

Aciliranje peptidov in proteinov z derivati maščobnih kislin

Peptide and protein fatty acylation

Nina Kočevar, Samo Kreft

Povzetek: Povečanje lipofilnosti hidrofilnih peptidov in proteinov z metodami aciliranja predstavlja enega od osnovnih pristopov za izboljšanje prehoda bioloških membran in s tem povečanje biološke uporabnosti. V reakciji aciliranja z derivati maščobnih kislin na reaktivne aminokislinske skupine peptidov in proteinov kovalentno vežemo lipofilne verige derivatov maščobnih kislin. Članek podaja pregled kemijskih metod aciliranja, na kratko pa je predstavljen tudi pomen aciliranih peptidov in proteinov, tako z biološkega kot s farmakološkega vidika.

Ključne besede: aciliranje, peptidi, prepustnost membrane, proteini

Abstract: Fatty acylation represents one of the basic methods for increasing membrane permeability of hydrophilic peptides and proteins for the increase of their bioavailability. In the fatty acylation reaction, lipophilic chains of the fatty acid derivatives are covalently attached to reactive aminoacid residues of peptides and proteins. The article represents a review of chemical fatty acylation methods. Additionally, the importance of fatty acylated peptides and proteins is discussed in its biological as well as pharmacological aspect.

Key words: fatty acylation, membrane permeability, peptides, proteins

1 Uvod

Peptidi in proteini so biološke makromolekule, ki so bistvenega pomena za usklajeno potekanje biokemijskih procesov v človeškem organizmu. Sprememba v njihovi funkciji ali porušenje njihovega fiziološkega ravnovesja sta lahko vzroka za številne patološke procese in bolezni.

Po drugi strani so peptidi in proteini tudi skupina biološko aktivnih spojin, ki predstavljajo velik potencial kot zdravilne učinkovine. Njihova terapevtska uporaba je danes še močno omejena (vnašamo jih predvsem parenteralno) zaradi neobstoja pri različnih fizioloških pH-jih, hitre encimske razgradnje in kratkega razpolovnega časa, potencialne imunogenosti ter slabega prehajanja bioloških membran kot posledice hidrofilnosti (1).

Pomembnejši pristopi za izboljšanje prehajanja membran in s tem povečanje biološke uporabnosti temeljijo na:

- podaljšanju časa zadrževanja na mestu absorpcije z mukoadhezivnimi farmacevtskimi oblikami,
- povečanju prepustnosti s pospeševalci absorpcije, z iontoforezo ali vključevanjem peptidov in proteinov v liposome ali nanodelce in
- povečanju lipofilnosti s kemijskimi modifikacijami peptidov in proteinov (2).

Prva spoznanja o lipidno-proteinskih konjugatih segajo v leto 1951, ko sta raziskovalca Folch in Lees v možganskem tkivu odkrila do takrat neznane spojine in jih poimenovala proteolipidi (3). Znanstveno delo

na tem področju je dobilo v naslednjih desetletjih intenzivne razsežnosti, pri čemer je močno napredovalo tudi znanje o aciliranju peptidov in proteinov z maščobnimi kislinami. Gre za biokemijski proces, značilen za vse evkarionske celice, ki se odvija kot kotranslacijska ali posttranslacijska sprememba (4). Ker je maščobnokislinska veriga na peptid oziroma protein vezana preko amidne, estrske ali tioestrške vezi, poznamo tri vrste aciliranja – *N*-aciliranje, *O*-aciliranje, ki je najmanj pogosto, in *S*-aciliranje (5) (slika 1). Med reakcije *N*-aciliranja uvrščamo *N*-miristoiliranje, ki pomeni kovalentno vezavo 14 ogljikovih atomov dolge nasičene miristinske verige na *N*-končni glicin (6) ali ϵ -amino skupino lizina (7), ter *N*-palmitoiliranje, ki pomeni kovalentno vezavo 16 ogljikovih atomov dolge nasičene palmitinske verige na *N*-končni glicin (6) ali aminsko skupino *N*-končnega cisteina (8). *S*-aciliranje najpogosteje pomeni *S*-palmitoiliranje, zato v literaturi izraza navadno kar enačijo. Gre za reverzibilno (proces je dinamičen, saj *in vivo* poteka tudi encimsko deaciliranje) kovalentno povezavo med palmitinsko verigo in tiolno skupino cisteina (6). *O*-aciliranje srečamo le v redkih primerih, poteče pa na serinski skupini (9, 10).

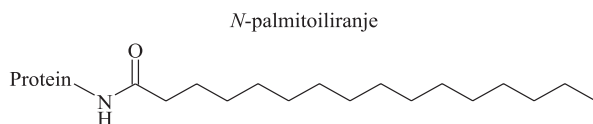
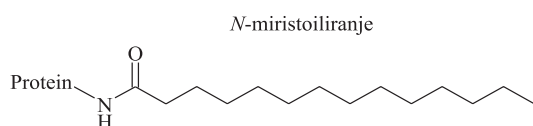
2 Aciliranje peptidov in proteinov

Eden izmed pristopov, ki jih uporabljamo za kemijsko modificiranje peptidov in proteinov, so metode aciliranja z reaktivnimi derivati maščobnih kislin. Gre za reakcije, s katerimi na reaktivne aminokislinske skupine peptidov in proteinov kovalentno priprimo

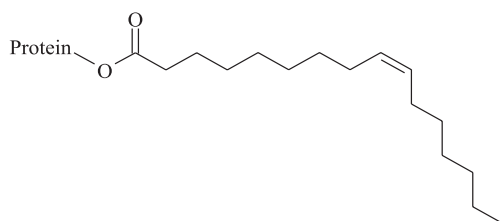
lipofilne verige derivatov maščobnih kislin. Tako modificirani peptidi in proteini imajo zaradi povečane lipofilnosti izrazito izboljšane transportne lastnosti, hkrati pa v veliki meri ohranijo svojo aktivnost (11-14). Kot so pokazale raziskave z acilirano ribonukleazo A, lahko zadostuje že ena sama palmitinska (11) oziroma stearinska (15) veriga, da izrazito povečamo prehod krvno-možganske pregrade.

Potencialna mesta aciliranja so s površine molekule peptida oziroma proteina izstopajoče reaktivne aminokislinske skupine – aminska, hidroksilna in tiolna. Po reakciji tako nastanejo amidna, estrska in tioestrška vez (slika 1), od katerih je prva najstabilnejša. V splošnem je zato najbolj zaželen potek reakcije v smeri selektivnega nastanka *N*-aciliranega produkta.

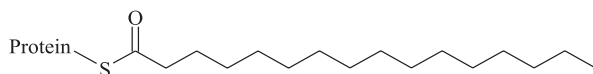
a) *N*-aciliranje



b) *O*-aciliranje



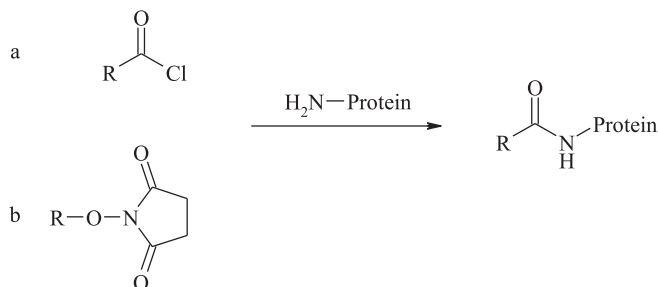
c) *S*-palmitoiliranje



Slika 1: Vrste aciliranja in vrste kemijskih vezi, ki nastanejo v reakciji: (a) *N*-aciliranje z miristinsko in s palmitinsko verigo in amidna vez, (b) *O*-aciliranje s palmitoleinsko (*cis*-9-heksadecenojsko) verigo in estrska vez ter (c) *S*-palmitoiliranje s palmitinsko verigo in tioestrška vez.

Figure 1: Types of fatty acylation and types of chemical bonds formed in the reaction: (a) *N*-acylation with myristic and palmitic chain and amide bond, (b) *O*-acylation with palmitoleic (*cis*-9-hexadecenoic acid) and ester bond, and (c) *S*-palmitoylation with palmitic chain and thioester bond.

Derivati maščobnih kislin, s katerimi najpogosteje izvajamo reakcije aciliranja, so lipofilni kislinski kloridi in hidrofilnejši *N*-hidroksisukcinimidni estri maščobnih kislin (slika 2). Maščobne kisline naj bi imele od 8 do 18 ogljikovih atomov dolge verige (oktanojska, dekanajojska, lavrinska, miristinska, palmitinska in stearinska kislina), pri čemer v splošnem velja, da imajo boljše transportne lastnosti proteini, modificirani z daljšimi maščobnimi verigami.



Slika 2: Shematski prikaz reakcije aciliranja s kislinskim kloridom (a) in z *N*-hidroksisukcinimidnim estrom maščobne kisline (b), ki poteče na amski skupini proteina.

Figure 2: Schematic representation of fatty acylation reaction using fatty acyl chloride (a) and *N*-hydroxysuccinimide ester of a fatty acid (b), which utilizes the protein's amino group.

Prva posebnost reakcij aciliranja izvira iz fizikalne narave peptidov oziroma proteinov ter reagentov za aciliranje. Te spojine namreč v istem mediju – vodnem, ki raztaplja peptid oziroma protein, ter organskem, ki raztaplja reagent za aciliranje – niso topne. V reakcijski zmesi moramo zato zagotoviti še prisotnost tretjega dejavnika, kot je na primer površinsko aktivna snov. Tej težavi se lahko izognemo z uporabo vodotopnih derivatov *N*-hidroksisukcinimidnih estrov maščobnih kislin, vendar pa moramo le-te pripraviti sami, saj komercialno niso dostopni, poleg tega pa je njihova uporaba vezana na specifične lastnosti peptida oziroma proteina, kot je na primer prisotnost tiolne skupine (12). Drugo pomembno omejitev predstavlja dejstvo, da peptidov in proteinov ne smemo neposredno izpostavljati večini organskih topil, saj lahko zaradi denaturiranja izgubijo svojo biološko aktivnost (2).

V splošnem sta se tako izoblikovala dva načina izvedbe reakcij aciliranja z derivati maščobnih kislin: aciliranje v organskem in aciliranje v vodnem mediju.

2.1 Aciliranje v organskem mediju

Prvo metodo so razvili za *O*- in *S*-palmitoiliranje peptidov (4). Temelji na relativno preprosti reakcijski shemi, po kateri reagent za aciliranje (kislinski klorid) dodamo neposredno organskemu topilu (trifluoroocetni kislini), v katerem je raztopljen peptid. Zaradi kislega medija ne pride do reakcije na amskih skupinah, ki so popolnoma protonirane; taka reakcija lahko poteče šele po nekaj urah do dnevih. Metoda je primerna za aciliranje manjših hidrofobnih peptidov.

Drugi pristop je zasnovan na reakciji, ki poteka v kompleksnejšem reverzno micelnem sistemu. V organskem topilu (na primer 2,2,4-trimetilpentanu) s pomočjo površinsko aktivne snovi (Aerosol OT) dispergiramo bazično raztopino peptida oziroma proteina (16). Pri

tem nastanejo reverzni miceli, v katerih vodno notranjost so vgrajeni peptidi oziroma proteini. Reagent za aciliranje (kislinski klorid), ki ga nato dodamo zunanji organski fazi, kontrolirano prehaja monosloj površinsko aktivne snovi in vstopa v reakcijo z aminskimi skupinami na peptidu oziroma proteinu. Metoda je še posebej uporabna, kadar želimo preprečiti agregacijo posameznih molekul peptida oziroma proteina, do katere lahko v večjem obsegu pride v vodnih raztopinah, in pa kadar v procesu aciliranja nastanejo močno lipofilni produkti.

2.2 Aciliranje v vodnem mediju

Te metode so z vidika neobstoynosti hidrofilnih peptidov in proteinov v relativno agresivnih organskih topilih za izvajanje aciliranja najprimernejše.

Prvi pristop predstavlja aciliranje z *N*-hidroksisukcinimidnimi estri maščobnih kislin. Reakcija obsega dve stopnji – v prvi pripravimo *N*-hidroksisukcinimidni ester, v drugi pa izvedemo reakcijo s peptidom ali proteinom. Tako najprej reagirata maščobna kislina (na primer palmitinska kislina) in *N*-hidroksisukcinimid, pri čemer moramo uporabiti tudi aktivator dicikloheksilkarbodiimid (slika 3). Nastali aktivni ester (*N*-hidroksisukcinimidni ester palmitinske kisline) nato dodamo pufrni raztopini peptida ali proteina (17).

Razvili so tudi nekaj zanimivih modifikacij te metode, od katerih uspešno uporabljajo aciliranje s popolnoma vodotopnim derivatom palmitinske kisline. Pri tej reakciji pride do nastanka reverzibilne disulfidne vezi med tiolno skupino na proteinu in reagentom za aciliranje (palmitoilnim derivatom *L*-cisteinil-2-piridilidisulfida) (12).

Druga metoda vključuje pripravo micelarne disperzije reagenta za aciliranje. V prvi stopnji bazični pufrni raztopini površinsko aktivne snovi (na primer natrijevega holata) dodamo lipofilni reagent za aciliranje (kislinski klorid). Po sonificiranju nastane micelarna disperzija reagenta za aciliranje, ki jo dodamo raztopini peptida oziroma proteina (18). Reagent za aciliranje je torej ujet v micelih homogeno porazdeljene notranje faze in enakomerno prehaja do peptida oziroma proteina.

Preprosto modifikacijo te metode predstavlja aciliranje z *in situ* pripravljeno disperzijo palmitoilklorida v vodni raztopini acetonitrila

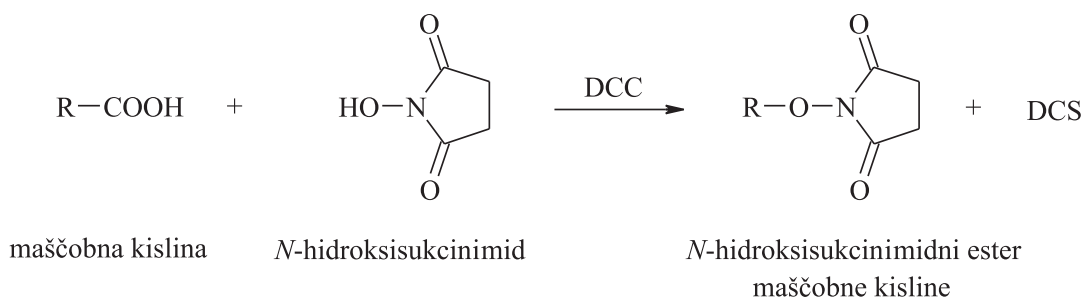
(19). Reakcijo izvedemo tako, da kislinski klorid raztopimo v 100-odstotnem acetonitrilu in ga dodamo bazični pufrni raztopini proteina, pri čemer vsebuje končna reakcijska zmes do 30 odstotkov acetonitrila v vodi. Pri tej koncentraciji acetonitrila večina proteinov še ne denaturira. Palmitoilklorid je v taki raztopini ravno dovolj topen za uspešen potek reakcije, preostanek, ki se obori, pa na koncu odstranimo s centrifugiranjem (19).

Kemijske reakcije aciliranja so v splošnem slabo selektivne, saj lahko reagent za aciliranje reagira z različnimi reaktivnimi aminokislinskimi skupinami hkrati (z amsko, s hidroksilno in tiolno), poleg tega pa lahko dobimo tudi zmes monoaciliranih, diaciliranih, triaciliranih molekul itd. Ker ima želeni biološki učinek pogosto le ena vrsta molekul, je izjemnega pomena, da razvijemo dobre analzne metode za karakterizacijo nastalih heterogenih produktov, kot sta na primer tekočinska kromatografija in masna spektroskopija.

3 Pomen aciliranja

Aciliranje proteinov z maščobnimi kislinami izrazito poveča njihove lipofilne lastnosti ter posledično spremeni tudi njihovo fiziološko vlogo. Acilirani proteini opravljajo v organizmu številne in zelo raznolike naloge. Izmed najbolj raziskanih lahko izpostavimo vezavo oziroma interakcije s celičnimi membranami, razmeščanje do celičnih organelov in drugih struktur znotraj celice, signaliziranje ter vpliv na interakcije z drugimi proteini (20, 21).

Z vidika terapevtske uporabe moramo kot prvo pomembno značilnost aciliranih peptidov in proteinov izpostaviti izboljšanje prehodnosti bioloških membran zaradi povečane lipofilnosti (11, 12, 17, 19, 22). V raziskavah so dobro proučili tudi vplive na farmakokinetične lastnosti. Dokazali so, da lahko z aciliranjem podaljšamo razpolovni čas hemoglobina (23) in insulina (24), saj pride do povečane vezave na albumin. Čeprav z aciliranjem povzročimo strukturne spremembe peptidnih in proteinskih molekul, pa s tem ne povečamo njihove imunogenosti. Celo nasprotno – dokazali so, da lahko z aciliranjem imunogenost znižamo in tako značilno zmanjšamo nastanek protiteles (25). To je pravzaprav razumljivo, saj so maščobne kisline v organizmu normalno prisotne in jih imunski sistem ne prepozna kot



Slika 3: Shematski prikaz priprave *N*-hidroksisukcinimidnega estra maščobne kisline. V reakciji po aktivaciji z dicikloheksilkarbodiimidom (DCC) reagirata maščobna kislina in *N*-hidroksisukcinimid. Nastaneta *N*-hidroksisukcinimidni ester maščobne kisline in dicikloheksilurea (DCS), ki jo odfiltriramo.

Figure 3: Schematic representation of preparation of *N*-hydroxysuccinimide ester of a fatty acid. In the reaction, a fatty acid and *N*-hydroxysuccinimide react after activation with dicyclohexylcarbodiimide (DCC). *N*-hydroxysuccinimide ester of the fatty acid and dicyclohexylurea (DCS), which is filtered out, are formed.

tujke.

Najbolj znan acilirani protein, ki ga uporabljamo v terapevtske namene, je inzulin detemir. Na njegovo lizinsko skupino je vezana 14 ogljikovih atomov dolga veriga miristinske kisline. Posledica te spremembe je združevanje molekul v heksamerne in diheksamerne strukture na mestu injiciranja (podkožno), kar upočasni absorpcijo v krvni obtok, poleg tega pa pride tudi do značilno povečane vezave na albumin (tako tkivni kot plazemski). Omenjeni učinki se odražajo v podaljšanem in bolj enakomernem plazemskem profilu (26).

4 Sklep

Aciliranje peptidov in proteinov z derivati maščobnih kislin je obetavna kemijska metoda, s katero lahko močno izboljšamo njihove farmakološke lastnosti. Čeprav je ta pristop relativno enostaven s sinteznega vidika, pa ne moremo mimo dejstva, da so reakcije v splošnem slabo selektivne in zato vodijo do nastanka heterogenih produktov. To nakazuje pomen natančne karakterizacije oziroma uporabe kompleksnih analiznih metod, ki so zelo zahtevne. Vendar pa omenjena problematika predstavlja drugo plat zgodbe, ki presega okvire tega članka.

5 Literatura

1. Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 298–306.
2. Šegula M, Vrečer F. Nove farmacevtske oblike za peroralno dostavo peptidov in proteinov. *Farm Vestn* 2003; 54: 25–35.
3. Folch J, Lees M. Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. *J Biol Chem* 1951; 191: 807–817.
4. Yousefi-Salakdeh E, Johansson J, Strömberg R. A method for S- and O- palmitoylation of peptides: synthesis of pulmonary surfactant protein-C models. *Biochem J* 1999; 343: 557–562.
5. Sachon E, Nielsen PF, Jensen ON. Characterization of N-palmitoylated human growth hormone by in situ liquid-liquid extraction and MALDI tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2007; 42: 724–734.
6. Linder ME, Deschenes RJ. New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. *Biochemistry* 2003; 42: 4311–4320.
7. Stevenson FT, Bursten SL, Locksley RM, Lovett DH. Myristyl acylation of the tumor necrosis factor alpha precursor on specific lysine residues. *J Exp Med* 1992; 176: 1053–1062.
8. Pepinsky RB, Zeng C, Wen D et al. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* 1998; 273: 14037–14045.
9. Kojima M, Hosoda H, Date Y et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656–660.
10. Takada R, Satomi Y, Kurata T et al. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell* 2006; 11: 791–801.
11. Chopineau J, Robert S, Fénart L et al. Monoacylation of ribonuclease A enables its transport across an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Control Release* 1998; 56: 231–237.
12. Ekrami HM, Kennedy AR, Shen W-C. Water-soluble fatty acid derivatives as acylating agents for reversible lipidization of polypeptides. *FEBS Lett* 1995; 371: 283–286.
13. Kabanov AV, Levashov AV, Alakhov VY et al. Fatty acylation of proteins for translocation across cell membranes. *Biomed Sci* 1990; 1: 33–36.
14. Martins MBF, Jorge JCS, Cruz MEM. Acylation of L-asparaginase with total retention of enzymatic activity. *Biochimie* 1990; 72: 671–675.
15. Chopineau J, Robert S, Fénart L et al. Physicochemical characterization and in vitro interaction with brain capillary endothelial cells of artificially monoacylated ribonucleases A. *Lett Pept Sci* 1997; 4:313–321.
16. Robert S, Domurado D, Thomas D et al. Fatty acid acylation of RNase A using reversed micelles as microreactors. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 447–454.
17. Foldvari M, Attah-Poku S, Hu J et al. Palmitoyl derivatives of interferon alpha: potential for cutaneous delivery. *J Pharm Sci* 1998; 87:1203–1208.
18. Martins MBF, Jorge JCS, Cruz MEM. Acylation of L-asparaginase with total retention of enzymatic activity. *Biochimie* 1990;72: 671–675.
19. Kocevar N, Obermajer N, Strukelj B et al. Improved acylation method enables efficient delivery of functional palmitoylated cystatin into epithelial cells. *Chem Biol Drug Des* 2007; 69: 124–131.
20. Resh MD. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 584–590.
21. Nadolski MJ, Linder ME. Protein lipidation. *FEBS J* 2007; 274: 5202–5210.
22. Slepnev VI, Phalente L, Labrousse H et al. Fatty acid acylated peroxidase as a model for the study of interactions of hydrophobically-modified proteins with mammalian cells. *Bioconjug Chem* 1995; 6: 608–615.
23. Fowler SA, Andracki M, Hurst G et al. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994; 22: 27–42.
24. Kurtzhals P, Havelund S, Jonassen I et al. Effect of fatty acids and selected drugs on the albumin binding of a long-acting, acylated insulin analogue. *J Pharm Sci* 1997; 86: 1365–1368.
25. Shi Q, Domurado M, Domurado D. Effect of protein chemical hydrophobization on antiglucose oxidase immunoglobulin production in mouse. *Pharmacol Toxicol* 1995; 76: 278–285.
26. Havelund S, Plum A, Ribet U et al. The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin. *Pharm Res* 2004; 21: 1498–1504.