

Kemi for tiden

Peptider og peptidbiblioteker

Af lektor Paul Robert Hansen, Kemisk Institut, KVL, prh@kvl.dk

Bakteriers stigende resistens over for antibiotika er et alvorligt problem. Det er forudsagt, at der inden for en kort årrække vil findes mange bakteriearter, der er resistente over for alle kendte antibiotika. Nye biologisk aktive forbindelser, f.eks. antibiotika, kan findes ved brug af kombinatorisk kemi. Princippet er, at man i stedet for at syntetisere et stof ad gangen syntetiserer millioner af stoffer i en blanding, kaldet et bibliotek. Biblioteket scannes dernæst for biologiske egenskaber, og de mest aktive forbindelser identificeres. Herved kan man finde nye biologisk aktive forbindelse med interessante egenskaber. Ved Peptidgruppen, Kemisk Institut, KVL, er vi interesseret i at udvikle nye antibiotika baseret på peptid- eller peptid-lignende forbindelser.

Peptiders opbygning

Peptider er små proteiner, der indgår i en lang række biologiske processer.

Biologisk aktive peptider findes inden for mange forskellige områder, f.eks. hormoner, vækstfaktorer, neurotransmittere, signalstoffer og antibiotika. Blandt de mere kendte peptider er det kunstige sødemiddel aspartam og enkefalin, som bruges af kroppen til at dæmpe smerte.

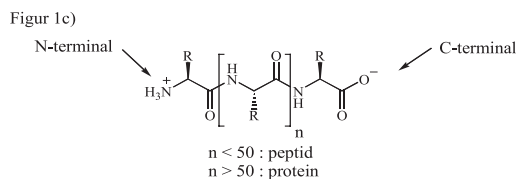
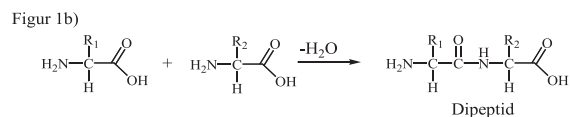
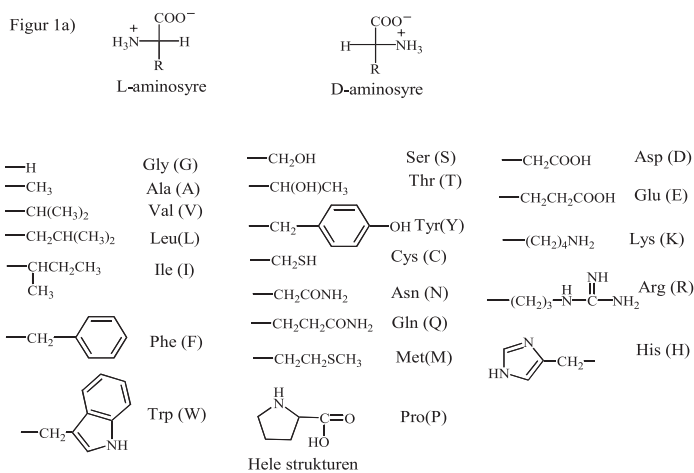
Peptider er ligesom proteiner opbygget af L-aminosyrer. Der findes i alt 20 forskellige aminosyrer der kan indgå i proteiner. Den generelle struktur er vist i figur 1a. R symboliserer sidekæden og varierer fra aminosyre til aminosyre.

Det simpleste peptid er et dipeptid. Det dannes ved, at carboxylsyregruppen på den ene aminosyre reagerer med aminogruppen på den anden aminosyre og fraspalter vand. Reagerer det dannede dipeptid (figur 1b) med endnu en aminosyre fås et tripeptid, osv. Et molekyle, der indeholder under 50 aminosyreenheder, kaldes et peptid (figur 1c). Er det opbygget af mere end 50 aminosyreenheder, betegnes det et protein.

Peptidsyntese, metode og anvendelse

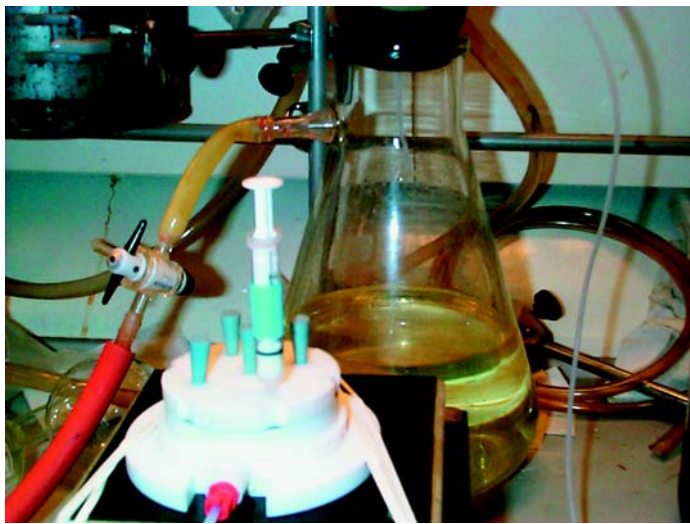
Kemisk syntese af peptider og peptid-baserede forbindelser kan bruges til:

1. at få større mængder af et kendt biologisk aktivt stof således, at det kan studeres nærmere
2. at stabilisere et biologisk aktivt peptid således, at det ikke så nemt bliver nedbrudt i organismen, og at dets effekt varer længere
3. at finde nye hidtil ukendte biologisk aktive forbindelser. Peptider fremstilles syntetisk ved fastfasemetoden, en teknik der blev fundet af Bruce Merrifield i 1963. Han modtog nobelprisen i 1984 for dette arbejde.



Figur 1.

På samme måde, som man trækker perler på en snor, opbygges den ønskede sekvens trinvist. Én aminosyre kobles ad gangen, således at kæden opbygges, mens C-terminalen er forankret til en uopløselig polymer (resin). Man kan forestille sig resin, som en svamp der udvider sig (kvælder), når den kommer i organiske opløsningsmidler; herefter kan opbygningen af peptidet foregå. Syntesen udføres ofte i en engangssprøjte udstyret med et teflonfilter (se billede). Herved kan man bruge et stort overskud af reagenser, som nemt kan vaskes væk. Eftersom man ikke kan skille sig af med biprodukter undervejs, er det vigtigt, at udbyttet i hvert koblingstrin er over 99%.



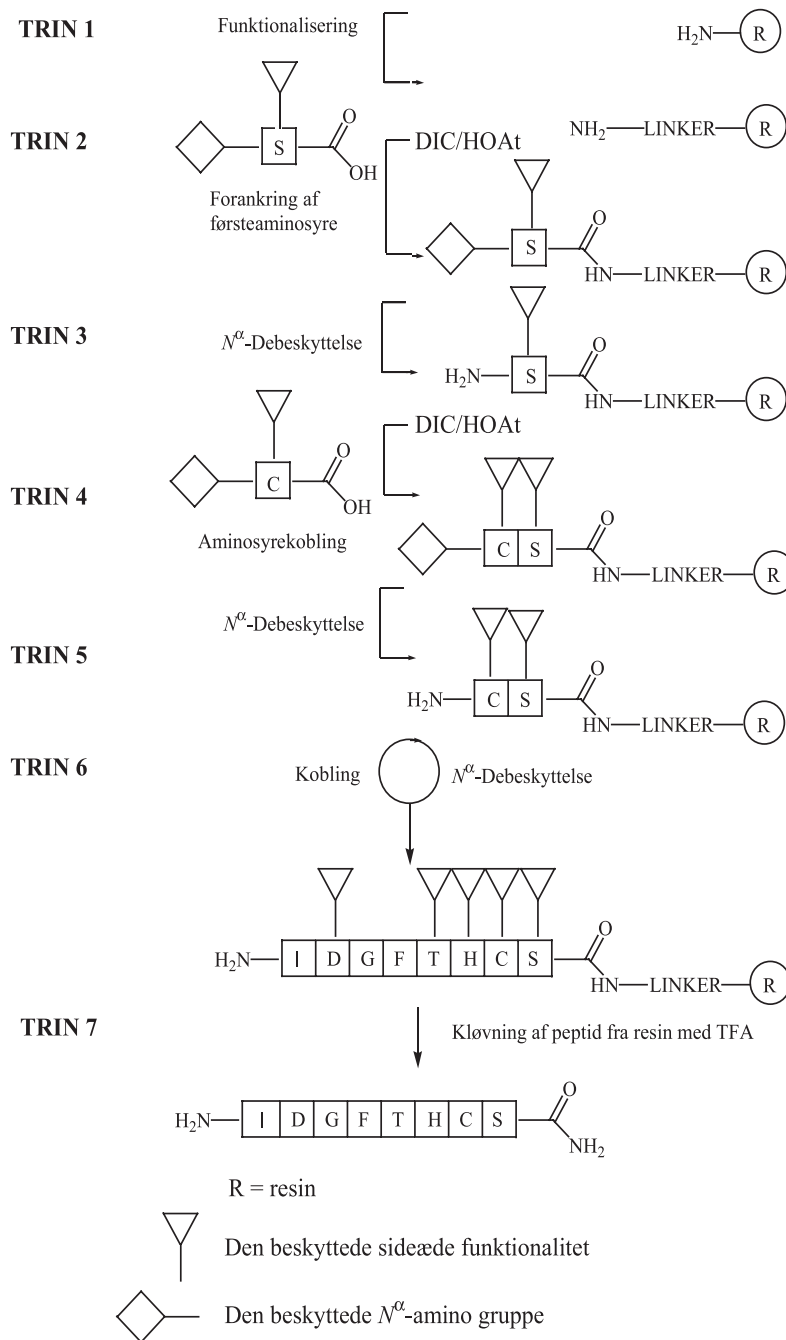
Fastfasesyntese af peptidet IDGFTHCS-NH₂

Peptidet opbygges på følgende måde (se figur 2).

Trin 1: En bifunktionel linker, med både en aminogruppe og carboxylsyregruppe, kobles via carboxylsyregruppen til en aminogruppe på resinen. Herved fås en amidbinding mellem linkerens og resinen. Dernæst fjernes beskyttelsesgruppen til linkerens aminofunktionalitet. Herved fås en fri aminogruppe på linkerens, og herpå syntetiseres peptidet nu. Linkeren gør, at peptidet kan frigøres og isoleres efter endt syntese. Peptidkæden er således bundet til resinen gennem en spaltbar linker under hele syntesen.

Trin 2: Nu kan syntesen af selve peptidet begynde, men for at undgå uønskede sidereaktioner må den aminosyre, der skal kobles, beskyttes. Aminosyrernes α -aminogruppe beskyttes (rombe) under koblingen, og fjernes med base når koblingen er fuldført. Aminosyrernes sidekædefunktionaliteter beskyttes (trekant) derimod semi-permanent under opbygningen af

Opstilling til peptidsyntese.



Figur 2. Skematisk fremstilling af fastfasesyntese. Syntese af peptidet IDGFTHCS-NH₂.

Bemærk I, G, og F i eksemplet behøver ikke beskyttelse af sidekæden

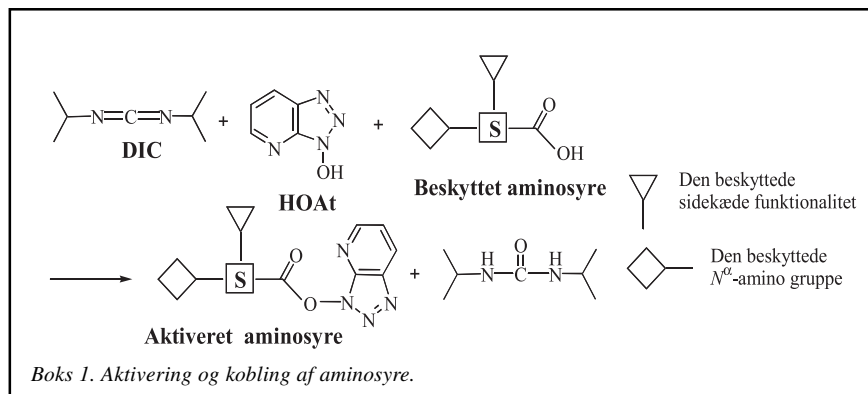
peptidet og fjernes med syre, men først til sidst når peptidet fraspaltes fra resinene. Den beskyttede aminosyre, i dette tilfælde serin, opløst i dimethylformamid, omdannes til en ester ved tilsætning af reagenserne diisopropylcarbodiimid, (DIC) og HOAt (1-hydroxy-7-azabenzotriazol). Denne reaktion er vist specielt i boks 1.

Trin 5: Aminosyrens α -aminobeskyttelsesgruppe fjernes som i trin 3, figur 2.

Trin 6: Trin 3 og 4 gentages, indtil den ønskede sekvens er syntetiseret.

Trin 7: Peptidet fraspaltes resinene, og sidekædebeskyttelsesgrupperne fjernes samtidigt, typisk med trifluoreddikesyre/H₂O (TFA/H₂O; 95:5).

Efter inddampning fældes produktet i diethylether, genopløses i 10% eddikesyre og frysetørres. Herefter får man det som et hvidt pulver. Herefter bestemmes identiteten og renheden af produktet ved Liquid-Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS). Herved analyseres stofferne ved først at adskille dem ved højtryksvæske chromatografi, hvorefter de identificeres i et massespektrometer.



Aminosyreesteren af den beskyttede aminosyre reagerer med den frie aminogruppe på resinene og danner en amidbinding. Reaktionen er en nucleophil acyl substitution. Nu er den første aminosyre covalent bundet til den faste fase som amid.

Trin 3: Aminosyrens α -aminobeskyttelsesgruppe fjernes med 20% piperidin i dimethylformamid (DMF). Omdannelsen af carbanionen (**2**) til dibenzofulven (**3**) er en β -elimination

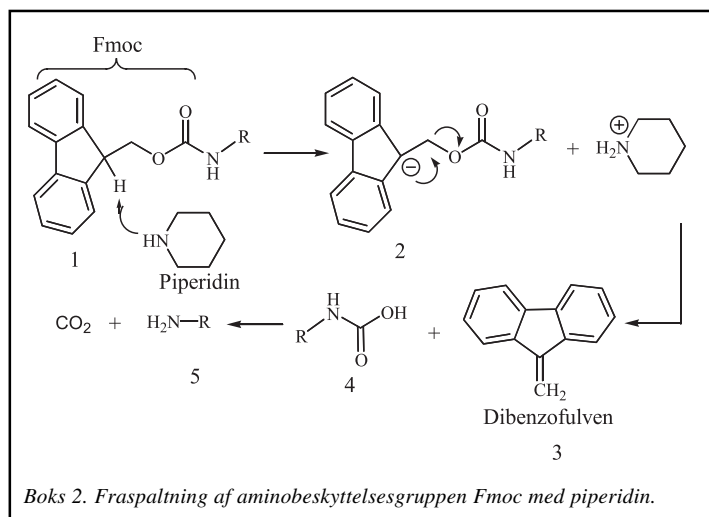
antibiotikum er penicillin. På grund af den meget udbredte anvendelse af antibiotika i de senere år, vil der inden for en relativ kort årrække findes mange bakteriearter, der er resistente over for alle kendte antibiotika. Resistensudvikling kan opstå ved mutation og overførsel af genetisk materiale.

En af de ting der forskes i ved Peptidgruppen, Kemisk Institut, KVL er at finde nye antibakterielle forbindelser baseret på peptider.

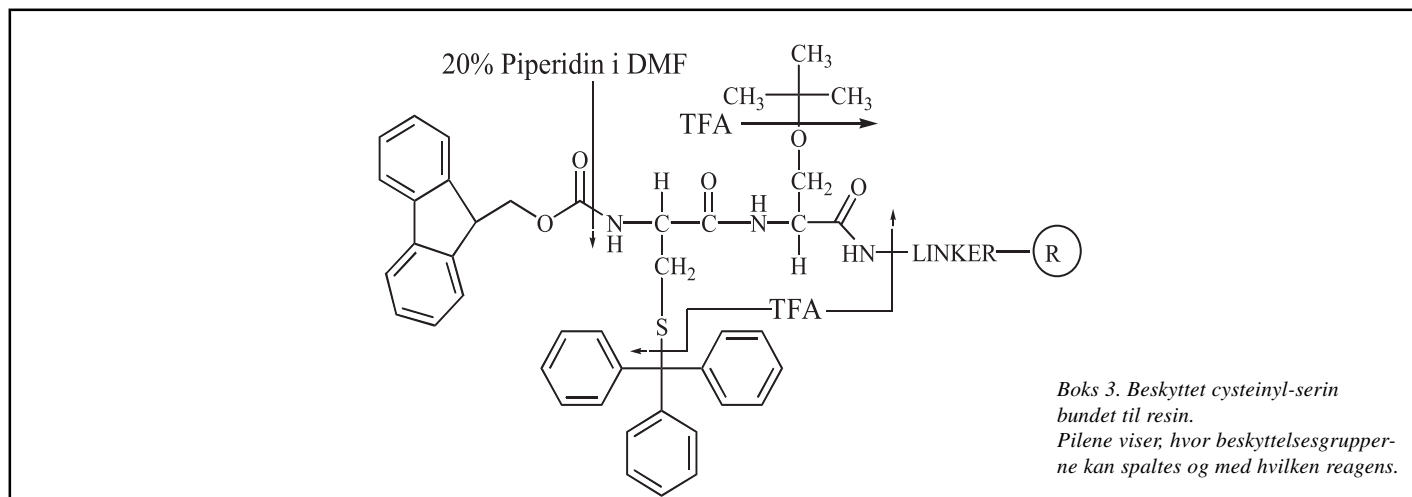
Syntese af alle analoger af selv små peptider er en umulig opgave. F.eks. findes der 400 dipeptider (20²), 8000 tripeptider, 160.000 tetrapeptider, 3.200.000 pentapeptider, 64.000.000 hexapeptider og over en milliard heptapeptider.

Nye biologisk aktive analoger findes ved brug af kombinatorisk kemi. Man anvender den samme type kemi som beskrevet ovenfor bare på en anden måde. Princippet er, at man i stedet for at syntetisere et stof ad gangen syntetiserer millioner af peptider eller peptidlignende stoffer i en blanding, kaldet et bibliotek. Ved at anvende denne fremgangsmåde kan man f.eks. syntetisere 64.000.000 hexapeptider på tre arbejdsdage. Biblioteket scannes dernæst for biologiske egenskaber, og de mest aktive forbindelser identificeres.

Peptidbibliotekerne kan have mange forskellige formater. I det følgende beskrives opløselige biblioteker i *positional scanning* formatet. Fordelen, ved at bibliotekerne er opløselige, er, at man kan anvende cellebaserede assays (et assay er en simpel metode til at teste den biologiske aktivitet af en given forbindelse). Ideen med *positional scanning* er, at man finder ud af, hvilken aminosyre der virker bedst i en bestemt



Trin 4: Næste aminosyre cystein kobles på samme måde som i trin 2. Hele strukturen af det beskyttede peptid bundet til resinene er vist specielt i boks 3.



- A $O_1X_2X_3X_4X_5X_6-NH_2$ (19 synteser)
 B $X_1O_2X_3X_4X_5X_6-NH_2$ (19 synteser)
 C $X_1X_2O_3X_4X_5X_6-NH_2$ (19 synteser)
 D $X_1X_2X_3O_4X_5X_6-NH_2$ (19 synteser)
 E $X_1X_2X_3X_4O_5X_6-NH_2$ (19 synteser)
 F $X_1X_2X_3X_4X_5O_6-NH_2$ (19 synteser)

O: Defineret aminosyre; X: Blanding af 19 aminosyrer
 Hver position kræver 19 synteser, dvs 114 ialt.
 Totalsyntese alle komponenter kræver 19^6 synteser.

Næste trin er at syntetisere de individuelle peptider, dvs. $2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2 = 64$ i alt og teste dem.

De bedste af de disse forbindelser er dernæst udgangspunkt (lead struktur) for optimering. Her vil man ved kemisk modifikation forsøge at gøre lead strukturerne mere stabile over for enzymatisk nedbrydning, samtidig med at den biologiske aktivitet bevares.

Referencer:

- Generelt om aminosyrer, peptider og proteiner: D. Moe og E.C. Munksgaard: Elementær biokemi (1991) Nyt Nordisk Forlag Arnold Busk.
- Navngivning og symbolisme for aminosyrer og peptider: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/AminoAcid/>
- Antibakterielle peptider: <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm>
- Avanceret: Richard A. Houghten, Clemencia Pinilla, Jon R. Appel, Sylvie E. Blondelle, Colette T. Dooley, Jutta Eichler, Adel Nefzi, and John M. Ostresh; *Mixture-Based Synthetic Combinatorial Libraries*, *Journal of Medicinal Chemistry*; **1999**; 42(19); 3743-3778.
- Zasloff, M. (2002). »Antimicrobial peptides of multicellular organisms«. *Nature* **415**, 389-395.

Figur 3. Princippet for positional scanning.

position. I figur 3 er fremgangsmåden illustreret. L-aminosyrer anvendes som byggeblokke, men andre non-proteinogene kan ligeledes anvendes.

Når subbibliotek A laves kobles den første aminosyre som en ækvimolær blanding af 19 aminosyrer X_6 (cystein anvendes ikke). Tilsvarende er kobling nummer 2-5 en ligelig (ækvimolær) blanding af 19 aminosyrer. Ved kobling nr. 6 (O_1) splittes resinen ud i 19 sprøjter, hvorefter L-alanin kobles i den første, L-asparaginsyre i den næste osv. Herved fås 19 synteser, der hver især indeholder $1 \times 19 \times 19 \times 19 \times 19 \times 19$ peptider.

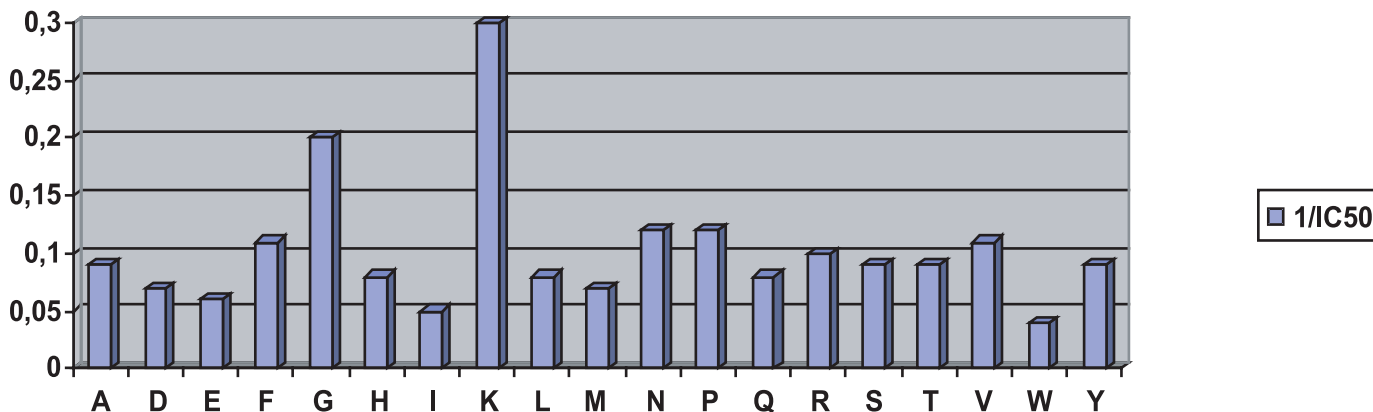
På samme måde laves subbibliotek B, C, D, E og F.

For at finde ud af, hvilken aminosyre der virker bedst i position O_1 , scannes subbibliotek A.

I figur 4 er vist en screening af subbibliotek A, hvor aminosyrerne glycin og lysin udviser størst aktivitet. På tilsvarende måde screenes subbibliotek B, C, D, E, F. For hver af subbibliotekerne findes de to bedste aminosyrer.

Baggrundsgruppen for »Kemi for tiden«: Lars Bank, Kemiingeniørgruppen, Poul Erik Hansen, Kemisk Forening, Jørn Kofod, H. Lundbeck A/S og Preben Albertsen Kemilærerforeningen.

Denne artikel er også tilgængelig på Kemilærerforeningens hjemmeside:
<http://www.ke.gymfag.dk>



Eksempel på biologisk scanning:

Bakteriolytisk aktivitet af subbibliotek A $O_1X_2X_3X_4X_5X_6$, overfor bakterien *E. coli*. O_1 er en af de 19 aminosyrer, mens X er en ækvimolær blanding af de 19 aminosyrer. Hver af søjlerne repræsenterer den reciproke IC_{50} værdi (koncentrationen ($\mu\text{g/ml}$) for hver af blandingerne defineret ved aminosyren på x-aksen. IC_{50} er den koncentration, hvor halvdelen af bakteriecellernes vækst er inhiberet. I nogle tilfælde måles MIC (Minimum Inhibitory Concentration). Figuren viser, at aminosyrerne G og K er de bedste i position O_1 . Endvidere undersøges den hæmolytiske aktivitet overfor erythrocyter (ikke vist).

Figur 4. Screening af subbibliotek A.