

## Técnica para proteger aminoácidos a utilizarse en la síntesis de péptidos en fase sólida

HEBER MUÑOZ-MARTINEZ †  
Departamento de Química Orgánica  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.  
Prol. de Carpio y Plan de Ayala  
Col. Santo Tomás  
Apartado Postal 42-186  
11340 México, D.F.

CECILIA JUAREZ-GORDIANO  
Departamento de Inmunología  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Universidad Nacional Autónoma de México

MUÑOZ-MARTÍNEZ, H. y C. JUÁREZ-GORDIANO, 1994. Técnica para proteger aminoácidos a utilizarse en la síntesis de péptidos en fase sólida. *An. Esc. nac. Cienc. biol., Méx.* **39**: 23-28.

RESUMEN: En este trabajo se presenta una técnica para la protección de los grupos  $\alpha$ -amino, utilizando el grupo ter-butoxicarbonilo (Boc) —diferente de la que proporciona el instructivo que acompaña al Boc, reportada por Hagiwara y Kamura<sup>1</sup>—. Esta técnica, logra incrementar la eficiencia de protección en un 30% aproximadamente, proporciona mayor grado de pureza y reduce los requerimientos de reactivos. Este trabajo describe la preparación de  $N\alpha$ Boc-Valina y  $N\alpha$ Boc-Glicina, aunque la misma técnica es susceptible de aplicarse a otros aminoácidos.

### INTRODUCCIÓN

La síntesis de péptidos es complicada por el gran número de reacciones indeseables que ocurren al sintetizar una unión peptídica entre dos aminoácidos. Los aminoácidos poseen una amplia variedad de grupos químicamente reactivos, como son los grupos carboxilo (-COOH), amino (-NH<sub>2</sub>), tiol (-SH) y oxhidrilo (-OH) que producen reacciones laterales, éstas compiten con la formación del enlace peptídico deseado y con frecuencia dan lugar a moléculas indeseables, que obligan a numerosos pasos de purificación. Además existen varias formas en las cuales se pueden unir dos aminoácidos: si al unir glicina y alanina, se producen cuatro especies: glicina-alanina, alanina-alanina, alanina-glicina y glicina-glicina; asimismo se pueden obtener polímeros más grandes como tripéptidos y tetrapéptidos que obligan a pasos innecesarios de purificación. Por estas razones, si bien la síntesis de péptidos la realizó con éxito Emil Fischer desde 1906, no fue sino hasta

que los bloqueos selectivos de los grupos activos de los diferentes aminoácidos, le permitieron a Merrifield<sup>2</sup> llevar a cabo una síntesis manual sistematizada que dio lugar posteriormente a la síntesis de péptidos en fase sólida automatizada.

Para impedir las reacciones colaterales indeseables, se utilizan grupos protectores para los grupos reactivos, lo que permite dejar libres los grupos necesarios para obtener la unión peptídica requerida; un buen grupo protector debe ser inerte a las condiciones de reacción necesarias para formar el enlace peptídico y, además, ser fácilmente eliminable al terminar la síntesis como lo ha enfatizado Erickson, *et al.*<sup>3</sup>

La protección de los grupos  $\alpha$ -amino libres de los aminoácidos, se logra con el grupo tert-butoxicarbonilo; la de los grupos carboxilo  $\alpha$ - y  $\delta$ - se obtiene con el grupo bencilo (Z); para el grupo lateral de la cisteína se usa el ter-butoxicarbonil-S-bencil, y los ésteres bencílicos son utilizados para proteger a los grupos oxhidrilo de la serina y treonina.<sup>4,5</sup> Durante el acoplamiento de un aminoácido, todos los grupos funcionales del aminoácido entrante, excepto el grupo  $\alpha$ -carboxilo, deben estar protegidos para evitar reacciones indeseables.

El tert-butoxicarbonilo (Boc), es uno de los grupos protectores más importantes del extremo  $\alpha$ -amino en la síntesis de péptidos (Fig. 1). Este presenta gran estabilidad a la hidrogenación catalítica, y a álcalis e hidrazinas, proporcionando Boc-aminoácidos libres de contaminantes y con altos rendimientos por procedimientos convencionales; además, es rápidamente eliminado del extremo  $\alpha$ -amino por tratamiento con ácido moderado, facilitando de esta manera la síntesis de péptidos tanto en solución como en fase sólida, lo que ha sido demostrado por Hagiwara y Kamura.<sup>1</sup>

En virtud de que las instrucciones que acompañan al grupo terbutoxicarbonilo no siempre producen los rendimientos deseados, la técnica descrita por Hagiwara y Kamura,<sup>1</sup> ésta fue desarrollada por el Prof. Héber Muñoz en su laboratorio, con una eficiencia superior al 95% y un alto grado de pureza que permitió la cristalización de uno de los péptidos sintetizados, lo que permite obviar el uso de otros reactivos, reduciendo el costo del proceso.<sup>6</sup>

#### PREPARACION DE N $\alpha$ BOC-VALINA Y N $\alpha$ BOC-GLICINA

1. En un matraz Erlenmeyer se preparó una solución de L-valina (5 g, 42.73 mmol) y trietilamina (8.96 ml, 62.72 mmol) en 25 ml de agua destilada, manteniéndola en agitación hasta homogeneidad completa.
2. Ya homogénea, se adicionaron 25 ml de dioxano y Boc-On (11.57 g, 45.97 mmol).

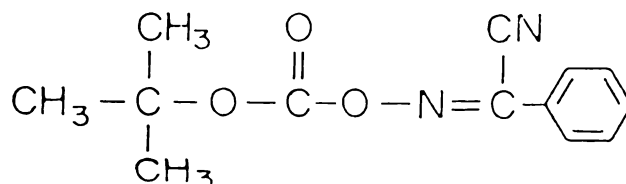


FIG. 1. Grupo ter-butoxicarbonilo (Boc).

3. Se dejó reaccionar la mezcla toda la noche con agitación constante y a temperatura ambiente.
4. Al terminar la reacción, se extrajo el producto con 50 ml de agua destilada y 60 ml de acetato de etilo para separar la fase acuosa, la que se saturó con NaCl.
5. La fase acuosa saturada se trató por tres veces consecutivas con 50 ml de agua destilada y 60 ml de acetato de etilo.
6. Se aciduló la fase acuosa con una solución de ácido cítrico al 10%, hasta obtener un pH de 2 ó 3.
7. El producto acidulado se extrajo con 60 ml de acetato de etilo por tres veces para recuperar la fase orgánica.
8. La fase obtenida se lavó tres veces con una solución saturada de NaCl (60 ml).
9. Para eliminar la posible humedad, se agregó a la solución resultante  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro (2 g) (en este paso, la solución puede quedar en reposo toda la noche o por varias horas).
10. La solución orgánica se filtró y se evaporó el acetato de etilo en rotavapor, manteniendo la temperatura a 60°C.
11. Por último, se llevó a sequedad en bomba de alto vacío con trampa de hielo seco, hasta obtener un polvo blanco.
12. El producto obtenido se caracterizó mediante punto de fusión, cromatografía en placa fina y espectro de RMN.

La preparación de  $\text{N}\alpha\text{Boc}$ -Glicina se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de reacción, con la diferencia de que la mezcla reaccionante permaneció solamente 2 horas (punto 3). Esta misma técnica fue utilizada para bloquear los grupos  $\alpha$ -amino de los aminoácidos glutámico, aspártico y  $\alpha$ -amino-adípico.

#### CONTROL DE CALIDAD DE LOS AMINOACIDOS BLOQUEADOS

Al concluir el bloqueo de los grupos amino libres de los aminoácidos valina y glicina con el grupo ter-butoxicarbonilo, se sometieron a tres distintas pruebas de control de calidad: cromatografía en placa fina, punto de fusión y espectros de RMN, para comprobar que el grupo tert-butilo se unió al aminoácido por el extremo  $\alpha$ -amino terminal.

#### CONTROL DE CALIDAD PARA EL $\text{N}\alpha\text{BOC}$ -VALINA

1. Cromatografía en placa fina. Del producto obtenido en la preparación del  $\text{N}\alpha\text{Boc}$ -Valina, se tomó una pequeña alícuota disolviéndola en un volumen mínimo de acetato de etilo, se aplicó en una cromatoplaqueta de sílica, junto con una muestra de referencia de Boc-valina de laboratorios Sigma. El sistema de elución utilizado para correr las placas fue de cloroformo-metanol-ácido acético 7:3:1. Al terminar el corrimiento se reveló la placa con una solución de ninhidrina al 2% en n-butanol, observando una sola mancha para el producto preparado, idéntico al de la referencia, obteniéndose un  $R_f$  para ambos de 0.54, lo que indicó la obtención del producto libre de contaminantes y de materia prima, es decir que la reacción se llevó a cabo en forma correcta.
2. Punto de fusión. Se tomó una pequeña muestra del producto seco en un tubo capilar sellado por uno de sus extremos y se colocó en el aparato para punto de fusión Elec-

trotermal, observando un punto de fusión de 76°C, que coincide con el descrito en la literatura (75-78°C).

3. Espectros de RMN. Para obtener el espectro de RMN, se solubilizó la muestra seca con deuteriocloroformo (CDCl<sub>3</sub>) y colocándolo en un tubo para RMN. El espectro para N $\alpha$ -Boc-Val preparada mostró varios singuletes, el primero se encontró en la región de 0.96 ppm que integra para seis protones (6H) correspondientes a los grupos metilo (CH<sub>3</sub>) del isopropilo en la cadena lateral del aminoácido. Inmediatamente después, con un desplazamiento químico en la región de 1.30 ppm se encontró un singulete que integra para nueve protones (9H) correspondientes al grupo tert-butilo. En los dos casos anteriores se observan singuletes, debido a que los protones (1H) unidos a sus carbonos correspondientes son equivalentes. En la región de 2.23 ppm se observó un singulete correspondiente al metino (CH). Este integra para tres protones (3H), por lo que el protón acopla con el protón del grupo amino y del isopropilo. Por último, a campo más bajo, con un desplazamiento químico de 4.0 a 4.45 ppm se observó la señal del protón que corresponde al grupo amino, ya que integra para un protón (1H).

Las características observadas en el espectro de RMN sugieren que el aminoácido valina quedó bloqueado en su extremo  $\alpha$ -amino por el grupo Boc, ya que la presencia del singulete que integra para nueve protones en la región de 1.30 ppm corresponde al grupo tert-butilo, y la señal del grupo  $\alpha$ -amino, que integra para un protón, indicando que uno de sus protones correspondientes al  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> se substituyó por el tert-butilo (Fig. 2).

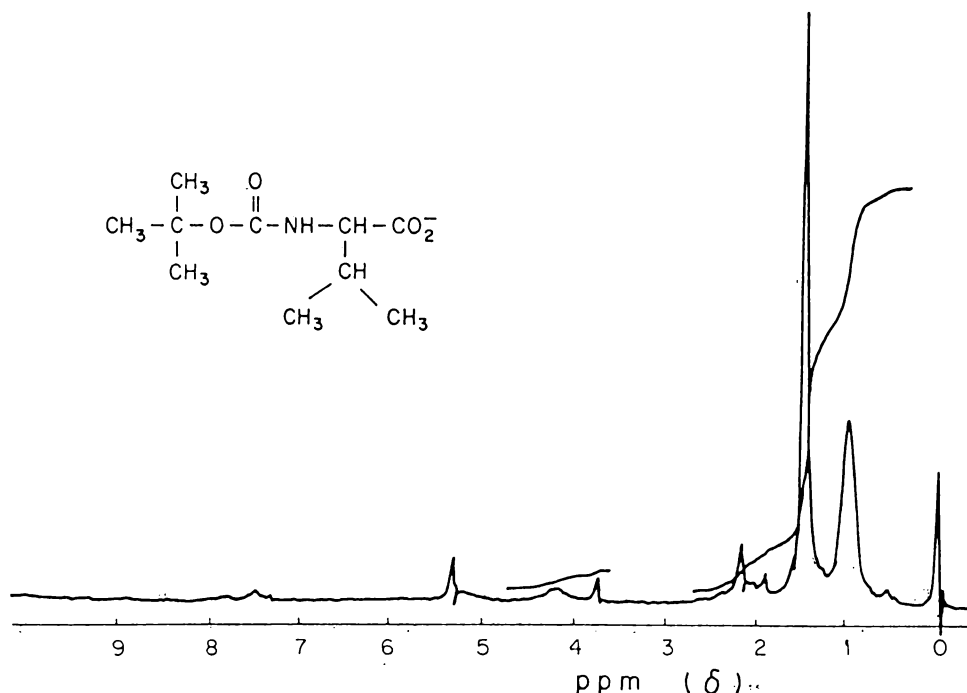


FIG. 2. Espectro de RMN del N $\alpha$ -Boc-Valina, mostrando la señal del ter-butilo en 1.30 ppm y la del amino en 4.2 ppm.

El rendimiento total del N $\alpha$ Boc-Val obtenido fue de 3.9 g, equivalente al 82% de rendimiento. El tiempo de reacción de este aminoácido fue mayor con respecto al de la glicina, debido a que es una molécula más voluminosa y por tanto ofrece un mayor efecto estérico al reaccionar.

#### CONTROL DE CALIDAD PARA LA N $\alpha$ BOC-GLI

Al finalizar la preparación del aminoácido protegido, se obtuvo un polvo blanco con un rendimiento del 85% (4.25 g), realizando su control de calidad por los métodos antes mencionados, en el aminoácido anterior.

1. Cromatografía en placa fina. Se utilizaron las mismas condiciones que para la N $\alpha$ Boc-valina, con un sistema de elución cloroformo-metanol-ácido acético 7:3:1 y revelando la placa con ninhidrina al 2% en n-butanol. En este caso también se observó una sola mancha para el producto, con un R<sub>f</sub> de 0.51 igual al de N $\alpha$ Boc-Gli usado como referencia, lo que sugiere una pureza aceptable, es decir ausencia de subproductos y material no reaccionante.
2. Punto de fusión. El punto de fusión del producto seco fue de 83°C, y se corroboró con el de la literatura que lo menciona entre 87 a 88°C.
3. Espectro de RMN. Para obtener el espectro de RMN del producto a analizar, lo solubilizó con acetona deuterada. El espectro mostró un singulete con un desplazamiento químico en 1.35 ppm, característico del grupo tert-butilo, que integra para nueve protones (9H). En la región de 3.8 ppm aparece un triplete que integra para tres protones no equivalentes, dos protones de metileno (CH<sub>2</sub>) y uno del grupo NH que acopla con ambos. La señal del grupo amino aparece con un desplazamiento químico de 6.2 ppm como un singulete ancho que integra para un protón (1H). En la región de 2.0 ppm aparece un multiplete que integra para tres protones (3H) que probablemente se trate de trazas del disolvente acetona en el cual se trabajó. El espectro revela claramente la presencia del grupo tert-butilo unido al aminoácido, por el singulete observado en la región 1.35 ppm que integra para nueve protones, correspondientes a los tres grupos metilo del tert-butilo; y por la presencia del singulete en la región 6.2 ppm que integra para un sólo protón del grupo NH (Fig. 3).

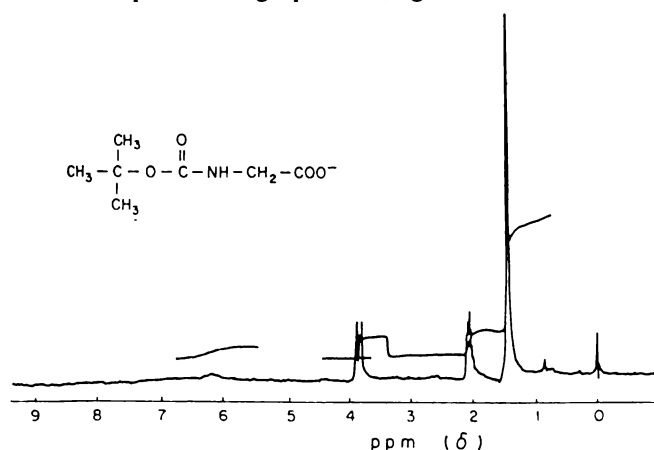


FIG. 3. Espectro de RMN del aminoácido glicina bloqueado con el grupo Boc-On en su extremo  $\alpha$ -amino. La señal a 1.3 ppm corresponde al ter-butilo y la señal a 6.8 al grupo  $\alpha$ -NH.

### Agradecimientos

Este trabajo fue revisado para su publicación por el Profr. Héber Muñoz el 19 de junio de 1989. Agradezco al Profr. Antonio Quiroz Gutiérrez sus sugerencias y a la maestra Leticia Contreras por sus correcciones de estilo.

### SUMMARY

This paper reports a new technique for amino acid protection using the *tert*-butoxycarbonyl (Boc) group, which is different to the previous one reported by Hagiwara and Kamura (1975) which is recommended by the Boc suppliers. This technique increases the efficiency of amino acid protection in 30% leads to a higher degree of purity than in the solid phase peptide methods and reduces the use of expensive reagents. In this paper we report the preparation of  $N\alpha$ -Boc-Valine and  $N\alpha$ -Boc-Glycine, but it can be used with other amino acids.

### REFERENCIAS

1. HAGIWARA, M. I.; KAMURA, T. *Tetrahedron. Lett.*, 1975, **49**: 4393.
2. MERRIFIELD, R. B. *Science*, 1965, **150**, 178.
3. ERICKSON, B. W.; MERRIFIELD, R. B., en: Neurath, H, *The Proteins*; Neurath, H., Ed.; Academic Press; USA, 1976; Vol. II.
4. BODANSKY, M. *Principles of peptide synthesis*; Springer-Verlag: New York, 1984.
5. STEWART, J. M.; YOUNG, J. D. *Solid-phase peptide synthesis*; Freeman: Sn. Fco., 1969.
6. JUÁREZ, C. Tesis licenciatura, UNAM-Iztacala, 1988.

Recibido en enero de 1992. Aceptado para su publicación en julio de 1993.