

Orientações para o design de seu peptídeo

A composição da sequência de aminoácidos e o comprimento do peptídeo irão determinar se a sua síntese é possível, além de determinar aspectos como a solubilidade do peptídeo. O conteúdo a seguir traz alguns pontos que devem ser considerados ao realizar a construção do seu peptídeo.

Visão Geral

1. Sequência peptídica

Os peptídeos podem ser construídos *de novo*, porém a maioria dos peptídeos de interesse biológico é geralmente derivada das porções C-terminal, N-terminal ou de porções internas de uma proteína nativa. Há diversas razões pelas quais sequências nativas algumas vezes precisam ser alteradas para serem sintetizadas como, por exemplo, para modificar a solubilidade, estabilidade, para produção de antissoro e conjugação com ligantes (cromóforos, etc).

Uma estratégia comum para a produção de novos peptídeos a partir de peptídeos nativos é alterar resíduos de aminoácidos que não são essenciais para o peptídeo em questão. Sequências peptídicas, mesmo que pequenas, possuem resíduos de aminoácidos essenciais e outros não tão importantes, os quais podem ser alterados. Porém, apesar de comum e aparentemente simples, determinar quais aminoácidos não são essenciais nem sempre é uma tarefa fácil.

Além desta, algumas outras estratégias para produção de um peptídeo são comuns, como a proteção de uma ou ambas as extremidades para peptídeos derivados de sequências internas, a fim de evitar a introdução de uma carga onde não haveria nenhuma na sequência nativa, além da introdução de um espaçador quando há a intenção de conjugação do peptídeo com ligantes, a fim de minimizar a influência do ligante na dobra do peptídeo.

2. Comprimento da sequência

A pureza de um peptídeo bruto geralmente diminui à medida que o comprimento aumenta.

- < 5 resíduos: podem apresentar problemas durante os processos de clivagem e purificação. É recomendado que essas sequências não possuam resíduos hidrofóbicos mas apresentem alguma modificação que contribua para a natureza hidrofóbica como Flc, Dansyl, Dabsyl, Btn, Lissamina, etc.
- Até 15 ou 30 resíduos: geralmente possuem uma produção simples e com rendimento satisfatório.
- > 30 resíduos: podem ter o acoplamento comprometido, o que gera um maior número de sequências deletérias e resulta na diminuição da pureza do peptídeo bruto, tornando mais custosa sua purificação.

3. Solubilidade

A solubilidade de um peptídeo é fortemente influenciada pela composição de aminoácidos em sua sequência. Peptídeos com alto teor de resíduos hidrofóbicos, como Leu, Val, Ile, Met, Phe e Trp, terão solubilidade limitada em solução aquosa ou serão completamente insolúveis. Nestas condições, será difícil utilizar o peptídeo em experimentos e pode ser difícil purificá-lo, se necessário.

Recomendações:

- Manter o conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos abaixo de 50%
- Garantir que haja pelo menos um resíduo carregado (Asp, Glu, Lys e Arg) para cada cinco aminoácidos ácidos.
- Uma única substituição conservadora, como substituir Ala por Gly ou adicionar um conjunto de resíduos polares nas extremidades N ou C, pode também melhorar a solubilidade.

4. Aminoácidos difíceis

Peptídeos contendo muito resíduos de Cys, Met ou Trp também são difíceis de obter em pureza elevada, em parte por serem susceptíveis à oxidação e/ou reações laterais. Uma alternativa é a substituição conservadora para alguns destes resíduos. Por exemplo:

- Norleucina pode ser utilizada como substituto para Met
- Serina pode ser utilizado algumas vezes como substituto menos reativo para Cys

5. Estrutura secundária

A formação de folhas- β também é um ponto a ser considerado ao fazer o design de seu peptídeo. Durante a síntese, a formação de folhas- β interfere na solvatação do peptídeo em crescimento, resultando em um alto grau de sequências deletérias no produto final. Este problema pode ser evitado ao optar por sequências que não contenham resíduos múltiplos ou adjacentes de Val, Ile, Tyr, Phe, Trp, Leu, Gln e Thr. Se isso não for possível, uma alternativa é gerar uma quebra por meio da inserção de um Gly ou Pro a cada três resíduos, substituindo Gln por Asn ou substituindo Thr por Ser.

Analizando sua sequência

Resíduos com carga positiva	K, R, H, N-terminal
Resíduos com carga negativa	D, E, C-terminal
Resíduos hidrofóbicos sem carga	F, I, L, M, V, W e Y
Resíduos sem carga	G, A, S, T, C, N, P, Q, acetil, amida

1. N-terminal

Caso a extremidade N-terminal possua:

- Glutamina (Q): a glutamina cicliza para piroglutamato quando exposta às condições ácidas da clivagem. Recomendações: sintetizar com piroglutamato ao invés de Q, remover Q, substituir Q por outro aminoácido ou acetilar a extremidade N-terminal. Todas as recomendações resultam em um peptídeo com maior qualidade.
- Asparagina (N): a asparagina possui um grupo protetor que pode ser de difícil remoção. Recomendações: remover ou substitui N por outro aminoácido.

2. C-terminal

Caso a extremidade C-terminal possua:

- Aminoácido não padrão, incluindo D-aminoácidos: o peptídeo deve ser amidado.
- Modificação (fluoresceína, biotina, etc.): a modificação deve ser anexada através da cadeia lateral de uma lisina e o peptídeo também deve ser amidado.

3. Sequência:

Além do comprimento, a composição de aminoácidos em uma sequência também é determinante em sua produção e pureza.

- Prolinas (P) múltiplas: podem sofrer isomerização cis/trans, resultando em um produto com menor pureza;
- Serinas (S) adjacentes: frequentemente resultam em produtos com baixa pureza e/ou com muitas deleções;
- Muito ácido aspártico (D): frequentemente resultam na formação de adutos de aspartimida, gerando um produto de menor pureza;
- Múltiplas modificações: geralmente resultam em um produto com baixo rendimento e/ou pureza;
- Múltiplas glicinas (G) consecutivas (4 ou mais): tendem a sofrer ligação de hidrogênio (formação de gel) no esqueleto peptídico, o que pode dificultar na purificação e dissolução do peptídeo.
- Fosfo-aminoácidos: a eficiência do acoplamento é bastante comprometida após um fosfo-aminoácido (formados pela fosforilação da hidroxila da serina e treonina ou do grupo fenólico da tirosina). Assim, sequências contendo fosfo-aminoácidos devem conter não mais que 10 acoplamentos após este aminoácido.