

SÍNTESIS DE OXITOCINA EN FASE SÓLIDA USANDO DERIVADOS DE TERBUTOXICARBONILO Y FLUORENILMETOXICARBONILO

Julio C. Calvo^{1*}, Nubia F. Barrera², Josué A. García², Fanny Guzman¹, Fabiola Espejo¹, Manuel E. Patarroyo¹.

Recibido: Septiembre 25/98 – Aprobado: Mayo 10/99

Keywords: Oxytocin, disulfide bridge, SPPS, cyclic peptide, NMR, structure.

RESUMEN

La oxitocina, péptido cíclico cuya secuencia es CYIQNCPLG, fué el primer péptido de importancia biológica que pudo ser sintetizado. En este trabajo se compara la síntesis de la oxitocina usando resina p-metilbenzohidrilamina (MBHA) para la síntesis por estrategia t-Boc y resina Rink p-metilbenzohidrilamina (Rink MBHA) para la síntesis por estrategia Fmoc, con altos rendimientos. El péptido crudo se ciclizó en una disolución acuosa de dimetilsulfóxido al 10%. La caracterización se llevó a cabo por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, y se logró detectar la presencia de dos isómeros.

ABSTRACT

Oxytocin a cyclic peptide whose sequence CYIQNCPLG was the first biologically relevant peptide to be synthesized.

Synthesis by Boc strategy using p-methylbenzohidrylamine resin and also by Fmoc using Rink p-methylbenzohidrylamine resin was carried out with high yields. The crude peptide was cyclized with 10% dimethylsulfoxide, characterized by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance showing the presence of two isomers.

Abreviaturas: Boc, ter-butoxicarbonilo; Fmoc, 9-fluorenilmetoxicarbonilo; trt, tritilo; 2-Br-Z, 2-bromobenciloxicarbonilo; MeBzl, p-metilbencilo; TFA, ácido trifluoroacético; DIEA, diisopropiletilamina; DMF, N,N-dimetilformamida; DCM, diclorometano; NMP, N-metilpirrolidina; DIC, diisopropilcarbodiimida; DCC, dicitlohexilcarbodiimida; HOBT, N-hidroxibenzotriazol; EDT, etanoditiol; TIS, triisopropilsilano; DMS, dimetilsulfuro.

INTRODUCCIÓN

La oxitocina es una hormona que se produce en el lóbulo posterior de la hipófisis y tiene la importancia histórica de

1 Instituto de Inmunología, Hospital San Juan de Dios, Universidad Nacional de Colombia, Ave. 1 No. 10-01, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.

2 Facultad de Ciencias, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Santafé de Bogotá.

* A quien se debe dirigir la correspondencia.

haber sido el primer péptido de origen biológico en ser sintetizado. Henry Dale descubrió en 1906 que un extracto del lóbulo posterior de la hipófisis producía contracciones en el útero de un animal. Este extracto fue purificado por Kam en 1928 y posteriormente por V. du Vigneaud, en 1952, quien realizó sus estudios de caracterización y sintetizó uno de sus componentes, la oxitocina, en fase líquida (1). En los últimos años los progresos en la química de síntesis de péptidos y proteínas han sido extraordinarios, debido al incremento en las investigaciones relacionadas con estas moléculas. El impulso más grande en este campo lo dió la invención del método de síntesis en fase sólida por Bruce Merrifield (2). La oxitocina fue sintetizada en fase sólida por Bayer en 1968 (3). En la actualidad esta molécula se sigue estudiando y se han reportado estudios sobre la utilización de otros grupos protectores y de diferentes medios oxidantes para obtener el puente disulfuro de este péptido cíclico, con buenos resultados y buen rendimiento en la reacción (4-6). En el presente trabajo, se llevó a cabo la síntesis de la oxitocina en fase sólida, haciendo uso tanto de la química t-Boc como de la Fmoc y realizando la ciclización del péptido en una disolución acuosa de dimetilsulfóxido al 10%. Este procedimiento resultó sencillo y de gran efectividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis t-Boc. Los aminoácidos usados (Bachem, San Diego, CA, USA), Asn, Cys(MeBzl), Gln, Gly, Ile, Leu, Pro, Tyr (2-Br-Z), están protegidos en su extremo N-amino por t-butoxicarbonilo (t-Boc). El péptido fué preparado por quí-

mica t-Boc usando una resina amida "MBHA" (Orpegen-Pharma, Heidelberg, Alemania). La resina tiene un grupo amino activo, el cual viene en forma de clorhidrato. La eliminación de los solventes y soluciones se llevó a cabo por filtración. El ciclo de acople de cada aminoácido incluye los siguientes pasos: lavado con DCM (1 min), neutralización con 5% DIEA/DCM (2 min, 3X), lavado con DCM (1 min, 3X), acople del aminoácido (aminoácido/HOBt/DCC 3:3:3 equivalentes respecto a la resina disueltos en DCM o DCM/DMF 1:1, 45 min), lavado con DMF (1 min), lavado con DCM (1 min, 3X), desprotección del grupo amino con 55% TFA/DCM (25 min), lavado con DCM (1 min, 2X). Todos los pasos descritos requieren agitación y la reacción de acople se monitorea con la prueba de ninhidrina (7). Si la reacción no es completa, se lleva a cabo un doble acople. La desprotección de las cadenas laterales y la liberación del péptido de la resina se realiza con la metodología de baja (HF/DMS/p-cresol 25:65:10) y alta (HF/anisol 95:5) concentración de fluoruro de hidrógeno (8).

Síntesis Fmoc. Los aminoácidos usados (Orpegen-Pharma, Heidelberg, Alemania), Asn(trt), Cys(trt), Gln(trt), Gly, Ile, Leu, Pro, Tyr (tBu), están protegidos en su extremo N-amino por 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). El péptido fué preparado por síntesis en fase sólida usando una resina "Rink amida MBHA" (Nova-Biochem, San Diego, CA, USA). La resina tiene un grupo amino activo, el cual viene protegido con Fmoc. La eliminación de los solventes y soluciones se llevó a cabo por filtración. El ciclo de acople de cada aminoácido incluye los siguientes pasos: lavado con DMF (1 min,

2X), desprotección del grupo amino con 50% piperidina/DMF (17 min), lavado con DMF (1 min, 7X), acople del aminoácido (aminoácido/HOBt/DIC 5:5:5 equivalentes respecto a la resina disueltos en NMP, 45 min), lavado con DMF (1 min, 2X), en donde X es el número de veces que se repitió el paso. Una vez terminada la síntesis, el péptido se acetila con anhídrido acético al 15% en DMF por 30 min. Todos los pasos descritos requieren agitación y la reacción de acople se monitorea con la prueba de hinhidrina. Si la reacción no ha llegado a término, se lleva a cabo un doble acople. La desprotección de las cadenas laterales y la liberación del péptido de la resina se lleva a cabo con una disolución que contiene 92.5% TFA, 2.5% agua, 2.5% EDT y 2.5% TIS, por 1 hora, con agitación. El péptido se precipita de la solución anterior adicionando dietil éter, el residuo sólido se disuelve en acetonitrilo acuoso al 30%, se congela y se liofiliza. El producto proveniente de la síntesis por la estrategia Fmoc se acetila para utilizarlo en la obtención del péptido cíclico y en la elucidación de su estructura, debido a que los péptidos con cisteínas pueden sufrir diverso grado de oxidación no dirigida durante el proceso de desenclaje con HF. El caso anterior se puede evitar utilizando la estrategia Fmoc.

Oxidación del producto. Para la formación del enlace disulfuro (9-10) y obtención del péptido cíclico (oxitocina) se toma el péptido crudo y se disuelve en agua. Se ajusta el pH entre 4 y 6, y luego se añade dimetilsulfóxido (DMSO) hasta obtener una disolución acuosa al 10%. La concentración final del péptido es de 1 mg/ml.

Caracterización del producto por RP-HPLC. El péptido se purifica por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), con una columna C₁₈-AR cosmosil semipreparativa (20 x 250 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) y las fracciones recogidas analizadas por RP-HPLC, en una columna analítica RP-18 Lichorosorb (4 x 250 mm; Merck, Darmstadt, Alemania), con un gradiente de 20-60% B en 35 min para la columna semipreparativa y de 0-90% B en 30 min para la columna analítica, a una longitud de onda de 210 nm. El solvente A es 0.1% TFA en agua y el B 0.1% TFA en acetonitrilo.

Caracterización del producto por masas y RMN. Para confirmar la identidad de los péptidos de cadena abierta y cíclico, se usa un espectrómetro de masas API III (Perkin Elmer SCIEX, Thornhill, Ontario, Canadá). Para la determinación de la estructura tridimensional se llevan a cabo experimentos COSY, TOCSY y NOESY por RMN bidimensional en un espectrómetro DRX 600 Mhz marca Bruker (Bruker Analytische Messtechnik GMBH, Rheinstetten, Alemania), de los cuales se derivan los asignamientos de todos los protones y se obtienen las señales para dos isómeros y la evidencia de la formación del puente disulfuro. Se disuelven 6.5 mg del péptido cíclico acetilado (oxitocina) en 30% de 2,2,2-trifluoroetanol-d₃ del 99.94% D (volumen final de 0.5 ml).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de la Oxitocina. Para la síntesis por la estrategia t-Boc se tomaron 0.15 g de resina MBHA con una sustitución de 0.65 meq/g y se obtuvieron 65.2

mg (rendimiento del 66.3%) de péptido crudo no acetilado (P.M. calculado / obtenido = 1009.4 Da / 1008 0.5 u). Para la síntesis por la estrategia Fmoc se tomaron 0.07 g de resina Rink MBHA con una sustitución de 0.64 meq/g y se obtuvieron 38 mg (rendimiento del 80.5%) de péptido crudo acetilado (P.M. = 1052.3 Da / 1051 0.5 u). Para la oxidación se tomaron 30 mg del péptido crudo acetilado y se disolvieron en 27 ml de agua, se ajustó el pH a 4, se adicionaron 3 ml de DMSO y se dejó en reacción por 48 horas. El péptido ciclizado se purificó y se obtuvieron 6.5 mg de Oxitocina (P.M. = 1050.3 Da / 1049 0.5 u). El producto puro acetilado se utilizó para el estudio de la estructura de la oxitocina por resonancia magnética nuclear.

Resonancia magnética nuclear. El procesamiento de los datos en el espectro RMN-2D fue realizado en un computador Indy (Silicon Graphics). El asignamiento de los protones a partir de los experimentos COSY y TOCSY en trifluoroetanol, revela la presencia de 9 aminoácidos en un doble set de asignamientos, lo que indica dos tipos de conformación debido a la isomerización que da origen a dos formas en la cadena: cis (*) y trans (especie mayoritaria). Por el número de niveles de contorno del espectro NOESY, la relación de isomería trans a cis es de 9:1. Por los espectros NOESY se obtuvieron los asignamientos secuenciales de las conectividades de $dN(i,j)$ entre residuos sucesivos. Un grupo separado de conectividades para la forma cis (*) se observa en los

Tabla 1. Desplazamientos químicos de los protones de la oxitocina en ppm.

Aminoácido	NH	α H	β H	Otros
C ₁	8.22	4.68	3.21-2.98	
Y ₂	8.68	4.79	3.28-2.92	2,6 H 7.31; 3,5 H 6.98
I ₃	7.79	4.27	2.00	Y' CH ₂ 1.38-1.13; Y, δ CH ₃ 0.96
Q ₄	8.39	4.16	2.11-2.00	Y' CH ₂ 2.43; δ NH ₂ 7.66-6.94
N ₅	8.34	4.72	3.12-2.86	Y NH ₂ 7.70-6.98
C ₆	8.35	4.90	3.30-3.12	
P ₇		4.49	2.06-1.99	Y' CH ₂ 2.31; δ CH ₂ 3.75-3.80
L ₈	8.28	4.34	1.72-1.66	Y CH ₃ 0.96; δ CH ₃ 0.92
G ₉	8.37	3.97-3.88	NH ₂ -t 7.52-7.18	
C* ₁	8.20	4.69		
Y* ₂	8.72	4.78		
I* ₃	7.79	4.31	2.00	
Q* ₄	8.43	4.16		
N* ₅	8.42	4.70		
C* ₆	8.07	4.61	3.06	
P* ₇		4.77		
L* ₈	8.51	4.34	1.65-1.73	
G* ₉	8.58	3.98-4.01		

residuos C*₁ a G*₉. Los asignamientos para los sistemas de spin están resumidos en la tabla 1. Las constantes de acoplamiento se derivan del espectro RMN-1D en el que se pueden asignar todas las señales.

La observación de ciertas señales NOEs (picos cruzados) en el espectro NOESY son usadas para inferir la presencia de regiones estructuradas. Los NOEs que dan información sobre la conformación son aquellos que normalmente no aparecen como señales entre vecinos en un péptido lineal. Las señales secuenciales presentes en el espectro NOESY, para el péptido en estudio, incluye señales secuenciales fuertes $d_{\alpha N}(i, i+1)$ y $d_{\beta N}(i, i+1)$, $d_{\gamma N}(i, i+1)$, d_{NN} , igualmente se observan todas las interacciones de $d_{\alpha N}$ y $d_{\beta N}$. Un grupo completo de NOEs fuertes de residuos consecutivos $d_{\alpha N}(i, i+1)$ muestran que el ensamblaje conformacional de la población de estos péptidos está en la región beta del espacio ($\phi\psi$). Sin embargo, hay una sig-

nificativa población de conformación en el espacio alfa ($\phi\psi$), caracterizada por NOEs fuertes $d_{NN}(i, i+1)$. El resumen de las conectividades NOE para este péptido es mostrado en la figura 1. También se obtienen algunos NOEs adicionales. Interacciones entre el CH_{α} de C₆ y los CH_{δ} de P₇ indican que la especie mayoritaria es la forma trans. Además se observa una interacción entre CH_{α} de P₇ y el NH de G₉ que es una interacción típica $i, i+2$ cuando el aminoácido Pro está presente. Se tiene además una evidencia de la formación del puente disulfuro por la presencia de las siguientes interacciones: NH de Y₂ con CH_{β} de N₅; CH_{α} de C₆ con CH_{β} de C₁; CH_{α} de C₁ con CH_{β} de C₆, CH_{β} de P₇ con NH de C₁ y CH_{β} de P₇ con CH_2 3,5 de Y₂. Las constantes de acoplamiento entre I₃ y C₆ son menores de 6, lo que sugiere que esta parte del péptido está enrollada en estructura similar a una vuelta de α -hélice.

De los resultados anteriores se deduce que por medio de la estrategia Fmoc

NOE	C ₁	Y ₂	I ₃	Q ₄	N ₅	C ₆	P ₇	L ₈	G ₉
$\alpha(i) - N(i+1)$	—————								
$\alpha(i) - N(i)$	—	—	—	—	—	—		—	—
$N(i) - N(i+1)$	—————								
$\alpha(i) - \delta(i+1)$						—	—		
$\alpha(i) - NH(i+2)$							—		
$\alpha(i) - \beta(i+5)$	—————								
$^3J_{HN\alpha}$	8	8	6	5	6	6			7
	C* ₁	Y* ₂	I* ₃	Q* ₄	N* ₅	C* ₆	P* ₇	L* ₈	G* ₉
$\alpha(i) - N(i+1)$	—————								
$\alpha(i) - N(i)$	—	—	—	—	—	—		—	—
$^3J_{HN\alpha}$	8	8				7			7

Figura 1. Resumen de las interacciones obtenidas para la oxitocina que demuestran la conformación de dos isómeros (trans y cis*).

se obtienen rendimientos altos de producto crudo y, al menos en este caso particular, superiores a los obtenidos por la estrategia t-Boc, descartándose en parte la prevención en contra de la estrategia Fmoc debido a su mayor costo y menores rendimientos. En la oxidación, se utilizó una concentración de péptido de 1 mg/ml, un poco superior a la recomendada por la literatura para la formación de puentes disulfuro intracatenarios (0.2-0.5 mg/ml). Esta recomendación tiene como fundamento el favorecer la reacción intracatenaria (ciclización) sobre la reacción intercatenaria (polimerización); sin embargo, a las condiciones de trabajo no se detectó formación de polímero. Respecto a la elucidación de la estructura tridimensional de la oxitocina utilizando un espectrómetro a 600 Mhz, se encontró que la oxitocina realmente presenta dos conformaciones y no una como se creía. El análisis por resonancia magnética nuclear revela la presencia de isómeros cis-trans con un gran predominio de la conformación trans.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresamos nuestra gratitud a Mary Trujillo, Q.F.U.N., por la elaboración de las tablas y figuras. Este trabajo fue financiado por El ministerio de Salud, República de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

1. du-Vigneaud, V.; Ressler, C.; Swann, J.; Roberts, C.; Katsoyannis, P. The synthesis of oxytocin. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 3115
2. Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis, I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.
3. Bayer, E.; Hagenmaier, H. Solid-phase synthesis of oxytocin. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 2037.
4. Fujii, N.; Otaka, A.; Watanabe, T.; Okamachi, A.; Tamamura, H.; Yajima, H.; Inagaki, Y.; Namizu, K.; Asano, K. Silver trifluoromethane-

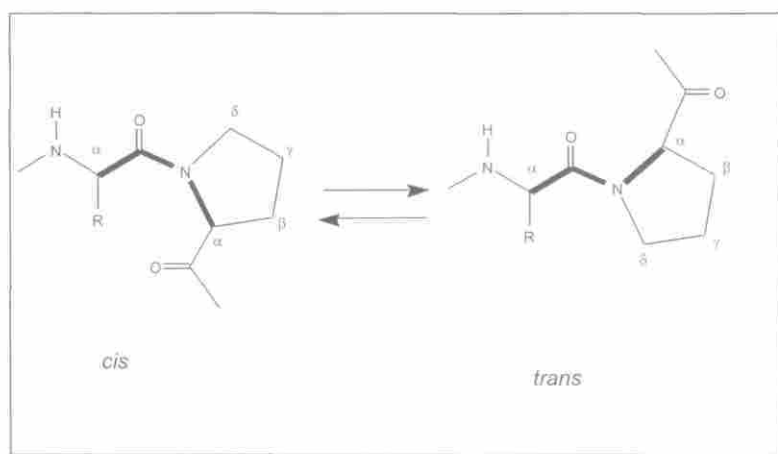


Figura 2. Conformaciones *cis* y *trans* de la Prolina en péptidos.

- sulphonate as an S-deprotecting reagent for the synthesis of cysteine peptides. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 283.
5. Sivanandaiah, K.M.; Sureshbabu, V.V.; Shanadaramma, S.C. Solid-phase synthesis of oxytocin using iodotrichlorosilane as Boc deprotecting agent. *Int. J. Pept. Protein. Res.* **1995**, 45 (4), 377.
 6. Tamamura, H.; Otaka, A.; Nakamura, J. Disulfide bond-forming reaction using dimethyl sulfoxide/aqueous HCl system and its application to regioselective two disulfide bond formation. *Int. J. Pept Protein Res.* **1995**, 45 (4), 312.
 7. Sarin, V.K.; Kent, S.V.H.; Tam, J.P.; Merrifield, R.B. Quantitative monitoring of solid phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal. Biochem.* **1981**, 117, 147.
 8. Houghten, R.A.; Bray, M.K.; DeGraw, S.T.; Kirby, C.J. Simplified procedure for carrying out simultaneous multiple hydrogen fluoride cleavages of protected peptide resins. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, 27, 673.
 9. Tam, J.P.; Wu, C.R.; Liu, W.; Zhang, J.W. Disulfide bond formation in peptides by dimethylsulfoxide, scope and applications. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 6657.
 10. Ruiz-Gayo, M.; Royo, M.; Fernández, I.; Albericio, F.; Giralt, E.; Pons, M. Unequivocal synthesis and characterization of a parallel and an antiparallel bis-cystine peptide. *J. Org. Chem.* **1993**, 58 (23), 6319.