

## PEPTIDI (PROTEINE)



Polimeri costituiti da monomeri relativamente semplici: gli **amminoacidi**. Hanno proprietà biologiche molto varie (ad es., antibiotici, ormoni, additivi alimentari, antidolorifici, ecc.)

### DEFINIZIONI





★ Gli amminoacidi sono tenuti insieme con legami ammidici; il legame ammidico viene chiamato anche **legame peptidico**

★ Gli amminoacidi che fanno parte di un peptide o di una proteina si dicono **residui**

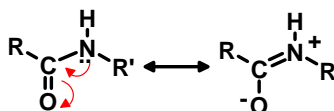
La distinzione tra proteine e peptidi è formale e di riferisce alle dimensioni:

<b>PEPTIDI</b>		polimeri costituiti da meno di 50 residui di amminoacidi; di solito non hanno una struttura tridimensionale ben definita.
<b>PROTEINE</b>		polimeri costituiti da almeno 50 residui (fino a oltre 1000); hanno strutture tridimensionali ben definite, da cui dipendono le proprietà biologiche.

Per peptidi e proteine si definiscono:

<b>Struttura primaria</b>		è la sequenza dei residui
<b>Struttura secondaria</b>		si riferisce ad aspetti strutturali specifici all'interno di una molecola
<b>Struttura terziaria</b>		è la forma tridimensionale complessiva della molecola
<b>Struttura quaternaria</b>		quando unità separate di proteine sono bloccate insieme (per esempio, emoglobina, tropocollagene)

### PROPRIETA' CHIMICHE DEL LEGAME PEPTIDICO



1. Il legame peptidico è piuttosto inerte. N non è né nucleofilo né basico. Perché gli elettrofili reagiscano con C=O servono condizioni drastiche
2. Il gruppo ammidico può talvolta funzionare da nucleofilo (in tal caso il centro nucleofilo è l'O).
3. Il gruppo ammidico è planare (importante per la forma tridimensionale).

### PROPRIETA' BIOLOGICHE DI PEPTIDI E DI AMMINOACIDI

Non è necessario avere lunghe catene polimeriche per avere attività biologica

Nome	n. di residui	Proprietà biologiche
GABA	1	neurotrasmettitore, implicato nel controllo degli impulsi nervosi
Glutammato monosodico	1	additivo alimentare
Aspartame	2	dolcificante artificiale (circa 100 volte più dolce del saccarosio)
Penicillina	3	potente antibiotico (prodotto da alcune muffe)
TRH	3	ormone che controlla il rilascio di un altro ormone ( <i>tirotrifina</i> ) ed influenza il sistema nervoso centrale.
Enkefaline	5	trovate nel cervello; sono peptidi coinvolti nella sensazione del dolore
Falloina	7	peptide biciclico, estremamente velenoso, in funghi non commestibili
Angiotensina II	8	usato dal corpo per aumentare la pressione del sangue
Ossitocina	9	nonapeptide ormonale ciclico, che può essere usato per provocare il travaglio
Gramicidina S	10	decapeptide ciclico, potente antibiotico

2

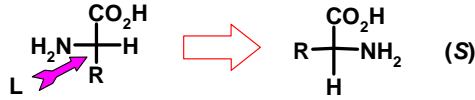
La sequenza degli aminoacidi in molti peptidi è controllata dal codice genetico

⇒ solo 20 α-aminoacidi sono codificati dal DNA

anche così le combinazioni sono molte:

pentapeptide ⇒ 20<sup>5</sup> combinazioni ⇒ 3 200 000 possibili peptidi

Gli α-aminoacidi naturali (tranne la glicina) sono di **serie L** e di configurazione **S**


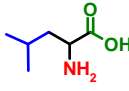
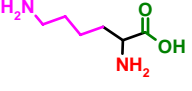
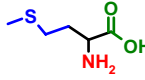
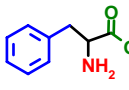



Nome	struttura	abbreviazioni	punto isoelettrico	catena laterale pK <sub>a</sub>	tipo
Alanina		Ala, A	6.00	-	L
Arginina		Arg, R	10.76	12.5	H+
Asparagina		Asn, N	5.41	-	H

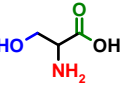
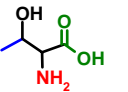
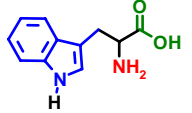
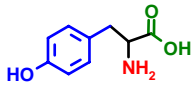
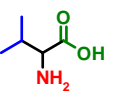
3

Nome	struttura	abbreviazioni	punto isoelettrico	catena laterale pK <sub>a</sub>	tipo
Acido aspartico		Asp, D	2.77	3.9	H-
Cisteina		Cys, C	5.07	9.3	H-
Acido glutammico		Glu, E	3.22	4.3	H-
Glutammina		Gln, Q	5.65	-	H
Glicina		Gly, G	5.97	-	-
Istidina (Histidine)		His, H	7.59	6.1	H

4

Nome	struttura	abbreviazioni	punto isoelettrico	catena laterale	
				pK <sub>a</sub>	tipo
Isoleucina		Ile, I	6.02	-	L
Leucina		Leu, L	5.98	-	L
Lisina		Lys, K	9.74	10.5	H+
Metionina		Met, M	5.74	-	L
Fenilalanina (Phenylalanine)		Phe, F	5.48	-	L
Prolina		Pro, P	6.30	-	L

5

Nome	struttura	abbreviazioni	punto isoelettrico	catena laterale	
				pK <sub>a</sub>	tipo
Serina		Ser, S	5.68	-	-
Treonina		Thr, T	5.60	-	-
Triptofano		Trp, W	5.89	-	L
Tirosina		Tyr, Y	5.66	9.1	L
Valina		Val, V	5.96	-	L

H = idrofilo; L = lipofilo (idrofobo)

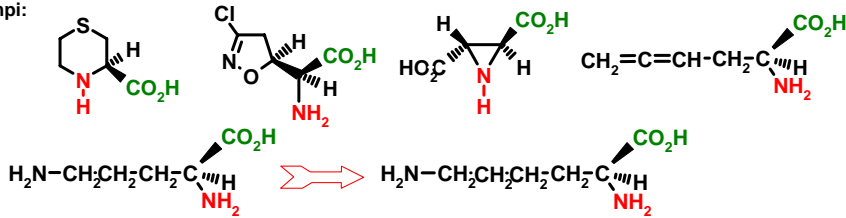
6

### Amminoacidi "non usuali"

Moltissimi amminoacidi presenti in natura non sono codificati dal DNA. Sono meno abbondanti di quelli codificati

#### Catene laterali insolite

esempi:



**Ornitina**  
presente in molti peptidi naturali  
(antibiotico)

**Lisina**  
**Idrossiprolina**  
costituente principale del collagene

**Prolina**

#### $\beta$ -amminoacidi

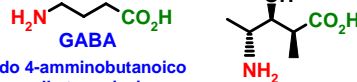
esempi:



7

#### $\gamma$ -amminoacidi

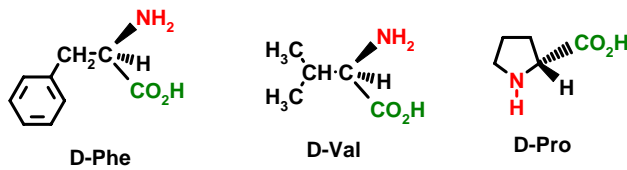
esempi:



**GABA**  
acido 4-aminobutanico  
entra nella trasmissione  
degli impulsi nervosi

#### D-amminoacidi

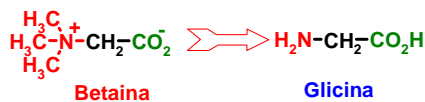
esempi:



sono sintetizzati da diversi organismi e sono importanti costituenti di antibiotici

#### altri

esempi:



**Betaina**  
agente metilante, entra nella  
biosintesi della metionina

**Glicina**

8

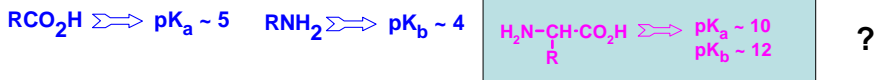
## CLASSIFICAZIONE E PROPRIETA' FISICHE DEGLI $\alpha$ -AMMINOACIDI

Gli amminoacidi vengono classificati, a seconda della natura della catena laterale, in:

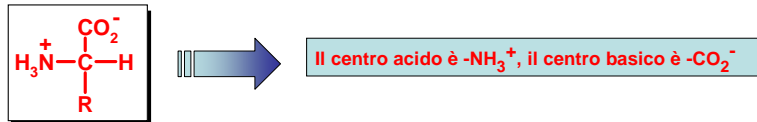
- Amminoacidi "acidi"**  $\rightarrow$  contengono nella catena laterale un altro gruppo  $-\text{CO}_2\text{H}$
- Amminoacidi "basici"**  $\rightarrow$  contengono nella catena laterale un altro gruppo  $-\text{NH}_2$
- Amminoacidi "neutri"**
  - $\leftarrow$  **polari**  $\rightarrow$  contengono nella catena laterale un eteroatomo
  - $\leftarrow$  **non polari**  $\rightarrow$  la catena laterale è idrocarburica

Gli  $\alpha$ -amminoacidi naturali sono composti solidi cristallini, alto-fondenti, solubili in acqua

Le proprietà fisiche sono diverse da quelle di acidi o ammine con lo stesso numero di atomi di C



Allo stato solido gli  $\alpha$ -amminoacidi sono "ioni dipolari" (*zwitterioni*)



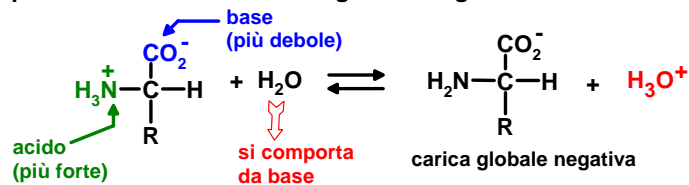
9

## IN SOLUZIONE ACQUOSA LA STRUTTURA PREVALENTE DIPENDE DAL pH

$\rightarrow$  In soluzione acquosa  $-\text{NH}_3^+$  è più forte come acido di quanto  $-\text{CO}_2^-$  sia forte come base

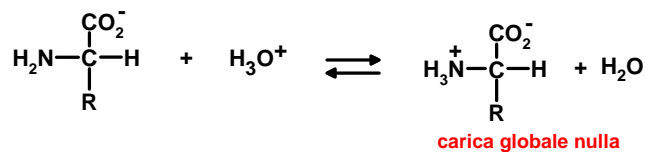
Come risultato della differenza di forza tra il centro acido ed il centro basico, UNA SOLUZIONE ACQUOSA DI ALANINA (amminoacido neutro non polare) CONTIENE PIU' ANIONI CHE CATIONI

$\rightarrow$  A pH 7 l'alanina ha una carica globale negativa.

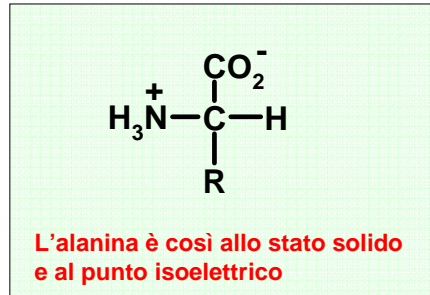
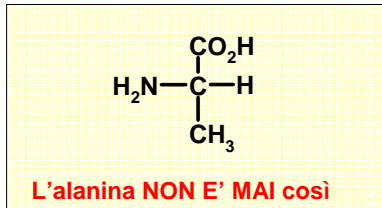


Per tornare allo ione dipolare bisogna aggiungere  $\text{H}_3\text{O}^+$

$\rightarrow$  A pH 6 l'alanina ha una carica globale nulla.

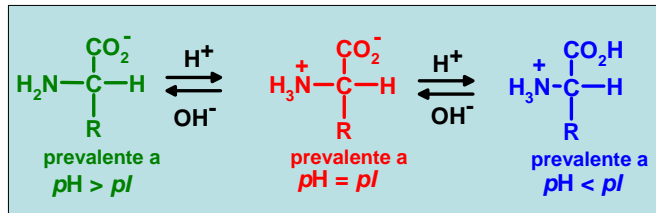


10



Si definisce **PUNTO ISOELETTRICO** quel valore di pH al quale l'amminoacido esiste in prevalenza come ione dipolare (complessivamente neutro). Al punto isoelettrico la concentrazione della forma cationica e di quella anionica sono uguali (e molto basse).

Per un amminoacido "neutro" il punto isoelettrico (che dipende soprattutto dai valori del  $pK_a$  di  $\text{NH}_3^+$  e del  $pK_b$  di  $-\text{CO}_2^-$ ) è attorno a 5.5-6.0.

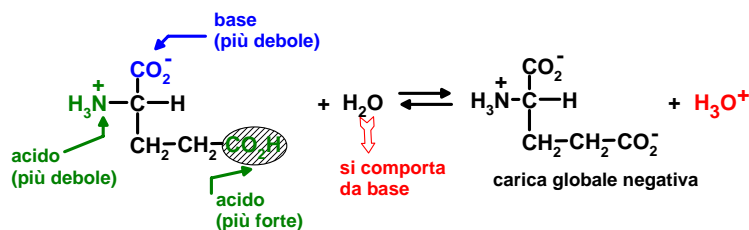


11

## ➔ Ogni amminoacido ha un punto isoelettrico diverso

In un amminoacido "acido" c'è un altro gruppo (il secondo carbossile) che reagisce con l'acqua (è il centro acido più forte)

Una soluzione acquosa di un amminoacido "acido" è decisamente acida:



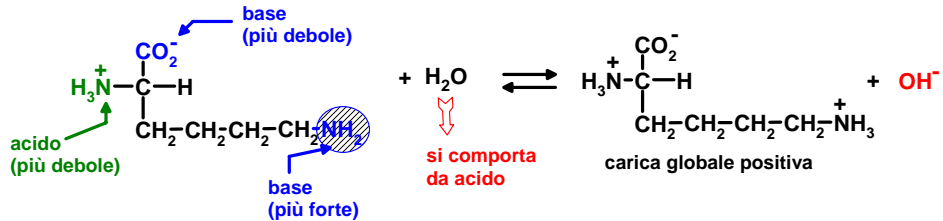
Per portare un amminoacido "acido" al punto isoelettrico E' NECESSARIA UNA CONCENTRAZIONE DI  $\text{H}_3\text{O}^+$  MAGGIORE che per un amminoacido "neutro".

Il punto isoelettrico di amminoacidi "acidi" è ~ pH 3.

12

In un amminoacido "basico" c'è un altro gruppo (il secondo gruppo amminico) che reagisce con l'acqua (è il centro basico più forte)

Una soluzione acquosa di un amminoacido "basico" è decisamente basica

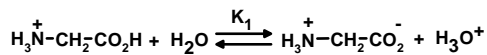


Per neutralizzare un amminoacido "basico" e portarlo al punto isoelettrico **BISOGNA AGGIUNGERE IONI OH<sup>-</sup>**.

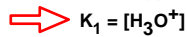
Il punto isoelettrico di amminoacidi "basici" è nell'intervallo 9-10 di pH.

13

### TITOLAZIONE DELLA GLICINA



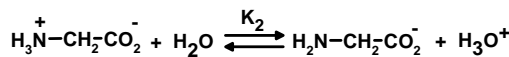
Quando sono stati aggiunti 0.5 equivalenti di OH<sup>-</sup>



$$K_1 = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{H}_3\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CO}_2^-]}{[\text{H}_3\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}]} = 10^{-2.4}$$

$$\Rightarrow \text{pK}_{a1} = 2.35$$

Aggiungendo altro OH<sup>-</sup>:

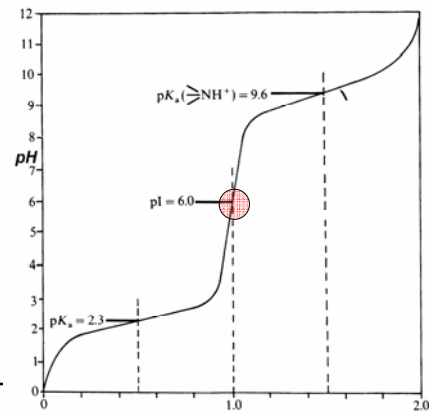


Quando sono stati aggiunti 1.5 equivalenti di OH<sup>-</sup>  $\Rightarrow K_2 = [\text{H}_3\text{O}^+]$

$$K_2 = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CO}_2^-]}{[\text{H}_3\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CO}_2^-]} = 10^{-9.78} \Rightarrow \text{pK}_{a2} = 9.78$$

al punto isoelettrico  $[\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CO}_2^-] = [\text{H}_3\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}]$

specie prevalente  $\Rightarrow \text{H}_3\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CO}_2^-$



14

Dal primo equilibrio  $\rightarrow [H_3N^+-CH_2CO_2^-] = \frac{[H_3N-CH_2CO_2H] \times 10^{-2.4}}{[H_3O^+]}$

Dal secondo equilibrio  $\rightarrow [H_3N^+-CH_2CO_2^-] = \frac{[H_3O^+][H_2N-CH_2CO_2^-]}{10^{-9.78}}$

$$\frac{[H_3N-CH_2CO_2H] \times 10^{-2.4}}{[H_3O^+]} = \frac{[H_3O^+][H_2N-CH_2CO_2^-]}{10^{-9.78}}$$

$$\Rightarrow [H_3O^+]^2 = \frac{10^{-12.2} [H_3N^+-CH_2CO_2H]}{[H_2N-CH_2CO_2^-]}$$

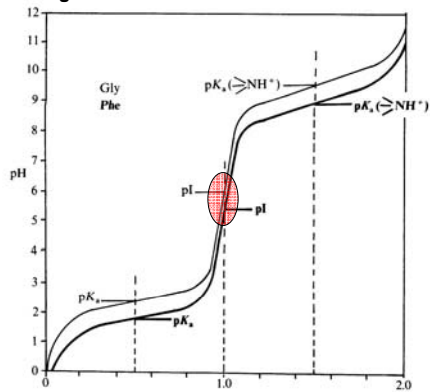
al punto isoelettrico  $\rightarrow [H_3O^+] = \sqrt{10^{-12.2}}$

Per gli amminoacidi "neutri" il valore del punto isoelettrico è determinato dall'effetto induttivo del gruppo R

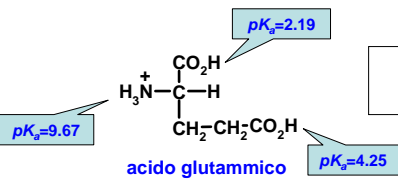
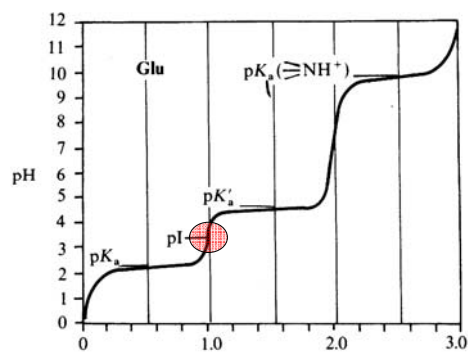
il fenile ha effetto -I  $\rightarrow$  aumenta l'acidità, diminuisce la basicità

15

Confronto fra le curve di titolazione di glicina e fenilalanina



Curva di titolazione dell'acido glutammico (amminoacido "acido")

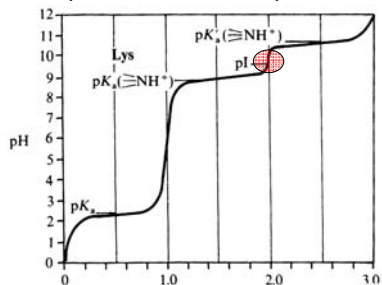


$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2} = \frac{2.19 + 4.25}{2} = \frac{6.44}{2} = 3.22$$

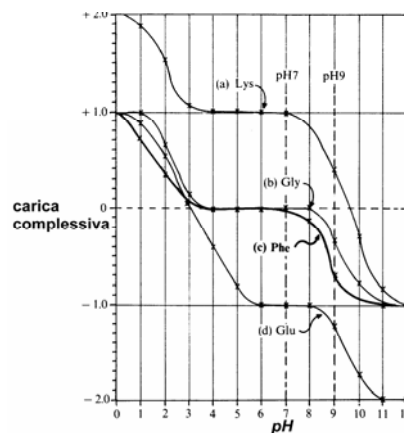
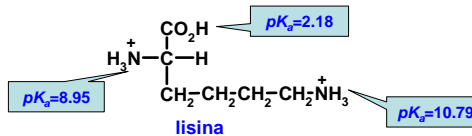
16



Curva di titolazione della lisina (amminoacido "basico")



$$pI = \frac{pK_{a2} + pK_{a3}}{2} = \frac{8.95 + 10.79}{2} = \frac{19.74}{2} = 9.87$$



E' significativo confrontare la carica complessiva dei quattro amminoacidi a pH diversi

17

### IDROFILICITA'/LIPOFILICITA'

La catena laterale degli amminoacidi ne influenza la solubilità

Il fatto che tutti gli amminoacidi allo stato solido esistano come ioni dipolari li rende più solubili nei solventi polari che in quelli non polari.

Amminoacidi (e peptidi) di solito sono solubili in acqua, ma spesso si sciolgono con difficoltà nei solventi organici

le solubilità relative nei diversi solventi dipendono dalla natura della catena laterale

in  $\text{H}_2\text{O}$  (polare protico) → Ser > Gly > Phe

in  $\text{CHCl}_3$  (poco polare) → Gly ~ Ser ~ Phe

in benzene (non polare) → Phe > Gly > Ser

Gli amminoacidi "acidi", "basici" o "neutri polari" in grado di formare legami idrogeno si dicono **IDROFILI** ed hanno elevata solubilità in acqua. Gli amminoacidi "neutri" si dicono **LIPOFILI** (o **IDROFOBI**) e preferiscono mezzi non polari.

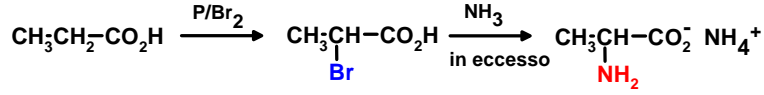
Le proprietà fisiche degli amminoacidi sono determinate da tre fattori principali:

- la carica complessiva ad un dato pH
- il pH al quale c'è carica complessiva zero (pI)
- l'idrofilicità o la lipofilicità delle catene laterali.

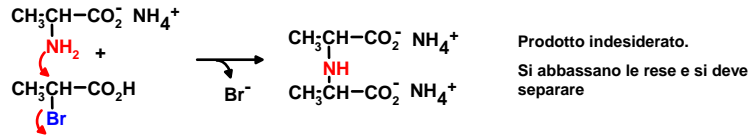
18

## SINTESI DI $\alpha$ -AMMINOACIDI

### 1. Amminazione di $\alpha$ -alogenoacidi

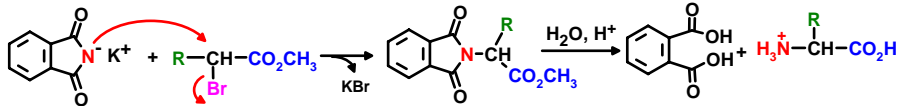


È il metodo più semplice, ma il MENO UTILE in pratica, perché l'amminoacido prodotto è ancora nucleofilo e può reagire con il bromoacido.



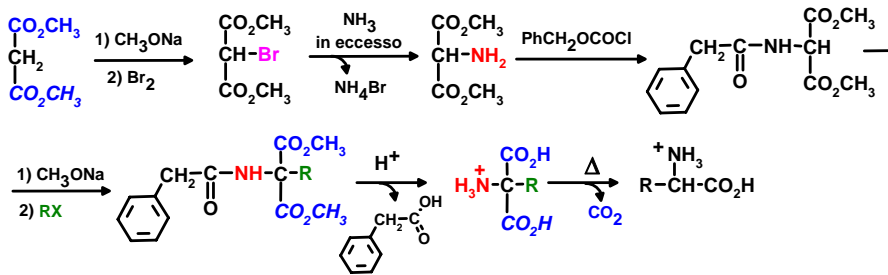
→ utile solo per preparare industrialmente la glicina

### 2. Sintesi di Gabriel

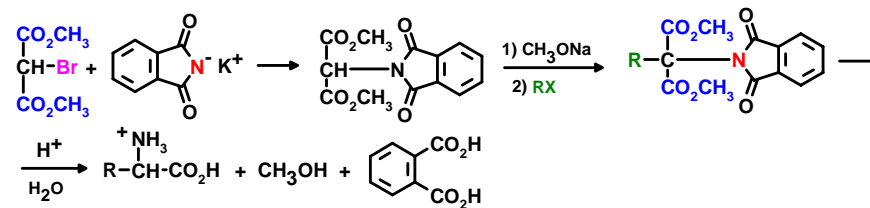


19

### 3. Alchilazione di derivati dell'estere malonico

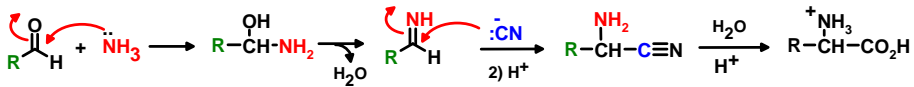


in alternativa:



20

#### 4. Sintesi di Strecker



Tutti i metodi precedenti portano a miscele racemiche

### RISOLUZIONE DI MISCELE RACEMICHE DEGLI $\alpha$ -AMMINOACIDI

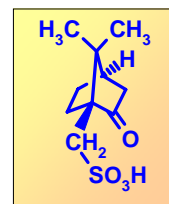
#### 1) Metodi chimici

Qualche volta è possibile la formazione di sali con un controione chirale, che può precipitare preferenzialmente con l'amminoacido D o con quello L.

N-acetil-(±)-amminoacido + base otticamente attiva  $\rightarrow$  sali diastereomeri  $\Rightarrow$  si separano e si aggiunge acido

li aminoacidi basici possono essere risolti direttamente, usando l'acido (1S)-10-canforsolfonico  $\rightarrow$

Non ci sono regole per poter prevedere quale enantiomero dia il sale che precipita, né le condizioni necessarie perché la cristallizzazione avvenga. bisogna operare per tentativi.



21

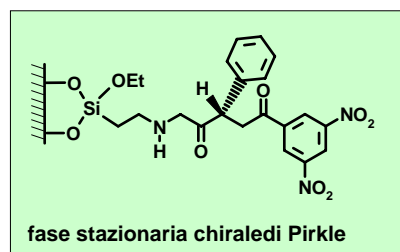
#### 2) Metodi enzimatici

N-acetil-(±)-amminoacido + acilasi  $\rightarrow$  L-amminoacido  $\rightarrow$  solubile in acqua  
da rene di maiale  $\rightarrow$  N-acetil-D-amminoacido  $\rightarrow$  insolubile in acqua

Se occorre anche l'amminoacido D, si recupera per idrolisi

#### 3) HPLC chirale (metodo analitico)

Con un gruppo chirale legato alla fase stazionaria diventa possibile separare gli enantiomeri. Sono disponibili colonne HPLC chirali che usano come componenti chirali della fase stazionaria carboidrati o proteine. Le fasi stazionarie chirali più usate sono quelle con derivati di aminoacidi legati ad un supporto di silice.



fase stazionaria chirale di Pirkle

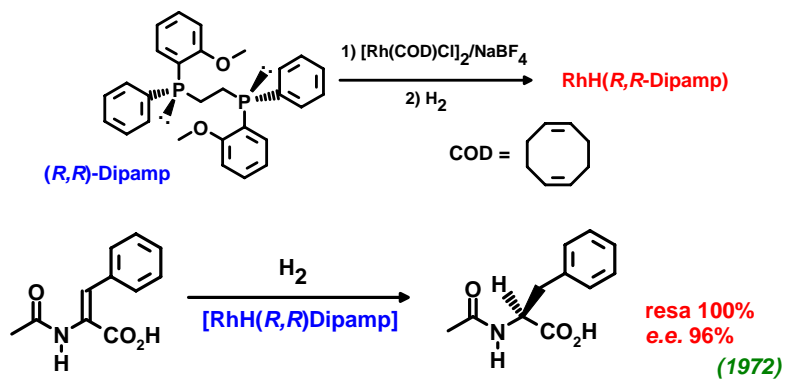
22

## SINTESI ASIMMETRICA

### 1) Uso di reagenti chirali

Sono disponibili reagenti ossidanti chirali, reagenti riducenti chirali e catalizzatori chirali

Esempio:

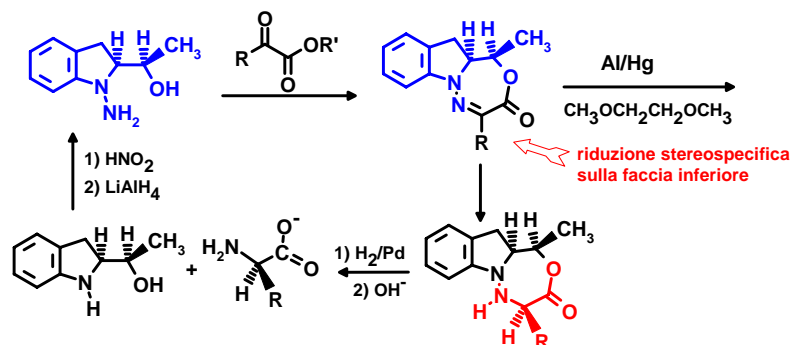


23

### 2. Uso di ausiliari chirali

Nel composto di partenza c'è un gruppo chirale rimovibile, che indirizza l'andamento stereochimico nella formazione del nuovo centro chirale; alla fine del processo (e dopo la purificazione) il gruppo chirale si rimuove

Esempio:

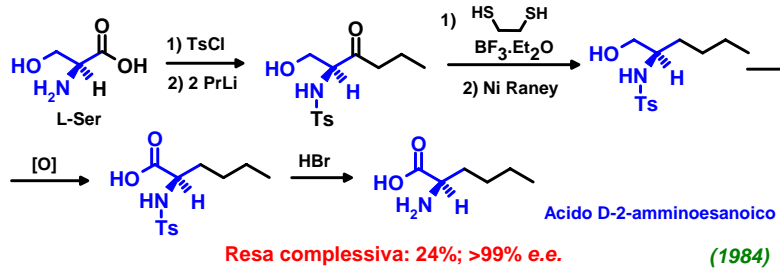


24

### 3. Sintesi chirale

Si parte da materiale otticamente attivo, il cui centro chirale viene poi incorporato nel prodotto.

Esempio:

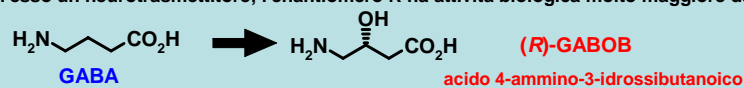


Ci sono molti modi per preparare un dato amminoacido: quale via scegliere in un caso specifico dipende da un'accurata considerazione della struttura da preparare e dall'esame di sintesi riportate in letteratura per composti simili.

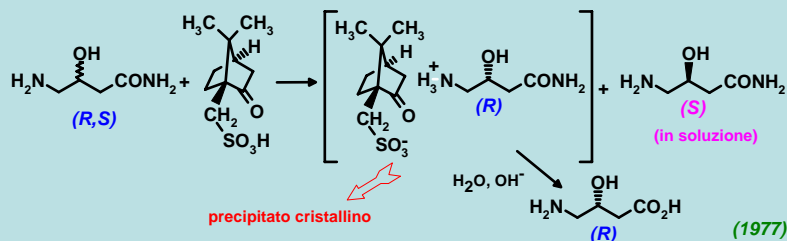
25

Esempio

L'acido  $\gamma$ -aminobutanoico (**GABA**) è un neurotrasmettitore e molti suoi derivati sono stati studiati per le loro potenzialità come farmaci. Un importante derivato, il 3-idrossi (**GABOB**), è anch'esso un neurotrasmettitore; l'enantiomero R ha attività biologica molto maggiore dell'S.



All'inizio il GABOB è stato preparato come miscela racemica con metodi tradizionali. La risoluzione della miscela racemica è stata ottenuta per cristallizzazione del sale canforsolfonico dell'amide.



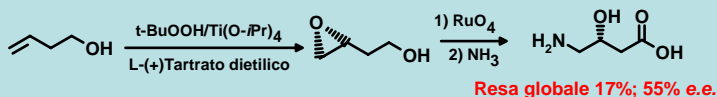
questo metodo ha permesso di ottenere (R)-GABOB, ma è lungo e con sprechi

Nel 1980 è stata pubblicata una sintesi chirale a partire dall'acido ascorbico (Vitamina C)



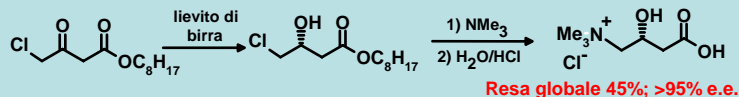
Sintesi lunga (nove passaggi) e resa bassa (~ 10%).

Nel 1983 è stata pubblicata una sintesi asimmetrica → Metodo 1: reagente chirale



Sintesi breve (tre passaggi), ma resa scarsa ed e.e. modesto

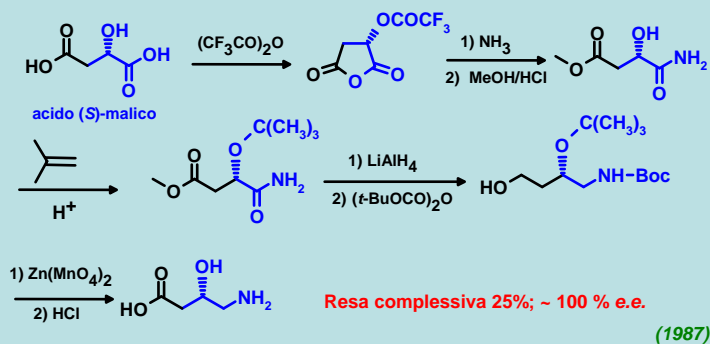
Un miglioramento si è avuto con la pubblicazione nel 1985 di una sequenza in tre passaggi che comprendono una riduzione enzimatica → Metodo 1: reagente chirale



La difficoltà maggiore è stata la ricerca del β-chetoestere migliore

A tutt'oggi il metodo migliore comporta una sintesi chirale a partire dall'acido malico (acido 2-idrossibutandioico), disponibile sia come isomero R che S, anche se la sintesi è stata fatta con l'acido S-malico, meno costoso.

→ Metodo 3: sintesi chirale




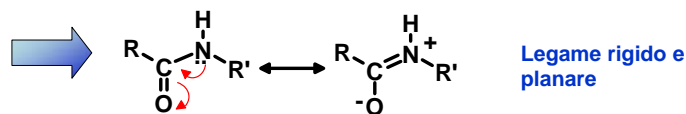
Fra i molti metodi a disposizione la scelta può dipendere dall'importanza della purezza ottica (se per esempio l'enantiomero "sbagliato" è tossico) o dalla resa o dalla versatilità del metodo.

## POLIPEPTIDI

I peptidi conservano molte delle proprietà degli amminoacidi, avendo alle due estremità un gruppo acido ed un gruppo amminico.

Le proprietà fisiche dei peptidi possono grosso modo essere determinate considerando insieme gli effetti di tutte le catene laterali, più quelli dei gruppi amminico e carbossilico alle estremità

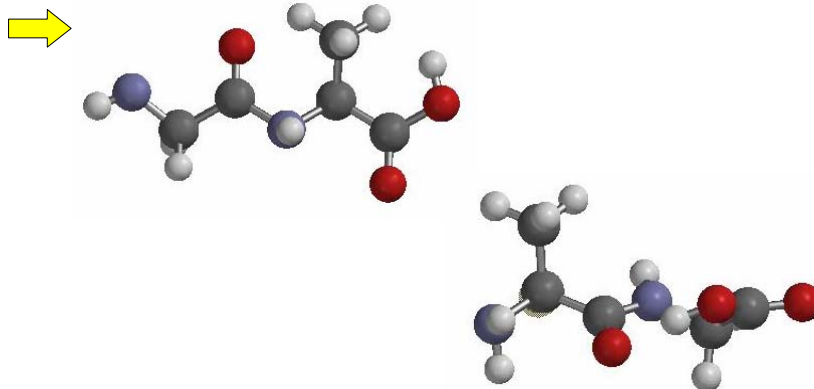
- 
- cariche globali tipiche a diversi pH
  - punti isoelettrici caratteristici
  - affinità specifiche per la fase acquosa e quella non acquosa



Con due amminoacidi diversi si possono avere due dipeptidi diversi, a seconda di quale gruppo carbossilico e quale gruppo amminico formino il legame peptidico

29

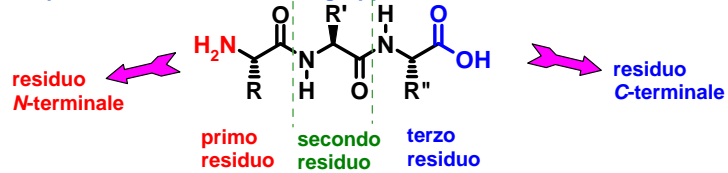
esempio: con glicina e alanina



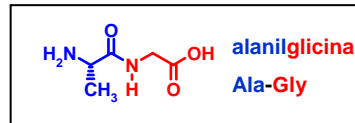
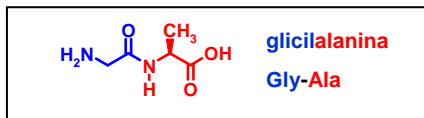
In un peptide l'amminoacido con l' $\text{NH}_2$  libero si chiama **estremità amminica** o **residuo N-terminale**; l'amminoacido con il gruppo  $-\text{CO}_2\text{H}$  libero si chiama **estremità carbossilica** o **residuo C-terminale**; la catena che comprende i legami ammidici si chiama **catena principale**; i sostituenti R degli amminoacidi costituenti il peptide si chiamano **catene laterali**.

30

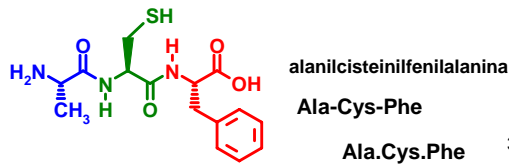
Per convenzione i peptidi si rappresentano scrivendo la sequenza da sinistra verso destra, a partire dall'estremità con il gruppo amminico:



**NOMENCLATURA.** Il residuo C-terminale costituisce il nome base; gli altri residui si chiamano come sostituenti (desinenza *-ile*).

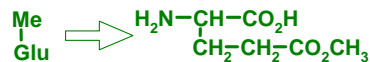


I nomi degli aminoacidi si abbreviano con le prime tre lettere, si collegano con "-" o con ".".

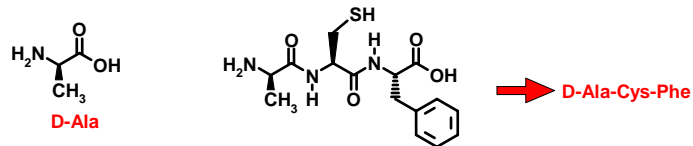


31

In caso di aminoacidi sostituiti, il sostituito si può indicare di seguito alla abbreviazione del nome dell'amminoacido



Si presuppone che gli aminoacidi siano di serie L. Se sono di serie D, va indicato



Quando si studiano i peptidi (e le proteine) le operazioni importanti sono:

1. Purificazione ed isolamento
2. Analisi degli aminoacidi e determinazione della sequenza
3. Sintesi

1. Perché si estrae dalla matrice biologica, insieme ad altre migliaia di composti
2. L'analisi non solo deve identificare quali aminoacidi costituiscono il peptide, ma anche la sequenza, cioè l'ordine con cui gli aminoacido sono legati tra loro, a partire dal residuo N-terminale fino al residuo C-terminale
3. Per avere quantità di peptide sufficiente per gli studi clinici, servono quantità molto maggiori di quelle che si possono ottenere dalla matrice biologica.

32

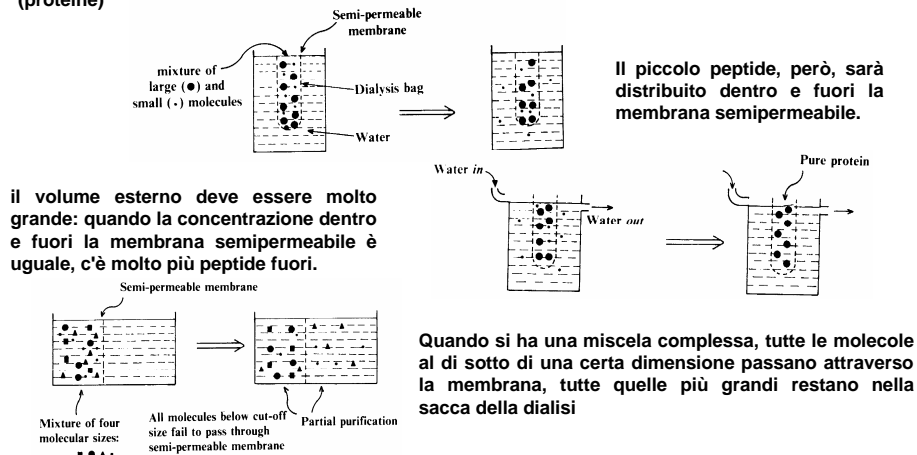


## PURIFICAZIONE ED ISOLAMENTO DEI PEPTIDI

Oltre al *pI* ed alla affinità per l'acqua o per i solventi organici è importante la dimensione dei peptidi.

### 1. DIALISI

Con membrane semipermeabili è possibile separare molecole piccole (peptidi) da molecole grandi (proteine)

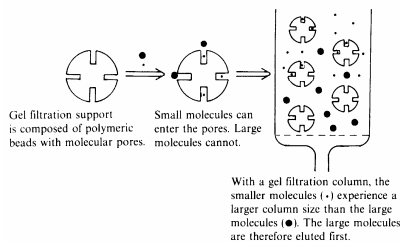


La dialisi è un metodo per una purificazione grossolana, che permette di maneggiare grandi quantità di materiale

33

## 2. GEL FILTRATION

La *gel filtration* impiega un supporto polimerico poroso. Le molecole grandi, che non entrano nei pori, vengono eluite rapidamente, mentre le molecole più piccole hanno tempi di ritenzione più lunghi.



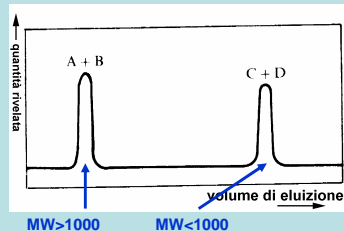
Se la miscela di peptidi è complessa, più grandi delle dimensioni dei pori verranno eluiti insieme ed insieme verranno eluiti quelli più piccoli

Usando un intervallo di dimensioni dei pori, le molecole di dimensioni piccole entreranno in tutti i pori, quelle di dimensioni medie entreranno solo in alcuni, le molecole grandi non entreranno in nessuno

Per molecole di dimensione intermedia diventano importanti i fattori di diffusione ed i tempi di ritenzione sono approssimativamente una funzione lineare di  $\log(MW)$ .

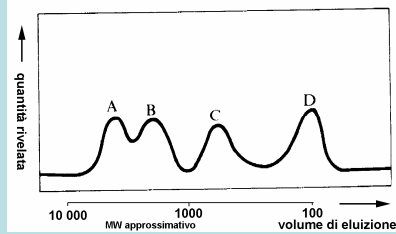
Purificazione per gel filtration di una miscela con 4 peptidi di MW 5000 (A), 3000 (B), 500 (C) e 100 (D)

Colonna di gel filtration con una sola dimensione dei pori



Con pori di dimensione corrispondente a circa MW 1000 (~12Å) verranno eluiti prima A+B e poi C+D

Colonna di gel filtration con un intervallo di dimensione dei pori



I pori differiscono tra loro all'incirca di 12Å : i quattro peptidi vengono separati

Questo è un profilo tipico per una gel filtration e dà anche un'indicazione del peso molecolare dei peptidi

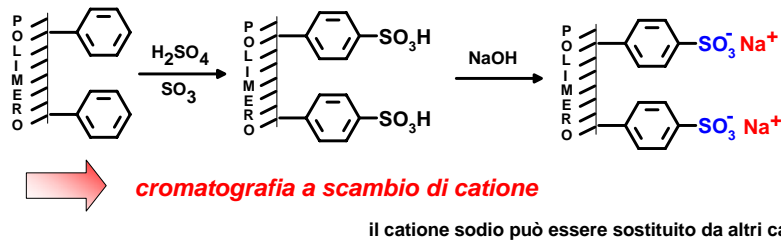
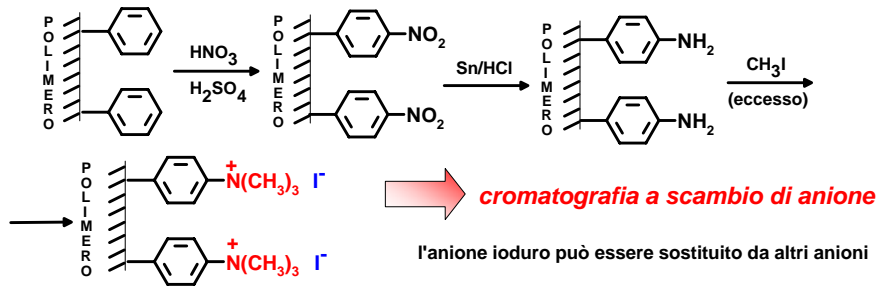
Con la gel filtration si ha un miglioramento della purezza del peptide ed una idea del peso molecolare, ma per isolare un peptide veramente puro servono altri metodi.

### 3. CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Se una soluzione di una miscela di peptidi viene fatta passare lungo una colonna che contiene un supporto polimerico carico, i peptidi verranno eluiti con una velocità diversa, che dipende soprattutto dalla loro carica complessiva.

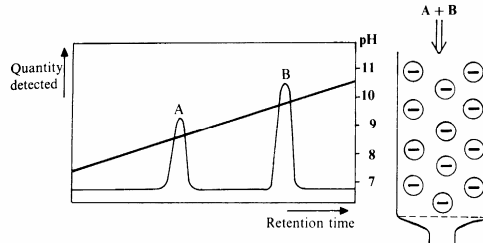
La carica del polimero può essere sia positiva che negativa.

35



I peptidi carichi positivamente hanno una elevata affinità per resine anioniche e non vengono eluiti; i peptidi carichi negativamente non interagiscono con le resine anioniche e vengono eluiti rapidamente (il contrario si ha con le resine cationiche).

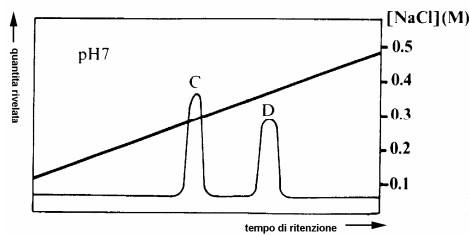
Per essere sicuri che tutto venga eluito in un tempo ragionevole, spesso si varia l'eluente con il tempo e questo di solito migliora anche la separazione dei componenti. Si può variare il pH o la forza ionica



A = Ala-Lys  
B = Ala-Lys-Ala-Lys

A pH <9 entrambi i peptidi vengono eluiti lentamente.

Aumentando il pH entrambi vengono eluiti abbastanza rapidamente ed escono a valori di pH prossimi al loro pI



C = Lys-Ala-Ala  
D = Lys-Glu-Lys

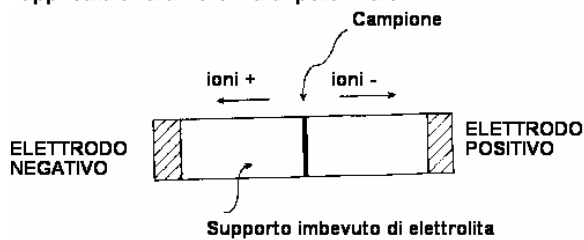
Tra pH 3 e 10 hanno carica complessiva molto simile

D contiene più gruppi polari: la sua maggiore affinità per i solventi polari è incrementata dall'aumento della forza ionica.

37

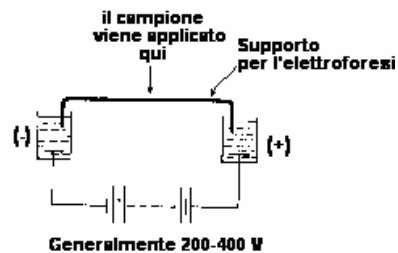
#### 4. ELETTROFORESI

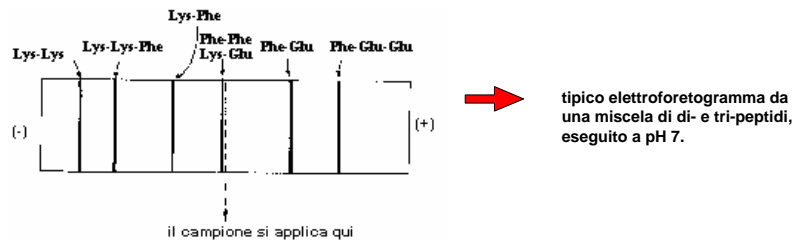
Nell'elettroforesi, una miscela di peptidi viene applicata su un supporto solido; il supporto viene permeato con una soluzione di elettrolita, in modo che possa essere applicata una differenza di potenziale.



Quando si fa passare la corrente, i peptidi carichi positivamente sono attratti verso il catodo, verso cui migrano. Invece i peptidi carichi negativamente migrano verso l'anodo.

Il supporto più semplice è una striscia di carta ed i peptidi si applicano vicino al centro della striscia. I diversi peptidi migrano con velocità diversa a seconda della loro carica complessiva e della loro resistenza al movimento: peptidi piccoli con carica elevata migrano più velocemente.





I dipeptidi Phe-Phe e Lys-Glu sono elettricamente neutri e restano vicino all'origine. Più alta è la carica complessiva, più migrano i peptidi (per es., Lys-Lys > Lys-Phe), ma un aumento di dimensione riduce la mobilità (per es., Lys-Lys-Phe migra meno di Lys-Lys).

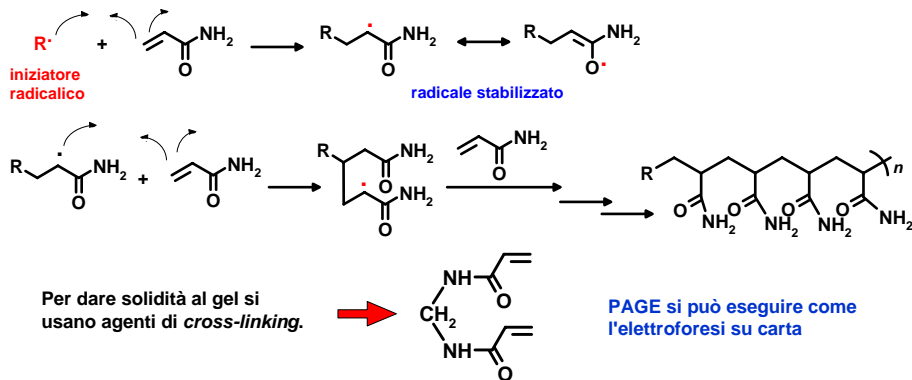
L'elettroforesi su carta è un metodo molto efficace per purificare piccole quantità di peptidi.

### Elettroforesi SDS-PAGE (PolyAcrylAmide Electrophoresis)

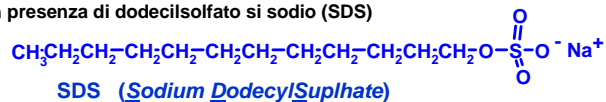
Come supporto, invece della carta, si prepara un gel di un polimero come la poliaccrilammide e la miscela di peptidi si applica ad una estremità

I gel di poliaccrilammide si formano per polimerizzazione radicalica della propenammide (acrilammide).

39



PAGE si esegue in presenza di dodecilsolfato di sodio (SDS)



- SDS:**
- ❖ è un tensioattivo e denatura i peptidi (e le proteine)
  - ❖ circonda i peptidi (e le proteine) conferendo loro una carica complessiva negativa e facendoli quindi migrare verso l'anodo
  - ❖ fa migrare i peptidi (e le proteine) *solo in funzione del loro peso molecolare* (migrano più rapidamente i più piccoli).

40

(-) ← il campione si applica qui → Tipico elettroforetogramma SDS-PAGE; il peso molecolare si deduce dalla distanza percorsa, per confronto con standard noti  
 70 k  
 60 k  
 50 k  
 40 k  
 30 k  
 20 k  
 10 k  
 Peso molecolare ↑  
 Migrazione ↓  
 (+)

a scala non è lineare ed è graduata in kilodaltons (1 kD = peso molecolare 1000)

SDS-PAGE è un ottimo metodo per separare peptidi (e proteine) sulla base del solo peso molecolare e permette anche di determinare il pesomolecolare approssimato.

**5. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)**  
 L'HPLC è una tecnica che usa supporti con elevata area superficiale e che può sopportare pressioni abbastanza elevate. → 10-100 atm, l'analisi dura 10-30 min

**La presenza di un solo segnale all'HPLC è criterio per la purezza del peptide**

- metodo analitico (< 1 mg)
- fase inversa

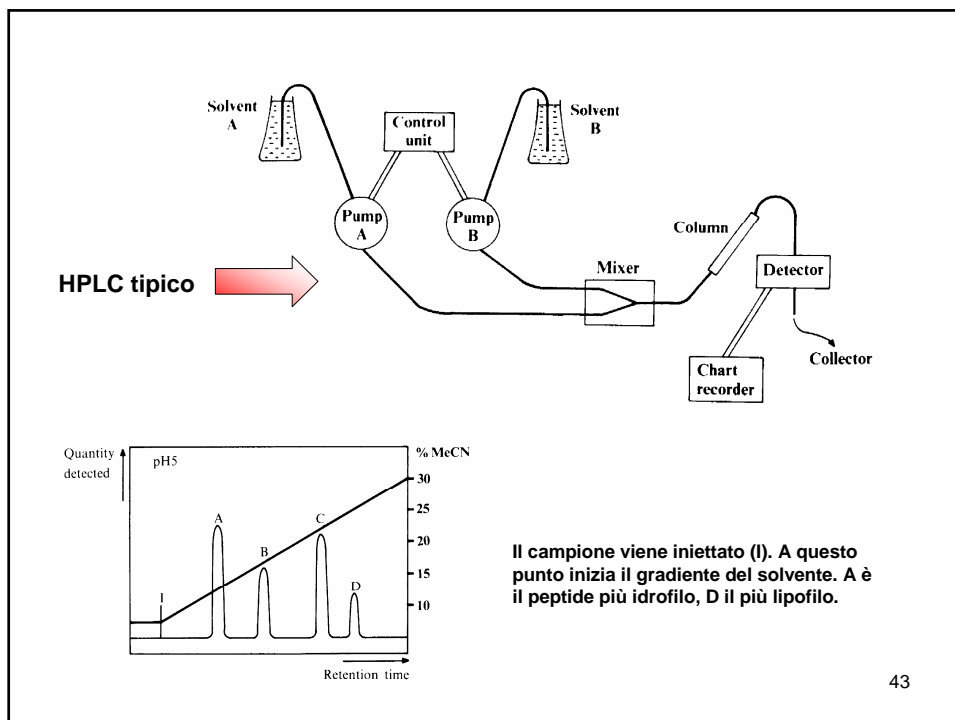
La cromatografia a fase inversa usa una fase stazionaria NON polare ed una fase mobile polare. I peptidi idrofili vengono eluiti rapidamente, quelli lipofili hanno tempi di ritenzione più lunghi.

Il supporto consiste di granelli di silice (< 10 mm), in cui i gruppi Si-OH presenti sulla superficie sono stati siliati per trattamento con  $RMe_2SiCl$ .

$R = \text{catena idrocarburica} \rightarrow \text{Più lungo è R, più lipofila è la colonna}$

campione in solvente polare

eluente → acqua con quantità crescenti di un solvente meno polare (MeCN, MeOH, *i*-PrOH), a pH costante e vicino alla neutralità.



## RIVELAZIONE DEI PEPTIDI

### 1. METODI NON DISTRUTTIVI

➡ **Assorbimento nell'ultravioletto**  
 $\lambda_{\max} \sim 214 \text{ nm}$  ( $\pi \rightarrow \pi^*$  del carbonile ammidico)

di solito si usano  $\lambda$  230 o 254 nm (spalla), perché la maggior parte degli eluenti ha assorbimento significativo a 210 nm. Se ci sono sostituenti aromatici (Phe, Tyr), si usa  $\lambda = 280 \text{ nm}$

➡ **Indice di rifrazione**

Quando nell'eluente è presente un composto, cambia l'indice di rifrazione (RI *refractive index*) del solvente. Metodo molto sensibile, non può essere usato con gradiente di solventi

➡ **Rotazione ottica (OR)**

La presenza di C chirali nei peptidi fa sì che questi ruotino la luce polarizzata

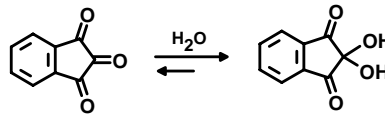
rivelatori OR laser, molto sensibili

I metodi non distruttivi non si possono usare per l'analisi di elettroforetogrammi

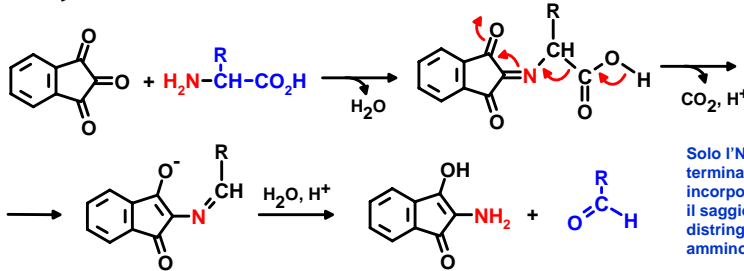
44

## 2. METODI DISTRUTTIVI

⇒ **Ninidrina**



⇒ conferisce una colorazione caratteristica viola-porpora

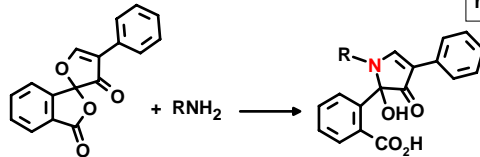


Solo l'N del residuo *N*-terminale viene incorporato nel prodotto: il saggio non permette di distinguere tra i vari aminoacidi (o peptidi)

$\lambda_{max} = 570 \text{ nm}$

45

⇒ **Fluorescammina**

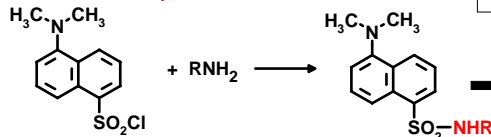


reagisce con qualsiasi gruppo  $-NH_2$

⇒ assorbe a 390 nm  
riemette a 475 nm

Il metodo è molto sensibile, in grado di rivelare picomoli ( $10^{-12}$  moli)

⇒ **Cloruro di dansile**



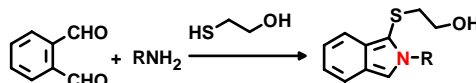
reagisce con qualsiasi gruppo  $-NH_2$

⇒ assorbe nell'UV

Il metodo è in grado di rivelare  $< 1 \mu\text{g}$  ( $10^{-8}$  moli) di qualsiasi aminoacido (o peptide)

⇒ **1,2-Benzendicarbaldeide (Aldeide ftalica, OPA o phthalaldehyde)**

in presenza di mercaptoetanolo, reagisce con qualsiasi gruppo  $-NH_2$

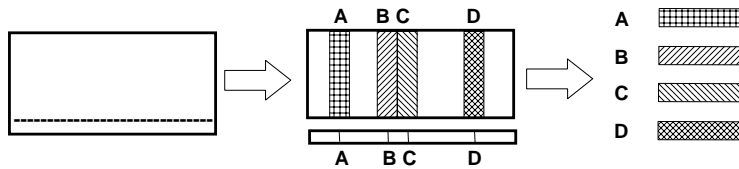


⇒ assorbe a 340 nm  
riemette a 450 nm

46

I metodi distruttivi sono accettabili solo se si usano piccole quantità di materiale.

➔ Se si sta usando l'elettroforesi per purificare i peptidi, si può rimuovere una sottile striscia di carta, sulla quale vengono visualizzati i peptidi



Una volta visualizzati i peptidi, si deduce la loro posizione sull'elettroforetogramma, si ritagliano le strisce contenenti i peptidi, che vengono recuperati lavandoli via con un solvente.

La purificazione di un pentapeptide incognito verrà ottenuta con più passaggi successivi, iniziando con quelli che permettono di trattare grandi quantità di materiale e passando poi a tecniche che abbiano risoluzione sempre maggiore, man mano che diminuisce la quantità di campione.

Una sequenza tipica può essere:

1. **Dialisi:** per rimuovere le proteine
2. **Gel filtration:** dà una purificazione significativa ed un PM approssimato
3. **Cromatografia a scambio ionico:** permette di trattare quantità relativamente grandi di materiale.
4. **HPLC in fase inversa:** metodo ottimo per purificare quantità piccole di peptidi
5. **Elettroforesi su carta:** per controllare la purezza del peptide e, se necessario, per isolare in piccola scala il peptide veramente puro.

## ANALISI DEI PEPTIDI

L'analisi dei peptidi consiste nell'individuare gli aminoacidi presenti e nel determinare la sequenza con cui sono legati fra loro

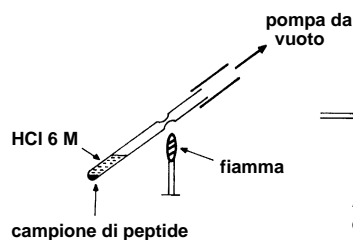
### ANALISI DEGLI AMMINOACIDI

#### 1. Idrolisi totale dei peptidi

I gruppi ammidici sono relativamente poco reattivi e possono essere idrolizzati in condizioni fortemente acide o basiche od usando enzimi specifici.

a) Idrolisi acida ➔ E' il metodo più usato per l'idrolisi totale dei peptidi allo scopo di analizzare gli aminoacidi

Condizioni standard: HCl acquoso 6M 110°C, 24 ore



Al termine il tubo viene rotto, il solvente viene evaporato, lasciando gli aminoacidi che costituiscono il campione.

La reazione si esegue di solito in un tubo di vetro sigillato, che prima di essere chiuso viene accuratamente degassato.

48



Alcuni amminoacidi possono essere distrutti nelle condizioni di idrolisi acida:

- Ser e Thr si disidratano ad alcheni (di solito le perdite non sono gravi)
- Met, Cys e Cys<sub>2</sub> si ossidano facilmente a 110°C. Non basta degassare, bisogna flussare accuratamente con azoto.
- Trp viene completamente distrutto.

Anche le catene laterali ammidiche vengono idrolizzate: l'asparagina ad acido aspartico, la glutammina ad acido glutammico.

### b) Idrolisi basica

Condizioni standard: NaOH 2 M in acqua, 100°C.

Arginina, cisteina, serina e treonina sono completamente distrutte, il triptofano no.

### c) Idrolisi enzimatica

Gli enzimi peptidasi scindono i legami ammidici

Condizioni standard: pH 7, 37°C, quantità catalitica di enzima

**Aminopeptidasi** → scindono (velocemente) i legami peptidici, liberando gli amminoacidi uno dopo l'altro, a partire dal residuo N-terminale. La scissione si interrompe tutte le volte che si arriva:

- ad un residuo Pro: il gruppo amminico è secondario e la catena laterale non può entrare nel sito attivo dell'enzima
- ad un D-amminoacido: la configurazione D impedisce alla catena laterale di entrare nella tasca del sito catalitico.

**Carbossipeptidasi** → scindono (lentamente) i legami peptidici, liberando gli amminoacidi uno dopo l'altro, a partire dal residuo C-terminale.

49

## 2. Separazione degli amminoacidi

Eseguita l'idrolisi totale del peptide, il problema successivo è separare gli amminoacidi liberati.

### a) Cromatografia a scambio ionico

- Di solito si usano solfonati (resine a scambio di catione).
- I tempi di ritenzione relativi sono influenzati dalla carica complessiva dell'amminoacido.
- Gli amminoacidi si separano in base alla carica complessiva.
- Si raccolgono più frazioni che poi si analizzano

Supponiamo di avere Gly, Phe, Lys e Glu

a pH 7

**Gly:** ha H come catena laterale; praticamente non carico

**Phe:** ha CH<sub>2</sub>Ph come catena laterale (effetto -I); praticamente non carico

**Glu:** ha un altro gruppo acido; complessivamente ha una carica negativa

**Lys:** ha un altro gruppo amminico; complessivamente ha una carica positiva.

Ordine di eluizione a pH 7 → Glu (carica complessiva -1)  
Gly e Phe (carica complessiva 0)  
Lys (carica complessiva +1)

50

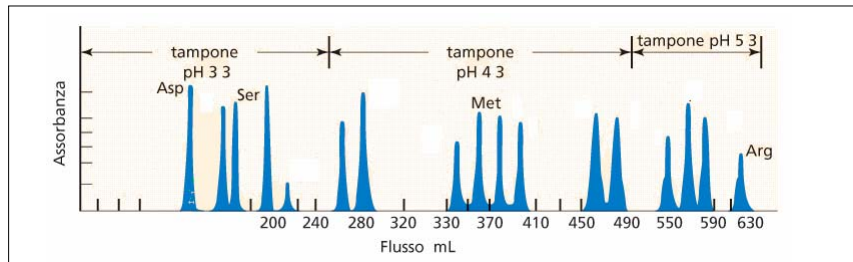
a pH 2

A pH 2 gli aminoacidi non avranno cariche intere, perché è un valore di pH più acido del punto isoelettrico.

Gly + 0.7, Phe + 0.4, Glu + 0.6, Lys + 1.6

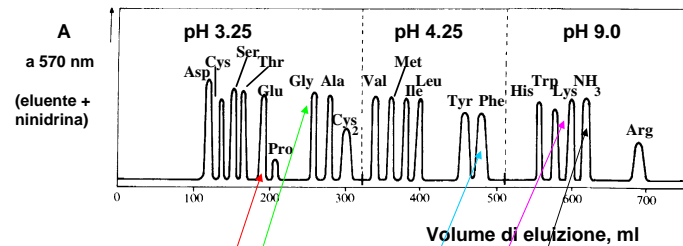
Ordine di eluizione a pH 2 → Phe, Glu, Gly, Lys → eluizione molto lenta (anche alcuni giorni)

Per separare tutti gli aminoacidi in tempi ragionevoli, nel corso della eluizione il pH viene gradualmente aumentato da 3 a 10: vengono eluiti prima gli aminoacidi acidi, poi quelli neutri ed infine quelli basici

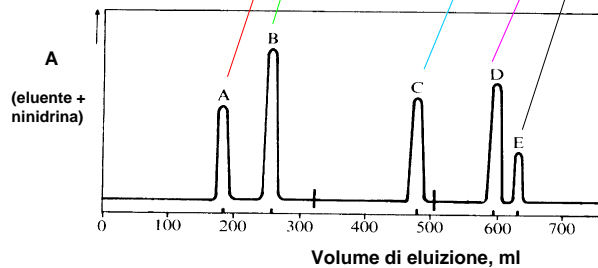


La cromatografia a scambio ionico si può effettuare automaticamente, con un analizzatore di aminoacidi. Le frazioni raccolte sono esaminate spettrofotometricamente, dopo aggiunta di ninidrina, a 570 nm (sapendo il coefficiente di estinzione molare, si conosce anche la concentrazione).

51



Cromatografia a scambio di catione per la separazione di quantità equimolari degli aa codificati dal DNA



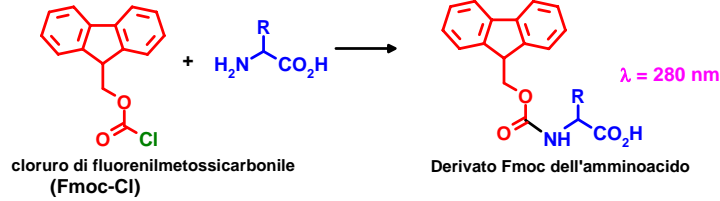
A = Glu, B = Gly, C = Phe, D = Lys, E = ammoniaca

Gli aminoacidi ottenuti dall'idrolisi totale di un peptide, fatti passare attraverso una colonna a scambio di catione, vengono identificati per confronto con gli standard.

52

### b) HPLC

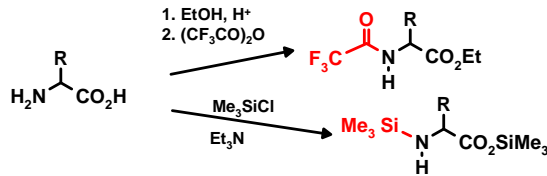
L'HPLC in fase inversa è particolarmente efficiente per separare gli aminoacidi, che si possono rivelare con la ninidrina o facendone i fluorenilmetossicarbonilderivati, che assorbono a circa 280 nm.



vantaggi → si usano strumenti HPLC standard e si rivelano tutti gli aminoacidi, compresa la prolina.

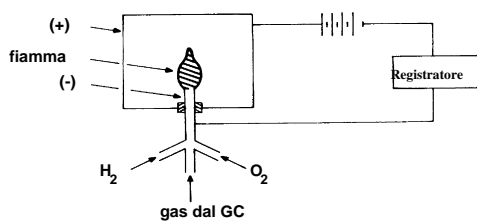
### c) Gascromatografia

Gli aminoacidi, esistendo generalmente come ioni dipolari, non sono volatili e vanno trasformati in derivati volatili per poter essere analizzati via GC.

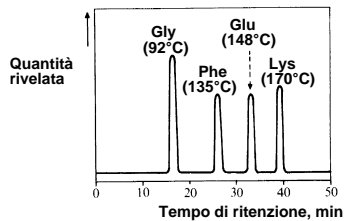


Generalmente la temperatura della colonna viene aumentata con il tempo

53



Rivelatore ad ionizzazione di fiamma: il gas di trasporto (eluente) viene convogliato su una fiamma che brucia in una camera, attraverso la quale è applicata una differenza di potenziale: la corrente dipenderà dal numero di particelle ionizzate prodotte dalla fiamma.



Analisi GC dei trifluoroacetammido esteri degli aa

#### vantaggi

Si possono usare gli strumenti GC standard.

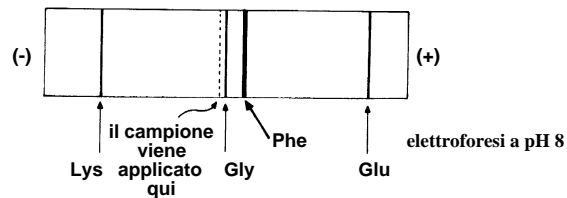
Si possono rivelare tutti gli aminoacidi (anche se danno risposte diverse al f.i.d.)

Il GC può essere direttamente collegato ad uno spettrometro di massa

54

#### d) Elettroforesi su carta

La tecnica si effettua caricando la miscela di amminoacidi su una striscia di carta che viene poi imbevuta con un tampone acquoso ad un pH opportuno. Quando alla carta si applica una differenza di potenziale, gli amminoacidi con carica globale positiva migrano verso il catodo, quelli con carica globale negativa migrano verso l'anodo.



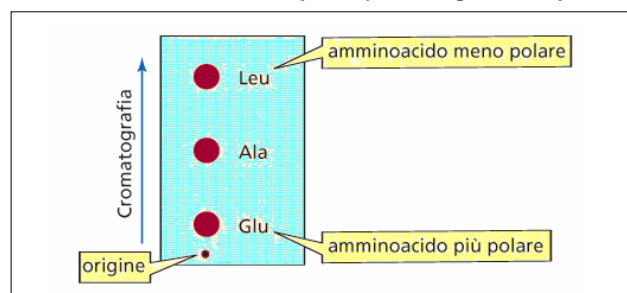
Svantaggi:   
⊗ scarsa risoluzione-   
⊗ molto difficile eseguire un'analisi quantitativa

Vantaggi:   
⊕ utile per separare amminoacidi insoliti   
⊕ utile per separare amminoacidi marcati con isotopi radioattivi

55

#### a) Cromatografia su carta

La cellulosa funziona da supporto e l'acqua ad essa legata (legame idrogeno) fa da fase stazionaria. Si usa un eluente acquoso (cromatografia di ripartizione).



La cromatografia su carta separa gli amminoacidi in base alla polarità. Gli amminoacidi meno polari vengono eluiti più rapidamente.

Al termine dell'eluizione si spruzza ninidrina, che dà una macchia violetta in corrispondenza degli amminoacidi.

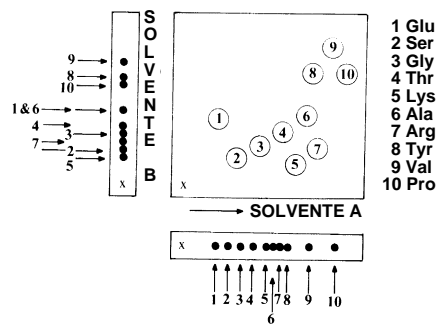
⇒ **Eluenti tipici contengono:**

- acqua
- soluzione ammoniacale (per aumentare il pH)
- acido acetico (per diminuire il pH)
- 1-butanolo (per diminuire la costante dielettrica).

56

Se non si riesce a separare completamente gli aminoacidi con la cromatografia su carta, si può tentare una cromatografia bidimensionale.

Si fa correre l'eluente in una direzione, si asciuga la carta, si cambia eluente e si fa correre in direzione perpendicolare alla precedente.



Cromatografia su carta in due dimensioni di una miscela di 10 a

57

## DETERMINAZIONE DELLA SEQUENZA

### 1. Analisi dei residui alle estremità del peptide

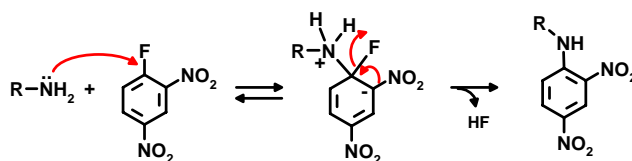
I residui alle estremità sono gli unici che hanno, rispettivamente, il gruppo amminico ed il gruppo carbossilico liberi (a parte quelli che li contengono nelle catene laterali).

Si modificano chimicamente questi gruppi funzionali, si esegue l'idrolisi del peptide: gli aminoacidi alle estremità vengono liberati in forma modificata

#### Residuo N-terminale

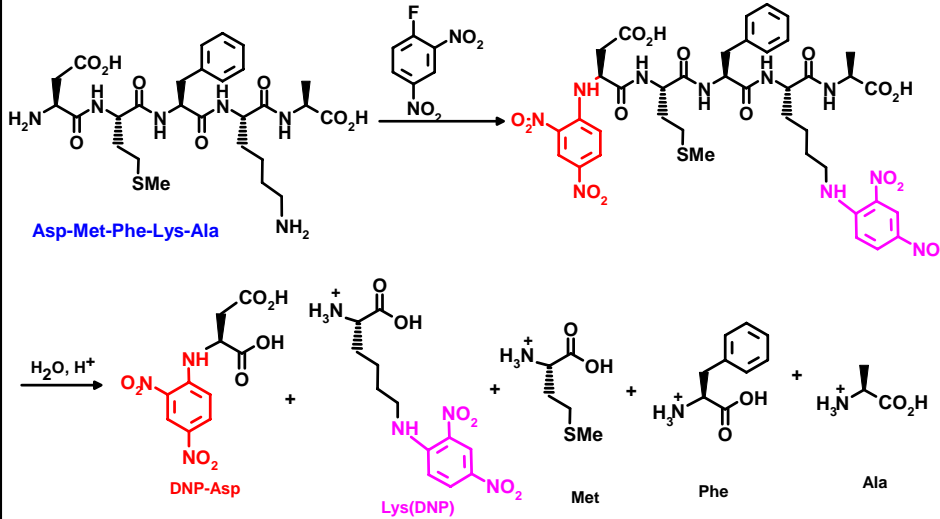
##### a. Metodo di Sanger

I gruppi amminici primari e secondari sono abbastanza nucleofili da dare reazione con il 2,4-dinitrofluorobenzene (*reagente di Sanger*), dando i 2,4-dinitrofenil derivati (DNP, *dinitrophenyl*)



Frederick Sanger

Il gruppo DNP è stabile all'idrolisi acida. Idrolizzando il peptide, si liberano gli aminoacidi: l'unico con DNP in  $\alpha$  è il residuo N-terminale.

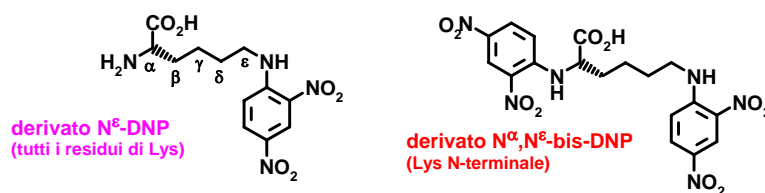


Provenendo dall'idrolisi acida, gli aminoacidi sono in forma cationica!

59

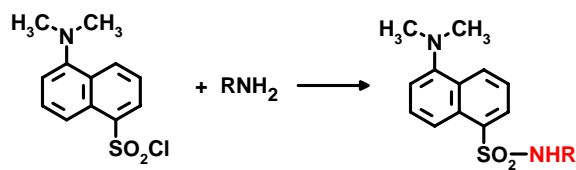
L'identificazione si fa per confronto con i DNP derivati degli aminoacidi.

Gli aminoacidi che hanno gruppi amminici in catena laterale saranno sostituiti in una posizione diversa dalla  $\alpha$ .



Il processo di identificazione si può migliorare estraendo i DNP derivati con solventi organici (cloroformio, acetato di etile).

Più recentemente il cloruro di dansile viene utilizzato a preferenza del reagente di Sanger (i derivati hanno forte assorbimento nell'UV).



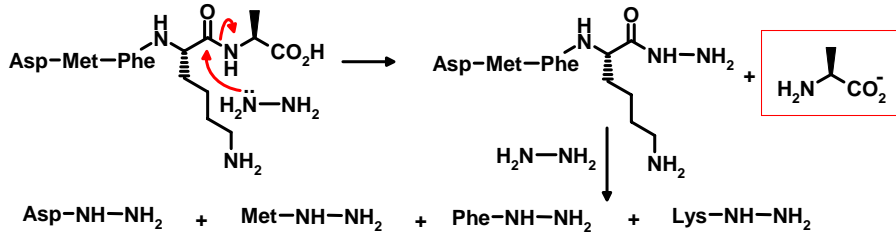
60

### Residuo C-terminale

L'identificazione dell'estremità carbossilica è meno facile

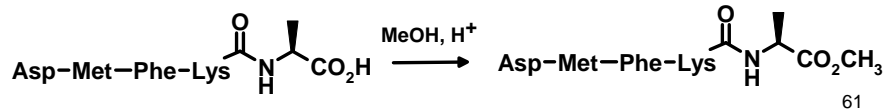
#### a. trattamento con $\text{NH}_2\text{NH}_2$

L'idrazina (Nu forte) attacca tutti i legami ammidici e come base dà l'anione carbossilato. L'unico carbossile libero al termine della reazione è quello del residuo C-terminale (o un carbossile in catena laterale)

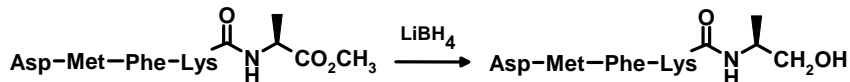


#### b. trattamento con $\text{LiBH}_4$

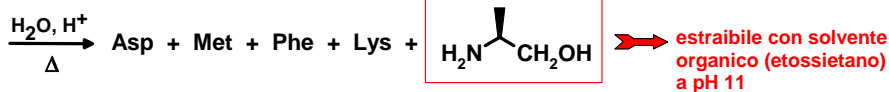
Tutti i gruppi carbossilici si trasformano in esteri metilici: il trattamento con  $\text{LiBH}_4$  riduce le funzioni esteree, ma non quelle ammidiche.



61



Per idrolisi totale del peptide modificato, si ottengono gli amminoacidi ed un amminoalcol (quello dal residuo C-terminale)



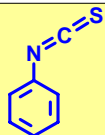
I metodi non sono molto sensibili ed il limite inferiore è circa 10 $\mu$ g.

## 2. Rimozione dei residui uno alla volta

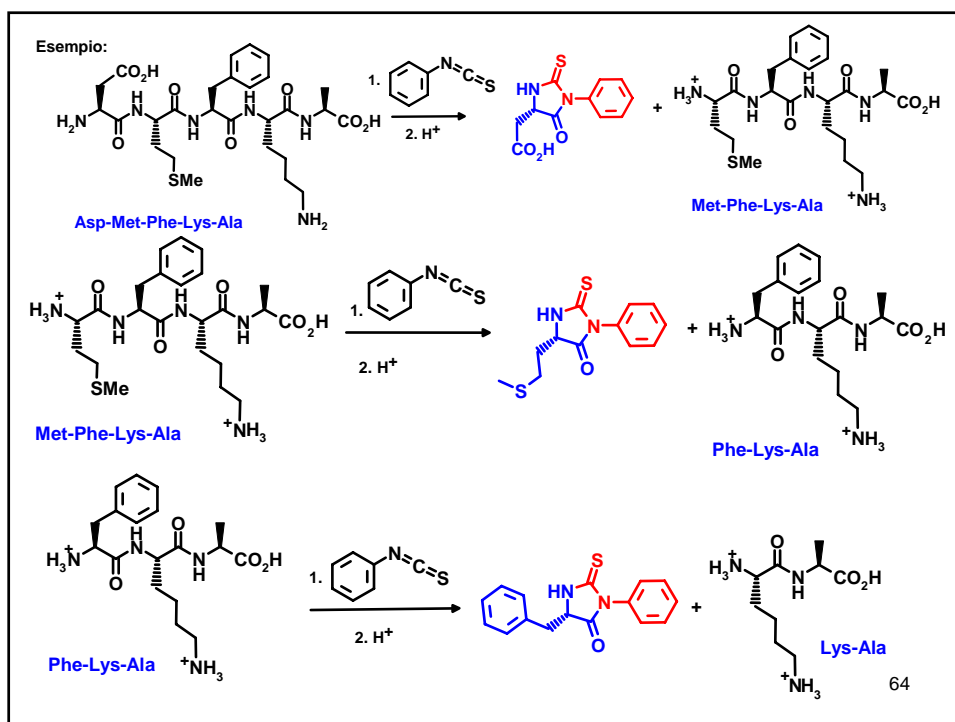
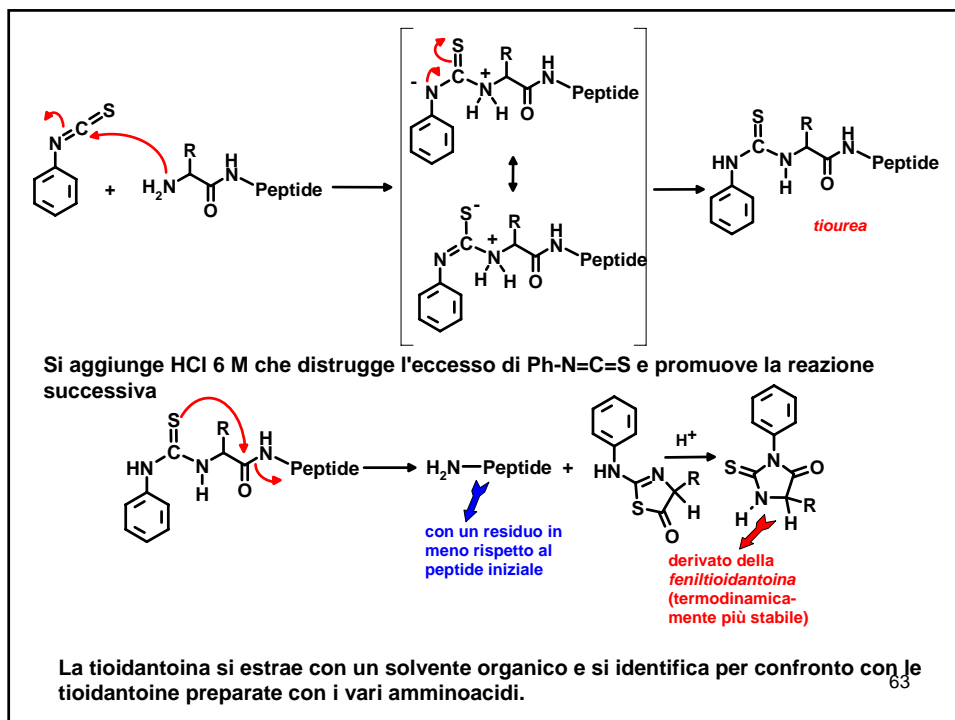
### Residuo N-terminale

Degradazione di Edman

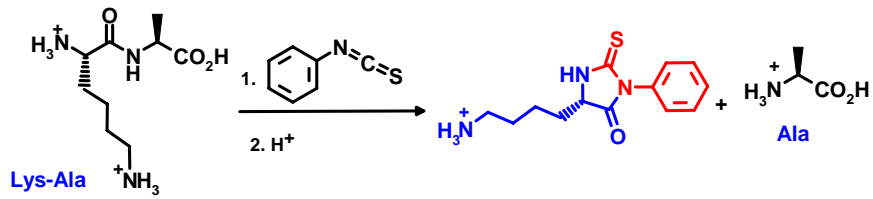
reagente:  
isotiocianato di fenile










Edman







- Vantaggi:**   con 50  $\mu\text{g}$  si può ricostruire la sequenza di un pentapeptide  
 il processo è stato automatizzato
- Svantaggi**   non è abbastanza sensibile per le piccole quantità di peptide spesso a disposizione  
 con la ripetizione del ciclo di reazione il peptide rimanente contiene sempre più impurezze e dopo 20 residui i risultati possono essere ambigui  
 è necessario che l'estremità contenga il gruppo amminico libero (ed in molti peptidi naturali non è così).

Se si deve ricostruire la sequenza di un peptide contenente più di 20-30 residui di amminoacidi, si effettua una scissione parziale a peptidi più piccoli.

65

### Residuo C-terminale

La carbossipeptidasi scinde gli amminoacidi uno alla volta, partendo dal residuo C-terminale. L'idrolisi è abbastanza lenta ed interrompendola intempi successivi (per es., per acidificazione) è possibile determinare i primi residui dagli amminoacidi liberati.

Esempio: Usando la carbossipeptidasi sul pentapeptide Asp-Met-Phe-Lys-Ala, si ottengono i seguenti risultati:

tempo di reazione (min)	Aa liberati (equivalenti)
2	Ala (0.34)
6	Ala (0.73) Lys (0.17)
20	Ala (0.96), Lys (0.52), Phe (0.07)
60	Ala (0.96), Lys (0.52), Phe (0.07) Met (0.12)

Con il procedere del tempo, le diverse velocità di idrolisi determinano un quadro più complesso. Di solito non è possibile risalire la sequenza per più di 3-5 residui.

66

### 3. Idrolisi parziale

L'idrolisi parziale (chimica o enzimatica) scinde il peptide in peptidi più piccoli, di cui è più facile ricostruire la sequenza: la struttura del peptide iniziale si ricostruisce trovando i punti in comune dei peptidi più piccoli.

Esempio

Ala-Phe-Gly-Glu-Phe-Ser-Ser-Phe ➔ **ottapeptide**

↓  
idrolisi parziale

*eptapeptidi + amminoacidi*

Ala + Phe-Gly-Glu-Phe-Ser-Ser-Phe + Ala-Phe-Gly-Glu-Phe-Ser-Ser + Phe

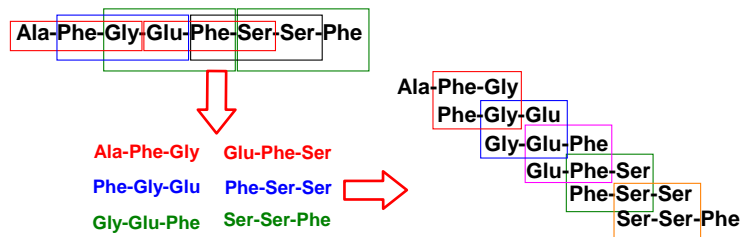
*esapeptidi + dipeptidi*

Ala-Phe + Gly-Glu-Phe-Ser-Ser-Phe + Ala-Phe-Gly-Glu-Phe-Ser + Ser-Phe

*pentapeptidi, tripeptidi*

67

Si raccolgono tutti i peptidi della stessa lunghezza: per esempio i tripeptidi



Un peptide (o una proteina) può essere idrolizzato parzialmente anche usando enzimi, detti **endopeptidasi**, che catalizzano l'idrolisi di un legame ammidico non terminale

Idrolisi enzimatica	
Enzima	Specificità
Tripsina	idrolizza dal lato carbonilico di Arg e Lys
Chimotripsina	idrolizza dal lato carbonilico di amminoacidi contenenti anelli aromatici a 6 termini (Phe, Tyr, Trp)
Elastasi	idrolizza dal lato carbonilico di piccoli amminoacidi (Gly, Ala)

68

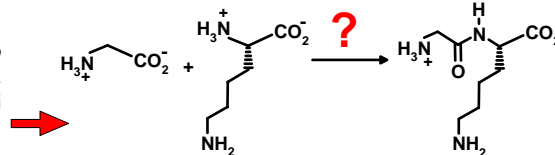
## SINTESI DEI PEPTIDI

La sintesi dei peptidi permette di:

- confermare la struttura di un peptide naturale
- preparare quantità relativamente grandi di peptidi rari
- preparare peptidi nuovi

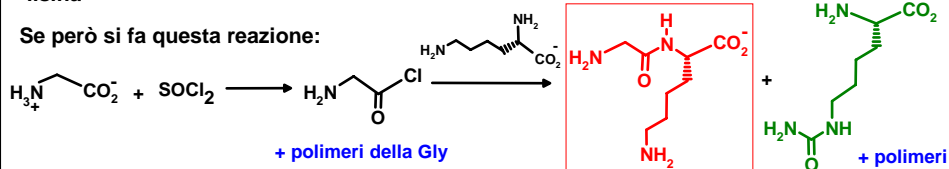
Supponiamo di dover preparare il pentapeptide **Glp-Phe-Gly-Gly-Lys** partendo da L-amminoacidi facilmente disponibili.

Affrontiamo il problema iniziando ad unire insieme due residui a partire da quello C-terminale: si tratta di fare il dipeptide Gly-Lys



si può pensare di trasformare la glicina nel suo cloruro acilico e poi di aggiungere la lisina

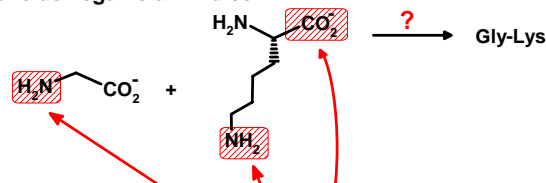
Se però si fa questa reazione:



oltre al dipeptide desiderato si formano *un centinaio di sottoprodotti!*

69

Per formare un dipeptide dagli amminoacidi che lo costituiscono, bisogna proteggere tutti i gruppi funzionali, tranne quelli che dovranno essere coinvolti nella formazione del legame ammidico

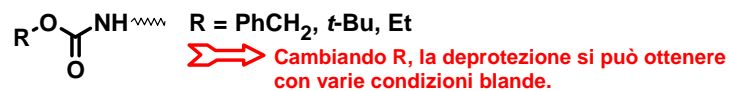


posizioni che devono essere protette per avere l'accoppiamento corretto

si devono scegliere gruppi protettivi che si possano rimuovere *senza rompere il legame peptidico appena formato*

### - Protezione del gruppo amminico

si ottiene diminuendo la nucleofilicità dell'N, trasformando il gruppo amminico in alcossicarbonil derivato

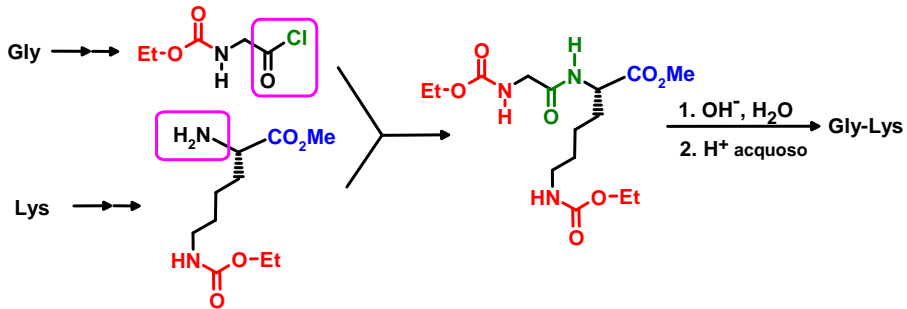


### - Protezione del gruppo carbossilico

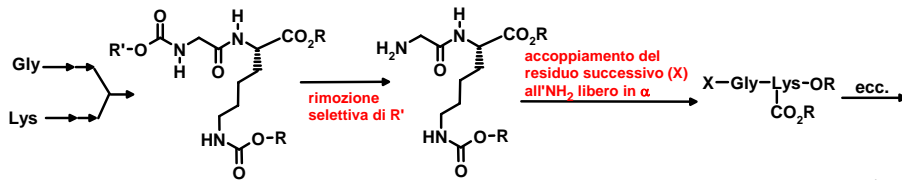
si ottiene trasformando l'acido nell'estere corrispondente (gli esteri sono più reattivi delle ammidi)

70

La sintesi del dipeptide Gly-Lys si può perciò effettuare nel modo seguente



Questa strategia funziona bene per preparare il dipeptide. Se però si vuole continuare la sintesi di un peptide più lungo, bisogna introdurre di nuovo i gruppi protettori: sarebbe meglio poter rimuovere solo il gruppo protettore dell' $\text{NH}_2$  in  $\alpha$

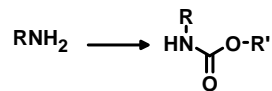
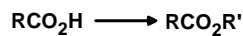


71

La sintesi dei peptidi si semplifica notevolmente, se si usano due tipi di gruppi protettori, ciascuno dei quali può essere rimosso selettivamente.

L'uso di gruppi protettori complementari si dice **protezione ortogonale**

Un esempio di protezione ortogonale si ha con i gruppi benzile/*terz*-butile

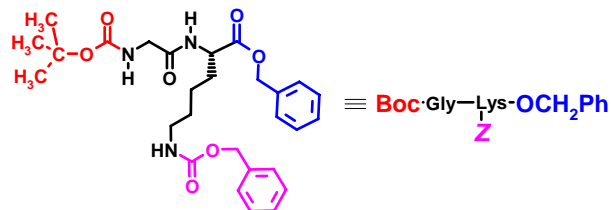


reagente	TFA	$\text{H}_2/\text{Pd-C}$
$\text{R}' = \text{CH}_2\text{Ph}$	x	✓
$\text{R}' = \text{CMe}_3$ ( <i>t</i> -Bu)	✓	x

x = stabile    ✓ = deprotezione

entrambi i gruppi si possono rimuovere con  $\text{HBr}/\text{AcOH}$  o  $\text{HF}$

Combinando i gruppi protettori benzile e *t*-butile, si può preparare facilmente un dipeptide Gly-Lys protetto, pronto per le reazioni successive

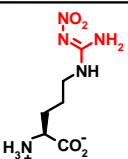
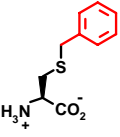

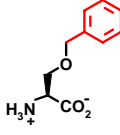
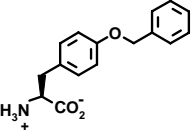


72



## - Protezione di altri gruppi

In catena laterale ci possono essere gruppi che devono essere protetti

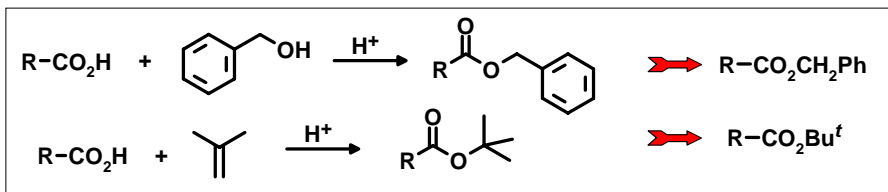
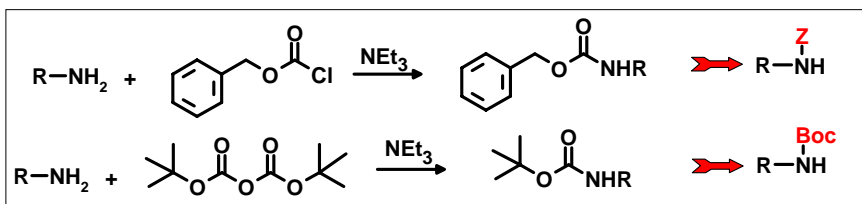
Amminoacido protetto	abbreviazione	rimozione	Amminoacido protetto	abbreviazione	rimozione
	Arg(NO <sub>2</sub> )	H <sub>2</sub> /Pd-C		Cys(CH <sub>2</sub> Ph)	Na/NH <sub>3</sub> liq.
	His(Bom)	H <sub>2</sub> /Pd-C		Ser(CH <sub>2</sub> Ph)	HBr/AcOH o Na/NH <sub>3</sub> liq.
	Tyr(CH <sub>2</sub> Ph)	HBr/AcOH o Na/NH <sub>3</sub> liq.			

75

Tutti questi gruppi protettori sono stabili quando si tratta con TFA. Sono tutti rimuovibili con HF.

## INTRODUZIONE DEI GRUPPI PROTETTORI

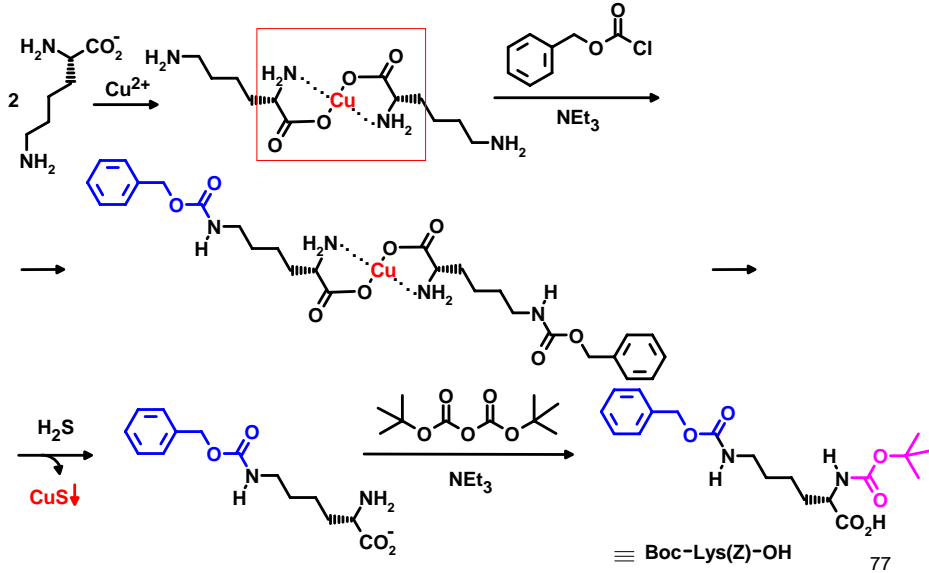
Spesso costa meno comperare gli amminoacidi già protetti (perché preparati ingrandi quantità). Dovendoli preparare, i gruppi protettori più comuni si introducono nel modo seguente:



Un problema particolare si presenta quando dobbiamo differenziare due gruppi amminici o due gruppi carbossilici. La soluzione dipende da quale gruppo si deve proteggere.

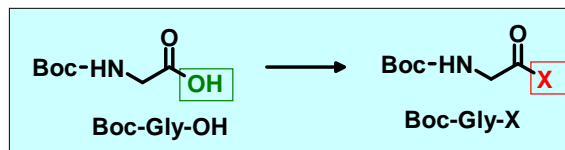
76

Per esempio, la protezione della catena laterale della lisina con Z si può effettuare sul chelato con un catione, come quello rameico; successivamente il gruppo amminico si protegge con Boc, dopo aver rimosso il catione

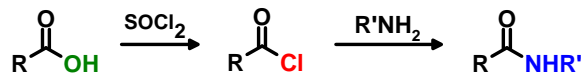


### FORMAZIONE DEL LEGAME PEPTIDICO

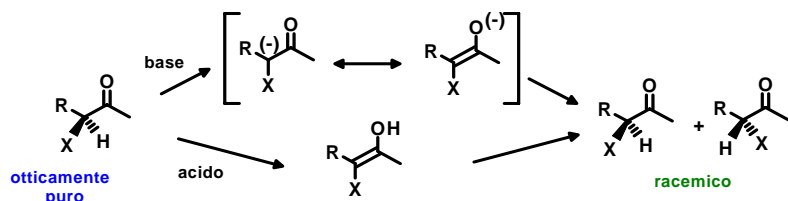
➡ Dovendo formare il legame ammidico tra due amminoacidi, opportunamente protetti, bisogna *trasformare il gruppo OH dell'acido in un buon gruppo uscente*



Per gli acidi carbossilici l'attivazione più usata nel passato è stata la trasformazione in cloruri acilici

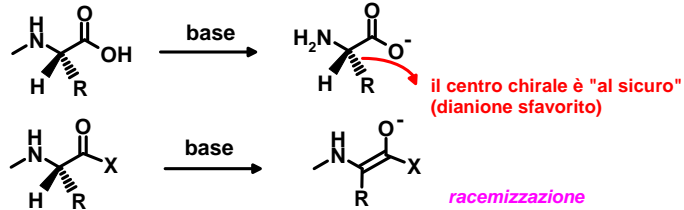


però ➡ per la formazione del legame peptidico, se l'attivazione è troppo forte, si hanno dei problemi, il principale dei quali è la racemizzazione del C $\alpha$

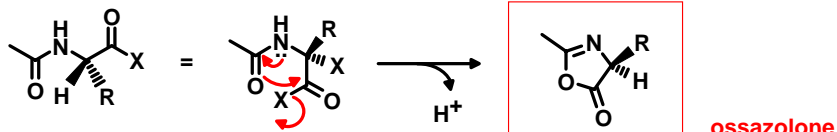


78

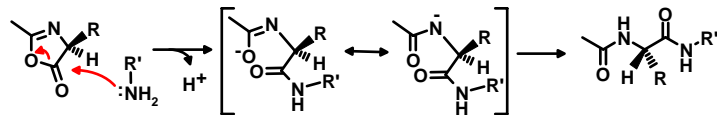
L'acido carbossilico libero non dà racemizzazione in ambiente basico, ma il cloruro acilico la dà, (Cl favorisce la formazione dell'anione)



Con i peptidi (e con gli aminoacidi con il gruppo amminico protetto come ammido semplice) c'è un altro meccanismo con cui avviene la racemizzazione quando il gruppo OH dell'acido carbossilico è sostituito con un gruppo uscente molto buono.

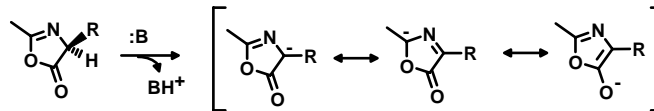


Gli ossazoloni sono molecole abbastanza reattive e possono fare legame peptidico per trattamento con l'opportuno composto con il gruppo amminico



79

però l'ossazolone dà racemizzazione in condizioni molto blande, soprattutto inseguito a deprotonazione base-catalizzata, dando un anello aromatico a 6 elettroni  $\pi$



qualunque formazione di ossazolone potrebbe portare a racemizzazione del centro chirale, pregiudicando l'integrità del peptide appena preparato

Per ridurre il grado di racemizzazione durante le reazioni di formazione del legame peptidico si può:

- ⌘ eseguire reazioni di accoppiamento in cui il carbossile attivato sia quello della glicina (che non è chirale) o della prolina (che non forma ossazolone)
- ⌘ scegliere condizioni di reazione che minimizzino la racemizzazione (solvente poco polare, pH neutro, bassa temperatura)
- ⌘ scegliere accuratamente le condizioni per attivare il carbossile (v. dopo)
- ⌘ usare nelle reazioni di accoppiamento aminoacidi protetti con gruppi alcossicarbonile



80

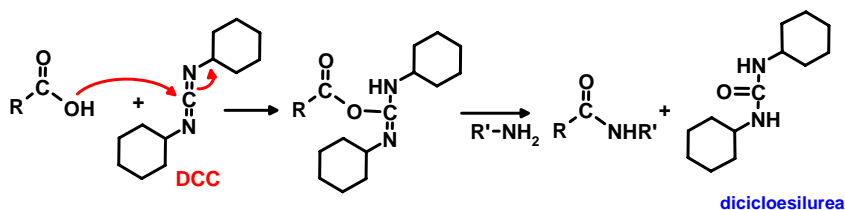


con questi derivati non si osserva praticamente racemizzazione, tranne che in condizioni molto estreme (si pensa che gli alcossiossazoloni corrispondenti siano difficili da deprotonare sul C  $\alpha$ ).

*gli aminoacidi protetti con alcossicarbonile possono essere "attivati" e poi accoppiati con l'amminoacido appropriato, senza rischio di avere racemizzazione.*

## REAGENTI PER L'ACCOPIAMENTO PEPTIDICO

### DICICLOESILCARBODIIMMIDE (DCC)



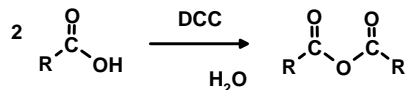
La DCC può essere aggiunta direttamente alla miscela di acido ed ammina, perché con l'ammina dà solo un equilibrio.

La diciolesilurea è poco solubile e si separa per filtrazione

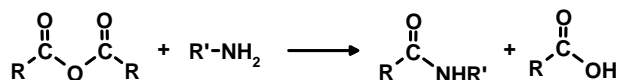
L'uso della DCC permette di accoppiare un acido ed un'ammina in una reazione "one-pot" ed è il metodo più semplice di formazione del legame ammidico.

### ANIDRIDE

Se l'acido carbossilico si tratta con mezzo equivalente di DCC, si osserva la formazione del precipitato bianco di diciolesilurea anche prima dell'aggiunta della DCC, a causa della formazione di anidride



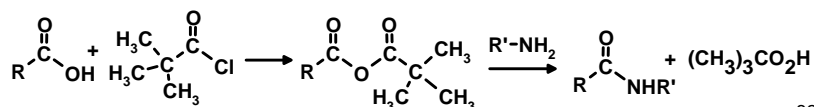
L'anidride può essere utilizzata per la formazione del legame ammidico



Questo procedimento è molto usato nella sintesi di peptidi, perché la reazione è pulita ed avviene velocemente (di solito entro un'ora).

*Le anidridi simmetriche, formate da acido e DCC, reagiscono con le ammine per dare ammidi che di solito sono molto pure, ma questo metodo comporta lo spreco di metà dell'acido carbossilico (costoso).*

L'inconveniente si può evitare usando anidridi miste:

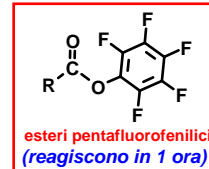
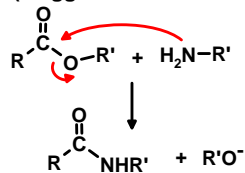


82

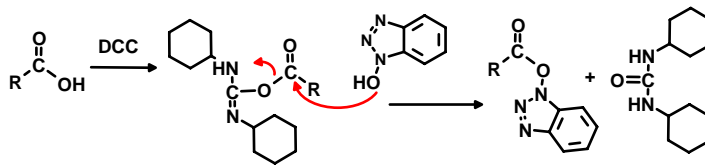
## ESTERE ATTIVO

Gli esteri metilici sono poco reattivi con le ammine e perciò non sono buoni substrati per la sintesi di peptidi.

→ la reazione diventa utile con esteri con gruppi OR migliori gruppi uscenti (maggiore stabilità do RO<sup>-</sup>)



Alcuni esteri attivi possono essere preparati *in situ*. Per esempio, l'1-idrossibenzotriazolo e la DCC vengono fatti reagire con l'acido carbossilico in uno stadio di "pre-attivazione"; la successiva aggiunta di ammina porta alla formazione pulita dell'ammido desiderata.

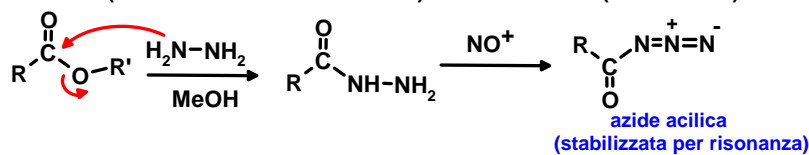


Quando gli esteri attivi vengono fatti reagire con le ammine, si ottengono ammido elevata purezza, ma gli esteri attivi possono essere difficili da preparare (o costosi da comperare).

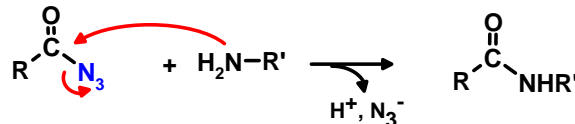
83

## AZIDI

Le azidi aciliche si possono formare dagli esteri carbossilici per trattamento con idrazina (che forma l'idrazide dell'acido) ed acido nitroso (fonte di NO<sup>+</sup>).



Il gruppo azido è un gruppo uscente moderatamente buono. La reazione con le ammine avviene in circa 10 ore, dando l'ammido corrispondente.

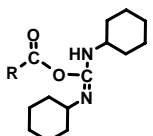
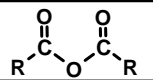
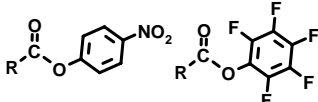



Il metodo dell'azide non viene scelto di solito, perché le azidi aciliche danno reazioni secondarie (per esempio la trasposizione di Curtius) e la formazione di ammido è piuttosto lenta. Però le azidi non danno racemizzazione.

La formazione di legame peptidico con azide si usa solo quando la racemizzazione è un problema serio, soprattutto nell'accoppiamento di due frammenti peptidici.

84

Riassumendo, i quattro metodi principali di accoppiamento peptidico sono:

Metodo	Forma attivata	Vantaggi	Svantaggi
DCC		semplice	qualche reazione secondaria
Anidride		reazione molto pulita	sprechi piuttosto costoso
Esteri attivi		reazione molto pulita	esteri attivi costosi o di non facile preparazione
Azide		assenza di racemizzazione nell'accoppiare frammenti	numerose reazioni secondarie

85

## STRATEGIA

Dovendo preparare un peptide, dobbiamo eseguire la sintesi aggiungendo un aminoacido alla volta o dobbiamo costruire la molecola in pezzi? Ci sono altri fattori che possono influenzare il progetto della via sintetica?

### SINTESI LINEARE o CONVERGENTE ?

Una sintesi di peptide si chiama *lineare* se la molecola-obiettivo viene costruita accoppiando un residuo aminoacidico alla volta.

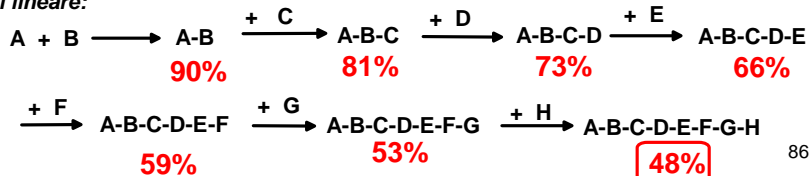
Una sintesi di peptide *convergente* comporta la sintesi separata di frammenti peptidici (contenenti due o più residui) che poi vengono accoppiati, formando il peptide finale.

Consideriamo la sintesi di un ottapeptide, la cui sequenza di aminoacidi si indichi con:



Supponiamo di poter garantire una resa del 90% per ciascun passaggio di accoppiamento e confrontiamo la resa complessiva di una sintesi lineare con quella di una sintesi convergente

Sintesi lineare:



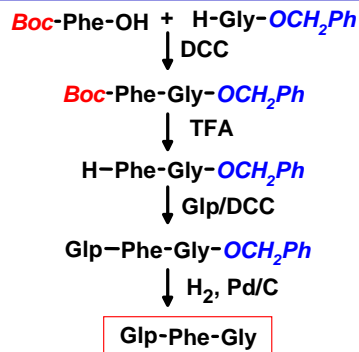
86





E' meglio costruire il peptide "da destra a sinistra", perché si può minimizzare la racemizzazione.

*Per la sintesi lineare di peptidi è meglio partire dall'estremità C-terminale, perché gli amminoacidi protetti con alcossicarbonile si possono attivare facilmente, senza seri rischi di racemizzazione.*



89

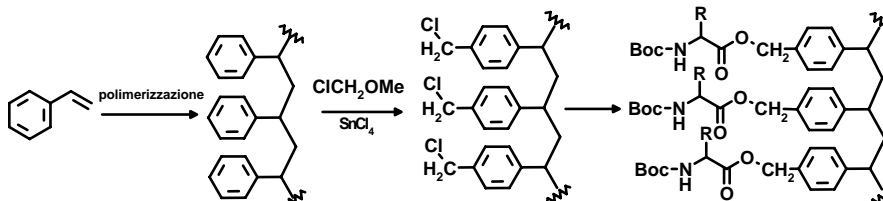
Nonostante i vantaggi della sintesi convergente, in seguito all'avvento della sintesi dei peptidi in fase solida, la maggior parte della sintesi peptidica si esegue in modo lineare.

### SINTESI DEI PEPTIDI IN FASE SOLIDA

Uno dei problemi principali nella sintesi peptidica non sono tanto i passaggi di protezione/deprotezione o le reazioni di accoppiamento, quanto la necessità di purificare il peptide ad ogni passaggio, per evitare che si accumulino le impurezze.

Un modo di semplificare notevolmente la purificazione si deve a Merrifield, che ha sviluppato la tecnica di legare l'estremità C- ad un supporto polimerico insolubile.

Merrifield ha usato un supporto di polistirene trattato con clorometossimetano in presenza di un acido di Lewis. Questa reazione di Friedel-Crafts dà un polimero insolubile, in grado di formare un legame di tipo estere benzilico con l'appropriato derivato di un amminoacido:

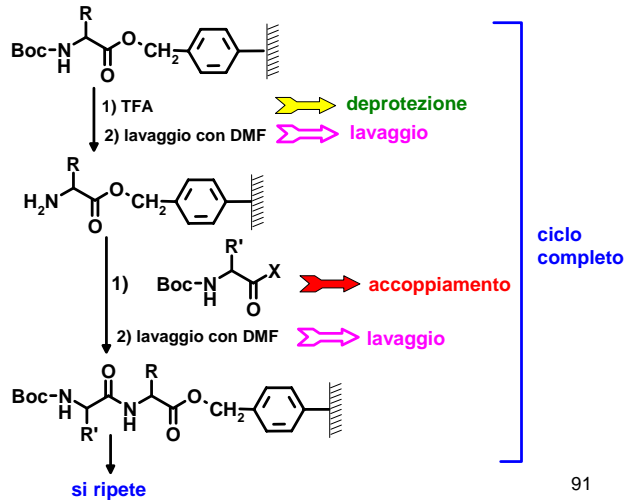
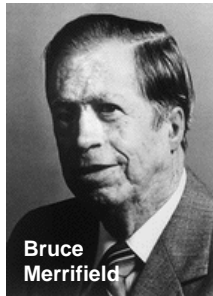


Questi polimeri si presentano come palline; l'amminoacido reagisce come se fosse un semplice estere benzilico; il polimero è insolubile nei solventi organici: il peptide in crescita è l'unica molecola organica legata alla resina. Tutte le impurezze vengono rimosse per lavaggio.

Si usano metodi di accoppiamento che assicurano reazione completa entro un'ora e si aggiunge un eccesso (3-5 equivalenti) dell'amminoacido attivato.

Ancora oggi sono molto usata la combinazione di protezione ed attivazione originale di Merrifield: protezione del gruppo amminico con Boc, attivazione con DCC, protezione di tipo benzilico delle catene laterali. Alla fine della sintesi si usa HBr/AcOH, che rimuove i gruppi protettori benzilici e contemporaneamente stacca il peptide dalla resina.

Durante la sintesi dei peptidi si esegue il seguente ciclo di reazioni:

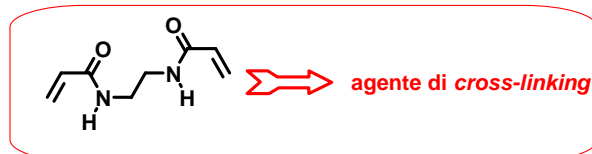
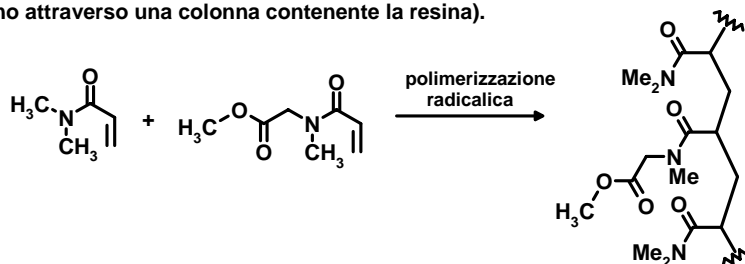


91

Più recentemente sono state sviluppate altre combinazioni di supporto polimerico, di legame del C-terminale, di protezione e deprotezione.

### 1. Supporto polimerico

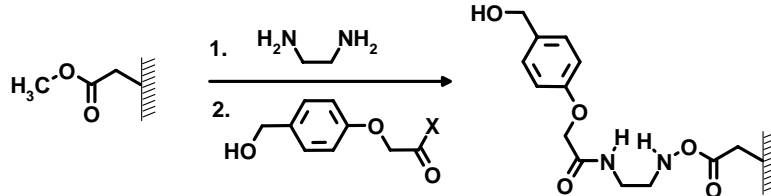
La polimerizzazione radicalica della N,N-dimetilpropenamamide (acrilammide), in presenza di un derivato funzionalizzato e di un agente di "cross-linking" dà un polimero permeabile in solventi come DMF, che può essere supportato su Kieselguhr (argilla inorganica), per avere sintesi peptidica in "flusso continuo" (i reagenti ed il solvente scorrono attraverso una colonna contenente la resina).



92

## 2. Collegamento polimero-peptide

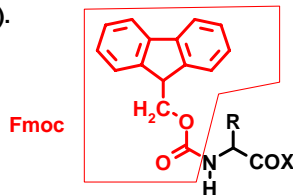
Una modifica in due passaggi del gruppo estere metilico dà un idrossi derivato, a cui si può legare l'amminoacido C-terminale con un semplice legame estereo



Il legame è labile in ambiente acido ed il peptide finale può essere rilasciato con ac. trifluoroacetico.

## 3. Protezione

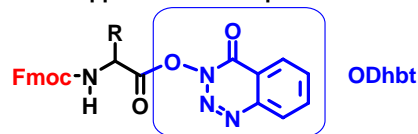
Il gruppo protettore Fmoc si rimuove facilmente in condizioni basiche blande (di solito 20% azaciloesano).



Durante la sintesi il peptide in crescita viene in contatto solo con reagenti blandi ed il trattamento finale con TFA libera dalla resina il peptide completamente de-protetto.

## 4. Attivazione

Gli esteri di Dhbt (3,4-diidro-4-osso-1,2,3-benzotriazol-3-ile, 3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazol-3-yl) si accoppiano abbastanza velocemente con i gruppi amminici liberi (circa 30 min). Durante la reazione di accoppiamento la resina si colora di giallo e quando l'accoppiamento è completo il colore scompare.



Quattro fattori hanno fatto sì che il metodo in fase solida sia quello attualmente più usato nella sintesi dei peptidi

- ➔ Le sintesi sono veloci: in un giorno si possono facilmente accoppiare 5-10 residui (la sintesi convenzionale in soluzione di un ottapeptide può richiedere un mese o più).
- ➔ I passaggi sono semplici e ripetitivi ed è stato possibile ottimizzare le reazioni fino a rese di quasi il 100%.
- ➔ La purificazione mediante HPLC ha permesso di isolare rapidamente peptidi molto puri.
- ➔ Dato che il metodo è così semplice e ripetitivo è stato possibile renderlo completamente automatico. I sintetizzatori automatici di peptidi sono costosi, ma adatti per le ditte farmaceutiche, che li possono far funzionare ventiquattro ore al giorno.

La sintesi dei peptidi in fase solida ha però degli inconvenienti

- ➔ ⊗ Dopo 15-20 residui le impurezze cominciano a diventare significative
- ➔ ⊗ Qualche volta l'accoppiamento può diventare difficile in modo inatteso e non evidenziato dal metodo, probabilmente per il ripiegamento della catena peptidica
- ➔ ⊗ Ci sono dei limiti alla quantità di peptidi che si possono preparare con la sintesi in fase solida. La resina non può essere caricata troppo con il primo residuo, altrimenti diminuisce l'efficienza dell'accoppiamento; 0.5 g di resina (che è la quantità maneggiata nella maggior parte dei laboratori) possono dare solo 75 mg di un pentapeptide (abbastanza per semplici prove biologiche, ma non per l'eventuale applicazione medica)
- ➔ ⊗ La resina, gli amminoacidi protetti, i reagenti ed i solventi per la sintesi in fase solida sono molto costosi.

*La sintesi dei peptidi in fase solida immobilizza il peptide in crescita su un polimero insolubile, permettendo una purificazione facile dopo ciascun accoppiamento. E' un metodo veloce ed affidabile per ottenere piccole quantità (10-100 mg) di peptide per i test biologici. Quantità maggiori di peptide si preparano usando la sintesi convergente in soluzione.*

95