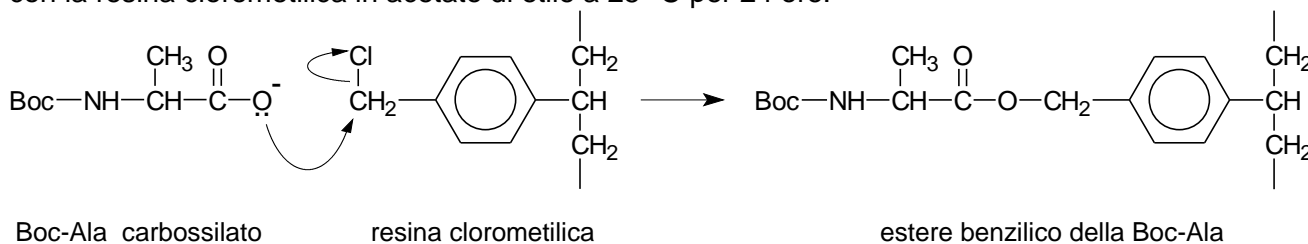
La resina clorometilica ha quindi la seguente struttura:



Ai normali livelli di derivatizzazione, 0,2 mmoli di gruppi CH_2Cl per grammo di resina, i gruppi clorometilici sono presenti su circa il 2% degli anelli benzenici.

Attacco del primo amminoacido alla resina

Viene ora descritta la sintesi del tetrapeptide Leu-Ser-Glu-Ala, lo stesso già preparato con la tecnica tradizionale in soluzione. Il primo passo della sintesi consiste nel legare covalentemente la Boc-alanina, l'amminoacido C-terminale, alla resina come estere benzilico. La sintesi dell'estere avviene in un modo poco usuale: il carbossilato è il nucleofilo che attacca con una reazione $\text{S}_{\text{N}}2$ il cloruro di benzile, una reazione possibile solo con cloruri molto reattivi. Si fa reagire la Boc-Ala-OH con trietilammina, TEA, si ottiene il carbossilato di trietilammonio. Questo sale viene fatto reagire con la resina clorometilica in acetato di etile a 25°C per 24 ore.



Sintesi in fase solida di Leu-Ser-Glu-Ala

Dopo l'attacco della Boc-alanina alla resina (1), vedi lo schema alla pagina seguente, la sintesi del tetrapeptide Leu-Ser-Glu-Ala prosegue con un ciclo di reazioni che viene ripetuto per introdurre ogni amminoacido successivo al primo. Il ciclo consiste di 4 reazioni:

- | | |
|--|--------------------------------|
| (2) Sblocco del Boc | TFA / DCM 1:1 |
| (3) Neutralizzazione del gruppo amminico | TEA / DCM 1:9 |
| (4) Aggancio del nuovo Boc-AA | anidride simmetrica del Boc-AA |
| (5) Acetilazione dei gruppi amminici non reagiti | anidride acetica / TEA / DCM |

La serina viene introdotta come Boc-Ser(Bzl)-OH con l'ossidrilico in catena laterale protetto come estere benzilico. L'acido glutammico viene introdotto come Boc-Glu(OBzl)-OH con il carbossile in catena laterale protetto come estere benzilico. Dopo l'introduzione dell'ultimo amminoacido, la leucina, si eseguono le due reazioni finali. Per prima cosa si deve sbloccare il Boc (6), poi si procede al distacco del peptide dalla resina (7) con HF liquido a 0°C in presenza di anisolo. In queste condizioni si staccano anche i protettori in catena laterale.

La reazione (3) di neutralizzazione con trietilammina è necessaria per trasformare il gruppo α amminico protonato in un gruppo amminico libero e quindi nucleofilo, capace di attaccare l'anidride

simmetrica nella reazione (4). Alla fine della sintesi, il Boc viene sbloccato in uno stadio separato (6), anche se potrebbe essere staccato in HF (7), questo per limitare il numero dei carbocationi, molecole pericolosamente reattive, durante il distacco finale dalla resina con HF liquido. Dopo ogni reazione, i reagenti in eccesso e i prodotti indesiderati si eliminano per filtrazione. La resina viene poi lavata più volte con diclorometano, DCM, prima di passare alla reazione successiva. Lo schema della sintesi è il seguente:

