

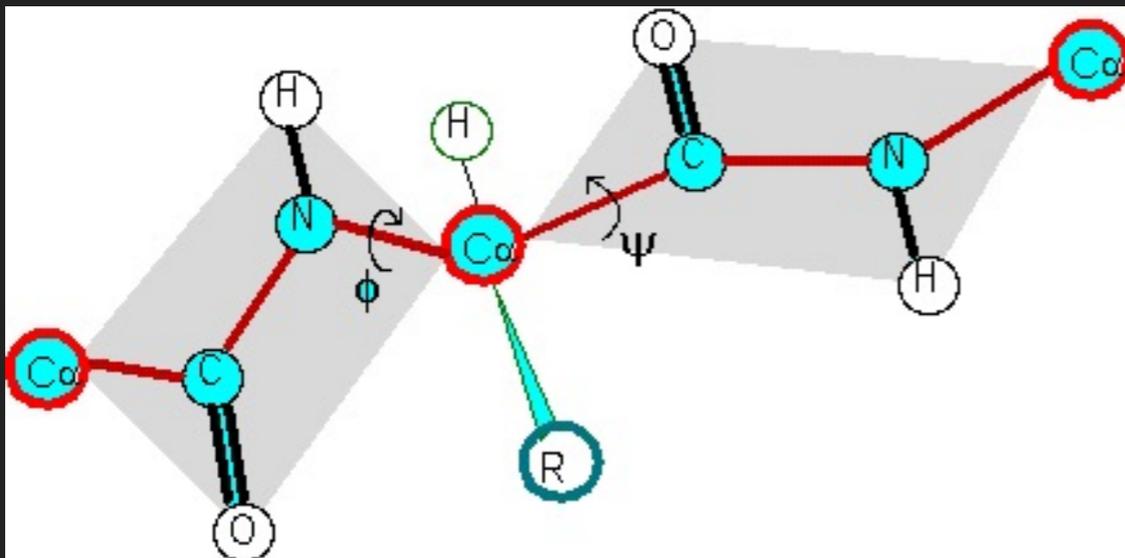
SINTESI PEPTIDICA

LEZIONE 4

PEPTIDI

I legami peptidici sono legami ammidici che uniscono i residui amminoacidici.

- ▶ gruppo ammino libero a sx
- ▶ gruppo carbossilico libero a dx
- ▶ configurazione trans più stabile della cis
- ▶ legame peptidico 40% carattere di doppio legame \Rightarrow strutture dell'intorno peptidico planari
- ▶ rotazione permessa per $C_{\alpha}-NH_3^+$ e per $C_{\alpha}-COO^-$



LEGAME AMMIDICO (PEPTIDICO)

Il legame ammidico si ottiene per reazione di un gruppo derivato dall'acido carbossilico con un gruppo amminico

acido carbossilico (acido) + ammina (base) \rightleftharpoons sale di ammonio

derivato dell'acido carbossilico + ammina \rightarrow ammide

derivato dell'acido carbossilico:

- ▶ cloruro acilico: NO! (si hanno reazioni collaterali)
- ▶ anidride asimmetrica: NO! perchè si perderebbero degli amminoacidi
- ▶ anidride simmetrica: SI!
- ▶ esteri: SI!

PROTEZIONE

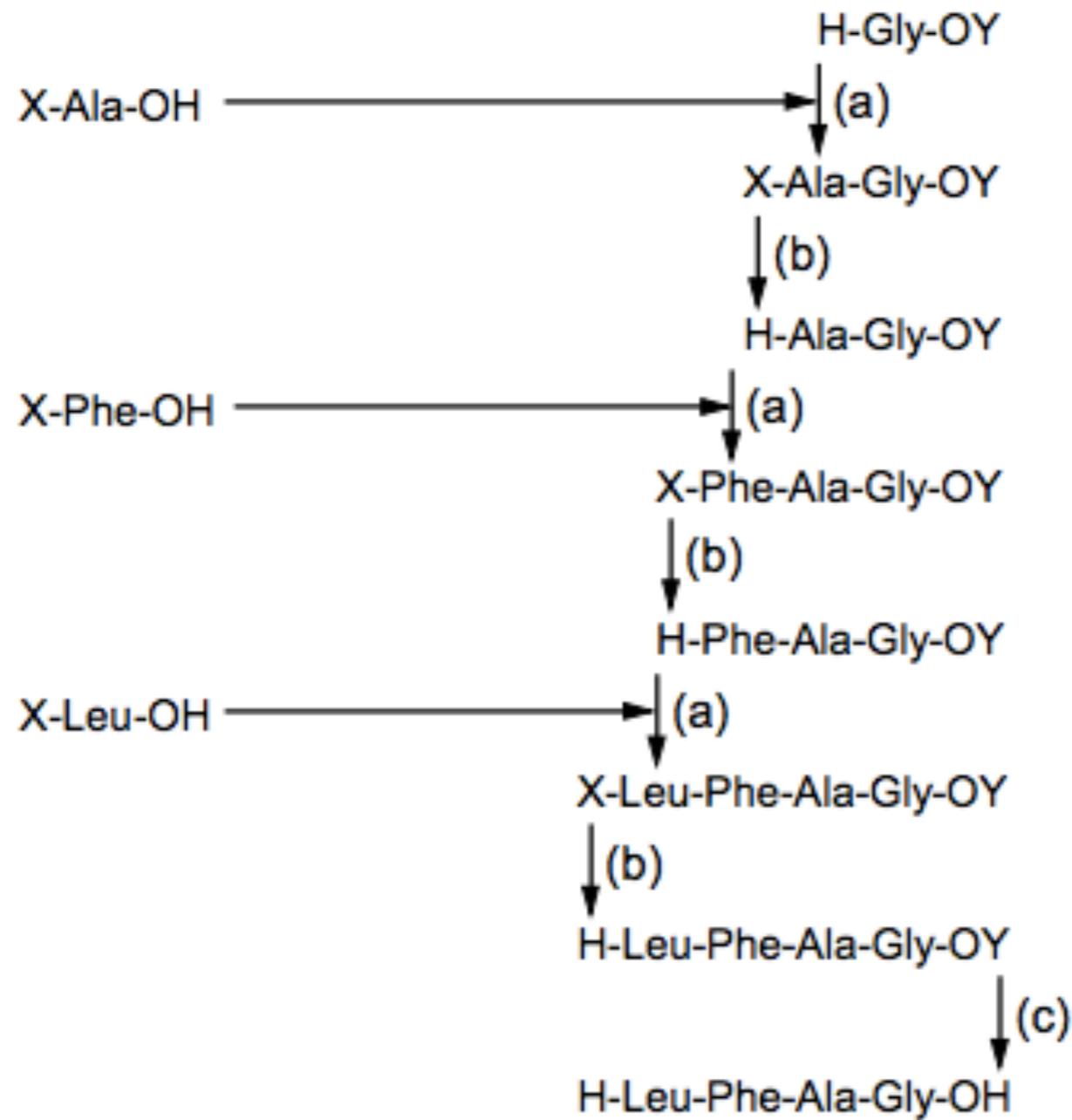
Se si fanno reagire due amminoacidi diversi ci sono 4 possibili peptidi come prodotto.

Per una sintesi selettiva è necessario procedere proteggendo i gruppi che non devono reagire in ogni passaggio e deproteggendoli per avere la reazione.

Si avranno quindi:

- ▶ N protettori
- ▶ C protettori
- ▶ C attivatori (per evitare la reazione acido-base)

PROTEZIONE



(a) = aggancio del nuovo amminoacido

(b) = deprotezione del gruppo amminico

(c) = deprotezione del gruppo carbossilico

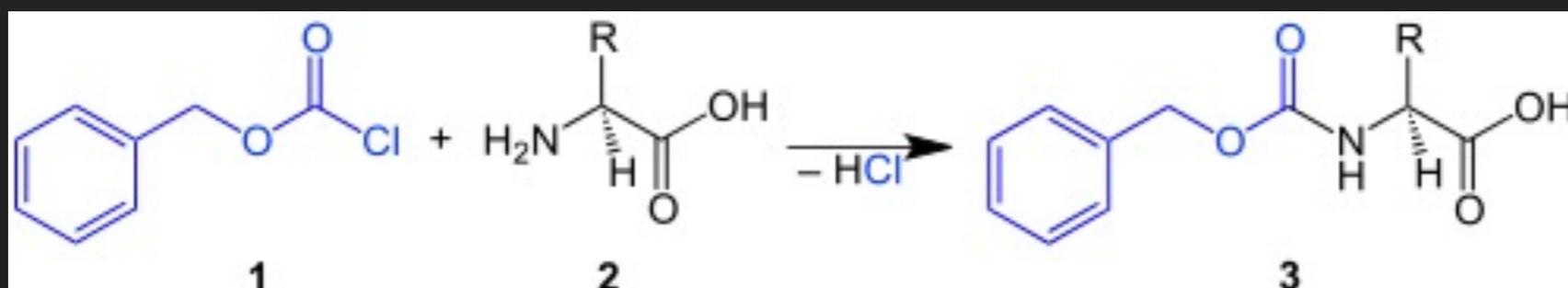
N-PROTETTORI

N-protettori sono gruppi **elettronattrattori** che formano **legami labili**

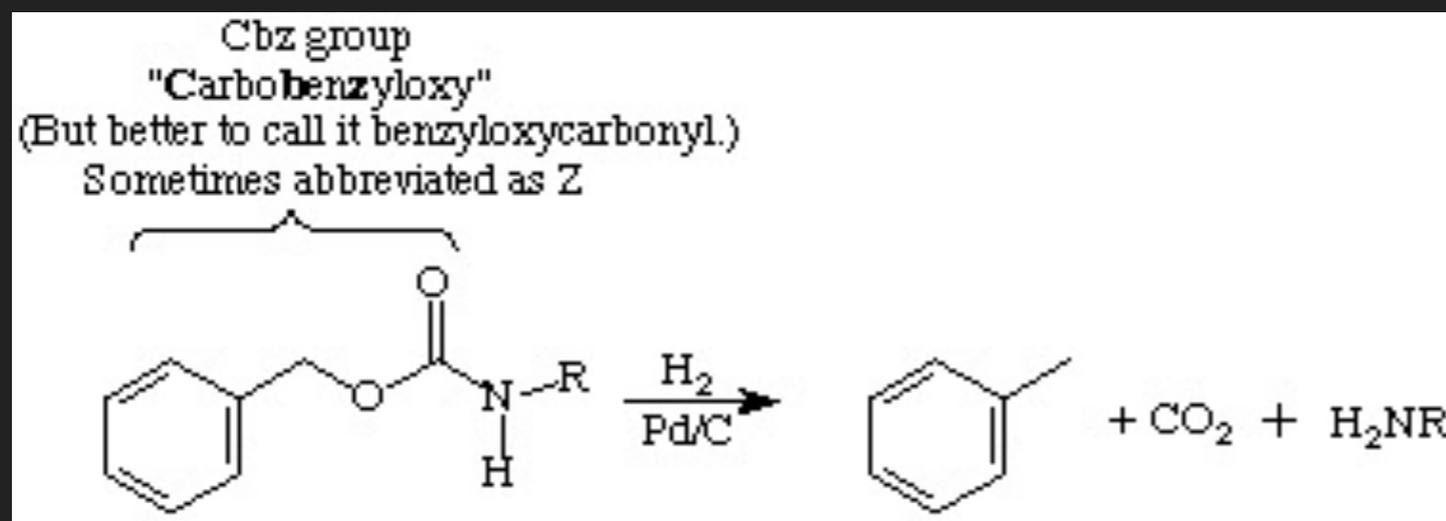
Gli N-protettori una volta idrolizzati formano carbocationi stabili (es: PhCH_2^+ , tBu^+)

- ▶ Estere carbammico Cbz (Benzil-ossi-carbonil)

protezione:



deprotezione: con idrogeno e catalizzatore

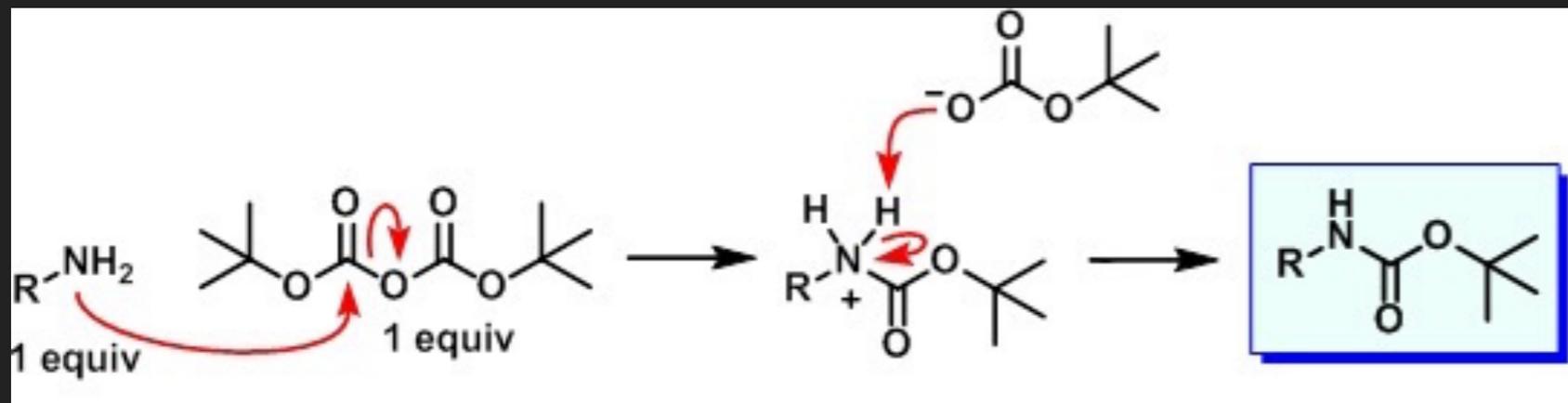


oppure acidi protici:

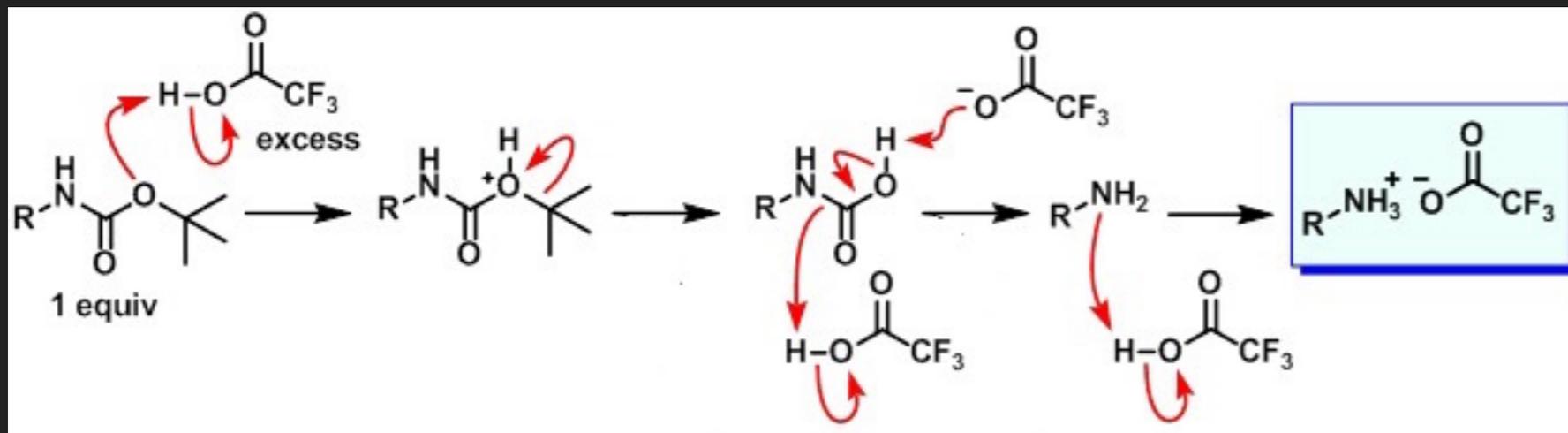
- HBr anidro in CH_3COOH
- HF 70% in piridina
- CF_3COOH agisce molto lentamente

N-PROTETTORI

- ▶ Estere carbammico: Boc (terzbutil-ossi-carbonil) protezione:

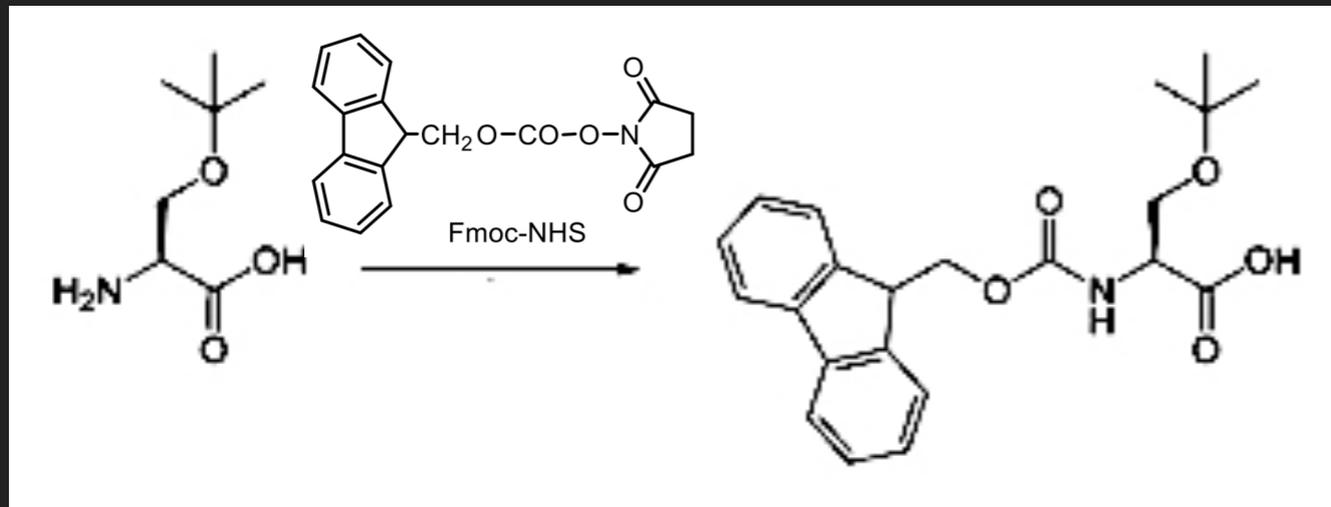


deprotezione: con acido trifluoroacetico

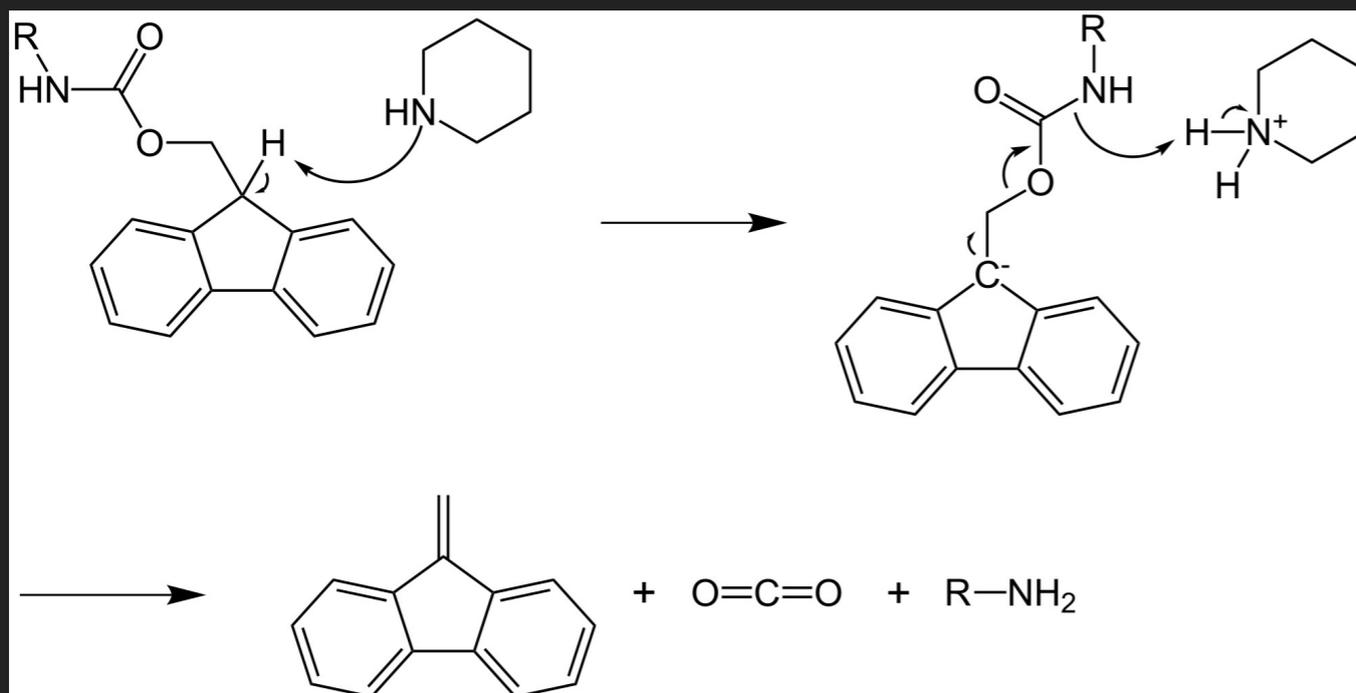


N-PROTETTORI

- ▶ Estere carbammico: Fmoc (9-fluorenil)metossicarbonil
protezione:



deprotezione: con piperidina

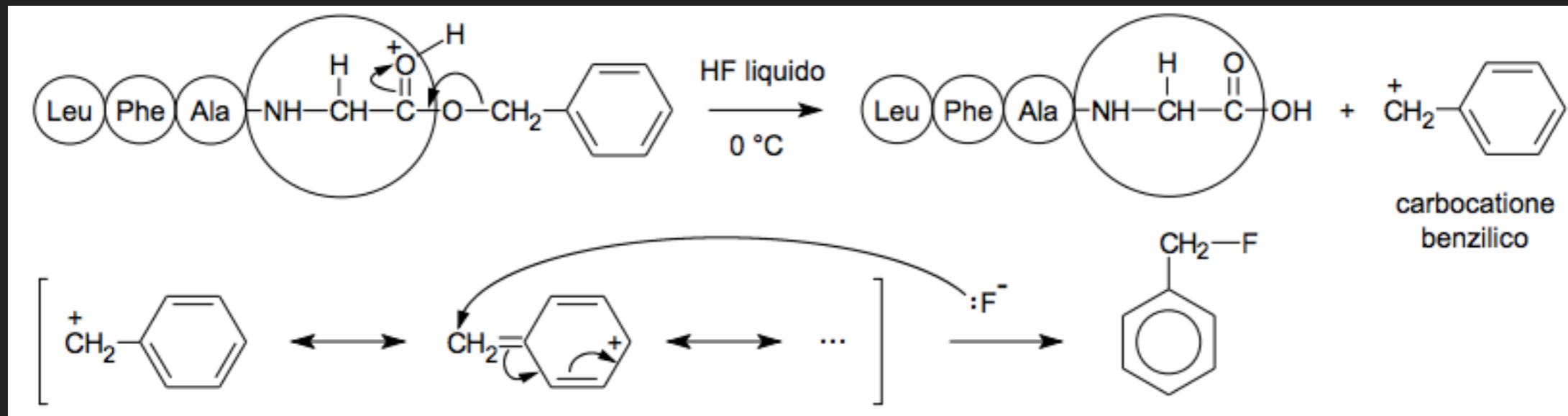


C-PROTETTORI

▶ Estere benzilico

protezione: formazione di un estere con PhCH₂OH acido catalizzata

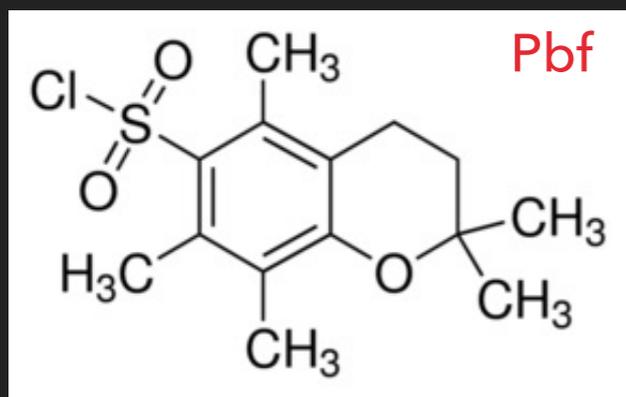
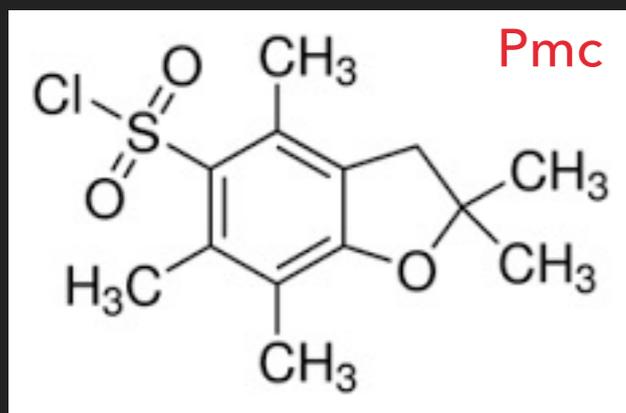
deprotezione: con HF anidro



PROTEZIONE DELLE CATENE LATERALI

Se la catena laterale dell'A.A. ha un gruppo amminico è necessario proteggerlo.

Protettori:



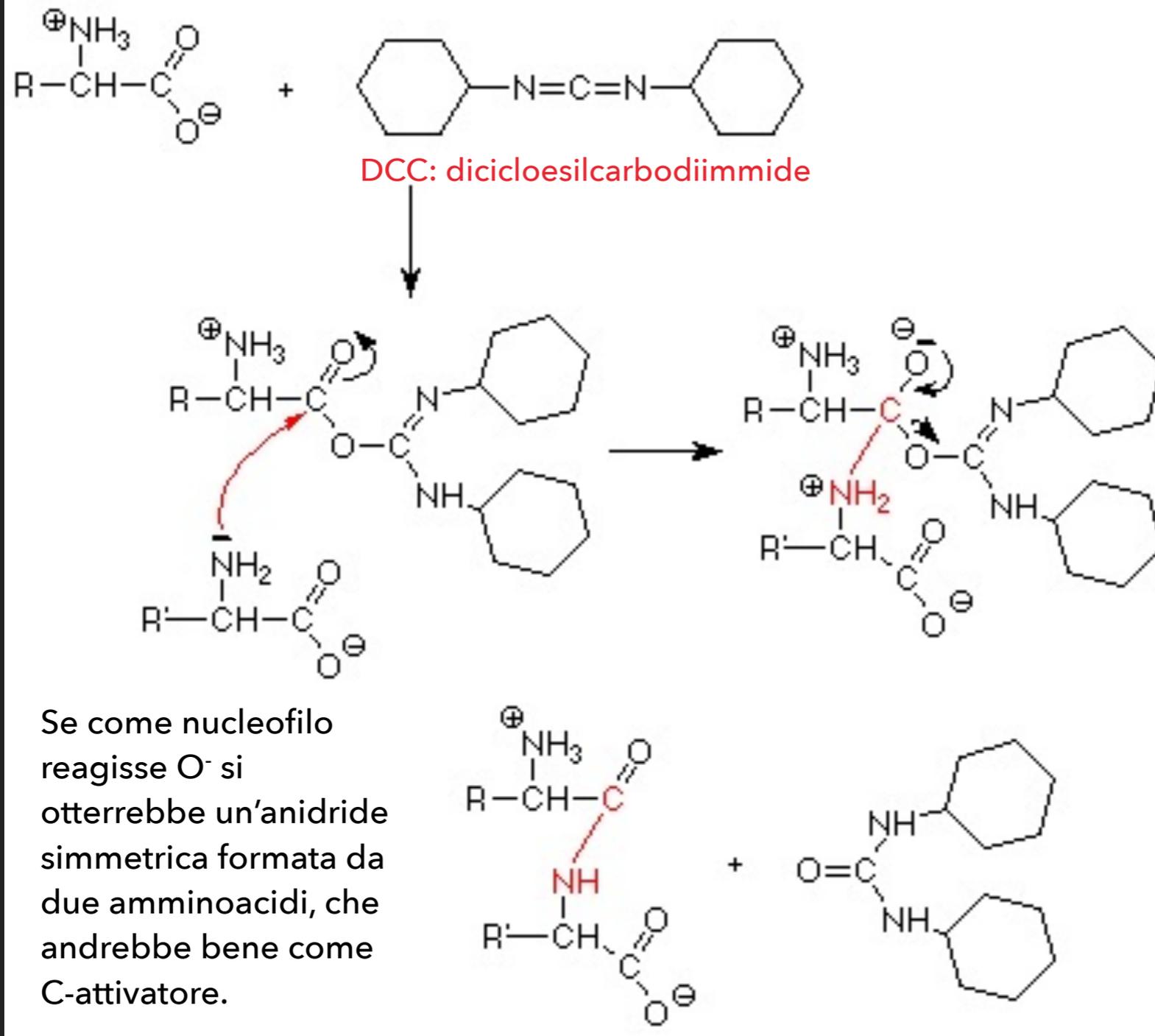
Deprotezione:

TFA (20min)

TFA (più veloce)

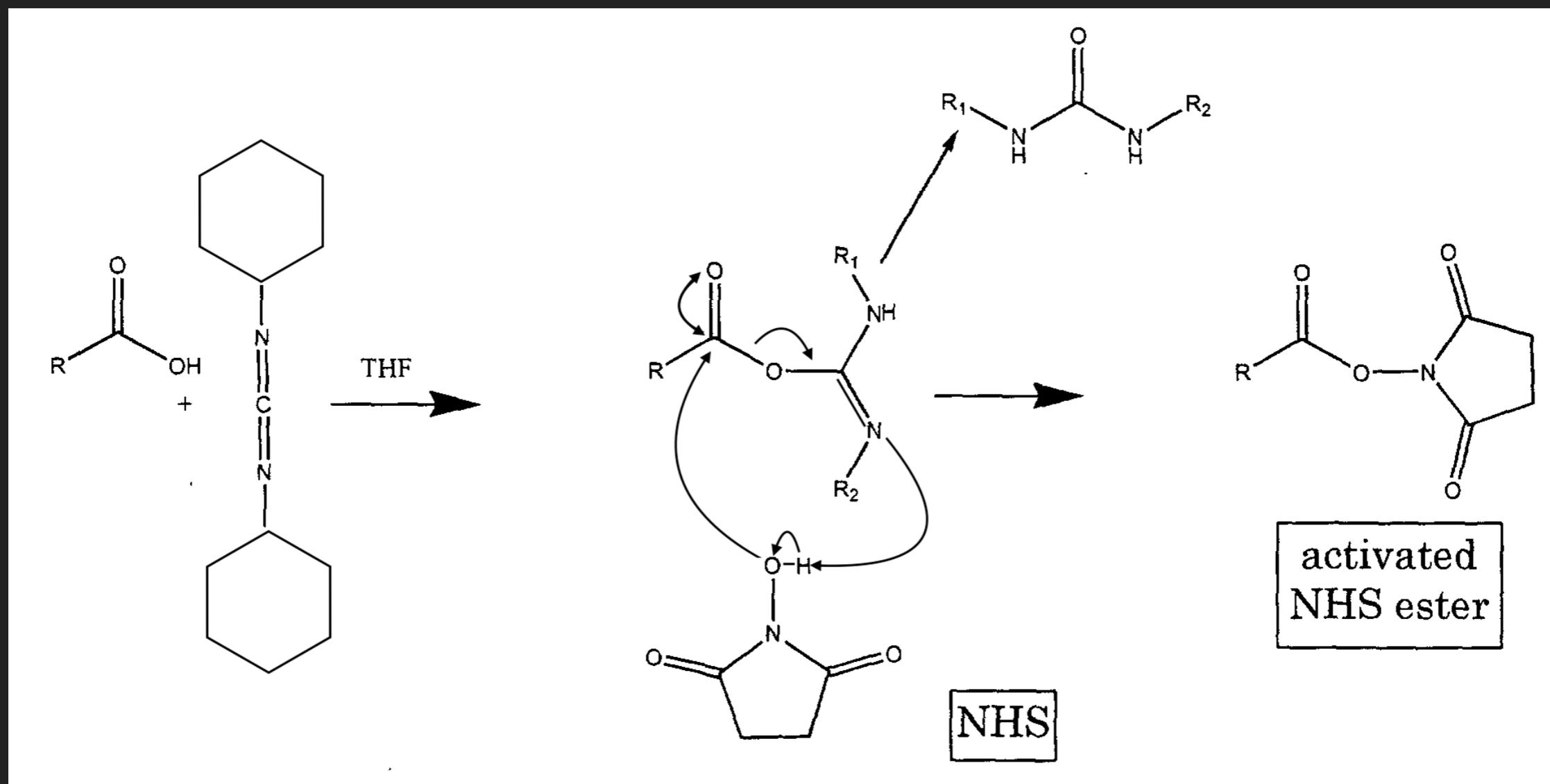
C-ATTIVATORI

► Anidridi simmetriche



C-ATTIVATORI

▶ Esteri attivi: N-idrossi eterocicli



SINTESI PEPTIDICA IN FASE SOLIDA (SPPS)

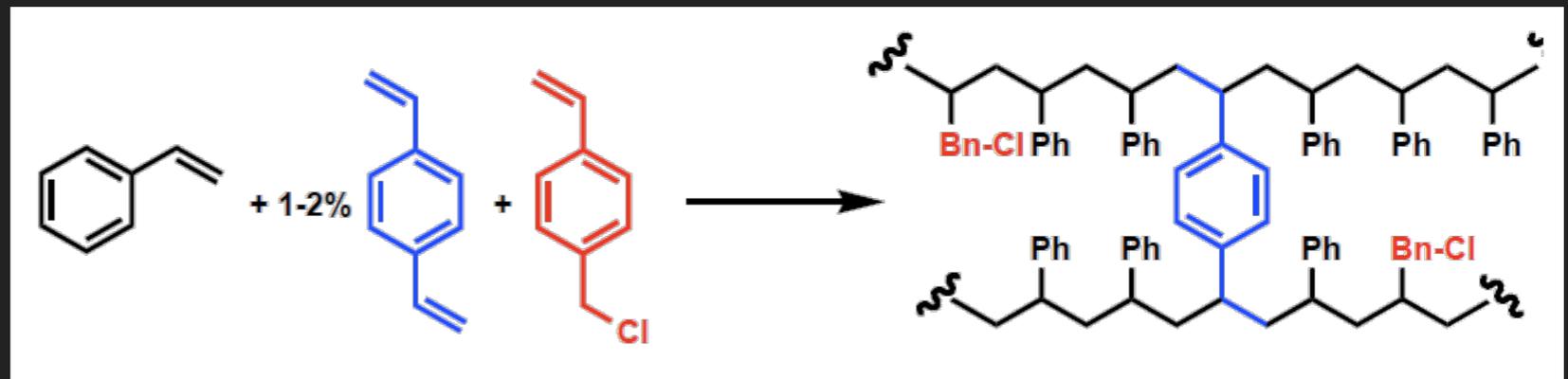
- ▶ L'amminoacido viene legato ad una resina in modo stabile (in modo che il legame resista a tutte le seguenti reazioni).
- ▶ Il processo di sintesi peptidica procede nello stesso modo della sintesi in soluzione e alla fine della sintesi si stacca il peptide dalla resina.
- ▶ E' necessario lavorare in eccesso di reagenti
- ▶ I reagenti in eccesso e i sottoprodotti si eliminano lavando la resina
- ▶ Il processo è automatizzabile (più veloce)

RESINE POLISTIRENICHE

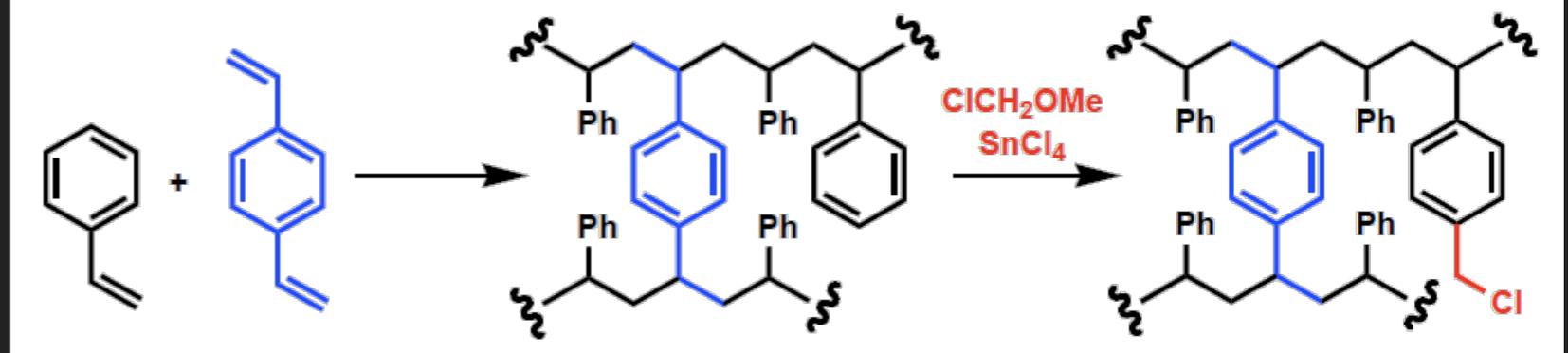
Resina clorometilica di Merrefield:

► Sintesi:

a. One pot
(semplice)



b. Resina → Resina funz.
(migliore)

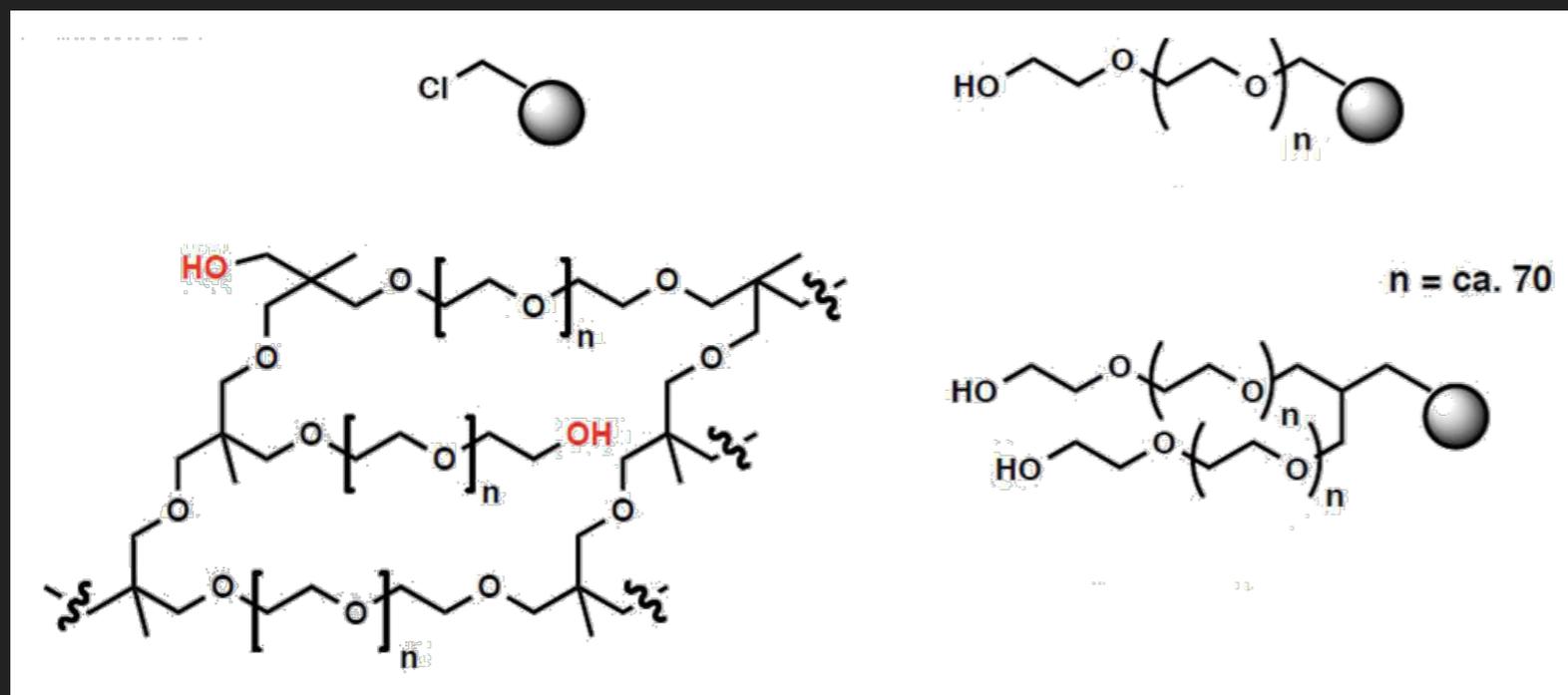


RESINE PEG-PS

Copolimero: Polistirene + Polietilenglicole:

- ▶ Funzionano bene in solventi polari
- ▶ Hanno ottima stabilità chimica e termica
- ▶ Difetti: maggiore costo, minore capacità di loading e bassa resistenza alle sollecitazioni meccaniche

NB: Loading: mmol di gruppo funzionale per grammo di resina



CONSIDERAZIONI SULLA SINTESI IN FASE SOLIDA

Protocollo N-protezione:

- ▶ Con Boc:

 - Cleaving con TFA

 - Distacco dalla resina con HF

- ▶ Con Fmoc:

 - Cleaving con piperidina

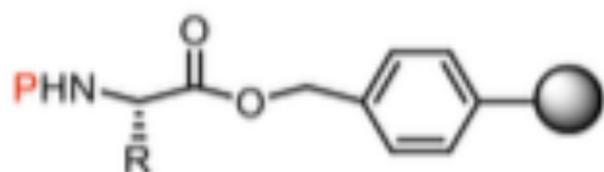
 - Distacco dalla resina con HF ma può bastare anche TFA

CONSIDERAZIONI SULLA SINTESI IN FASE SOLIDA

Resine:

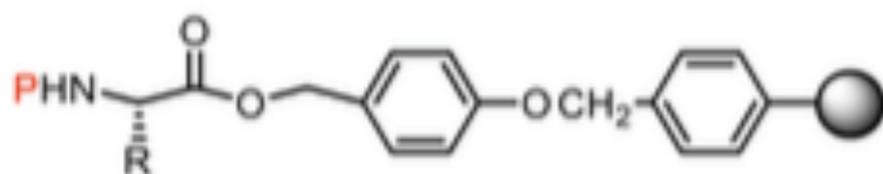
Distacco peptide:

Merrifield



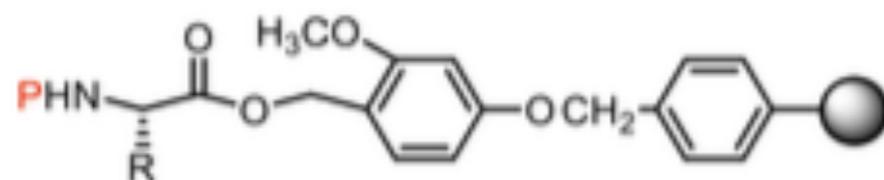
HF liquido

Wang



50-60% TFA in DCM

Sasrin



1% TFA in DCM

EFFICIENZA DELLA SINTESI IN FASE SOLIDA

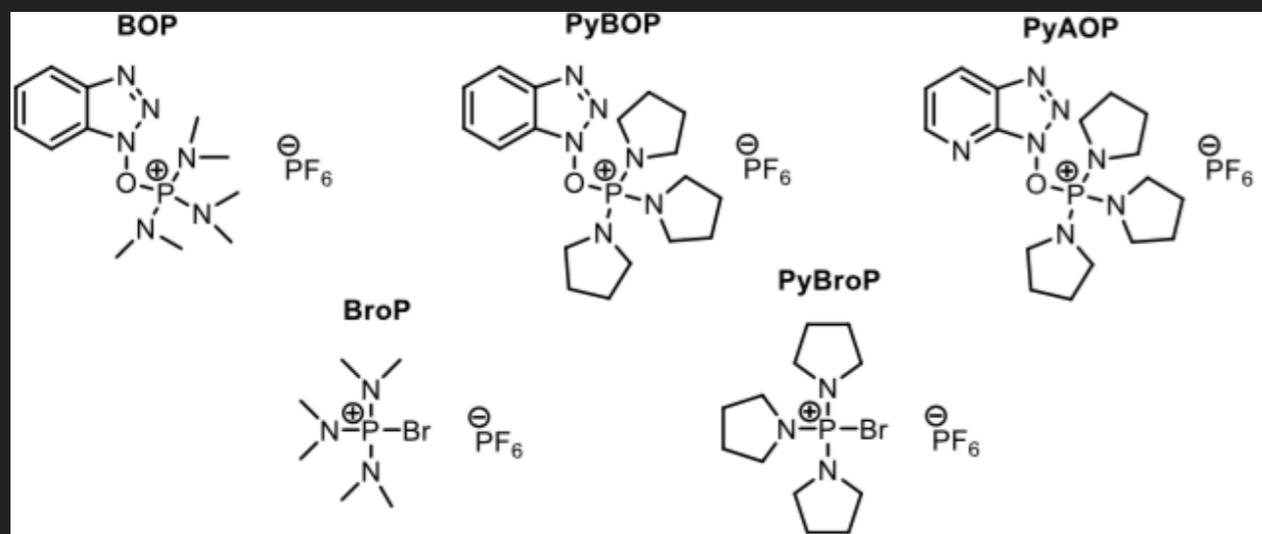
- ▶ Possono verificarsi mancati agganci tra un peptide e l'amminoacido seguente \Rightarrow errore nella sequenza

La piccola percentuale di errore ad ogni passaggio si propaga quindi è importante avere resa per passaggio $\approx 99\%$

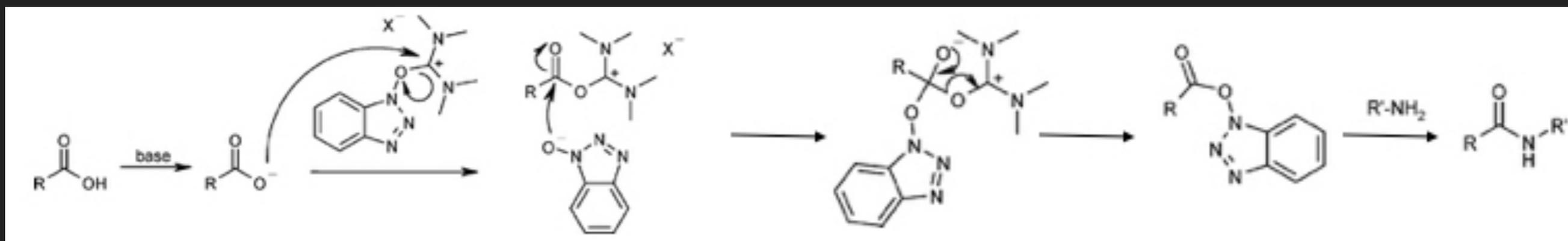
- ▶ Il trattamento con HF per distaccare la resina abbassa la resa finale quindi si utilizzano scavengers per ovviare a questo problema

C-ATTIVATORI IN SITU

Sali di fosfonio

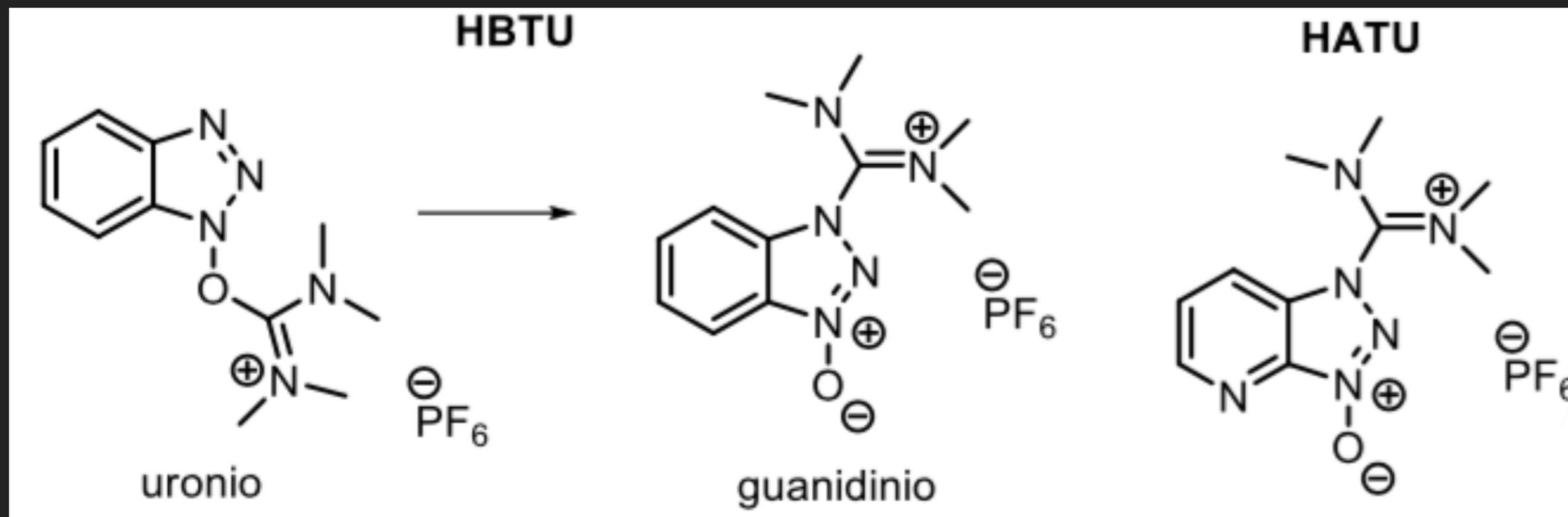


Meccanismo:



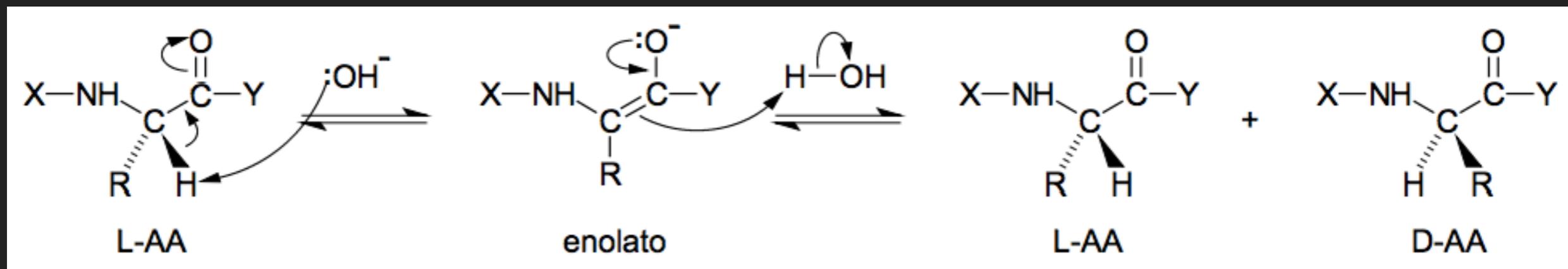
C-ATTIVATORI IN SITU

Sali di uronio e guanidinio:



RACEMIZZAZIONE

- ▶ Racemizzazione per enolizzazione diretta
Il processo avviene in ambiente acido o basico ma è trascurabile in condizioni normali

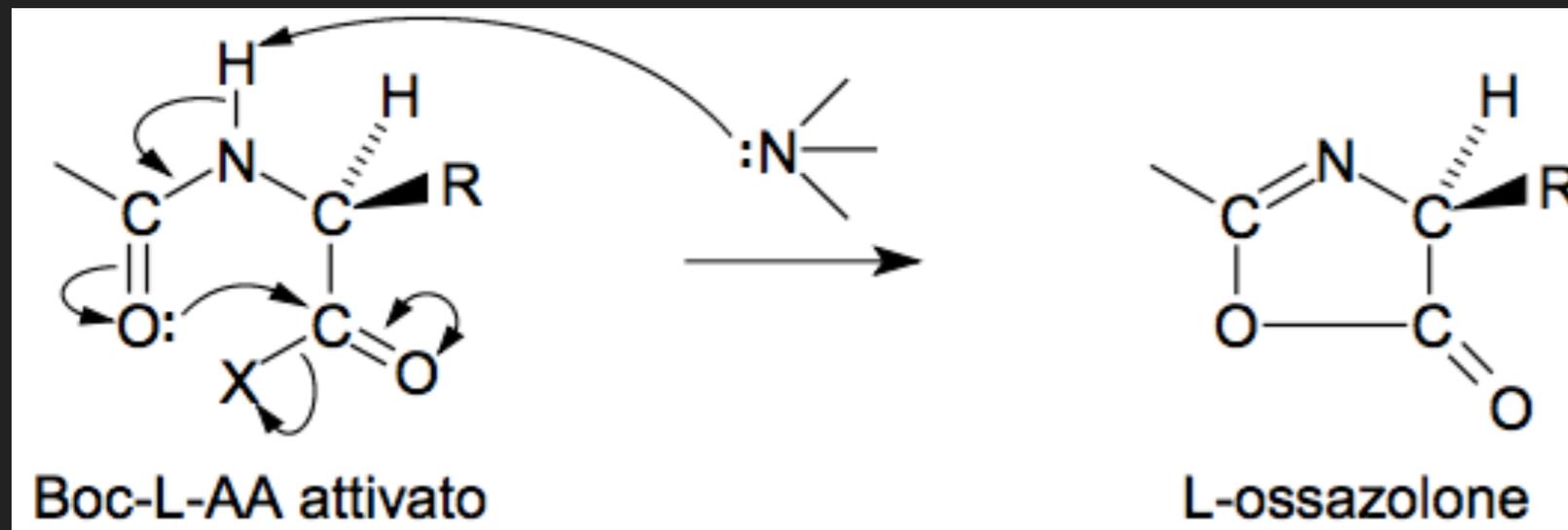


RACEMIZZAZIONE

► Racemizzazione via ossazolone

Ossazolone: intermedio ciclico (si forma facilmente in Boc-amminoacidi C-attivati)

NB: Questo processo è il vero responsabile della racemizzazione

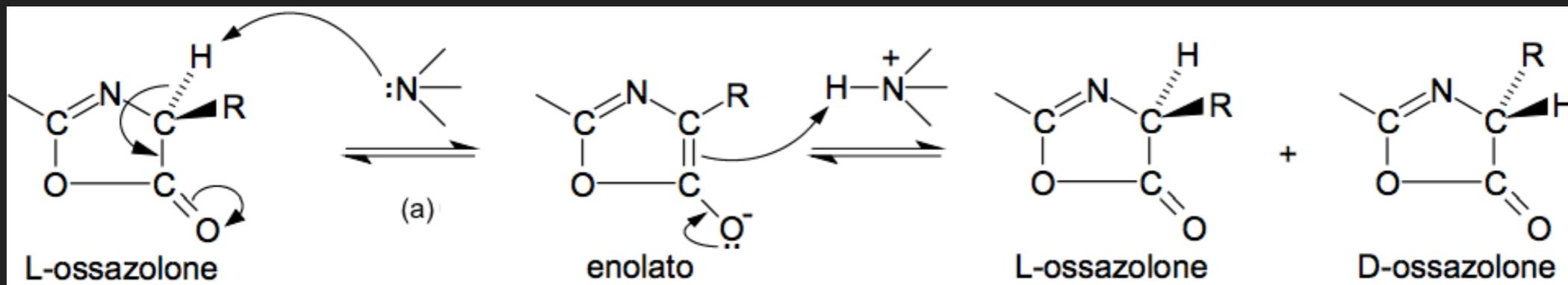


Meccanismi:

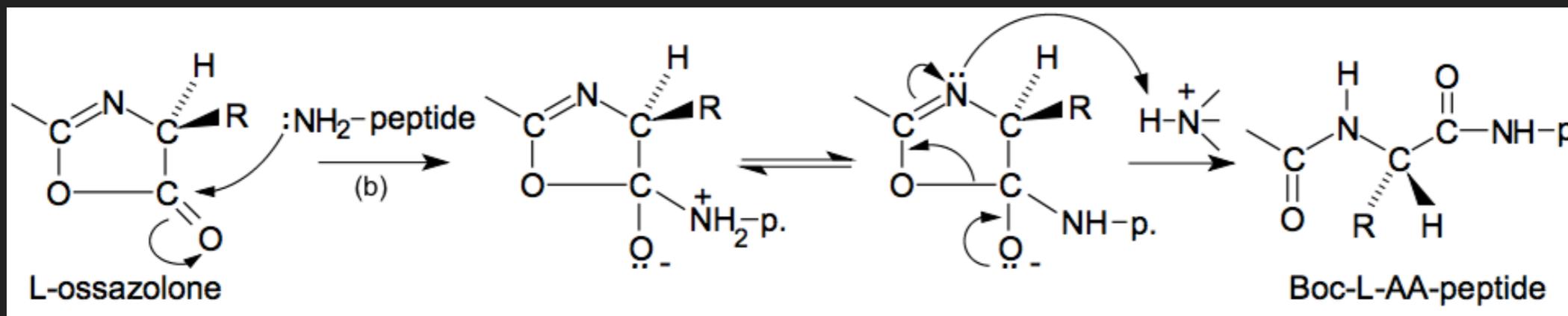
- Racemizzazione dell'ossazolone
- Racemizzazione della catena polipeptidica (amminolisi)

RACEMIZZAZIONE

- a. Racemizzazione dell'ossazolone: L'ossazolone può enolizzare ad alta velocità. L'idrogeno legato al carbonio chirale è acido perchè è in posizione α rispetto a due doppi legami, il carbonile e il doppio legame C=N.

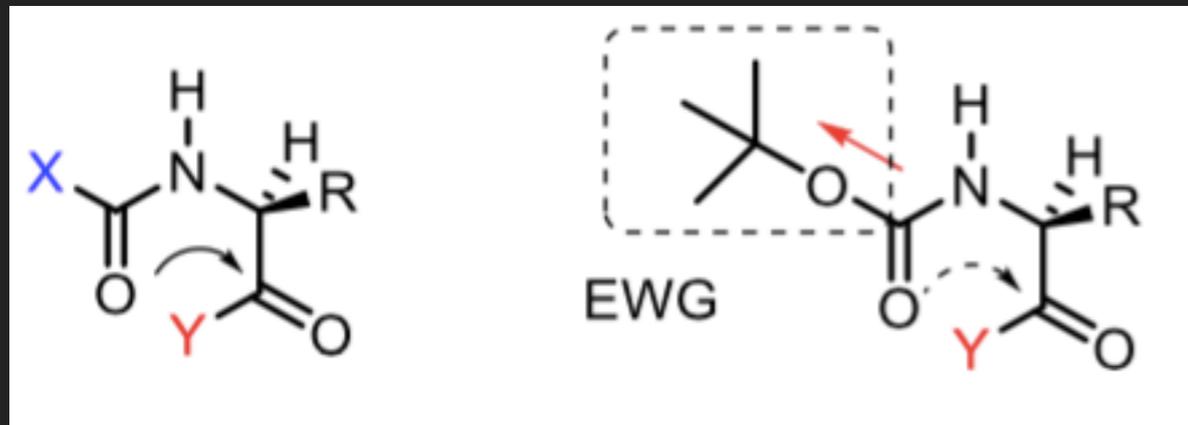


- b. Racemizzazione della catena polipeptidica (amminolisi): l'ossazolone è molto reattivo come acilante e può reagire con i nucleofili (es: gruppo amminico libero di un peptide). Se l'ossazolone aveva racemizzato anche il prodotto di questo processo un racemo.



RIDURRE LA RACEMIZZAZIONE

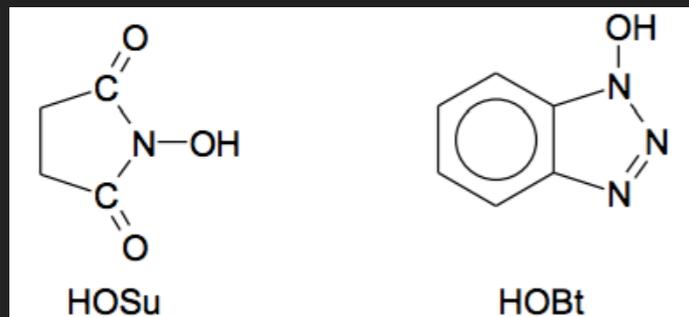
1. Impedire la formazione dell'ossazolone
 - ▶ Ridurre l'attivazione del gruppo carbossilico: invece di utilizzare cloruri acilici si utilizzano anidridi simmetriche o esteri attivi.
 - ▶ Introdurre un sostituito elettron attrattore (EWG) per ridurre la nucleofilicit  dell'ossigeno



RIDURRE LA RACEMIZZAZIONE

2. Impedire la racemizzazione dell'ossazolone:

- ▶ Aumentare la competitività della reazione di apertura dell'anello (amminolisi) utilizzando HOSu e HOBT. L'ossigeno di HOSu o di HOBT attacca 10 volte più velocemente rispetto al gruppo amminico di un peptide.



- ▶ Diminuire l'acidità dell'ossazolone introducendo sostituenti del gruppo amminico di tipo uretanico (Boc, Fmoc)

