

Técnica para proteger con tert-butoxicarbonilo (BOC) los grupos α -amino de aminoácidos a utilizarse en la síntesis de péptidos en fase sólida

H. MUÑOZ-MARTÍNEZ¹ y C. JUÁREZ-GORDIANO²

¹ Departamento de Química Orgánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas I.P.N. México D.F.

² Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Apdo. postal 70-228, 04510 México D.F.

Recibido en febrero de 1992

Aprobado en febrero de 1992

La síntesis de péptidos ha tomado una importancia sin precedente, sólo comparable al reciente desarrollo de la biotecnología. La explotación de sus capacidades terapéuticas ha hecho de ellos fármacos, y sus numerosas aplicaciones en biología molecular han permitido estudiar los diferentes reconocimientos, enzima-substrato, antígeno-anticuerpo o ligando-receptor, característicos de la biología. En inmunología se han usado para determinar epitopes, como antígenos e inmunógenos sintéticos, para la producción de vacunas o de anticuerpos monoclonales.

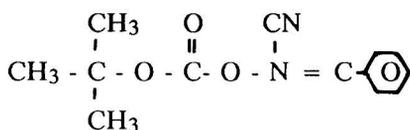
En la actualidad, los sintetizadores automáticos han evolucionado y hecho posible la obtención rápida de péptidos; desafortunadamente, junto con su eficiencia, estos aparatos han incrementado su costo así como el de todos sus reactivos, y con mucha frecuencia los péptidos en forma automática no alcanzan los niveles de pureza requeridos, por lo que la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Merrifield en forma manual es aún una técnica de gran utilidad y que puede fácilmente ser implementada.

La síntesis de péptidos es complicada por el gran número de reacciones indeseables que pueden ocurrir; los aminoácidos poseen varios grupos químicamente reactivos: carboxilo (-COOH), amino (-NH₂), tiol (-SH) y oxhidrilo (-OH) que producen reacciones laterales, que compiten con la formación del enlace peptídico deseado. Además, existe más de una forma en la cual se pueden unir dos aminoácidos, si tratamos de unir glicina y alanina, obtendríamos cuatro especies: glicina-alanina, alanina-alanina, alanina-glicina y glicina-glicina (Merrifield, 1965).

Para impedir las reacciones colaterales indeseables, se usan grupos protectores para los grupos reactivos, hasta dejar libres los grupos necesarios a fin de obtener la unión peptídica deseada; un buen grupo protector debe ser inerte a las condiciones de reacción necesarias para formar el enlace peptídico y además fácilmente eliminable al terminar la síntesis (Erickson *et al.*, 1976).

La protección de los grupos α -amino libres de los aminoácidos, se logra con el grupo tert-butoxicarbonilo; la de los grupos carboxilo α y γ se obtiene con el grupo Z (bencilo); para el grupo lateral de la cisteína se usa el tert-butoxicarbonil-S-Bencilo y los ésteres bencílicos son utilizados para proteger a los grupos oxhidrilo de la serina y treonina (Bodanski, 1984). Durante el acoplamiento de un aminoácido en la síntesis de péptidos, todos los grupos funcionales del aminoácido entrante, excepto el grupo γ -carboxilo, deben estar protegidos para evitar reacciones indeseables (Stewart *et al.*, 1969).

El grupo tert-butoxicarbonilo (Boc), es uno de los más importantes grupos protectores del extremo α -amino en la síntesis de péptidos. Este presenta una gran estabilidad a la hidrogenación catalítica, a álcalis e hidrazinas, proporcionando Boc-amionácidos libres de contaminantes y con altos rendimientos por procedimientos convencionales; además, es rápidamente eliminado del extremo amino por tratamiento con ácido moderado, lo que facilita la síntesis de péptidos, tanto en solución como en fase sólida.



En virtud de que la protección de aminoácidos mediante el grupo tert-butoxi-carbonilo no siempre produce los rendimientos deseados, reportamos una modificación a la técnica de Hagiwara, desarrollada en nuestro laboratorio, con la que hemos obtenido una eficiencia superior al 95 % y un mayor grado de pureza en el producto obtenido.

PREPARACION DE NBoc-VALINA Y NBoc-GLICINA

1. En un matraz erlenmeyer preparar 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 que homogenice.
2. Ya homogénea, adicionar 25 mL de dioxano y Boc-On (11,57 g 45,9 mmol).
3. Dejar reaccionar la mezcla toda la noche con agitación constante y a temperatura ambiente.
4. Cuando termine la reacción, se extrae el producto con 50 mL de agua destilada y 60 mL de acetato de etilo para separar la fase acuosa, la que se satura con NaCl.
5. Tratar la fase acuosa saturada de nuevo con 50 mL de agua destilada y 60 mL de acetato de etilo por tres veces.
6. Con una solución de ácido cítrico al 10% acidular la fase acuosa hasta obtener un pH de 2 ó 3.
7. Extraer el producto acidulado con 60 mL de acetato de etilo por tres veces para recuperar la fase orgánica.
8. Lavar a la fase obtenida tres veces con una solución saturada (60 mL) de NaCl.
9. Para eliminar la posible humedad agregar a la solución resultante Na_2SO_4 anhidro (2 g). En este paso la solución puede quedar en reposo toda la noche o por varias horas.
10. Filtrar la solución y evaporar el acetato de etilo controlando la temperatura menor a 60°C.
11. Por último, llevar a sequedad en bomba de alto vacío con trampa de hielo seco, hasta obtener un polvo blanco.
12. Determinar al producto obtenido: punto de fusión, cromatografía de placa fina y espectro de RMN.

La preparación de NBoc-Glicina se lleva a cabo en las mismas condiciones de reacción, con la diferencia de que la mezcla reaccionante permanecerá solamente por dos horas (punto 3).

Está misma técnica la utilizamos para bloquear los grupos α -amino de los aminoácidos glutámico, aspártico y α -amino-adípico.

REFERENCIAS

BODANSKY, M. (1984). Principles of peptide synthesis. *Springer-Verlag*, New York.

ERICKSON, B.W. y R. B. MERRIFIELD (1976). Solid-Phase peptide synthesis. In: *The Proteins*. Vol. II. Academic Press, USA.

HAGIWARA, M.I y T. KAMIRA (1975). A new tert-butoxycarbonylating reagents 2-tert-butyloxy carbonyloxyimino-2-phenyl-acetonitrile. *Tet. Lett.* 49: 4393-4396.

JUAREZ, G.C. (1988). Síntesis en fase sólida de polipéptidos del oncogene "ras". Tesis. UNAM-Iztacala. México.

MERRIFIELD, R.B. (1965). Automated synthesis of peptide. *Science* 150: 178-185.

STEWART, J.M. y J.D. YOUNG (1969). Solid-phase peptide synthesis. *Freeman*, San Francisco, USA.