

## **Art. 2**

Artigo de pesquisa científica / <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n3.91249>

### **Funcionalização do polietilenoglicol metil éter via reação de bromoacetilação: ativação, caracterização por MALDI-TOF e mecanismo de reação**

**Título curto:** Funcionalização do polietilenoglicol metil éter via reação de bromoacetilação

Lídia Pereira B. Cordeiro<sup>1</sup>, William Gustavo Lima<sup>1</sup>, Ana Caroline Soares<sup>1</sup>, Marcia Helena Borges<sup>2</sup>, Maria Elena de Lima<sup>1,3</sup>, Júlio César Moreira Brito<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Rua Conde Pereira Carneiro, 80. Gameleira, Minas Gerais, 35501-293, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Instituto de Ensino e Pesquisa, Santa Casa-Belo Horizonte, MG, Brasil.

\*Autor para correspondência: Correio eletrônico: [juliocmbrito@gmail.com](mailto:juliocmbrito@gmail.com), ORCID: 0000-0003-2794-5680

Recebido: 3 de junho de 2020

Revisado: 11 de junho de 2020

Aceto: 15 de junho de 2020

## **Resumo**

A PEGilação, reação química de conjugação com a molécula de polietilenoglicol (PEG) ou polietilenoglicol metil éter (mPEG), tem sido amplamente aplicada pelas indústrias farmacêuticas como estratégia de melhoria das propriedades farmacocinéticas de compostos bioativos. O PEG é um polímero que possui um esqueleto de poliéster quimicamente inerte e que apresenta grupos hidroxilos (-OH) em suas extremidades. Assim, o PEG para tornar-se apto como reagente de conjugação deve ser ativado com um grupo funcional que seja reativo. Nesse sentido, a bromoacetilação apresenta-se como uma alternativa para a funcionalização do PEG. Portanto, nesse trabalho objetivamos descrever em detalhes os

procedimentos e o mecanismo de reação envolvida na funcionalização do mPEG, através da reação de bromoacetilação. Além do mais, estudamos a aplicação do MALDI-ToF para a caracterização do produto ativado. Após a bromoacetilação, por um procedimento adaptado, obteve-se o bromoacetyl-mPEG-éster, com rendimento bruto de 56,78%. Análises posteriores, por espectrometria de massas por MALDI-ToF, possibilitaram identificar e caracterizar o produto bromoacetilado. Entre as condições de reação, o controle de temperatura (-10 °C a 0 °C) mostrou-se eficaz favorecendo a adição nucleofílica essencial à bromoacetilação. Assim, concluímos que o controle da baixa temperatura reacional é um fator chave para o favorecimento da adição nucleofílica à carbonila e, portanto, essencial na obtenção do mPEG funcionalizado via bromoacetilação. Estudos posteriores serão necessários, no entanto, para confirmar se o mPEG esterificado, nessas condições, poderá ser utilizado na conjugação com moléculas de natureza proteica ou peptídica, por meio de substituição nucleofílica bimolecular.

**Palavras-chaves:** Polietilenoglicol (PEG), PEGilação, bromoacetilação, adição nucleofílica.

## Summary

### **Poly(ethylene glycol) methyl ether functionalization by bromoacetylation reaction: Activation, characterization by MALDI-TOF and reaction mechanism**

PEGylation, a chemical reaction of conjugation with the polyethylene glycol molecule (PEG), has been widely applied by the pharmaceutical industries as a strategy to improve the pharmacokinetic properties of bioactive compounds. PEG is a polymer that has a chemically inert polyether backbone and hydroxyl groups (-OH) at its ends. Thus, PEG to become fit as a reagent for conjugation must be activated with a functional group that is reactive. In this sense, bromoacetylation presents itself as an alternative for the functionalization of PEG. Therefore, in this study we aim to describe in detail the procedures and reaction mechanism involved in the functionalization of mPEG through the bromoacetylation reaction. In addition, we used the spectrometric technique, by MALDI-ToF, for the characterization of the activated product. After applying an adapted bromoacetylation procedure, bromoacetyl-mPEG-ester was obtained with a yield of 56.78%. Subsequent analyzes of MALDI-ToF mass spectrometry were able to correctly identify and characterize the bromoacetylated product. Among the reaction conditions, temperature control (from -10 °C to 0 °C) was effective in favoring the essential nucleophilic addition to bromoacetylation. Thus, we conclude that the control of the low reaction temperature is a key factor in favoring the nucleophilic addition to carbonyl and, therefore, obtaining a favorable conversion to functionalized PEG via bromoacetylation. Further studies, however, will be necessary to confirm whether PEG esterified with

these conditions can be used in conjunction with molecules of a protein or peptide nature by means of bimolecular nucleophilic substitution.

**Keywords:** polyethylene glycol (PEG), PEGylation, bromoacetylation, nucleophilic addition.

## Resumen

### Funcionalización de polietilenglicol metil éter mediante reacción de bromoacetilación: activación, caracterización por MALDI-TOF y mecanismo de reacción

La PEGilación, una reacción química de conjugación con la molécula de polietilenglicol (PEG), ha sido ampliamente aplicada por las industrias farmacéuticas como una estrategia para mejorar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos bioactivos. El PEG es un polímero formado por un esqueleto de poliéster químicamente inerte con grupos hidroxilo (-OH) en sus extremos. Por lo tanto, para usar el PEG como reactivo de conjugación debe activarse con un grupo funcional que sea reactivo. En este sentido, la bromoacetilación es una alternativa para la funcionalización de PEG. De esta manera, en este trabajo nuestro objetivo es describir en detalle los procedimientos y el mecanismo de reacción involucrados en la funcionalización de PEG a través de la reacción de bromoacetilación. Además, estudiamos la aplicación de MALDI-ToF para la caracterización del producto activado. Después de aplicar un procedimiento de bromoacetilación adaptado, se obtuvo bromoacetil-mPEG-éster con un rendimiento bruto de 56,78%. Los análisis posteriores de espectrometría de masas por MALDI-ToF pudieron identificar y caracterizar correctamente el producto bromoacetilado. Entre las condiciones de reacción, el control de la temperatura (desde -10 °C hasta 0 °C) fue eficaz para favorecer la adición nucleofílica esencial a la bromoacetilación. Así, concluimos que el control de la baja temperatura de reacción es un factor clave para favorecer la adición nucleofílica al carbonilo y, por lo tanto, esencial para obtener el mPEG funcionalizado mediante la bromoacetilación. Sin embargo, serán necesarios más estudios para confirmar si el mPEG esterificado en estas condiciones puede usarse junto con moléculas de naturaleza proteica o peptídica por medio de la sustitución nucleófila bimolecular.

**Palabras clave:** Polietilenglicol (PEG), pegilación, bromoacetilación, adición nucleofílica.

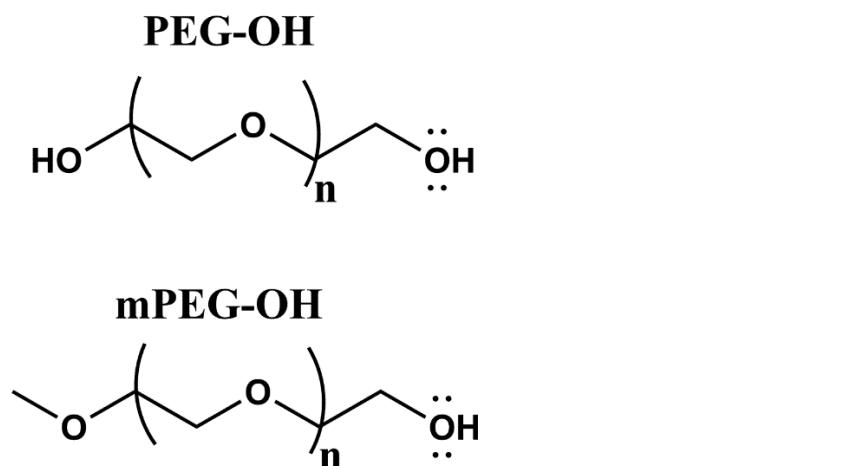
## **Introdução**

A prospecção de novas moléculas com potencial efeito terapêutico, frente a diversas doenças na atualidade se faz necessária, em resposta à demanda por tratamentos mais inovadores, seguros e efetivos [1]. Assim, para que tais moléculas se viabilizem como fármacos, são necessárias etapas de avaliação de suas viabilidades de aplicação terapêutica, dentre as quais se destaca o delineamento farmacocinético, que aponta fatores associados à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) destes potenciais agentes terapêuticos [2]. Vale destacar que, grande parte das moléculas com atividade farmacológica promissora nos ensaios pré-clínicos falham em ensaios clínicos, muito em virtude de características farmacocinéticas inadequadas, como baixa estabilidade plasmática, rápida excreção e biodistribuição ineficaz [1-3]. Nesse contexto, com o intuito de superar as limitações farmacocinéticas de determinadas moléculas (como os peptídeos e proteínas), sistemas bioconjugados têm sido propostos. Esses sistemas empregam polímeros que, a exemplo do polietilenoglicol metil éter (mPEG-OH), resultam em aumento do tempo de meia-vida da molécula de interesse, redução do seu *clearance* renal, melhora da solubilidade e proteção contra inativação proteolítica [2, 3].

O polietilenoglicol (PEG) foi muito difundido na indústria como aditivo na produção de papel, agente de controle de viscosidade e precipitação de proteínas, e excipiente de formulações medicamentosas. Porém, foi somente na década de 70 que se explorou a conjugação deste polímero anfifílico com proteínas, com o pioneirismo do estudo de Abuchowski e Davis (1977) que resultou na conjugação da albumina bovina sérica com o mPEG-OH. A partir de então, a técnica da PEGilação passou a ser mais explorada na bioconjugação de peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos. De fato, o sucesso da PEGilação levou ao lançamento de moléculas bioativas conjugadas na clínica, como o caso do Oncaspar® (Pegaspargase) e Cimzia® (Certolizumab pegol), que são atualmente empregados na terapia da leucemia e artrite reumatóide, respectivamente.

A polimerização de unidades de oxietileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) pode resultar na formação dos polímeros de polietilenoglicol (PEG) ou polietilenoglicol metil éter (mPEG) de diversos tamanhos. Os índices de polidispersão variam de 1,01 para polímeros de PEG com massa molar entre 2-10 kDa e 1,2 para polímeros de alta massa molar. Por se tratar de polímeros com unidades monoméricas óxido de etileno, cada unidade monomérica é capaz de coordenar a 3-5 moléculas de água, o que aumenta o volume hidrodinâmico do polímero de 10-15 vezes, retardando a excreção renal e prolongando a meia vida das moléculas conjugadas. A conjugação com tais polímeros também confere proteção frente à degradação química, redução da imunogenicidade, opsonização e agregação [2, 3].

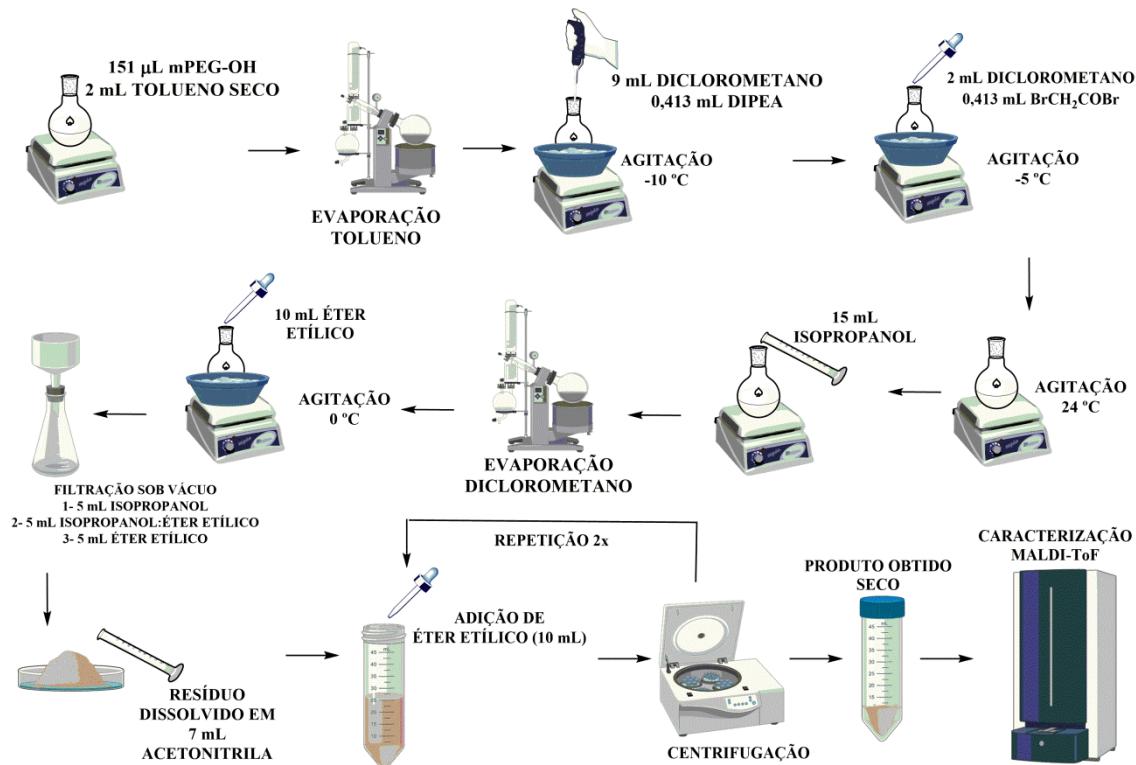
Enquanto o PEG é um diol, *i.e.*, tem dois sítios de reação; o mPEG contém um grupo metoxila e um grupo hidroxila que corresponde ao sítio de reação e que deve estar devidamente ativado para servir de agente de PEGilação (figura 1). Assim, para conjugação do mPEG com o potencial alvo é necessário que o polímero esteja funcionalizado com um grupo reativo ao fármaco. O presente trabalho descreve a obtenção do polímero bromoacetil-mPEG-éster via bromoacetilação, com potencial aplicabilidade na conjugação com peptídeos e proteínas por reação de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ) [2-11].



**Figura 1.** Estrutura química geral dos polímeros PEG-OH e mPEG-OH.

## Métodos

A funcionalização do polímero mPEG-OH via reação de bromoacetilação foi realizada conforme metodologia de Benincasa *et al.* [8], com modificações. Foram empregados 151  $\mu\text{L}$  (0,3 mmol) de mPEG-OH (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) de 550 Da, os quais foram solubilizados em 2,5 mL de tolueno seco (Synth<sup>®</sup>). O solvente foi evaporado sob vácuo, a 80 °C até formação de um filme marrom. Posteriormente, o sistema foi mantido sob resfriamento a -10 °C, e em seguida foram adicionados 9 mL de diclorometano seco (DCM; Carlo Erba<sup>®</sup>) contendo 413  $\mu\text{L}$  (2,5 mmol) de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA; Sigma Aldrich<sup>®</sup>). A solução foi vigorosamente agitada por cerca de cinco minutos e, em seguida, foi adicionada sob gotejamento, solução contendo 413  $\mu\text{L}$  (3 mmol) de brometo de bromoacetila ( $\text{BrCH}_2\text{COBr}$ ; Sigma Aldrich<sup>®</sup>) em 2 mL de diclorometano seco. A seguir, a solução foi agitada por 15 minutos a -5 °C e depois por 1 hora à temperatura ambiente (figura 2) [3].

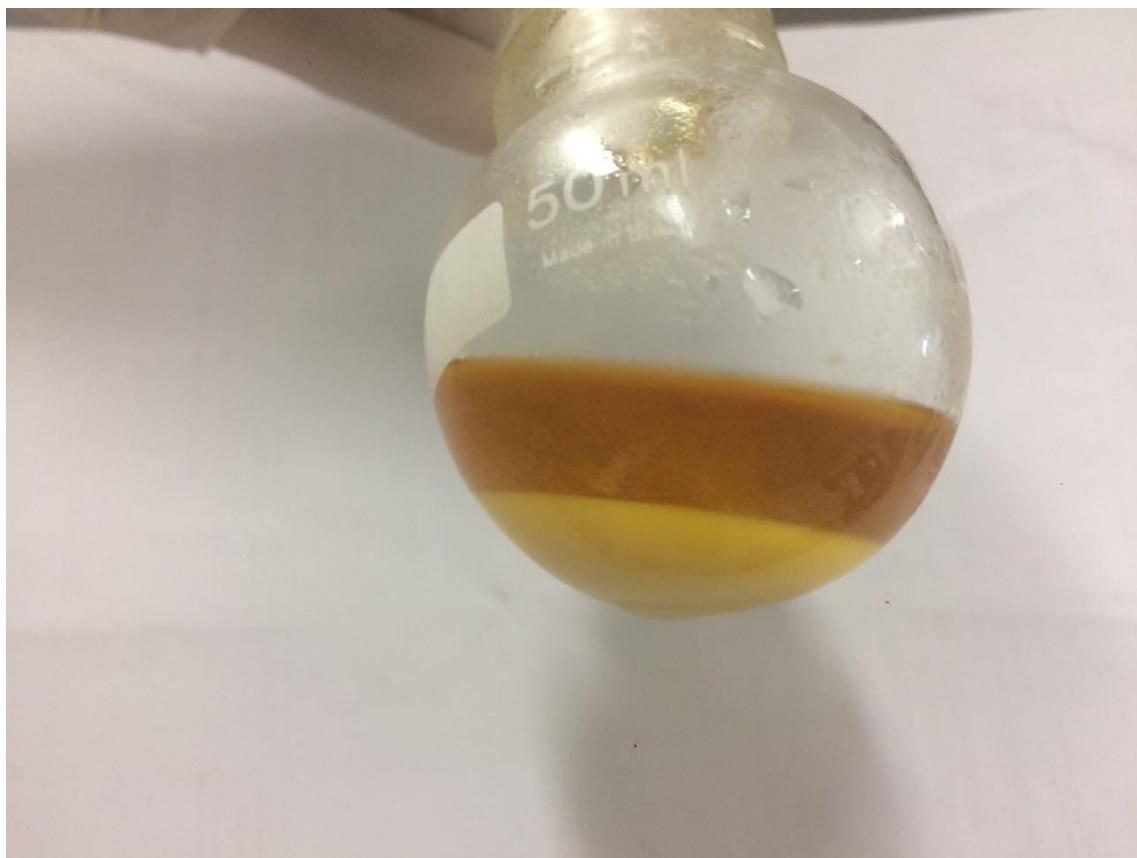


**Figura 2.** Representação esquemática do procedimento de bromoacetilação do mPEG-OH proposto nesse estudo.

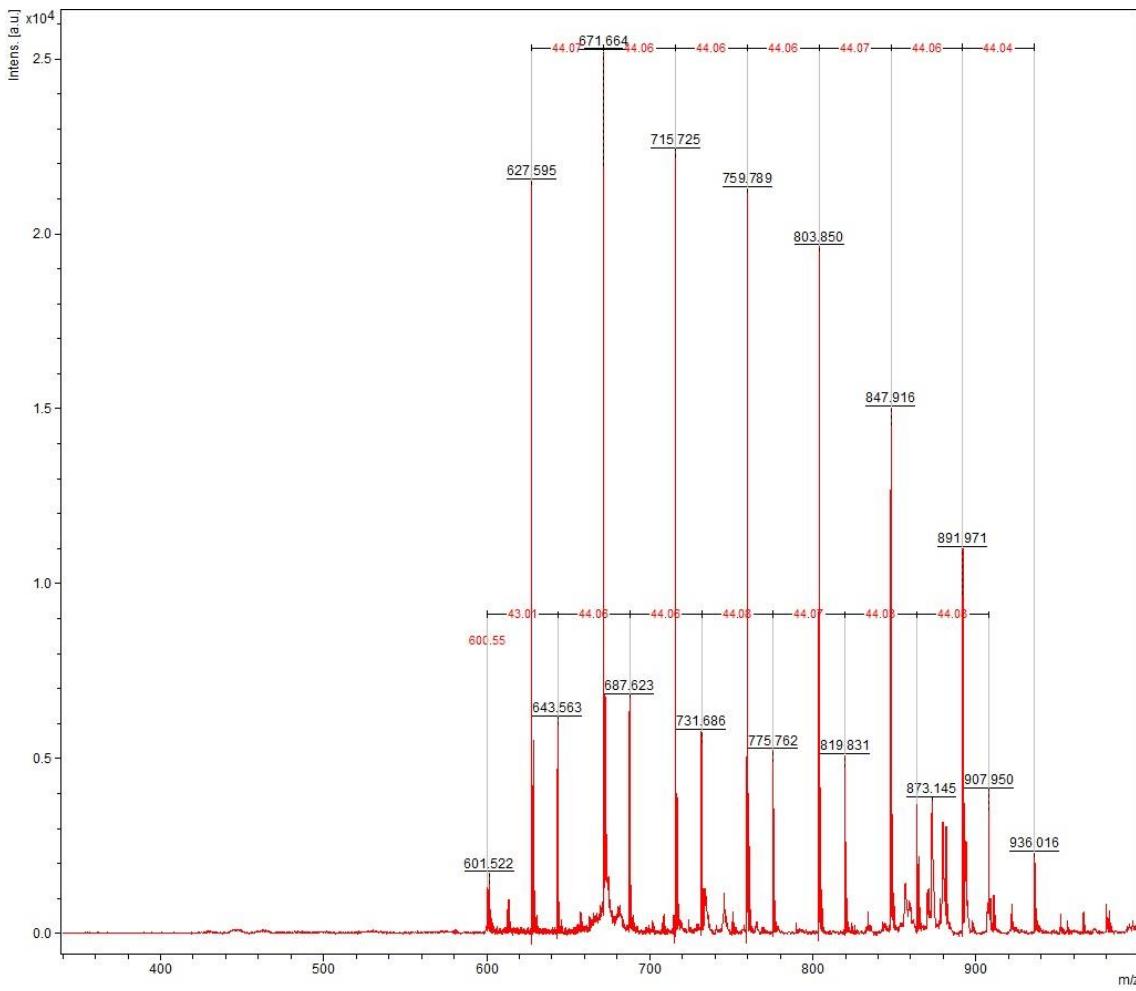
Após agitação à temperatura ambiente, 15 mL de isopropanol (Química Moderna<sup>®</sup>) foram adicionados e o diclorometano foi evaporado sob pressão. A solução em banho de gelo foi então submetida ao gotejamento de 10 mL de éter etílico (Dinâmica<sup>®</sup>) e mantida sob agitação em resfriamento durante 1 hora. Em seguida, o produto foi filtrado sob vácuo e submetido a duas lavagens com cada um dos seguintes solventes, sequencialmente: 5 mL de isopropanol gelado, 5 mL de isopropanol:éter etílico (1:1) e 5 mL de éter etílico. O resíduo restante foi dissolvido em 7 mL de acetonitrila (Honeywell<sup>®</sup>), precipitado em éter etílico gelado sob centrifugação a 6600 rpm por cinco minutos e secado sob fluxo de nitrogênio (figura 2). Finalmente, o produto obtido foi caracterizado por espectrometria de massas por ionização/dessorção assistida por laser e análise por tempo de voo (MALDI-ToF; Bruker Daltonics Autoflex SmartBeam, MA) em matriz de ácido sinapínico [3].

## Resultados e discussão

Apesar de que atualmente se dispõem de diversos mPEG's funcionalizados comercialmente como o mPEG-succinato de succinimidila, mPEG-maleimidil, mPEG-carbonato de succinimidila, e mPEG-iodoacetamida, a ativação do mPEG *in house* ainda tem sido frequentemente empregada por indústrias químicas e farmacêuticas de todo o mundo. O procedimento adaptado de Benincasa *et al.* [8] e proposto nesse trabalho foi eficaz na obtenção do produto bromoacetil-mPEG-éster (mPEG-Br). Macroscopicamente, o mPEG-Br foi obtido como um sólido cristalizado amorfo castanho (figura 3) e um rendimento bruto de 56,78 %. A verificação da formação do mPEG-Br se deu pelo espectro de massas MALDI ToF, demonstrando um sinal intenso correspondente ao íon molecular com razão massa carga igual a 671,644 [M+H<sup>+</sup>] (massa teórica 670 g.mol<sup>-1</sup>). Outro aspecto que corrobora este resultado é a diferença característica de 44 unidades entre os picos adjacentes, correspondendo à unidade monomérica (oxietileno) do mPEG-OH (figura 4).



**Figura 3.** Produto amarronzado precipitado com éter etílico, obtido pela reação de bromoacetilação.

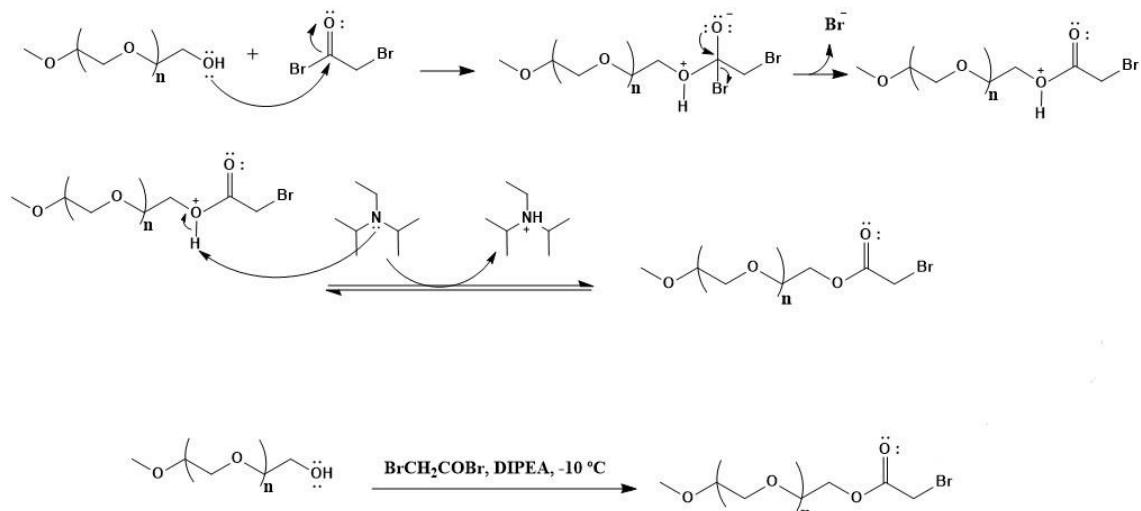


**Figura 4.** Espectro de massas obtido por técnica MALDI-ToF, evidenciando o sinal intenso correspondente ao íon molecular de massa carga 671,664 [M+H<sup>+</sup>], confirmativo da obtenção do produto de interesse (bromoacetil-mPEG-éster).

Benincasa *et al.* [8] utilizaram mPEG-OH 20 kDa e nesse trabalho foi funcionalizado mPEG-OH com massa 36 vezes menor (550 Da). Nesse sentido, para se obter o produto precipitado foram utilizados dois ciclos utilizando éter etílico gelado e centrifugação a 6600 rpm (figura 2), adaptações feitas à técnica de Benincasa *et al.* [8]. Esses dois ciclos favoreceram a obtenção do polímero funcionalizado, pois o choque térmico induziu a precipitação e a centrifugação possibilitou a concentração do produto funcionalizado [12].

O brometo de bromoacetila tem dois sítios eletrofílicos susceptíveis ao ataque da hidroxila, a carbonila e o metileno, tal que as condições de reação empregadas favorecem a formação do produto esterificado [13, 14]. Considerando os mecanismos envolvidos nas duas possíveis reações, a etapa lenta da reação de adição à carbonila envolve um intermediário quaternário que mediante a saída do íon brometo leva à formação

do produto esterificado [15]. Já na reação de substituição nucleofílica bimolecular, o mecanismo seria concertado com o ataque e simultânea saída do íon brometo, levando à formação do respectivo éter (figura 5).



**Figura 5.** Mecanismo proposto da reação de bromoacetilação do mPEG-OH, evidenciando a formação do produto esterificado em etapa de precipitação com éter etílico gelado [14].

Nesse estudo mostramos, através da proposição do mecanismo de reação, que o controle de baixa temperatura favorece a reação de adição nucleofílica à carbonila em detrimento da reação de substituição nucleofílica bimolecular (figura 5) [13]. Isso resulta na disponibilidade do bromometil frente aos peptídeos e proteínas passíveis de reação, tendo em vista a susceptibilidade à reação com grupamentos nucleofílicos como sulfidrila ( $-\text{SH}$ ) e amina ( $-\text{NH}_2$ ) levando à formação de ligação covalente estável com biomoléculas.

Uma vez que a reatividade do polímero mPEG-OH frente a peptídeos e proteínas depende da funcionalização da hidroxila com grupos eletrofílicos, o mPEG-Br destaca-se como um produto funcionalizado que pode ser empregado na conjugação com peptídeos e proteínas. A susceptibilidade dessas biomoléculas à conjugação com o mPEG-Br se dá pelo fato de que peptídeos e proteínas têm resíduos de aminoácidos contendo grupamentos nucleofílicos como  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ , os quais são passíveis de reagirem com os grupos eletrofílicos presentes. Entretanto, vale destacar que para a reação de PEGilação ocorrer normalmente, as reatividades dos grupamentos eletrofílico e nucleofílico devem ser compatíveis em termos reacionais com o pH, a temperatura, a concentração salina, e condições termodinamicamente favoráveis. Sendo assim, a ativação do PEG não deve ser considerada isoladamente durante a conjugação com as biomoléculas [2].

## **Conclusão**

Com esse trabalho concluímos que, a exposição do mPEG ao brometo de bromoacetila ( $\text{BrCH}_2\text{COBr}$ ) em meio básico anidro, possibilita, mediante o controle de temperatura (-10 °C a 0 °C), a correta bromoacetilação do mPEG. Posteriormente, mostramos que o espectro de massas do MALDI-ToF foi capaz de caracterizar com eficiência o bromoacetyl-mPEG-éster e que o controle da baixa temperatura reacional é essencial à obtenção do produto de interesse. Estudos adicionais deverão confirmar se o PEG esterificado nessas condições, poderá ser utilizado na conjugação com moléculas de natureza proteica ou peptídica por meio de substituição nucleofílica bimolecular. Assim, esse trabalho destaca as etapas e mecanismos envolvidos na ativação do mPEG por bromoacetilação, o que pode contribuir no desenvolvimento biofarmacêutico e melhora das propriedades terapêuticas de moléculas promissoras.

## Agradecimentos

Agradecemos a Vivian Pena da Fundação Ezequiel Dias pelo auxílio técnico; Waleska Stephanie da Cruz Nizer de Carleton University, Ottawa, Ontario, Canadá; José Maria Muñoz Lopez da Universidade Federal de Minas Gerais. W.G.L. agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado. Ao CNPq e Fapemig pelo financiamento da pesquisa.

## Conformidade com os padrões éticos

**Financiamento:** CNPq e a Fapemig para a compra de reagentes.

**Aprovação ética:** este artigo não contém estudos com participantes humanos ou animais realizados por qualquer um dos autores, dispensando, portanto, aprovação por um comitê de ética.

**Contribuição dos autores:** todos os autores contribuíram para o desenvolvimento, análise, redação e revisão deste artigo.

## Conflito de interesse

Todos os autores relatam que não têm nenhum conflito de interesse.

## Referências

1. S. Pushpakom, F. Iorio, P.A. Evers, K.J. Escott, S. Hopper, A. Wells, A. Doig, T. Guilliams, J. Latimer, C. McNamee, A. Norris, P. Sanseau, D. Cavalla, M. Pirmohamed, Drug repurposing: progress, challenges and recommendations, *Nature Reviews Drug Discovery*, **18**(1), 41-58 (2019).
2. F.M. Veronese, *PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications*, Birkhäuser, 2009, Vol. 1, p.14-27.
3. F.M. Veronese, Peptide, and protein PEGylation: a review of problems and solutions, *Biomaterials*, **22**(5), 405-417 (2001).
4. A. Abuchowski, T.V. Es, N.C. Palczuk, F.F. Davis, Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol, *The Journal of Biological*

*Chemistry*, **252**(11), 3578-3581 (1977).

5. M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, Pharmacokinetic consequences of PEGylation, *Drug Delivery*, **13**(6), 399-409 (2006).
6. M.J. Roberts, M.D. Bentley, J.M. Harris, Chemistry for peptide and protein PEGylation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**(4), 459-476 (2002).
7. C.J. Fee, J.M.V. Alstine, PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues, *Chemical Engineering Science*, **61**(3), 924-939 (2006).
8. M. Benincasa, S. Zahariev, C. Pelillo, A. Milan, R. Gennaro, M. Scocchi, PEGylation of the peptide Bac7(1-35) reduces renal clearance while retaining antibacterial activity and bacterial cell penetration capacity, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **95**, 210-219 (2015).
9. I.W. Hamley, PEG-peptide conjugates, *Biomacromolecules*, **15**(5), 1543-1559 (2014).
10. J.M. Harris, R.B. Chess, Effect of PEGylation on pharmaceuticals, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**(3), 214-221 (2003).
11. P.L. Turecek, M.J. Bossard, F. Schoetens, I.A. Ivens, PEGylation of biopharmaceuticals: A review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **105**(2), 460-475 (2016).
12. S. Lee, X. Tong, F. Yang, Effects of the poly(ethylene glycol) hydrogel crosslinking mechanism on protein release, *Biomaterials Science*, **4**(3), 405-411 (2016).
13. D.F. Schneider, M.S. Viljoen, Bromoacetyl bromide: a versatile and selective cleaving agent for ethers and acetals, *Synthetic Communications*, **32**(5), 721-728 (2002).
14. M. Li, Z. Tang, H. Sun, J. Ding, W. Song, X. Chen, pH, and reduction dual-responsive nanogel cross-linked by quaternization reaction for enhanced cellular internalization and intracellular drug delivery, *Polymer Chemistry*, **4**, 1199-1207 (2013).
15. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry*, 2 ed., Oxford University Press, New York, Vol. 1, 2012.

#### Como citar este artigo

L. Pereira B. Cordeiro, W.G. Lima, A.C. Soares, M.H. Borges, M.E. de Lima, J.C. Moreira-Brito, Funcionalização do polietilenoglicol metil éter via reação de bromoacetilação: Ativação, Caracterização por MALDI-TOF e mecanismo de reação, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **49**(3), **xx-xx** (2020).