

## SÍNTESIS DE PÉPTIDOS DENDRIMÉRICOS USANDO LA ESTRATEGIA DE DOBLE DÍMERO

*Julio C. Calvo\**, Zuly J. Rivera, Claudia C. Carvajal, Alexander Bernal, Francisco A. Chaves,  
José M. Lozano, Mary Trujillo, Fanny Guzmán, Manuel E. Patarroyo

Recibido: Septiembre 25/98 – Aprobado: Mayo 14/99

**Keywords:** Disulfide bridge, dendrimers, double dimer construction, DDC, synthetic vaccines, synthetic macromolecules.

### RESUMEN

Se propone un enfoque apropiado para la síntesis de péptidos dendriméricos, el cual es desarrollado usando péptidos diméricos no protegidos a manera de bloques de síntesis. Nuestro modelo involucra la síntesis directa de un péptido dimérico que contiene cisteína y la subsiguiente oxidación del grupo sulfhidrilo de la misma. La formación del enlace disulfuro para producir la molécula tetramérica de 90 residuos se lleva a cabo en una disolución acuosa de dimetilsulfóxido. Este tipo de construcción de péptidos dendriméricos es denominado sistema de construcción de doble dímero y puede tener aplicación en la obtención de vacunas sintéticas.

### ABSTRACT

A convenient approach for synthesis of dendrimeric peptides is proposed. The strategy was developed by using unpro-

tected dimeric peptides as building blocks. Our model involved the direct synthesis of a Cysteine containing dimer peptide and subsequent sulfhydryl group oxidation. The disulfide bridge formation reaction to get a 90 amino acid residues tetrameric molecule is performed with dimethyl sulfoxide. This kind of dendrimeric peptide synthesis is called Double Dimer Construction System, and it could be applied to obtain synthetic vaccines.

**Abreviaturas:** Fmoc, 9-fluorenilmetoxi-carbonilo; DDC, sistema de construcción de doble dímero; DMF, N,N-dimetilformamida; DCM, diclorometano; NMP, N-metilpirrolidina; TFA, ácido trifluoracético; BOP, fosfoniohexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-dimetilamino; DIEA, diisopropiletilamina; BSA, albúmina sérica bovina; KLH, hemocianina de la concha del molusco "Megathura crenulata".

### INTRODUCCIÓN

La síntesis química de péptidos ha sido importante para la comprensión de la relación estructura-función en proteínas y el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. La síntesis de péptidos en fase

\* Instituto de Inmunología, Hospital San Juan de Dios, Universidad Nacional de Colombia, Av. 1 No. 10 - 01, Santafé de Bogotá, Colombia.

sólida fue propuesta por Merrifield (1) y es capaz de producir polipéptidos de hasta 10 kDa (80 - 100 aminoácidos) (2). La síntesis de una nueva clase de péptidos denominada "dendrimeros", péptidos con estructura ramificada, ha permitido la síntesis de macromoléculas que sobrepasan los 20 kDa. Los péptidos dendriméricos con su estructura ramificada han demostrado ser muy útiles en el desarrollo de vacunas (3), productos de diagnóstico (4) y enzimas artificiales (5).

Los péptidos antigénicos capaces de producir una respuesta inmune son de gran importancia en el desarrollo de vacunas pero, debido a su bajo peso molecular, para producir anticuerpos antipéptido es necesario unir el péptido antigénico a una proteína transportadora conocida, tal como BSA o KLH (6-7). Sólo una pequeña porción del total de la producción de los anticuerpos estará dirigida contra el péptido y los otros estarán dirigidos contra la proteína transportadora. Para contrarrestar este inconveniente, en nuestro laboratorio se ha probado la utilización de péptidos con cisteínas en sus extremos amino y carboxilo para producir macromoléculas (8). El método consiste en oxidar los grupos sulfhidrilo de las cisteínas para formar enlaces disulfuro (9). Este es el caso de la vacuna sintética antimalárica (Spf-66)n, con buenos resultados en seguridad y protectividad (10-11). Sin embargo, la polimerización de cisteínas no es controlable y se observa la formación simultánea de monómeros cíclicos, dímeros, trímeros, y especies de mayor peso molecular. A finales de la década de los 80 se popularizó la síntesis directa del sistema múltiple de péptidos antigénicos (MAP, por su sigla en inglés), el cual era un tipo de péptido dendrimérico (péptido

con estructura ramificada) con un alto peso molecular identificable por electroforesis (3).

La dificultad para obtener macromoléculas homogéneas y solubles con múltiples copias de péptidos antígenos por esta vía directa, llevó a la búsqueda de reacciones de condensación de fragmentos de péptidos por uniones quimioselectivas que se desarrollarán en solución acuosa por formación de enlaces tipo tioéteres, oximas, hidrazonas y tiazolidinas (12-15). El bajo rendimiento de estos enfoques sintéticos, relacionado con los múltiples pasos de purificación involucrados, condujo la investigación hacia estrategias que disminuyeran los pasos de purificación y aumentaran los rendimientos. Nuestra propuesta, el sistema de construcción de doble dímero (DDC, por sus siglas en inglés), cumple con estos requisitos. En el presente trabajo, se intenta la síntesis de una macromolécula de 90 residuos de aminoácidos por la vía DDC. Para llevar a cabo este estudio se tomó como referencia el péptido 1513 de secuencia GYSLFQKEKMLNEGTSFTA, cuyos primeros 12 aminoácidos hacen parte de la vacuna sintética antimalárica SPf66.

## PARTE EXPERIMENTAL

**Síntesis del péptido.** El péptido (Ac-GYSLFQKEKMLNEGTSFTA)<sub>2</sub>KEEGC fue preparado por la estrategia fmoc en fase sólida usando 150 mg de una resina Novasyn TGR (sustitución 0.2 meq/g, de NovaBiochem, San Diego, CA, USA). La resina tiene un grupo amino activo, el cual no tiene grupo protector. La eliminación de los solventes y soluciones se llevó a cabo por filtración. El ciclo de acople de cada

aminoácido incluía los siguientes pasos: lavado con DMF (1 min, 2X), acople del aminoácido (aminoácido/HOBt/ BOP/DIEA 5:5:5:10 equivalentes respecto a la resina, disueltos en NMP, 45 min), lavado con DMF (1 min, 2X), desprotección del grupo amino con 50% piperidina/DMF (17 min), lavado con DMF (1 min, 5X), en donde X es el número de veces que se repite un paso. La reacción de acople fue monitoreada por medio de la prueba de ninhidrina (16). Si la reacción no había llegado a término, se llevaba a cabo un doble acople. El péptido se acetiló, una vez terminada la síntesis, con anhídrido acético al 15% en DMF (hasta ninhidrina negativa). La desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos y la liberación del péptido de la resina se llevó a cabo con una disolución que contenía 82.5% TFA, 5% anisol, 5% tiofenol, 5% agua y 2.5% etanoditiol, por 90 min. La resina fue removida por filtración y el péptido se precipitó de la disolución con éter etílico seco. El residuo sólido se disolvió en acetonitrilo acuoso al 30%, se congeló y se liofilizó.

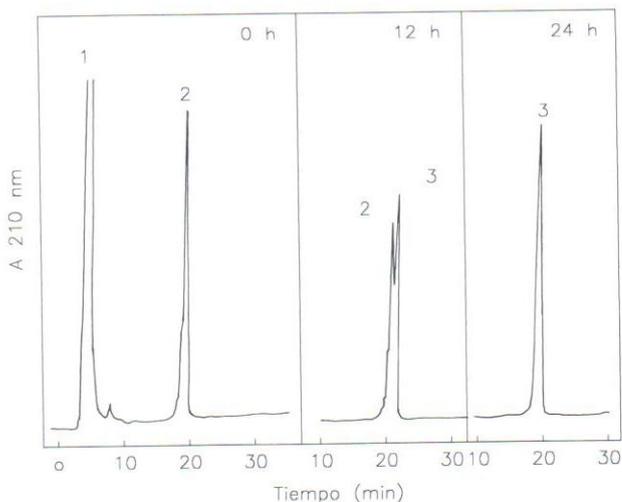
**Obtención del tetramero.** El péptido 1513 en su forma dimérica acetilada se purificó por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) en una columna semipreparativa Vydac 218TP1022 (The Separations Group, Hesperia, CA, USA). Se usó un gradiente de 20-50% B en 45 min, a un flujo de 4.5 ml/min y 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. La obtención del péptido 1513 en su forma tetramérica se realizó por medio de la formación de un enlace disulfuro entre dos moléculas de la forma dimérica. La reacción se llevó a cabo a una concentra-

ción de 10 mg/ml en una disolución acuosa de dimetilsulfóxido al 10%, a pH 7.5. La reacción de formación de la especie tetramérica fue observada por RP-HPLC, en una columna analítica Vydac 214TP54. Se usó un gradiente de 30-60% B en 20 min. Los solventes de la fase móvil usados fueron los mismos del paso de la cromatografía preparativa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la síntesis del péptido en fase sólida se obtuvieron 80 mg de producto dimérico crudo, el cual se purificó para obtener 15 mg de producto dimérico purificado. En un primer ensayo se llevó a cabo la reacción de oxidación a una concentración de 1 mg/ml, pero la reacción tardó 72 horas en producir el doble dímero esperado. En un segundo ensayo, se elevó dicha concentración a 10 mg/ml, y se obtuvo una disminución sustancial en el tiempo de reacción, obteniéndose la especie tetramérica en sólo 24 horas. El seguimiento de la reacción por RP-HPLC se muestra en la figura 1. En los cromatogramas se observa la elución de tres picos. Un pico común (pico 1) que eluye con un tiempo de retención de aproximadamente 5 min corresponde al dimetilsulfóxido; un segundo pico (pico 2), que eluye con un tiempo de retención de 20 min, se observa en los cromatogramas a las 0 y 12 h de reacción y corresponde a la forma dimérica del péptido; un tercer pico (pico 3), con un tiempo de retención de 22 min, se observa en los cromatogramas a las 12 y 24 horas de reacción y corresponde a la forma tetramérica (doble dímero) del péptido 1513.

La caracterización de los productos presentes en los picos se realizó en un es-



**Figura 1.** Progreso de la reacción de formación del doble dímero (DDC) analizado por RP-HPLC (Columna analítica Vydac 214TP54). La especie dimérica acetilada y purificada (10 mg/ml) se oxidó en una disolución acuosa de DMSO al 10%. En cada caso se inyectaron  $7 \mu\text{l}$  de la mezcla de reacción. El pico 1 es dimetilsulfóxido, el pico 2 es el dímero y el pico 3 es el tetrámero (doble dímero). Se usó un gradiente de 30-60% de acetonitrilo en 20 min, a una longitud de onda de 210 nm, con un flujo de 1 ml/min.

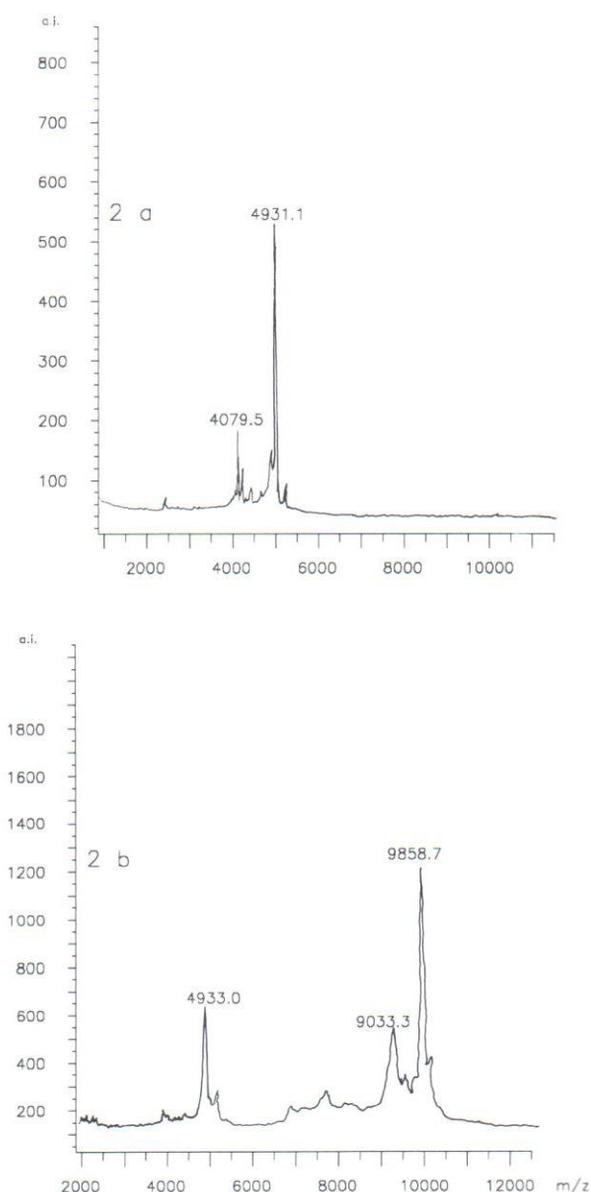
pectrómetro de masas MALDI-TOF (Bruker, Billerica, MA, USA) obteniéndose los pesos moleculares esperados (calculado / encontrado) para la forma dimérica acetilada, Pico 2, (4930.4 Da / 4931.1 Da  $\pm$  1.4 u) y para la forma tetramérica (DDC), Pico 3, (9858.8 Da / 9858.7 Da  $\pm$  5 u). El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF para la especie dimérica se llevó a cabo en el "modo reflector" y para la especie tetramérica en el "modo lineal" (Fig. 2). El análisis del pico 2 de RP-HPLC muestra la existencia de una especie predominante con una masa de 4931.1 ( $M+H^+$ ) y otra de masa 4079.5 correspondiente a una impureza. El análisis del pico 3 de RP-HPLC muestra la existencia de tres especies; la de mayor intensidad absoluta con una masa de 9858.7 Da y otra de 4933.0 Da, corresponden a la especie tetramérica acetilada con una ( $M+H^+$ ) y dos cargas positivas ( $M+2H^+$ ) respectivamente; sin embargo, se ve una tercera especie con una masa de 9033.3 Da que probablemente pueda haberse formado por la reacción

entre la especie dimérica deseada y la impureza presente. La suma de las masas de estas dos especies químicas difieren en 23 unidades (probablemente un átomo de sodio) con respecto a la masa encontrada y los espectros de las especies monomérica y tetramérica presentan un perfil de la impureza muy semejante. La técnica de ionización MALDI no es cuantitativa y, generalmente, las especies de menor masa suelen ionizarse más fácilmente y producir picos de mayor intensidad. Lo anterior nos lleva a pensar que una impureza con un pico de baja intensidad está en una concentración muy baja.

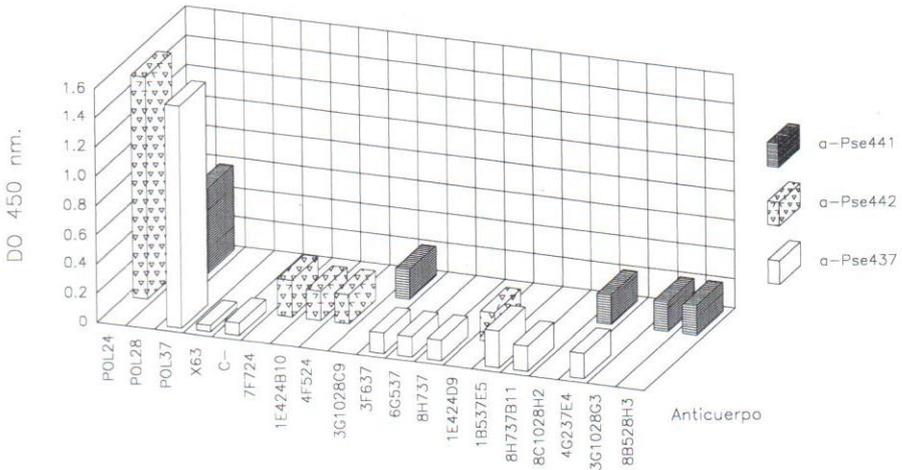
Con el fin de confirmar las propiedades biológicas del DDC para el péptido 1513 de malaria, la forma tetramérica del péptido fue ensayada frente a un grupo de 30 anticuerpos monoclonales inducidos por pseudopéptidos del péptido 1513 (17). Los pseudopéptidos poseen cada uno un enlace peptídico modificado de su forma normal CO-NH a CH<sub>2</sub>-NH. El pseudopéptido Pse-437 posee la modifi-

cación entre los residuos V11 y L12, el Pse-441 entre E8 y K9 y el Pse-442 entre K7 y E8 respectivamente. Como puede apreciarse en la Figura 3, al evaluar el reconocimiento del péptido 1513 en su presentación tetramérica, su capacidad de ser reconocido por los anticuerpos policlonales y monoclonales se refleja en las altas Densidades Ópticas (DO) leídas. Es decir, que se logra una adecuada presentación del epítipo (péptido 1513) acorde con altas densidades ópticas observadas en los ensayos de ELISA mostrados en la Figura 3. Las células X-63Ag8 empleadas para la obtención de los monoclonales se usaron como control del ensayo y la solución de PBS como control negativo del mismo.

Nuestros resultados muestran que la síntesis directa de un péptido dimérico, como bloque unitario para la formación de tetrameros, es un enfoque eficiente para la síntesis de péptidos dendriméricos. La síntesis directa del dímero produce mejores rendimien-



**Figura 2.** Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF de los picos de RP-HPLC. (Fig. 2a) El análisis del pico 2 de RP-HPLC muestra la especie dimérica predominante  $M+H^+$  (4931.1 Da) y una impureza (4079.5 Da). (Fig. 2b) El análisis del pico 3 de RP-HPLC muestra la especie tetramérica en las formas  $M+H^+$  (9858.7 Da) y  $M+2H^+$  (4933.0 Da), además de una impureza (9033.3 Da).



**Figura 3.** Reactividad de anticuerpos frente al doble dímero (DDC).

tos del péptido dimérico crudo, comparado con la de los MAP directos y los dendrímeros indirectos propuestos por otros grupos, además de ser fácil de purificar. La oxidación del dímero puro da un tetramero, el cual no necesita de pasos adicionales de purificación. Es de resaltar que la cantidad de dímero obtenida es la misma cantidad de tetramero obtenida después de la formación del enlace disulfuro. Por otro lado, la alta solubilidad del producto es una característica relevante. Finalmente, se evaluó la extensión de la reacción de formación del tetramero por RP-HPLC. De nuestros resultados concluimos que el tetramero es prácticamente el único producto final de la reacción, y que el dímero está presente solo en muy pequeñas cantidades. Por otra parte el hecho de que en los ensayos de ELISA el tetramero sea capaz de ser reconocido por

anticuerpos obtenidos con otras formas del péptido 1513 demuestra las propiedades inmunogénicas y la adecuada presentación al sistema inmune del péptido 1513 contenido en el tetramero. Toda vez que el sistema de construcción de doble dímero es fácil de llevar a cabo y da altos rendimientos de producto tetramérico, se puede establecer como un buen sistema molecular para presentar antígenos y un método conveniente para producir vacunas sintéticas.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresamos nuestra gratitud al Ministerio de Salud, República de Colombia, por la financiación de este trabajo.

## REFERENCIAS

1. Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.
2. Schnölzer, M.; Kent, S.B.H. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineering HIV protease. *Science* **1992**, 256, 221.
3. Tam, J.P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigen peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 5409.
4. Tam, J.P.; Zabala, F.J. Multiple antigen peptide: a novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptide antigens in solid phase immunoassays. *J. Immunol. Methods* **1989**, 124, 53.
5. Hahn, K.W.; Klis, W.A.; Stewart, J.M. Design and synthesis of a peptide having chymotrypsin-like esterase activity. *Science* **1990**, 248, 1544.
6. Gullick, W.J. *Methods in molecular biology: 3. New protein techniques*, J.M. Walker (Ed.), Humana Press, Clifton, N.J., USA, **1988**, pág. 341.
7. Patarroyo, M.E.; Romero, P.; Torres, M.L.; Clavijo, P.; Moreno, A.; Martínez, A.; Rodríguez, R.; Guzmán, F.; Cabezas, E. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* **1987**, 328, 629.
8. Patarroyo, M.E.; Amador, R.; Clavijo, P.; Moreno, A.; Guzmán, F.; Romero, P.; Tascón, R.; Franco, A.; Murillo, L.A.; Pontón, G.; Trujillo, G. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, **1988**, 332, 158.
9. Ruiz-Gallo, 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, 6319.
10. Amador, R.; Moreno, A.; Valero, V.; Murillo, L.; Mora, A.L.; Rojas, M.; Rocha, C.; Salcedo, M.; Guzmán, F.; Espejo, F.; Núñez, F.; Patarroyo, M.E. The first trials of the chemically synthesized malaria vaccine Spf66: safety, immunogenicity and protectivity. *Vaccine* **1992**, 10, 179
11. Teuscher, T.; Armstrong-Schellenberg, J.R.M.; Bastos de A., I.; Hurt, N.; Smith, T.; Hayes, R.; Masanja, H.; Silva, Y.; López, M.C.; Kitua, A.; Kilama, W.; Tanner, M.; Alonso, P.L. Spf66, a chemically synthesized subunit malaria vaccine, is safe and immunogenic in Tanzanians exposed to intense malaria transmission. *Vaccine* **1994**, 12, 328
12. Lu, Y.A.; Clavijo, P.; Galantino, M.; Shen, Z.Y.; Liu, W.; Tam, J.P. Chemically unambiguous peptide immunogen: preparation, orientation and antigenicity of purified peptide conjugated to the multiple antigen peptide system. *Mol. Immunol.* **1991**, 28, 623.

13. Rose, K. Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 30.
14. Shao, J.; Tam, J.P. Unprotected peptides as building blocks for synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone, and thiazolidine linkages. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3893.
15. Chaves, F.A.; Calvo, J.C.; Carvajal, C.C.; Díaz, D.; Silva, Y.; Rosas, J.E.; Guzmán, F. *Memorias XI Congreso Colombiano de Química*, Asociación Química Colombiana, Bucaramanga, **1998**, pág. 227.
16. 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.
17. Lozano, J. M.; Espejo, F.; Díaz, D.; Salazar, L. M.; Rodríguez, J.; Pinzón, C.; Calvo, J. C.; Guzmán, F.; Patarroyo, M. E. Reduced amide pseudopeptide analogues of a malaria peptide possess secondary structural elements responsible for induction of functional antibodies which react with native proteins expressed in *Plasmodium falciparum* erythrocyte stages. *J. Peptide Res.* **1998**, 52, 457.