

Síntese de Péptidos Antimicrobianos e Penetradores Celulares

Luísa Aguiar Tavares da Silva

Mestrado em Química

Departamento de Química e Bioquímica

2014

Orientador

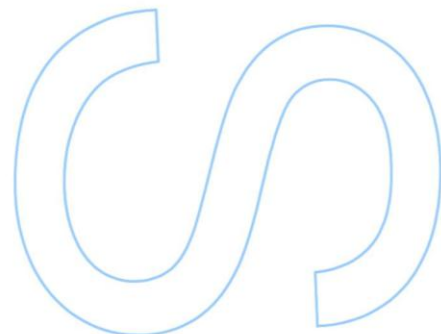
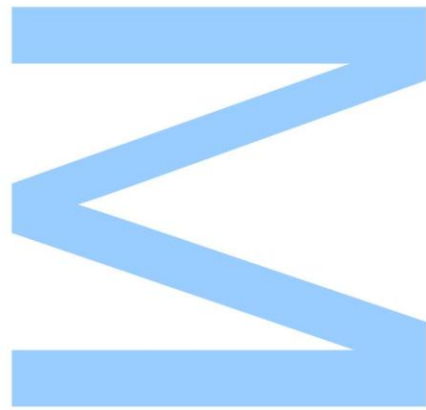
Paula Alexandra de Carvalho Gomes

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Orientador Empresa

Nuno Filipe de Sousa Vale

Centro de Investigação em Química da Universidade do Porto

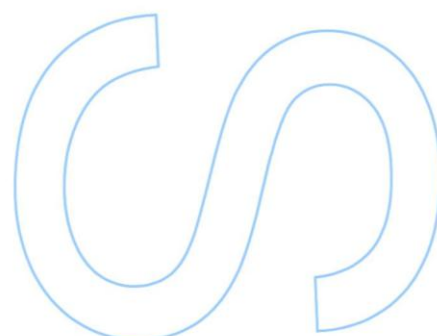
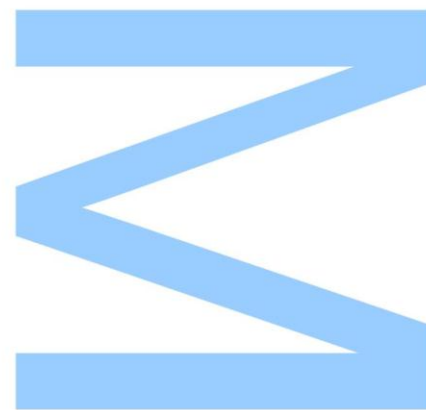




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Prof^a Doutora Paula Gomes, orientadora deste trabalho, por todas as oportunidades de aprendizagem que me proporcionou nos últimos anos e pela paciência e dedicação com que sempre me presenteou. Pelos mesmos motivos agradeço ao Doutor Nuno Vale, que desde sempre se mostrou disponível para me apoiar e ensinar.

Agradeço também às minhas companheiras de laboratório que me proporcionaram um ambiente de trabalho fantástico, cheio de boa disposição.

Aos meus amigos, pela paciência nos momentos menos bons, mas também pelos bons momentos, um grande “obrigada”. Em especial agradeço ao António, pela companhia, pelo carinho e, particularmente, pela força e paciência nos momentos de mais “stress”.

Devo agradecer também ao meu irmão e amigo, que sempre me incentivou a enveredar pela química quando eu não sabia o que escolher – hoje não me imagino a fazer outra coisa.

Estou para sempre agradecida aos meus pais pelo constante apoio, carinho e entusiasmo e também por todas as oportunidades que me proporcionaram.

Resumo

O tratamento e/ou cura de doenças genéticas, cancro ou infeções bacterianas resistentes aos antibióticos convencionais são, hoje em dia, alguns dos maiores desafios na área da medicina. Neste contexto, péptidos e proteínas têm sido alvo de grande interesse e estudo na medicina e desenvolvimento de fármacos, devido a uma grande variedade de possíveis aplicações. Os MAP (*Membrane Active Peptides*) apresentam vantagens relativamente a pequenas moléculas, por apresentarem maior especificidade e afinidade para alvos terapêuticos, mas também em relação a proteínas de maior peso molecular, em termos de viabilidade de síntese, flexibilidade de derivatização, baixa imunogenicidade e parâmetros físico-químicos mais compatíveis com o seu emprego como agentes terapêuticos ^[1]. Os MAP incluem os Péptidos Penetradores Celulares (CPP, *Cell Penetrating Peptides*), capazes de transportar de forma eficiente ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas ou outras moléculas para o interior de células (mantendo a integridade da célula), e os Péptidos Antimicrobianos (AMP, *Anti-Microbial Peptides*), que interagem com bactérias, fungos ou parasitas, inibindo a sua atividade por destabilização das suas membranas celulares.

O trabalho visou a síntese de derivados modificados de MAP com interesse terapêutico, nomeadamente, do péptido hLF(1-11) ^[2], um AMP catiónico com ação antimicrobiana potente e de largo espetro, e do péptido S4₁₃-PV ^[3], capaz de se comportar como um CPP. Para tal, empregaram-se metodologias de síntese peptídica em fase sólida (SPPS, *Solid Phase Peptide Synthesis*) clássica ou assistida por microondas (MW-SPPS). Os péptidos foram sintetizados com sucesso, sendo posteriormente purificados por cromatografia líquida de fase reversa. A análise dos produtos finais foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) e espetrometria de massa com ionização por electro-nebulização e deteção por armadilha de iões (ESI-IT MS, *Electro-Spray Ionization-Ion Trap Mass Spectrometry*), permitindo confirmar a obtenção dos péptidos-alvo com excelentes graus de pureza.

Abstract

The treatment and/or cure of genetic diseases, cancer or bacterial infections are considered a few of the greatest challenges in the field of medicine. In this context, peptides and proteins have been a subject of great interest and study in medicine and drug development, due to a large variety of possible applications. MAP (Membrane Active Peptides) present several advantages over small molecules, since they present higher specificity and affinity towards therapeutic targets, but also over proteins of higher molecular weight, in terms of synthesis viability, derivatization flexibility, low immunogenicity and physico-chemical characteristics compatible with their employment as therapeutic agents ^[1]. MAP include Cell Penetrating Peptides (CPP), capable of efficiently transporting deoxyribonucleic acid (DNA), proteins or other molecules to the interior of the cells (maintaining the integrity of the cell), and Antimicrobial Peptides (AMP), which are able to interact with bacteria, fungus or parasites, inhibiting their activity through destabilization of the cell's membranes.

This work targeted the synthesis of modified derivatives of peptides with therapeutical interest, namely, of hLF(1-11) ^[2], a cationic AMP with potent broad-spectrum activity, and of S4¹³-PV ^[3], capable of acting as a CPP. To this end, classic or microwave-assisted Solid-Phase Peptide Synthesis (SPPS) methodologies were employed. The peptides were successfully synthesized and next purified by reverse-phase liquid chromatography. The analysis of the final products was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Electro-Spray Ionization-Ion Trap Mass Spectrometry (ESI-IT MS), which provided confirmation that the target peptides were effectively obtained with excellent purity degrees.

Índice Geral

Índice de Esquemas	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xiii
Índice de Abreviaturas	xiv
Capítulo 1 – Breve introdução à síntese peptídica	1
1. Preâmbulo	3
2. Síntese Peptídica em Fase Sólida	4
2.1. A ligação peptídica	4
2.2. Metodologias de síntese peptídica em fase sólida	7
2.2.1. Suporte sólido	9
2.2.2. Esquemas de proteção	10
2.2.3. Agentes de acoplamento	14
2.2.3.1. Carbodiimidias	14
2.2.3.2. Sais de urónio	17
2.2.3.3. Sais de fosfónio	19
2.2.3.4. Derivados da “Oxyma Pure”	21
2.2.3.5. <i>N</i> -etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-di-hidroquinolina (EEDQ)	22
2.2.4. Monitorização do alongamento da cadeia peptídica	23
2.2.5. Clivagem de um péptido sintetizado pelo esquema Fmoc/ ^t Bu	25
2.2.6. SPPS assistida por instrumentação automatizada	30
3. Bibliografia	34
Capítulo 2 – Síntese de análogos lipofílicos do péptido penetrador celular S4₁₃-PV para potencial aplicação em terapia génica	39
1. Considerações gerais	41
1.1. Péptidos penetradores celulares	41
1.2. Classificação de péptidos penetradores celulares	42
1.2.1. CPP catiónicos	42
1.2.2. CPP anfipáticos	43
1.2.3. CPP hidrofóbicos	43
1.3. Mecanismos de penetração celular	45

1.3.1. Translocação membranar direta	45
1.3.2. Endocitose	47
1.4. CPP aplicados à terapia génica	48
1.5. O péptido S4 ₁₃ -PV em terapia génica	48
1.6. Modificação de CPP com ácidos gordos	49
2. Objetivo	51
3. Resultados e discussão	52
3.1. Síntese de derivados lipofílicos do CPP S4 ₁₃ -PV	52
3.2. Síntese de derivados do péptido S4 ₁₃ -PV Scrambled	59
4. Procedimento experimental	63
4.1. Montagem experimental	63
4.2. Reagentes e equipamentos utilizados	63
4.3. Preparação da resina	64
4.4. Ciclos de desproteção e acoplamento de aminoácidos	64
4.5. Acilação do aminoácido C-terminal	64
4.6. Clivagem do péptido e desproteção das cadeias laterais	65
5. Bibliografia	66

Capítulo 3 – Síntese de péptidos antimicrobianos funcionalizados para conjugação a biomateriais para terapia local da osteomielite	71
1. Considerações gerais	73
1.1. Péptidos antimicrobianos	73
1.2. Mecanismos de ação dos AMP	74
1.3. Os AMP no tratamento da osteomielite	76
1.4. O péptido hLF(1-11): um potente AMP de largo espectro	77
1.5. Criação de revestimentos antimicrobianos por imobilização covalente do péptido hLF(1-11) ao quitosano	78
2. Objetivo	81
3. Resultados e discussão	84
3.1. Síntese de derivados funcionalizados do péptido hLF(1-11)	84
4. Procedimento experimental	90
4.1. Montagem experimental	90
4.2. Reagentes e equipamentos utilizados	90
4.3. Preparação da resina	90

4.4. Construção das cadeias peptídicas	91
4.4.1. Péptidos Hexinoil-hLF(1-11) e Pra-Ahx-hLF(1-11)	91
4.4.2. Péptido hLF(1-11)-Ahx-Pra	91
4.4.3. Clivagem do péptido e desproteção das cadeias laterais	92
5. Bibliografia	93
Capítulo 4 – Conclusão e perspectivas futuras	97
Anexos	101
A. Tabela de Aminoácidos Proteinogénicos	103
B. Péptido C10-S4 ₁₃ -PV	105
C. Péptido C12-S4 ₁₃ -PV	106
D. Péptido C14-S4 ₁₃ -PV	107
E. Péptido C16-S4 ₁₃ -PV	108
F. Péptido C18-S4 ₁₃ -PV	109
G. Péptido C18-S4 ₁₃ -PV Scr	110
H. Péptido Hexinoil-hLF(1-11)	111
I. Péptido hLF(1-11)-Ahx-Pra	112

Índice de Esquemas

Esquema 1.1 - Formação de um sal estável entre uma amina e um ácido carboxílico e sua conversão térmica numa amida.....	5
Esquema 1.2 – Formação de uma ligação amida por ataque nucleófilo de uma amina a um intermediário reativo derivado de um ácido carboxílico.	5
Esquema 1.3 – Racemização de um <i>N</i> ^α -acil-aminoácido ativado, através da formação de uma oxazolona intermediária (1).	6
Esquema 1.4 – Esquema geral de SPPS. O péptido final pode ser obtido sob a forma de carboxamida (Y=N) ou ácido carboxílico (Y=O).	8
Esquema 1.5 – Mecanismo de remoção do grupo Fmoc com piperidina.	14
Esquema 1.6 – Ativação de um grupo carboxílico por uma carbodiimida e subsequente reação da <i>O</i> -acilisourea (9) formada (i) por via intramolecular para formar uma <i>N</i> -acilureia estável (10), ou (ii) com uma amina nucleofílica para formar o produto de condensação desejado.	15
Esquema 1.7 – Ataque nucleófilo do HOBT a uma <i>O</i> -acilisourea e subsequente aminólise do éster de benzotriazolilo formado.	16
Esquema 1.8 – Representação do ‘neighbouring group effect’, por estabelecimento de ligações de hidrogénio entre o azoto da posição 7 do HOAt e a amina nucleofílica.	17
Esquema 1.9 – Mecanismo de ativação do componente carboxilo com um sal de urónio.	18
Esquema 1.10 – <i>N</i> -guanidilação do componente amino por reação deste com o sal de urónio.	19
Esquema 1.11 - Mecanismo de ativação do componente carboxilo com um sal de fosfónio.	20
Esquema 1.12 – Mecanismo de condensação peptídica mediada pela EEDQ.	23
Esquema 1.13 – Reação da ninidrina com o grupo α-NH ₂ de um aminoácido	24
Esquema 1.14 – Clivagem da ligação péptido-resina (ilustra-se o caso mais geral, ou seja, obtenção de um péptido carboxamida em <i>C</i> -terminal, sintetizado sobre uma resina do tipo metilbenzidrilamina – MBHA – modificada com um espaçador bifuncional do tipo Rink ^[51]).	25
Esquema 1.15 – Mecanismo de acidólise dos grupos protetores mais comuns: (A) Boc, (B) Trt e (C) ^t Bu ^[51]	27

Esquema 1.16 – Mecanismo de acidólise do grupo Pbf, protetor do grupo guanidínio presente na arginina ^[51]	28
Esquema 1.17 - Possíveis resultados da clivagem do grupo Pbf com TFA: Rota A conduz ao péptido desejado, enquanto que a rota B dá origem a uma arginina sulfonada. Adaptado de [52].	29
Esquema 3.1 – Ligação do péptido hLF(1-11) ao quitosano através de uma ponte dissulfureto, de acordo com o estudo realizado por F. Costa <i>et al.</i> ^[22]	80
Esquema 3.2 – Esquema geral de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen.	81
Esquema 3.3 – Rota sintética delineada para a imobilização do péptido hex-5-inoil-hLF(1-11) no quitosano: (i) conversão dos grupos amino primários do quitosano em grupos azida, por reação com cloreto de 1-azido-sulfonilimidazólio, CuSO ₄ e K ₂ CO ₃ ^[48] ; (ii) reação “click” entre o quitosano modificado e o péptido, na presença de acetato de cobre e ascorbato de sódio ^[43]	83
Esquema 3.4 – Interação eletrostática que se estabelece entre a arginina e o anião trifluoracetato.	87

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Representação estrutural de resinas (A) do tipo PS e (B) do tipo PS-PEG. Adaptado de [18].	10
Figura 1.2 – Grupos protetores associados ao esquema de proteção Boc/Bzl. ...	12
Figura 1.3 – Alguns grupos protetores, temporários ou permanentes, usados no esquema de proteção Fmoc/ ^t Bu.	13
Figura 1.4 – Estrutura dos nucleófilos auxiliares HOBt (11) e HOAt (12).	17
Figura 1.5 – Estrutura dos agentes de acoplamento PyBOP e PyAOP.	20
Figura 1.6 – Estrutura da “Oxyma Pure”	21
Figura 1.7 - Estrutura dos agentes de condensação PyOxP e PyOxB.	22
Figura 1.8 – Representação esquemática do efeito do aquecimento/radiação microondas no enrolamento da cadeia peptídica.	31
Figura 1.9 - Sintetizador automático CEM Liberty1™.	31
Figura 1.10 – Estrutura do agente de condensação HCTU.	32
Figura 2.1 – Representação esquemática dos mecanismos propostos para a internalização de um CPP via translocação membranar direta: (A) modelo das micelas invertidas; (B) formação de poros membranares, e (C) modelo “em carpete”. Adaptado de [8].	46
Figura 2.2 – Internalização de um CPP por via endocitótica. Adaptado de [27]....	47
Figura 2.3 – Sequência de aminoácidos do péptido quimérico S4 ₁₃ -PV, constituído pelo péptido S4 ₁₃ , representado a azul, e pelo NLS SV-40, representado a cinzento.	49
Figura 2.4 – Derivados lipofílicos do péptido S4 ₁₃ -PV sintetizados no âmbito do trabalho.	51
Figura 2.5 – Péptidos <i>N</i> -acetil-S4 ₁₃ -PV (A) e <i>N</i> -lauroil-S4 ₁₃ -PV (B).	51
Figura 2.6 – Estrutura da resina Fmoc-Rink Amide MBHA (o círculo com a letra P representa o polímer PS-DVB).	52
Figura 2.7 – Cromatograma obtido para o péptido-base Fmoc-S4 ₁₃ -PV, com uma eluição de 0-100% ACN em água (com 0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 μm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ=220 nm.	54
Figura 2.8 – Espetro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido Fmoc-S4 ₁₃ -PV, correspondente ao pico de maior intensidade do cromatograma anterior (Figura 2.7).	54

Figura 2.9 - Cromatograma obtido para o péptido C8-S4 ₁₃ -PV, com uma eluição de 0-100% ACN em água (com 0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ=220 nm.	54
Figura 2.10 – Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C8-S4 ₁₃ -PV bruto.	56
Figura 2.11 – Cromatograma obtido pela análise do péptido C8-S4 ₁₃ -PV purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ=220 nm.	58
Figura 2.12 – Cromatograma obtido para o péptido Ac-S4 ₁₃ -PV Scr, com uma eluição de 0-100% ACN em água (com 0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ=220 nm.	60
Figura 2.13 – Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido Ac-S4 ₁₃ -PV Scr.	60
Figura 2.14 –Cromatograma obtido para o péptido Ac-S4 ₁₃ -PV Scr purificado, com uma eluição de 0-100% ACN em água (com 0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ=220 nm.	62
Figura 2.15 – Montagem experimental aplicável à síntese peptídica manual	63
Figura 3.1 – Modelos propostos para explicar o mecanismo de ação dos AMP: (A) modelo de interação do tipo aduela, (B) modelo de interação do tipo carpete, e (C) modelo de interação do tipo poro toroidal. Adaptado de [9].	75
Figura 3.2 - Sequência de aminoácidos do péptido anfipático hLF(1-11), constituído por uma parte catiónica (representada a azul) e uma parte hidrofóbica (representada a cinzento).	77
Figura 3.3 – Representação estrutural do quitosano, com uma das unidades acetilada.	78
Figura 3.4 – Péptidos sintetizados ao longo do trabalho experimental: (A) Propargil-hLF(1-11), (B) Hexinoil-hLF(1-11), (C) Pra-Ahx-hLF(1-11) e (D) hLF(1-11)-Ahx-Pra.	82
Figura 3.5 - Cromatograma obtido pela análise do péptido Pra-Ahx-hLF(1-11), com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ=220 nm.	86

Figura 3.6 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido Pra-Ahx-hLF(1-11), correspondente ao pico de maior intensidade do cromatograma anterior (Figura 3.5).	86
Figura 3.7 – Cromatograma obtido pela análise do péptido Pra-Ahx-hLF(1-11) purificado, com uma eluição em gradiente de 10-30% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 μ m), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.	87
Figura B1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido C10-S4 ₁₃ -PV purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 μ m), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.	105
Figura B2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C10-S4 ₁₃ -PV bruto.	105
Figura C1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido C12-S4 ₁₃ -PV purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 μ m), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.	106
Figura C2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C12-S4 ₁₃ -PV bruto.	106
Figura D1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido C14-S4 ₁₃ -PV purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 μ m), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.	107
Figura D2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C14-S4 ₁₃ -PV bruto.	107
Figura E1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido C16-S4 ₁₃ -PV purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 μ m), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.	108
Figura E2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C16-S4 ₁₃ -PV bruto.	108
Figura F1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido C18-S4 ₁₃ -PV purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 μ m), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.	109

Figura F2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C18-S4 ₁₃ -PV bruto.	109
Figura G1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido C12-S4 ₁₃ -PV Scr purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ=220 nm.	110
Figura G2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C12-S4 ₁₃ -PV Scr bruto.	110
Figura H1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido Hexinoil-hLF(1-11) purificado, com uma eluição em gradiente de 10-30% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ=220 nm.	111
Figura H2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido Hexinoil-hLF(1-11) bruto.....	111
Figura I1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido hLF(1-11)-Ahx-Pra purificado, com uma eluição em gradiente de 10-30% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ=220 nm.	112
Figura I2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido hLF(1-11)-Ahx-Pra bruto.	112

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Origem e sequência de aminoácidos dos dois primeiros CPP descritos na literatura: <i>Penetratin</i> e TAT.	41
Tabela 2.2 – Sequências de alguns CPP descritos na literatura e respetiva categoria, de acordo com a classificação referida na secção 1.2.	44
Tabela 2.3 – Derivados lipofílicos do péptido S4 ₁₃ -PV sintetizados.	53
Tabela 2.4 – Adutos formados entre o péptido-base Fmoc-S4 ₁₃ -PV e iões H ⁺	55
Tabela 2.5 – Adutos formados entre o péptido C8-S4 ₁₃ -PV e iões H ⁺	57
Tabela 2.6 – Resumo dos resultados experimentais da síntese dos derivados lipofílicos do péptido S4 ₁₃ -PV.	58
Tabela 2.7 – Peso molecular dos derivados do péptido S4 ₁₃ -PV Scr	59
Tabela 2.8 - Adutos formados entre o péptido Ac-S4 ₁₃ -PV Scr e iões H ⁺	61
Tabela 2.9 – Resumo dos resultados experimentais da síntese dos derivados lipofílicos do péptido S4 ₁₃ -PV.	62
Tabela 3.1 – Derivados funcionalizados do péptido hLF(1-11) sintetizados	85
Tabela 3.2 – Adutos formados entre o péptido Pra-Ahx-hLF(1-11) e iões H ⁺	87
Tabela 3.3 – Resumo dos resultados experimentais da síntese dos derivados funcionalizados do péptido hLF(1-11).	89
Tabela A1 – Estrutura dos aminoácidos proteínogénicos	103

Índice de Abreviaturas

¹H-RMN Ressonância magnética nuclear de próton

AA Aminoácido

ACN Acetonitrilo

ADN Ácido desoxirribonucleico

Ahx Ácido 6-amino-hexanóico

Ala Alanina

AMP Péptidos Antimicrobianos

Arg Arginina

Asn Asparagina

Asp Ácido Aspártico

Boc *tert*-Butoxicarbonilo

BOP Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfónio

BtO⁻ 1-*N*-óxido de benzotriazolilo

Bzl Benzil

CPP Péptido Penetrador Celular

C_t Carbono terminal

Cys Cisteína

DCM Diclorometano

DIEA *N*-etil-*N,N*-diisopropilamina

DMF *N,N*-Dimetilformamida

EEDQ *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-di-hidroquinolina

ESI-IT MS espetrometria de massa com ionização por eletro-nebulização e deteção por armadilha de iões

Fmoc 9-Fluorenilmetoxicarbonilo

Fmoc-Rink Ácido *p*-[(*R,S*)- α -[1-(9H-fluoren-9-il)-metoxiformamido]-2,4-dimetoxiben-zil]fenoxiacético

Gln Glutamina

Glu Ácido Glutâmico

Gly Glicina

HATU Hexafluorofosfato de O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio

HBTU Hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio

HCTU Hexafluorofosfato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio

HF Ácido Fluorídrico

His Histidina

hLF Lactoferrina humana

HMPA Hexametilfosforamida

HOAt 7-aza-1-hidroxibenzotriazole

HOBt 1-hidroxibenzotriazole

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

Ile Isoleucina

Leu Leucina

Lys Lisina

MBHA metilbenzidrilamina

Met Metionina

MRSA Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus

MW-SPPS Microwave assisted solid-phase peptide synthesis

Nle Norleucina

NLS Sinal de localização nuclear

NMP *N*-metilpirrolidona

N_t Amina terminal

Oxyma Pure 2-ciano-2-hidroximinoacetato de etilo

Pbf 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-di-hidrobenzofuran-5-sulfonilo

PEG Polietilenoglicol

Phe Fenilalanina

Pra Propargil-glicina

Pro Prolina

PS Poliestireno

PyAOP Hexafluorofosfato de (7-aza-benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidino-fosfónio

PyBOP Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidino-fosfónio

PyOxB Tetrafluoroborato de O-[(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilideno)amino]oxitripirrolidino-fosfónio

PyOxP Hexafluorofosfato de O-[(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilideno)amino]oxitripirrolidino-fosfónio

RP-MPLC Cromatografia líquida de fase reversa a média pressão

Ser Serina

SiRNA Ácido ribonucleico interferente pequeno

S_N1 Substituição nuclófica de unimolecular

S_NAr Substituição nucleofílica aromática

SPPS Síntese Peptídica em Fase Sólida

TATU Tetrafluoroborato de O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurónio

TBTU Tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurónio

^tBu *terc*-Butilo

TFA Ácido Trifluoroacético

Thr Treonina

TIS Triisopropilsilano

t_r tempo de retenção

Trp Triptofano

Trt Tritilo

Tyr Tirosina

Val Valina

Capítulo 1

Breve introdução à síntese peptídica

1. Preâmbulo

Péptidos e proteínas assumem um papel fundamental em diversos processos biológicos e fisiológicos de organismos vivos, nomeadamente na comunicação intracelular e intercelular (como hormonas ou neurotransmissores), no sistema imunitário (péptidos antimicrobianos endógenos, anticorpos), ou ainda no transporte de diversas substâncias através de membranas biológicas (proteínas transmembranares, vulgarmente designadas por “canais”) [1].

Devido ao largo espetro de funções exercidas por aquelas biomoléculas, começaram a surgir diversos tratamentos baseados em péptidos bioativos, derivados de hormonas peptídicas naturais ou de fragmentos de proteínas, por exemplo. Neste contexto, os péptidos apresentam vantagens relativamente a outras pequenas moléculas, por possuírem geralmente maior especificidade e afinidade para alvos terapêuticos, mas também relativamente a proteínas de elevado peso molecular, em termos de viabilidade de síntese, flexibilidade de derivatização, baixa imunogenicidade e parâmetros físico-químicos mais compatíveis com o seu emprego como agentes terapêuticos [2].

Considerando a importância biológica dos péptidos, tornou-se importante facilitar a sua obtenção na quantidade necessária e com o grau de pureza exigido para a aplicação desejada. Atualmente, sequências peptídicas podem ser obtidas de três formas:

- Isolamento de péptidos de uma matriz biológica - como, por exemplo, células, tecidos ou mesmo organismos;
- Manipulação genética - técnicas de ADN recombinante para a expressão de péptidos e proteínas em microorganismos;
- Síntese química.

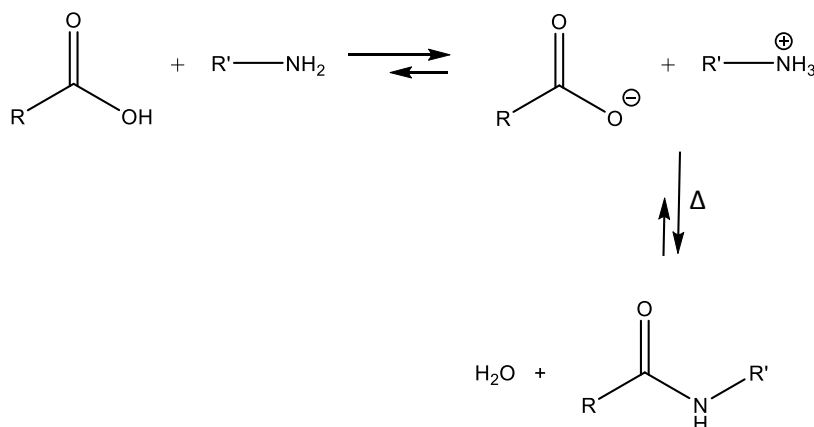
Ainda que a cada um destes métodos estejam associadas vantagens e desvantagens, o último é o único que permite a incorporação de aminoácidos não naturais ou de outras modificações com vista à melhoria do índice terapêutico do péptido. Adicionalmente, a síntese química proporciona, geralmente, a produção de péptidos em maior escala e com maior grau de pureza final.

2. Síntese Peptídica em Fase Sólida

2.1. A Ligação Peptídica

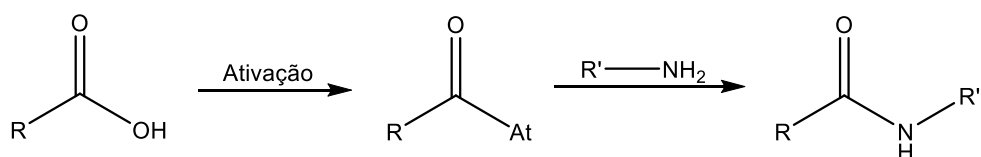
À ligação amida resultante da condensação de dois aminoácidos dá-se o nome de ligação peptídica. Esta ligação desempenha um papel fundamental em sistemas biológicos, caracterizando-se por ser extremamente estável, polar e capaz de estabelecer ligações de hidrogénio com outros átomos, atuando quer como grupo dador, quer como grupo aceitador dessas ligações^[3]. Assim, a síntese peptídica tem por base a junção sequencial de α -aminoácidos através de uma ligação amida, formada através de uma reação de adição nucleófila-eliminação (condensação) entre o grupo α -amino de um α -aminoácido (AA1) e o grupo carboxilo de outro (AA2). Por convenção, a ordem sequencial dos aminoácidos de um péptido é apresentada no sentido $N_t \rightarrow C_t$, ou seja, com o aminoácido *N*-terminal (N_t , com o grupo α -amino livre) à esquerda, e com o aminoácido *C*-terminal (C_t , com o grupo carboxilo livre), à direita. A reação de condensação deve ser regiosseletiva, sendo absolutamente necessária a supressão de reatividade de outros grupos funcionais que não aqueles que se pretende fazer reagir, ou seja, será preciso desativar de alguma forma o grupo carboxilo do AA1, o grupo α -amino do AA2 e grupos funcionais reativos eventualmente presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos.

A reação de condensação entre um grupo amino e um grupo carboxilo, apesar de termodinamicamente viável, não é cineticamente favorecida. Assim, à temperatura ambiente ou inferior, sem uma ativação apropriada do grupo carboxilo, a junção daqueles grupos funcionais dará lugar a uma reação ácido-base, com a formação de um sal estável (Esquema 1.1). A formação da amida a partir deste sal requer temperaturas muito elevadas (160-180 °C), geralmente incompatíveis com a síntese peptídica^[4]. Alternativamente, e de forma a evitar-se o recurso a temperaturas tão altas, dever-se-á ativar o grupo carboxilo, ou seja, convertê-lo num seu derivado mais reativo, que reaja prontamente com a amina nucleofílica através do mecanismo de adição-eliminação conducente à amida desejada (Esquema 1.2).



Esquema 1.1 – Formação de um sal estável entre uma amina e um ácido carboxílico e sua conversão térmica numa amida.

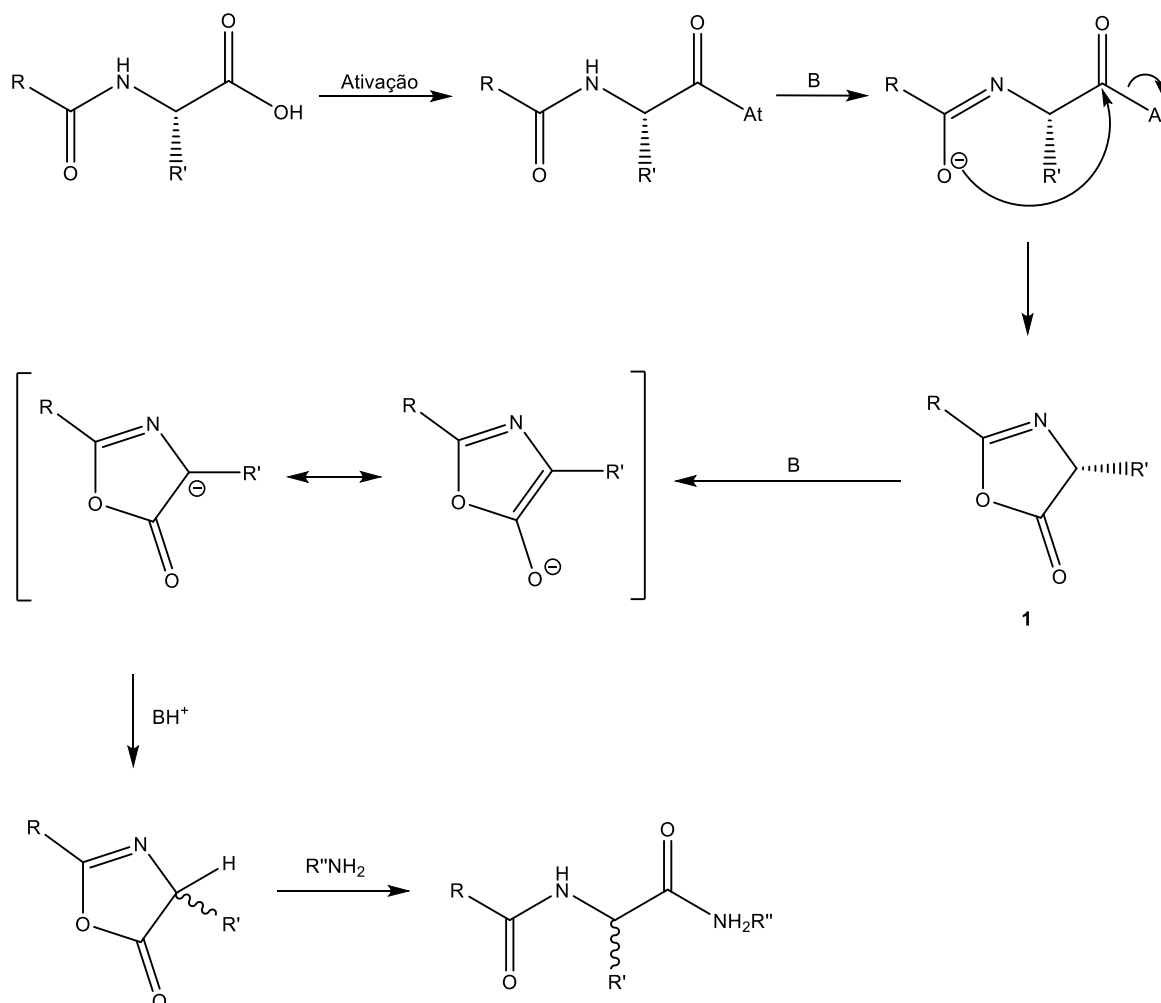
Assim, a promoção de uma condensação peptídica em condições suaves requer dois passos: (a) a ativação do grupo carboxílico de um dos reagentes, geralmente promovida por adição dos denominados agentes de condensação, ativação ou acoplamento, que promove a inserção de um bom grupo de saída (At), e (b) o ataque nucleófilo do grupo amino do outro reagente ao derivado carboxílico ativado (Esquema 1.2).



Esquema 1.2 – Formação de uma ligação amida por ataque nucleófilo de uma amina a um intermediário reativo derivado de um ácido carboxílico.

Na formação de uma ligação amida (peptídica) entre dois aminoácidos, será também preciso salvaguardar que o processo de ativação não ponha em causa a configuração do(s) carbono(s) quiral(is) do aminoácido ativado, conduzindo à sua racemização. Na realidade, este é um problema significativo quando se faz crescer uma cadeia peptídica no sentido $N_t \rightarrow C_t$, ou seja, no sentido idêntico ao observado na biossíntese ribossômica de péptidos e proteínas: a ativação do grupo carboxilo de um aminoácido N^R -acilado é geralmente acompanhada de racemização do C^α desse

aminoácido, através de ciclização intramolecular *via* uma oxazolona (**1**, Esquema 1.3) [5-9].



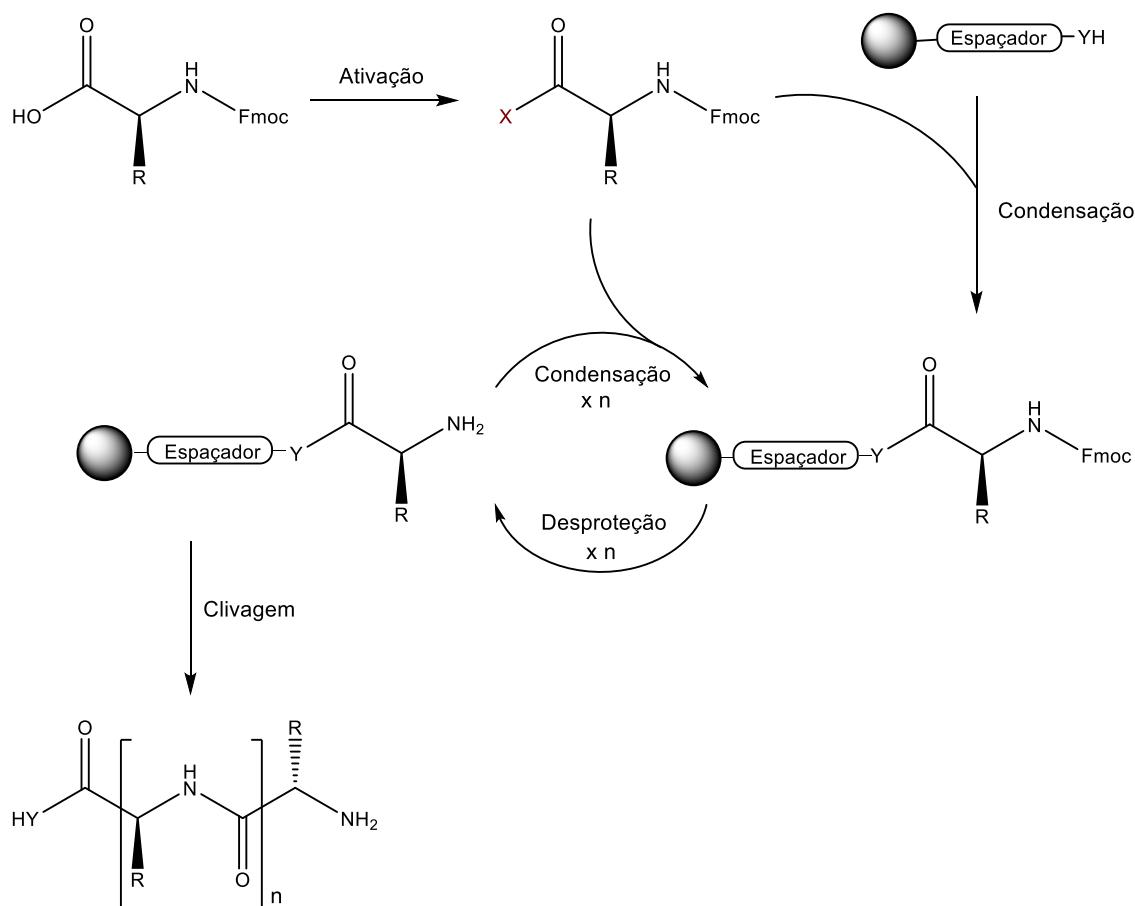
Esquema 1.3 – Racemização de um N^{α} -acil-aminoácido ativado, através da formação de uma oxazolona intermediária (**1**).

Assim, a síntese química de péptidos é normalmente realizada no sentido $C_T \rightarrow N_T$ para minimizar o problema da racemização, já que a ativação de α -aminoácidos convenientemente N^{α} -protegidos permite contornar a formação de oxazolonas [10]. Adicionalmente, o recurso à síntese peptídica em fase sólida (SPPS, c.f. 2.2) permite que as reações de condensação se realizem em períodos de tempo substancialmente mais curtos do que em síntese peptídica em solução, minimizando assim a probabilidade de ocorrência de fenómenos conducentes à perda de configuração [10]. Existem, no entanto, aminoácidos mais propensos a perder pureza ótica no decurso da sua incorporação numa cadeia peptídica crescente, mesmo quando a síntese é realizada em fase sólida, como são os casos da cisteína [11] e da histidina [12].

2.2. Metodologias de Síntese Peptídica em Fase Sólida

Para além do problema da epimerização já referido, a condensação peptídica, em condições suaves, está também normalmente associada um baixo rendimento. Assim, um dos grandes desafios do desenvolvimento de metodologias de síntese peptídica tem vindo a prender-se com a otimização de procedimentos de ativação e condensação, e de proteção de grupos funcionais, que permitam não só a prevenção de reações laterais indesejadas, mas também melhores rendimentos de síntese. Após a intervenção pioneira de Emil Fischer na síntese química de péptidos, no início do século XX, a ciência da síntese de péptidos foi progredindo lenta, mas continuamente, surgindo em 1963 a que foi considerada a maior revolução de sempre na síntese química de péptidos: a invenção da síntese peptídica em fase sólida (SPPS), por Robert Bruce Merrifield, galardoado com o Prémio Nobel da Química em 1984 ^[13].

A estratégia de SPPS inicia-se com a ligação de um aminoácido N^α -protegido a um polímero insolúvel (resina), através do seu grupo carboxílico, garantindo-se que esta ligação seja capaz de resistir a todas as reações empregues durante o alongamento da cadeia peptídica, no sentido $C_t \rightarrow N_t$. Deste modo, a resina serve não só de suporte insolúvel sobre o qual a cadeia peptídica vai sendo construída, como também atua como grupo protetor do grupo carboxilo do aminoácido C-terminal. O passo seguinte consiste na desproteção do grupo α -amino do aminoácido incorporado, de forma a torná-lo disponível para se ligar ao aminoácido seguinte, por condensação peptídica. O alongamento da cadeia peptídica dá-se através de ciclos repetitivos de incorporação de aminoácidos protegidos e consequente remoção do grupo α -amino protetor (designado grupo protetor temporário). Todos os acoplamentos e desproteções são realizados usando excesso dos reagentes solúveis, para forçar a ocorrência de reações quantitativas, e seguidos pela lavagem da peptidil-resina com solventes apropriados, como o diclorometano (DCM) e a N,N -dimetilformamida (DMF), para remover reagentes excedentários e produtos laterais. Assim, no vaso reacional resta apenas o péptido ancorado à resina. Terminado o alongamento da sequência peptídica, dá-se o processo de clivagem (rotura da ligação entre a cadeia peptídica e a resina), normalmente por acidólise, com remoção simultânea dos grupos protetores das cadeias laterais (designados grupos protetores permanentes) (Esquema 1.4).



Esquema 1.4 – Esquema geral de SPPS. O péptido final pode ser obtido sob a forma de carboxamida (Y=NH) ou ácido carboxílico (Y=O).

A grande vantagem da SPPS, em relação à síntese peptídica em solução, prende-se com a maior simplicidade, rapidez e eficácia do procedimento sintético. Na síntese em solução, cada intermediário sintético tem de ser isolado e purificado após cada passo reacional, o que torna o processo muito dispendioso e demorado. Para além disso, não é conveniente usar largos excessos de reagentes para forçar a reação a ser quantitativa, pois tal dificultaria significativamente as purificações subsequentes. Seguindo uma estratégia de SPPS, geralmente poupa-se substancialmente no tempo, pois não há isolamento nem purificação de intermediários sintéticos, e aumenta-se consideravelmente o rendimento global de síntese, pois todo o processo é sempre realizado no mesmo vaso reacional, e podem usar-se excessos de reagentes que são posteriormente removidos por lavagem e filtração da peptidil-resina contida no vaso reacional, que está normalmente ligado a um sistema de filtração por vácuo.

2.2.1. Suporte Sólido

A natureza do polímero sólido de suporte (resina) utilizado na SPPS é um dos fatores determinantes para a obtenção da sequência peptídica desejada e com bons rendimentos. Para além de insolúvel e estável à agitação, a resina deve ser inerte às condições químicas aplicadas durante o alongamento da cadeia peptídica, permitir uma rápida difusão dos reagentes para que estes possam aceder prontamente aos centros reativos, e ser adequadamente funcionalizada de modo a que a ancoragem do primeiro aminoácido seja eficiente, se mantenha estável enquanto pretendido, e seja clivável de forma suave quando desejado ^[14].

Os suportes sólidos mais utilizados estão normalmente incluídos numa de duas categorias ^[15]:

- Resina de Poliestireno (PS): utilizada primeiramente por Merrifield, esta resina constitui um co-polímero clorometilado de estireno (~99%) e divinilbenzeno (~1%), apresentando um carácter altamente hidrofóbico. Na presença de solventes apropriados, este polímero permite a difusão eficiente dos reagentes. No entanto, para esta resina, a cinética de reação diminui, especialmente quanto mais longa for a cadeia peptídica. (Figura 1.1 A) ^[16-17].
- Resina de PS-Polietilenoglicol (PS-PEG): sendo predominantemente composta por espaçadores PEG (até 70%), com um carácter hidrofílico, estes tipos de resina promovem reações mais rápidas e eficientes em solventes mais polares, uma vez que permitem uma maior acessibilidade aos locais reativos (Figura 1.1 B) do que as resinas mais hidrofóbicas, neste tipo de solventes ^[18].

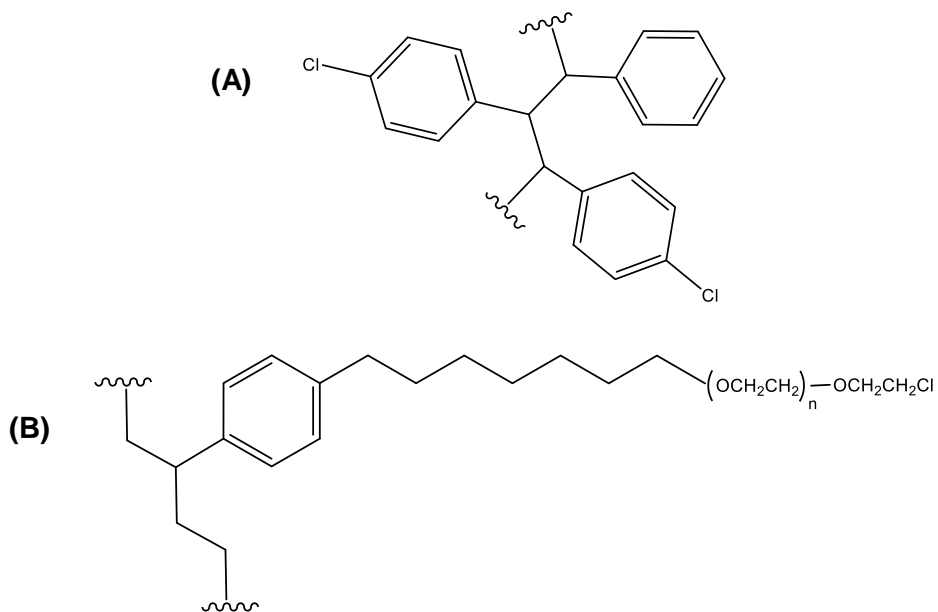


Figura 1.1 – Representação estrutural de resinas (A) do tipo PS e (B) do tipo PS-PEG.
Adaptado de [18].

Em qualquer dos casos, a funcionalização do suporte sólido utilizado é um fator determinante e deverá rondar os 0,5 mmol/g, já que uma funcionalização mais elevada poderá favorecer interações não covalentes (hidrofóbicas, por ligações de hidrogénio, etc.) entre cadeias peptídicas, conduzindo possivelmente à inacessibilidade dos locais reativos da cadeia. Funcionalizações mais baixas conduzem a um baixo rendimento de síntese, estando o seu uso reservado apenas para os casos em que um efeito de “pseudo-diluição” na fase sólida seja recomendado como, por exemplo, na síntese em fase sólida de péptidos muito longos ou cíclicos ^[19].

As resinas são posteriormente funcionalizadas com um espaçador bifuncional ao qual se liga o aminoácido C-terminal da sequência peptídica. A escolha da resina e do espaçador bifuncional a aplicar em SPPS depende do tipo de modificação C-terminal que se pretenda no péptido-alvo, das condições de clivagem que se queira aplicar, e do tipo de grupos protetores temporários e permanentes que se irá utilizar.

2.2.2. Esquemas de Proteção

Considerando a diversidade de grupos funcionais presentes nos diferentes aminoácidos, torna-se necessária a combinação apropriada de grupos protetores, ou seja, é fulcral a utilização de esquemas de proteção adequados. Estes destinam-se a prevenir a ocorrência de condensação (oligomerização) entre as moléculas do

aminoácido que esteja a ser incorporado (grupos N^{α} -protetores temporários) ou entre grupos funcionais presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos, seja entre si, seja com cada aminoácido ativado que irá sendo incorporado na sequência peptídica (grupos protetores permanentes), garantindo uma síntese bem sucedida.

Os esquemas de proteção podem classificar-se em seletivos ou ortogonais. A ortogonalidade de um esquema de proteção caracteriza-se pela combinação de grupos protetores que diferem uns dos outros, essencialmente, pelo mecanismo de remoção, sendo possível a remoção de um tipo de grupo protetor sem que sejam afetados os restantes. Por outro lado, os esquemas de proteção seletivos combinam grupos protetores que apresentam o mesmo mecanismo de remoção, mas diferentes labilidades relativamente a um mesmo tipo de agente de remoção, sendo que, neste caso, a remoção de grupos protetores permanentes requer condições mais drásticas que a dos grupos protetores temporários ^[20-21].

Em SPPS, são fundamentalmente usados dois esquemas de proteção, vulgarmente designados como Boc/Bzl e Fmoc/^tBu, designações estas que se devem aos grupos usados como protetores temporários e permanentes em cada caso. Assim, no esquema Boc/Bzl, o grupo N^{α} -protetor temporário é o *tert*-butoxicarbonilo (Boc, **2**), lábil a ácidos como o ácido trifluoroacético (TFA) a concentrações superiores a 30%; tal exige que o grupo Boc seja combinado com grupos protetores permanentes (cadeias laterais) que, como o grupo benzilo (Bzl, **3**), entre outros, sejam resistentes ao TFA ^[22]. No esquema Fmoc/^tBu, o grupo protetor temporário é o 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc, **4**), estável a ácidos, mas lábil a bases, em especial a aminas secundárias, o que permite usar grupos protetores permanentes que, tal como o *tert*-butilo (^tBu, **5**) e outros, são lábeis a ácidos como o TFA ^[23].

Pelo atrás referido, se infere que o esquema Boc/Bzl corresponde a uma estratégia de proteção seletiva, tendo sido a utilizada por Merrifield quando este descreveu pela primeira vez a SPPS ^[22]. Ainda que apresentando algumas vantagens, como envolver o uso de aminoácidos protegidos geralmente mais baratos que os empregues no esquema Fmoc/^tBu, ou desfavorecer processos de agregação peptídica que muitas vezes estão na origem do insucesso da síntese de péptidos longos, o esquema Boc/Bzl tem a grande desvantagem de requerer tratamentos repetitivos da peptidil-resina com TFA e condições drásticas de clivagem, geralmente, por acidólise com HF anidro. Por um lado, as repetidas remoções do grupo Boc com TFA acabam por promover (a) perda parcial do péptido crescente, por clivagem da sua ligação à resina, e (b) desproteção de uma pequena parte das cadeias laterais da cadeia

peptídica em construção, em consequência de se tratar de um esquema de proteção seletivo, e não ortogonal. Por outro lado, a acidólise com HF anidro é uma operação delicada, que exige um operador experimentado e uma montagem específica que impeça qualquer fuga de HF e que seja totalmente construída em Teflon® e colocada em laboratório dedicado a reações especiais. Ao esquema Boc/Bzl estão ainda associadas reações laterais que contribuem para a diminuição do rendimento da síntese e da qualidade do produto final ^[21].

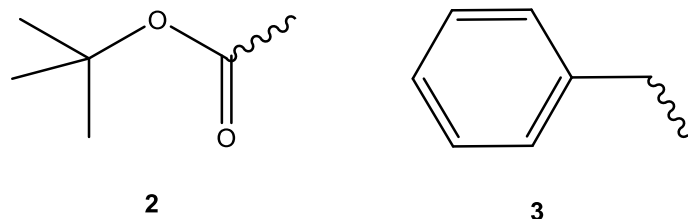


Figura 1.2 – Grupos protetores associados ao esquema de proteção Boc/Bzl.

Num esforço de contornar as dificuldades associadas ao uso do esquema Boc/Bzl, Carpino e Han desenvolveram em 1970 o grupo Fmoc ^[23], ao que de imediato se seguiu a proposta do esquema de proteção ortogonal Fmoc/^tBu para SPPS ^[24-25]. Neste esquema, o grupo Fmoc é normalmente removido com soluções de piperidina a 20% em DMF (Esquema 1.5), podendo recorrer-se a outras bases, se necessário; estas condições suaves de tratamento repetitivo da peptidil-resina não só não causam, geralmente, desproteção ou clivagem prematura, como também são totalmente compatíveis com grupos que, como o ^tBu, são estáveis a bases e lábeis a ácidos. Alguns outros grupos protetores permanentes usados em SPPS pelo esquema Fmoc/^tBu são o tritilo (Trt, **6**), o Boc (**2**) ou o 2,2,4,6,7-pentametyldi-hidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf, **7**). Assim, a clivagem (e concomitante desproteção total) de um péptido construído pelo esquema de proteção Fmoc/^tBu é geralmente realizada por acidólise com TFA (c.f. secção 2.1.5)

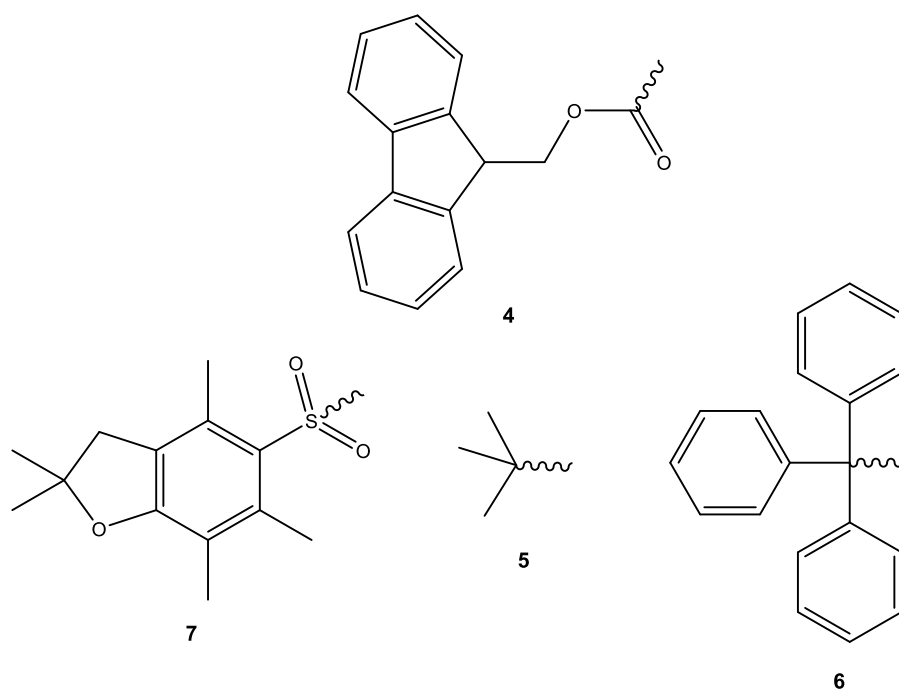
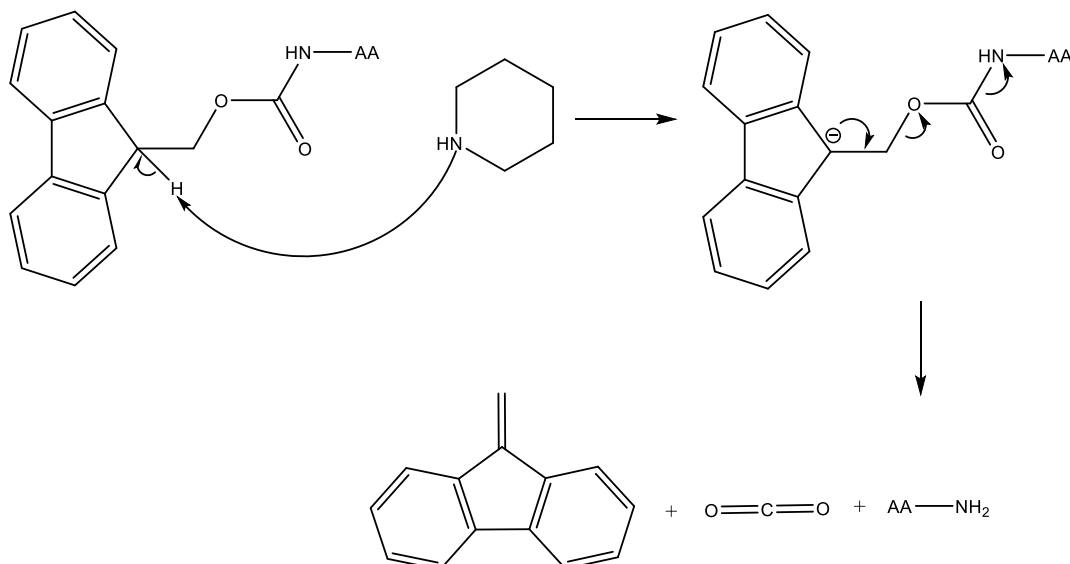


Figura 1.3 – Alguns grupos protetores, temporários ou permanentes, usados no esquema de proteção Fmoc/^tBu.

A menor agressividade química da SPPS segundo um esquema Fmoc/^tBu, em comparação com um esquema Boc/Bzl, faz com que aquele seja compatível com uma variedade substancialmente maior de grupos protetores e modificações químicas, bem como com diversos sistemas automatizados de síntese peptídica (c.f., secção 2.1.6). Por essa razão, e também pela sua menor perigosidade e ortogonalidade, o esquema Fmoc/^tBu rapidamente se tornou o esquema de proteção de eleição em SPPS.



Esquema 1.5 – Mecanismo de remoção do grupo Fmoc com piperidina.

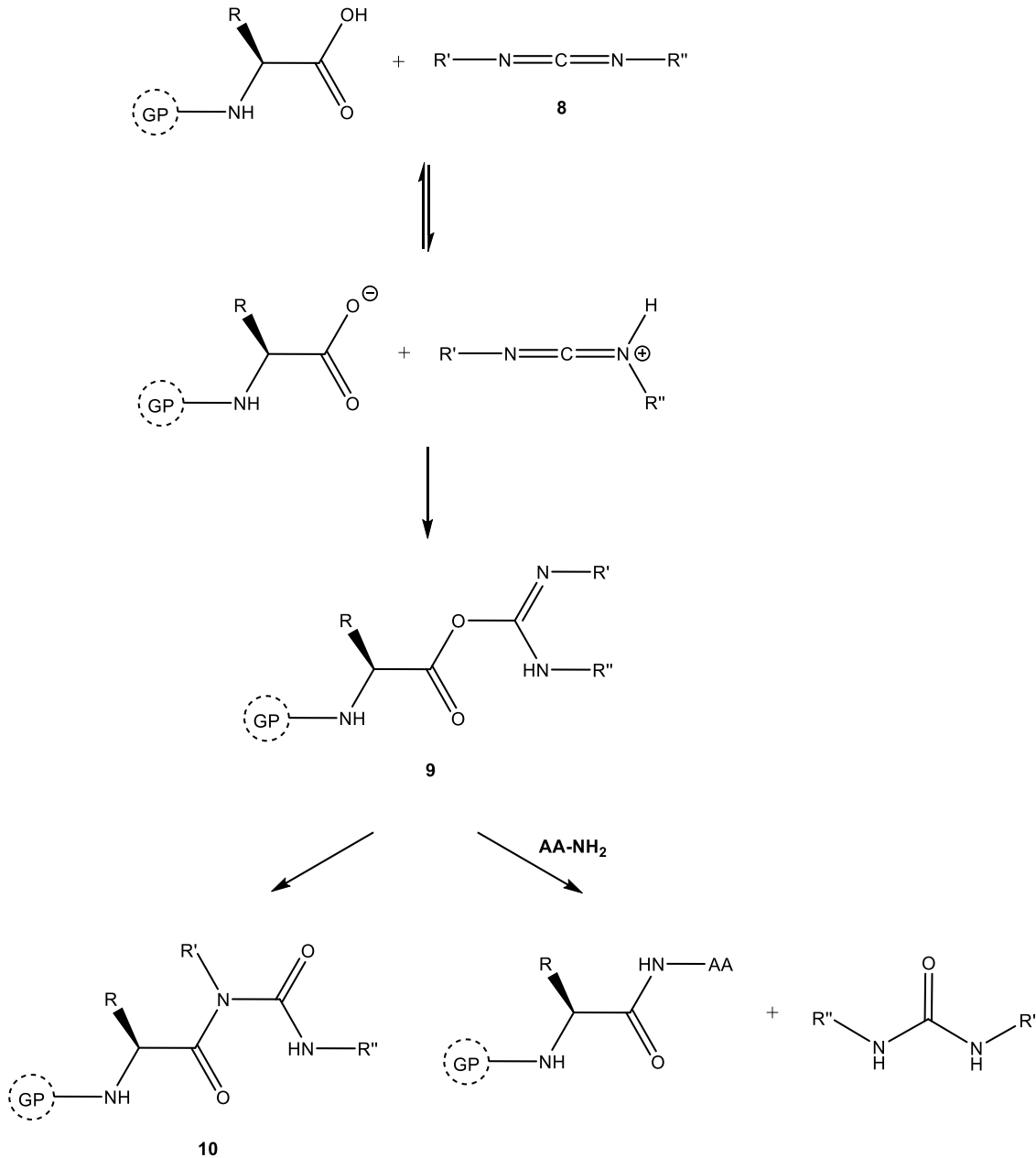
2.2.3. Agentes de Acoplamento

Os métodos correntemente utilizados para a ativação do componente carboxílico em síntese peptídica, quer em solução, quer em fase sólida, baseiam-se nos chamados agentes de condensação, ativação ou acoplamento, que promovem a ativação *in situ*. Estes agentes estão geralmente associados a uma reação de ativação rápida, mesmo no caso de aminoácidos estereoquimicamente impedidos, formando-se um éster ativo como intermediário. Existem atualmente diversos agentes de acoplamento como, por exemplo, carbodiimidas ou sais de fosfônio ou urônio, sendo os últimos geralmente mais eficientes, possibilitando a diminuição dos tempos de reação, bem como o aumento do rendimento global de síntese.

2.2.3.1. Carbodiimidas

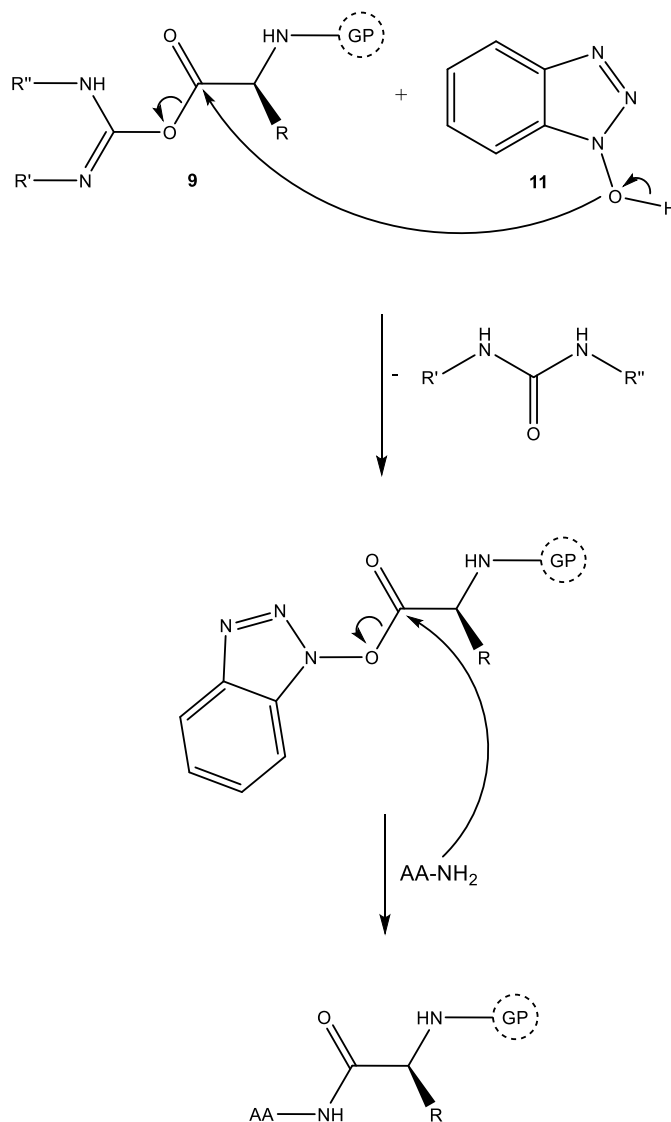
As carbodiimidas foram o primeiro tipo de agente de condensação *in situ* a ser desenvolvido, em meados do século XX ^[26]. Ao reagir com um ácido carboxílico, as carbodiimidas (**8**) originam uma *O*-acilisoureia lábil (**9**), muito propensa a sofrer um ataque nucleófilo (Esquema 1.6). Assim, sendo esta isoureia gerada na presença do componente amino, reagirá prontamente com este para produzir a amida desejada. No entanto, a elevada reatividade da *O*-acil-isoureia está também muitas vezes associada à racemização do substrato ativado ou ainda à conversão intramolecular da própria *O*-

acilisoureira no seu isómero *N*-acilureia (**10**) que não é reativo, ou seja, não sofre a reação de aminólise conducente à formação da ligação amida desejada ^[26].



Esquema 1.6 – Ativação de um grupo carboxílico por uma carbodiimida e subsequente reação da *O*-acilisoureira (**9**) formada (i) por via intramolecular para formar uma *N*-acilureia estável (**10**), ou (ii) com uma amina nucleofílica para formar o produto de condensação desejado.

Ainda no último quartil do século XX, e com o objetivo de contornar os problemas associados à utilização de carbodiimidas, introduziu-se o conceito de nucleófilo auxiliar, em que espécies nucleófilas como o 1-hidroxibenzotriazole (HOBt, **11**) eram usadas em conjunto com as carbodiimidas para promover a ativação *in situ* [27]. O HOBt reage prontamente com a *O*-acil-isoureia, gerando um éster reativo de benzotriazolilo, menos lábil que a isoureia, mas ainda passível de sofrer um ataque nucleófilo por parte de uma amina (esquema 1.7). Para além de evitar a conversão da *O*-acilisoureia em *N*-acilureia, o HOBt é também capaz de reduzir os níveis de racemização por ser ligeiramente ácido, proporcionando uma formação da amida desejada com melhores rendimentos [28-29].



Esquema 1.7 – Ataque nucleófilo do HOBt a uma *O*-acilisoureia e subsequente aminólise do éster de benzotriazolilo formado.

Outros nucleófilos auxiliares similares ao HOBt surgiram posteriormente, como é o caso do 7-aza-1-hidroxibenzotriazole (HOAt, **12**), geralmente mais eficiente que o HOBt na supressão da racemização e no aumento da velocidade e do rendimento da condensação [30-32]. Esta melhoria está provavelmente relacionada com a incorporação de um átomo de azoto na posição 7 do sistema aromático, que poderá contribuir quer para uma melhor estabilização do grupo de saída (aumentado assim a reatividade do éster), quer para o estabelecimento de 'neighboring group effect' que aumenta a nucleofilia da amina (esquema 1.8) [10,30,33].

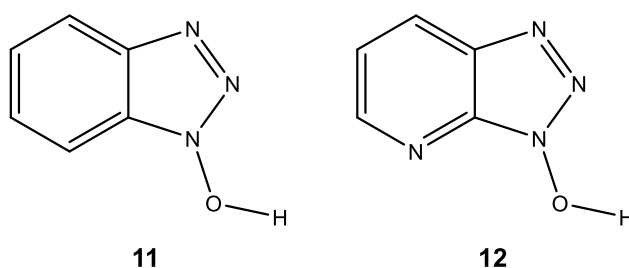
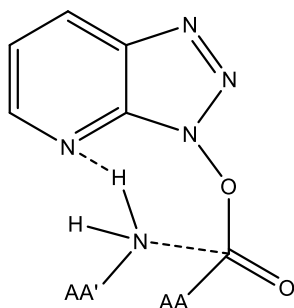


Figura 1.4 – Estrutura dos nucleófilos auxiliares HOBt (**11**) e HOAt (**12**).



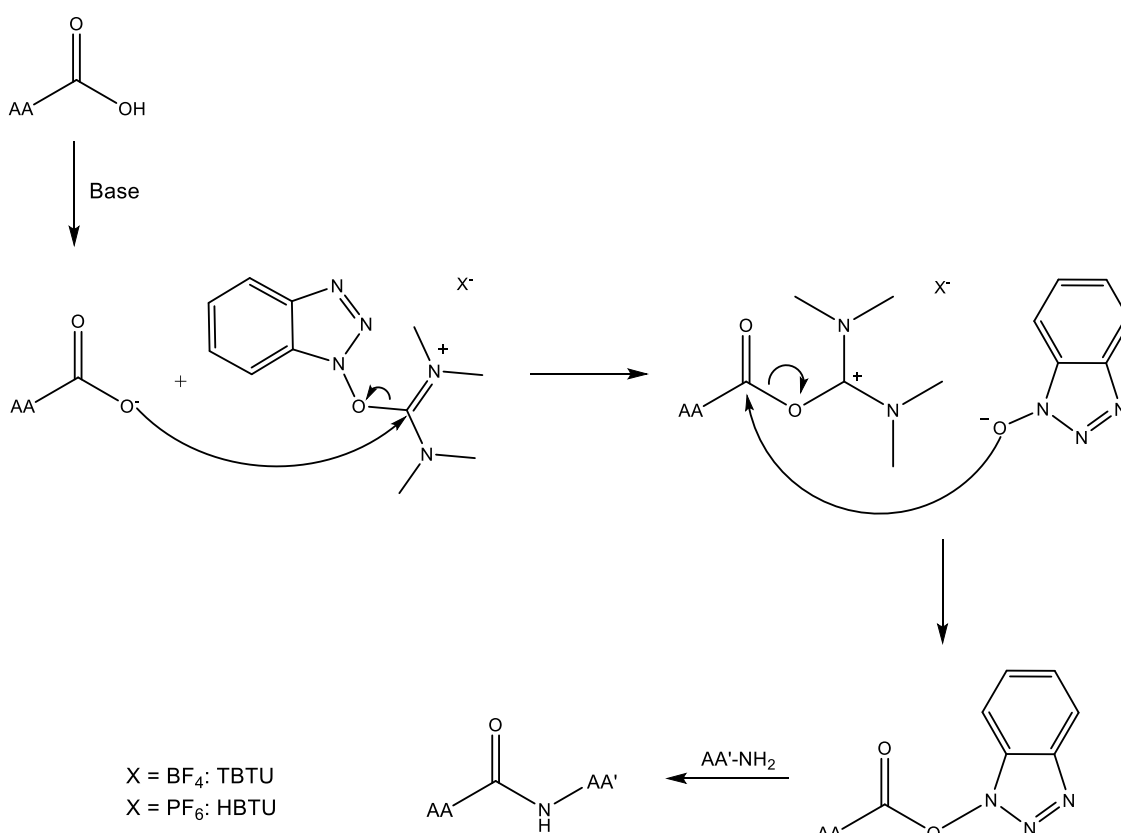
Esquema 1.8 – Representação do 'neighbouring group effect', por estabelecimento de ligações de hidrogénio entre o azoto da posição 7 do HOAt e a amina nucleofílica.

2.2.3.2. Sais de urónio

O sucesso da combinação do HOBt com carbodiimidas conduziu à síntese de diversos novos agentes de acoplamento *in situ*, capazes de produzir resultados similares aos da referida combinação. Surgiram assim os denominados sais de urónio, como o tetrafluoroborato ou o hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio (TBTU, **13** ou HBTU, **14**, respetivamente). O HBTU foi introduzido

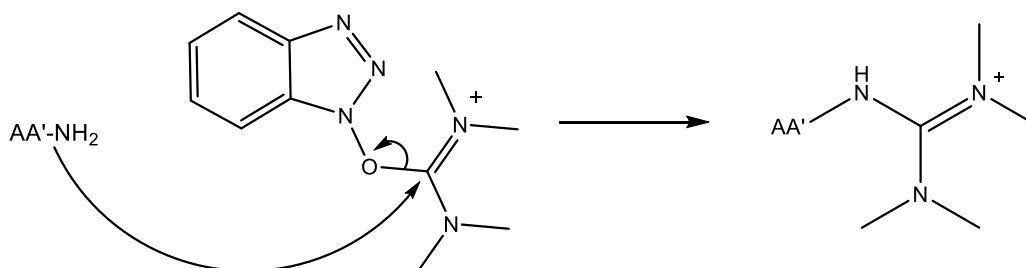
como agente de acoplamento em 1978 ^[34] e é atualmente um dos mais utilizados em SPPS. Os sais de urônio são usados na presença de aminas terciárias, como a *N*-etil-*N,N*-diisopropilamina (DIEA), que desprotonam o aminoácido *N*^o-protegido. Este, na sua forma carboxilato, reage rapidamente com o sal de urônio, produzindo, num primeiro passo, 1-*N*-óxido de benzotriazolilo (BtO⁻) e um intermediário *O*-acilisourônio; este é prontamente atacado pelo BtO⁻, gerando-se o éster reativo de benzotriazolilo que irá depois reagir com o componente amina (esquema 1.9).

Na sequência do desenvolvimento do HOAt como um agente de acoplamento mais eficiente que o HOBt, surgiram também sais de urônio baseados na sua estrutura, como, por exemplo, tetrafluoroborato ou hexafluorofosfato de *O*-(7-aza-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurônio (TATU, **15** ou HATU, **16**, respetivamente) ^[35]. Para além de ter demonstrado um melhor desempenho em termos de reatividade e supressão do mecanismo de racemização do que o HBTU ^[36-37], o HATU é também uma boa alternativa para a condensação de aminoácidos estereoquimicamente impedidos, como *N*-metilaminoácidos ^[38].



Esquema 1.9 – Mecanismo de ativação do componente carboxilo com um sal de urônio.

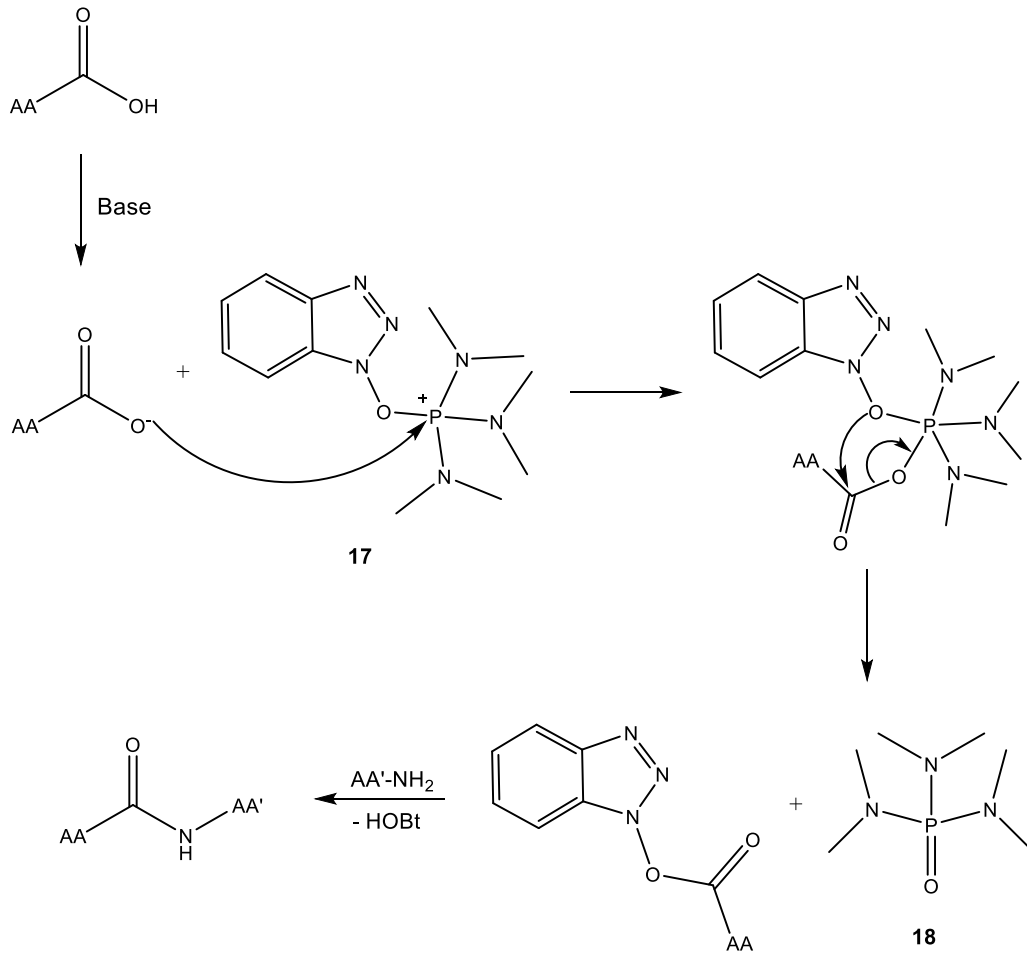
Os sais de urónio, apesar de mais eficazes que as carbodiimidas ou combinações destas com nucleófilos auxiliares, podem conduzir à *N*-guanidilação do componente amino, particularmente se o ataque do carboxilato ao urónio for lento (esquema 1.10) ^[35]. Este problema raramente assume proporções significativas em SPPS, dados os curtos períodos de reação e o grande excesso molar do componente carboxilo (aminoácido *N*^α-protegido, adicionado juntamente com a base e o agente de condensação *in situ* à peptidil-resina) em relação ao componente amino (grupos amino livres na peptidil-resina).



Esquema 1.10 – *N*-guanidilação do componente amino por reação deste com o sal de urónio.

2.2.3.3. Sais de Fosfónio

Em paralelo ao desenvolvimento dos sais de urónio, foram também desenvolvidos sais de fosfónio como eficientes agentes de condensação *in situ*. Nos anos 1970, Castro *et al.* propuseram o primeiro desses agentes, o hexafluorofosfato de (benzotriazole-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfónio (BOP, **17**), também conhecido como Reagente de Castro. À semelhança do que ocorre com os sais de urónio, os sais de fosfónio originam um éster ativo de benzotriazolilo (Esquema 1.11), com a vantagem de não poderem promover a *N*-guanidilação da amina ^[39]. Apesar da elevada eficiência do Reagente de Castro, o uso deste foi rapidamente desencorajado, pois a hexametilfosforamida (HMPA, **18**) gerada como produto lateral é um potencial agente carcinogénico ^[10,40].



Esquema 1.11 - Mecanismo de ativação do componente carboxílico com um sal de fosfônio.

Tal motivou a procura de alternativas, conduzindo a análogos do BOP, como o hexafluorofosfato de (benzotriazole-1-iloxi)tripirrolidíniofosfônio (PyBOP, **19**). O PyBOP é atualmente um dos sais de fosfônio mais populares em SPPS, apresentando todas as vantagens do BOP, e gerando uma fosforamida menos tóxica que a HMPA ^[41].

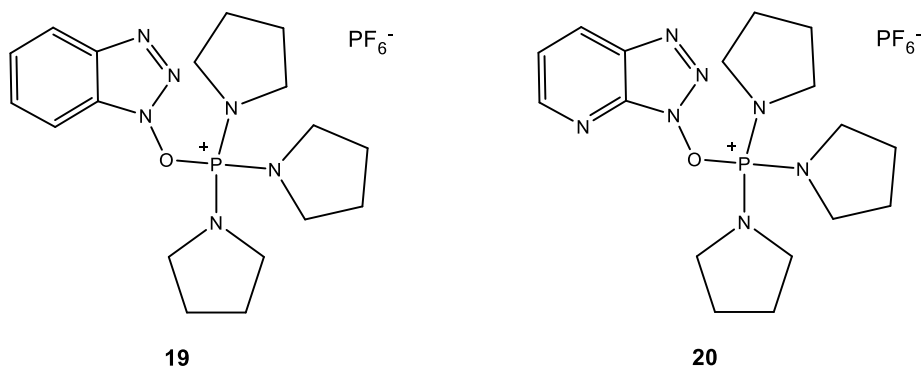


Figura 1.5 – Estrutura dos agentes de acoplamento PyBOP e PyAOP.

Tal como no caso dos sais de urónio, também entre os sais de fosfónio podem encontrar-se análogos derivados de HOAt, como o hexafluorofosfato de (7-aza-benzo-triazole-1-iloxi)tripirrolidino-fosfónio (PyAOP, **20**)^[42].

2.2.3.4. Derivados da “Oxyrna Pure”

Os derivados do HOBt, apesar de serem agentes de acoplamento eficientes, são considerados perigosos devido ao seu potencial de decomposição fortemente exotérmico, o que os classifica como explosivos de classe 1 requerendo condições especiais de transporte^[43-44]. Foi com base neste argumento que Albericio e colaboradores trabalharam no desenvolvimento de agentes de acoplamento contendo estruturas *N*-hidroxiladas alternativas ao HOBt, como o 2-ciano-2-hidroximinoacetato de etilo, ou “Oxyrna Pure” (**21**). O potencial da “Oxyrna Pure” como nucleófilo auxiliar de carbodiimidas foi recentemente avaliado, com resultados que sugeriram um desempenho superior ao do HOBt, tanto a nível de supressão de racemização, como a nível de eficiência da condensação. Para além disso, foi ainda demonstrada a sua compatibilidade com sistemas de síntese automatizada, cada vez mais importante nos dias que correm, considerando a constante evolução das metodologias de SPPS^[44].

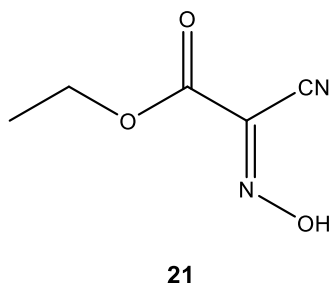
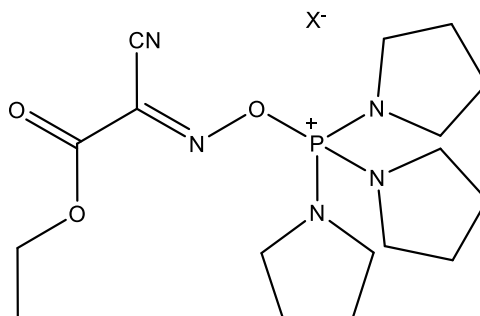


Figura 1.6 – Estrutura da “Oxyrna Pure”.

Com base nos resultados observados para a “Oxyrna Pure”, o mesmo grupo de investigação decidiu combinar esta estrutura com um sal de tetrafluoroborato de trispirrolidino-fosfónio, surgindo assim o tetrafluoroborato de *O*-[(ciano-(etoxicarbonil)-metilideno)amino]-iloxitripirrolidino-fosfónio (PyOxB, **22**)^[45]. Este agente foi avaliado relativamente à sua capacidade de inibir reações de racemização, bem como de aumentar a extensão da reação de condensação e comparado com o hexafluorofosfato de *O*-[(ciano-(etoxicarbonil)-metilideno)amino]iloxitripirrolidino-fosfónio (PyOxP, **23**)^[46]. Deste estudo concluiu-se que o PyOxP demonstra elevada

estabilidade em solução, superior aos sais de fosfônio PyBOP ou PyAOP, possibilitando também sínteses com melhores rendimentos. Devido à sua elevada estabilidade em solução, este agente de acoplamento é adequado para utilização em SPPS [45].



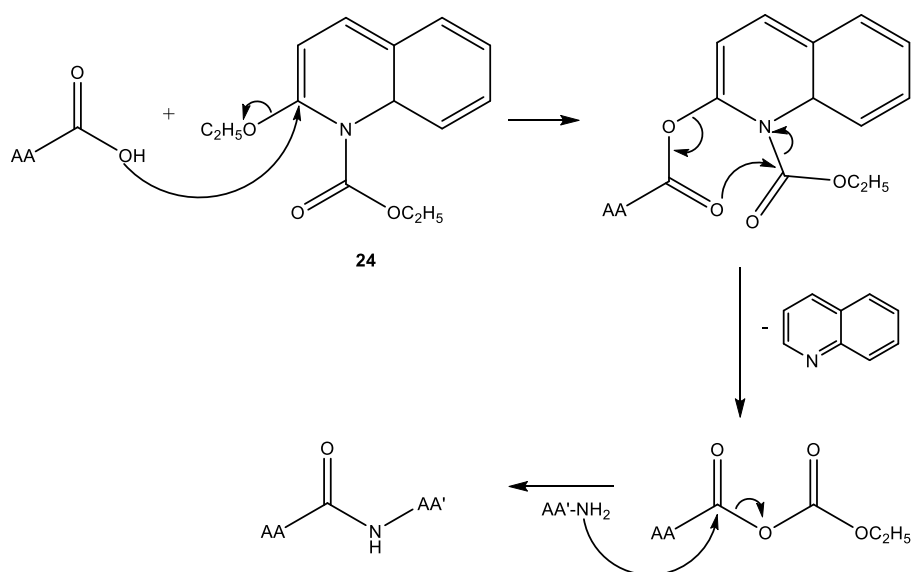
X = BF₄⁻: PyOxB **22**

X = PF₆⁻: PyOxP **23**

Figura 1.7 - Estrutura dos agentes de condensação PyOxB (**22**) e PyOxP (**23**).

2.2.3.5. *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-di-hidroquinolina (EEDQ)

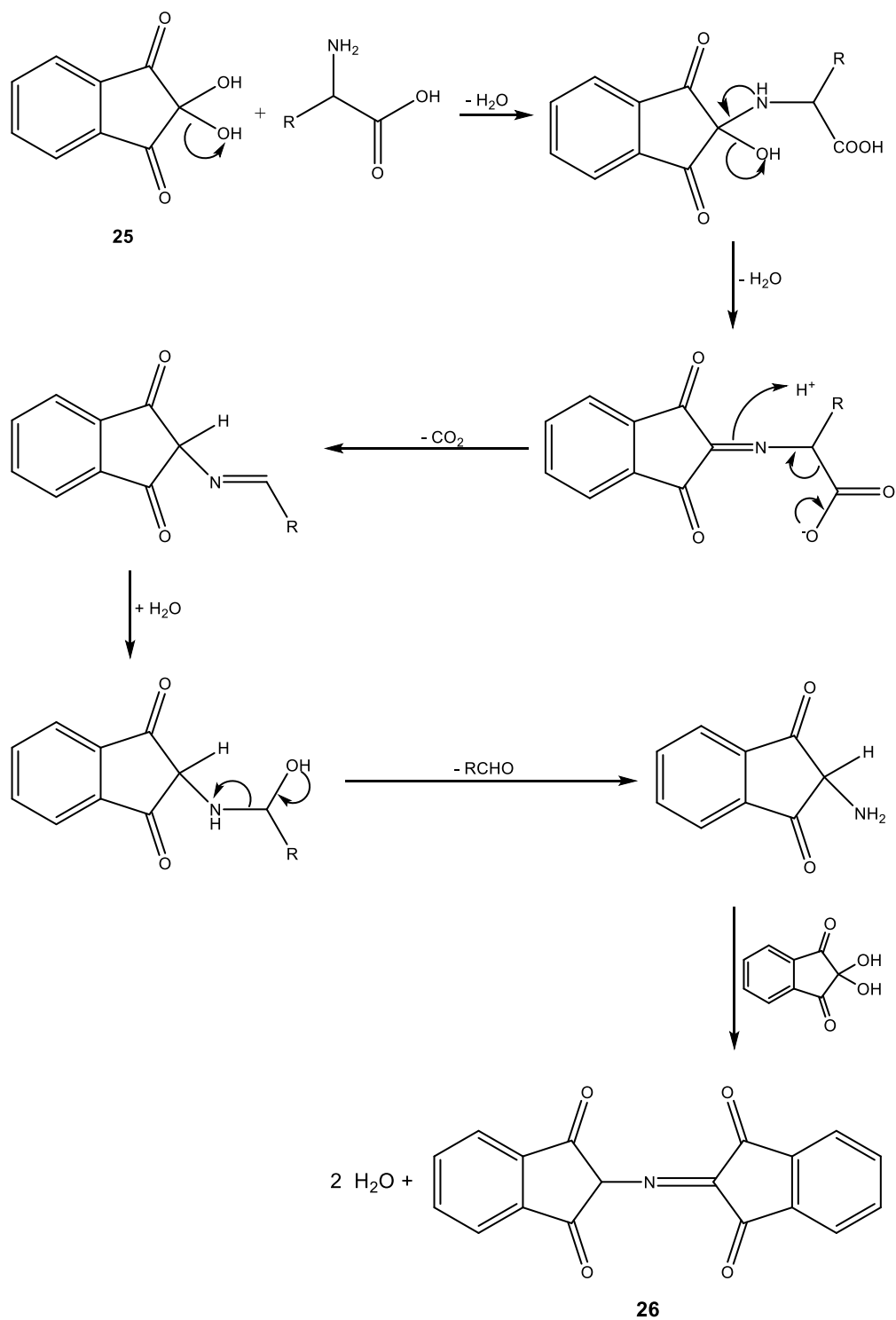
Existe, para além dos agentes de acoplamento *in situ* mais populares e já referidos, um vasto leque de outros reagentes que são pontualmente usados como agentes de condensação peptídica *in situ* [47-48]. Não estando no âmbito desta dissertação fazer uma abordagem exaustiva a todos eles, decidiu-se fazer referência a um deles, a *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-di-hidroquinolina (EEDQ, **24**), pela sua relevância no contexto deste trabalho. A EEDQ é um antagonista irreversível de recetores de dopamina, desenvolvido em 1967 [49], que se revelou um agente de acoplamento altamente eficaz e específico, promovendo a condensação peptídica sem problemas de racemização ou *N*-guanidilação do componente amino. A ativação do componente carboxilo começa por uma substituição nucleofílica aromática (S_NAr), em que o carboxilato substitui o grupo etoxilo da posição 2 do anel quinolínico. À S_NAr segue-se um rearranjo intramolecular, com conseqüente formação de um anidrido misto. A ligação amida é depois formada por aminólise deste anidrido (esquema 1.12). É, no entanto, de referir que o ataque nucleofílico do componente amino ao anidrido misto pode ocorrer também no grupo carbonilo do etilcarbonato (em vez do grupo carbonilo do aminoácido). Por esta razão, a EEDQ não é utilizada sistematicamente em SPPS [21].



Esquema 1.12 – Mecanismo de condensação peptídica mediada pela EEDQ.

2.2.4. Monitorização do alongamento da cadeia peptídica

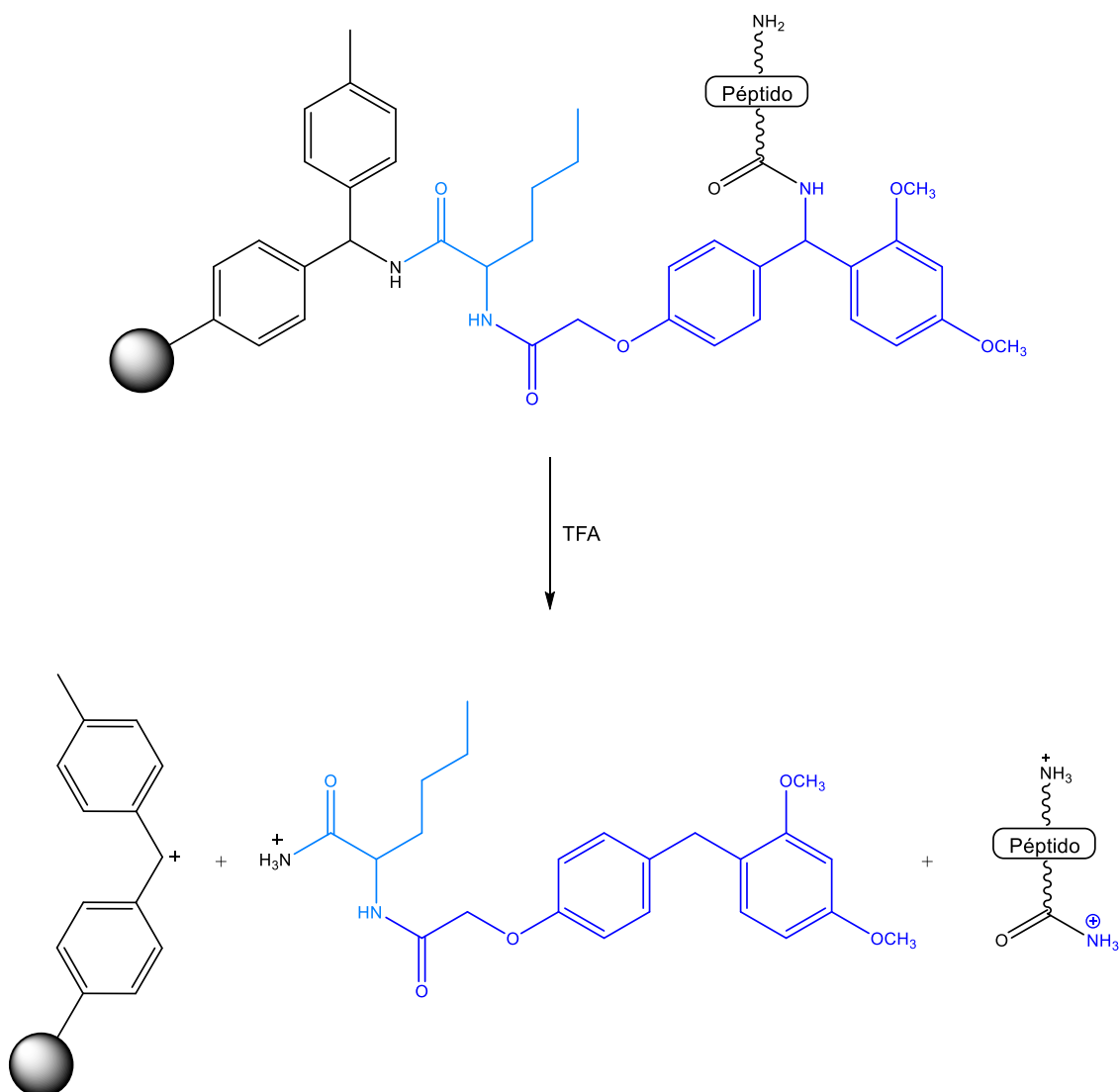
O alongamento da cadeia peptídica é realizado, como descrito anteriormente, através de sucessivos ciclos de desproteção e acoplamento. Apesar da utilização de agentes de acoplamento/soluções de desproteção adequadas e condições experimentais favoráveis, é possível que (a) um aminoácido não reaja completamente com todos os grupos amino livres da peptidil-resina ou que (b) não ocorra a remoção completa dos grupos α -amino protetores. Assim sendo, é aconselhável monitorizar todas as reações de desproteção e acoplamento, para avaliar se estas foram ou não completas, de modo a evitar que se sintetizem sequências de deleção. Uma das formas de monitorizar rapidamente a eficiência de cada passo consiste no recurso ao teste da ninidrina (ou teste de Kaiser), que é um método colorimétrico sensível e eficaz, capaz de detetar grupos amino primários, mesmo que em quantidades muito baixas. A ninidrina (**25**), de cor amarelo-pálida, reage com o grupo α -amino do aminoácido a elevadas temperaturas, originando um composto de coloração violeta intensa (“Púrpura de Ruhemann”, **26**), que acusa a presença de grupos amino primários na amostra (Esquema 1.13) ^[50].



Esquema 1.13 – Reação da ninidrina com o grupo α - NH_2 de um aminoácido.

2.2.5. Clivagem de um péptido sintetizado pelo esquema Fmoc/Bu

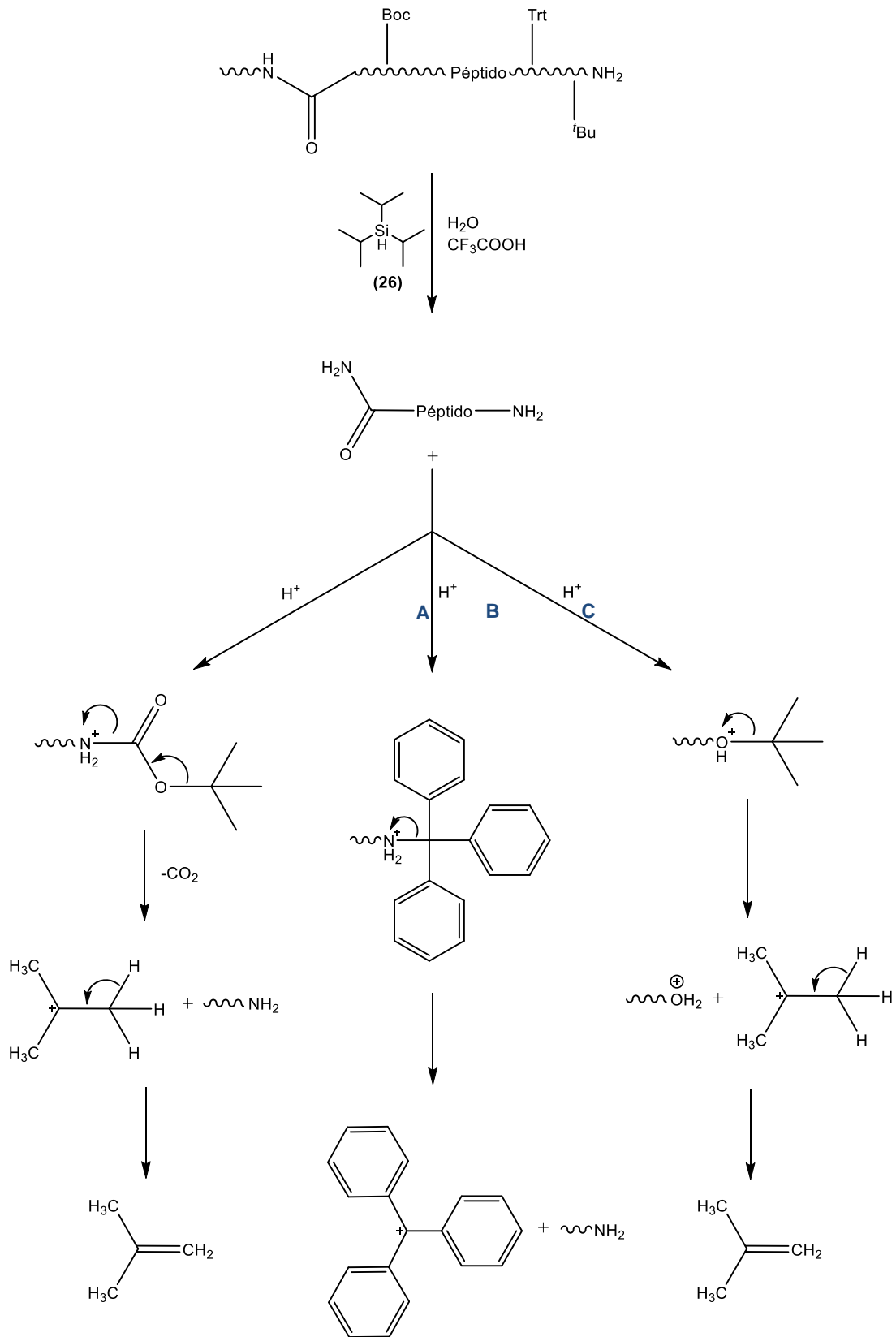
Terminado o alongamento da sequência peptídica, normalmente procede-se à clivagem do péptido, com o objetivo de o separar da resina e remover os grupos protetores das cadeias laterais. Quando utilizado o esquema de proteção ortogonal Fmoc/^tBu, a clivagem da ligação péptido-resina é normalmente realizada por acidólise com TFA (esquema 1.14).



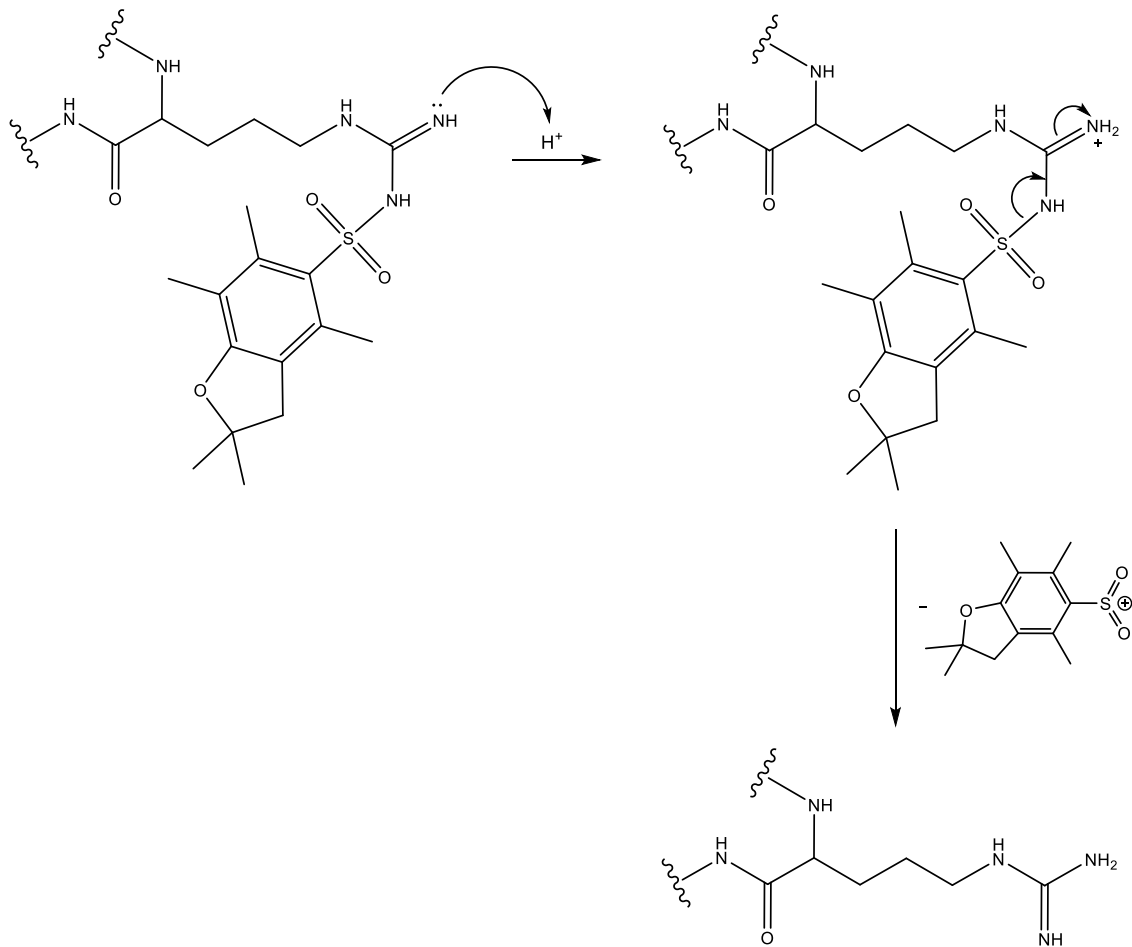
Esquema 1.14 – Clivagem da ligação péptido-resina (ilustra-se o caso mais geral, ou seja, obtenção de um péptido carboxamida em C-terminal, sintetizado sobre uma resina do tipo metilbenzidrilamina – MBHA – modificada com um espaçador bifuncional do tipo Rink ^[51]).

Os grupos protetores das cadeias laterais, também removidos na clivagem acidolítica (reação que segue geralmente um mecanismo de S_N1), dão origem a carbocatiões relativamente estabilizados, como carbocatiões terciários ou estabilizados por ressonância (Esquemas 1.15 e 1.16). No entanto, estes carbocatiões não deixam de ser espécies eletrófilas muito reativas, capazes de reagir com algumas cadeias laterais com características nucleófilas, modificando irreversivelmente a cadeia peptídica. Torna-se, por isso, importante a adição, ao TFA, dos chamados *scavengers* – espécies nucleófilas muito reativas, capazes de reagir rapidamente com os eletrófilos gerados durante o processo de acidólise, impedindo-os assim de reagir com o péptido final.

Assim, a clivagem é realizada usando-se o chamado *cocktail* de clivagem, que consiste numa solução de TFA (90 a 95%) e *scavengers* apropriados (água, trialkilsilanos, tióis), conforme a sequência peptídica sintetizada. Um dos *cocktails* de clivagem mais populares, por ser genericamente eficaz e inodoro, é composto por 95% de TFA, 2,5% de água e 2,5% de triisopropilsilano (TIS). Estes dois *scavengers* são capazes de captar rapidamente (reagir com) carbocatiões como o *tert*-butilo, tritilo, trimetoxibenzilo e arilsulfonilo, produzidos na acidólise.

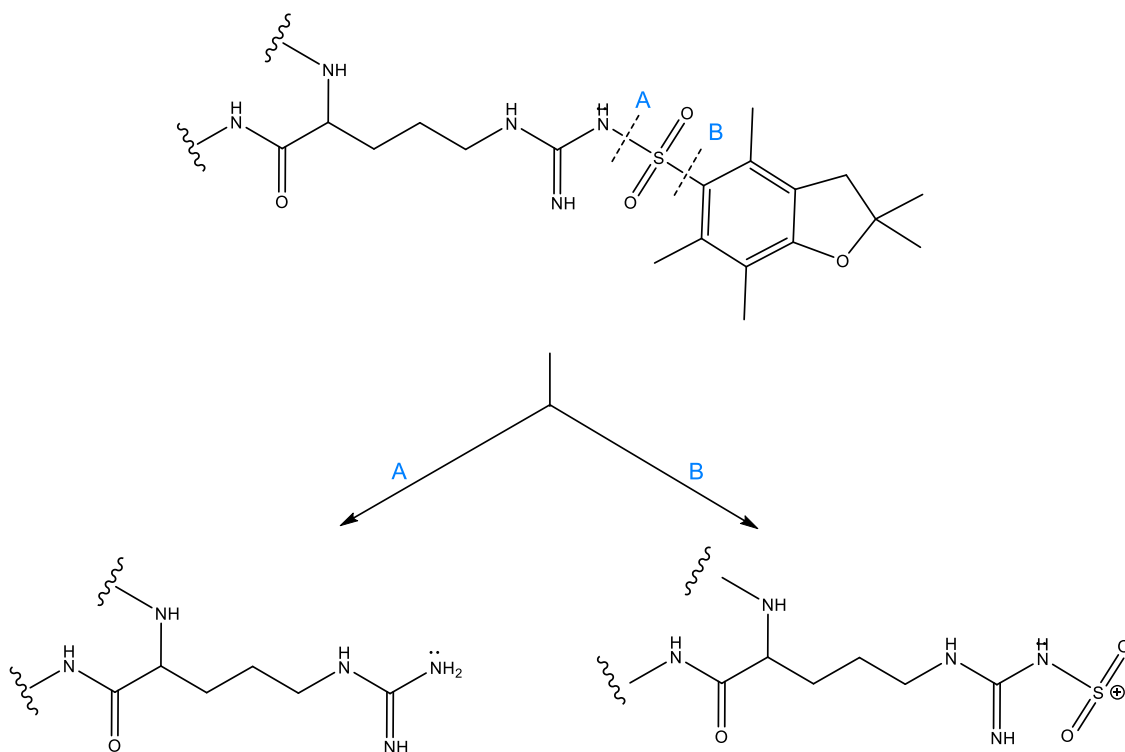


Esquema 1.15 – Mecanismo de acidólise dos grupos protetores mais comuns: (A) Boc, (B) Trt e (C) ^tBu^[51].



Esquema 1.16 – Mecanismo de acidólise do grupo Pbf, protetor do grupo guanidínio presente na arginina ^[51].

Em algumas situações torna-se necessário utilizar uma mistura de *scavengers* diferente, para garantir que a presença de um elevado número de aminoácidos muito nucleofílicos, ou de grupos protetores com especificidades reacionais, não ponham em causa o sucesso da síntese. Por exemplo, em sequências peptídicas com duas ou mais argininas, é recomendado o uso de determinados tióis (tioanisole, anisole e etano-1,2-ditiol) como *scavengers*, para evitar que a clivagem do grupo protetor (Pbf) ocorra com uma orientação indesejada, ou seja, que o grupo sulfonilo seja clivado “pelo lado errado”, dando origem a uma arginina sulfonada (Esquema 1.17) ^[21,52].



Esquema 1.17 – Possíveis resultados da clivagem do grupo Pbf com TFA: rota A conduz ao péptido desejado, enquanto que a rota B dá origem a uma arginina sulfonada. Adaptado de [52].

2.2.6. SPPS assistida por instrumentação automatizada

A natureza repetitiva dos ciclos de acoplamento e desproteção de aminoácidos em SPPS, juntamente com a evolução da informática, da robótica e da microfluídica, proporcionaram o desenvolvimento de instrumentação dedicada à SPPS. A automatização da SPPS é praticamente contemporânea da própria SPPS, já que Merrifield e colaboradores desenvolveram um primeiro instrumento logo em 1965, o que representou um novo marco na ciência da síntese de péptidos, publicado na revista *Science* [53]. Desde então, e até hoje, tem sido substancial o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais rápidos, flexíveis e eficientes, desde equipamentos dedicados à produção de um só péptido de cada vez, permitindo trabalhar a diferentes escalas de síntese, até equipamentos de síntese múltipla, capazes de produzir de cerca de uma dezena a mais de uma centena de péptidos em simultâneo, nesses casos geralmente a pequena ou média escala. Na esmagadora maioria dos casos, os sistemas para síntese automatizada de péptidos são apenas compatíveis com SPPS segundo um esquema de proteção Fmoc/^tBu, por ser difícil e muito dispendioso tentar

compatibilizar os delicados componentes de microfluídica com a agressividade dos tratamentos repetitivos com TFA, requeridos quando se usa o esquema Boc/Bzl^[54].

O interesse da síntese automatizada de péptidos não reside apenas na sua maior rapidez, ou na possibilidade que oferece de continuar a ser realizada durante períodos de ausência do operador. Na realidade, ainda que seja atualmente a metodologia mais eficaz de produção de péptidos nativos ou modificados, a SPPS continua a apresentar diversos desafios, alguns dos quais podem beneficiar do uso de determinados sistemas automatizados de SPPS. O mais emblemático desses desafios é o da síntese de péptidos longos (com mais de 30 aminoácidos), em especial se forem ricos em aminoácidos hidrofóbicos. As cadeias peptídicas em crescimento sobre uma resina têm tendência a agregar-se à medida que vão ficando cada vez mais longas, através de interações intermoleculares, sejam pontes de hidrogénio ou outras interações dipólo-dipólo, sejam interações hidrofóbicas. Estas interações podem também ocorrer intramolecularmente, promovendo o enrolamento da cadeia peptídica, à medida que esta cresce. Em ambos os casos, o rendimento e qualidade da síntese são drasticamente afetados, já que a estruturação (intra- ou inter-molecular) das cadeias peptídicas crescentes vai tornando inacessíveis os grupos reativos necessários para o passo sintético seguinte, seja de desproteção ou condensação. Problemas similares podem surgir devido a efeitos estéricos, quer quando a amina terminal é secundária (por exemplo, na prolina ou aminoácidos *N*-substituídos), quer em casos em que o grupo protetor da cadeia lateral é muito volumoso, o que diminui substancialmente a velocidade e extensão das reações. Uma das estratégias mais recentes para tentar ultrapassar estes problemas, para além do uso de agentes de condensação e desproteção mais eficazes, tem sido a aplicação de aquecimento nos ciclos de *N*-desproteção e acoplamento^[55-57] (Figura 1.8).

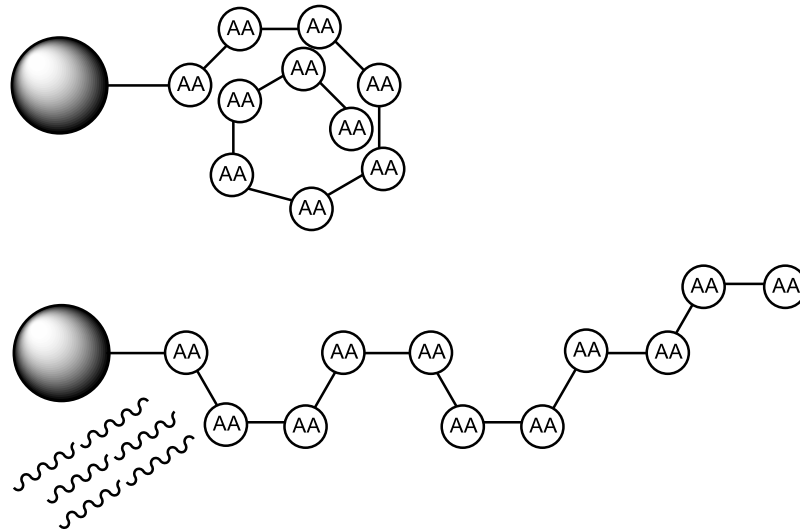


Figura 1.8 – Representação esquemática do efeito do aquecimento/radiação microondas no enrolamento da cadeia peptídica.

Neste contexto, o aquecimento através de radiação microondas, que se impôs no início deste século como uma ferramenta útil em síntese orgânica ^[57], passou a integrar alguns sistemas automatizados de SPPS (Figura 1.9). Nasceu, assim, a Síntese Peptídica em Fase Sólida Assistida por Microondas (MW-SPPS), que possibilitou não só uma diminuição significativa dos tempos de reação, mas também um aumento do rendimento de síntese e, em muitos casos, uma melhoria no grau de pureza do péptido ^[58].



Figura 1.9 – Sintetizador automático CEM Liberty1™.

A MW-SPPS ainda não permitiu, contudo, que a síntese peptídica atingisse um nível de desempenho ótimo. A maior propensão de alguns aminoácidos, ou seus derivados, para sofrer alterações indesejadas, como a racemização ou outras, pode ser agravada nas condições de acoplamento e desproteção assistidos por microondas. Tal exige um cuidado adicional com sequências contendo resíduos como cisteína, histidina ou ácido aspártico, ou na síntese de determinados péptidos modificados, como fosfopéptidos, glicopéptidos ou péptidos *N*-metilados [57,59]. Perante isto, novos equipamentos estão a surgir no mercado, e novos protocolos de síntese a ser explorados, tendo em vista o constante melhoramento e maior flexibilização da SPPS. Exemplo disso é o recente lançamento de um sintetizador paralelo (síntese simultânea de até 24 péptidos) que permite não só o aquecimento por radiação infra-vermelha, como é também compatível com o esquema Boc/Bzl, no qual os problemas de agregação/estruturação das cadeias peptídicas são menores, dado que as interações subjacentes a esses problemas são maioritariamente destruídas em cada ciclo de desproteção com TFA [60]. Adicionalmente, o uso combinado deste tipo de sintetizador com protocolos de SPPS envolvendo o uso do hexafluorofosfato de *O*-(6-clorobenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio (HCTU, **27**) como agente de condensação, tem vindo a revelar-se uma via eficaz para a síntese de sequências longas e hidrofóbicas, como é o caso do péptido β -amilóide 1-42 humano [61].

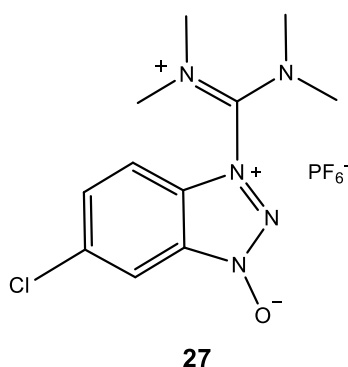


Figura 1.10 – Estrutura do agente de condensação HCTU.

Em suma, a SPPS é um marco na síntese peptídica que, desde a sua invenção até hoje, tem evoluído de forma considerável. Apesar de haver ainda alguns obstáculos a transpor em síntese de péptidos, é hoje possível sintetizar de forma

simples e rápida um sem número de sequências peptídicas diversas, se necessário incorporando aminoácidos não naturais ou modificações químicas inacessíveis por via biossintética. Tal trouxe aos péptidos um novo protagonismo em várias áreas, da engenharia biomédica à nanotecnologia e à criação de novos fármacos ^[62].

3. Bibliografia

- [1] N. Sewald, H. D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Verlag, **2002**.
- [2] D. P. McGregor, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, 8, 616-619.
- [3] V. R. Pattabiraman, J. W. Bode, *Nature* **2011**, 480, 471-479.
- [4] R. B. Martin, *Biopolymers* **1998**, 45, 4, 351-353.
- [5] M. Goodman, W.J. McGahren, *Tetrahedron* **1967**, 23, 2031-2050.
- [6] I. Antovonics, J. T. Young, *J. Chem. Soc.* **1967**, 595.
- [7] M. Bodansky, *Principle of Peptide Synthesis*, Second ed., Springer, Verlag, Berlin, **1993**.
- [8] L. A. Carpino, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 875.
- [9] P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*, CRC Press, Boca Raton, **1997**.
- [10] T. I. Al-Warhi, H. M. A. Al-Hazimi, A. El-Faham, *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, 16, 97-116.
- [11] Y. Han, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4307.
- [12] N. Robertson, L. Jiang, R. Ramage, *Tetrahedron* **1999**, 55, 2713.
- [13] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1984/
- [14] L. P. Miranda, P. F. Alewood, *Biopolymers* **2000**, 55, 217-226.
- [15] J. H. Adams, R. M. Cook, D. Hudson, V. Jammalamadaka, M. H. Lyttle, M. F. Songster, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 11, 3706-3716.
- [16] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- [17] K. Pugh, E. York, J. Stewart, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, 40, 208-213.
- [18] B. Yan, A.W. Czarnik (Eds.), *Optimization of Solid-Phase Combinatorial Chemistry*, Marcel Dekker, **2002**.

- [19] M. Meldal, *Properties of Solid Supports*. In: G.B. Fields, ed. *Methods of Enzymology*, Vol. 289, Solid Phase Peptide Synthesis. Orlando FL: Academic Press, **1997**, 83-104.
- [20] A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Alberício, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455-2504.
- [21] N. L. Benoiton, *Chemistry of Peptide Synthesis*, CRC Press, Boca Raton, **2006**.
- [22] R. B. Merrifield, *Science* **1986**, *232*, 341-347.
- [23] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 578.
- [24] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard, B. Williams, *Chemical Communications*, **1978**, 537-539.
- [25] C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1978**, *11*, 246-249.
- [26] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- [27] W. Koenig, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [28] W. Koenig, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2024-2033.
- [29] A. Williams, I. T. Ibrahim, *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 589-636.
- [30] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [31] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279.
- [32] L. A. Carpino, H. Imazumi, B. M. Foxman, M. J. Vela, P. Henklun, A. El-Faham, J. Klose, M. Biernet, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2253.
- [33] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *J. Org. Chem.* **1995**, *50*, 3561.
- [34] V. Dourtoglou, J.C. Zigler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *155*, 1269-1272.
- [35] C. Nayera, *Synlett* **2002**, 1388-1403
- [36] M. Fresno, A. El-Faham, L. A. Carpino, M. Royo, F. Albericio, *Organic Lett.* **2000**, *2*, 3539.

- [37] P. Li, J. C. Xu, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *56*, 4437.
- [38] F. Frérot, J. Coste, J. Poncet, P. Jouin, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2815.
- [39] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *14*, 1219-1222.
- [40] M. Kim, D. V. Patel, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5603.
- [41] D. Hudson, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 617.
- [42] F. Albericio, M. Cases, J. Alsina, S. A. Triolo, L. A. Carpino, S. A. Kates, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4853-4856.
- [43] M. Malow, K. D. Wehrstedt, S. Newenfeld, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1233-1235.
- [44] R. Subirós-Funosas, R. Prohens, R. Barbas, A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9394-9403.
- [45] R. Subirós-Funosas, A. El-Faham, F. Albericio, *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2010**, *8*, 3665-3673.
- [46] F. Hoffmann, L. Jaeger, C. Griehl, Phosphorous, Sulfur and Silicon and the Related Elements, **2003**, *178*, *2*, 299-309.
- [47] E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631.
- [48] C. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- [49] B. Belleau, G. Malek, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1651-1652.
- [50] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P.I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
- [51] D. Pires, M. Bemquerer, C. Nascimento, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2014**, *20*, 53-69.
- [52] A. Beck-Sickinger, G. Chnorrenberq, J. Metzger, G. Jung, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *31*, 25-31.
- [53] R.B. Merrifield, *Science* **1965**, *150*, 178-185.

- [54] K.J. Jensen, P.T. Shelton, S.L. Pederson, *Peptide Synthesis and Applications*, Second Ed., Humana Press, **2013**.
- [55] L.M. Varanda, M.M. Miranda, *J. Pept. Res.* **1997**, 50, 102–108.
- [56] B.E. Kaplan, L.J. Hefta, R.C. Blake, K.M. Swiderek, J.E. Shively, *J. Pept. Res.* **1998**, 52, 249–260.
- [57] S.L. Pedersen, A.P. Tofteng, L. Malik, K.J. Jensen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 1826–1844
- [58] H. Yu, S. Chen, K. Wang, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4781-4784.
- [59] F. Rizzolo, C. Testa, D. Lambardi, M. Chorev, M. Chelli, P. Rovero, A. Panini, *J. Pept. Sci.* **2011**, 17, 708-714.
- [60] <http://www.ptipep.com/products~instruments-5~symphony-x-343>
- [61] C. Hood, G. Fuentes, H. Patel, K. Page, M. Menakuru, J. Park, *J. Pept. Sci.* **2008**, 14, 97-101.
- [62] R. Kharb, M. Rana, P.C. Sharma, M.S. Yar, *J. Chem. Pharm. Res.* **2011**, 3, 6, 173-186.

Capítulo 2

Síntese de análogos lipofílicos do péptido penetrador celular S4₁₃-PV para potencial aplicação em terapia génica

1. Considerações Gerais

1.1. Péptidos Penetradores Celulares

A membrana plasmática atua como uma barreira seletivamente permeável das células vivas, sendo essencial para a realização das normais funções celulares, logo, para a sobrevivência da célula. Ainda que pequenas moléculas ou alguns fármacos com estrutura baseada em proteínas sejam capazes de atravessar esta barreira, a passagem eficiente de moléculas bioativas exógenas através da membrana plasmática permanece um grande desafio para a eficaz atuação de fármacos em alvos intracelulares. Com o objetivo de contornar este obstáculo, foram desenvolvidas diversas estratégias de entrega intracelular, tais como a utilização de vetores virais ou de lipossomas, ou uso de técnicas de microporação ou micropunctura, entre outras. A estas estratégias estão associados, no entanto, danos para as células, toxicidade e imunogenicidade ^[1].

Nos anos 80, Frankel ^[2] e Green ^[3] descobriram que a proteína TAT do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH-1) possuía a capacidade de atravessar membranas celulares, induzindo a transativação do promotor viral ^[4]. Na mesma altura, demonstrou-se que a proteína do homeodomínio de Antennapedia, um fator de transcrição envolvido no desenvolvimento embrionário de patas em artrópodes, da *Drosophila melanogaster*, conseguia penetrar células nervosas, regulando a morfogénese do sistema nervoso ^[5]. Iniciaram-se, assim, estudos de estrutura/atividade com o objetivo de encontrar, para cada uma das proteínas referidas, a sequência de aminoácidos responsável pela capacidade de penetração celular, o que resultou na identificação dos primeiros péptidos penetradores celulares (CPP) descritos na literatura (Tabela 2.1): o péptido TAT, correspondente ao domínio básico da proteína TAT do VIH-1 ^[6] e o péptido *Penetratin*, fragmento do homeodomínio Antennapedia ^[7].

Tabela 2.1 – Origem e sequência de aminoácidos dos dois primeiros CPP descritos na literatura: *Penetratin* e TAT.

Péptido	Origem	Sequência de aminoácidos
<i>Penetratin</i>	homeodomínio Antennapedia ⁽⁴³⁻⁵⁸⁾	RQIKIWFQNRRMKWKK
TAT	Proteína TAT – VIH-1 ⁽⁴⁸⁻⁶⁰⁾	GRKKRRQRRRPPQ

A descoberta de péptidos com a capacidade de atravessar membranas plasmáticas de células eucarióticas, através de um processo não-tóxico e aparentemente independente de recetores ou de consumo de energia, apresentou uma nova alternativa para uma melhor internalização celular de substâncias exógenas. Efetivamente, os CPP são capazes de transportar para o interior de células vivas uma grande variedade de substratos, a eles ligados covalentemente ou não, como, por exemplo, fármacos, péptidos, proteínas, lipossomas, nanopartículas ou ácidos nucleicos ^[8]. Existe, atualmente, uma vasta panóplia de CPP, que podem ser distinguidos quanto à sua origem: péptidos derivados de proteínas, péptidos quiméricos (resultantes da fusão de duas sequências naturais), ou péptidos sintéticos, concebidos com base em estudos experimentais e/ou computacionais de relações estrutura-atividade.

1.2. Classificação de péptidos penetradores celulares

Ainda que existam CPP com uma grande variedade de sequências, é possível dividi-los em três categorias – catiónicos, anfipáticos e hidrofóbicos – de acordo com as suas propriedades físico-químicas. Apesar de estes péptidos serem rapidamente assimilados, as diferentes classes apresentam comportamentos distintos, especialmente no que diz respeito à internalização endocitótica ^[4].

1.2.1. CPP catiónicos

Os CPP catiónicos têm em comum uma sequência rica em aminoácidos básicos, adquirindo assim, em condições fisiológicas, uma carga global positiva elevada. Estes resíduos básicos são responsáveis por uma primeira interação de natureza eletrostática com a membrana plasmática – particularmente, com os polissacáridos e lípidos carregados negativamente – que acaba por conduzir à internalização do péptido na célula. De entre os aminoácidos básicos, a arginina (Arg, R) desempenha um papel particularmente importante, estando associada a uma elevada capacidade de internalização do péptido, provavelmente devido não só à carga, mas também à maior capacidade de estabelecimento de ligações de hidrogénio através do grupo guanidínio lateral, em comparação com o grupo amino lateral da lisina (Lys, K) ^[9]. Exemplos de CPP catiónicos conhecidos incluem, para além do TAT ^[6], o R9 ^[10,11] e o DPV3 ^[12] (Tabela 2.2).

Os CPP catiónicos estão, no entanto, associados à indução de efeitos secundários relacionados com a integridade da membrana plasmática ou a viabilidade da célula ^[10]; ou seja, o uso de CPP catiónicos poderá estar associado a um certo grau de lise celular, o que não será totalmente inesperado, dada a sua semelhança estrutural e funcional com os péptidos antimicrobianos (AMP) catiónicos, que atuam por destabilização da membrana bacteriana e consequente morte celular ^[14].

1.2.2. CPP anfipáticos

Os CPP anfipáticos possuem na sua estrutura, como o nome indica, domínios hidrofílicos e domínios hidrofóbicos. Podem ser (1) derivados de proteínas, ou (2) resultar da combinação de péptidos diferentes, um de carácter hidrofílico, outro de carácter hidrofóbico. Uma combinação descrita na literatura, como conducente a CPP anfipáticos, é a da ligação de um CPP hidrofóbico a um péptido localizador nuclear (NLS, de *nuclear localization signal*), de forma a juntar-se, no mesmo péptido, propriedades de internalização celular e a capacidade de alvejar o núcleo ^[10]. É este o caso do péptido MPG (Tabela 2.2), que resulta da fusão entre o NLS do grande antigénio T do vírus símio 40 (SV-40) – PKKKRKV, e o domínio hidrofóbico da glicoproteína 41 do VIH ^[15]. Outros exemplos de CPP anfipáticos incluem o pVEC ^[16] ou o Pep-1 (Tabela 2.2)^[17].

De entre os CPP anfipáticos, destacam-se aqueles que são ricos em prolina (Pro, P). Este aminoácido hidrofóbico possui características únicas, como a rigidez resultante de ser um aminoácido cíclico, a maior propensão para participar na formação de ligações peptídicas em configuração *cis*, e o facto do seu grupo α -amino ser secundário, estabelecendo com outros aminoácidos ligações amida terciárias, incapazes de atuar como dadoras de pontes de hidrogénio. Em consequência destas características, um péptido rico em prolinas assume uma estrutura secundária em hélice, característica ^[18]. Nesta categoria inclui-se, a título de exemplo, o péptido Bactenecin-7 (Bac7, Tabela 2.2) ^[19].

1.2.3. CPP hidrofóbicos

Quando presentes numa sequência peptídica, os resíduos hidrofóbicos desempenham um papel fundamental na interação com a bicamada lipídica da membrana plasmática, melhorando a translocação do CPP através desta. A presença

de aminoácidos hidrofóbicos aromáticos, como a fenilalanina (Phe, F), a tirosina (Tyr, Y) ou o triptofano (Trp, W) é consideravelmente importante, uma vez que as interações não covalentes entre eletrões π deslocalizados (π - π *stacking*) são cruciais para o desempenho de funções biológicas [20]. O Trp é um resíduo crucial para a internalização desta classe de CPP, estando envolvido em processos de destabilização de membranas. Estudos recentes demonstraram que um aumento do número de resíduos Trp numa sequência aumenta a eficiência na penetração do péptido, sem que a sua afinidade frente a fosfolípidos seja afetada [21]. Ainda assim, um carácter altamente hidrofóbico pode diminuir a eficiência da internalização de um CPP, provavelmente porque este fica retido no interior lipofílico da membrana plasmática. Atualmente, o número de CPP hidrofóbicos descobertos é bastante limitado, estando incluído neste pequeno grupo o péptido PFV (Tabela 2.2) [22].

Tabela 2.2 – Sequências de alguns CPP descritos na literatura e respetiva categoria, de acordo com a classificação referida na secção 1.2..

Péptido	Sequência de Aminoácidos	Categoria
TAT	GRKKRRQRRRPPQ	Catiónico
R9	RRRRRRRRR	
DPV3	RKKRRRESRKKRRRES	
<i>Penetratin</i>	RQIKIWFQNRRMKWKK	Anfipático
MPG	GALFLGWLGAAGSTMGAPKKKRKV	
pVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKRKV	
Bac7	RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPG	
PFV	PFVYLI	Hidrofóbico

1.3. Mecanismos de Penetração Celular

Um dos grandes desafios no campo dos CPP prende-se com a elucidação do seu mecanismo de internalização celular, que permanece um assunto controverso. O facto de este fenómeno ocorrer mesmo a baixas temperaturas fez com que, à partida, fosse excluída a via endocitótica, sugerindo a existência de um mecanismo alternativo, independente de energia. Posteriormente, avaliou-se a capacidade de translocação de enantiómeros D ou péptidos com a sequência invertida, verificando-se que as suas atividades eram similares, excluindo-se assim a hipótese de o mecanismo de internalização estar dependente de recetores presentes nas membranas celulares ^[23].

Como resultado destas observações, começaram a ser propostos vários modelos que pudessem explicar a translocação de CPP através de membranas celulares, com base nas suas interações com fosfolípidos ou outros componentes da membrana ^[24]. Ainda que esta questão não esteja completamente solucionada, são aceites, hoje em dia, duas vias de internalização - endocitose ou translocação membranar direta, podendo estes mecanismos ocorrer para o mesmo péptido, em condições experimentais diferentes ^[25].

1.3.1. *Translocação membranar direta*

Para explicar a translocação direta de CPP através de membranas biológicas, processo independente da disponibilidade de energia, foram propostos três modelos: formação de micelas invertidas, formação de poros membranares e modelo “em carpete” (Figura 2.1).

De acordo com o modelo das micelas invertidas (Figura 2.1.A), a interação do CPP com a membrana plasmática resulta num distúrbio da bicamada lipídica, com a consequente formação de estruturas hexagonais (micelas) invertidas. Os péptidos permanecem retidos no meio hidrofílico do centro da micela, até que a sua interação com os componentes da membrana provoque um processo inverso, resultando na destabilização da micela invertida, e consequente libertação do péptido para o meio intracelular ^[23,24]. Este modelo é aceite para a translocação de péptidos de baixo peso molecular através da bicamada lipídica, sem que seja necessário ultrapassar a barreira energética apresentada pelo seu interior. No entanto, não é compatível com a internalização de péptidos de maior peso molecular, uma vez que a formação de micelas em torno destas moléculas maiores não é favorecida energeticamente ^[24].

Por outro lado, a hipótese de formação de poros membranares (Figura 2.1.B) considera a inserção membranar dos CPP, que se reorganizam para formarem estruturas cilíndricas. Este modelo é aceite para péptidos que assumem uma estrutura de hélice- α anfipática, ou seja, com uma face lipofílica que interage com a bicamada lipídica, e outra face hidrofílica, que se orienta para o centro do poro ^[26].

Por último, de acordo com o modelo “em carpete” (Figura 2.1.C), a translocação dos péptidos ocorre como consequência da sua acumulação na superfície externa da membrana celular, induzindo uma reorganização dos fosfolípidos que proporciona a internalização do péptido ^[26].

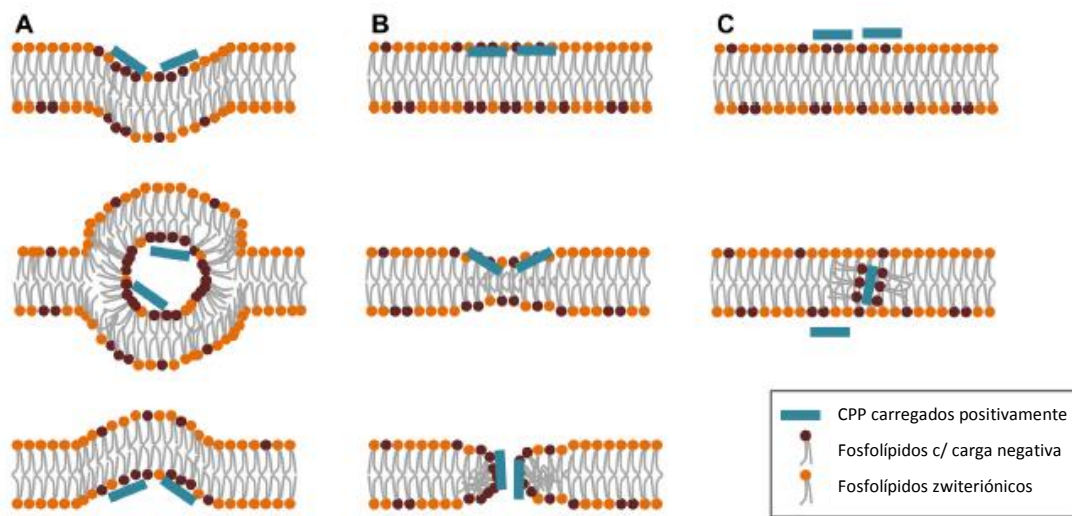


Figura 2.1 – Representação esquemática dos mecanismos propostos para a internalização de um CPP via translocação membranar direta: (A) modelo das micelas invertidas; (B) formação de poros membranares, e (C) modelo “em carpete”. Adaptado de [8].

1.3.2. Endocitose

A internalização de CPP via endocitose consiste em dois passos: penetração endocítica, seguida da evasão do endossoma. Este último passo é fundamental, não só para evitar a degradação do péptido (bem como de moléculas a ele conjugadas), mas também para permitir que este atinja o seu alvo, exercendo a atividade biológica pretendida. A endocitose é o mecanismo mais aceite para a internalização de péptidos, estando atualmente descritas três diferentes vias endocitóticas para a ocorrência deste fenómeno (Figura 2.2): macropinocitose, endocitose mediada pela clatrina e endocitose mediada por cavéolas [8].

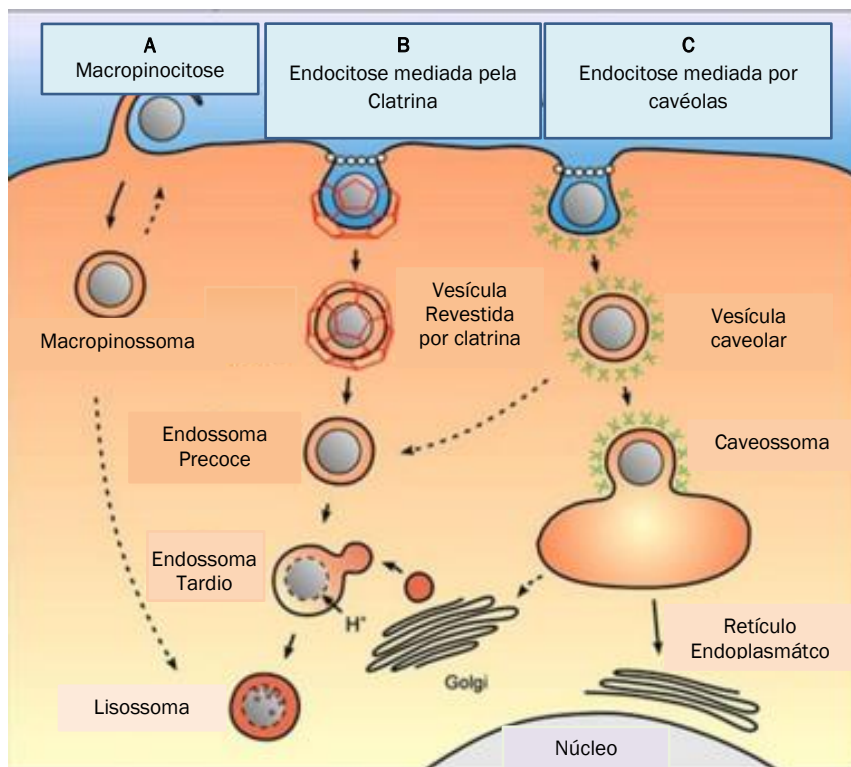


Figura 2.2 – Internalização de um CPP por via endocitótica. Adaptado de [27].

No caso particular da aplicação de CPP à veiculação de fármacos, será provavelmente preferível uma translocação membranar direta, uma vez que este mecanismo permitirá evitar a retenção do conjugado CPP-fármaco nos endossomas [28]. Ainda assim, os mecanismos atrás referidos como possivelmente associados à translocação de CPP implicam uma elevada destabilização da membrana celular, o que torna difícil explicar a baixa citotoxicidade associada a este tipo de péptidos e

seus conjugados. Ou seja, nenhum dos modelos acima descritos explica inteiramente os dados experimentais obtidos para diferentes CPP, o que sugere que exista(m), para além destes, outro(s) mecanismo(s) de internalização de CPP ^[24].

1.4. CPP aplicados à terapia génica

A terapia génica foi descrita pela primeira vez nos anos 70 e tem como principal objetivo a inserção de genes terapêuticos no núcleo de células alvo, de forma a promover a expressão correta de um produto genético que esteja a ser expresso de forma incorreta ou deficiente ^[29]. Uma das limitações deste tipo de tratamento prende-se com a dificuldade de desenvolver vetores seguros e eficientes, capazes de promover e sustentar localmente a expressão genética por longos períodos de tempo ^[30].

Os vetores virais são os mais comumente usados em terapia génica, uma vez que apresentam algumas vantagens frente a outros vetores, como os elevados níveis de transdução e, em alguns casos, a integração estável e eficiente de ADN exógeno na célula alvo. No entanto, a estes vetores estão também associados alguns problemas, como imunogenicidade, toxicidade, dificuldade de produção em larga escala, e os riscos de indução de mutações oncogénicas ou de formação de partículas virais ativas através de mecanismos recombinantes ^[31]. Com o objetivo de contornar estes obstáculos, começaram a ser desenvolvidos novos vetores não virais de entrega genética, como nanopartículas, polímeros, lipossomas e CPP. Neste contexto, a utilização de CPP é particularmente interessante, uma vez que os péptidos são capazes de se conjugar a ácidos nucleicos, covalentemente ou não, possibilitando o transporte de carga genética para o interior do núcleo celular ^[24].

1.5. O péptido S4₁₃-PV em terapia génica

As dermaseptinas constituem uma família de AMP que são expressos na pele de rãs pertencentes ao género *Phyllomedusa*. Estes AMP caracterizam-se por serem policatiónicos (ricos em lisinas) e apresentarem atividade citolítica frente a um largo espectro de microorganismos patogénicos, como bactérias e fungos; esta atividade é mediada pela interação do péptido, adotando uma conformação em hélice- α anfipática, com fosfolípidos da membrana plasmática do patógeno ^[32].

O péptido S4₁₃ é um fragmento de 13 aminoácidos derivado da dermaseptina S4, que apresenta atividade antimicrobiana associada a uma baixa atividade hemolítica, aliada à capacidade de penetrar eficientemente a membrana plasmática [33]. Tendo em conta que este é um péptido curto, de peso molecular relativamente baixo, esperava-se que fosse capaz de se difundir livremente através dos poros nucleares, acumulando-se no núcleo das células alvo, o que não se observou. Pelo contrário, após atravessar facilmente a membrana plasmática, este péptido fica retido no citoplasma. Assim, com o objetivo de conferir a capacidade de penetração nuclear ao péptido S4₁₃, este foi conjugado com a sequência NLS do grande antigénio T do vírus símio 40 (SV-40), um vírus potencialmente oncogénico encontrado em símios e humanos. Esta conjugação deu origem ao péptido quimérico S4₁₃-PV (Figura 2.3), que não só manteve a propriedade de permear a membrana plasmática, mas também adquiriu a capacidade de penetrar o núcleo celular de uma forma rápida, eficiente e não tóxica [34].

A L W K T L L K K V L K A P K K R K V C

Figura 2.3 – Sequência de aminoácidos do péptido quimérico S4₁₃-PV, constituído pelo péptido S4₁₃, representado a azul, e pelo NLS SV-40, representado a cinzento.

A internalização do S4₁₃-PV ocorre através de dois mecanismos distintos: a baixas concentrações, este processo ocorre por um mecanismo endocitótico, dependente de glicosaminoglicanos; por outro lado, a elevadas concentrações de péptido, a internalização ocorre via translocação membranar direta, independente de energia [35].

Considerando a capacidade de translocação membranar do péptido S4₁₃-PV, Trabelo *et al.* avaliaram o seu potencial como vetor de entrega intracelular de ADN plasmídico, para futuras aplicações em terapia génica [36]. Efetivamente, o péptido demonstrou a capacidade de entregar ADN plasmídico de forma eficiente, realçando assim a possibilidade de utilização de CPP, neste caso o péptido quimérico S4₁₃-PV, como vetores em terapia génica.

1.6. Modificação de CPP com ácidos gordos

Em 2001, Futaki *et al.* avaliaram o efeito, na capacidade de translocação membranar, da modificação de CPP previamente estudados (como, por exemplo, o péptido TAT) com ácidos gordos. De acordo com os resultados publicados, a modificação de CPP com cadeias lipofílicas, especialmente com o ácido esteárico, parece aumentar drasticamente a capacidade de penetração celular, provavelmente porque a inserção de uma cadeia hidrofóbica permite uma maior perturbação das paredes dos endossomas, promovendo a sua rutura ^[37]. Desde então, diversos estudos têm surgido no sentido de avaliar CPP modificados com o ácido esteárico no que se refere à sua capacidade penetração celular e de entrega intracelular de moléculas bioativas como, por exemplo, ácido ribonucleico interferente pequeno (SiRNA, do inglês *Small Interference Ribonucleic Acid*) ^[38-41].

2. Objetivo

O trabalho experimental realizado teve como objetivo principal a síntese de derivados lipofílicos do péptido penetrador celular S4₁₃-PV (Figura 2.4), a fim de se averiguar, posteriormente, se estas modificações podem conduzir a uma melhor capacidade de entrega intracelular de ADN plasmídico.

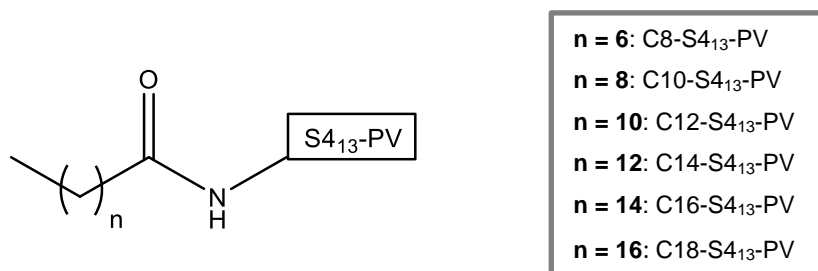


Figura 2.4 – Derivados lipofílicos do péptido S4₁₃-PV sintetizados no âmbito do trabalho.

Pretendeu-se, também, sintetizar dois péptidos baseados na sequência S4₁₃-PV Scrambled (KTLKVAKWLKKAKPLRKLVKC), resultante da reordenação aleatória dos aminoácidos constituintes do péptido S4₁₃-PV. Os dois péptidos, produzidos para usar como controlos em ensaios biológicos posteriores, corresponderam a derivados *N*-acilados do S4₁₃-PV Scr, o primeiro (Figura 2.5.A) com o grupo acetilo, e o segundo (Figura 2.5.B) com o grupo dodecilo (lauroílo).

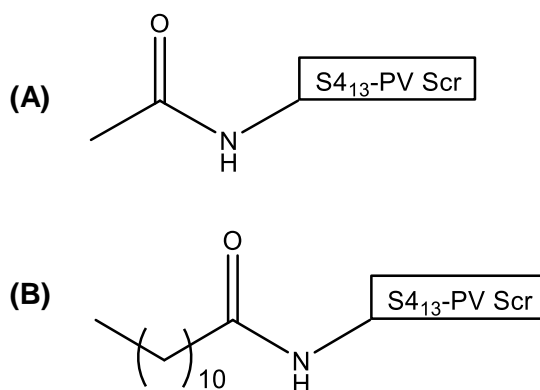


Figura 2.5 – Péptidos *N*-acetil-S4₁₃-PV (A) e *N*-lauroil-S4₁₃-PV (B).

3. Resultados e Discussão

3.1. Síntese de derivados lipofílicos do CPP S₄₁₃-PV

Começou-se por construir o péptido S₄₁₃-PV (ALWKTLLKKVLKAPKKKRKVC, 2480 g/mol) por SPPS, utilizando um esquema de proteção ortogonal Fmoc/^tBu. Como suporte sólido foi utilizada a resina Fmoc-Rink Amide MBHA (0,38 mmol/g), que consiste num polímero-base de poliestireno reticulado com 1% de divinilbenzeno (PS-DVB) e modificado com grupos do tipo metilbenzidrilamina, por sua vez conjugados com o espaçador bifuncional ácido *p*-[(*R,S*)- α -[1-(9H-fluoren-9-il)-metoxiformamido]-2,4-dimetoxibenzil]fenoxiacético (Fmoc-Rink), através do aminoácido norleucina (Nle) (Figura 2.6).

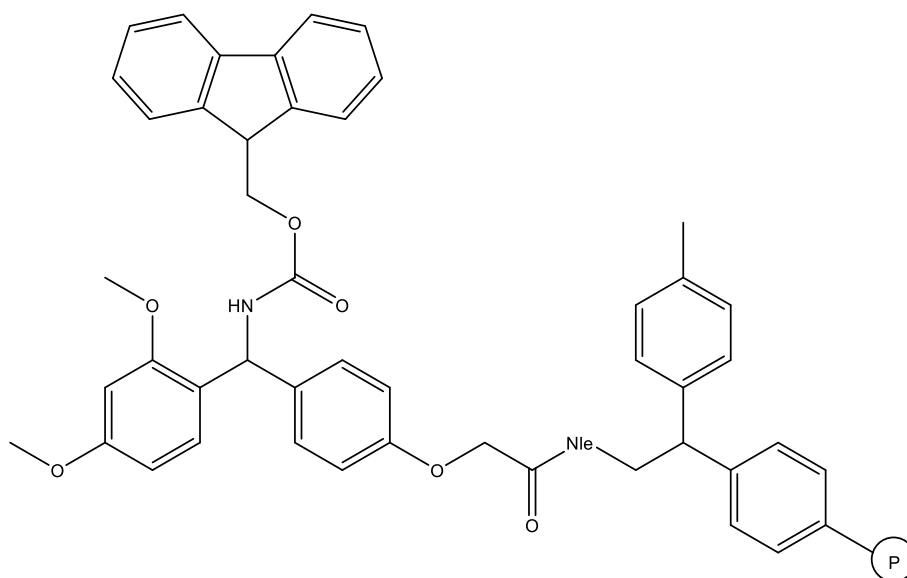


Figura 2.6 – Estrutura da resina Fmoc-Rink Amide MBHA (o círculo com a letra P representa o polímero PS-DVB).

O grupo Fmoc do espaçador foi inicialmente removido com uma solução de piperidina a 20% em DMF, seguindo-se a lavagem da resina, com DMF e DCM, com o objetivo de remover reagente em excesso e produtos da reação de desproteção. Ao grupo amino do espaçador acoplou-se o primeiro aminoácido da sequência (*C*-terminal) *N*^o-Fmoc-protegido (Fmoc-AA-OH), utilizando como agente de condensação HBTU, na presença de DIEA. O alongamento da cadeia peptídica foi realizado através de ciclos repetitivos de reações de desproteção e acoplamento, que foram

intercaladas com lavagens da resina com DMF e DCM e monitorizadas pelo teste de Kaiser. Sempre que este teste revelou que a reação não havia sido completa, a mesma foi repetida. Assim, quando foi necessário repetir o acoplamento de um aminoácido, substituiu-se o HBTU por HATU, geralmente mais eficiente ^[42]. Nas repetições de ciclos de desproteção, usou-se uma solução de piperidina a 50% em DMF.

Terminada a construção da sequência peptídica, recolheu-se uma alíquota da peptidil-resina para posterior clivagem e análise da sequência S4₁₃-PV construída, e procedeu-se à divisão da restante resina em seis frações iguais. A cada uma destas frações acoplou-se um ácido gordo diferente, utilizando como agentes de acoplamento PyBOP e DIEA, dissolvidos em DMF. Completou-se, assim, a construção dos seis derivados lipofílicos do péptido S4₁₃-PV (tabela 2.3) em fase sólida.

Tabela 2.3 – Derivados lipofílicos do péptido S4₁₃-PV sintetizados.

Ácido Gordo	Lipopéptido	Massa molar/g.mol ⁻¹
Ácido octanoico (caprílico)	C8-S4 ₁₃ -PV	2606
Ácido decanoico (cáprico)	C10-S4 ₁₃ -PV	2634
Ácido dodecanoico (láurico)	C12-S4 ₁₃ -PV	2662
Ácido tetradecanoico (mirístico)	C14-S4 ₁₃ -PV	2690
Ácido hexadecanoico (palmítico)	C16-S4 ₁₃ -PV	2718
Ácido octadecanoico (esteárico)	C18-S4 ₁₃ -PV	2746

Procedeu-se, depois, à clivagem de todas as peptidil-resinas, por acidólise com um *cocktail* de clivagem constituído por TFA (90%), TIS (2,5%) e H₂O (2,5%). Após a clivagem, os produtos brutos de síntese foram isolados de acordo com o procedimento descrito na secção 4.6, e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e por espetrometria de massa com ionização por eletro-nebulização e deteção por armadilha de iões (ESI-IT MS), com o objetivo de determinar, respetivamente, o grau de pureza e massa molecular de cada péptido bruto.

A título de exemplo, mostram-se os cromatogramas e espectros de massa obtidos para o péptido Fmoc-S4₁₃-PV (Figuras 2.7 e 2.8, respetivamente) e para o seu derivado C8-S4₁₃-PV (Figuras 2.9 e 2.10).

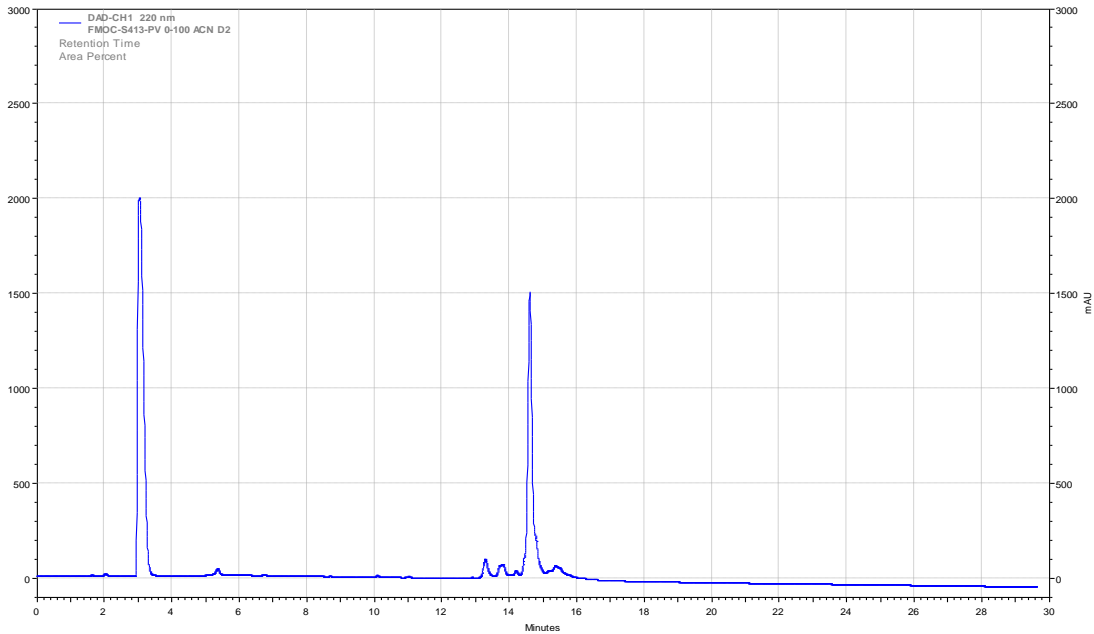


Figura 2.7 – Cromatograma obtido para o péptido-base Fmoc-S4₁₃-PV, com uma eluição de 0-100% ACN em água (com 0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.

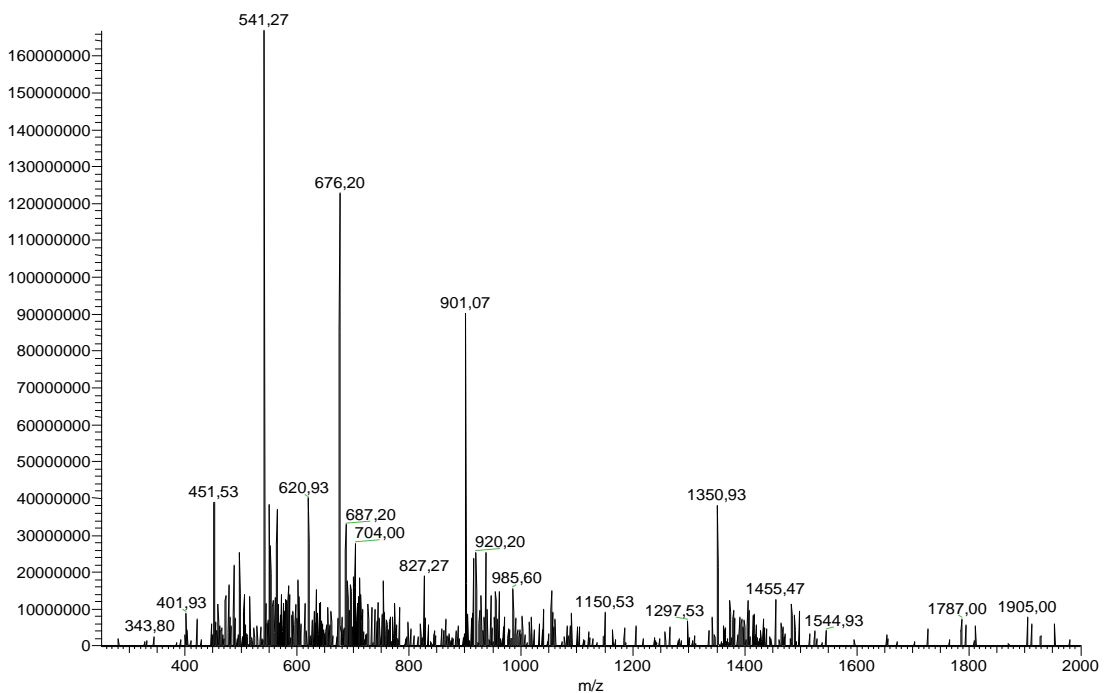


Figura 2.8 – Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido Fmoc-S4₁₃-PV, correspondente ao pico de maior intensidade do cromatograma anterior (Figura 2.7).

Tabela 2.4 – Adutos do péptido-base Fmoc-S4₁₃-PV com iões H⁺, detetados por ESI-IT MS.

Adutos	m/z esperado	m/z observado
P + 2H⁺	1352,00	1350,93
P + 3H⁺	901,66	901,07
P + 4H⁺	676,50	676,20
P + 5H⁺	541,40	541,27
P + 6H⁺	451,33	451, 53

Como se pode verificar na figura 2.7, o cromatograma do péptido Fmoc-S4₁₃-PV revela um pico bastante intenso, com um $t_r = 14,9$ minutos, que se verificou corresponder ao produto esperado por ESI-IT MS (Figura 2.8). Efetivamente, no espetro de massa deste péptido (peso molecular 2702 g/mol) surgem diversos picos, que correspondem a moléculas do péptido-alvo com diferentes graus de protonação (Tabela 2.4).

Da mesma forma, o cromatograma do péptido C8-S4₁₃-PV (Figura 2.9) apresenta um pico principal com $t_r = 14,9$ minutos, correspondente ao péptido esperado, conforme se comprovou por análise de massa (Figura 2.10). Também neste caso, foi possível observar vários picos, correspondentes a moléculas do péptido-alvo com diferentes graus de protonação (Tabela 2.5).

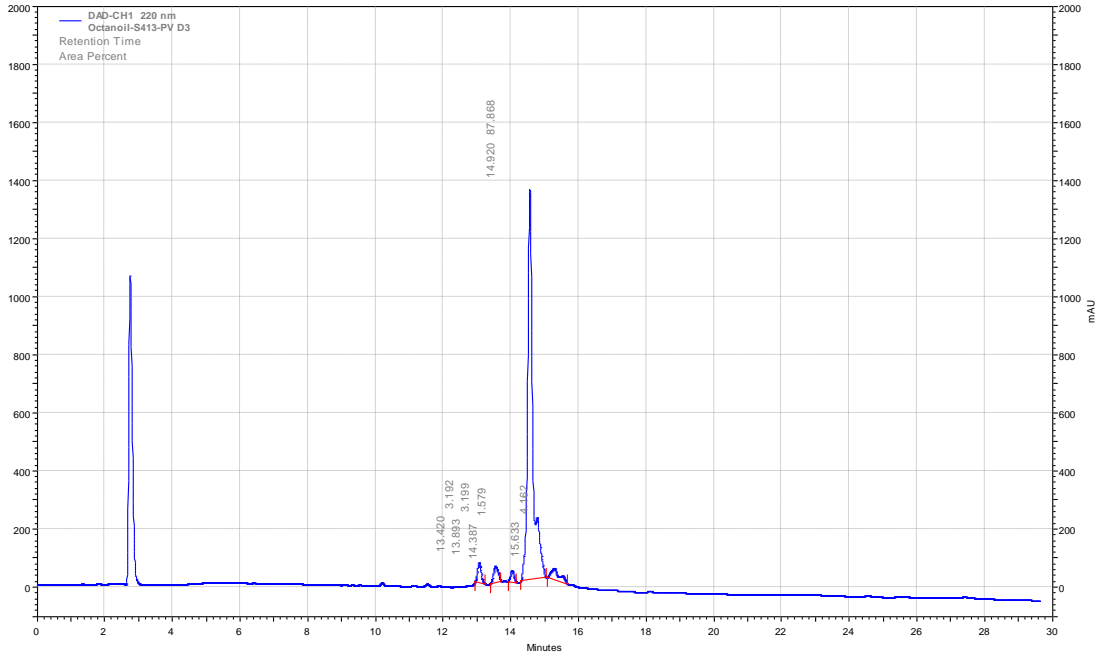


Figura 2.9 - Cromatograma obtido para o péptido C8-S4₁₃-PV, com uma eluição de 0-100% ACN em água (com 0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.

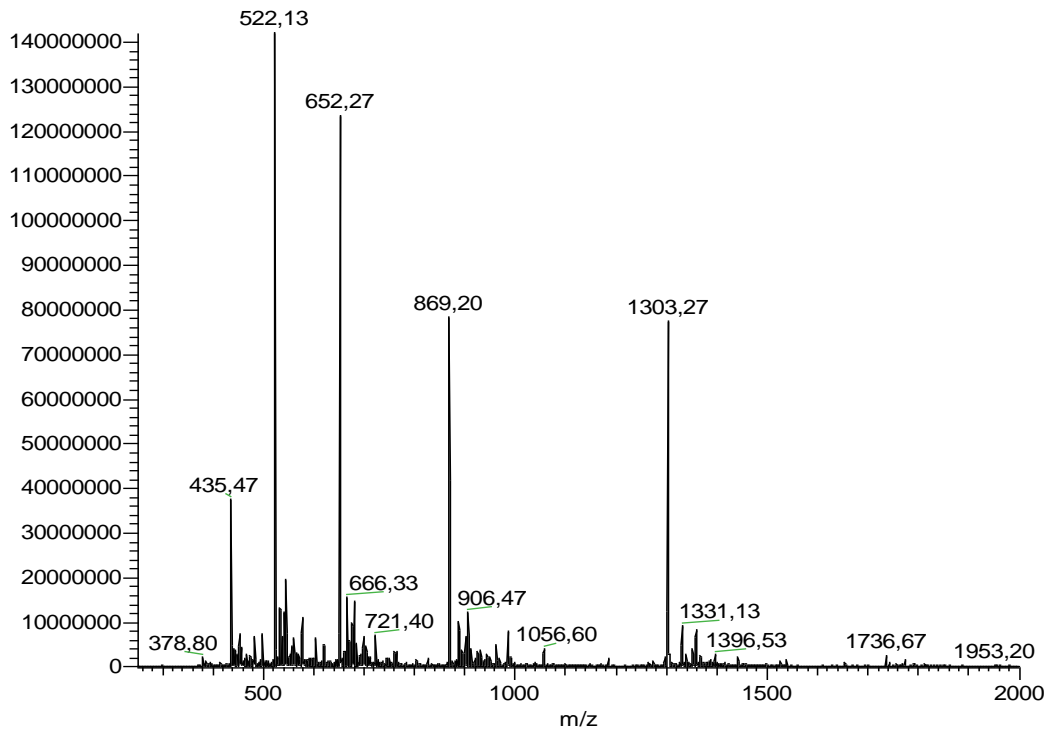


Figura 2.10 – Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C8-S4₁₃-PV bruto.

Tabela 2.5 – Adutos do péptido C8-S4₁₃-PV com iões H⁺, detetados por ESI-IT MS.

Adutos	m/z esperado	m/z observado
P + 2H⁺	1304,00	1303,27
P + 3H⁺	869,70	869,20
P + 4H⁺	652,50	652,27
P + 5H⁺	522,20	522,13
P + 6H⁺	435,30	435,47

A análise do péptido bruto por HPLC permitiu, também, constatar que o grau de pureza do mesmo era de 87,9%, um pouco abaixo do mínimo desejado (90%). As impurezas presentes seriam, provavelmente, correspondentes a sequências de deleção, já que também podem ser observadas no cromatograma correspondente ao péptido-base (S4₁₃-PV). Após otimização, por HPLC, do gradiente apropriado para a purificação do péptido, o produto bruto foi submetido a separação por cromatografia líquida de fase reversa a média pressão (RP-MPLC), utilizando uma eluição em gradiente de 15-45% ACN em água (com 0,05% TFA). O péptido purificado foi novamente analisado por HPLC, determinando-se um grau de pureza final de 97,1% (Figura 2.11), e foi finalmente liofilizado para posterior envio para ensaios biológicos.

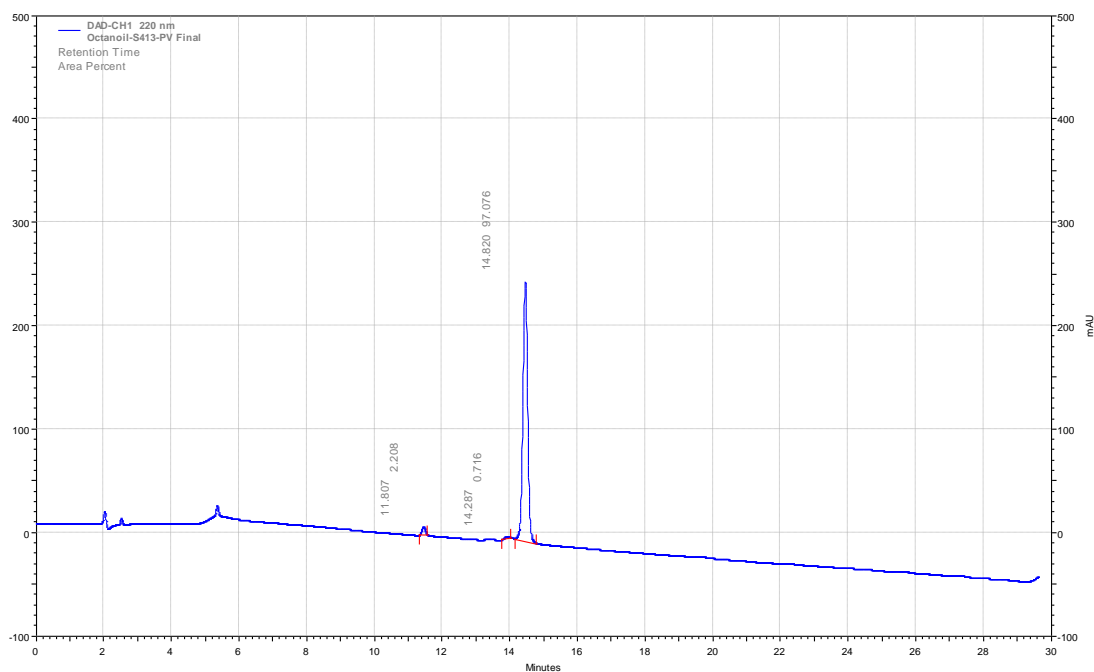


Figura 2.11 – Cromatograma obtido pela análise do péptido C8-S4₁₃-PV purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.

Este procedimento foi idêntico para todos os lipopéptidos produzidos (Tabela 2.3), que foram obtidos com dados cromatográficos e espetroscópicos corretos (Anexos), e com os graus de pureza e rendimentos globais de síntese constantes da Tabela 2.6.

Tabela 2.6 – Resumo dos resultados experimentais da síntese dos derivados lipofílicos do péptido S4₁₃-PV.

Péptido	M. Molar / g.mol ⁻¹	Massa / mg	Pureza / %	Rendimento / %
C8-S4 ₁₃ -PV	2606	25,1	97,1	27,5
C10-S4 ₁₃ -PV	2634	27,4	98,8	29,7
C12-S4 ₁₃ -PV	2662	13,6	97,6	14,6
C14-S4 ₁₃ -PV	2690	27,3	96,1	29,0
C16-S4 ₁₃ -PV	2718	12,0	97,2	12,6
C18-S4 ₁₃ -PV	2746	21,6	98,7	22,5

3.2. Síntese de Derivados do Péptido S4₁₃-PV Scrambled

O péptido S4₁₃-PV Scrambled (KTLKVAKWLKKAKPLRKLVKC, 2480 g/mol) foi construído por SPPS, utilizando-se um esquema de proteção ortogonal Fmoc/^tBu. Como suporte sólido foi utilizada igualmente a resina Fmoc-Rink Amide MBHA, com uma funcionalização de 0,38 mmol/g.

A síntese da sequência peptídica foi realizada de forma semelhante à síntese do péptido S4₁₃-PV (secção 3.1) e, terminado o alongamento da cadeia, procedeu-se à divisão da resina em duas frações que foram, posteriormente, *N*-aciladas (tabela 2.7).

O péptido Ac-S4₁₃-PV Scr foi o resultado da *N*-acilação do péptido-base, com anidrido acético e DIEA, em *N*-metilpirrolidona (NMP). Para a síntese do derivado C12-S4₁₃-PV Scr, procedeu-se ao acoplamento do ácido dodecanóico ao grupo amino *N*-terminal da restante fração do péptido S4₁₃-PV Scr, utilizando PyBOP como agente de condensação, na presença de DIEA.

Tabela 2.7 – Peso molecular dos derivados do péptido S4₁₃-PV Scr

Agente de acilação adicionado ao péptido S4 ₁₃ -PV	Péptido <i>N</i> -acilado	M. Molar / g.mol ⁻¹
Ácido Láurico	C12-S4 ₁₃ -PV Scr	2662
Anidrido Acético	Ac-S4 ₁₃ -PV Scr	2521

Terminadas as modificações do péptido-base, procedeu-se à clivagem das peptidil-resinas por acidólise, com um *cocktail* de clivagem constituído por TFA (90%), TIS (2,5%) e H₂O (2,5%). Após a clivagem, os produtos brutos de síntese foram isolados de acordo com o procedimento descrito na secção 4.3, e analisados por HPLC e ESI-IT MS, com o objetivo de determinar, respetivamente, o grau de pureza e massa molecular de cada péptido bruto.

A título de exemplo, mostram-se o cromatograma e espetro de massa obtidos para o péptido Ac-S4₁₃-PV Scr (Figuras 2.12 e 2.13, respetivamente).

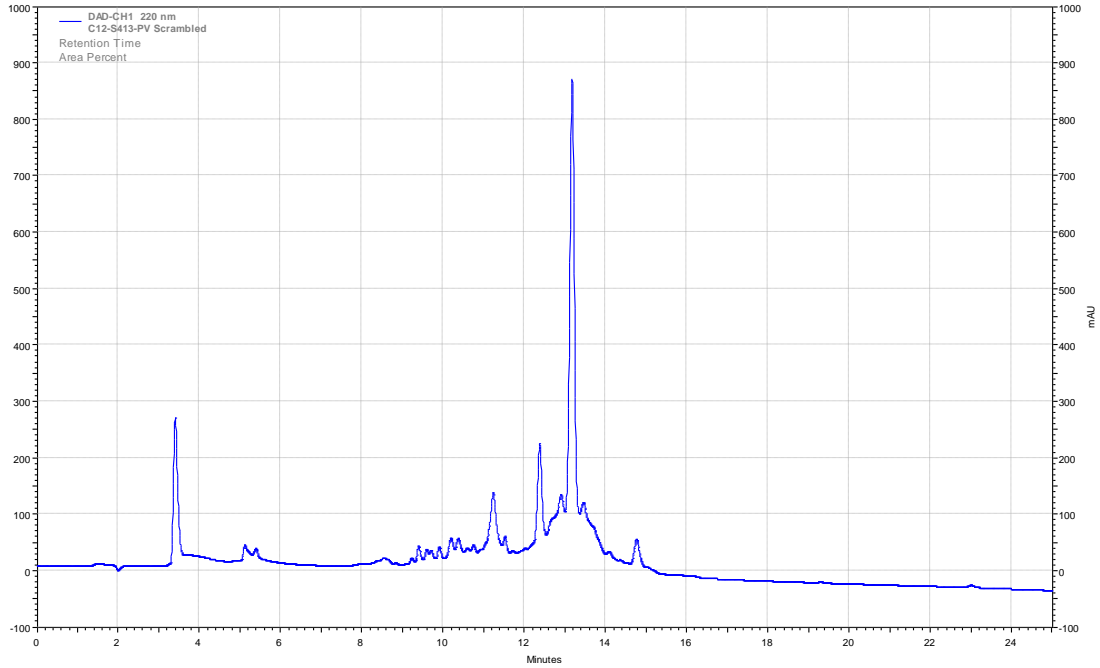


Figura 2.12 – Cromatograma obtido para o péptido Ac-S4₁₃-PV Scr, com uma eluição de 0-100% ACN em água (com 0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.

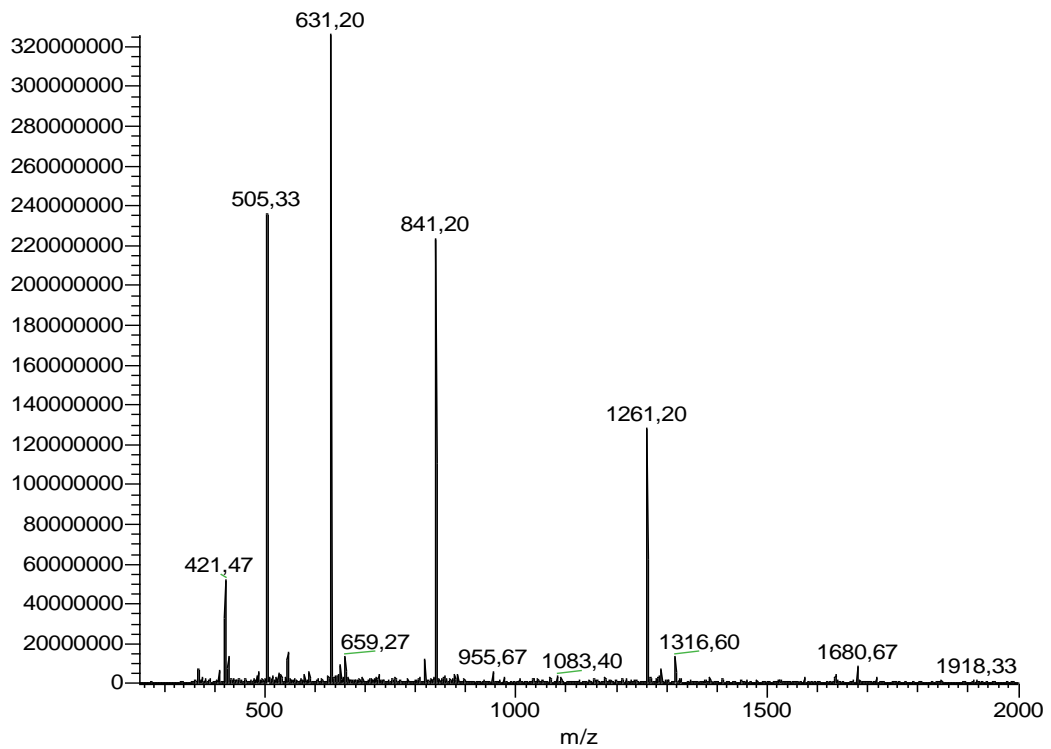


Figura 2.13 – Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido Ac-S4₁₃-PV Scr.

Tabela 2.8 - Adutos do péptido Ac-S4₁₃-PV Scr com iões H⁺ detetados por ESI-IT MS.

Adutos	m/z esperado	m/z observado
P + 2H⁺	1261,50	1261,20
P + 3H⁺	841,33	841,20
P + 4H⁺	631,25	631,20
P + 5H⁺	505,20	505,33
P + 6H⁺	421,17	421,47

O cromatograma do péptido Ac-S4₁₃-PV Scr (Figura 2.12) revela um pico bastante intenso, com um $t_r = 13,8$ minutos, que se verificou corresponder ao produto esperado por ESI-IT MS (Figura 2.13). No espetro de massa deste péptido (peso molecular 2521 g/mol) surgem diversos picos, que correspondem a moléculas do péptido-alvo com diferentes graus de protonação (Tabela 2.8).

Analisando o cromatograma obtido, pode concluir-se que o péptido não se encontrava suficientemente puro (<90%), sendo necessário proceder-se à sua purificação. Após otimização, por HPLC, do gradiente apropriado para a purificação do péptido, o produto bruto foi submetido a separação por RP-MPLC, utilizando uma eluição em gradiente de 15-45% ACN em água (com 0,05% TFA). O péptido purificado foi novamente analisado por HPLC, determinando-se um grau de pureza final de 98,5% (Figura 2.14), e foi finalmente liofilizado para posterior envio para ensaios biológicos.

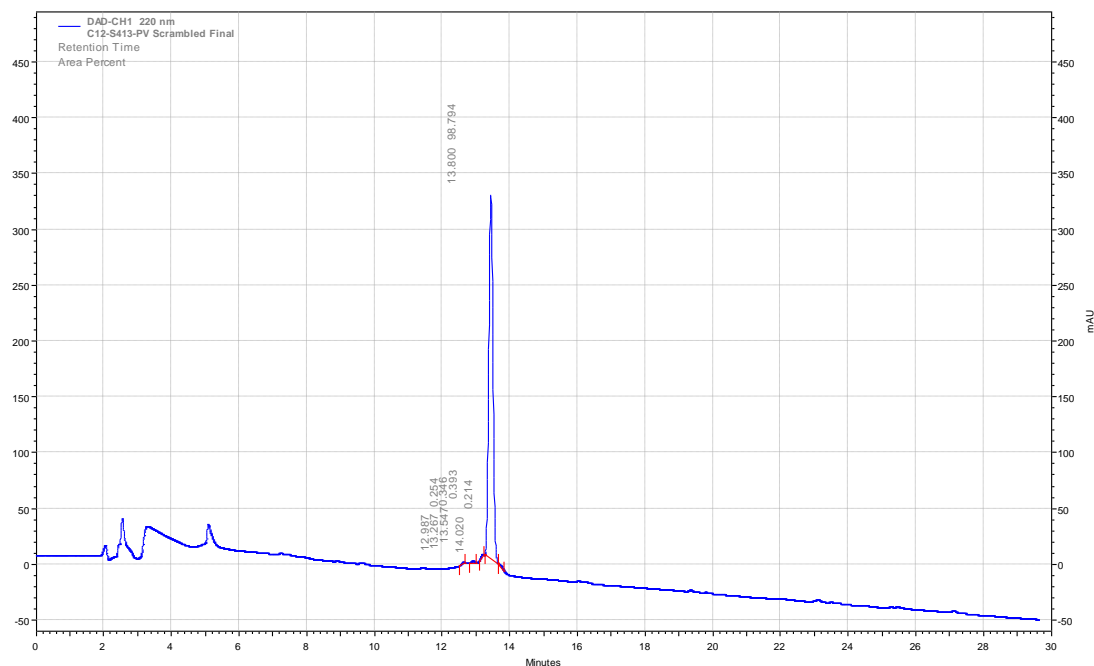


Figura 2.14 –Cromatograma obtido para o péptido Ac-S4₁₃-PV Scr purificado, com uma eluição de 0-100% ACN em água (com 0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ=220 nm.

Os dados cromatográficos e espectroscópicos foram também obtidos para o péptido C12-S4₁₃-PV Scrambled, constando na tabela 2.9 o grau de pureza e rendimento global de síntese dos derivados *N*-acilados do péptido S4₁₃-PV Scrambled.

Tabela 2.9 – Resumo dos resultados experimentais da síntese dos derivados lipofílicos do péptido S4₁₃-PV.

Péptido	P. Mol. / g.mol ⁻¹	Massa / mg	Pureza / %	Rendimento / %
C12-S4 ₁₃ -PV Scr	2662	36,0	98,8	13,5
Ac-S4 ₁₃ -PV Scr	2521	17,0	98,5	6,7

4. Procedimento Experimental

4.1. Montagem Experimental

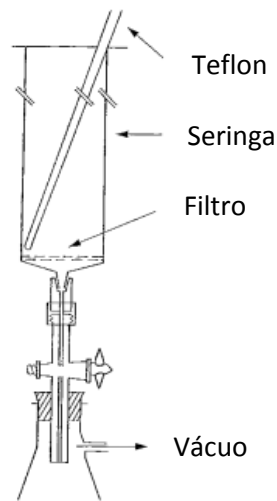


Figura 2.15 – Montagem experimental aplicável à SPPS manual.

4.2. Reagentes e Equipamentos Utilizados

Os reagentes e solventes utilizados no âmbito deste trabalho foram da marca na Novabiochem (Fmoc-Aminoácidos, resina), Sigma-Aldrich (agentes de acoplamento, piperidina, DIEA) e Merck (TFA, solventes).

As análises ESI-IT MS foram realizadas sobre soluções dos produtos em metanol (LC-MS grade) num equipamento Finnigan Surveyor LCQ DECA XP MAX, no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (DQB-FCUP).

No decorrer do trabalho, os péptidos-alvo foram purificados por RP-MPLC, usando-se uma fase estacionária do tipo octadecil-silano Vydac® 218TP, da Grace Vydac.

A pureza dos compostos foi avaliada por HPLC, num equipamento Merck-Hitachi LaChrom Elite dotado de bomba quaternária, injetor automático termostaticado por efeito peltier e detetor de diodos. Usou-se uma coluna de fase reversa (octadecilsilano) Purospher star RP C-18 de 125 x 4,0 mm e 5 µm (diâmetro de partícula). Foi realizada uma eluição gradiente com acetonitrilo / água + 0,05% TFA.

Os péptidos purificados foram liofilizados num equipamento BenchTop Pro with omnitronics SP Scientific.

4.3. Preparação da Resina

Após a preparação da montagem experimental (Figura 2.15), colocou-se a resina seca (Fmoc-Rink-MBHA 0,25 mmol; 0,66 g) na seringa, à qual se adicionou DMF, mantendo a mistura sob agitação durante 20 minutos. Filtrou-se a resina e foi-lhe adicionado DCM, que foi rejeitado 20 minutos mais tarde. Procedeu-se então à remoção do grupo Fmoc com uma solução de piperidina a 20% em DMF (3 mL, 1 x 1' + 1 x 20'), mantendo-se a mistura sob agitação. Após a desproteção de 20 minutos, lavou-se a resina com DMF (3 mL, 3 x 1') e DCM (3 mL, 3 x 1'), foram retirados alguns grãos da mesma e efetuou-se o teste de Kaiser. Quando o resultado foi positivo (solução azul escura), avançou-se para a construção da cadeia peptídica.

4.4. Ciclos de Desproteção e Acoplamento de Aminoácidos

Preparou-se uma solução de Fmoc-AA-OH (5,0 eq.), HBTU (5,0 eq.) e DIEA (10,0 eq) em DMF (3 mL) e adicionou-se à resina, previamente desprotegida, permanecendo a mistura sob agitação durante 1 hora. Terminado o tempo de reação, filtrou-se a resina, que foi posteriormente lavada com DMF (3 mL, 3 x 1') e DCM (3 mL, 3 x 1'). Com alguns grãos, efetuou-se o teste de Kaiser e, quando o resultado foi negativo (solução amarela), prosseguiu-se para a desproteção da peptidil-resina, com uma solução de piperidina a 20% em DMF (3 mL, 1 x 1' + 1 x 20'). Terminada a reação de desproteção, efetuou-se o teste de Kaiser e, quando o resultado foi positivo, procedeu-se ao acoplamento do aminoácido seguinte, nas condições anteriormente referidas. A construção da sequência peptídica foi realizada através de diversos ciclos de desproteção e acoplamento.

Na eventualidade de serem necessárias mais do que duas repetições de um dado passo, para que o teste de Kaiser desse o resultado desejado, as condições da reação de desproteção e acoplamento foram alteradas. Nesses casos, a desproteção dos Fmoc-Aminoácidos foi realizada com piperidina a 50% em DMF (15') e, nas reações de acoplamento, o HBTU foi substituído pelo HATU, mantendo-se as restantes condições da reação.

4.5. Acilação do Aminoácido N-terminal

Terminado o alongamento da cadeia peptídica, procedeu-se à divisão da resina em 7 frações, tendo sido 6 delas modificadas com um ácido gordo diferente. Para tal, promoveu-se a desproteção do aminoácido Nt e preparou-se uma solução do ácido gordo relevante (5,0 eq.), PyBOP (5,0 eq.) e DIEA (10,0 eq.), em DMF (3 mL), a qual

foi adicionada à peptidil-resina, permanecendo a mistura sob agitação durante 1 hora. Terminada a reação, efetuou-se o teste de Kaiser e, perante um resultado negativo (solução amarela), procedeu-se à clivagem do péptido.

4.6. Clivagem do Péptido e Desproteção das Cadeias Laterais

Na *hotte*, preparou-se o *cocktail* de clivagem (95% TFA, 5% TIS e 5% H₂O). Transferiram-se porções de 100 mg de peptidil-resina seca para tubos de *falcon* de 15 mL e transferiu-se 1 mL de *cocktail* de clivagem para cada tubo, deixando-se a mistura sob agitação contínua durante 2 horas. Na *hotte*, fez-se uma montagem para filtração sob vácuo, utilizando um funil de placa porosa D4 e, após as 2 horas de reação, verteu-se a mistura contida nos tubos de *falcon* para o funil, ficando o péptido solúvel no filtrado. Dividiu-se o filtrado em porções de 2 mL, em tubos de *falcon*, perfazendo o volume de 15 mL com éter etílico seco. Após alguns minutos no congelador, centrifugou-se a mistura e decantou-se o líquido sobrenadante para um matraz com rolha. A adição de éter etílico seco e posterior centrifugação e decantação foram realizadas mais três vezes e, finalmente, os tubos foram colocados no exsiccador. Ao líquido sobrenadante foram efetuadas extrações líquido-líquido, com o objetivo de se recuperar algum péptido que tivesse ficado dissolvido no éter. Para isso, lavou-se a camada orgânica três vezes com água (0,05% TFA) (~10 mL) e, por fim, liofilizou-se a camada aquosa, juntando-se a fração obtida ao produto isolado anteriormente por centrifugação.

O péptido foi dissolvido numa solução de ácido acético a 10% e analisado por HPLC e ESI-IT MS. Todos os péptidos obtidos foram purificados por RP-MPLC, com uma eluição em gradiente de 15-45% ACN em H₂O (0,05% TFA). Depois de isoladas e combinadas as frações contendo o péptido puro, a solução final de péptido foi dividida em tubos de *falcon* (45 mL), que foram posteriormente colocados no congelador, consistindo o último passo na liofilização do péptido purificado.

5. Bibliografia

- [1] R. Tréhin, H. P. Merkle, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *58*, 209-223.
- [2] A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell* **1988**, *55*, 1189-1193.
- [3] M. Green, P.M. Lowenstein, *Cell* **1988**, *55*, 1179-1188.
- [4] E. Koren, V. P. Torchilin, *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 7, 385-393.
- [5] A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 1864-1868.
- [6] E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010-16017.
- [7] D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444-10450.
- [8] C. Bechara, S. Sagan, *FEBS Letters* **2013**, *587*, 1693-1792.
- [9] D. J. Mitchel, D. T. Kim, L. Steinman, C. G. Fathman, J. B. Rothbard, *J. Pep. Res.* **2000**, *56*, 318-325.
- [10] D. J. Mitchell, D. T. Kim, L. Steinman, C. J. Fathman, J. B. Rothbard, *J. Pep. Res.* **2000**, *56*, 318-325.
- [11] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, **(2001)** *J. Biol. Chem.*, *276*, 5836-5840.
- [12] C. Coupade, A. Fittipaldi, V. Chagnas, M. Michel, S. Carlier, E. Tasciotti, A. Darmon, D. Ravel, J. Kearsey, M. Giacca, F. Cailler, *Biochem. J.* **2005**, *390*, 407-418.
- [13] F. Wang, Y. Wang, X. Zhang, W. Zhang, S. Guo, F. Jin, *J. Con. Rel.* **2014**, *174*, 126-136
- [14] W. Verdeumen, R. Brock, *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *32*, 2.
- [15] S. Deshayes, T. Plenat, G. Aldrian-Herrada, G. Divita, C. Grimellec, F. Heitz, *Biochemistry* **2004**, *43*, 7698-7706.
- [16] Y. H. Nan, I. S. Park, K. S. Hahm, S. Y. Shin, *J. Pep. Sci.* **2011**, *17*, 812-817.
- [17] M. C. Morris, S. Deshayes, F. Heitz, G. Divita, *Biol. Cell* **2008**, *100*, 201-217.

- [18] F. Milletti, *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 15-16.
- [19] K. Sadler, K.D. Eom, J-L. Yang, Y. Dimitrova, J. P. Tam, *Biochemistry* **2002**, *41*, 14150-14157.
- [20] L. M. Salonen, M. Ellermann, F. Diederich, *Ang. Chem. Int. Ed* **2011**, *50*, 4808-4842
- [21] H. A. Rydberg, M. Matson, H. L. Amand, E. K. Esbjorner, B. Norden, *Biochemistry* **2012**, *51*, 5531-5539.
- [22] C. L. Watkins, P. Brennan, C. Fegan, K. Takayama, I. Nakase, S. Futaki, A. T. Jones, *J. Cont. Rel.* **2009**, *140*, 237-244.
- [23] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleu, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18188-18193.
- [24] S. Trabulo, A.L. Cardoso, M. Mano, M. Lima, *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 961-993.
- [25] E. Vives, J. Schmidt, A. Pelegrin, *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1786*, 126-138.
- [26] P. Lundberg, U. Langel, *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 227-233.
- [27] T-E. Park, Y-J. Choi, C-S. Cho, *J. Bioequiv. Bioavail.* **2012**, *4(6)*, xx-xxii.
- [28] A. El-Sayed, S. Futaki, H. Harashima, *Am. Assoc. Pharm. Sci. J.* **2009**, *11*, 13-22.
- [29] C.R. Merrill, M.R. Geier, J.C. Petriccioni, *Nature* **1971**, *233*, 398-400.
- [30] D.J. Glover, H.J. Lipps, D.A. Hans, *Nat. Rev. Gen.* **2005**, *6*, 299-310.
- [31] S. Li, L. Huang, *Gene Ther.* **2000**, *7*, 31-34.
- [32] R. Feder, R. Nehushtai, A. Mor, *Peptides* **2001**, *22*, 1683-1690.
- [33] R. Feder, A. Dagan, A. Mor, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4230-4238.
- [34] E. Hariton-Gazal, R. Feder, A. Mor, A. Graessmann, R. Brack-Werner, D. Jans, C. Gilon, A. Loyter, *Biochemistry* **2002**, *41*, 9208-9214.
- [35] M. Mano, C. Teodósio, A. Paiva, S. Simões, M. Lima, *Biochem. J.* **2005**, *390*, 603-612.
- [36] S. Trabulo, M. Mano, H. Faneca, A. Cardoso, S. Duarte, A. Henriques, A. Paiva, P. Gomes, S. Simões, M. Lima, *J. Gene Med.* **2008**, *10*, 11, 1210-1222.

[37] S. Futaki, W. Ohashi, T. Suzuki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, H. Harashima, Y. Sugiura, *Bioconj. Chem.* **2001**, *12*, 1005-1011.

[38] S. E. Andaloussi *et al.*, *Nucl. Acids Res.* **2011**, *39*, 9, 3972, 3987.

[39] M. Anko, J. Maihenc, K. Kogei, R. Sillard, U. Langel, G. Anderluh, M. Zorko, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2012**, *1818*, 3, 915-924.

[40] G. Kibria, H. Hatakeyama, N. Ohga, K. Hida, H. Harashima, *J. Con. Rel.* **2011**, *153*, 2, 141-148.

[41] M. Mae, S. E. Andaloussi, P. Lundin, N. Oskolkov, H. Johanssen, P. Guterstam, U. Langel, *J. Con. Rel.* **2009**, *134*, 221-227.

[42] L. A. Carpino, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 875.

Capítulo 3

Síntese de Péptidos Antimicrobianos
Funcionalizados para Conjugação a
Biomateriais para Terapia Local da
Osteomielite

1. Considerações Gerais

1.1. Péptidos Antimicrobianos

O tratamento de infeções é considerado, hoje em dia, um procedimento relativamente simples, devido à eficiência dos antibióticos existentes. Ainda assim, nos últimos anos, tem-se tornado gradualmente um desafio cada vez maior, devido à resistência que alguns agentes patogénicos têm vindo a desenvolver aos antibióticos convencionais. Futuramente, este fenómeno conduzirá a uma falta de respostas eficazes contra infeções, originadas por diversos agentes patogénicos – bactérias, fungos, vírus ou parasitas, com graves consequências para a saúde pública. É, por isso, fundamental encontrar-se tratamentos alternativos capazes de contornar este problema, tendo-se avançado, nos últimos anos, que os AMP poderão fazer parte dessa alternativa ^[1]. Os AMP fazem parte da primeira linha de defesa do sistema imunitário, podendo ser encontrados em diversos organismos vivos, desde seres procariontes a mamíferos, plantas ou insetos. Foram já identificados mais de 750 diferentes AMP naturais ^[2] e, apesar da sua diversidade, a grande maioria partilha as seguintes características:

- sequências pequenas, normalmente com 10 a 25 aminoácidos;
- carácter altamente catiónico, ainda que a carga global varie;
- tendência a adotar estruturas secundárias anfipáticas.

Estas características conferem aos péptidos a capacidade de interação com superfícies ou membranas microbianas, particularmente se carregadas negativamente, facto que tem sustentado a hipótese dos AMP atuarem por destabilização ou destruição das membranas celulares dos agentes patogénicos ^[3]. A grande maioria destes péptidos geneticamente codificados é mobilizada imediatamente após uma infeção microbiana, atuando rapidamente na neutralização dos agentes patogénicos ^[4,5]. A atividade bactericida, fungicida, antiviral e antitumoral dos AMP, aliada ao facto de atuarem a baixas concentrações, faz com que estes péptidos sejam considerados candidatos promissores a agentes terapêuticos no tratamento de infeções, em especial em situações de resistência à antibioterapia clássica. O facto de o mecanismo de ação destes agentes antimicrobianos não estar dependente da interação com recetores específicos, seja intracelulares, seja na superfície de membranas – ao contrário do que acontece com antibióticos convencionais, sugere que será mais difícil dar lugar ao desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos agentes patogénicos ^[6].

1.2. Mecanismos de ação dos AMP

Ainda que os mecanismos de ação dos AMP não estejam totalmente esclarecidos, é sabido que estes são capazes de estabelecer interações eletrostáticas com células bacterianas, cuja superfície está ocupada em grande parte por fosfolípidos carregados negativamente, seguindo-se rotura da membrana celular ^[7]. Neste contexto, a interação entre AMP e células de animais ou plantas não é favorecida, já que as membranas destas células são maioritariamente constituídas por fosfolípidos neutros e colesterol, o que não promove a interação eletrostática com os AMP. Assim sendo, após o estabelecimento de interações eletrostáticas entre os AMP e os componentes aniônicos da membrana celular bacteriana, as moléculas de péptido forçam a reorganização da bicamada fosfolipídica, induzindo a formação de poros e consequente destabilização da membrana. Para explicar estas interações, com base nos dados experimentais disponíveis até à data, propuseram-se três modelos (Figura 3.1) ^[8]:

- **modelo em aduela** (*barrel stave model*, Figura 3.1.A): após a interação eletrostática com os fosfolípidos, os péptidos, com uma estrutura de hélice- α anfipática, formam agregados cilíndricos com uma estrutura bem definida – o lado apolar da hélice- α associado às cadeias hidrofóbicas dos ácidos gordos e o lado polar orientado para o meio aquoso; a destabilização causada na membrana conduz, em última instância, à morte celular;
- **modelo em carpete** (*carpet model*, Figura 3.1.B): as cadeias peptídicas formam uma espécie de tapete na superfície da membrana e, ao ser atingido o ponto de saturação, começam a formar-se cavidades (como se a membrana sofresse um colapso por excesso de peso de péptido à sua superfície), conducentes à rotura da membrana bacteriana, e consequente morte celular;
- **modelo em poro toroidal** (*toroidal pore model*, Figura 3.1.C): após a interação com os fosfolípidos, os péptidos são inseridos na membrana e formam agregados ao longo de toda a membrana, tornando-a porosa; por associação a moléculas de água, estes agregados aumentam, formando canais responsáveis pela libertação do conteúdo intracelular para o meio extracelular, o que conduz à morte da célula bacteriana.

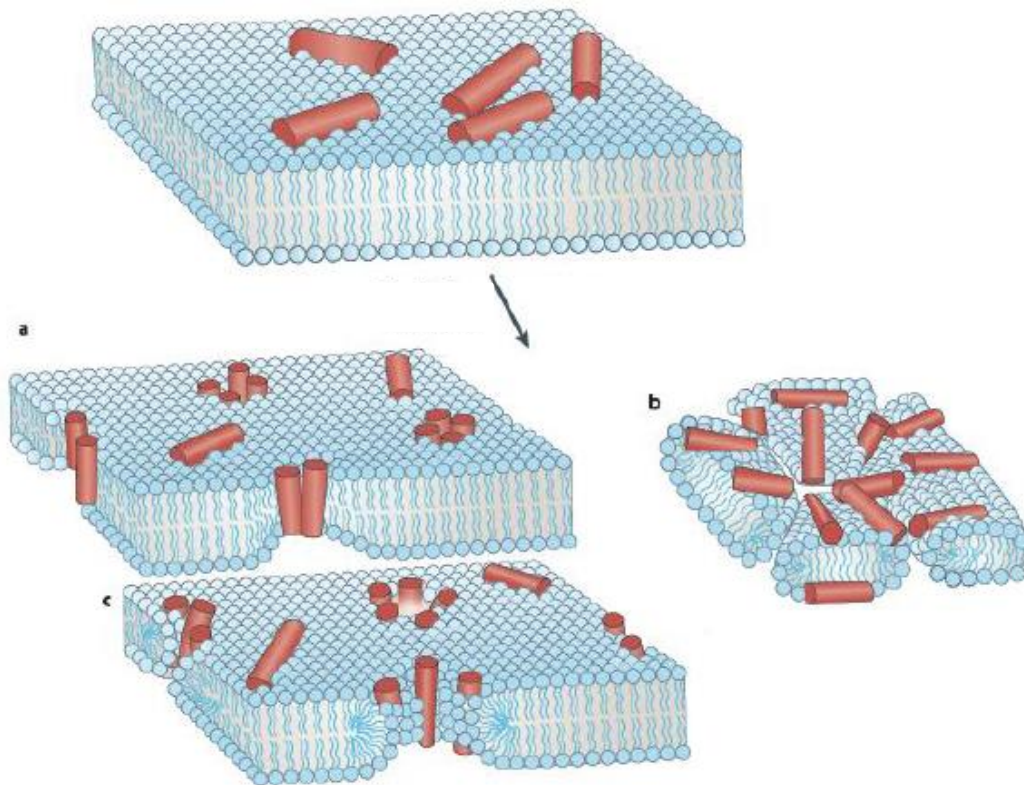


Figura 3.1 – Modelos propostos para explicar o mecanismo de ação dos AMP: (A) modelo de interação do tipo aduela, (B) modelo de interação do tipo tapete, e (C) modelo de interação do tipo poro toroidal. Adaptado de [9].

Em suma, como componentes do sistema imune inato, os AMP são capazes de perturbar as membranas bacterianas, permeando a bicamada lipídica e promovendo a morte celular. Desta forma, torna-se compreensível porque é que, até aos dias de hoje, não se observou desenvolvimento de resistência significativa aos AMP, o que os torna particularmente valiosos como componentes de futuras estratégias de antibioterapia. No entanto, é de referir que alguns agentes patogénicos desenvolveram formas de diminuir os efeitos dos AMP, nomeadamente, através da expressão de proteases no exterior da membrana, para promover a degradação destes péptidos, ou a modificação química da superfície celular, de forma a diminuir a sua interação com os AMP [10-11].

1.3. Os AMP no tratamento da osteomielite

Os implantes ósseos estão associados a um grande número de infecções, como a osteomielite, em consequência de colonizações bacterianas e formação de biofilmes superficiais, cuja prevenção e tratamento são geralmente muito difíceis, nomeadamente devido à deficiente imunidade que existe na interface implante/tecido [12]. Apesar das melhorias a que se tem assistido, tanto a nível de diagnóstico, como a nível de opções de tratamento, a osteomielite continua a ser uma das maiores complicações relacionadas com cirurgia ortopédica, resultando em elevada morbidade, uma vez que as infecções mais persistentes podem ter como consequência a remoção ou substituição do implante [8,13].

Hoje em dia, o tratamento da osteomielite consiste no desbridamento minucioso do tecido infetado, seguido da administração de sistemas de libertação controlada de antibióticos. No entanto, o surgimento de estirpes resistentes aos antibióticos convencionais, especialmente *Staphylococcus aureus* multirresistente (MRSA, de *Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus*), tornou-se um dos maiores obstáculos no tratamento destas infecções [14,15], sendo urgente o desenvolvimento de novas estratégias em antibioterapia. Neste contexto, algumas abordagens recentes têm-se centrado na preparação e estudo de superfícies antimicrobianas, como (1) superfícies antiaderentes (superfícies que evitam a adsorção de proteínas e/ou a adesão das células microbianas) [16,17], (2) superfícies colonizadas com bactérias não-patogénicas [18], e (3) superfícies combinadas com biocidas ou antibióticos [19,20]. As últimas apresentam a vantagem de entregarem o fármaco diretamente no local do implante, resultando numa elevada concentração do mesmo no local de ação, sem que sejam atingidas concentrações elevadas a nível sistémico, o que permite prevenir efeitos secundários associados ao fármaco [18]. Para além disso, esta estratégia permite a existência de atividade antimicrobiana durante longos períodos de tempo, sem que haja acumulação do agente em órgãos não-alvo, como o cérebro, o fígado, os rins ou o baço [21]. A eficiência destes revestimentos está fortemente dependente da atividade do fármaco selecionado, bem como da possibilidade de desenvolvimento de resistência antimicrobiana no período de tempo relevante, pelo que se torna necessário encontrar um agente antimicrobiano de largo espectro, capaz de prevenir a colonização de biomateriais e minimizar o desenvolvimento de resistência bacteriana, mas também que seja estável durante um longo período de tempo [8]. Os AMP são excelentes candidatos para este propósito, uma vez que, como referido anteriormente, apresentam geralmente um largo espectro de atividade e o seu mecanismo primário de ação antimicrobiana torna improvável o desenvolvimento de mecanismos de

resistência por parte dos agentes patogénicos. A imobilização de AMP a uma superfície faz ainda com que seja possível contornar alguns inconvenientes associados à aplicação sistémica destes agentes, como a degradação proteolítica, a co-precipitação ou a auto-agregação ^[22].

1.4. O péptido hLF(1-11): um potente AMP de largo espectro

A lactoferrina humana (hLF) é uma glicoproteína pertencente à família das transferrinas, que existe em quantidade significativa no colostro e pode ser encontrada em superfícies mucosas, atuando na primeira linha de defesa do corpo humano contra infeções ou inflamações ^[23-24]. Esta proteína apresenta atividade antimicrobiana e antifúngica, inicialmente atribuída à sua capacidade para se ligar a iões de ferro, privando os microorganismos deste ião essencial. Hoje em dia sabe-se que a hLF apresenta também atividade anticancerígena, antiparasítica e antiviral, e que a estes mecanismos de ação está associado o seu domínio *N*-terminal, catiónico e anfipático, rico em argininas ^[25-27].

O péptido hLF(1-11), fragmento *N*-terminal da hLF que compreende os primeiros 11 aminoácidos da proteína (Figura 3.2), apresenta um carácter anfipático, integrando o importante domínio catiónico *Nt* (GRRRR). Este péptido antimicrobiano demonstrou elevada atividade contra um largo espectro de agentes patogénicos ^[24,28], nomeadamente várias estirpes resistentes de bactérias, como MRSA ^[29], *Acinetobacter baumannii* ^[30], *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia Coli* ^[31], e fungos, como *Candida albicans* ^[29] e *Aspergillus fumigates* ^[32]. De entre estas estirpes destacam-se, no contexto desta dissertação, a MRSA e a *A. baumannii*, frequentemente responsáveis pelo desenvolvimento de osteomielite crónica ^[33,34].



Figura 3.2 - Sequência de aminoácidos do péptido anfipático hLF(1-11), constituído por uma parte catiónica (representada a azul) e uma parte hidrofóbica (representada a cinzento).

Futuras aplicações deste péptido incluem, entre outras, o revestimento de dispositivos médicos para implante e/ou aplicação em pacientes com o sistema imunitário comprometido (atuando como um desinfetante com vista a prevenir a

formação de biofilmes bacterianos à superfície do dispositivo), ou ainda para a criação de biossensores para a deteção de infeções de difícil despiste, como a meningite, já que o hLF(1-11) é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica [24,35].

1.5. Criação de revestimentos antimicrobianos por imobilização covalente do péptido hLF(1-11) ao quitosano

O quitosano, um polissacárido linear composto por monómeros de 2-aminodesoxiglucose (unidade não acetilada) e *N*-acetil-2-aminodesoxiglucose (unidade acetilada) (Figura 3.3), é obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e alguns insetos [36]. O quitosano tem sido alvo de grande interesse, especialmente em áreas de estudo como a medicina e a bioengenharia, devido às suas propriedades intrínsecas como biocompatibilidade, biodegradabilidade (já que pode ser metabolizado por algumas enzimas) e bioadesão (devido à carga positiva que adquire a pH fisiológico). Para além disto, o quitosano promove a cicatrização e apresenta propriedades bacterioestáticas [36-37]. Por todas estas características, aliadas ao facto de este polímero ser relativamente barato, o quitosano tornou-se muito apelativo para diversas indústrias, sendo atualmente utilizado como agente antimicrobiano na agricultura, agente floculante para o tratamento de águas residuais, aditivo na indústria alimentar, agente hidratante em produtos cosméticos ou como ingrediente farmacêutico – especialmente na veiculação de fármacos, entre outras aplicações [38-39].

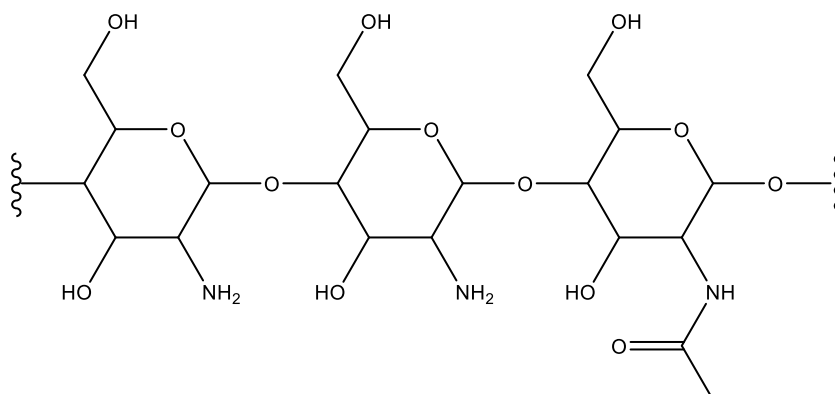
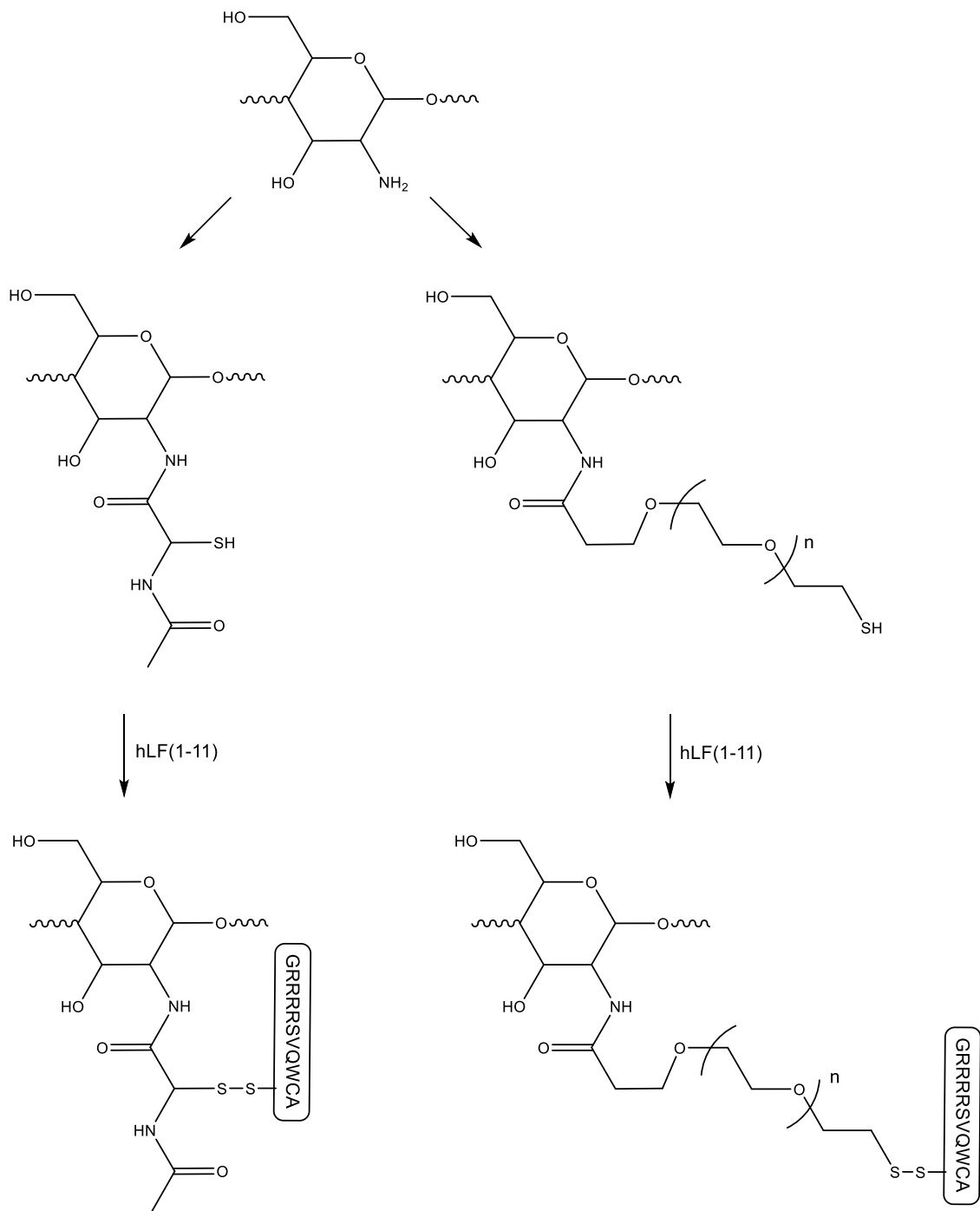


Figura 3.3 – Representação estrutural do quitosano, com uma das unidades acetilada.

O quitosano tem sido também utilizado no revestimento de superfícies, uma vez que é capaz de prevenir a formação de biofilmes, bem como de aumentar a diferenciação dos osteoblastos ^[40]. Lu Zhao *et al.* descreveram, recentemente, o revestimento de implantes de titânio com um conjugado quitosano-ácido láurico com a capacidade de inibir a adesão e proliferação de bactérias, para além de aumentar a capacidade de mineralização dos osteoblastos ^[41]. O revestimento de implantes de titânio com um conjugado quitosano-RGD (péptido Arg-Gly-Asp) foi também estudado, com resultados semelhantes ^[42].

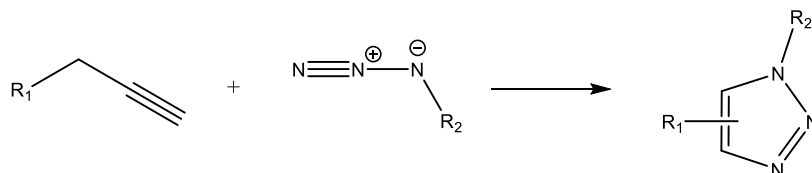
F. Costa *et al.* têm estudado a imobilização covalente do péptido hLF(1-11) ao quitosano, com o objetivo de serem produzidos filmes para o posterior revestimento de dispositivos médicos ou implantes cirúrgicos, de forma a prevenir uma infeção ^[43]. A imobilização covalente de AMP ao quitosano, em alternativa a um conjugado não covalente, poderá aumentar a estabilidade do conjugado a longo prazo, bem como diminuir a sua toxicidade e proporcionar uma orientação adequada do péptido, o que globalmente poderá significar uma ação antibacteriana mais potente e prolongada ^[8, 44]. Num trabalho recentemente publicado, estes autores testaram a ligação covalente do hLF(1-11) ao quitosano através de uma ponte dissulfureto, estabelecida entre a cisteína presente na sequência peptídica (Ct) e um grupo tiol de um espaçador previamente inserido no quitosano (Esquema 3.1) ^[22]. Deste estudo concluiu-se que o hLF(1-11), quando ligado ao quitosano – quer diretamente, quer através de um espaçador, perdeu parte da sua atividade, não se observando diminuição na adesão bacteriana. No entanto, o péptido demonstrou uma melhor atividade quando ligado ao quitosano através de um espaçador, mas ainda longe de uma taxa de redução de adesão bacteriana suficientemente elevada para ter interesse prático. Por este motivo, os autores consideram que este estudo terá ainda que ser expandido e aprofundado, sendo necessário considerar a importância do grupo tiol da cisteína para a atividade antimicrobiana do péptido, bem como a orientação do mesmo e a influência do espaçador. É, também, importante reavaliar o método de imobilização covalente do péptido ao quitosano, uma vez que as pontes dissulfureto são instáveis num ambiente biorredutor, que promove a conversão dissulfureto→tiol ^[45-46]. A substituição desta ligação por uma outra estrutura mais estável, sem prejudicar a atividade do péptido nem implicar a sua cisteína Ct, poderá melhorar significativamente a estabilidade do conjugado ^[46].



Esquema 3.1 – Imobilização do péptido hLF(1-11) ao quitosano através de uma ponte dissulfureto, de acordo com o estudo realizado por F. Costa *et al.* [22].

2. Objetivo

O trabalho experimental desenvolvido teve como principal objetivo a síntese de derivados funcionalizados do péptido hLF(1-11), para posterior imobilização covalente ao quitosano, através de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen (reação “click” entre um grupo alcino e uma função azida, Esquema 3.2) ^[47].



Esquema 3.2 – Esquema geral de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen.

Assim, foi planeada a síntese de quatro péptidos modificados com a função alcino: propargil-hLF(1-11), hex-5-inoil-hLF(1-11), Pra-Ahx-hLF(1-11) e hLF(1-11)-Ahx-Pra – figura 3.4 (A) a (D), respetivamente. Os péptidos foram desenhados de forma a se poder estudar futuramente a influência de alguns parâmetros estruturais nas propriedades antibacterianas dos conjugados péptido-quitosano a produzir:

- (a) Propargil-hLF(1-11) *versus* hex-5-inoil-hLF(1-11) – efeito do comprimento do espaçador (cadeia carbonada) entre o péptido e a ligação tripla terminal;
- (b) Pra-Ahx-hLF(1-11) – efeito da presença de um grupo amino primário livre (à semelhança do que acontece no quitosano não modificado) na extremidade do péptido modificado; a ligação tripla apresenta-se na cadeia lateral de um aminoácido não natural, a propargil-glicina (Pra), ligada à sequência peptídica através de um espaçador flexível, inserido por condensação do ácido 6-amino-hexanóico (Ahx);
- (c) hLF(1-11)-Ahx-Pra – efeito da inserção da modificação no extremo C-terminal do péptido, por comparação Pra-Ahx-hLF(1-11), onde a mesma modificação foi inserida no extremo N-terminal da sequência peptídica.

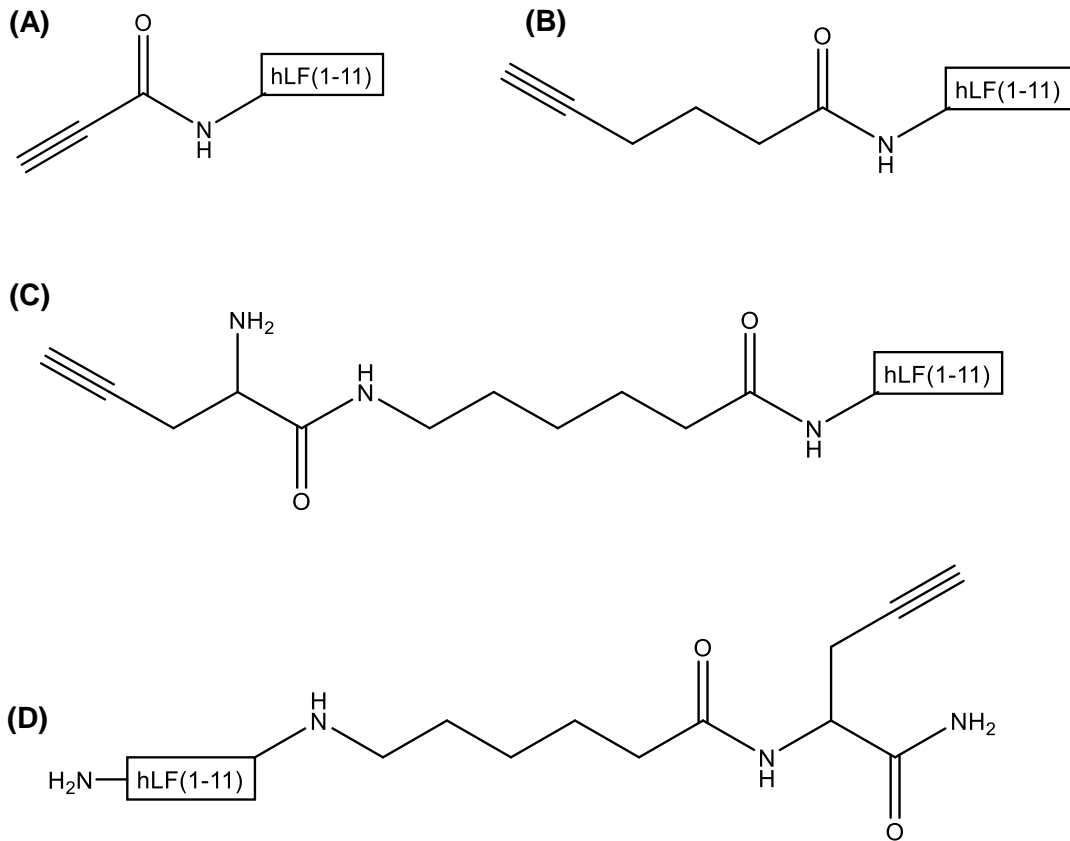
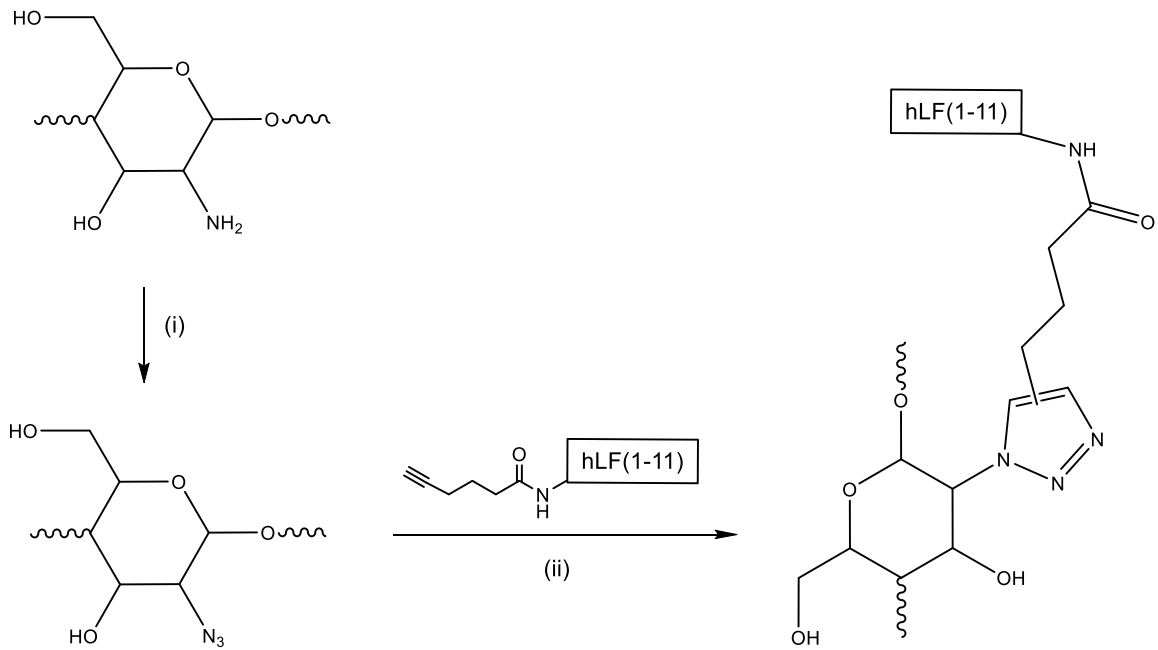


Figura 3.4 – Péptidos sintetizados ao longo do trabalho experimental: (A) Propargil-hLF(1-11), (B) Hexinoyl-hLF(1-11), (C) Pra-Ahx-hLF(1-11) e (D) hLF(1-11)-Ahx-Pra.

Os derivados alcino do péptido hLF(1-11) a produzir no âmbito desta tese serão, posteriormente, usados em testes preliminares de ligação ao quitosano, previamente modificado de forma a conter a função azida, de acordo com a rota sintética apresentada no Esquema 3.3. Esta rota, a ser já testada por uma estudante de doutoramento do grupo, assenta num primeiro passo de conversão dos grupos amino do quitosano em grupos azida, de acordo com procedimentos descritos na literatura ^[48]; comprovado o sucesso desse primeiro passo, passar-se-à à reação “click” propriamente dita, fazendo-se reagir o polímero modificado com o péptido, na presença de acetato de cobre e ascorbato de sódio ^[43].



Esquema 3.3 – Rota sintética delineada para a imobilização do péptido hex-5-inoil-hLF(1-11) no quitosano: (i) conversão dos grupos amino primários do quitosano em grupos azida, por reação com cloreto de 1-azida-sulfonil-imidazólio, K_2CO_3 ^[48]; (ii) reação “click” entre o quitosano modificado e o péptido, na presença de acetato de cobre e ascorbato de sódio ^[43].

3. Resultados e Discussão

3.1. Síntese dos derivados funcionalizados do péptido hLF(1-11)

Começou-se por construir o péptido hLF(1-11) (GRRRRSVQWCA, 1374 g/mol) por SPPS, utilizando um esquema de proteção ortogonal Fmoc/^tBu e, como suporte sólido, a resina Fmoc-Rink Amide MBHA, com uma funcionalização de 0,60 mmol/g.

A síntese da sequência peptídica foi realizada de forma semelhante à síntese do péptido S4₁₃-PV (capítulo 2 – 3.1) e, terminado o alongamento da cadeia, procedeu-se à divisão da peptidil-resina em três frações que foram, posteriormente, sujeitas a modificações. Numa primeira fração, testou-se o acoplamento do ácido propargílico ao aminoácido *Nt* da cadeia peptídica ancorada à resina, utilizando HBTU como agente de condensação, na presença de DIEA. Este acoplamento não resultou, razão pela qual se testou novamente a condensação usando EEDQ como agente de acoplamento, realizado de acordo com o procedimento descrito por Tornøe *et al.* [49]. No entanto, também neste caso não se logrou obter o produto pretendido, mas antes o mesmo produto que havia sido obtido no acoplamento mediado por HBTU/DIEA. Analisou-se esse produto por ressonância magnética nuclear de próton (¹H-RMN) e por ESI-IT MS, mas não se conseguiu identificá-lo de forma a tentar compreender o motivo do fracasso da conjugação do ácido propargílico ao péptido hLF(1-11).

Face ao acima referido, avançou-se para a modificação das restantes duas frações da peptidil-resina, uma delas por acilação com ácido hexinóico, utilizando-se a EEDQ como agente de acoplamento, conforme descrito em [49]. A terceira fração de peptidil-resina foi sequencialmente acoplada ao ácido 6-amino-hexanóico e à propargilglicina, por acoplamento dos respetivos derivados *N*-Fmoc-protegidos (Fmoc-Ahx e Fmoc-Pra, respetivamente) na presença de HBTU/DIEA, seguida de remoção do grupo Fmoc com uma solução de piperidina a 20% em DMF. Procedeu-se, depois, à clivagem das duas peptidil-resinas modificadas, por acidólise com um *cocktail* de clivagem constituído por TFA (90%), anisole (2%), etano-1,2-ditiol (3%) e tioanisole (5%). Após a clivagem, os produtos brutos de síntese foram isolados de acordo com o procedimento descrito em 4.5, e analisados por HPLC e por ESI-IT MS, com o objetivo de determinar, respetivamente, o grau de pureza e massa molecular de cada péptido bruto.

Para a síntese do péptido C-modificado, hLF(1-11)-Ahx-Pra, partiu-se da mesma resina Fmoc-Rink-MBHA que, após remoção do grupo Fmoc, se acoplou sequencialmente a propargilglicina e ácido 6-amino-hexanóico, igualmente por

condensação dos respetivos derivados *N*-Fmoc-protégidos, mediada por HBTU/DIEA, seguida de remoção do grupo Fmoc, nas condições já referidas. Prosseguiu-se depois com a construção da cadeia peptídica, de acordo com o procedimento descrito no capítulo 2 – 3.1, procedendo-se finalmente à clivagem da peptidil-resina nas mesmas condições aplicadas na síntese dos derivados *N*-modificados do hLF(1-11), sendo o produto isolado como descrito em 4.5, e analisado por HPLC e ESI-IT MS.

Em suma, foram sintetizados, em fase sólida, três derivados funcionalizados do péptido hLF(1-11) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Derivados funcionalizados do péptido hLF(1-11) sintetizados

Péptido	Peso molecular/g.mol⁻¹
Hexinoil-hLF(1-11)	1468
Pra-Ahx-hLF(1-11)	1581
hLF(1-11)-Ahx-Pra	1581

A título de exemplo, mostram-se o cromatogramas e espectro de massa obtidos para o péptido Pra-Ahx-hLF(1-11) (Figuras 3.5 e 3.6, respetivamente).

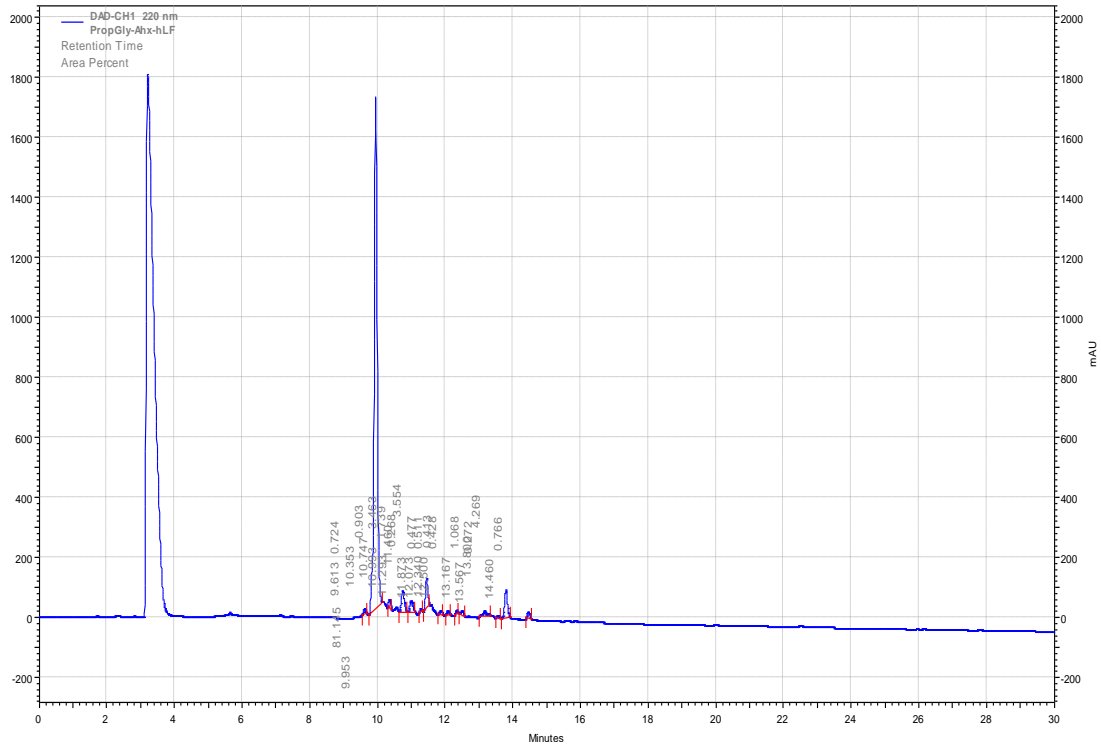


Figura 3.5 - Cromatograma obtido pela análise do péptido Pra-Ahx-hLF(1-11), com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 μ m), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.

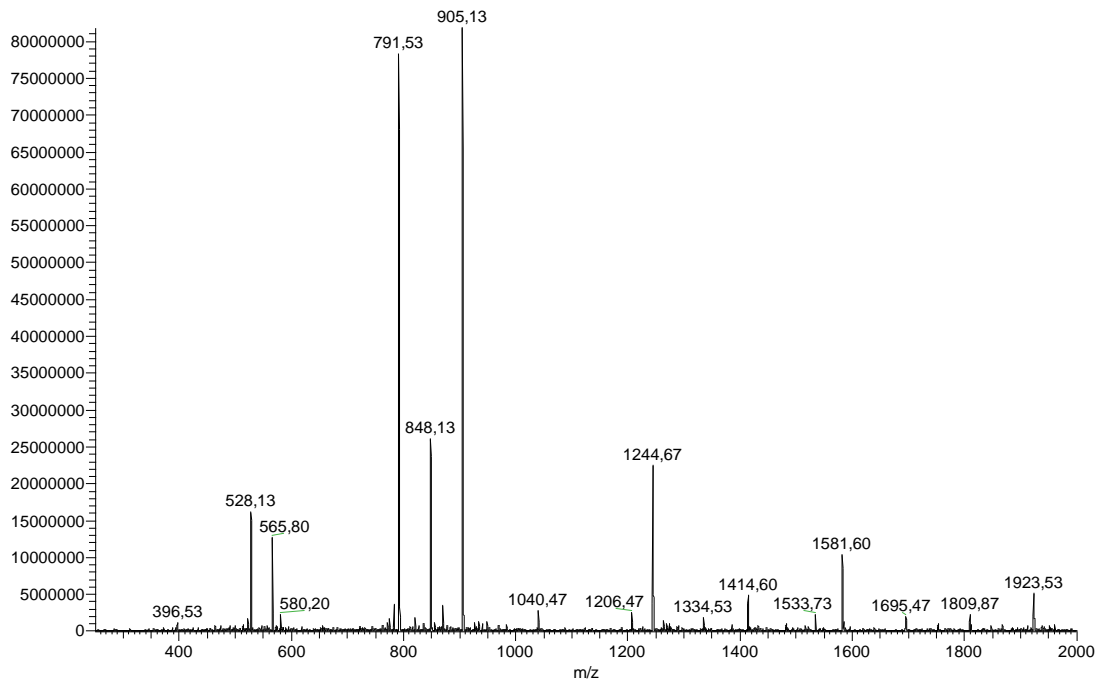
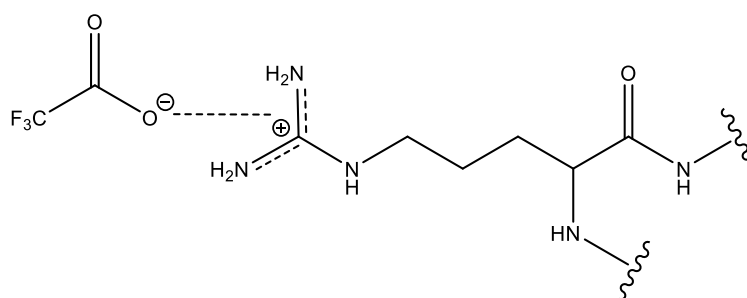


Figura 3.6 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido Pra-Ahx-hLF(1-11), correspondente ao pico de maior intensidade do cromatograma anterior (Figura 3.5)

Tabela 3.2 – Adutos do péptido Pra-Ahx-hLF(1-11) detetados por ESI-IT MS.

Adutos	m/z esperado	m/z observado
$P + 1H^+$	1581,00	1581,60
$P + 2H^+$	791,50	791,53
$P + 3H^+ + 2TFA^-$	906,00	905,13
$P + 2H^+ + TFA^-$	848,00	848,13
$P + 3H^+$	528,00	528,13
$P + 3H^+ + TFA^-$	565,67	565,80

Como se pode verificar na figura 3.5, o cromatograma do péptido Pra-hLF(1-11) revela um pico bastante intenso, com um $t_r = 10,0$ minutos, que se verificou corresponder ao produto esperado por ESI-IT MS (Figura 3.6). Efetivamente, no espetro de massa deste péptido (peso molecular 2702 g/mol) surgem diversos picos, que correspondem a moléculas do péptido-alvo com diferentes graus de protonação (Tabela 3.2). É, também, possível verificar a associação do péptido ao anião trifluoroacetato (TFA^-), proveniente do processo de clivagem. Esta observação deve-se, provavelmente, à presença de um grande número de argininas na sequência peptídica, que possuem na sua cadeia lateral o grupo guanidínio, capaz de estabelecer interações eletrostáticas com o anião TFA^- (Esquema 3.4).



Esquema 3.4 – Interação eletrostática que se estabelece entre a arginina e o anião trifluoroacetato.

A análise do péptido bruto por HPLC permitiu, também, constatar que o grau de pureza do mesmo era de 81%, abaixo do mínimo desejado (90%). Após otimização, por HPLC, do gradiente apropriado para a purificação do péptido, o produto bruto foi submetido a separação por RP-MPLC, utilizando uma eluição em gradiente de 10-30% ACN em água (com 0,05% TFA). O péptido purificado foi novamente analisado por HPLC, determinando-se um grau de pureza final de 96,9% (Figura 3.7).

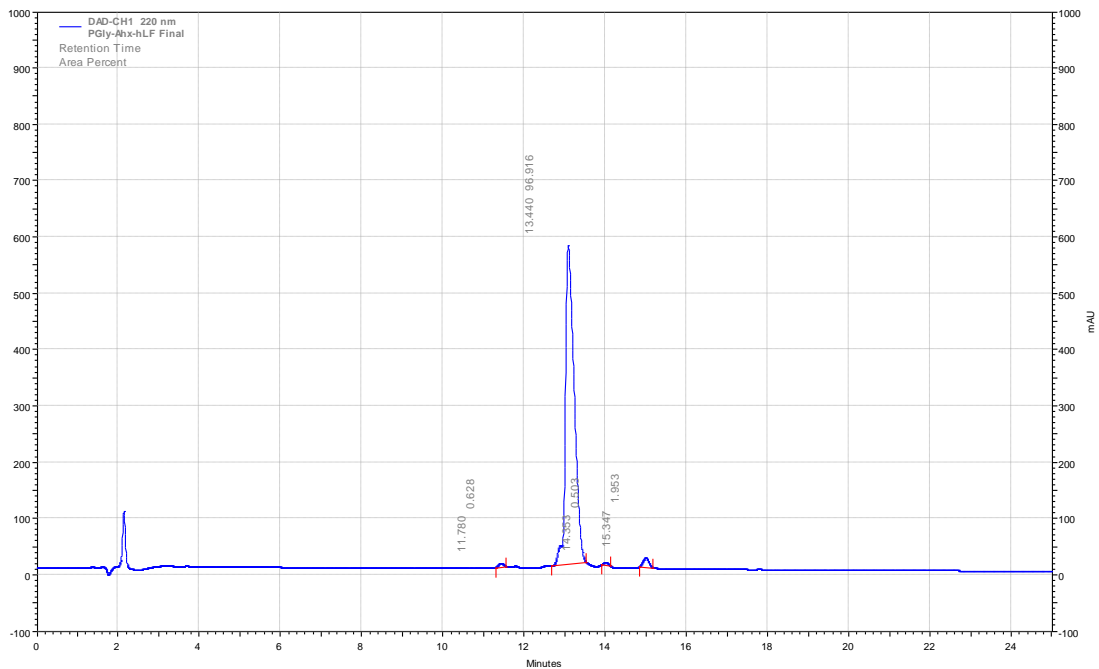


Figura 3.7 – Cromatograma obtido pela análise do péptido Pra-Ahx-hLF(1-11) purificado, com uma eluição em gradiente de 10-30% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 μ m), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com detecção ao $\lambda=220$ nm.

Este procedimento foi idêntico para todos os derivados funcionalizados do péptido hLF(1-11) (Tabela 3.1), que foram obtidos com dados cromatográficos e espectroscópicos corretos (Anexos), e com os graus de pureza e rendimentos globais de síntese constantes da Tabela 3.3. Os produtos finais foram liofilizados.

Tabela 3.3 – Resumo dos resultados experimentais da síntese dos derivados funcionalizados do péptido hLF(1-11).

Péptido	M. Molar / g.mol⁻¹	Massa / mg	Pureza / %	η / %
Hexinoil-hLF(1-11)	1468	14,6	94,4	8,2
Pra-Ahx-hLF(1-11)	1581	27,8	96,9	14,6
hLF(1-11)-Ahx-Pra	1581	131,5	92,6	83,2

4. Procedimento Experimental

4.1. Montagem Experimental

A montagem experimental utilizada no contexto da síntese dos derivados do hLF(1-11) foi semelhante à apresentada na Figura 2.15, no capítulo 2, secção 4.1.

4.2. Reagentes e Equipamentos Utilizados

Os reagentes e equipamentos utilizados foram os descritos no capítulo 2, secção 4.1.

4.3. Preparação da Resina

A preparação da resina foi realizada de acordo com o procedimento experimental descrito no capítulo 2, secção 4.3. Neste caso, foi utilizada a resina Fmoc-Rink Amide MBHA, com uma funcionalização de 0,60 mmol/g (Hexinoil- e Pra-Ahx-hLF(1-11): 0,25 mmol; 0,417 g; hLF(1-11)-Ahx-Pra: 0,10 mmol; 0,167 g).

4.4. Construção das cadeias peptídicas

4.4.1. Péptidos Hexinoil-hLF(1-11) e Pra-Ahx-hLF(1-11)

A construção da sequência peptídica foi realizada de acordo com o procedimento descrito no capítulo 2, secção 4.4. Terminado o alongamento da cadeia (incluindo a desproteção do último aminoácido), a peptidil-resina foi dividida em frações, com o objetivo de serem inseridas diferentes modificações *N*-terminais em cada fração. Assim sendo, a uma fração acoplou-se o ácido hex-5-inóico (3,0 eq.; 0,42 mmol; 46 µL), utilizando como agente de condensação a EEDQ (3,1 eq.; 0,43 mmol; 0,106 g), em DCM (3 mL). Esta mistura permaneceu em agitação durante 5 horas e, terminado o tempo de reação, lavou-se a resina com 4 mL de THF (3 x 1') e DCM (3 x 1'). Adicionou-se novamente ácido hex-5-inóico e EEDQ, em DCM, à resina, e esta mistura permaneceu em agitação *overnight*, sendo a resina finalmente lavada com 4 mL de THF (6 x 1') e DCM (6 x 1'). Procedeu-se, depois, à clivagem, purificação e análise do péptido final, conforme descrito no capítulo 2, secção 4.6.

À segunda fração começou-se por ligar a espaçador bifuncional Fmoc-Ahx (5,0 eq.; 0,70 mmol; 0,247 g), utilizando como agente de condensação HBTU (5,0 eq.; 0,70 mmol; 0,265 g), na presença de DIEA (10,0 eq.; 1,4 mmol; 0,24 mL) em DMF. Deixou-se a reagir sob agitação durante 1 hora, após o que se lavou a resina (com DMF e

DCM), e se procedeu ao acoplamento da Fmoc-propargilglicina (5,0 eq; 0,7 mmol; 0,235 g), nas mesmas condições do acoplamento anterior. O último passo da construção desta sequência consistiu na remoção do grupo Fmoc, como atrás descrito. Seguidamente, procedeu-se à clivagem, purificação e análise do péptido final, como descrito no capítulo 2, secção 4.6.

4.4.2. Péptido hLF(1-11)-Ahx-Pra

A construção deste péptido foi iniciada com a ligação do aminoácido não natural Fmoc-propargilglicina (5,0 eq., 0,5 mmol; 0,167 g) à resina-base, utilizando como agente de condensação o HBTU (5,0 eq.; 0,5 mmol; 0,189 g), na presença de DIEA (10,0 eq.; 1,0 mmol; 0,17 mL), em DMF. A mistura permaneceu em agitação durante 1 hora, seguindo-se a remoção do grupo Fmoc, utilizando uma solução de piperidina a 20% em DMF. Seguidamente, fez-se reagir o grupo amino livre com o espaçador bifuncional Fmoc-Ahx (5,0 eq.; 0,5 eq.; 0,177 g) nas mesmas condições que o acoplamento anterior, seguindo-se a remoção do grupo Fmoc. Ao grupo amino do espaçador ligou-se o aminoácido Ct da sequência do hLF(1-11), prosseguindo-se assim com a construção da sequência de aminoácidos correspondente a este AMP, de acordo com o procedimento descrito no capítulo 2 (4.4). O péptido final foi clivado, purificado e analisado como descrito no capítulo 2, secção 4.6.

4.5. Clivagem e Desproteção das Cadeias Laterais

Na *hotte*, preparou-se o *cocktail* de clivagem (90% TFA, 2% anisole, 3% etano-1,2-ditiol e 5% tioanisole). Transferiram-se porções de 100 mg de peptidil-resina seca para tubos de *falcon* de 15 mL e transferiu-se 1 mL de *cocktail* de clivagem para cada tubo, deixando-se a mistura sob agitação contínua durante 2 horas. Também na *hotte*, fez-se uma montagem para filtração sob vácuo, utilizando um funil de placa porosa D4 e, após as 2 horas de reação, verteu-se a mistura contida nos tubos de *falcon* para o funil, ficando o péptido solúvel no filtrado. Dividiu-se o filtrado em porções de 2 mL, em tubos de *falcon*, perfazendo o volume de 15 mL com éter etílico seco. Após alguns minutos no congelador, centrifugou-se a mistura e decantou-se o líquido sobrenadante para um matrás com rolha. A adição de éter etílico seco e posterior centrifugação e decantação foram realizadas mais três vezes e, finalmente, os tubos foram colocados no exsiccador.

O péptido seco foi dissolvido numa solução de ácido acético a 10% e analisado por HPLC e ESI-IT MS. Todos os péptidos obtidos foram purificados por RP-MPLC, com uma eluição em gradiente de 15-45% ACN em H₂O (0,05% TFA). Depois de

isoladas e combinadas as frações contendo o péptido puro, a solução final de péptido foi dividida em tubos de *falcon* (45 mL), que foram posteriormente colocados no congelador, consistindo o último passo na liofilização do péptido purificado.

5. Bibliografia

- [1] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> (consultado em 4 de Maio de 2014)
- [2] D. Andreu, L. Rivas, *Biopolymers* **1998**, 47, 6, 415-433
- [3] W. Van't Hof, E.C. Veerman, E.J. Helmerhorst, A.V. Amerongen, *Biol. Chem.* **2001**, 382, 4, 597-619
- [4] R. Lehrer, T. Gantz, *Curr. Opin. Immun.* **1999**, 11, 23, 7.
- [5] K. Reddy, R. Yedery, C. Aranha, *Int. J. Antimicro. Ag.* **2004**, 24, 536-547.
- [6] R. Feder, R. Nehushtai, A. Mor, *Peptides* **2001**, 22, 1683-1690.
- [7] Z. Oren, Y. Shai, *Biopolymers* **1998**, 47, 451-463.
- [8] F. Costa, I. Carvalho, R. Montelaro, P. Gomes, M. Martins, *Acta Biomater.* **2011**, 7, 1431-1440.
- [9] M.N. Melo, R. Ferre, et. al. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7, 3, 245-250.
- [10] R.E.W. Hancock, *Lancet* **1997**, 349, 418-422.
- [11] R.E.W. Hancock, R. Lehrer, *Trends Biotech.* **1998**, 16, 82-88.
- [12] M. Knetsch, L. Koole, *Polymers* **2011**, 3, 340-366.
- [13] C. Faber, H.P. Stallmann, D.M. Lyaruu, U. Joosten, C. von Eiff, A. Amerongen, P. Wuisman, *Antimicrob. Ag. Chemother.* **2005**, 49, 6, 2438-2444.
- [14] C. Faber, R. Hoogendoorn, H.P. Stallmann, D.M. Lyaruu, A. Amerongen, P. Wuisman, et al., *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, 54, 1078-1084.
- [15] M. Kazemzadeh-Narbat, B. Lai, C. Ding, J. Kizhakkedathu, R.E.W. Hancock, *Biomaterials* **2013**, 34, 5969-5977.
- [16] K. Glinel, A.M. Jonas, T. Jouenne, J. Leprince, L. Galas, W.T. Huck, *Bioconj. Chem.* **2009**, 20, 1, 71-77.
- [17] R.G. Chapman, E. Ostuni, M.N. Liang, G. Meluleni, E. Kim, L. Yan, et al., *Langmuir* **2001**, 17, 4, 1225-1233.

- [18] C. Carvalho, *Recent Pat. Biotechnol.* **2007**, 1, 1, 49-57.
- [19] D.W. Chung, S.E. Papadakis, K.L. Yam, *Int. J. Food Sci. Technol.* **2003**, 38, 2, 165-169.
- [20] A. Bach, D. Darby, B. Bottiger, H. Bohrer, J. Motsch, E. Martin, *Int. Care Med.* **1996**, 22, 10, 1066-1069.
- [21] L. Zhao, P.K. Chu, Y. Zhang, Z. Wu, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Applied Biomaterials* **2009**, 91, 1, 470-480.
- [22] F. Costa, S. Maia, J. Gomes, P. Gomes, M. Martins, *Acta Biomater.* **2014**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.028>
- [23] D. Legrand, A. Pierce, E. Ellass, M. Carpentier, C. Mariller, J. Mazurier, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, 606, 163-194.
- [24] C. Brouwer, M. Rahman, M. Welling, *Peptides* **2011**, 32, 1953-1963.
- [25] S.A. González-Chávez, S. Arévalo-Gallegos, Q. Rascón-Cruz, *Int. J. Antimicrob. Ag.* **2009**, 33, 4, 301.
- [26] R.E.W. Hancock, *Lancet Inf. Dis.* **2001**, 1, 3, 156-154.
- [27] E.N. Baker, H.M. Baker, *Biochimie* **2009**, 91, 3-10.
- [28] S. Fornilli, R. Pizzi, D. Rebecani, *Int. J. Pep. Res. Ther.* **2010**, 16, 4, 223-231.
- [29] C. Brower, M. Welling, *Peptides* **2008**, 29, 7, 1109-1117.
- [30] L. Dojkshoorn, C. Brower, S. Bogaards, A. Nemeč, P. van der Brock, P. Nibbering, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **2004**48, 12, 4919-4921.
- [31] A. Lupetti, A. Paulusma-Annema, M. Welling, S. Senesi, J. van Disset, P. Nibbering, *Antimicrob. Ag. Chemother.* **2000**, 44, 3357-3363.
- [32] A. Lupetti, A. Paulusma-Annema, M. Welling, H. Dogterom-Ballering, C. Brower, S. Senesi, J. van Disset, P. Nibbering, *Antimicrob. Ag. Chemother.* **2003**, 47, 1, 262-267.
- [33] J- Schafer, J. Mangino, *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, 14, 3, 512-514.
- [34] W. Witte, *J. Antimicrob. Chemother.* **1999**, 44, 1-9.

- [35] M.S. Mannor, S. Zhang, A.J. Link, M.C. McAlpine, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 45, 19207-19212.
- [36] J. Berger, M. Reist, J. Mayer, O. Felt, N. Peppas, R. Gurny, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*, 19-34.
- [37] R. Muzzarelli, *Natural chelating polymers: alginic acid, chitin, and chitosan*, **1973**, Pergamon Press.
- [38] S.M. Hudson, *Advances of Chitin Science*, A. Domard, G.A.F. Roberts, K.M. Varum, Eds, **1997**, Vol II, p. 590.
- [39] E. Rabea, M. Badamy, C. Stevens, G. Smaghe, W. Sternbaut, *Biomacromol.* **2003**, *4*, 6, 1457-1465.
- [40] R. Carlson, R. Taffs, W. Davidson, P. Stewart, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2008**, *19*, 8, 1035-1046.
- [41] L. Zhao, Y. Hu, D. Xu, K. Cai, *Coll. Surf. B Biointer.* **2014**, *119*, 115-125.
- [42] Z. Shi, K. Neoh, E. Tang, C. Poh, W. Wang, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, 865-872
- [43] J.R. Oliveira, M. Martins, L. Mafra, P. Gomes, *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 240-249.
- [44] N. Aumsuwan, R.C. Danyus, S. Heinhorst, M.W. Urban, *Biomacromol.* **2008**, *9*, 7, 1712-1718.
- [45] M. Gongora-Benitez, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2014**, 901-926.
- [46] H. Li, R. Aneja, I. Chaiken, *Molecules* **2013**, *18*, 9797-9817.
- [47] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Ang. Chem. Int.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [48] V. Castro, J. Blanco-Canosa, H. Rodriguez, F. Albericio, *Am. Chem. Soc. Comb. Sci.* **2013**, *15*, 331-334.
- [49] C. Tornøe, S. Sanderson, J. Mottram, G. Coombs, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 312-324.

Capítulo 4

Conclusões e perspectivas futuras

Em retrospectiva, é possível assumir que foram plenamente atingidos os objetivos do trabalho, centrados na síntese de derivados modificados de péptidos bioativos.

A acilação das várias frações do CPP S4₁₃-PV com ácidos gordos foi bem conseguida, sendo que os lipopéptidos daí resultantes foram isolados com graus de pureza bastante elevados e rendimentos aceitáveis. De realçar que a *N*-acilação do S4₁₃-PV com ácidos gordos obrigou a uma alteração no protocolo de clivagem: uma vez que a precipitação em éter não foi tão eficiente, dado o aumento da hidrofobicidade dos péptidos (especialmente no caso dos ácidos gordos mais longos, logo, mais apolares), foi necessário efetuar extrações líquido-líquido com o propósito de se recuperar algum péptido ainda dissolvido no éter etílico. Tal poderá justificar os rendimentos globais de síntese obtidos, eventualmente também afetados por perdas no processo de clivagem e no processo de purificação por RP-MPLC. Para além dos lipopéptidos referidos, logrou-se ainda sintetizar com sucesso dois derivados acilados do péptido S4₁₃-PV Scrambled, que serão oportunamente utilizados como controlos em ensaios bioquímicos e biofísicos que visam testar a aplicação de todos os lipopéptidos produzidos na veiculação e entrega intranuclear de ADN plasmídico, em terapia génica. Estes estudos serão levados a cabo pela equipa da Prof^a Doutora Maria da Conceição Pedroso de Lima, do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Foram, também, produzidos com sucesso diferentes derivados alcino do hLF(1-11). Ainda que não tenha sido conseguida a introdução do ácido propargílico no extremo *N*-terminal da sequência bioativa, logrou-se sintetizar os péptidos Hexinoil-hLF(1-11) e Pra-Ahx-hLF(1-11) com excelentes graus de pureza. Contudo, estes péptidos foram obtidos com um rendimento baixo, o que pode estar relacionado com o facto de partirem ambos de uma mesma sequência base bastante impura e/ou com o facto de estes péptidos *N*-modificados apresentarem baixa afinidade para com a fase estacionária, durante a purificação por RP-MPLC, tornando bastante difícil a sua recuperação. O mesmo problema não surgiu na síntese do péptido *C*-modificado, hLF(1-11)-Ahx-Pra, cujo rendimento global foi excelente, o que de certa forma suporta a hipótese de ser a modificação em *N*-terminal que justifica propriedades cromatográficas conducentes a um baixo rendimento global de síntese. A provar-se a aplicabilidade destes péptidos na criação de novos biomateriais antimicrobianos, será porventura útil testar-se diferentes fases estacionárias que permitam melhorar substancialmente o rendimento do processo de purificação por RP-MPLC.

Anexos

A. Tabela de Aminoácidos Proteínogénicos

Tabela A – Estrutura dos aminoácidos proteínogénicos

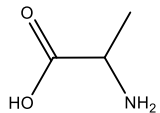
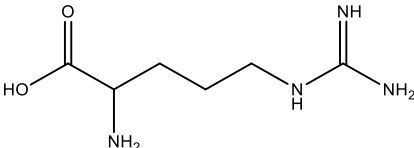
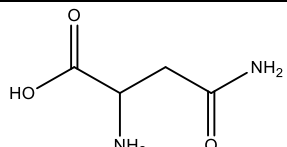
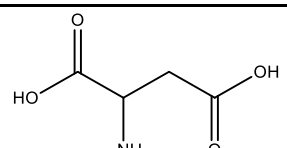
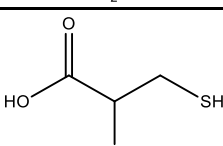
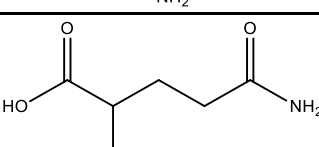
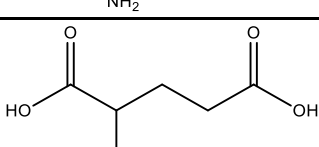
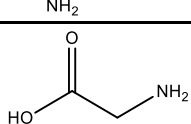
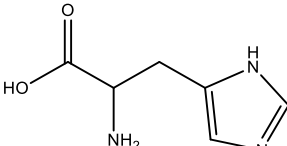
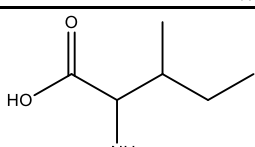
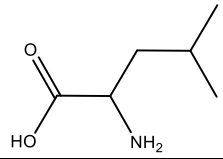
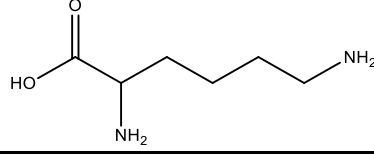
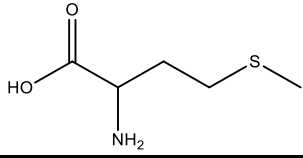
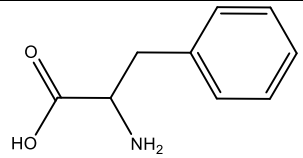
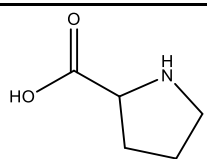
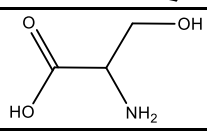
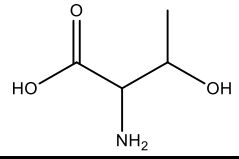
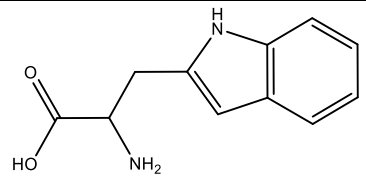
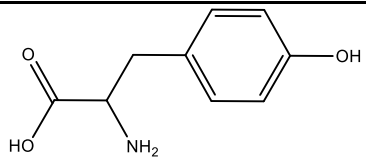
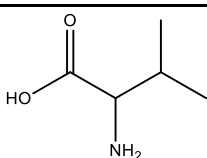
Aminoácido	Abreviaturas	Estrutura
Alanina	Ala, A	
Arginina	Arg, R	
Asparagina	Asn, N	
Ácido Aspártico	Asp, D	
Cisteína	Cys, C	
Glutamina	Gln, Q	
Ácido Glutâmico	Glu, E	
Glicina	Gly, G	
Histidina	His, H	
Isoleucina	Ile, I	

Tabela A – Estrutura dos aminoácidos proteínogénicos (continuação)

Aminoácido	Abreviaturas	Estrutura
Leucina	Leu, L	
Lisina	Lys, K	
Metionina	Met, M	
Fenilalanina	Phe, F	
Prolina	Pro, P	
Serina	Ser, S	
Treonina	Thr, T	
Triptofano	Trp, W	
Tirosina	Tyr, Y	
Valina	Val, V	

B. Péptido C10-S4₁₃-PV

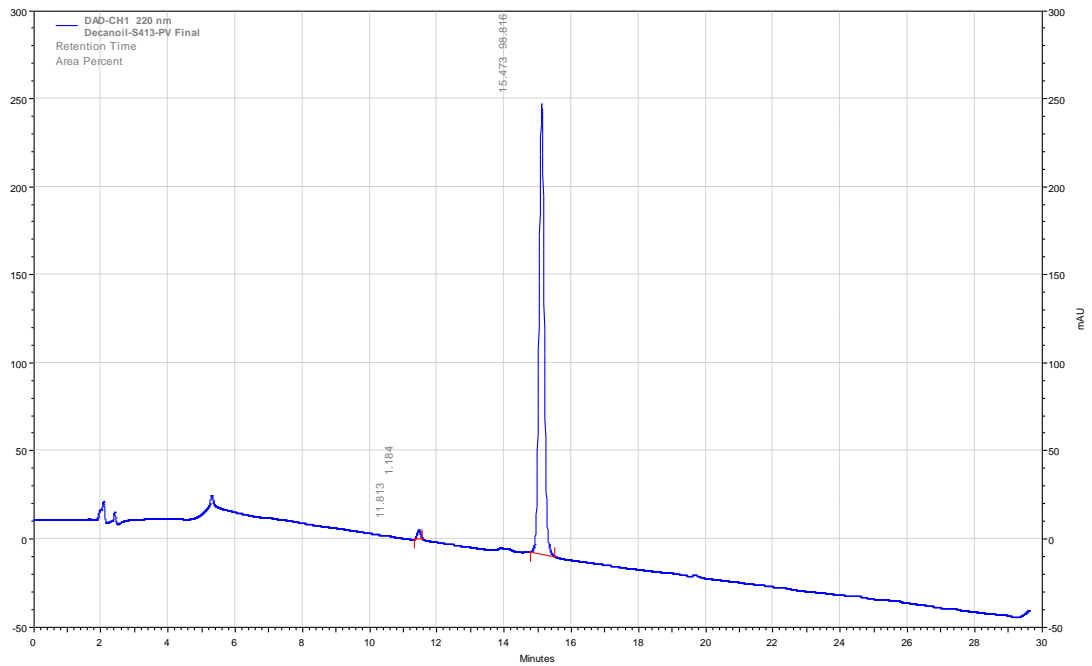


Figura B1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido C10-S4₁₃-PV purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.

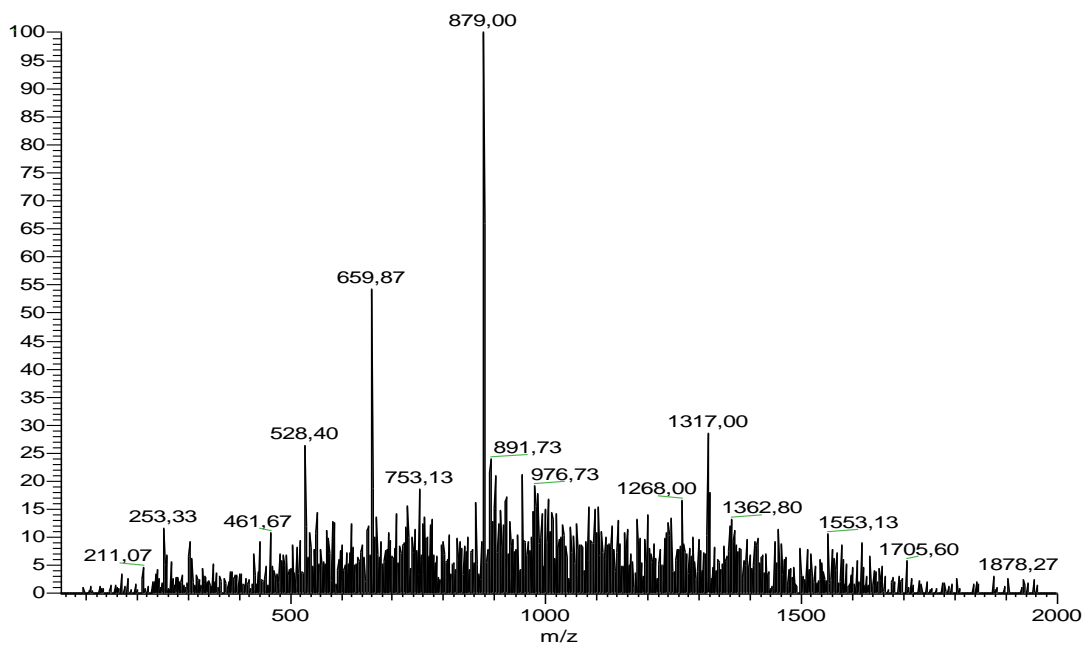


Figura B2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C10-S4₁₃-PV bruto.

C. Péptido C12-S4₁₃-PV

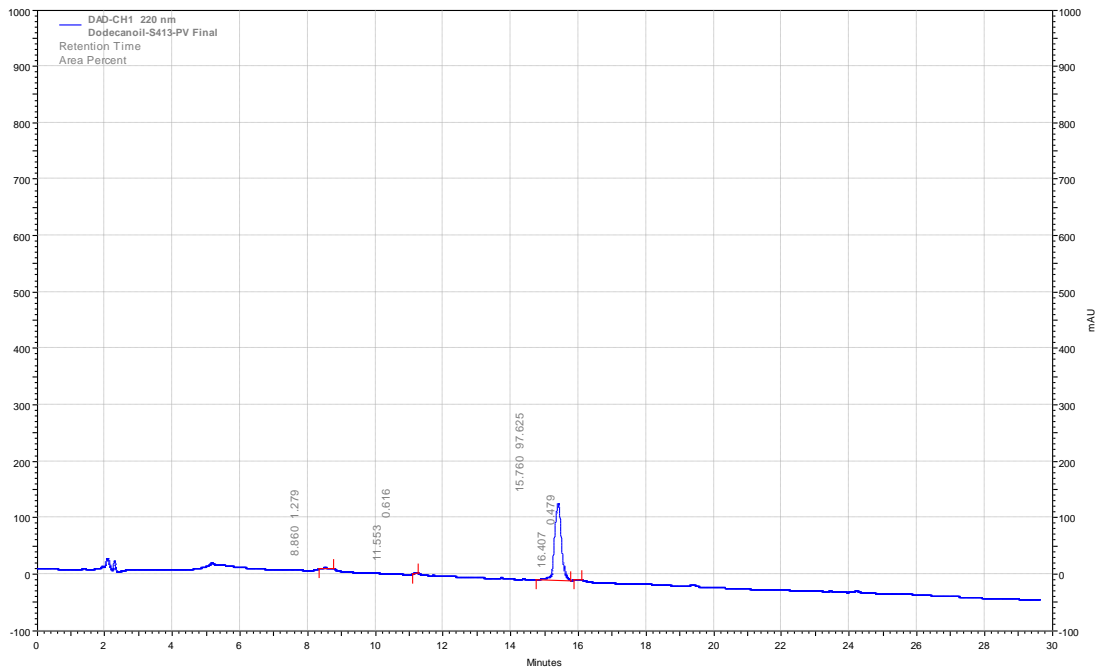


Figura C1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido C12-S4₁₃-PV purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.

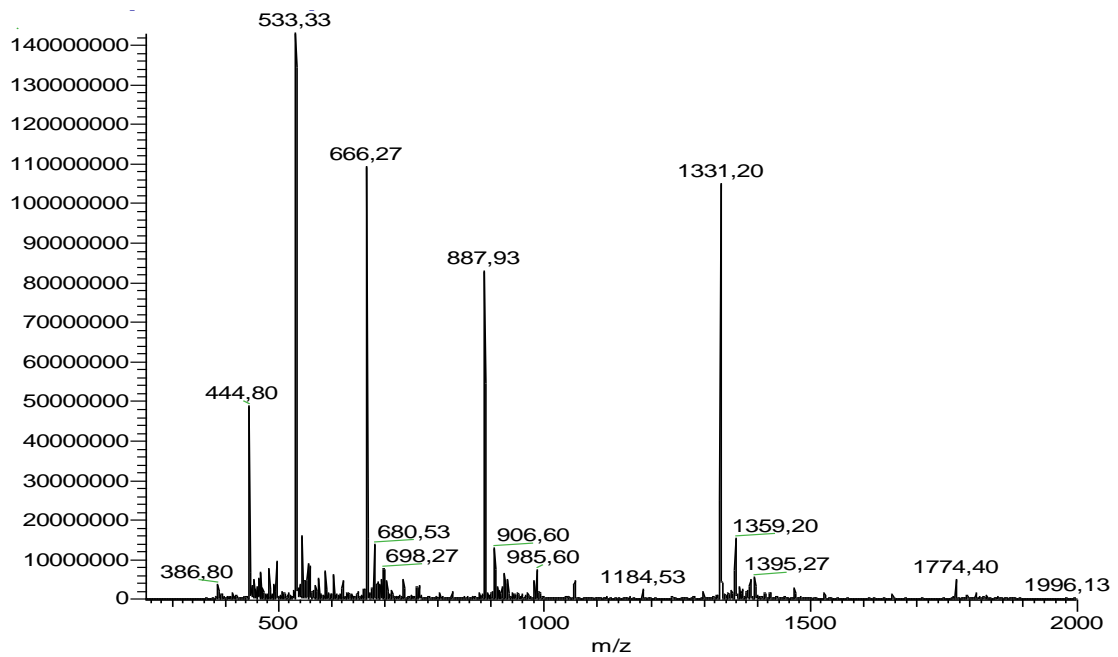


Figura C2 - Espetro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C12-S4₁₃-PV bruto.

D. Péptido C14-S4₁₃-PV

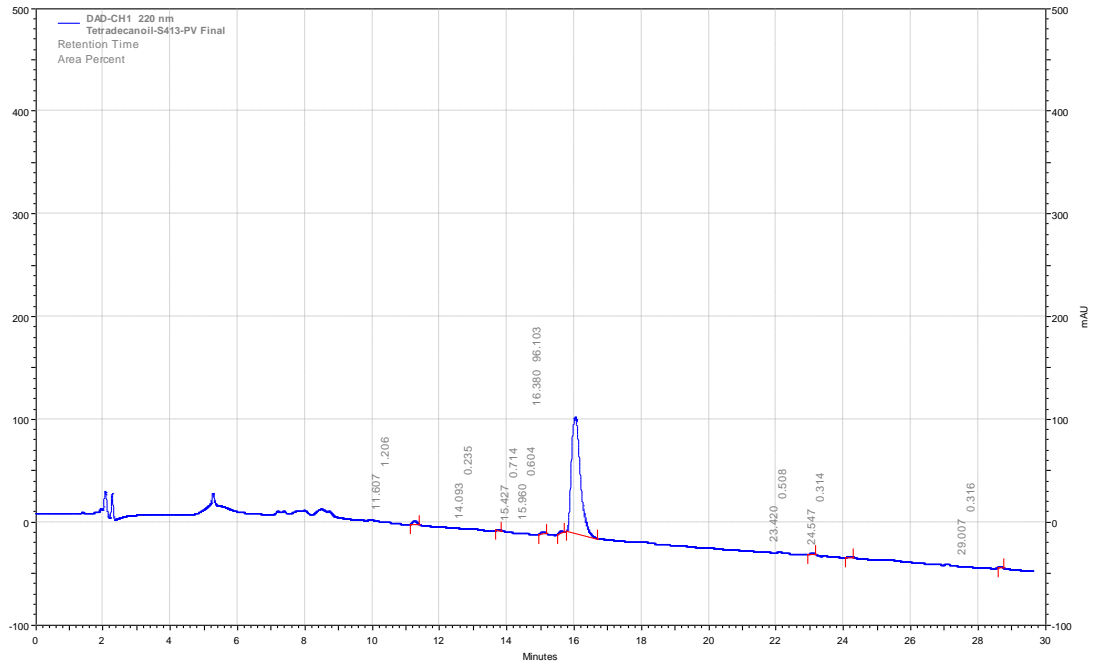


Figura D1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido C14-S4₁₃-PV purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ=220 nm.

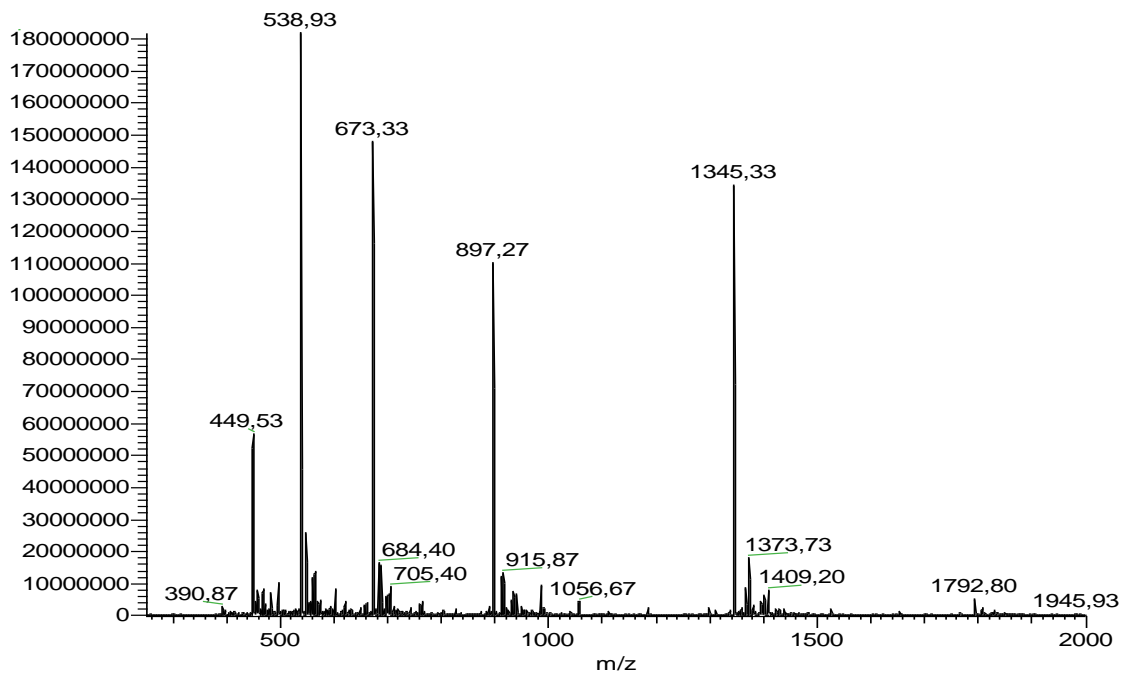


Figura D2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C14-S4₁₃-PV bruto.

E. Péptido C16-S4₁₃-PV

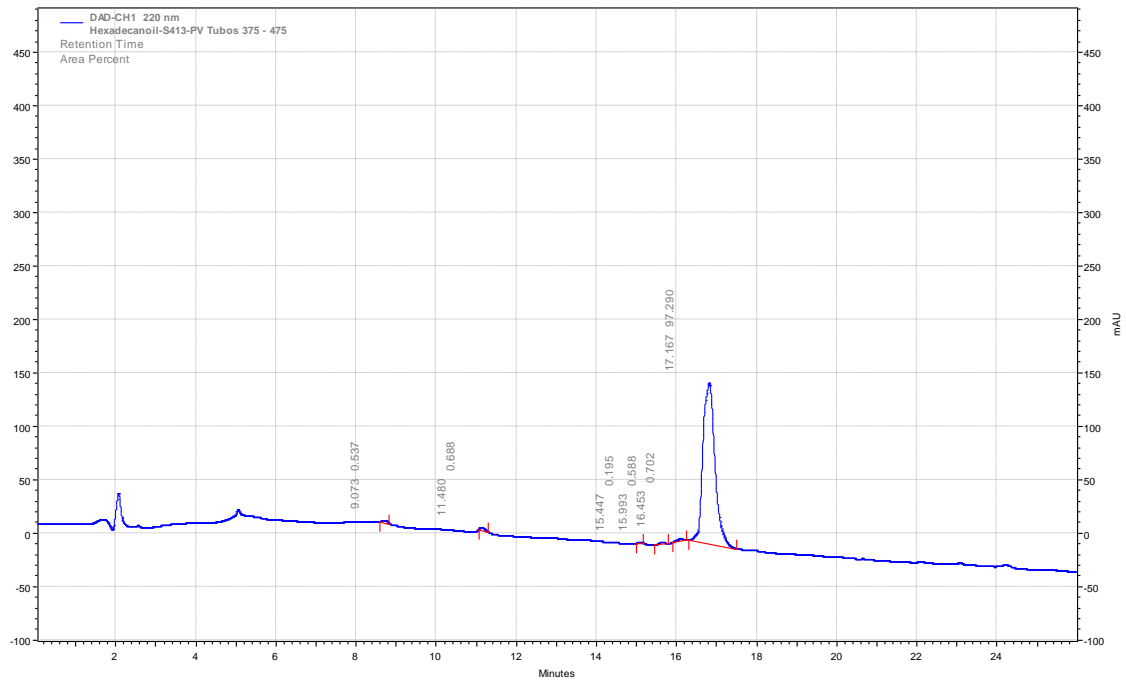


Figura E1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido C16-S4₁₃-PV purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.

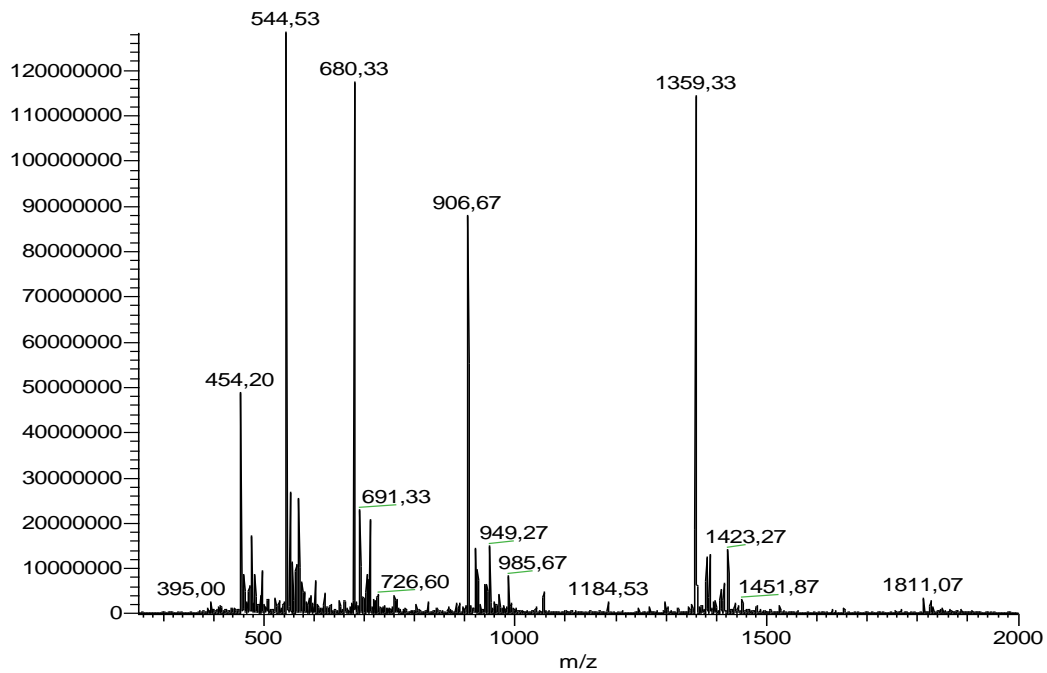


Figura E2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C16-S4₁₃-PV bruto.

F. Péptido C18-S4₁₃-PV

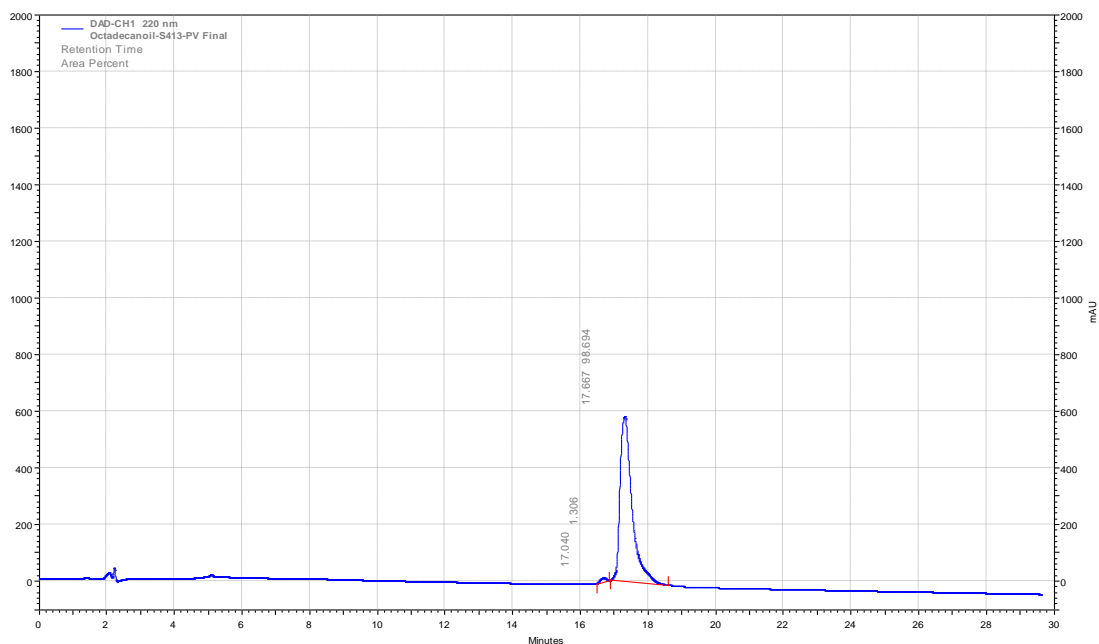


Figura F1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido C18-S4₁₃-PV purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ=220 nm.

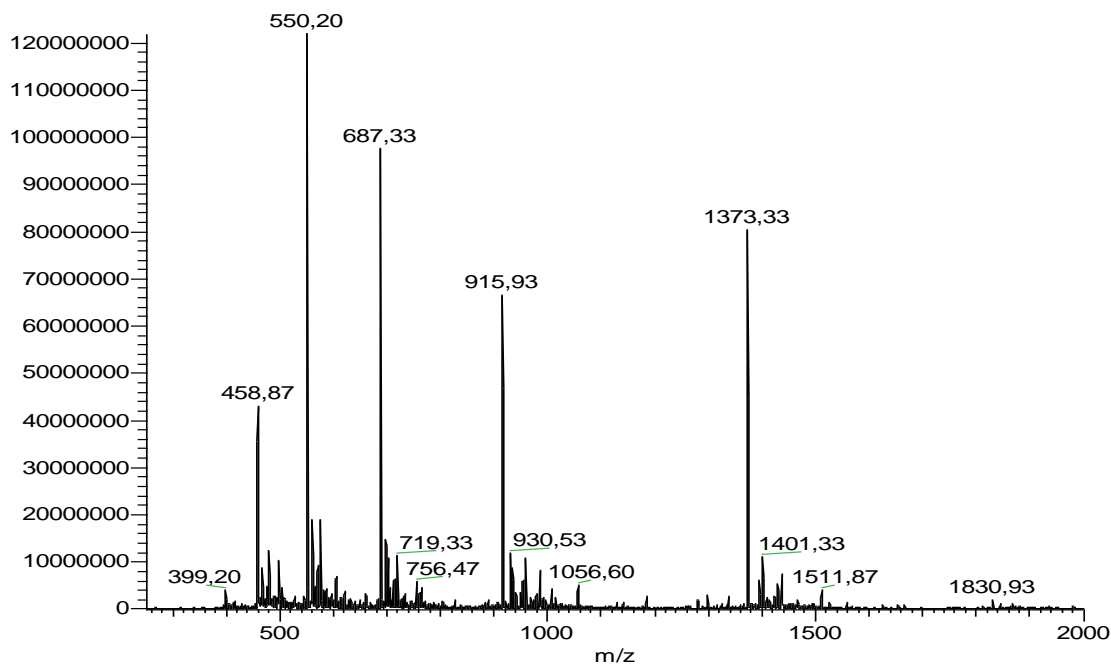


Figura F2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C18-S4₁₃-PV bruto.

G. Péptido C12-S4₁₃-PV Scr

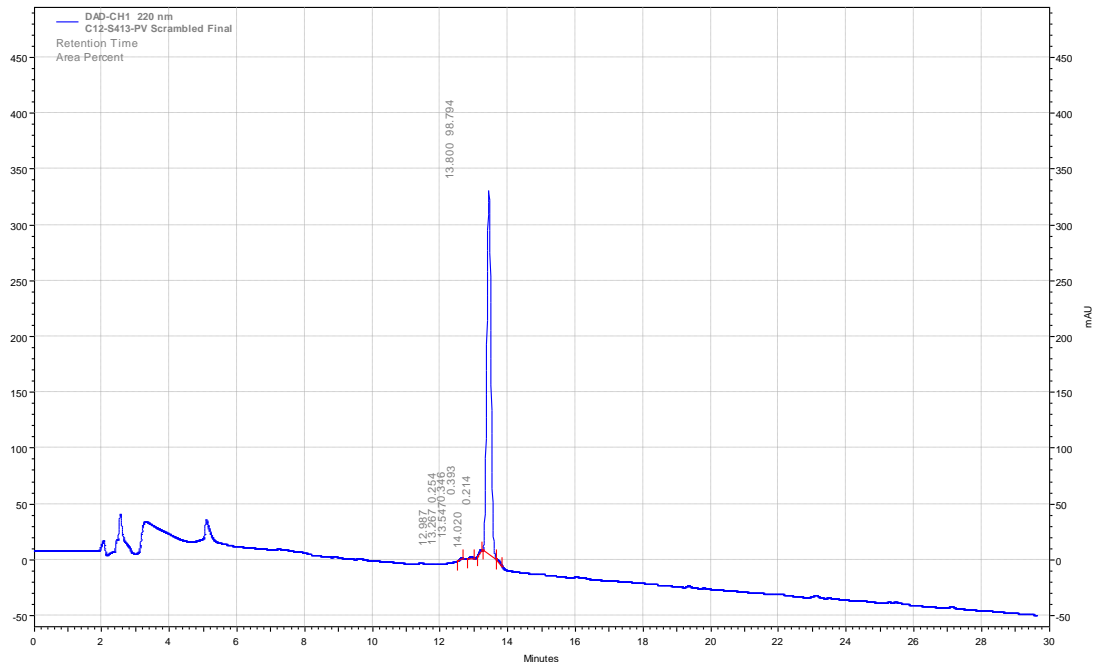


Figura G1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido C12-S4₁₃-PV Scr purificado, com uma eluição em gradiente de 0-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.

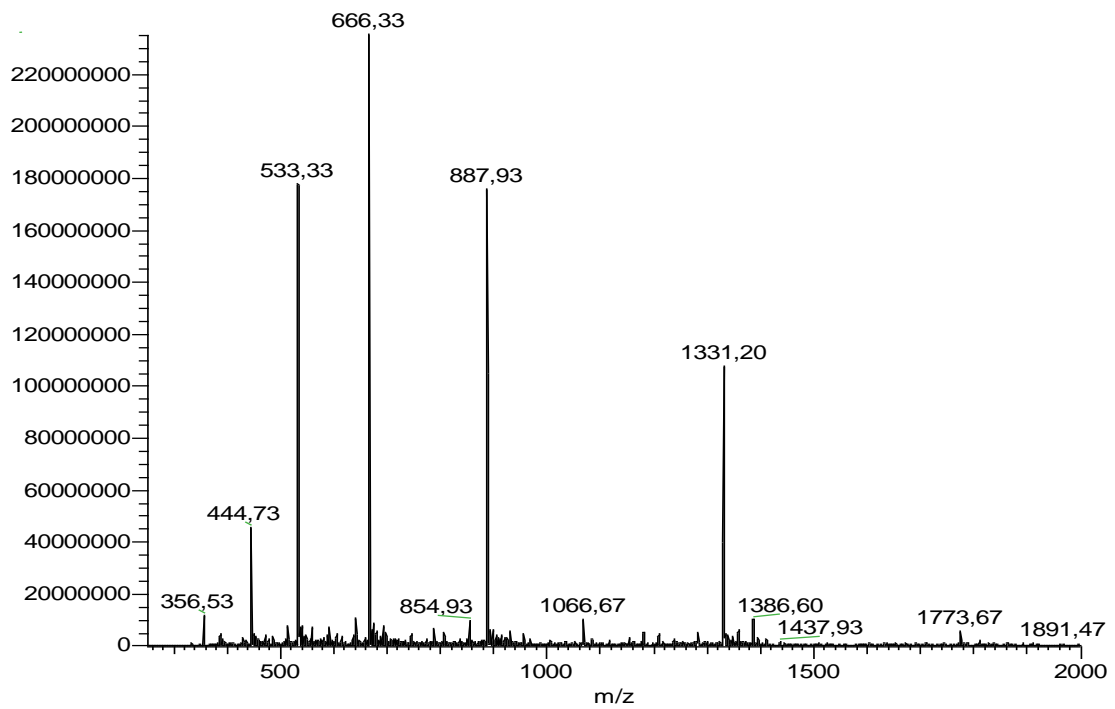


Figura G2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido C12-S4₁₃-PV Scr bruto.

H. Péptido Hexinoil-hLF(1-11)

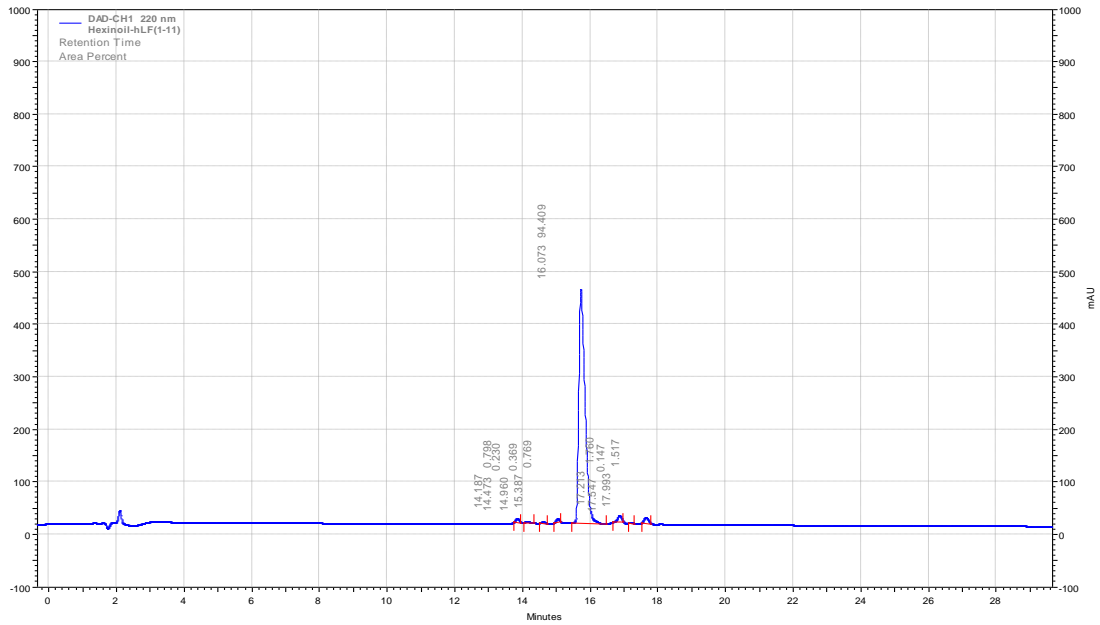


Figura H1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido Hexinoil-hLF(1-11) purificado, com uma eluição em gradiente de 10-30% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.

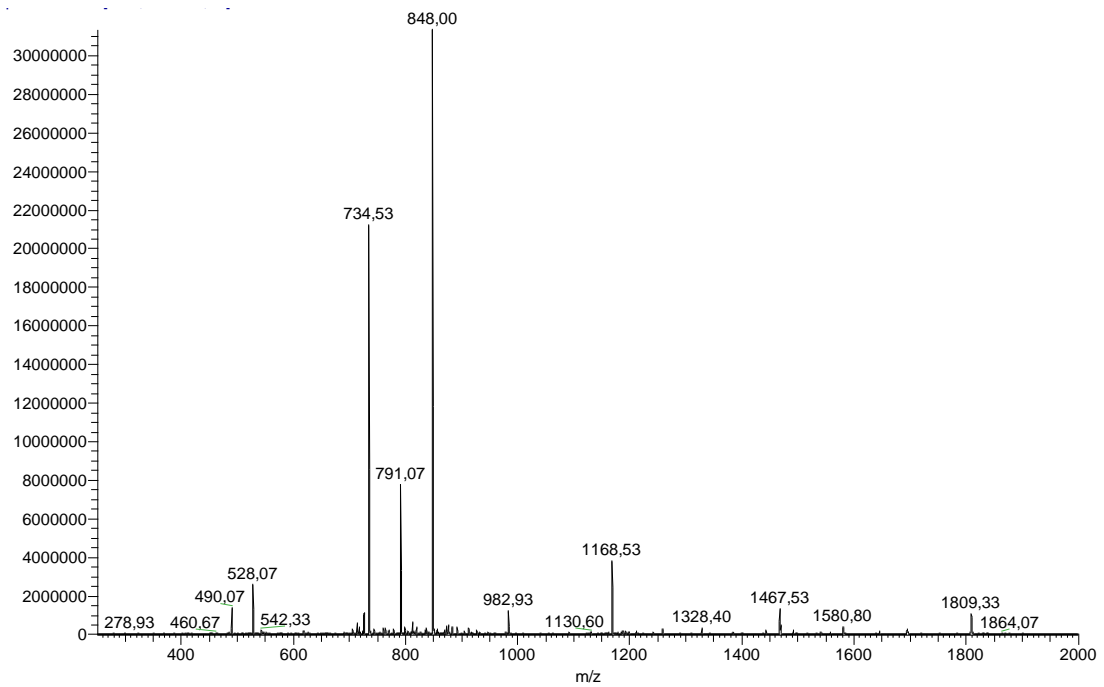


Figura H2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido Hexinoil-hLF(1-11) bruto.

I. Péptido hLF(1-11)-Ahx-Pra

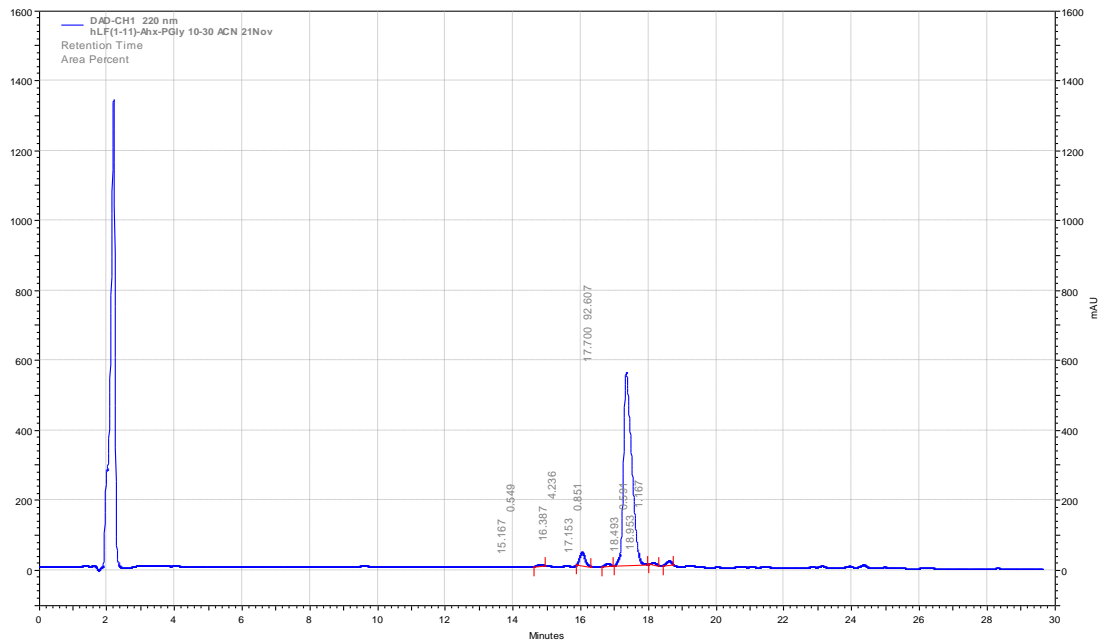


Figura I1 - Cromatograma obtido pela análise do péptido hLF(1-11)-Ahx-Pra purificado, com uma eluição em gradiente de 10-30% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 μ m), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao $\lambda=220$ nm.

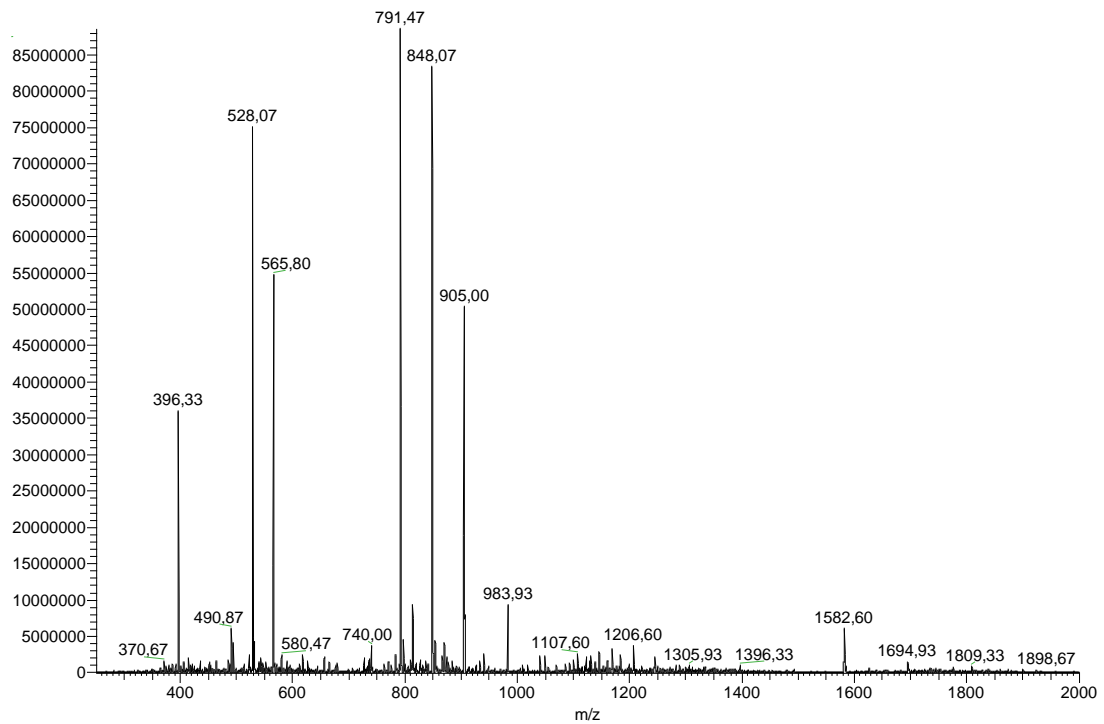


Figura I2 - Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do péptido hLF(1-11)-Ahx-Pra bruto.