

Tesis Doctoral

**UNA NUEVA ESTRATEGIA DE QUÍMICA  
COMBINATORIA PARA EL DISEÑO Y  
MODIFICACIÓN DE DOMINIOS PROTEICOS**

Jose Javier Pastor Porras



Departament de Química Orgànica (2004)



Memoria presentada por

Jose Javier Pastor Porras

para optar al grado de Doctor en Química por la Universidad de Barcelona

Revisada por:

Dr. Francesc Rabanal

Dr. Ernest Giralt

Programa de Doctorado: Química Orgànica (Bienio 1998-2000)

Departament de Química Orgànica

Facultat de Química

Universitat de Barcelona

Barcelona, Marzo 2004



Si os tengo que ser sinceros, por un momento he estado tentado de no escribir agradecimientos. La verdad, sois tantos los que me habéis ayudado en este tiempo, de una u otra forma, que resulta difícil no dejarse a nadie y que todos tengáis el espacio que os merecéis en un apartado que se supone sólo debería tener unas líneas. Sin embargo, eso no sería justo, más cuando estás son las únicas páginas que estoy seguro que todos leeréis. Creo que siempre he intentado daros las gracias cuando me habéis ayudado al momento y ser tan sincero con vosotros como vosotros lo habéis sido conmigo. Por tanto, esto es sólo un pequeño recordatorio de nombres y situaciones, un pequeño pedazo de un gran pastel.

Para empezar, me gustaría dar las gracias a Ernest Giralt y Francesc Rabanal por la oportunidad que me brindaron de hacer la tesis en este grupo. Con ello he cumplido uno de los grandes sueños de mi vida, que se dice pronto, pero no sólo he eso, he trabajado bajo la tutela de dos grandes personas que me han aconsejado y apoyado en todo momento, tanto a nivel profesional como personal. También me gustaría dar las gracias a Ernesto Nicolás, que siempre ha tenido cinco minutos y más para mí, a Fernando Albericio por los consejos, la confianza, la alegría y las bromas (espero que no decaiga nunca, porque es una fuente de la que muchos bebemos) y a Ana Grandas, una persona sincera y siempre dispuesta a escuchar y ayudar, y no me refiero en ciencia precisamente. Finalmente, quiero dar las gracias a Miriam Royo, por todo. No sé cuantas veces le he pedido ayuda de todo tipo y siempre a estado ahí, sin dudar. Creo que he conocido a muy pocas personas de su talla. Ha sido un verdadero placer haberla conocido.

Si dejamos a parte el tema de los jefes, la cosa se complica. Cuando yo empecé, allá por la prehistoria, estábamos todos en la facultad en el llamado grupo 10, que más que grupo era legión, pues éramos unos cuantos. Ahora, aquí en el parque, es mucha la gente que ha llegado nueva, algunos permanecen y muchos se han ido, con lo que hacer grupos de personas es difícil, pero haré lo que pueda.

Cuando esta odisea empezó, yo me encontraba en el Lab. 5, también conocido como Fraggie Rock: un lugar lejano perdido en la inmensidad de la facultad. Dentro de aquel cubículo tuve la suerte de conocer a Lia, un pedazo de pan, y Cris Chiva, mi veterana favorita, de la que aprendí mucho más de lo que yo mismo sé. Muchas gracias a las dos por todo, sobretodo a ti Cris por todos tus consejos. Además de ellas, también compartí mesa y vitrina con Lorena, ahora perdida en Madrid y de la que guardo un maravilloso recuerdo. Finalmente, cuando ya llevábamos un tiempo allí, aparecieron dos personas encantadoras que ni quiero ni puedo olvidar, la pequeña Carol, dulzura y genio a la vez, y Dolors, mi eterna compañera de poyata y amiga.

A partir de aquí, las cosas se confunden. De los que no están y con los que viví muy buenos momentos me gustaría recordar y dar las gracias a Cristina Carreño y Mari Luz, las jefas del Servicio de Síntesis por aquél entonces, a Alberto Adeva, el actual jefe del servicio y una persona maravillosa y, como no, a Mele, mi profesora favorita y la bondad en persona. Por aquí se te echa mucho de menos. Por supuesto, también estaban Montse del Fresno, Eva, Oscar Millet, Mac, Àngel (¿cómo era lo de los agujeros y la guerra?) y Javi, alguien simplemente admirable. Espero que te haya ido bien por Francia y verte pronto por aquí, porque se me hace raro llegar a un laboratorio y que tú no estés.

Por fin pasamos al parque, el sitio que me permitió compartir tiempo con mucha gente a la que después de años conocía muy poco y darme cuenta de su verdadera valía. Si empezamos por la Isla 1, quiero dar las gracias a Tere (nuestra Bio particular), a Marc Martinell (como te dije, al final has leído tú primero; muchas gracias por tus consejos y ayuda en esta etapa final de tesis y por toda la ayuda de antes), a Silvia, mi fumadora favorita (calma, todo llegará, te lo aseguró) y a Txell, de la que poco puedo decir que no se haya dicho ya (ha sido un placer trabajar contigo y tocar para ti en tu despedida de soltera). Si saltamos a la Isla 2, dejando de banda a Dolors, que sigue siendo mi compañera de poyata, quiero dar las gracias a Jimena, nuestra jefa, por todo el esfuerzo que ha dedicado a que todo funcione como tiene que ser en una jungla de 300 m<sup>2</sup>. En las Islas 3 y 4 encontramos a Susana (la mujer de hielo, y que conste que lo dijiste tú), a Giovanna (cuando necesites algo, no dudes en llamar), a Martina (mi mejicanita linda, por favor no cambies nunca), a Pierre (merci beaucoup), a Jan (danke) a Javi (el pirata de Navarra), a Tommasso (gracie) y, como no, a Jesús, mi gallego favorito y sex-symbol particular (como me ponen esos pantalones de chándal...). Por último, como habitantes del pasillo que no es un pasillo están Natxo, Pili, Marcelo y Ricard, al que le tengo que dar las gracias no sólo por su ayuda científica, sino por ser un gran punto de apoyo personal en los momentos en los que lo he necesitado (eso va también por vosotras, Txell y Silvia). No quiero dejarme a tres personas que ya no están aquí pero que han hecho mi paso por aquí inolvidable: el Dr. K, alguien increíble y compañero de cigarros (espero que te vaya bien por Boston con Judit, de la que también me acuerdo un montón...) y a Xavier Salvatella y Laia Crespo, dos personas maravillosas destinadas a acabar juntas. Os deseo lo mejor a los dos. Sinceramente, muchas gracias a todos, de verdad.

Dentro del parque, como siempre, nos hemos ido expandiendo, y ahora ya tenemos el laboratorio Pharmamar, con Natália, Núria Bayo (aquí tienes el espacio especial que te prometí), Fayna (¿Madrid o Canarias?), Luis Javier y Carol y el Lab100, con Gloria (un auténtico huracán de júbilo, alegría y bondad), Marta Marfil (menos mal que saliste de tu etapa de reclusión e-mailera), Josep Farreras (¿dónde compras los pantalones?) y Pablo. Además está UQSex, con Marc V. (la rubia del laboratorio y un personaje increíble), Rubén (sinceridad, alegría y bondad a destajo), Sonia (es un placer tener amigas como tú), Yraola's (¿se escribe así?) y Mónica, la alegría de la huerta. Gracias a todos por los buenos ratos que me habéis hecho pasar y por toda vuestra ayuda. Nunca olvidaré el recibimiento con alfombra de trapicel...

En la facultad nos dejamos una parte del personal, al que también quiero recordar y dar las gracias: Mireria (ya queda poco, no desesperes), Esther (ayer allí y ahora aquí en el Parque) y, sobre todo, Óscar, mi Farma-compañero. Gracias a ti en especial por todos los buenos ratos poliméricos y por ayudarme a acabar la tesis. Como ya te dije, sin ti esto hubiese tardado bastante más.

Bueno, como me gusta decir, resulta que hay vida más allá del doctorado, una vida que vale la pena vivir y que también me ha ayudado a llegar hasta aquí. Para empezar, quiero recordar a mis compañeros de grupo y amigos, Dani y Sergio, por todos estos años de proyecto común y buenos ratos (por cierto, si alguien no tiene nuestra maqueta es el momento de pedírmela), como también a Carlos y Cristina, por soportar parte del peso de la tesis conmigo (y de la lavadora, la nevera...; con

gente como vosotros da gusto). Me gustaría también dar las gracias a los amigos de la facultad (Merce, Agustín, la pequeña Laia y Óscar) y a toda la gente de Molins que ha estado siempre a mi lado: verdaderos amigos con los que siempre puedo contar, aunque haga mucho que no les vea, con una simple llamada de teléfono (Juanan, Marina y Jose, mi poli favorito).

Por último, me gustaría dar las gracias a mis padres, que siempre me han apoyado en todo y han estado a mi lado en todo momento (os quiero mucho, gracias por creer en mí) y a mis hermanos (Mari, Manu y Txiki) y cuñados/cuñadas/sobrinos/sobrinas, la mejor familia del mundo de la que estoy orgulloso de formar parte.

Además de a todos ellos, queda una persona a la que dar las gracias, la persona más maravillosa y especial del mundo (los que la conocéis sabéis que no miento), mi alma y mi voz. Muchas gracias sobretodo a ti Patricia, muchas gracias por todo. Sabes que sin ti no habría llegado tan lejos. Eres todo lo que siempre había soñado y más. Hace ocho años que soy la persona más feliz del mundo y espero que quieras que sigamos siéndolo cien años más. A ti, en especial, te dedico éste mi trabajo.

PD. Como respuesta a la gran pregunta de ¿y ahora qué?, que muchos me habéis hecho, tomaré prestada la primera estrofa de una canción de Los Suaves que lo resume todo muy bien:

*Por una vez en la vida  
esta noche voy a pensar sólo en mí.  
Intentaré ser feliz  
y que digan lo que digan.  
Y si pierdo es cosa mía,  
no voy a dar ninguna explicación.  
Y con razón o sin razón,  
pensaré con alegría.*

Muchas gracias a todos.

Jose J. Pastor



Para ti Patricia,  
que haces que la vida  
merezca la pena



## **Abreviaturas**



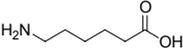
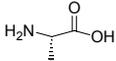
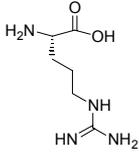
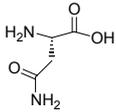
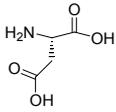
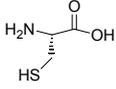
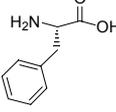
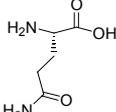
## 1. Abreviaturas

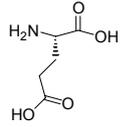
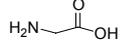
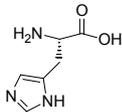
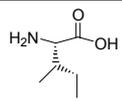
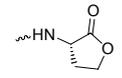
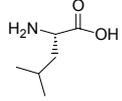
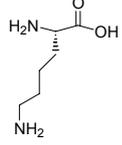
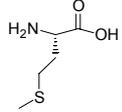
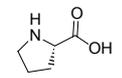
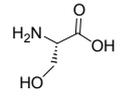
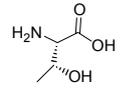
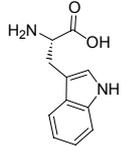
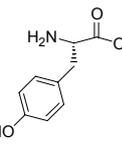
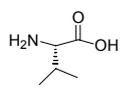
AA	Aminoácido
AAA	Análisis de aminoácidos
AcOEt	Acetato de etilo
Ac <sub>2</sub> O	Anhídrido acético
d <sub>6</sub> -Ac <sub>2</sub> O	Anhídrido acético deuterado
AcOH	Ácido acético
CCf	Cromatografía de capa fina
CHCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico
CMA	Cloroformo/metanol/ácido acético
DC	Dicroísmo circular
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIEA	Diisopropiletilamina
DIPCDI	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DMAP	<i>N,N</i> -dimetil-4-aminopiridina
DMF	Dimetilformamida
Et <sub>2</sub> O	Éter dietílico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
H <sub>I-II</sub>	Hélices I-II naturales del dominio B
H3 <sub>a</sub>	Hélice III del dominio B con secuencia aleatoria (Hélice III control negativo)
H3 <sub>n</sub>	Hélice III natural del dominio B
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HMFS	Ácido <i>N</i> -[(9-hidroximetil)-2-fluorenil]succinámico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de espectrometría de masas
IgG	Inmunoglobulina G
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en modo tándem
<i>p</i> -MBHA	<i>p</i> -metilbenzohidrilamina
Nbb	Ácido 4-hidroximetil-3-nitrobenzoico
P1	Positivo 1 de la quimioteca L300
P2	Positivo 2 de la quimioteca L300
PyBOP	Hexafluorofosfato de 1 <i>H</i> -benzotriazol-1-iloxtiris(pirrolidino)fosfonio
TBAF · 3H <sub>2</sub> O	Fluoruro de tetrabutilamonio trihidratado

TBME	<i>Tert</i> -butilmetil éter
TBTU	Tetrafluoroborato de <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)-tetrametiluronio
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TIPS	Triisopropilsilano

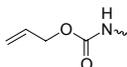
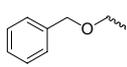
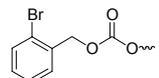
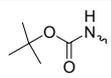
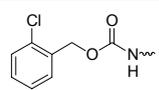
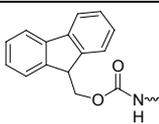
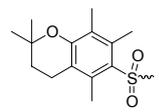
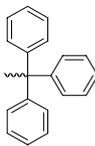
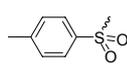
## 2. Aminoácidos y Protectores

### 2.1. Aminoácidos

Estructura	Nombre	Código 3/4 letras	Código 1 letra
	Ácido 6-aminohexanoico	Ahx	
	L-alanina	Ala	A
	L-arginina	Arg	R
	L-asparagina	Asn	N
	L-ácido aspártico	Asp	D
	L-cisteína	Cys	C
	L-fenilalanina	Phe	F
	L-glutamina	Gln	Q

	L-ácido glutámico	Glu	E
	Glicina	Gly	G
	L-histidina	His	H
	L-isoleucina	Ile	I
	Lactona de homoserina	Hmsl	
	L-leucina	Leu	L
	L-lisina	Lys	K
	L-metionina	Met	M
	L-prolina	Pro	P
	L-serina	Ser	S
	L-treonina	Thr	T
	L-triptófano	Trp	W
	L-tirosina	Tyr	Y
	L-valina	Val	V

2.2. Protectores

Estructura	Nombre	Abreviatura
	Aliloxicarbonil	Alloc
	Bencil	Bn
	$\pi$ -benciloximetil	Bom
	2-bromobenciloxicarbonil	BrZ
	<i>Tert</i> -butoxicarbonil	Boc
	<i>Tert</i> -butil	tBu
	Ciclohexil	cHex
	2-clorobenciloxicarbonil	ClZ
	9-fluorenilmetoxicarbonil	Fmoc
	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonil	Pmc
	Tritilo	Trt
	Tosilo	Tos

**Índice**



<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
1. Diseño <i>de novo</i> de proteínas .....	4
1.1 Proteínas <i>de novo</i> helicoidales .....	6
1.2 Proteínas <i>de novo</i> incluyendo láminas- $\beta$ .....	8
1.3 Proteínas <i>de novo</i> funcionales .....	9
1.4 Limitaciones del diseño <i>de novo</i> de proteínas .....	11
2. Química combinatoria .....	13
2.1 Metodologías químicas .....	13
2.1.1 Síntesis empleando varillas de polietileno (sistema <i>Multipin</i> ).....	13
2.1.2 Síntesis de quimiotecas sobre papel de celulosa.....	14
2.1.3 Síntesis empleando “bolsas de té” ( <i>tea bags</i> ) .....	15
2.1.4 Acoplamiento de mezclas de aminoácidos .....	15
2.1.5 Mezcla y separación ( <i>split and mix</i> ) .....	16
2.2 Metodologías biológicas .....	17
2.3 Química combinatoria y nuevas proteínas .....	18
2.4 Aplicación de metodologías combinatorias .....	20
3. Objetivos.....	23
4. Bibliografía.....	24

## **Capítulo 1: Diseño de la metodología combinatoria**..... **31**

1. El dominio B de la proteína A como modelo de trabajo .....	33
1.1 El dominio B de la proteína A.....	33
1.2 Precentes del trabajo con el dominio B .....	37
1.3 Diseño de la estrategia combinatorial general.....	37
2. Estrategia para la síntesis de las quimiotecas .....	39
2.1 Resina PEGA: un soporte compatible con medios acuosos.....	42
2.2 El espaciador bifuncional HMFS.....	43
2.3 El espaciador bifuncional Nbb.....	44
3. Ensayo de actividad para la evaluación de las quimiotecas .....	45
4. Determinación de la secuencia de péptidos activos.....	47
4.1 ¿MS/MS ó PSD?.....	51
5. Conclusiones.....	54

6.	Bibliografía .....	55
<b><u>Capítulo 2: Desarrollo de la estrategia sintética</u></b> .....		<b>59</b>
1.	Síntesis del péptido H <sub>3n</sub> .....	61
1.1	<i>Prueba de estabilidad de los enlaces péptido-espaciador bifuncional</i> .....	61
1.2	<i>Síntesis del péptido H<sub>3n</sub></i> .....	62
1.2.1	Formación de aspartimidias en el heptapéptido C-terminal del H <sub>3n</sub> .....	65
1.2.2	Modificación de la estrategia Nbb/Boc/Bn .....	67
1.3	<i>Continuación de la síntesis del péptido H<sub>3n</sub></i> .....	69
2.	Síntesis del péptido H <sub>3a</sub> .....	74
3.	Conclusiones .....	77
4.	Bibliografía .....	78
<b><u>Capítulo 3: Desarrollo de la metodología de secuenciación</u></b> .....		<b>79</b>
1.	Generación de una escalera de secuencias parciales marcadas isotópicamente como método de secuenciación .....	81
1.1	<i>Primer diseño</i> .....	85
1.2	<i>Segundo diseño</i> .....	90
1.3	<i>Síntesis de la quimioteca L27-1</i> .....	91
1.4	<i>Síntesis de la quimioteca L27-2</i> .....	95
1.5	<i>Síntesis de la quimioteca L6</i> .....	98
2.	Desarrollo de la metodología de secuenciación por MALDI-TOF PSD .....	102
2.1	<i>MALDI-TOF PSD de alícuotas de H<sub>3n</sub> y H<sub>3a</sub></i> .....	103
2.2	<i>MALDI-TOF PSD de los péptidos H<sub>3n</sub> y H<sub>3a</sub> empleando el producto de unidades de resina aisladas</i> .....	105
3.	Conclusiones .....	108
4.	Bibliografía .....	110
<b><u>Capítulo 4: Desarrollo del ensayo de actividad</u></b> .....		<b>111</b>
1.	Síntesis del péptido H <sub>I-II</sub> .....	114
2.	Primera etapa de optimización: comprobación del funcionamiento del ensayo de actividad .....	116

---

3.	Segunda etapa de optimización: mezclas de H3 <sub>n</sub> -HMFS-PEGA y H3 <sub>a</sub> -HMFS-PEGA.....	119
4.	Tercera etapa de optimización: ensayos de inhibición con H3 <sub>n</sub> en disolución.....	122
5.	Estudio por microcopía confocal de la disposición de las moléculas de IgG-FITC en las unidades de resina positivas.....	124
6.	Conclusiones.....	126
7.	Bibliografía.....	128
<b><u>Capítulo 5: Síntesis y evaluación de la quimioteca de prueba L300</u> .....</b>		<b>129</b>
1.	Diseño de la quimioteca L300 .....	131
2.	Síntesis de la quimioteca L300.....	134
3.	Evaluación de la quimioteca L300 .....	139
4.	Secuenciación de positivos por MALDI-TOF PSD .....	141
5.	Síntesis de los péptidos H3 <sub>n</sub> , H3 <sub>a</sub> , P1 y P2 a gran escala .....	144
6.	Análisis por dicroísmo circular de la interacción de los péptidos H3 <sub>n</sub> , H3 <sub>a</sub> , P1 y P2 con las hélices I-II naturales del dominio B.....	148
7.	Análisis de las secuencias positivas identificadas en el ensayo de actividad.....	152
8.	Conclusiones.....	156
9.	Bibliografía.....	157
<b><u>Conclusiones</u>.....</b>		<b>159</b>
<b><u>Materiales y Métodos</u>.....</b>		<b>163</b>
<b><u>Procedimientos Experimentales</u> .....</b>		<b>191</b>
<b><u>Anexo</u>.....</b>		<b>209</b>



## **Introducción**



La información que conduce al plegamiento de las proteínas se encuentra “codificada” en su estructura primaria. El conocimiento de la relación existente entre secuencia y estructura terciaria/actividad resulta, por tanto, de vital importancia, tanto para la predicción de la función que desarrollan en el organismo multitud de proteínas de las que sólo se conoce su secuencia, como para el estudio de las disfunciones generadas por un mal plegamiento y sus causas.<sup>1</sup> Este conocimiento ofrece además la posibilidad de diseñar nuevas proteínas con nuevas funciones y de modificar las proteínas naturales para dotarlas de nuevas propiedades (mayor estabilidad frente a temperatura, pH o proteasas por ejemplo), ambos supuestos de gran interés para los campos de la medicina y la industria. Finalmente, dado que el mecanismo de plegamiento de las proteínas es también un modelo para el estudio de los procesos de interacción proteína-proteína, a través del estudio de las interacciones entre las diferentes subestructuras que componen un sistema plegado, el establecimiento de las relaciones secuencia/estructura resulta también de gran utilidad en el campo del reconocimiento molecular (diseño de ligandos peptídicos de gran afinidad y especificidad).

Teniendo en cuenta que para una proteína de 100 aminoácidos formada a partir de los 20 aminoácidos codificados existen  $20^{100}$  posibles secuencias, resulta obvia la dificultad del problema que se plantea. Si se considera además que un sistema de este tipo puede tener unas  $10^{100}$  conformaciones energéticamente razonables, es posible deducir que la magnitud de esta dificultad es aún mayor.<sup>2</sup> Las proteínas naturales, sin embargo, adquieren en general una única estructura tridimensional, la cual viene determinada por su secuencia y por las *fuerzas* que dirigen el plegamiento (interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno...)<sup>3</sup> Considerando que sistemas que presentan únicamente un 10 % de sus residuos en las mismas posiciones de la secuencia pueden adquirir la misma estructura tridimensional, es posible concluir que estas *fuerzas* son fundamentales, es decir, independientes de la secuencia y, por tanto, iguales para todas las proteínas.<sup>4</sup>

La complejidad del problema planteado ha dado lugar al desarrollo de dos grandes herramientas para la modificación de proteínas o el diseño de nuevos enzimas o ligandos: el diseño *de novo* (*de novo design*) y la química combinatoria. Debido a los principios en los que se basan, estas aproximaciones han sido consideradas en numerosas ocasiones como antagónicas a la hora de resolver un mismo problema. Actualmente, sin embargo, la química orgánica tiende a utilizar la primera como complemento indispensable de la segunda,<sup>5</sup> empleando todo el conocimiento

disponible para la síntesis de quimiotecas *dirigidas* que intentan explorar el máximo de diversidad posible, siguiendo unos parámetros de diseño que garanticen la actividad de alguno de los compuestos sintetizados o la optimización de un compuesto ya de por sí activo.

## 1. Diseño de novo de proteínas

Aunque en un principio pueda parecer evidente que la mejor forma de conocer la relación entre secuencia y estructura sea a partir del estudio de sistemas naturales, la carga evolutiva que pesa sobre las proteínas nativas hace que no sean modelos ideales.<sup>6</sup> En una proteína natural cada aminoácido puede disponer de varias funciones, algunas de ellas nada obvias, siendo la actividad desarrollada en la actualidad producto de las mutaciones sufridas a lo largo del tiempo, muchas de las cuales pueden haber supuesto cambios de actividad por mecanismos excesivamente complejos. Por ello, el estudio del plegamiento de proteínas suele llevarse a cabo a partir de sistemas *de novo*, libres de estos factores evolutivos, de forma que los principios o reglas que se deduzcan sean de aplicación universal.

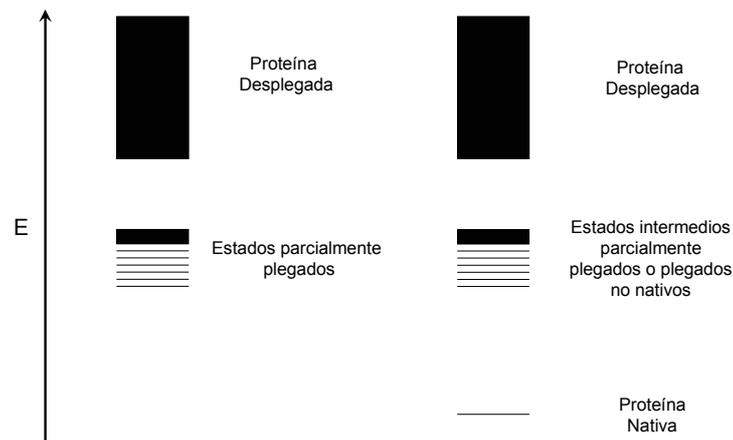
El diseño *de novo* de proteínas parte de principios básicos para la obtención de secuencias de aminoácidos que plieguen adquiriendo estructuras tridimensionales predefinidas, con propiedades análogas a las de una proteína natural, es decir: i) estructuras secundarias definidas; ii) buen empaquetamiento de cadenas laterales (señales de RMN definidas y con buena dispersión); iii) desnaturalización cooperativa, en un intervalo corto de temperatura y iv) interior hidrofóbico compacto y poco expuesto al disolvente (determinado por intercambio H/D normalmente).<sup>7</sup> Esta aproximación no tan sólo permite extraer conclusiones sobre el mecanismo general del plegamiento y de las fuerzas que lo rigen, sino que además permite comprobar la veracidad de los conocimientos adquiridos y aplicados a través del éxito o fracaso de los diseños.

Gracias a los avances realizados en el diseño *de novo* de proteínas, ha sido posible determinar parte de los principios que rigen su plegamiento, dando lugar a nuevos diseños cada vez con un mayor grado de éxito. La mayoría de los estudios, sin embargo, han sido realizados sobre sistemas de tipo “ $\alpha$ -helicoidal”,<sup>8</sup> debido principalmente a su mayor facilidad de manipulación comparados con los formados por láminas  $\beta$ , con gran tendencia a agregarse y precipitar. Además, las hélices  $\alpha$  son el motivo de estructura secundaria más común en proteínas globulares (aproximadamente 1/3 de los residuos que componen las proteínas nativas de estructura conocida se encuentran formando parte de este tipo de estructura secundaria).<sup>9</sup> Aún así, muchos de los principios aplicables al plegamiento de estos sistemas son también aplicables a aquellos constituidos total o parcialmente por láminas  $\beta$ .

Uno de los principales factores que inducen el plegamiento de una proteína es la tendencia de éstas a evitar la exposición de sus residuos apolares al medio acuoso. Se generan así sistemas parcialmente plegados que disponen de estructuras secundarias definidas, pero cuyo interior

hidrofóbico carece de un buen empaquetamiento, pudiendo adoptar las cadenas laterales de los aminoácidos múltiples conformaciones (sistemas *molten globule*). Por ello, sus propiedades son parecidas a las de una proteína nativa pero presentan ciertas deficiencias (por ejemplo, desnaturalizan cooperativamente pero en un rango mayor de temperatura, dan lugar a espectros de RMN con menor dispersión de señales y son capaces de acomodar pequeñas moléculas en su interior hidrofóbico, de forma inespecífica).<sup>7</sup> La obtención de un sistema *molten globule* o con propiedades de proteína nativa es lo que determina el éxito parcial o total de un diseño.

El primer paso en el diseño *de novo* de una proteína es la elección de la estructura terciaria que se pretende construir (haces de hélices  $\alpha$ , horquilla  $\beta$ ...). Las estructuras secundarias que la forman suelen obtenerse a partir de una correcta elección de los aminoácidos, en función de su tendencia a encontrarse en uno u otro tipo de estructura secundaria de forma natural (hélice  $\alpha$ , lámina  $\beta$ ...), así como de la periodicidad de las posiciones hidrofóbicas/hidrofílicas en la secuencia.<sup>10</sup> De esta forma, la disposición alternada de residuos hidrofóbicos/hidrofílicos conduce normalmente a la formación de láminas  $\beta$ , mientras que el espaciado de residuos hidrofóbicos cada 3 ó 4 posiciones suele conducir a la formación de hélices  $\alpha$ , según la regla del heptante.<sup>11</sup> A partir de aquí, que la secuencia diseñada dé lugar a un sistema *molten globule* o a uno con propiedades de proteína nativa dependerá principalmente de la *especificidad de las interacciones* entre los residuos de las diferentes subestructuras que la forman, las cuales deben modularse cuidadosamente. En una proteína nativa, cada aminoácido, sobretudo del interior hidrofóbico, se empaqueta en un entorno único.<sup>12</sup> En otras palabras, las interacciones entre sus aminoácidos son suficientemente específicas para dar lugar a una sola estructura tridimensional energéticamente



**Figura 1** Representación energética teórica de los posibles estados accesibles para un sistema *molten globule* (izquierda) y una proteína nativa (derecha). Como puede apreciarse, la proteína nativa posee una única conformación de mínima energía y un salto energético importante entre ésta y el resto de estructuras posibles o sistemas parcialmente plegados, debido a la especificidad de las interacciones entre sus aminoácidos. Para los sistemas *molten globule* no existe ninguna estructura favorecida y la proteína puede adoptar múltiples conformaciones con facilidad, siendo las propiedades medidas una promedio de las de todas las conformaciones accesibles (estructuras secundarias definidas pero baja dispersión de señales por RMN, señales anchas debido a fenómenos de equilibrio conformacional y ausencia de señales NOE entre residuos lejanos en secuencia pero cercanos en el espacio).

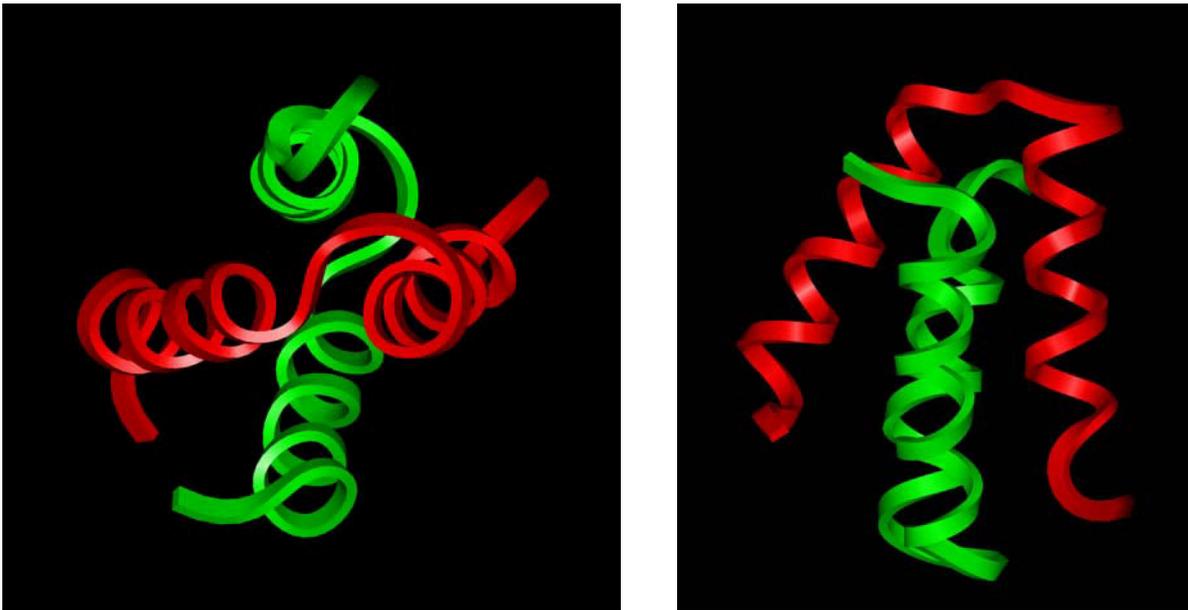
favorable, cuya energía difiere de la de otras estructuras posibles y sistemas *molten globule* de forma suficiente como para que sólo ella sea accesible (Figura 1). Es por ello que durante la etapa de diseño, además de procurar la estabilización de la estructura deseada, deben introducirse elementos de *diseño negativo* que desestabilicen el resto de estructuras posibles, teniendo en cuenta que los residuos cercanos al interior hidrofóbico y los que conectan los diferentes elementos de estructura secundaria juegan también un papel importante en el plegamiento.<sup>6,13</sup>

La falta de especificidad en una proteína de diseño ha sido suplida en numerosas ocasiones mediante la coordinación de ciertos residuos a metales de transición,<sup>14</sup> enlaces covalentes intercadena<sup>15</sup> o mediante la unión de las diferentes estructuras secundarias a “soportes” rígidos o TASP<sup>16</sup> (Template Assembled Synthetic Proteins). Estos recursos permiten restringir la movilidad general del sistema y fijar su estructura, siendo capaces de convertir sistemas *molten globule* en moléculas con propiedades de proteína nativa. Sin embargo, la aplicación de estas aproximaciones no hace sino que dejar patente el vacío de conocimiento que aún hoy existe sobre el llamado “problema del plegamiento”.

## 1.1 Proteínas de novo helicoidales

En la literatura existen múltiples ejemplos de proteínas artificiales basadas en motivos “*todo hélice  $\alpha$* ”,<sup>17</sup> muchas de las cuales poseían características de *molten globule* más que de proteína nativa, o requerían del uso de las aproximaciones anteriormente comentadas para fijar su estructura. Otras, sin embargo, han demostrado poseer propiedades de proteína nativa sin el uso de estas herramientas, reflejando los avances realizados en el conocimiento de las fuerzas que dirigen el plegamiento.

En 1987, William F. DeGrado y col. describieron el primer haz de cuatro hélices alfa (*four-helix bundle*) de diseño.<sup>18</sup> Este sistema se basaba en una hélice  $\alpha$  de 16 aminoácidos diseñada para autoasociarse formando tetrámeros antiparalelos. Para ayudar al plegamiento global de la proteína, el péptido se incorporó en una construcción del tipo hélice  $\alpha$ /conector/hélice  $\alpha$  que dimerizaba para dar lugar al tetrámero de 73 aminoácidos. La caracterización en profundidad del complejo, denominado por los autores como  $\alpha_4B$ , reveló sin embargo que su comportamiento era más similar al de *molten globule* que al de proteína nativa. La mejora del diseño en una etapa posterior para aumentar la especificidad de las interacciones del interior hidrofóbico, condujo a la sustitución de algunas de las Leu por residuos aromáticos y  $\beta$ -ramificados.<sup>19</sup> El nuevo complejo ( $\alpha_4C$ ) tenía un comportamiento análogo al de las proteínas naturales a baja temperatura, pero experimentaba una transición hacia un sistema *molten globule* cerca de temperatura ambiente. Se establecía así la importancia de la especificidad en el empaquetamiento de las cadenas laterales del interior hidrofóbico, el cual, por otro lado, era insuficiente para el correcto plegamiento total de la proteína. Una última sustitución de tres aminoácidos de  $\alpha_4C$  dio como resultado el primer haz de cuatro



**Figura 2** Vista superior (izquierda) y lateral (derecha) de la estructura tridimensional de la proteína  $\alpha_4D$ . La estructura representada es el promedio de las mejores estructuras obtenidas por minimización, a partir de los datos de RMN. La figura muestra únicamente la disposición del esqueleto peptídico, en forma de cinta. Como puede apreciarse, la proteína está formada por dimerización de dos monómeros tipo hélice- $\alpha$ /conector/hélice- $\alpha$  idénticos, representados en la figura en rojo y verde.

hélices  $\alpha$  con características de proteína nativa.<sup>20</sup> La llamada  $\alpha_4D$  incorporaba un centro de unión a metal en el interior hidrofóbico, además de otro cambio ideado más para la desestabilización de otras estructuras posibles que para la estabilización de la deseada (*diseño negativo*). El sistema presentaba propiedades análogas a las de una proteína natural incluso en ausencia de metales, jugando las histidinas introducidas un papel esencial en la estabilización de la estructura global por interacciones de enlace de hidrógeno. Ello demostraba que, a veces, la presencia de residuos cargados en el interior hidrofóbico de una proteína podía ser más favorable que desestabilizante, al proporcionar mayor especificidad de interacción. Las características de proteína nativa de este sistema facilitaron la determinación de su estructura tridimensional por RMN (Figura 2).

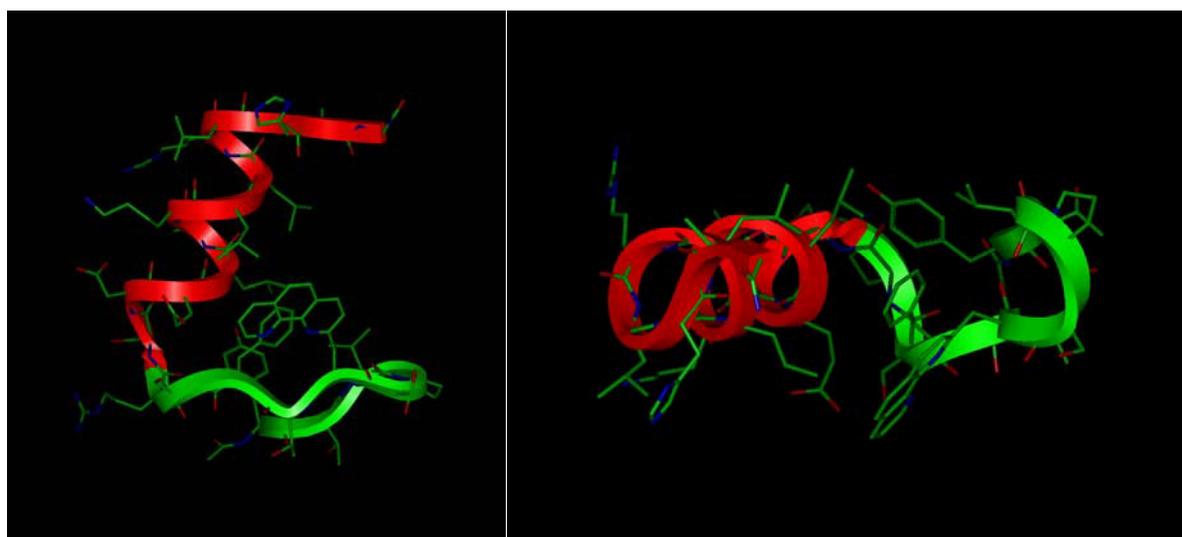
De forma paralela a DeGrado, Baltzer y col. describieron en 1996 la obtención de un haz de cuatro hélices  $\alpha$  con propiedades de proteína nativa. El sistema, bautizado como GTD-43, estaba formado también por dimerización de un péptido tipo hélice  $\alpha$ /conector/hélice  $\alpha$ ,<sup>21</sup> pero que al contrario que el sistema de DeGrado, no disponía de ningún centro de coordinación a metales. La clave del diseño de esta proteína fue la introducción de residuos aromáticos en su interior hidrofóbico, cuya cadena lateral poseía una movilidad más restringida en este entorno debido a su gran tamaño. La determinación de la estructura por RMN<sup>22</sup> permitió corroborar la hipótesis de los autores sobre el papel determinante de los residuos aromáticos en la estabilización de la estructura.

## 1.2 Proteínas de novo incluyendo láminas $\beta$

Como ya se ha comentado anteriormente, mientras que el diseño *de novo* de proteínas formadas en su totalidad por hélices  $\alpha$  ha sido explorado ampliamente, el diseño de proteínas que contengan láminas  $\beta$  lo ha sido en menor grado. Ello se debe a la elevada tendencia de este tipo de estructura secundaria a agregar, lo cual hace muy difícil su manipulación. Aún así, ha sido posible la obtención de algunas pequeñas proteínas *de novo* formadas total o parcialmente por láminas  $\beta$ .

Una de los primeros sistemas de este tipo descritos en la literatura fue la denominada proteína BBA1.<sup>23</sup> Esta molécula de 23 aminoácidos presentaba una estructura de tipo  $\beta\beta\alpha$ , basada en los motivos naturales capaces de unir ADN llamados “dedo de zinc” (zinc-finger), y poseía características de proteína nativa, lo cual hizo posible la resolución de su estructura por RMN (Figura 3). La BBA1 fue sometida posteriormente a diferentes modificaciones, entre las que se incluyeron la sustitución de alguno de los aminoácidos no naturales de su secuencia por otros proteínogénicos. Estas modificaciones dieron lugar a la proteína BBA5,<sup>24</sup> la cual se plegaba en disolución adoptando la misma estructura terciaria que su predecesora, con análogas propiedades. Finalmente, la zona de unión de la segunda lámina  $\beta$  con la hélice  $\alpha$  C-terminal de la BBA5 fue modificada con la intención de obtener dominios capaces de oligomerizar de forma discreta en disolución. Como resultado se obtuvo la proteína BBAT1, un trímero con propiedades de proteína nativa donde cada monómero adquiriría una estructura de tipo  $\beta\beta\alpha$ , con la hélice  $\alpha$  extendida para interactuar con las láminas  $\beta$  de otro monómero en lugar de interactuar con las suyas, como en la BBA5.<sup>25</sup>

Paralelamente a estas estructuras mixtas, también se han descrito diversos sistemas *de novo*



**Figura 3** Vista superior (izquierda) y lateral (derecha) de la estructura tridimensional de la proteína BBA1. La estructura representada es el promedio de las mejores estructuras obtenidas por minimización a partir de los datos de RMN. La figura muestra la disposición del esqueleto peptídico en forma de cinta además de la disposición de las cadenas laterales. En rojo se muestra la hélice- $\alpha$  C-terminal del dominio y en verde las láminas- $\beta$  N-terminales.

formados íntegramente por láminas  $\beta$ , capaces de adoptar en disolución estructuras discretas con propiedades de proteína nativa. De entre ellos cabe destacar los motivos tipo horquillas  $\beta$ <sup>26</sup> y los formados por empaquetamiento de tres o más láminas  $\beta$ .<sup>27</sup> Como ejemplo destacado de éste último encontramos la Betanova, un péptido de 20 aminoácidos formado por tres láminas  $\beta$  antiparalelas de cuatro aminoácidos cada una, conectadas por dos giros  $\beta$  I'. Este péptido poseía características de proteína nativa y su estructura pudo ser determinada por RMN (Figura 4).<sup>28</sup>



**Figura 4** Superposición del esqueleto de las 20 mejores estructuras de la Betanova, obtenidas por minimización a partir de los datos de RMN.

El éxito en el diseño *de novo* de proteínas formadas por láminas  $\beta$  demuestra los avances realizados en el conocimiento de los principios que dirigen el plegamiento de proteínas que contienen este motivo estructural. Este conocimiento es especialmente importante si tenemos en cuenta que la formación de fibras amiloides por interacción de láminas  $\beta$  se postula como crucial en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, ya que puede proporcionar las claves necesarias para descubrir los factores que conducen a la formación de estos agregados y, por tanto, abrir nuevas vías para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades asociadas.

### **1.3 Proteínas de novo funcionales**

Como ya se ha comentado anteriormente, el diseño *de novo* no tan solo pretende la obtención de sistemas que plieguen adquiriendo una estructura tridimensional predefinida con propiedades de proteína nativa, sino también dotarlos de funcionalidad. Sin embargo, si tenemos en cuenta la dificultad que presenta el diseño de una molécula con comportamiento nativo, es fácil intuir que la dificultad de dar actividad a estas nuevas estructuras es aún mayor. El grado de éxito

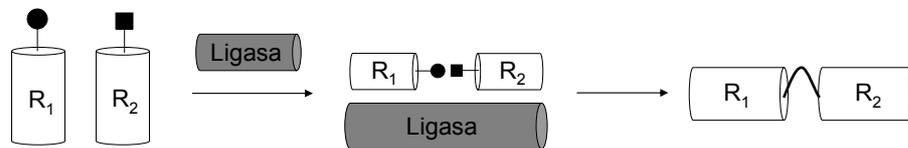
en este campo ha sido, por tanto, menor, aunque por otro lado muestra un futuro prometedor para el diseño *de novo* de proteínas funcionales.

Dentro del diseño *de novo* de proteínas funcionales, tienen un lugar destacado aquellos sistemas que incorporan en su estructura sitios de unión a metal.<sup>29</sup> Uno de los primeros ejemplos que encontramos en la bibliografía es la Helichrome I, un haz de cuatro hélices  $\alpha$  unidas a un grupo hemo capaz de catalizar la transformación de anilina en *p*-aminofenol en ausencia de catalasas, de igual modo que muchas hemoproteínas naturales.<sup>30</sup> En 1994, DeGrado, Dutton y col. describieron una serie de haces de cuatro hélices  $\alpha$ , todos ellos formados por dimerización de un péptido con estructura de hélice  $\alpha$ /puente disulfuro/hélice  $\alpha$ , los cuales permitían la unión de hasta cuatro grupos hemo diferentes en una misma molécula, cuyos potenciales redox variaban en función del entorno proteico en que se encontrasen.<sup>31</sup> Posteriormente, Dutton y col. extendieron este tipo de construcción a la obtención de una flavoproteína artificial, incorporando en el esqueleto base dos flavinas unidas covalentemente a dos cisteínas de la secuencia, así como una zona para la unión de un grupo hemo.<sup>32</sup> Esta nueva proteína permitía la transferencia de electrones fotoinducida entre sus diferentes “cofactores”, reproduciendo así la actividad de las flavoproteínas naturales. Más recientemente, Mihara y col.<sup>33</sup> describieron un haz de tres hélices  $\alpha$  antiparalelas capaz de unir Fe que disponía de actividad tipo peroxidasa: la proteína catalizaba la oxidación de *O*-metoxifenol en presencia de  $H_2O_2$ . El grupo hemo del sistema, sin embargo, se degradaba en presencia del peróxido de hidrógeno, por lo que la capacidad catalítica de la proteína era limitada. Ello fue atribuido a un contacto excesivo entre el  $H_2O_2$  y el centro activo, el cual no era capaz de romper el enlace O-O sin generar radicales libres, responsables del deterioro de uno de los anillos de porfirina. Pavone y col.<sup>34</sup> describieron por otro lado un haz de cuatro hélices  $\alpha$  capaz de unir dos átomos de Fe en su interior hidrofóbico. El sistema presentaba además una cavidad que permitía la entrada hasta el centro activo tanto del disolvente como de pequeñas moléculas como aziduro o acetato. Además de estos ejemplos basados en el diseño total de la proteína funcional, existen también múltiples ejemplos en la literatura donde estos sitios de unión a metal han sido incorporados a la estructura de proteínas naturales carentes de ellos, sin que su estructura ni propiedades se vean alteradas significativamente.<sup>35</sup> A modo de ejemplo encontramos la introducción de un sitio de unión a Fe en el dominio B1 de la proteína G, descrito por Regan y col.,<sup>36</sup> o la introducción de un sitio de unión a  $Ca^{2+}$  en el dominio N-terminal de la proteína CD2 de rata, descrito por Lee y col.<sup>37</sup> En este último, la proteína no tan sólo unía  $Ca^{2+}$  con afinidad comparable a la de algunas proteínas naturales, sino que además lo hacía de forma selectiva frente a otros metales de similares características, como  $Mg^{2+}$  y  $K^+$ .

A parte de la unión de metales, las proteínas de diseño han sido dotadas de otras múltiples funcionalidades. DeGrado y col.<sup>38</sup> diseñaron un haz de cuatro hélices  $\alpha$  capaz de insertarse en membranas y actuar como canal de protones y cationes de tamaño inferior a 8 Å. Más recientemente, Sugihara y col.<sup>39</sup> describieron una proteína de 69 aminoácidos formada por cuatro hélices  $\alpha$ , donde una de las hélices, totalmente hidrofóbica, se encontraba rodeada de las otras tres. Este sistema, totalmente soluble en agua, se insertaba en membranas con un mecanismo supuestamente análogo al de algunas toxinas bacterianas. En lo referente a proteínas capaces de

interaccionar con ADN, el estudio de los motivos “*dedo de zinc*” ha dado lugar al desarrollo de pequeños modelos con actividad análoga a la de estos sistemas naturales,<sup>40</sup> permitiendo determinar su modo de acción y los residuos importantes tanto para la interacción como para el plegamiento.<sup>41</sup> Este conocimiento ha sido empleado para el diseño de nuevos motivos con afinidad por secuencias de ADN diferentes a la de la proteína natural.<sup>42</sup>

Finalmente, el área donde menores progresos se han realizado ha sido en el diseño de los llamados “enzimas artificiales”, es decir, moléculas con actividad catalítica, de las cuáles ya se ha comentado algún caso.<sup>29-33</sup> Entre los sistemas que han sido diseñados con éxito encontramos también un sistema de tipo helicoidal y rico en Leu y Lys capaz de catalizar la descaboxilación del ión oxaloacetato,<sup>43</sup> además de sistemas capaces de catalizar la hidrólisis y transesterificación de ésteres de 4-nitrofenilo.<sup>44</sup> DeGrado y col.<sup>45</sup> describieron un haz de cuatro hélices  $\alpha$  que reconocía específicamente el centro de unión de la Calcineurina (fosfatasa objetivo de muchos fármacos inmunodepresores) y más recientemente, Ghadiri y col.<sup>46</sup> diseñaron una hélice  $\alpha$  que actuaba como catalizador de la reacción de ligadura química entre dos segmentos complementarios a ésta, al favorecer la interacción entre los reactivos colocándolos cerca en el espacio y en la orientación adecuada (Figura 5). A parte de estos sistemas totalmente *de novo*, existen en la literatura múltiples ejemplos de obtención de nuevas proteínas activas a partir de la modificación de proteínas naturales, ya sea para dotarlas de afinidad por nuevos sustratos<sup>47</sup> o de actividades completamente nuevas.<sup>48</sup>



**Figura 5** Esquema del mecanismo de acción de la ligasa diseñada por Ghadiri y col. El péptido responsable de la catálisis, una hélice  $\alpha$  anfipática, es capaz de interaccionar específicamente y con gran afinidad con los sustratos (también hélices  $\alpha$  anfipáticas), colocándolos cerca en el espacio y con la orientación adecuada. Esta especificidad y afinidad aumenta la concentración *efectiva* de los reactivos en la disolución, acelerando así la reacción.

#### **1.4 Limitaciones del diseño de novo de proteínas**

Como puede deducirse de lo hasta aquí expuesto, el diseño *de novo* de proteínas es una poderosa herramienta para el estudio del plegamiento y de las reglas que lo rigen, para la obtención de nuevas proteínas (con o sin función) y para la modificación de proteínas naturales, ya sea con la intención de mejorar sus propiedades físico-químicas (estabilidad frente a pH, temperatura,

proteasas, etc.) o de modular su actividad. El diseño *de novo*, sin embargo, presenta una serie de limitaciones que impiden su aplicación sistemática.

La principal limitación que puede observarse en el diseño de proteínas es el desequilibrio que existe en el balance esfuerzo/resultados. En la mayoría de los casos, la primera secuencia suele plegar dando lugar a sistemas *molten globule*, siendo necesarios varios ciclos de rediseño, síntesis y análisis para poder obtener un compuesto con propiedades de proteína nativa. El tiempo necesario para obtener una molécula funcional, por tanto, acostumbra a ser largo, aún cuando la aplicación de la informática para la ayuda e incluso automatización de la etapa de diseño ha conseguido acelerar notablemente el proceso.<sup>45,49</sup> Este problema puede atribuirse a la forma en que se plantea la etapa de diseño. Normalmente, una vez elegida la estructura tridimensional objeto de estudio, sólo se optimizan una o unas pocas secuencias de aminoácidos para cumplir los requisitos necesarios que lleven a la molécula a adoptar la estructura objetivo. Los conocimientos que hoy poseemos sobre el proceso de plegamiento, aun teniendo en cuenta los avances realizados, es limitado, por lo que las posibilidades de éxito apostando por un número de secuencias reducido son pequeñas.

La segunda limitación importante del diseño *de novo* está íntimamente relacionada con el tamaño de los sistemas que estudia. Como se ha mostrado, es posible dotar a péptidos pequeños, asequibles por síntesis química, de estructura tridimensional definida y propiedades de proteína nativa<sup>28</sup> (la Betanova contiene 20 aminoácidos únicamente). La obtención de moléculas de mayor envergadura por síntesis química es también posible, a partir de la síntesis de pequeños fragmentos que posteriormente son unidos de forma conveniente<sup>16</sup> o que son capaces de estructurarse sin necesidad de estar unidos covalentemente, a partir de interacciones no covalentes.<sup>29a</sup> Sin embargo, cuando lo que se pretende es la modificación de proteínas naturales de gran tamaño, abordar su construcción por síntesis química, aunque posible, es extremadamente difícil y laboriosa.<sup>50</sup> Por esta razón se suele recurrir, en estos casos, a metodologías de expresión de proteínas para conseguir cantidades suficientes de producto en un período razonable de tiempo. Lo que por un lado se plantea como una solución, por otro lado nos limita la variedad de aminoácidos que podemos emplear a los 20 aminoácidos proteínogénicos (aminoácidos L). Este inconveniente se pone de manifiesto principalmente durante la modificación de proteínas naturales para aumentar su estabilidad frente a proteasas, para lo cual el uso de aminoácidos no naturales (no reconocidos por proteasas naturales, por tanto) es una de las mejores aproximaciones. Los avances en el conocimiento del mecanismo celular de expresión de proteínas han permitido el desarrollo de metodologías para la incorporación de aminoácidos no naturales en las proteínas expresadas. Aún así, la mayoría de estas metodologías admite únicamente la incorporación de estos aminoácidos en posiciones concretas de la secuencia,<sup>51</sup> mientras que aquellas que hacen posible un mayor grado de incorporación de aminoácidos no naturales (ampliando el código genético de la *E. Coli* con codones de 4 y 5 bases o bases no naturales)<sup>52</sup> se encuentran todavía en proceso de optimización. La *modificación exhaustiva de proteínas de gran tamaño empleando aminoácidos no naturales es, por tanto, solamente posible por medios químicos*, de momento. Esta limitación, cabe destacar, no es exclusiva del diseño *de novo*, sino que también la presenta la modificación de proteínas por

química combinatoria, ya que es producto del tamaño de los sistemas estudiados y no de la aproximación empleada.

## 2. Química combinatoria

La química combinatoria surge a mediados de los 80 como respuesta a la gran demanda de nuevos compuestos planteada por la industria farmacéutica, generada por el descubrimiento de un número elevado de nuevas dianas terapéuticas, gracias a los avances en el campo de la biología molecular y a la automatización de los ensayos para la detección de compuestos con propiedades terapéuticas (también llamado *High Throughput Screening* o HTS).<sup>53</sup> La química combinatoria puede definirse, por tanto, como todo un conjunto de metodologías dirigidas a la obtención del mayor número posible de compuestos a partir de un número mínimo de reacciones, o lo que es lo mismo, de forma sencilla, económica y eficaz.<sup>54</sup>

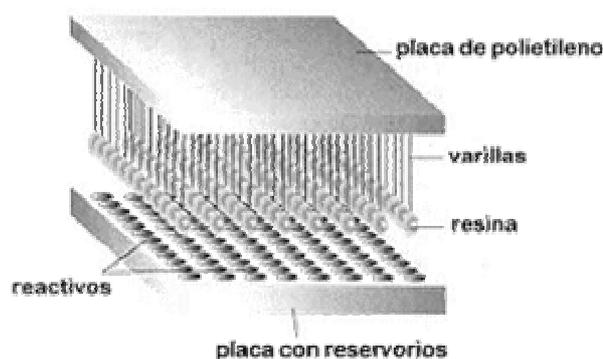
Los orígenes de la química combinatoria los encontramos en el desarrollo de sistemas para la síntesis múltiple y en paralelo de péptidos, posteriormente extendidos a la síntesis de todo tipo de moléculas.<sup>55</sup> A partir de aquí, muchas y muy diversas metodologías se han desarrollado para la síntesis de quimiotecas. Dentro del campo de los péptidos éstas se pueden dividir en dos grandes grupos, que podemos denominar *metodologías químicas* y *metodologías biológicas*.

### 2.1 Metodologías químicas

Varias han sido las metodologías desarrolladas para la síntesis de quimiotecas de péptidos, todas ellas basadas en un objetivo común: generar el mayor número de compuestos a partir del mínimo número de pasos de síntesis o de la forma más automatizada posible. A continuación se describen brevemente algunas de las técnicas empleadas más comúnmente, para las que el uso de un soporte sólido sobre el que llevar a cabo la síntesis es un requisito imprescindible.

#### 2.1.1 Síntesis empleando varillas de polietileno (sistema *Multipin*)

Esta metodología, ideada inicialmente para el escrutinio rápido y efectivo de epítomos continuos, se basa en el uso de soportes de 96 varillas de polietileno (*pins*) provistas en su extremo de un material polimérico funcionalizado, sobre el que se desarrolla la síntesis de los péptidos. El sistema permite la síntesis automática y en paralelo de hasta 96 compuestos diferentes, uno por



**Figura 6** Esquema del sistema multipin para la síntesis combinatoria de péptidos en paralelo.

varilla (Figura 6).<sup>56</sup> Los ensayos de actividad suelen realizarse en sistemas ELISA con los péptidos unidos al soporte, ya que las dimensiones de éste están diseñadas para que cada varilla coincida con un pocillo de una placa ELISA estándar, haciendo posible el ensayo de todos los productos de forma simultánea. La necesidad de poder disponer de los péptidos en disolución condujo posteriormente a la incorporación de espaciadores bifuncionales al soporte polimérico para permitir su liberación tras la síntesis, abriendo la posibilidad a la realización no tan sólo de ensayos de actividad en fase sólida, sino también en disolución.<sup>57</sup>

### 2.1.2 Síntesis de quimiotecas sobre papel de celulosa

Esta metodología se basó en un principio en el uso de discos de papel de celulosa funcionalizada (1.55 cm de diámetro, funcionalización media 1-3  $\mu\text{moles}/\text{cm}^2$ ) como soporte para la síntesis de las quimiotecas, llevándose a cabo la síntesis de un péptido diferente sobre cada disco, el cual era marcado convenientemente para la identificación de la secuencia que contenía.<sup>58</sup> La ventaja de esta metodología era la de poder realizar aquellas etapas de síntesis comunes (desprotecciones, lavados...) de forma simultánea para todos los compuestos, introduciendo todos los discos en un mismo reactor. Metodologías posteriores pero análogas se desarrollaron empleando algodón (otra forma de celulosa) en vez de papel, debido a la mayor estabilidad mecánica que éste presentaba así como a sus propiedades de retención de disolvente.<sup>59</sup> Finalmente, el uso de la celulosa se ha extendido para hacer posible la “*síntesis localizada en el espacio*” (spatially addressed SPOT synthesis) de múltiples péptidos en una misma hoja de papel.<sup>60</sup> En este caso la actividad de la quimioteca suele evaluarse con los compuestos unidos al soporte sólido, identificando las secuencias activas por el cambio de color de la zona en la que se encuentran, al ser sometidas a ensayos colorimétricos o similares.

### 2.1.3 Síntesis empleando “bolsas de té” (*tea bags*)

La síntesis de quimiotecas empleando bolsas de té parte del mismo principio que la metodología anterior: realizar todos aquellos pasos de síntesis comunes de forma simultánea sobre todos los compuestos de la quimioteca, en un único reactor. Para ello, Houghten y col. desarrollaron un sistema basado en aislar pequeños lotes de resina en el interior de bolsas selladas de polipropileno poroso (las llamadas *bolsas de té*).<sup>61</sup> De esta forma se pueden sintetizar hasta 500  $\mu$ moles de péptido en el interior de cada una de las bolsas, las cuales se encuentran etiquetadas convenientemente para la fácil identificación del compuesto que contienen. Las reacciones se llevan a cabo introduciendo las bolsas en reactores provistos de una disolución con los reactivos adecuados, ya sea para la desprotección, lavado o acoplamiento de aminoácidos comunes. Una vez acabada la síntesis, la resina se saca individualmente de las bolsas y el péptido que contiene se desprotege, desancla y purifica, en caso necesario, y se ensaya para la detección de actividad.

### 2.1.4 Acoplamiento de mezclas de aminoácidos

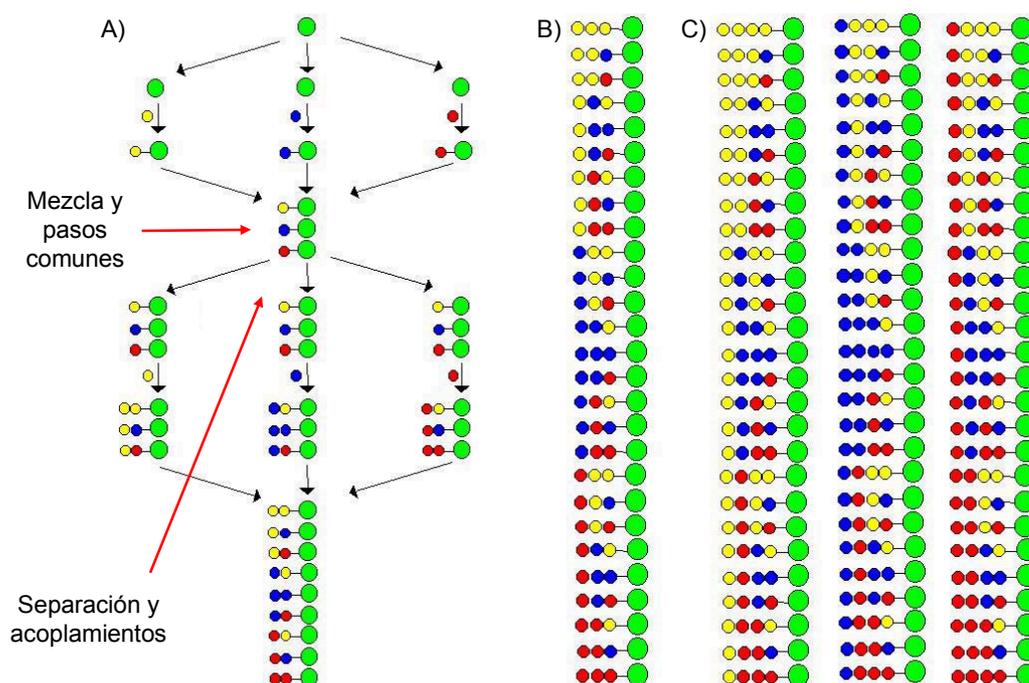
El acoplamiento de mezclas de aminoácidos para la síntesis simultánea de múltiples péptidos ha sido otra de las estrategias más utilizadas en química combinatoria.<sup>62</sup> El principal problema de esta aproximación es asegurar la representación equimolar de todos los compuestos que forman la quimioteca, debido a la diferente velocidad de reacción de los distintos aminoácidos activados. El uso de cantidades equimolares de reactivos está comprobado que conduce a la incorporación preferente de unos aminoácidos sobre otros.<sup>63</sup> Por ello, es necesario emplear disoluciones con mayor concentración de aquellos componentes cuya velocidad de reacción es menor, asegurando así que todos los aminoácidos utilizados en un acoplamiento se incorporan en igual proporción. Otra posible alternativa consiste en el uso de disoluciones formadas por una mezcla equimolar de los aminoácidos a incorporar, todos ellos en defecto con respecto a la cantidad de grupos reactivos presentes en la resina.<sup>64</sup> Esta aproximación, bautizada con el nombre de “*adición subestequiométrica múltiple*”, proporciona excelentes resultados y es preferible a la anterior debido a su sencillez, al permitir utilizar cualquier mezcla de aminoácidos sin necesidad de conocer sus velocidades de reacción, ya que no requiere del cálculo de las concentraciones en las que deberían encontrarse para la incorporación equimolar de todos ellos.

Aunque el empleo de esta metodología permite la síntesis de un número elevado de compuestos de forma rápida y sencilla, la obtención de mezclas de péptidos presenta dos grandes inconvenientes que es necesario comentar, ya que han sido los que han limitado en gran medida su uso. En primer lugar, obtenemos mezclas de compuestos, en principio imposibles de separar y que, por tanto, deben ser ensayadas como tales. Ello ha generado una gran polémica sobre la fiabilidad de los resultados obtenidos debido a que, como puede suponerse, dentro de una mezcla pueden

darse fenómenos de competición (autoinhibición entre los compuestos de la quimioteca) o cooperatividad que conducirían tanto a falsos resultados positivos como negativos. Finalmente, la identificación de los compuestos activos es un proceso que requiere un elevado tiempo y esfuerzo, al necesitar que porciones de la misma quimioteca sean sintetizadas y evaluadas varias veces hasta poder conocer todos los aminoácidos de sus secuencias.

### 2.1.5 Mezcla y separación (*split and mix*)

Desde su desarrollo por Furka y col.<sup>65</sup> y su confirmación con los trabajos de Houghten<sup>66</sup> y Lam,<sup>67</sup> esta metodología ha sido, junto con la síntesis de péptidos en paralelo, una de las aproximaciones más utilizadas para la síntesis de quimiotecas peptídicas.<sup>68</sup> La técnica de síntesis es similar a la de acoplamiento de mezclas de aminoácidos, solucionando el problema de la diferente velocidad de reacción de los aminoácidos a partir de la separación física de las



**Figura 7** Esquema del procedimiento de síntesis de quimiotecas por la metodología de *mezcla y separación*. A) esquema general del procedimiento de síntesis; B) y C) los 27 y 81 tripéptidos y tetrapéptidos posibles, respectivamente, por combinación de tres aminoácidos (rojo, azul y amarillo) en todas las posiciones. Como puede apreciarse, la metodología permite la síntesis de un gran número de compuestos a partir de un número mínimo de pasos de síntesis (12 acoplamientos para la síntesis de los 81 tetrapéptidos posibles frente a los 324 acoplamientos si se pretende su síntesis de forma individual). Además, cada unidad de resina contiene una única secuencia, lo cual permite tener los compuestos físicamente separados durante los ensayos de actividad y que cada unidad de resina pueda ser considerada como una “disolución” independiente, donde no existe la posibilidad de interacción con otros compuestos de la quimioteca.

reacciones. La síntesis mediante la técnica de *mezcla y separación* parte de una cantidad suficiente de resina para incluir todos los péptidos que formarán la quimioteca (ver Materiales y métodos 6.1), la cual es dividida en tantas partes iguales como aminoácidos a incorporar en una posición, realizándose el acoplamiento de un aminoácido diferente en cada fracción. Finalizada la etapa de acoplamiento, el total de la resina es introducido en un único reactor donde se mezcla adecuadamente y se llevan a cabo los pasos comunes de síntesis (desprotecciones y lavados). Posteriormente la resina vuelve a dividirse en partes iguales sobre las que se procede a la incorporación del segundo aminoácido (Figura 7). Como puede apreciarse, esta estrategia permite la síntesis de un gran número de compuestos con relativamente pocos pasos de síntesis.

Con respecto a la síntesis de mezclas de compuestos, la ventaja que ofrece la estrategia de *mezcla y separación* es que cada unidad de resina posee múltiples copias de una única secuencia (aproximación “*one-bead-one-compound*”). Ello permite que, si los ensayos de actividad son realizados con los péptidos unidos a la fase sólida de síntesis, sea posible evaluar gran cantidad de moléculas en un solo ensayo sin los problemas asociados a las mezclas, ya que cada compuesto se encuentra físicamente “aislado” del resto.<sup>69</sup> El desarrollo de ensayos de actividad para moléculas unidas a soporte sólido, sin embargo, puede no resultar trivial.<sup>70</sup>

Un ensayo de actividad realizado sobre quimiotecas de éste tipo permite la identificación de aquellas unidades de resina que contienen péptido activo, empleando métodos colorimétricos<sup>71</sup> o fluorescentes.<sup>72</sup> Estas *bolitas* de resina deben ser aisladas físicamente del resto de la quimioteca, lavadas convenientemente y el péptido contenido analizado para la identificación de su secuencia, para lo cual existen diferentes metodologías que se comentarán más adelante, adaptadas a la escasa cantidad de muestra que contiene una unidad de resina.

## **2.2 Metodologías biológicas**

Entendemos por metodologías biológicas todas aquellas metodologías en las que los péptidos que forman una quimioteca son obtenidos por expresión, sea cual sea el sistema, y no por síntesis química. El denominador común para todas ellas es la generación de la diversidad en los oligonucleótidos que codifican estos péptidos, cuyos extremos suelen ser de secuencia constante y adecuada para permitir su ligadura al vector de expresión que vaya a emplearse.<sup>73</sup> Todas estas metodologías procuran además mantener unidos de alguna forma los componentes de la quimioteca y el ADN que los codifica, lo cual hace posible la fácil identificación de los compuestos activos una vez aislados del resto.

Del conjunto de metodologías biológicas desarrolladas, la más destacada es la que emplea para la expresión de los compuestos partículas de bacteriófagos, de entre los cuales, los más utilizados han sido los fagos filamentosos de *E. Coli*. Éstos presentan unas dimensiones de 930 nm de largo y 6.5 nm de diámetro, en cuyo interior albergan una molécula de ADN compuesta de 6400 pares de bases. En este caso, los compuestos se expresan fusionados con alguna de las proteínas de

la cápside del virus, de forma que la quimioteca pueda ser sometida a ensayos de actividad mientras los péptidos permanecen unidos al sistema de expresión, del cual podemos extraer posteriormente el ADN para su secuenciación.<sup>74</sup>

De entre las proteínas que componen la cápside de estos fagos, las más empleadas para la fusión con compuestos de quimiotecas han sido las proteína pIV y pIII. La cápside del virus presenta unas 2700 copias de la primera y 5 de la segunda, por lo que permiten la búsqueda de compuestos activos con baja afinidad en el caso de la pIV y de elevada afinidad en el caso de la pIII. En ambas metodologías los candidatos se expresan unidos al extremo N-terminal de éstas o cerca de él. La proteína pIII tolera bien la inserción de péptidos largos sin alterar de forma dramática el ciclo vital del fago, aunque algunos de los péptidos pueden afectar e incluso bloquear la unión del virus a *E. Coli*, disminuyendo su capacidad de propagación e impidiendo la equimolaridad de todos los compuestos de la quimioteca.<sup>75</sup> Por otro lado, la inserción de péptidos de más de 10 aminoácidos en todas las copias de pIV impide el ensamblaje del virus con las células, interrumpiendo completamente su ciclo vital. Es por ello que ha sido necesario el desarrollo de vectores que producen dos versiones de la misma proteína, una modificada con los componentes de la quimioteca y la pIV natural. De esta forma el desarrollo del virus no se ve afectado y la obtención de quimiotecas con péptidos de mayor longitud es posible.<sup>76</sup>

Las metodologías biológicas presentan ventajas e inconvenientes cuando se las compara con las metodologías químicas. Entre las ventajas más relevantes podemos destacar el número de compuestos diferentes que se pueden preparar ( $<10^7$ - $10^{10}$ ), mucho mayor que el asequible por métodos químicos, donde quimiotecas con más de  $10^6$  candidatos son difíciles de sintetizar. Además, dado que nos servimos de sistemas de expresión de proteínas, la talla de los péptidos que componen las quimiotecas puede ser también mucho mayor. Sin embargo, como ya se comentó en el apartado de diseño *de novo* (Introducción 1.4), la obtención de los péptidos por expresión limita el número de aminoácidos que podemos emplear a aminoácidos codificados, lo cual puede ser un problema en la búsqueda de moléculas con determinadas actividades o propiedades. Es por ello que este tipo de metodologías se encuentran fuera del marco general en el que se encuadra la presente tesis, por lo que no serán comentadas en profundidad.

### **2.3 Química combinatoria y nuevas proteínas**

Aunque desarrollada en un principio para la búsqueda de nuevos fármacos de forma rápida y eficaz, la versatilidad de la química combinatoria ha hecho posible su aplicación a la búsqueda de compuestos con propiedades de todo tipo, como por ejemplo de nuevos catalizadores.<sup>77</sup> Dentro de estas “nuevas aplicaciones”, la química combinatoria ha jugado también un papel destacado en la modificación de proteínas naturales para la modificación de sus propiedades, así como en la obtención de nuevas proteínas artificiales.<sup>78</sup> Esto, que en principio podría parecer contradictorio debido a los principios de los que parten química combinatoria y diseño *de novo*, no es más que la

demostración de como la implementación de ambas metodologías es la solución más efectiva a las limitaciones que cada una de ellas presenta por separado.<sup>79</sup>

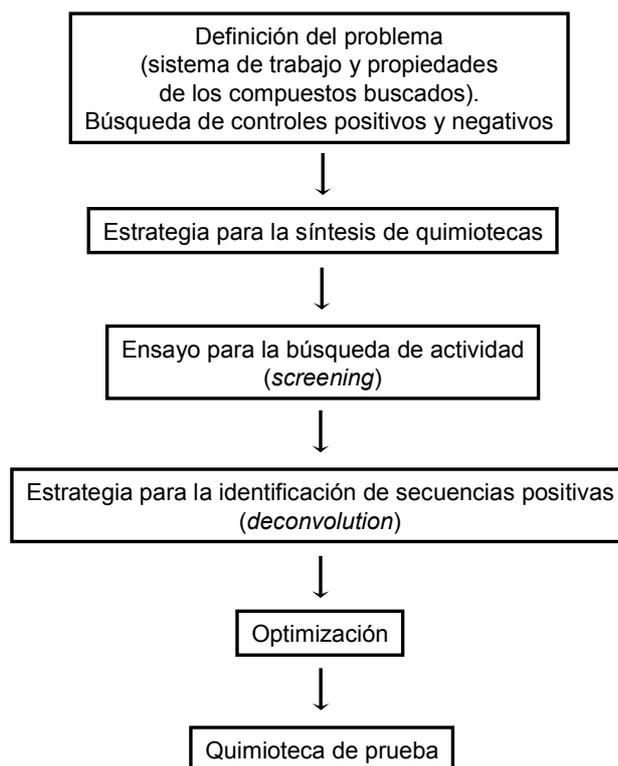
De las diferentes metodologías combinatorias existentes, las más comúnmente aplicadas en este campo han sido las metodologías biológicas, debido fundamentalmente al tamaño de los sistemas estudiados.<sup>80</sup> El tamaño es, por otro lado, una limitación importante para la aplicación de la química combinatoria a la obtención de “nuevas” proteínas. Si tenemos en cuenta la cantidad de secuencias que podrían generarse con un sistema de 100 residuos empleando los 20 aminoácidos naturales para la variación de todas sus posiciones, podemos ver que el número de compuestos a sintetizar es demasiado elevado ( $10^{130}$ ) como para plantearse siquiera su síntesis. Si además tenemos en cuenta las *fuerzas* que rigen el plegamiento de proteínas (colapso hidrofóbico, complementariedad de cadenas laterales...), podemos deducir que no tan sólo el número de compuestos es demasiado elevado, sino que este tipo de quimiotecas carece de sentido, ya que es posible anticipar que la mayoría de los candidatos no poseerían estructura alguna.<sup>81</sup> Nos encontramos, por tanto, ante un tipo de sistemas que no admite una variación exhaustiva de sus estructuras, pero que si, por el contrario, no se introduce variedad convenientemente, la diversidad explorada es mínima. Es por ello que aquí, más que nunca, una etapa previa de diseño donde decidir *qué modificar y cómo* es totalmente necesaria.

La aplicación de la química combinatoria a la modificación de proteínas naturales surge con la aparición de quimiotecas de anticuerpos expresadas en fagos, con el objetivo de aumentar su afinidad por sus epítopos naturales o bien dotarlos de la capacidad de reconocimiento de nuevos epítopos.<sup>82</sup> El potencial que estas metodologías ofrecían en términos de aceleración y eficacia, hizo que su uso fuese rápidamente extendido a la modificación de todo tipo de proteínas, con objetivos análogos.<sup>83</sup> Wells y col. emplearon este tipo de quimiotecas en un intento de aumentar la afinidad de la hormona de crecimiento humana (hGH) por su receptor natural.<sup>84</sup> Debido al tamaño de la hGH y a la cantidad de residuos implicados en el reconocimiento, fueron necesarias tres quimiotecas diferentes, cada una dirigida a la variación de una de las áreas responsables de la interacción. A partir de las secuencias más activas de cada una de las quimiotecas, se llevó a cabo la síntesis de una cuarta quimioteca que incluía todas las modificaciones halladas. Esta condujo a un análogo de la hGH con 15 aminoácidos sustituidos y que poseía una afinidad por el receptor natural 400 veces mayor que la proteína nativa. Un procedimiento análogo fue seguido también por Wells y col. para la modificación del dominio Z de la proteína A, un haz de tres hélices  $\alpha$  capaz de unir IgG de mamíferos con gran afinidad.<sup>85</sup> En este caso, los autores buscaban convertir el sistema en un haz de dos hélices  $\alpha$ , de estructura estable y similar afinidad por el sustrato, eliminando la hélice C-terminal del dominio, necesaria para mantenerlo plegado pero no implicada en la labor de reconocimiento. Otros ejemplos importantes los encontramos en el desarrollo de nuevos dominios tipo “*dedo de zinc*”, capaces de reconocer nuevas secuencias de ADN con mayor afinidad que la del domino natural por su sustrato,<sup>86</sup> así como en el uso de mutagénesis combinatorial dirigida para modular la especificidad de la Apolipoproteína D humana<sup>87</sup> o de enzimas como la TEM  $\beta$ -lactamasa,<sup>88</sup> en todos los casos por modificación de los aminoácidos implicados en el reconocimiento o de éstos y los de posiciones adyacentes.

En lo referente a la obtención de nuevas proteínas artificiales, una de las primeras aproximaciones combinatorias consistió en la síntesis de una quimioteca de  $4.7 \times 10^{41}$  compuestos expresados en fagos, destinada a la búsqueda de péptidos capaces de plegarse como un haz de cuatro hélices  $\alpha$ .<sup>89</sup> Para evitar la síntesis de quimiotecas aún mayores, debido a la gran cantidad de residuos con posibilidad de ser permutados, se establecieron restricciones en los aminoácidos a introducir en cada una de las posiciones de la secuencia, fijando un patrón hidrofóbico/hidrofílico típico de hélices  $\alpha$ . El éxito de la aproximación se vio reflejado en la obtención de compuestos con propiedades de proteína nativa. Dutton y col., por otro lado, emplearon la química combinatoria para el rediseño del interior hidrofóbico de un haz de cuatro hélices  $\alpha$  formado por dimerización de un péptido *de novo* tipo hélice-S-S-hélice.<sup>17a,b</sup> La quimioteca permitió identificar compuestos capaces de adquirir la estructura deseada con propiedades de proteína nativa, pudiendo incluso resolver la estructura de alguno de los positivos por RMN. Haenel y col.<sup>90</sup> se ayudaron del uso de TASP para desarrollar quimiotecas de haces de cuatro hélices  $\alpha$  con capacidad de unir grupos hemo o cobalto, con muy buenos resultados. Finalmente, además de para el desarrollo de sistemas *de novo* totalmente helicoidales, la química combinatoria se ha empleado también para la búsqueda de proteínas capaces de plegarse con estructura de lámina  $\beta$ . Así por ejemplo, Hecht y col. describieron una quimioteca expresada en fagos a cuyos componentes se les impuso un patrón hidrofóbico/hidrofílico típico de láminas  $\beta$ .<sup>91</sup> Entre los compuestos sintetizados, encontraron que una gran parte era capaz de adoptar la estructura deseada, presentando por otro lado una gran tendencia a la formación de agregados tipo amiloide.

## **2.4 Aplicación de metodologías combinatorias**

Pese al gran potencial de la química combinatoria para la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades de interés, el desarrollo de nuevas metodologías combinatorias requiere de toda una etapa previa de diseño y optimización importante, sin la cual, las garantías de éxito son prácticamente nulas. Esta etapa incluye la elección de la estrategia para la síntesis de las quimiotecas, el tipo de análisis al que serán sometidos los compuestos para la búsqueda de actividad, etc. Aunque el diseño de metodologías combinatorias es un proceso más o menos sistemático (ver Figura 8), es necesario tener en cuenta que todas las etapas de las que se compone una metodología en concreto están íntimamente ligadas entre ellas y que, por tanto, cada decisión que tomamos condiciona de forma importante el resto. Por ello, es necesario estudiar cuidadosamente todas las opciones posibles para cada etapa antes de tomar una decisión concreta, ya que una mala elección puede conducir a metodologías inviables, muy poco efectivas o incluso inútiles para la búsqueda de los compuestos deseados. Esto es especialmente importante durante los primeros estadios del diseño, ya que son estas etapas las que imponen más limitaciones. A



**Figura 8** Planteamiento general del proceso de diseño y optimización de nuevas metodologías combinatorias.

continuación se describen brevemente algunas de las consideraciones más relevantes que deben tenerse en cuenta de forma previa a la síntesis de cualquier quimioteca de tipo peptídico.

Una vez definido el sistema de trabajo y las propiedades que debe poseer un péptido para ser considerado activo, el primer paso consiste en la elección de la metodología a emplear para la síntesis de las quimiotecas: bolsas de té, acoplamiento de mezclas, etc. Esta elección depende tanto del tamaño de las quimiotecas que se pretenden sintetizar (la obtención de millones de compuestos por síntesis en paralelo no es, por ejemplo, una buena opción, debido al tiempo que la síntesis implicaría) como del tipo de ensayo a emplear para la detección de actividad, así como de la instrumentación disponible en el laboratorio. Una metodología adecuada debería permitir la síntesis de todos los compuestos que formarán las quimiotecas en un periodo de tiempo razonable, con pureza elevada (idealmente superior al 80 %) y en la forma adecuada para su análisis (en disolución o unidos a fase sólida). Unida a la elección de esta metodología se encuentra también la elección del esquema de protección que se empleará para la síntesis (Boc/Bn o Fmoc/tBu), así como el tipo de resina y espaciador bifuncional.

Tras determinar el tipo de quimioteca a sintetizar, es importante definir la metodología analítica que se seguirá para la detección de actividad (*screening*), así como la metodología para la secuenciación de los compuestos activos (*deconvolution*), ambas íntimamente ligadas al tipo de quimioteca escogido. Por ejemplo, quimiotecas sintetizadas en sistemas *Multipin* necesitarán de ensayos ELISA y no requerirán de secuenciación, ya que la secuencia de los compuestos activos estará definida directamente por su posición en la placa. Estrategias del tipo *mezcla y separación*

necesitarán adaptar la prueba de actividad a péptidos unidos a fase sólida, de forma que podamos identificar fácilmente las unidades de resina que contienen un compuesto activo, así como disponer de una metodología para su secuenciación (secuenciación de Edman, métodos de codificación...).

Una vez diseñada la metodología general, debe procederse a la optimización de cada una de sus etapas: síntesis, evaluación y secuenciación. Para ello, será necesario disponer de controles tanto positivos como negativos, importantes sobretodo a la hora de la optimización del ensayo de actividad. Con ellos se comprobará que la estrategia de síntesis proporciona los compuestos deseados con purezas aceptables, que es posible diferenciar entre péptidos activos e inactivos y que su secuenciación es viable.

Finalmente y como paso previo a la síntesis de las primeras quimiotecas *reales*, es conveniente realizar la síntesis de una pequeña *quimioteca de prueba*, que permita comprobar el buen funcionamiento de la metodología en su conjunto. Para ello, esta quimioteca debe incorporar entre sus compuestos algún control positivo que asegure la existencia de candidatos activos en la quimioteca, ya que, en caso contrario, no sería posible asegurar la fiabilidad del ensayo de actividad.

### 3. **Objetivos**

La presente tesis doctoral presenta un objetivo general:

- El desarrollo de una metodología combinatoria para la modificación de dominios proteicos naturales. Esta metodología debe cumplir dos requisitos fundamentales: i) permitir no tan sólo la modificación de posiciones concretas de las secuencias, sino también de elementos completos de estructura secundaria; ii) permitir el uso más o menos ilimitado de aminoácidos no naturales como elementos de diversidad.

Este objetivo principal se subdivide en los siguientes objetivos parciales:

- Elección de un modelo adecuado de trabajo y diseño de la metodología combinatoria (tipo de quimiotecas a emplear, metodología de síntesis, ensayo de actividad y sistema de secuenciación).
- Desarrollo de la estrategia para la síntesis de las quimiotecas.
- Desarrollo del ensayo de actividad para la detección de compuestos activos.
- Desarrollo del sistema de secuenciación de los péptidos activos.
- Verificación de la estrategia desarrollada empleando una pequeña quimioteca de prueba.

## 4. Bibliografía

- <sup>1</sup> Cohen, F. E.; Kelly, J. W. *Nature* **2003**, *246*, 905-909
- <sup>2</sup> Creighton, T. *Proteins*; Freeman: San Francisco, 1984
- <sup>3</sup> Dobson, C. M. *Nature* **2003**, *246*, 884-890
- <sup>4</sup> DeGrado, W. F.; Wasserman, Z. R.; Lear, J. D. *Science* **1989**, *243*, 622-628
- <sup>5</sup> Kohn, W. D.; Hodges, R. S. *TIBTECH* **1998**, *16*, 379-389
- <sup>6</sup> Baltzer, L.; Nilsson, H.; Nilsson J. *Chem. Rev.* **2001**, *101(10)*, 3153-3164
- <sup>7</sup> Betz, S. F.; Raleigh, D. P.; DeGrado, W. F. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 601-610
- <sup>8</sup> Hill, R. B.; Raleigh, D. P.; Lombardi, A.; DeGrado, W. F. *Accounts Chem. Res.* **2000**, *33*, 745-754
- <sup>9</sup> Hodges, R. S. *Biochem. Cell Biol.* **1996**, *74*, 133-154
- <sup>10</sup> Bryson, J. W.; Betz, S. F.; Lu, H. L.; Suich, D. J.; Zhou, H. X.; O'Neil, K. T.; DeGrado, W. F. *Science* **1995**, *270*, 935-941
- <sup>11</sup> Cohen, C.; Parry, D. A. D. *Trends Biochem. Sci.* **1986**, *11*, 245-248
- <sup>12</sup> Schafmeister, C. E.; Stroud, R. M. *Curr. Opin. Biotech.* **1998**, *9*, 350-353
- <sup>13</sup> Nagi, A. D.; Regan, L. *Folding Des.* **1997**, *2*, 67-75
- <sup>14</sup> a) Regan, L.; Clarke, N. D. *Biochemistry* **1990**, *29*, 10878-10883; b) Lieberman, M.; Sasaki, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1470-1471; c) Ghadiri, M. R.; Soares, C.; Choi, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 825-831
- <sup>15</sup> a) Koruda, Y.; Nakai, T.; Ohkubo, T. *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 862-868; b) Koruda, Y. *Protein Eng.* **1995**, *8*, 97-101
- <sup>16</sup> a) Mutter, M.; Vulleumies, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 535-554; b) Tuchscherer, G.; Grell, D.; Mathieu, M.; Mutter, M. *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 185-194; c) Schnepf, R.; Hörth, P.; Bill, E.; Wieghardt, K.; Hildebrandt, P.; Haenel, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2186-2195; d) Obataya, I.; Sakamoto, S.; Ueno, A.; Mihara, H. *Biopolymers* **2001**, *59*, 65-71
- <sup>17</sup> a) Hecht, M. H.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C.; Ogden, R. C. *Science* **1990**, *249*, 884-891; b) Skalicky, J. J.; Gibney, B. R.; Rabanal, F.; Bieber Urbauer, R. T.; Dutton, P. L.; Wand, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4941-4951; c) Gibney, B. R.; Rabanal, F.; Skalicky, J. J.; Wand, A. J.; Dutton, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4952-4960; d) Tanaka, Y.; Nagamoto, K.; Sasaki, H.; Fujimoto, T.; Nishino, N. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37(6)*, 881-884; e) Karle, I. L.; Banerjee, A.; Balaram, P. *Folding Des.* **1997**, *2*, 203-210; f) Kashiwada, A.; Hiroaki, H.; Kohda, D.; Nango, M.; Tanaka, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 212-215; g) Koike, M.; Wada, K.; Kiyokawal, T.; Kanaoril, K.; Tajima, K.; Mizuno, T.; Oku, J.-i.; Tanaka, T. *Peptide Sci.* **2003**, *39*, 355-356; h) Brask, J.; Wackerbarth, H.; Jensen, K. J.; Zhang, J.; Chorkendorff, I.; Ulstrup, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 94-104
- <sup>18</sup> Ho, S. P.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6751-6758
- <sup>19</sup> Raleigh, D. P.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 11079-11081
- <sup>20</sup> Raleigh, D. P.; Betz, S. F.; DeGrado, W.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7558-7559

- <sup>21</sup> Dolphin, G. T.; Brive, L.; Johansson, G.; Baltzer, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11297-11298
- <sup>22</sup> Brive, L.; Dolphin, G. T.; Baltzer, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8598-8607
- <sup>23</sup> Struthers, M.; Cheng, R. P.; Imperiali, B. *Science* **1996**, *27*, 342-345
- <sup>24</sup> Struthers, M.; Ottesen, J. J.; Imperiali, B. *Folding Des.* **1998**, *3*, 95-104
- <sup>25</sup> a) Mezo, A. R.; Ottesen, J. J.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1002-1003; b) Mezo, A. R.; Cheng, R. P.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3885-3891
- <sup>26</sup> a) Ramirez-Alvarado, M.; Blanco, F. J.; Serrano, L. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 604-611; b) DeAlba, E.; Jimenez, M. A.; Rico, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 175-183
- <sup>27</sup> a) Quinn, T. P.; Tweddy, N. B.; Williams, N. B.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8747-8751; b) Yan, Y.; Erickson, B. W. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 1069-1073
- c) Schenck, H. L.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4869-4870; d) Griffiths-Jones, S. R.; Searle, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8350-8356
- <sup>28</sup> Kortemme, T.; Ramirez-Alvarado, M.; Serrano, L. *Science* **1998**, *281*, 253-256
- <sup>29</sup> a) Rabanal, F.; DeGrado, W. F.; Dutton, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 473-474; b) Gibney, B. R.; Rabanal, F.; Skalicky, J. J.; Wand, A. J.; Dutton, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2323-2324; c) Rau, H. K.; DeJonge, N.; Haehnel, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11526-11531; d) Moffet, D. A.; Case, M. A.; House, J. C.; Vogel, K.; Williams, R. D.; Spiro, T. G.; McLendon, G. L.; Hecht, M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2109-2115; e) Schnepf, R.; Hörth, P.; Bill, E.; Wieghardt, K.; Hildebrandt, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2186-2195; f) Obataya, I.; Sakamoto, S.; Ueno, A.; Mihara, H. *Biopolymers* **2001**, *59*, 65-71
- <sup>30</sup> Sasaki, T.; Kaiser, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 380-381
- <sup>31</sup> a) Robertson, D. E.; Farid, R. S.; Moser, C. C.; Urbauer, J. L.; Mulholland, S. E.; Pidikiti, R.; Lear, J. D.; Wand, A. J.; DeGrado, W. F.; Dutton, P. L. *Nature* **1994**, *368*, 425-432; b) Choma, C. T.; Lear, J. D.; Nelson, M. J.; Dutton, P. L.; Robertson, D. E.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 856-865
- <sup>32</sup> Sharp, R. E.; Moser, C. C.; Rabanal, F.; Dutton, P. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 10465-10470
- <sup>33</sup> Obataya, I.; Kotaki, T.; Sakamoto, S.; Ueno, A.; Mihara, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2719-2722
- <sup>34</sup> Costanzo, L. D.; Wade, H.; Geremia, S.; Randaccio, L.; Pavone, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12749-12757
- <sup>35</sup> Toma, S.; Campagnoli, S.; Margarit, I.; Gianna, R.; Grandi, G.; Bolognesi, M.; De Filippis, V.; Fontana, A. *Biochemistry* **1991**, *30*, 97-106
- <sup>36</sup> Farinas, E.; Regan, L. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1939-1946
- <sup>37</sup> Yang, W.; Jones, L. M.; Isley, L.; Ye, Y.; Lee, H.-W. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6165-6171
- <sup>38</sup> a) Lear, J. D.; Wasserman, Z. R.; Degrado, W. F. *Science* **1988**, *240*, 1177-1181; b) Kiener, P. K.; DeGrado, W. F.; Lear, J. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4859-4863
- <sup>39</sup> Lee, S.; Kiyota, T.; Kunitake, T.; Yamashita, S.; Anzai, K.; Sugihara, G. *Biochemistry* **1997**, *36*, 3782-3791

- <sup>40</sup> O'Neil, K. T.; Hoess, R. H.; DeGrado, W. F. *Science* **1990**, *249*, 774
- <sup>41</sup> a) Fisher, D. E.; Parent, L. A.; Sharp, P. A. *Cell* **1993**, *72*, 467-476; b) Michael, S. F.; Kilfoil, V. J.; Schmidt, M. H.; Amann, B. T.; Berg, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4796-4800
- <sup>42</sup> Choo, Y.; Sánchez-García, I.; Klug, A. *Nature* **1994**, *372*, 642-645
- <sup>43</sup> a) Johnsson, K.; Allemann, R. K.; Widmer, H.; Benner, S. A. *Nature* **1993**, *365*, 530-532; b) Blondelle, S. E.; Takahashi, E.; Robles, B. L.; Houghten, R. A.; Perez-Paya, E. *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis & Combinatorial Libraries: Peptides, Proteins and Nucleic Acids--Small Molecule Organic Chemical Diversity, Collected Papers, International Symposium, 5th, London, Sept. 2-6, 1997* **1999**, 163-166
- <sup>44</sup> a) Broo, K. S.; Brive, L.; Lundh, A. C.; Ahlberg, P.; Baltzer, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8172-8173; b) Broo, K. S.; Brive, L.; Ahlberg, P.; Baltzer, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11362-11372
- <sup>45</sup> Ghirlanda, G.; Lear, J. D.; Lombardi, A.; DeGrado, W. F. *J. Mol. Biol.* **1998**, *281*, 379-391
- <sup>46</sup> Kennan, A. J.; Haridas, V.; Severin, K.; Lee, D. H.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1797-1803
- <sup>47</sup> a) Viadu, H.; Osuna, J.; Fink, A. L.; Soberón, X. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 781-787; b) Roth, M.; Jeltsch, A. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29(15)*, 3137-3144
- <sup>48</sup> Wolfson, A. J.; Kanaoka, M.; Lau, F. T. K.; Ringe, D. *Protein Eng.* **1991**, *4*, 313-317
- <sup>49</sup> a) Dahiyat, B. I.; Mayo, S. L. *Science* **1997**, *278*, 82-87; b) Dahiyat, B. I.; Sarisky, C. A.; Mayo, S. L. *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 789-796; c) Leach, A. R.; Bryce, R. A.; Robinson, A. J. *J. Mol. Graph. Model.* **2000**, *18*, 358-367; d) Pegg, S. C.-H.; Haresco, J. J.; Kuntz, I. D. *J. Comp. Aid. Mol. Des.* **2001**, *15*, 911-933; e) Kuhlman, B.; Dantas, G.; Ireton, G. C.; Varani, G.; Stoddard, B. L.; Baker, D. *Science* **2003**, *302*, 1364-1368
- <sup>50</sup> a) Nisiuchi, Y.; Inui, T.; Nishio, H.; Bodi, J.; Kimura, T.; Tsuji, F. T.; Sakakibara, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13549-13554; b) Sakakibara, S. *Biopolymers* **1999**, *51*, 279-296; c) Kochendoerfer, G. G.; Chen, S.-Y.; Mao, F.; Cressman, S.; Traviglia, S.; Shao, H.; Hunter, C. L.; Low, D. W.; Cagle, E. N.; Carnevali, M.; Gueriguian, V.; Keogh, P. J.; Porter, H.; Stratton, S. M.; Wiedeke, M. C.; Wilken, J.; Tang, J.; Levy, J. J.; Miranda, L. P.; Crnogorac, M. M.; Kalbag, S.; Botti, P.; Schindler-Horvat, J.; Savatski, L.; Adamson, J. W.; Kung, A.; Kent, S. B. H.; Bradburne, J. A. *Science* **2003**, *299*, 884-887; d) Becker, C. F. W.; Hunter, C. L.; Seidel, R.; Kent, S. B. H.; Goody, R. S.; Engelhard, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5075-5080
- <sup>51</sup> a) Koh, J. T.; Cornish, V. W.; Schultz, P. G. *Biochemistry* **1997**, *36*, 11314-11322; b) Liu, D. R.; Schultz, P. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4780-4785; c) Martin, A. B.; Schultz, P. G. *Trends Genet.* **1999**, *15*, M24-M28; d) Pastrnak, M.; Schultz, P. G. *Bioorgan. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2373-2379; e) Wang, L.; Brock, A.; Herberich, B.; Schultz, P. G. *Science* **2001**, *292*, 498-500; f) Wang, L.; Schultz, P. G. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 883-890; f) Dedkova, L. M.; Fahmi, N. E.; Golovine, S. Y.; Hecht, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6616-6617
- <sup>52</sup> Hohsaka, T.; Ashizuka, Y.; Murakami, H.; Sisido, M. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3646-3651

- <sup>53</sup> Gallop, M. A.; Barrett, R. W.; Dower, W. J.; Fodor, S. P. A.; Gordon, E. M. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233-1251
- <sup>54</sup> Terrett, N. K. *Combinatorial Chemistry*; Oxford University Press: New York, 1998
- <sup>55</sup> a) Krchnák, V.; Vagner, J. *Peptide Res.* **1990**, *3*, 182-193; b) Gausepohi, H.; Boulin, C.; Kraft, M.; Frank, R. W. *Peptide Res.* **1992**, *5*, 315-320
- <sup>56</sup> a) Geysen, H. M.; Meloen, R. H.; Barteling, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998-4002; b) Geysen, H. M.; Barteling, S. J.; Meloen, R. H. *Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 178-182; c) Geysen, H. M.; Rodda, S. J.; Mason, T. J.; Tribbick, G.; Schoofs, P. G. *J. Immunol. Methods* **1987**, *102*, 259-274
- <sup>57</sup> a) Bray, A. M.; Maeji, N. J.; Jhingran, A. G.; Valerio, R. M. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6163-6166; b) Valerio, R. M.; Benstead, M.; Bray, A. M.; Campbell, R. A.; Maeji, N. J. *Anal. Biochem.* **1991**, *197*, 168-177
- <sup>58</sup> a) Blankemeyer-Menge, B.; Frank, R. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5871-5874; b) Frank, R.; Doring, R. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6031-6040
- <sup>59</sup> a) Eichler, J.; Bienert, M.; Stierandova, A.; Lebl, M. *Peptide Res.* **1991**, *4*, 296-307; b) Schmidt, M.; Eichler, J.; Odarjuk, J.; Krause, C.; Beyerman, M.; Bierniet, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 441-446
- <sup>60</sup> a) Frank, R. *Tetrahedron* **1992**, *92*, 9217-9232; b) Frank, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 425-430; c) Rau, H. K.; DeJonge, N.; Haehnel, W. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2000**, *39*, 250-253
- <sup>61</sup> a) Houghten, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 5131-5135; b) Houghten, R. A.; Bray, M. K.; Degraw, S. T.; Kirby, C. J. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1986**, *27*, 673-678; c) Kilcevskaja, K.; Jackevica, L.; Steinbergs, J.; Gusars, I.; Sallberg, M.; Tsimanis, A. *Hybridoma* **1997**, *16*, 277-280
- <sup>62</sup> a) Geysen, H. M.; Rodda, S. J.; Mason, T. J. *Mol. Immunol.* **1986**, *23*, 709-715; b) Tjoeng, F. S.; Towery, D. S.; Bullock, J. W.; Whipple, D. E.; Foe, K. F.; Williams, M. H.; Zupec, M. E.; Adams, S. P. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1990**, *35*, 141-146
- <sup>63</sup> Birkett, A. J.; Soler, D. F.; Wolz, R. L.; Bond, J. S.; Wiserman, J.; Berman, J.; Harris, R. B. *Anal. Biochem.* **1991**, *196*, 137-143
- <sup>64</sup> a) Kramer, A.; Volkmer-Engert, R.; Malin, R.; Reineke, V.; Schneider-Mergener, J. *Peptide Res.* **1993**, *6*, 314-319; b) Quesnel, A.; Delmas, A.; Trudelle, Y. *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 182-187
- <sup>65</sup> Furka, A.; Sebesteyén, F.; Asgedom, M.; Dibó, G. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1991**, *37*, 487-493
- <sup>66</sup> Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E.; Appel, J. R.; Dooley, C. T.; Cuervo, J. H. *Nature* **1991**, *354*, 84-86
- <sup>67</sup> Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. *Nature* **1991**, *354*, 82-84
- <sup>68</sup> Halkes, K. M.; St. Hilaire, P. M.; Crocker, P. R.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 18-27
- <sup>69</sup> Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchnák, V. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411-448
- <sup>70</sup> a) Lebl, M.; Krchnák, V.; Sepetov, N. F.; Seligmann, B.; Strop, P.; Felder, S.; Lam, K. S. *Biopolymers* **1995**, *37*, 177-198; b) Krchnák, V.; Lebl, M. *Mol. Divers.* **1996**, *1*, 193-220
- <sup>71</sup> Cheng, Y.; Suenaga, T.; Still, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1813-1814

- <sup>72</sup> a) Graven, A.; St. Hilarie, P. M.; Sanderson, S. J.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 441-452; b) Willert, M.; Benito, J. M.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 91-101
- <sup>73</sup> Birnbaum, S.; Mosbach, K. *Curr. Opin. Biotech* **1992**, *3*, 49-54
- <sup>74</sup> a) Smith, G. P. *Science* **1985**, *228*, 1315-1317; b) Cwirla, S.; Peters, E. A.; Barrett, R. W.; Dower, W. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 6378-6382; c) Scott, J. K.; Smith, G. P. *Science* **1990**, *249*, 386-390
- <sup>75</sup> Cabilly, S. *Combinatorial peptide library protocols*; 1st ed.; Humana Press Inc.: New Jersey, *Methods in Molecular Biology* 1998; Vol. 87
- <sup>76</sup> Vispo, N. S.; Puchades, Y. *Biotech. Aplic.* **2001**, *18*(3), 135-147
- <sup>77</sup> a) Gilbertson, S. R.; Wang, X. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 434-435; b) Burgess, K.; Lim, H.-J.; Porte, A. M.; Sulikowski, G. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 220-222; c) Shimizu, K. D.; Cole, B. M.; Krueger, C. A.; Kuntz, K. W.; Snapper, M. L.; Hoveyda, A. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1704-1707
- <sup>78</sup> Matsuura, T.; Ernst, A.; Zechel, D. L.; Plückthum, A. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 177-182
- <sup>79</sup> a) Hoess, R. H. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3205-3218
- <sup>80</sup> Moffet, D. A.; Hecht, M. H. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3191-3204
- <sup>81</sup> Beasley, J. R.; Hecht, M. H. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2031-2034
- <sup>82</sup> a) Marks, J. D.; Hoogenboom, H. R.; Bonnert, T. P.; McCafferty, J.; Griffiths, A. D.; Winter, G. *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 581-597; b) Barbas, C. F.; Brain, J. D.; Hoekstra, D. M.; Lenner, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4457-4461; c) Hoogenboom, H. R. *TIBTECH* **1997**, *15*, 62-70
- <sup>83</sup> a) Cabbibo, A.; Sporeno, E.; Toniatti, C.; Altamura, S.; Savino, R.; Paonessa, G.; Filiberto, G. *Gene* **1995**, *167*, 41-47; b) Hiipakka, M.; Poikonen, K.; Saksela, K. *J. Mol. Biol.* **1999**, *23*, 1097-1106; c) Huang, W.; Zhang, Z.; Palzkill, T. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14964-14968
- <sup>84</sup> Lowman, H. B.; Bass, S. H.; Simpson, N.; Wells, J. A. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10832-10838; b) Lowman, H. B.; Wells, J. A. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 564-578
- <sup>85</sup> Braisted, A. C.; Wells, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5688-5692
- <sup>86</sup> Rebar, E. J.; Pabo, C. O. *Science* **1994**, *263*, 671-673; b) Jamieson, A. C.; Kim, S.-H.; Wells, J. A. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5689-5695; c) Choo, Y.; Klug, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11163-11167; d) Choo, Y.; Klug, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11168-11172
- <sup>87</sup> Vogt, M.; Skerra, A. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 191-199
- <sup>88</sup> Viadu, H.; Osuna, J.; Fink, A. L.; Soberón, X. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 781-787
- <sup>89</sup> a) Kamtekar, S.; Schiffer, J. M.; Xiong, H.; Babik, J. M.; Hecht, M. H. *Science* **1993**, *262*, 1680-1685; b) Roy, S.; Helmer, K. J.; Hecht, M. H. *Folding Des.* **1997**, *2*, 89-92; c) Roy, S.; Ratnaswamy, G.; Bioce, J. A.; Fairman, R.; McLendon, G.; Hecht, M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5302-5306
- <sup>90</sup> Schnepf, R.; Hörth, P.; Bill, E.; Wiegardt, K.; Hildebrandt, P.; Haenel, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2186-2195

<sup>91</sup> West, M. W.; Wang, W.; Patterson, J.; Mancias, J. D.; Beasley, J. R.; Hecht, M. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11211-11216



## **Capítulo 1: Diseño de la metodología combinatoria**



## 1. El dominio B de la proteína A como modelo de trabajo

El diseño de la metodología combinatoria para la modificación de dominios naturales se inició con la elección de un modelo de trabajo adecuado a nuestros propósitos. Este dominio debía cumplir los siguientes requisitos:

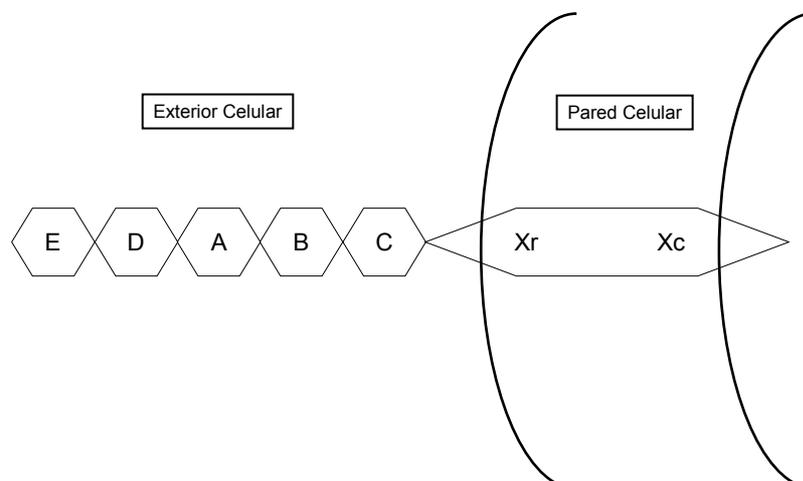
- Disponer de estructura tridimensional conocida formada íntegramente por hélices  $\alpha$ , que permitiese la aplicación de los principios del diseño *de novo* de proteínas a la puesta a punto de nuestras quimiotecas y evitase además los problemas derivados del trabajo con láminas  $\beta$ .
- Que la síntesis tanto del dominio completo como de sus diferentes estructuras secundarias fuese asequible por medios químicos, de forma sencilla y con elevado rendimiento (dominio pequeño).
- Disponer de actividad conocida a partir de la cual se pudiese desarrollar una prueba analítica para la búsqueda de compuestos activos.
- Preferentemente, ser un dominio conocido por nuestro grupo de trabajo, permitiendo la aplicación de la experiencia adquirida al desarrollo de la metodología.

Ello condujo a la elección del *dominio B de la proteína A del Staphylococcus Aureus* como modelo de trabajo.

### 1.1 El dominio B de la proteína A

La proteína A es una de las proteínas que se encuentra unida a la pared celular del *Staphylococcus Aureus*, el cual puede llegar a presentar hasta 80000 copias de la misma repartidas por toda su superficie<sup>1</sup> y secretarla en algunas cepas.<sup>2</sup> La proteína completa consta de unos 470 aminoácidos, un peso molecular de 52 kDa y una estructura tridimensional compuesta por un 50 % de hélice  $\alpha$ , un 10-20 % de lámina  $\beta$  y un 30-35 % de otras estructuras secundarias y cadena no

estructurada.<sup>3</sup> Es estable en un amplio rango de pH (pH = 1-12) así como frente a temperatura y a agentes químicos.<sup>3a</sup>

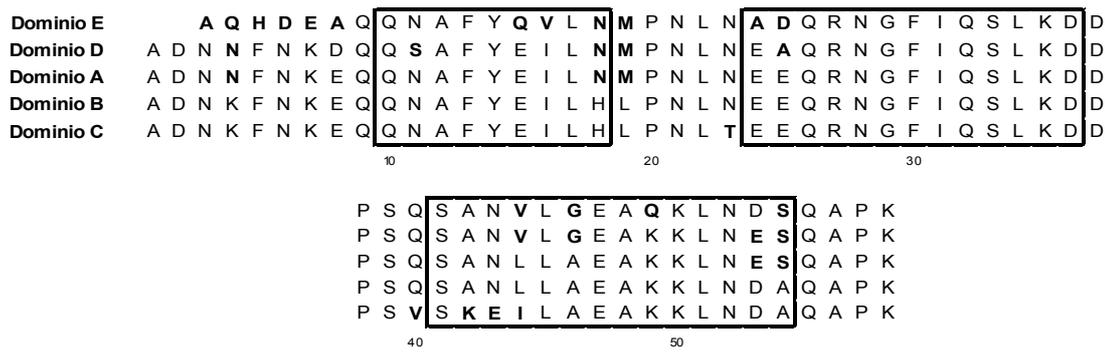


**Figura 1** Representación esquemática de los diferentes componentes de la proteína A.

La proteína A consta de dos regiones claramente diferenciadas (Figura 1):

- Una región C-terminal o región X, responsable de la unión de la proteína a la pared celular<sup>4</sup> y formada por dos dominios unidos secuencialmente. El dominio C-terminal, también llamado Xc, está formado por 81 aminoácidos y es el responsable del anclaje de la proteína a la pared. El segundo dominio, llamado Xr, está formado por 12.5 repeticiones de un octapéptido con mínimas variaciones de secuencia y se encarga de orientar la región activa de la proteína hacia el exterior de la bacteria.<sup>1d,3b,5</sup>
- Una región N-terminal situada en el exterior celular y responsable de la actividad de la proteína. Esta parte se encuentra formada por 5 dominios consecutivos de unos 58 aminoácidos cada uno y alta homología de secuencia (Figura 2),<sup>1d,3b</sup> cuya principal actividad conocida es su capacidad de unión a inmunoglobulinas G de diferentes especies de mamífero por su región contante Fc. Cada proteína A puede unir 2 moléculas de IgG<sup>1b,6</sup> con afinidad variable en función de la especie que las produzca (Tabla 1).<sup>7</sup>

Aún conociendo la afinidad de la proteína A por las inmunoglobulinas G, la actividad concreta que ésta desarrolla para la bacteria es desconocida todavía. Se postula sin embargo que el *Staphylococcus Aureus* podría emplear la proteína A para recubrirse completamente con inmunoglobulinas del cuerpo huésped, como mecanismo para evitar una respuesta inmediata por parte del sistema inmunológico de éste.<sup>8</sup> Más recientemente, el descubrimiento de la afinidad que la proteína presenta por el factor de von Willebrand ha llevado también a considerarla como una de las principales responsables de la capacidad de la bacteria de infectar el sistema endovascular.<sup>9</sup> En el campo de la biotecnología y la medicina, esta actividad de unión a IgG ha permitido el



**Figura 2** Secuencia de los cinco dominios activos de la proteína A. Los dominios se encuentran ordenados de arriba abajo en función de su posición en la proteína natural (ver Figura 1). Los aminoácidos se encuentran representados en código de una letra y las secuencias alienadas de forma que la homología entre ellas sea máxima. En negrita se destacan aquellos aminoácidos que difieren de los encontrados en el dominio B para esa misma posición. Enmarcadas encontramos las zonas de la secuencia responsables de la formación de cada una de las hélices- $\alpha$  de los dominios.

desarrollo de columnas de afinidad para la purificación de anticuerpos de forma rápida y eficaz, así como el estudio de su aplicación para la regulación de procesos inmunológicos *in vivo* en tratamientos anticáncer<sup>10</sup> o como complemento al uso de AZT en terapia anti-SIDA, con el objetivo de reducir los efectos secundarios que provoca el fármaco.<sup>11</sup>

Especies	Afinidad por IgG
<b>Anticuerpos Policlonales</b>	
Humano	+++
Conejo	+++
Conejo de Indias	+++
Ratón	++
Rata	+
Hamster	++
Vaca	++
Cabra	+
Oveja	+
Caballo	++
Perro	++
Gato	+++
Pollo	0
<b>Anticuerpos Monoclonales Humanos</b>	
IgG1	+++
IgG2	+++
IgG3	0/+
IgG4	+++

**Tabla 1** Afinidad de la proteína A por anticuerpos monoclonales y policlonales de diferentes especies mamíferas.

Aunque formada por cinco dominios activos homólogos (4 de elevada afinidad por Fc y uno de afinidad moderada, el dominio E), el más estudiado de todos ellos ha sido el dominio B, al

considerarse su secuencia la más conservada a lo largo de la evolución de la proteína.<sup>12</sup> Además de éste, el llamado dominio Z (un dominio no natural generado por mutagénesis dirigida a partir del dominio B, prácticamente análogo a éste pero de mayor estabilidad)<sup>13</sup> ha sido el otro gran centro de las investigaciones realizadas con dominios aislados. Aún así, debido a su gran similitud, prácticamente todo aquello descubierto para el dominio Z puede ser aplicado al dominio B.



**Figura 3** Estructura tridimensional del dominio B de la proteína A determinada por Guoda y col. a partir de los datos obtenidos por RMN. El esqueleto del dominio se representa en forma de cinta, con las hélice I y II (hélices- $\alpha$  N-terminales) en color violeta y la hélice III (C-terminal) en verde.

El dominio B se encuentra formado por 58 aminoácidos (Figura 2) y posee estructura estable en disolución por sí sólo, así como una elevada afinidad de unión a IgG. Su estructura tridimensional ha sido elucidada tanto por rayos X, unida a Fc,<sup>2,14</sup> como por RMN en su forma libre.<sup>15</sup> El dominio está formado por un haz de tres hélices  $\alpha$  (Figura 3) casi antiparalelas, donde la hélice C-terminal o hélice III se encuentra formando un ángulo de  $30^\circ$  con respecto al eje definido por las hélices N-terminales (hélices I y II). De las tres hélices  $\alpha$ , las hélices II y III son las que se suponen más estables y donde tiene lugar la mayor interacción intradominio, al comprobarse por cálculos teóricos que la hélice I es la primera en perder la estructura durante los procesos de desnaturalización, seguida de la hélice II y finalmente de la III.<sup>16</sup> La actividad de unión a IgG se encuentra centrada en las hélices I y II,<sup>2,14,15b,17</sup> mientras que la hélice III, aunque no interviene directamente en la interacción, es necesaria para que ésta se produzca, ya que sin ella la estructura tridimensional del dominio no se conserva.<sup>15b,17a,c,18</sup> En un principio, la presencia de la hélice III en el complejo SpA<sub>B</sub>:Fc fue motivo de controversia, debido a que las estructuras deducidas por rayos X la mostraban en forma extendida y sin contactos con el resto del sistema. Estudios posteriores revelaron, sin embargo, que esta zona del dominio no tan sólo se encontraba estructurada tanto en

el dominio libre como en el complejo, sino que, como se ha comentado antes, era totalmente necesaria para que el dominio B desarrollara su actividad. La ausencia de la hélice III en la estructura determinada por rayos X ha sido atribuida a fenómenos artefactuales derivados de las fuerzas del empaquetamiento cristalino.<sup>17a,c,18,19</sup>

## **1.2 Precentes del trabajo con el dominio B**

El dominio B de la proteína A ha sido empleado en nuestro grupo como modelo de trabajo en las tesis doctorales de Yolanda Sánchez y M<sup>a</sup> José González, ambas destinadas a comprobar la validez del *concepto retro-enantio*<sup>20</sup> aplicado a hélices  $\alpha$ . Para ello, Yolanda Sánchez sintetizó el dominio B natural por síntesis convencional de péptidos en fase sólida, así como tres variantes de éste: i) uno donde la hélice III era sustituida por un análogo de igual secuencia pero formado íntegramente por aminoácidos D; ii) uno donde era sustituida por su retro-análogo; iii) finalmente, uno donde la hélice III se sustituía por su análogo retro-enantio, es decir, un péptido formado íntegramente por aminoácidos D y de secuencia inversa a la natural. La caracterización de los diferentes compuestos demostró que sólo el dominio natural era capaz de adoptar una estructura tridimensional estable y conservar la actividad de unión a IgG, ofreciendo las primeras evidencias sobre la no aplicabilidad del concepto retro-enantio a hélices  $\alpha$ .<sup>21</sup> Por su parte, M<sup>a</sup> José González dividió el dominio B en dos péptidos independientes: uno formado por las hélices I y II ( $H_{I-II}$ ) y otro formado por la hélice III ( $H_{3_n}$ ), estudiando la interacción no covalente entre ellos y entre  $H_{I-II}$  y los derivados retro, enantio y retro-enantio de la hélice III. Los resultados obtenidos fueron análogos a los anteriores.<sup>22</sup> De las cuatro “hélices III”, sólo la natural era capaz de interaccionar con las hélices I-II, dando lugar a un complejo no covalente análogo al dominio B natural, pero menos estructurado y estable. Estos resultados corroboraban que el *concepto retro-enantio* no era válido para hélices  $\alpha$ , además de comprobar que los péptidos  $H_{I-II}$  y el péptido  $H_{3_n}$  interaccionaban en disolución formando pseudo-dominios B no covalentes.

## **1.3 Diseño de la estrategia combinatorial general**

De lo hasta aquí expuesto, era posible establecer una serie de premisas importantes a la hora de diseñar nuestra metodología combinatorial:

- La síntesis del dominio B completo por síntesis convencional de péptidos en fase sólida era posible. Aun así, la pureza de los crudos obtenida resultaba insuficiente para su aplicación directa a ensayos de actividad. Por tanto, una metodología basada en la síntesis de

quimiotecas de dominios B modificados sería únicamente factible por síntesis en paralelo de los diferentes candidatos, para permitir su posterior purificación de forma previa a la realización de cualquier ensayo. Esto suponía una limitación importante en el número de compuestos que podría contener cada quimioteca, más teniendo en cuenta el tamaño del dominio.

- Por otro lado, la síntesis de la hélice III natural y de análogos de ésta podía realizarse por síntesis convencional en fase sólida, obteniendo crudos de pureza aceptable para su aplicación directa a ensayos de actividad.

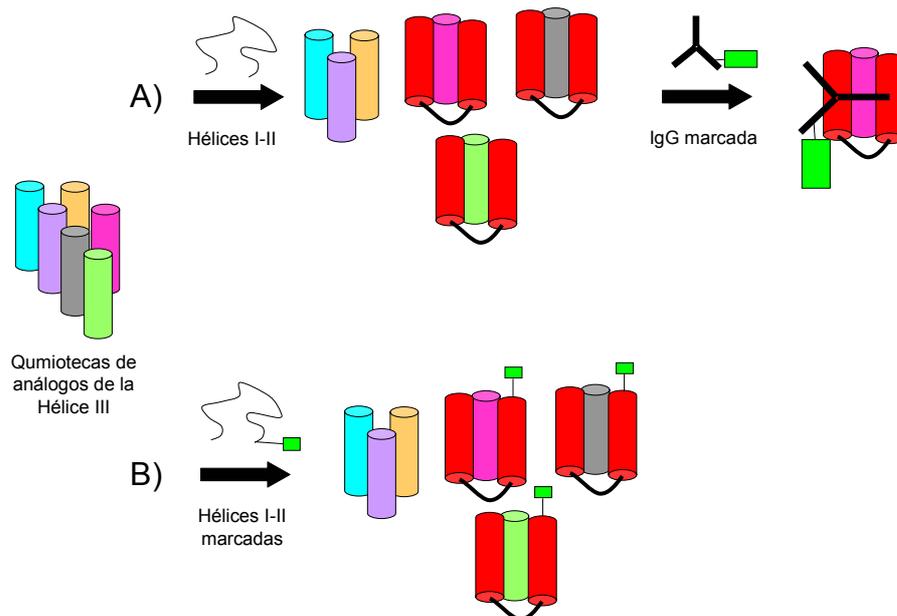
- $H3_n$  era además capaz de interactuar con  $H_{I-II}$  de forma no covalente, dando lugar a complejos análogos al dominio B natural pero de menor estabilidad (la actividad no había sido estudiada). En cambio, derivados de la hélice III que unidos covalentemente a las otras dos hélices se había comprobado que no daban lugar a dominios activos, no eran capaces de interactuar con ellas de forma no covalente, aun después de la adición de grandes cantidades de trifluoroetanol para favorecer la estructuración.

A partir de estas observaciones, del dominio natural escogido como modelo de trabajo y teniendo en cuenta el objetivo principal de la presente tesis, este objetivo se concretó en el *diseño de una metodología combinatoria para la modificación de la hélice III natural del dominio B, definiendo compuesto activo como aquél capaz de interactuar con las hélices I-II naturales de forma no covalente generando un complejo de estructura análoga a la del dominio B natural, y, por tanto, con actividad de unión a IgG*. Para ello se idearon las siguientes estrategias generales (Figura 4):

- *Estrategia A*: la primera estrategia planteada se basaba en las síntesis de quimiotecas de análogos de la hélice III natural y su ensayo en dos fases. En la primera fase, estos análogos se incubaban con las hélices I-II naturales para la formación de los pseudo-dominios B no covalentes, los cuales serían detectados en la segunda fase empleando IgG marcadas. Sólo aquellos análogos capaces de formar el complejo e inducir a las hélices I-II a estructurarse de la misma forma que en el dominio natural serían capaces de unir el anticuerpo.

- *Estrategia B*: la segunda estrategia partía de la misma base que la anterior, realizando ahora la evaluación de los compuestos en una única fase, empleando el péptido  $H_{I-II}$  convenientemente marcado. Al contrario que en el caso anterior, esta estrategia permitiría detectar qué candidatos de la quimioteca eran capaces de interactuar de forma no covalente con el resto del dominio natural, sin tener en cuenta la estructura general de complejo no covalente ni si éste desarrollaba o no alguna actividad.

Como puede apreciarse, aunque la primera estrategia era mucho más exigente y, por tanto, ofrecía menos probabilidades de encontrar compuestos activos, los positivos obtenidos resultarían de mayor calidad, ya que no solamente serían capaces de interactuar con las hélices I-II, sino que lo harían formando dominios de estructura adecuada. En otras palabras, estos compuestos serían capaces de desarrollar todas las funciones de la hélice III natural, lo cual se ajustaba más al



**Figura 4** Representación esquemática de las estrategias generales planteadas para la modificación de la hélice III del dominio B por química combinatoria. Partiendo de quimiotecas de análogos de la hélice III, la estrategia A plantea el ensayo de los compuestos en dos fase, empleando para la detección de compuestos activos IgG marcadas. La estrategia B, en cambio, plantea un ensayo en una única fase basado en el uso de un péptido conteniendo las hélices I y II ( $H_{I-II}$ ) marcado convenientemente.

objetivo de este trabajo. Por ello se decidió adoptar la primera estrategia para el desarrollo de nuestra metodología combinatoria, dejando la segunda reservada para aquellas quimiotecas en las que no se encontrase ningún compuesto activo por la primera vía. Las secuencias de los péptidos hélice III natural ( $H_{3_n}$ ) y hélices I-II naturales ( $H_{I-II}$ ) se definieron basándonos en el trabajo descrito en la tesis de M<sup>a</sup> José González (Figura 5).<sup>22</sup>

## 2. Estrategia para la síntesis de las quimiotecas

Una vez definido el modelo de trabajo y las propiedades que buscábamos en un compuesto activo, el siguiente paso en el diseño de la metodología combinatoria fue la elección del tipo de



**Figura 5** Secuencias de los péptidos  $H_{I-II}$  y  $H_{3_n}$  empleadas para el desarrollo de la metodología combinatorial.

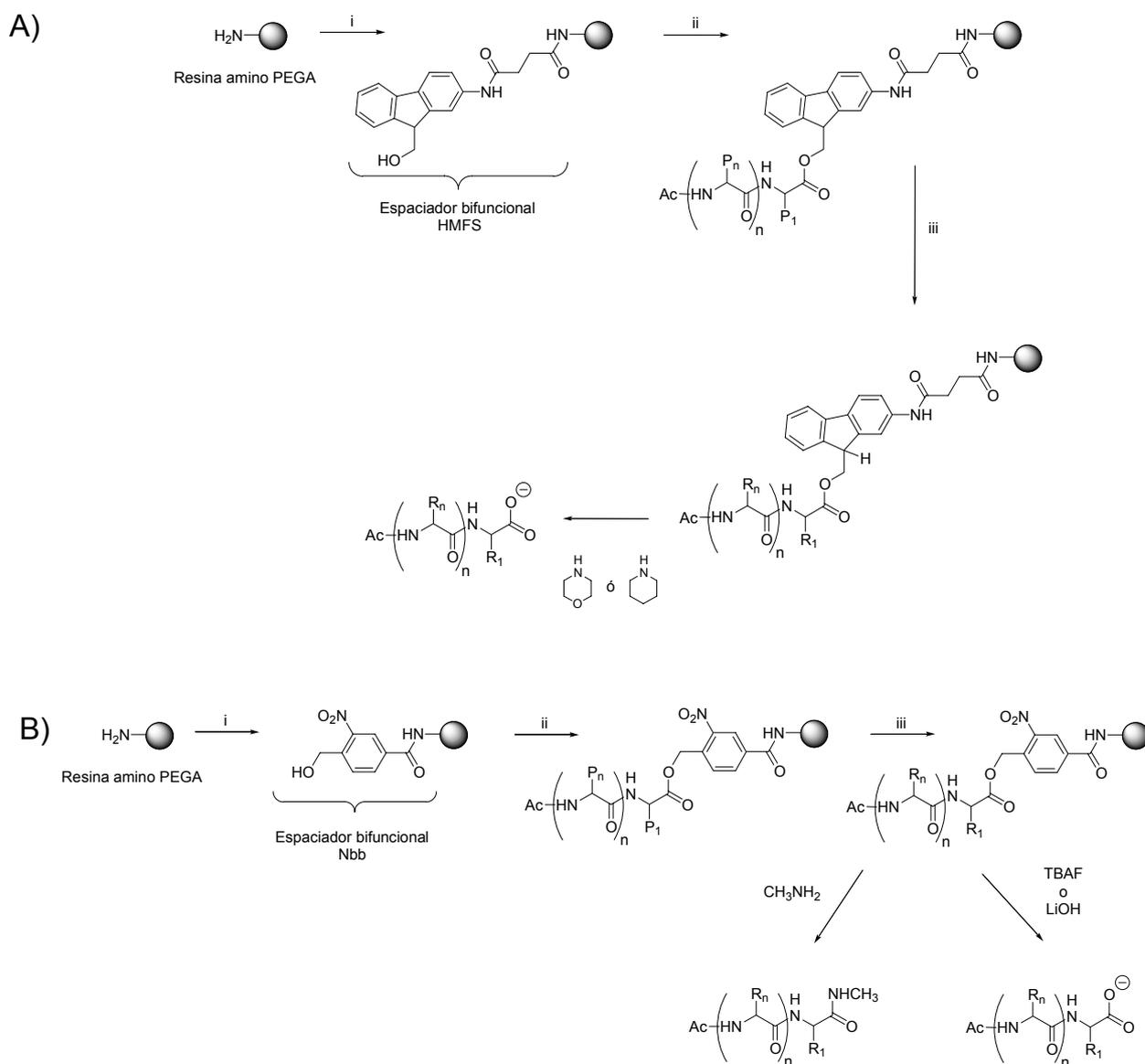
quimiotecas a preparar y de la estrategia a seguir para su síntesis. Para ello debía tenerse en cuenta tanto el número de candidatos de las quimioteca como la estructura general de éstos (péptidos de 22 aminoácidos, en principio). En nuestro caso decidimos optar por un tipo de quimiotecas que, sin necesidad de realizar los ensayos de actividad con mezclas de péptidos, nos permitiese la síntesis y evaluación de grandes cantidades de compuestos (de centenas a millares). De las diferentes metodologías químicas existentes (ver apartado 2.1 de la Introducción), la que mejor se adaptaba a nuestros objetivos era la de *mezcla y separación*<sup>23</sup> asociada a un ensayo de actividad con los péptidos unidos a un soporte sólido, ya que cumplía todos los requisitos comentados gracias a que los candidatos se encontrarían físicamente aislados en unidades de resina diferentes. Factores adicionales que contribuyeron a esta decisión fueron la fácil adaptabilidad de la metodología y el hecho de que no necesitaba ningún tipo de instrumentación especial, pudiéndose llevar a cabo con las mismas herramientas utilizadas para la síntesis manual de péptidos individuales, todas ellas disponibles en nuestro laboratorio.

Esta decisión nos condujo a la necesidad de disponer de una estrategia sintética que permitiese la obtención de péptidos desprotegidos unidos al soporte sólido de síntesis, además de un sistema para secuenciar los péptidos contenidos en las unidades de resina que se revelasen positivas (ver Introducción 2.1.5). Los estudios realizados previamente en nuestro grupo con el dominio B basaron la síntesis de todos los péptidos en el uso del *esquema de protección Boc/Bn*, con excelentes resultados,<sup>22</sup> lo que hizo que nos decantáramos por este tipo de esquema sintético para la obtención de nuestras quimiotecas. A partir de aquí, disponíamos de dos opciones: i) unir los péptidos sintetizados de forma irreversible al soporte sólido de síntesis y emplear sistemas de codificación (*tagged methodologies*),<sup>24</sup> de *secuenciación iterativa*<sup>25</sup> o la secuenciación de Edman<sup>23c,26</sup> para la identificación de positivos; ii) desarrollar un esquema sintético ortogonal que, mediante el uso de un espaciador bifuncional adecuado, permitiese la síntesis y desprotección de los péptidos sin que ello supusiese su liberación, la cual se realizaría de forma controlada después del ensayo de actividad para la caracterización de los positivos.

De las dos opciones planteadas, la primera presentaba claras desventajas con respecto a la segunda. Para empezar, la estructura general de los compuestos a sintetizar, basada en la estructura de H3<sub>n</sub> (Figura 5), disponía del extremo N-terminal acetilado, por lo que el uso de la degradación de Edman para su secuenciación no resultaba viable, además de la excesiva lentitud y coste que ello implicaría (1h por aminoácido aproximadamente). La secuenciación iterativa requeriría de la síntesis de porciones de la quimioteca varias veces para llegar a la secuencia de algún péptido activo, lo cual resultaba también lento y costoso. Finalmente, la secuenciación empleando sistemas de codificación no garantizaba que las secuencias obtenidas se correspondiesen con los productos realmente contenidos en las unidades de resina, ya que en ningún momento éstos serían analizados.<sup>27</sup> Empleando la segunda aproximación, la secuenciación se realizaría directamente a partir del producto desanclado de la resina, lo cual aseguraba que la secuencia obtenida sería correcta y nos permitiría conocer la presencia de impurezas de síntesis en la unidad de resina. Éste último era un factor importante a tener en cuenta, ya que altos niveles de impurezas podrían derivar en fenómenos de cooperatividad de respuesta al ensayo de actividad o en unidades de

resina donde el compuesto realmente activo fuese la impureza y no el supuesto candidato. Sin un análisis directo del producto, llegar a este tipo de deducciones sería imposible.

En resumen, el diseño de la estrategia sintética para la obtención de las quimiotecas nos



**Figura 6** Rutas sintéticas diseñadas para la obtención de las quimiotecas de derivados de la hélice III del dominio B. (A) Estrategia HMFS/Boc/Bn. Partiendo de la cantidad adecuada de resina PEGA, se procede a la incorporación del espaciador bifuncional (i) y a la elongación de la cadena siguiendo un esquema de protección Boc/Bn (ii). Tras la acetilación del extremo N-terminal se realiza la desprotección de las cadenas laterales (iii), obteniéndose el péptido desprotegido unido a resina. Este puede ser liberado fácilmente por tratamiento de la peptidil-resina con morfolina o piperidina. (B) Estrategia Nbb/Boc/Bn. El procedimiento de síntesis (pasos i, ii y iii) es el mismo que para la ruta A, excepto para la liberación del péptido, que en este caso puede realizarse con TBAF ó LiOH, si se desea obtener el péptido con el extremo C-terminal en forma de ácido carboxílico, o con  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  si se desea en forma de metilamida. En ambas rutas las cadenas laterales de los aminoácidos se representan como Pn en su forma protegida y como Rn en la desprotegida.

condujo hacia el uso de *quimiotecas* “one-bead-one-compound”, sintetizadas empleando un esquema de *protección Boc/Bn* y un *espaciador bifuncional* que permitiese disponer de los péptidos desprotegidos unidos al soporte de síntesis, los cuales podrían ser liberados posteriormente para su caracterización. Partiendo de estas premisas se diseñaron las estrategias sintéticas que se detallan en la Figura 6. Como puede apreciarse, ambas rutas eran prácticamente análogas y permitían el acceso al mismo tipo de productos, difiriendo únicamente en el espaciador bifuncional empleado: el ácido *N*-[(9-hidroximetil)-2-fluorenil] succinámico (HMFS) o el ácido 4-hidroximetil-3-nitrobenzoico (Nbb).

## 2.1 Resina PEGA: un soporte compatible con medios acuosos

El trabajo con quimiotecas “one-bead-one-compound” requiere el uso de soportes sólidos compatibles tanto con los disolventes orgánicos utilizados durante la síntesis, como con el medio acuoso donde se realizan los ensayos de actividad, el cual debe ser además estable a todos los reactivos con los que vaya a entrar en contacto. De las dos resinas más comúnmente empleadas por este tipo de metodologías, la resina TentaGel y la resina PEGA,<sup>28</sup> la primera ha demostrado no ser estable al tratamiento con HF requerido para la desprotección de las cadenas laterales de los péptidos sintetizados por química Boc/Bn,<sup>29</sup> lo cual nos llevó a escoger la segunda como soporte para la síntesis de nuestras quimiotecas.

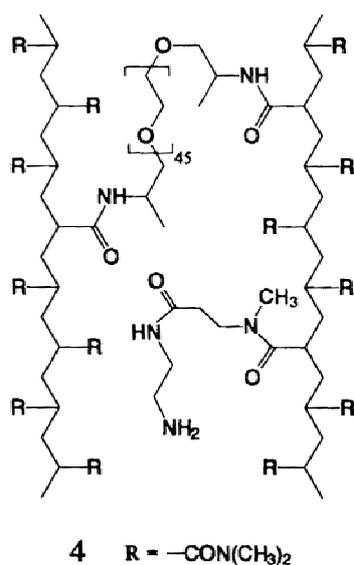


Figura 7 Estructura de la resina PEGA

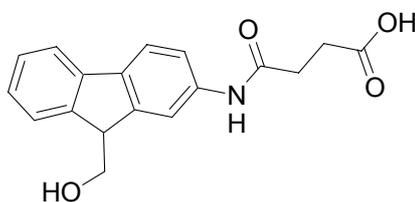
La resina PEGA fue desarrollada en 1992 por Meldal y col. a partir de la copolimerización de bisacrilamido polietilenglicol, *N,N*-dimetilacrilamida y monoacrilamido polietilenglicol o el éster etílico de la acrililsarcosina (Figura 7).<sup>30</sup> La resina, ideada en principio para la síntesis de péptidos de forma automática con sistemas de flujo continuo, presentaba unas propiedades ideales que la convirtieron en seguida en uno de los soportes base para el trabajo con quimiotecas evaluadas con los péptidos unidos a fase sólida,<sup>31</sup> lo cual aún hoy es aplicable.<sup>32</sup> Entre estas propiedades no tan sólo destacaba su capacidad de solvatar bien en disolventes de todo tipo, sino también su flexibilidad, la cual permitía a los péptidos unidos comportarse de forma muy similar a como lo harían en disolución, la disminución de problemas de agregación en la síntesis de secuencias difíciles y su elevado tamaño de poro, que daba acceso al interior de la resina a sistemas de hasta

50 kDa.<sup>33</sup> La resina PEGA había demostrado además presentar una menor problemática en el desarrollo de ensayos biológicos sobre péptidos, como demostraron Leon y col.<sup>34</sup> y Bradley y

col.<sup>35</sup> Ambos autores, en trabajos independientes, sintetizaron la misma quimioteca sobre resina PEGA, TentaGel y en disolución, comprobando que únicamente la quimioteca sintetizada sobre resina PEGA era capaz de revelar compuestos activos y que existía una excelente correlación entre los positivos encontrados en esta quimioteca y los encontrados en disolución.

A pesar de todas las ventajas que la resina PEGA presentaba frente a otras dirigidas a su uso en química combinatoria, existía un inconveniente importante que debía ser considerado, más al pretender trabajar con quimiotecas “one-bead-one-compound”. La resina PEGA, aunque resistente a la síntesis por flujo continuo, es *extremadamente sensible a la acción de fuerzas mecánicas*, las cuales pueden destrozar literalmente y con gran facilidad las unidades de resina, en condiciones donde otras resina permanecen intactas. Por ello, era necesario evitar en la medida de lo posible cualquier tipo de agitación mecánica durante su manipulación para mantener su integridad, ya que durante la evaluación de las quimiotecas la coloración de las unidades de resina sería la que nos indicaría la localización de los compuestos activos, para lo que resultaba imprescindible disponer de unidades de resina.

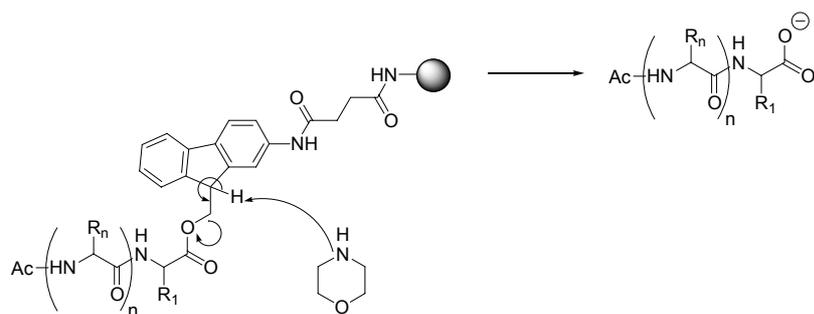
## 2.2 El espaciador bifuncional HMFS



**Figura 8** Estructura del espaciador bifuncional HMFS.

El espaciador bifuncional ácido *N*-[(9-hidroximetil)-2-fluorenil] succinámico o HMFS (Figura 8) fue desarrollado en 1992 por Rabanal y col. dentro de nuestro grupo de investigación para la obtención de péptidos protegidos en disolución, aplicados a la síntesis de péptidos por estrategias convergentes.<sup>36</sup> Su estructura, inspirada en el grupo protector Fmoc, hacen el enlace péptido-espaciador estable a las condiciones de síntesis por química Boc/Bn, siendo posible liberar el péptido cuantitativamente y de forma ortogonal mediante el uso de bases, por un mecanismo de  $\beta$ -eliminación (Figura 9).<sup>37</sup> El potencial que este espaciador bifuncional ofrecía quedó rápidamente demostrado por Sakakibara y col. con la síntesis de la *Proteína Fluorescente Verde (Aquorea Green Fluorescent Protein)*, de 238 aminoácidos.<sup>38</sup>

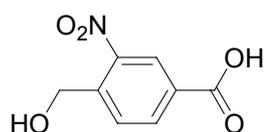
La elección del HMFS como una de las opciones para el desarrollo de la estrategia sintética vino determinada por la experiencia que el grupo poseía tanto en su síntesis como en el trabajo con él. El problema que a priori se nos presentaba era que la estabilidad del enlace péptido-espaciador



**Figura 9** Mecanismo de liberación de los péptidos unidos al espaciador HMFS, empleando morfolina como base. Rn simboliza la cadena lateral de cualquier aminoácido, en su forma tanto protegida como desprotegida.

frente al HF no había sido probada, ya que hasta el momento se había empleado únicamente en la síntesis de fragmentos protegidos. Aún así, su similitud con el Fmoc permitía anticipar la estabilidad de este enlace. La gran ventaja que ofrecía este espaciador sobre otros posibles<sup>39</sup> era la limpieza y suavidad de las condiciones en las que se producía la liberación del péptido. En caso que la estrategia fuera satisfactoria, no tan solo sería posible obtener péptidos desprotegidos unidos a fase sólida, sino su desanclaje en caso necesario para ser ensayados en disolución tras la simple evaporación de los reactivos (morfolina o piperidina y DMF).

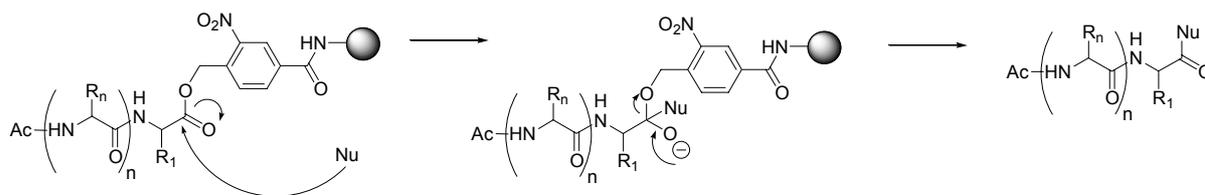
### 2.3 El espaciador bifuncional Nbb



**Figura 10** Estructura del espaciador bifuncional Nbb.

El espaciador bifuncional 4-hidroximetil-3-nitrobenzoico o Nbb (Figura 10) fue utilizado también en nuestro grupo por Giralt y col. para la síntesis de fragmentos protegidos.<sup>40</sup> Aunque en un principio la liberación de los péptidos se realizaba por fotólisis, la posibilidad de llevar a cabo el desanclaje por ataque nucleófilo y modificar así el extremo C-terminal de los péptidos sintetizados, llevaron a la optimización de diferentes metodologías que permitían la obtención de los productos con diferentes funcionalidades en ese extremo (Figura 11).<sup>41</sup> A modo de ejemplo destacaremos el uso de TBAF o LiOH para la obtención de fragmentos en forma de ácido carboxílico, de MeOH para obtenerlos en forma de éster metílico o de CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> para obtenerlos en forma de metilamida.

La elección del Nbb para el desarrollo de la estrategia sintética vino determinada por las mismas razones que en el caso anterior: la experiencia que el grupo disponía en el trabajo con él.



**Figura 11** Mecanismo de liberación de los péptidos unidos al espaciador Nbb por ataque nucleófilo (Nu). Rn simboliza la cadena lateral de cualquier aminoácido, en su forma tanto protegida como desprotegida.

De igual forma que para el espaciador HMFS, la estabilidad del enlace péptido-espaciador frente al HF no había sido comprobada, pero su estructura permitía intuir la inestabilidad del hipotético carbocatión que pudiera generarse durante el tratamiento y, por lo tanto, que el enlace sería estable. Frente al HMFS y otros posibles espaciadores, el Nbb disponía de la ventaja de permitir obtener los péptidos con diferentes extremos C-terminales, según se deseara. Por otro lado, sin embargo, algunos de los reactivos propuestos para el desanclaje permanecían en el crudo después de la evaporación del disolvente, lo cual haría necesario purificar los productos en caso de que éstos pudieran interferir en el análisis o ensayo en disolución de los candidatos.

### 3. Ensayo de actividad para la evaluación de las quimiotecas

El diseño del ensayo para la evaluación de las quimiotecas se llevó a cabo según el esquema A de la Figura 4, con la única diferencia que ahora debía ser adaptado para realizarse sobre péptidos desprotegidos unidos al soporte sólido de síntesis. En realidad, el tipo el ensayo se encontraba ya diseñado, quedando por decidir únicamente una serie de detalles, que aunque importantes, representaban simplemente el punto de partida para su optimización y podrían ser variados convenientemente durante este proceso en caso necesario.

En primer lugar, era necesario decidir que disolución reguladora debía utilizarse en los experimentos. Del estudio de la bibliografía descrita sobre el dominio B<sup>15,17,19,21,22,42</sup> se pudo deducir que tanto los ensayos de interacción como los estudios estructurales del dominio habían sido desarrollados principalmente en tampones fosfato, a pH cercanos o iguales al pH fisiológico y con fuerzas iónicas elevadas (adición de otras sales como NaCl o KCl), por lo se optó por iniciar la optimización con un tampón de este tipo (tampón fosfato 10 mM, pH = 7.4-7.5 y NaCl 100 mM).

En segundo lugar, se decidió desarrollar el ensayo para muestras de aproximadamente 1000 unidades de resina, de forma que su manipulación durante el ensayo y en el momento de ser observadas bajo el microscopio no fuese extremadamente difícil.\* Como anticuerpo para el

\* A la hora de analizar por microscopía una muestra de 4000 unidades de resina, resulta más sencillo y eficaz trabajar con cuatro muestras de 1000 unidades que con una única de 4000. En muestras pequeñas es fácil controlar si todas las bolas de resina han sido observadas y si todos los positivos han sido capturados. La dificultad de este proceso

reconocimiento de los dominios B no covalentes formados se escogió IgG de conejo, una de las de mayor afinidad por el dominio B (Tabla 1). De esta forma se intentó compensar la pérdida de estabilidad del complejo IgG-dominio B al trabajar con dominios no covalentes. Además se decidió emplear inmunoglobulinas marcadas con fluorescencia por la misma razón. Aunque el revelado de unidades de resina activas puede realizarse tanto por medios colorimétricos como fluorescentes,<sup>43</sup> la sensibilidad de éstos últimos es mucho mayor. La pérdida de estabilidad del complejo conllevaría seguramente que sólo una pequeña cantidad de IgG permanecería unida a las unidades de resina positivas tras los lavados finales, por lo que resultaba imprescindible elevar al máximo la sensibilidad de la detección. En concreto se encogió una *IgG de conejo marcada con fluoresceína* (excitación bajo luz azul, emisión en verde), marcador ya empleado en el análisis de quimiotecas “one-bead-one-compound” sintetizadas sobre resina PEGA con muy buenos resultados.<sup>44</sup>

Las cantidades concretas de cada uno de los reactivos ( $H_{I-II}$  y IgG) no se decidieron hasta el inicio de la optimización del ensayo. Lo que sí quedó establecido fue no incorporar etapas de lavado entre la adición de  $H_{I-II}$  y de la IgG. La principal razón fue la de mejorar la respuesta del ensayo, ya que la presencia simultánea de  $H_{I-II}$  e IgG podría ayudar desplazar el equilibrio hacia la formación de más dominios no covalentes, con el consiguiente aumento en la respuesta al ensayo. La incorporación de una etapa de lavado intermedia eliminaría la presencia de  $H_{I-II}$  libre en el medio y, por tanto, la posibilidad de que esto ocurriese.

El diseño del ensayo de actividad finalizó con la elección de los compuestos que se usarían como controles positivo y negativo durante el proceso de optimización. Como control positivo se decidió emplear la hélice III natural ( $H_{3_n}$ ) del dominio B, que como ya se había comprobado, era capaz de interactuar con las hélices I y II naturales ( $H_{I-II}$ ) dando lugar a la formación de pseudo-dominios B no covalentes.<sup>22</sup> Como control negativo se decidió emplear un péptido de composición análoga a la de  $H_{3_n}$  pero de secuencia aleatoria. A la hora de determinar la secuencia de este péptido se impusieron, sin embargo, dos condiciones: i) ausencia del par Asp-Pro, cuyo enlace amida es *fácilmente hidrolizable* en medios acuosos ácidos<sup>45</sup> y podía, por tanto, plantear problemas durante la síntesis; ii) disponer de una *baja tendencia a la formación de hélices  $\alpha$*  que asegurase su inactividad, para lo cual las dos Pro que contiene el péptido  $H_{3_n}$ , aminoácido con conocida tendencia a la ruptura de estructuras secundarias helicoidales,<sup>46</sup> fueron fijadas en las posiciones 7 y 15 de la secuencia. La posición del resto de los aminoácidos del control negativo, bautizado como  $H_{3_a}$ , fue determinada totalmente al azar. La Figura 12 muestra las secuencias de ambos controles así como la predicción de su estructura secundaria, calculada a partir del programa SOPMA.<sup>47</sup> Como puede apreciarse,  $H_{3_a}$  no presentaba una marcada tendencia a adoptar estructura secundaria, como era deseable, al contrario que la hélice III natural, con una elevada tendencia a adoptar una estructura de hélice  $\alpha$ .

---

crece sobremanera con el tamaño de la muestra. Además debe tenerse en cuenta que la labor del operador de esta forma resulta más amena y menos cansada. *Michal Lebl, comunicación personal.*

**H3<sub>n</sub>**: Ac-DPSQSANLLEAEKKLNDAQAPK-NH<sub>2</sub>

**H3<sub>a</sub>**: Ac-AQKQASPDALAKNLPKADNASL-NH<sub>2</sub>

```
DPSQSANLLEAEKKLNDAQAPK
ccchhhhhhhhhhhhhhhccc
Sequence length : 22
SOPMA :
Alpha helix (Hh) : 16 is 72.73%
310 helix (Gg) : 0 is 0.00%
Pi helix (Ii) : 0 is 0.00%
Beta bridge (Bb) : 0 is 0.00%
Extended strand (Ee) : 0 is 0.00%
Beta turn (Tt) : 0 is 0.00%
Bend region (Ss) : 0 is 0.00%
Random coil (Cc) : 6 is 27.27%
Ambiguous states (?) : 0 is 0.00%
Other states : 0 is 0.00%
```

**H3<sub>n</sub>**

```
AQKQASPDALAKNLPKADNASL
ccccchhhhhhhhhhhhhctH
Sequence length : 22
SOPMA :
Alpha helix (Hh) : 8 is 36.36%
310 helix (Gg) : 0 is 0.00%
Pi helix (Ii) : 0 is 0.00%
Beta bridge (Bb) : 0 is 0.00%
Extended strand (Ee) : 0 is 0.00%
Beta turn (Tt) : 1 is 4.55%
Bend region (Ss) : 0 is 0.00%
Random coil (Cc) : 13 is 59.09%
Ambiguous states (?) : 0 is 0.00%
Other states : 0 is 0.00%
```

**H3<sub>a</sub>**

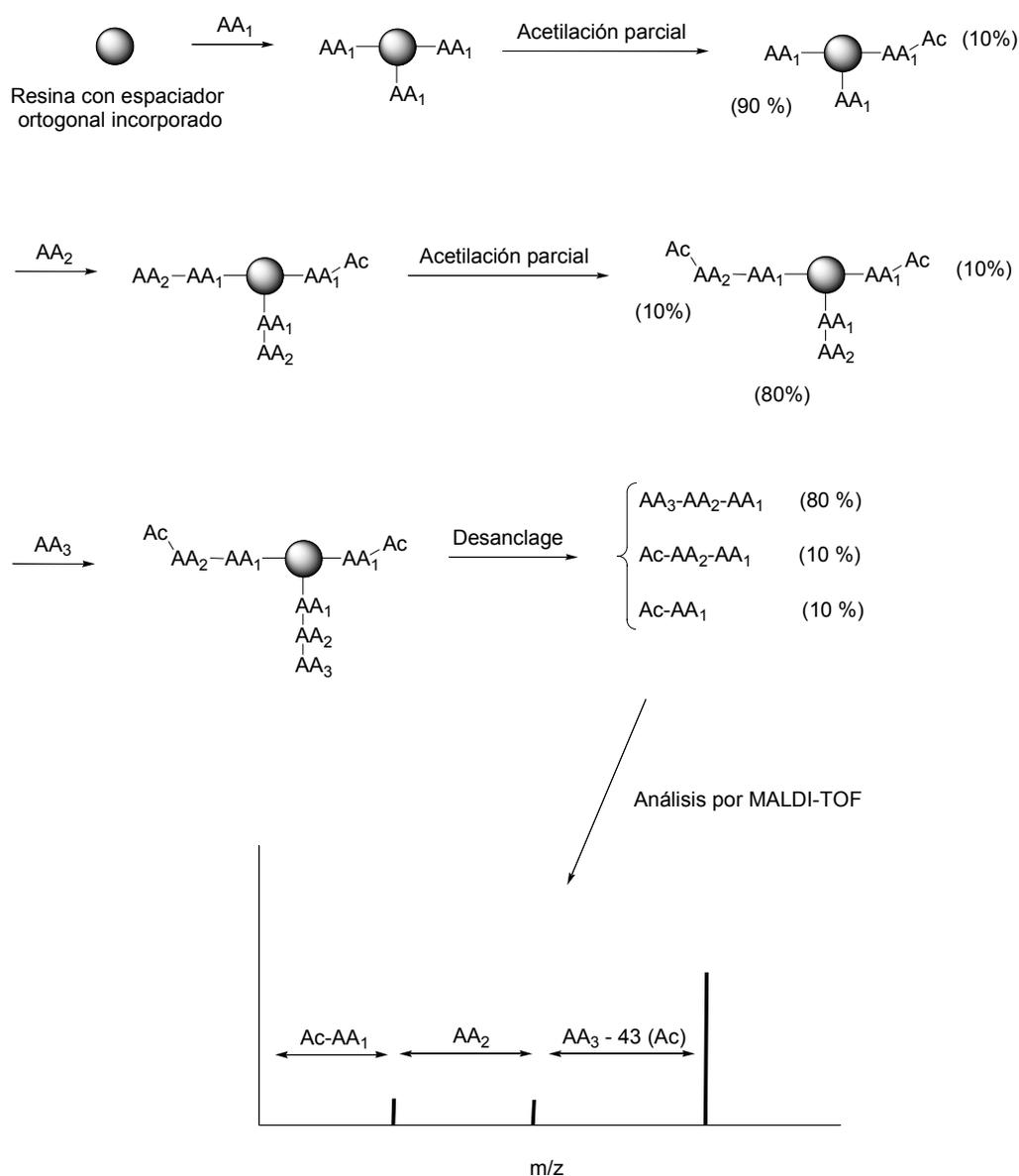
**Figura 12** Secuencia de los péptidos H3<sub>n</sub> y H3<sub>a</sub> escogidos como controles positivo y negativo para la optimización del ensayo de actividad. Los aminoácidos se representan en código de una letra con el extremo N-terminal acetilado y el C-terminal en forma de amida. En la parte inferior se muestran los resultados de los cálculos de predicción de estructura secundaria realizados con el programa SOPMA, disponible en [www.expasy.org](http://www.expasy.org).

#### 4. Determinación de la secuencia de péptidos activos

El último paso en el diseño de la estrategia combinatoria consistía en la elección de la metodología a emplear para la secuenciación de los péptidos activos, que como ya se ha comentado en el segundo apartado de esta introducción, se había decidido llevar a cabo por análisis directo del producto contenido en las unidades de resina positivas. La metodología debía, por tanto, estar basada en el uso de una técnica de secuenciación que cumpliera los siguientes requisitos:

- Permitir la secuenciación de péptidos de 22 aminoácidos.
- Tener la capacidad de secuenciar péptidos compuestos por aminoácidos no naturales y con el extremo N-terminal modificado.
  - Elevada sensibilidad, dada la limitada cantidad de producto contenido en una unidad de resina ( $\leq 200$  pmoles).<sup>27a,48</sup>
- Rapidez y bajo coste de análisis.
- Posibilidad de automatización.

• Elevada eficacia de análisis. Este último requisito es producto del tipo de quimiotecas escogido para el desarrollo de la metodología combinatoria. Las quimiotecas “one-bead-one-compound” proporcionan como resultado de los ensayos de actividad una serie de unidades de resina, cada una de las cuales contiene, en función del tamaño de la quimioteca y de la cantidad de resina analizada, un compuesto diferente y teóricamente único (salvo impurezas). La información que obtenemos de cada una de estas unidades de resina es, por tanto, de un enorme valor, lo cual hace necesario que la mayoría, sino todos los compuestos contenidos en las unidades de resina reveladas positivas sean secuenciados.



**Figura 13** Representación esquemática de la estrategia de secuenciación de péptidos por generación de la escalera de secuencias parciales. Como puede apreciarse, la estrategia se basa en la terminación parcial de las cadenas en crecimiento tras el acoplamiento de cada aminoácido y el posterior análisis de la mezcla por espectrometría de masas MALDI-TOF. De la diferencia de masas entre picos consecutivos es posible extraer la secuencia del péptido.

Todo ello nos llevó a la elección de la espectrometría de masas como herramienta para la secuenciación de los péptidos, al ser la única de las técnicas aplicadas a este fin capaz de cumplir todos los requisitos.<sup>27b,28,43,49</sup>

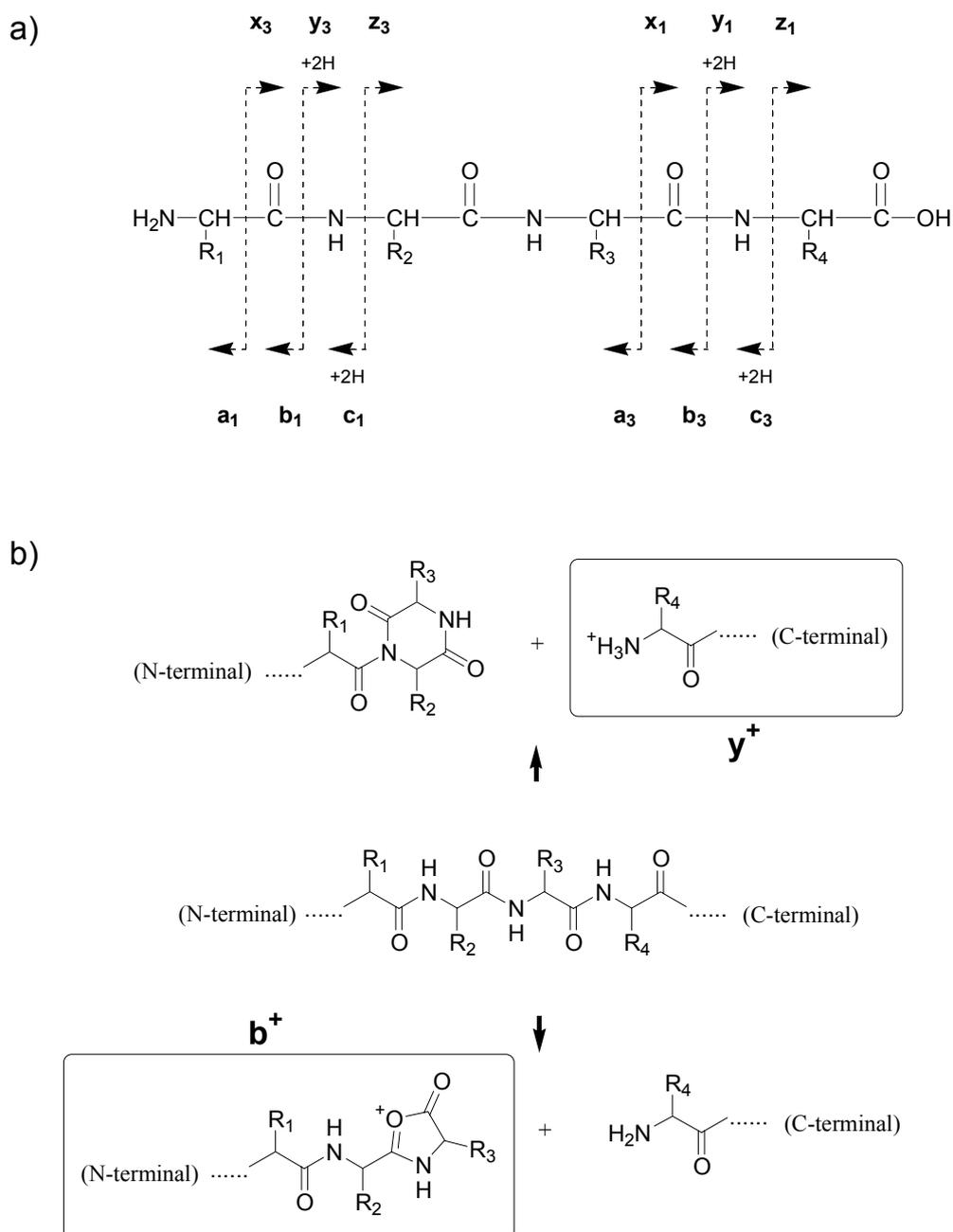
De los precedentes existentes en la bibliografía sobre secuenciación de péptidos por espectrometría de masas, dentro del marco de la química combinatoria y de las quimiotecas “one-bead-one-compound”, se extrajeron dos posibles metodologías de trabajo:

- Generación de una “*escalera*” de *secuencias parciales* durante la síntesis de los compuestos.<sup>50</sup> La metodología general (Figura 13) se basa en la terminación parcial de las cadenas en crecimiento (10% aproximadamente) después de cada uno de los pasos de separación y el análisis de la mezcla obtenida tras el desanclaje por MALDI-TOF. La diferencia de masas entre picos consecutivos permite la deducción de la secuencia del péptido, así como la caracterización de subproductos de síntesis a partir del análisis de picos “no esperados” en el espectro. En realidad esta estrategia puede ser considerada una estrategia mixta entre la secuenciación directa y los métodos de codificación, al encontrarse cada péptido codificado de alguna forma con fragmentos de él mismo.

- Secuenciación directa empleando técnicas de fragmentación, ya sea con el uso de cámaras de colisión (MS/MS ó Tandem Mass Spectrometry) o por detección de los fragmentos generados durante el paso de las moléculas de analito por analizadores de tiempo de vuelo (MALDI-TOF Post-Source Decay ó PSD).

Aunque la primera de las metodologías ofrece claras ventajas en términos de rapidez de análisis y sencillez en la interpretación de los datos obtenidos, presenta una serie de limitaciones importantes que es necesario tener en cuenta. Para empezar, la generación de estas escaleras de secuencias parciales introduce toda una serie de pasos extra en la síntesis que, aunque sencillos, ralentizan el proceso de obtención de las quimiotecas. Los inconvenientes más relevantes derivan, sin embargo, del hecho de emplear una metodología análoga a las de codificación. Para empezar, la terminación parcial de las cadenas en crecimiento disminuye la cantidad de compuesto “total” disponible en cada unidad de resina para la realización de los ensayos de actividad, ya de por sí limitada (sólo un 70% de todas las posiciones reactivas de una bola de resina contendrían el péptido de secuencia completa tras cuatro pasos de separación). De esta forma, cada vez más, restringimos la capacidad de detección de un compuesto activo a aquellos de elevada afinidad. Aunque esta limitación ha sido parcialmente resuelta por Griesinger y col., a partir de la eliminación de pasos de terminación parcial innecesarios y del uso de diferentes ácidos para la acilación,<sup>51</sup> es un factor que debe ser tenido en cuenta, más si los positivos que se esperan de una quimioteca son todos de afinidad moderada. Por otro lado, aunque el compuesto de secuencia completa y sus secuencias parciales son muy similares, encontrándose el primero además en mayor cantidad que el resto, no es posible descartar fenómenos de competición... durante el ensayo de actividad, derivados del análisis de mezclas de péptidos, ahora todos unidos a la misma unidad de resina.

Estas limitaciones nos hicieron decantarnos por el segundo tipo de metodología para la secuenciación, aun conociendo el mayor tiempo requerido para la adquisición de los espectros y la mayor dificultad que presentaba la interpretación de los datos. Sin embargo, como se explicará más adelante, una variante de la primera fue también optimizada para la secuenciación de quimiotecas de tripéptidos, en colaboración con el grupo del Prof. Mark Bradley durante una estancia realizada en el Departamento de Química de la Universidad de Southampton.



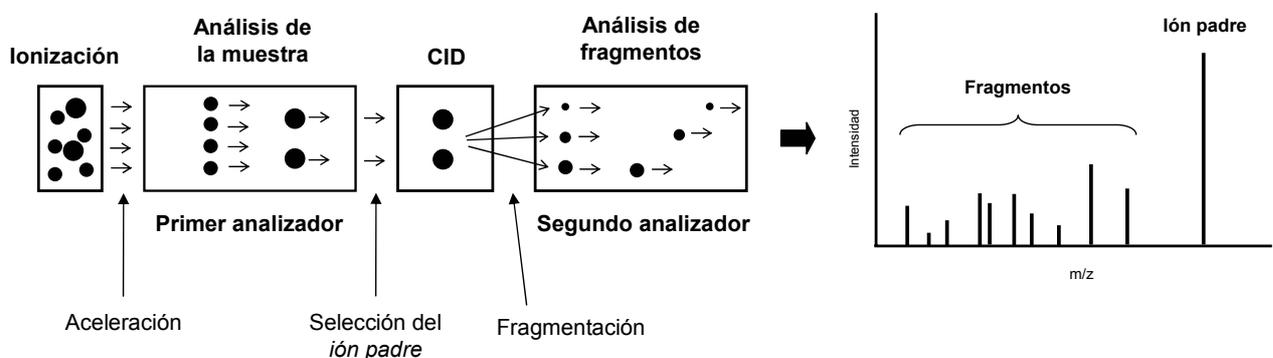
**Figura 14** a) Nomenclatura de los posibles fragmentos obtenidos de la descomposición del ión padre de un péptido durante la secuenciación por espectrometría de masas, siendo los fragmentos  $b_n$  y  $y_n$  aquellos que se dan con mayor probabilidad. b) Representación esquemática de la ruptura de un enlace peptídico por el mecanismo del *protón móvil* para dar lugar a los fragmentos  $b_n$  y  $y_n$ .

#### 4.1 ¿MS/MS ó PSD?

Las técnicas de secuenciación directa por espectrometría de masas surgen a partir de la aparición de los llamados “métodos de ionización suaves”<sup>52</sup> y del desarrollo de nuevos sistemas para el estudio de los procesos de intercambio de energía ión-molécula.<sup>53</sup> El uso de estas herramientas analíticas de forma rutinaria para la secuenciación de péptidos y proteínas se encuentra, sin embargo, fuertemente ligado a la aparición de la Proteómica y a la importancia que ésta ha adquirido en los últimos años.<sup>54</sup>

Tanto el MALDI-TOF PSD como las técnicas denominadas “Tándem” parten del mismo principio: el estudio de los fragmentos provenientes de la descomposición de los iones de un analito para la identificación de su secuencia. Ello es posible gracias a que la fragmentación que se produce en péptidos y proteínas tiene lugar principalmente sobre el enlace peptídico o cerca de él (Figura 14), por mecanismos bien conocidos.<sup>55</sup> Este patrón de fragmentación permite la secuenciación a partir de la diferencia de masas entre picos consecutivos de una misma serie ( $y_{n+1}-y_n$ ,  $b_{n+1}-b_n\dots$ ), aunque por otro lado dificulta la interpretación de los datos obtenidos, ya que en un mismo espectro encontramos los picos correspondientes a todas las series, que es necesario asignar. Esta es la principal razón por la cual, aún cuando se han desarrollado multitud de algoritmos dirigidos a la interpretación automática de los espectros, la obtención de una secuencia totalmente *de novo* no es todavía posible de forma unívoca.<sup>54a</sup> Ambas técnicas se diferencian, sin embargo, en la forma de obtener estos fragmentos y en el número de analizadores empleado.

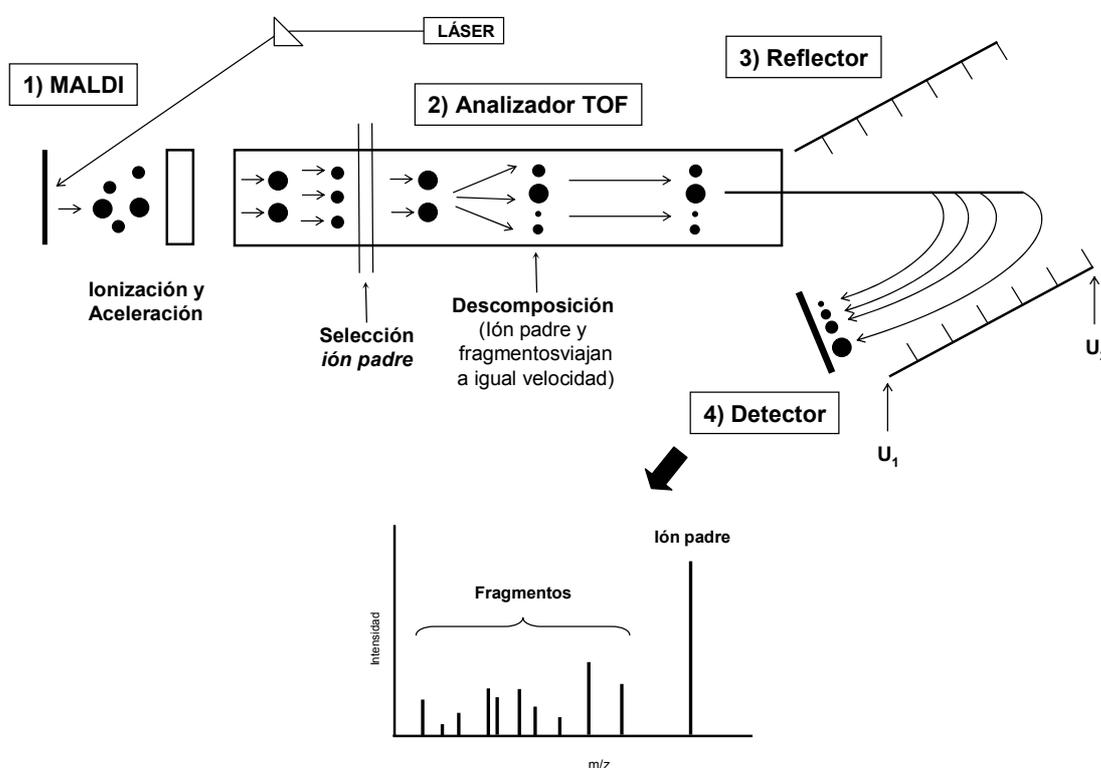
La secuenciación por MS/MS (Figura 15) se basa en el uso de dos analizadores conectados en serie, entre los cuales se inserta la llamada *cámara de colisión*. La secuenciación parte de la selección del *ión padre* (iones de masa correspondiente a la del compuesto que queremos secuenciar) al final del primer analizador. Estos son separados del resto y conducidos al interior de la cámara donde se les hace colisionar con moléculas de un gas inerte introducido en ella. Este fenómeno convierte parte de la energía cinética del ión padre en energía interna, desestabilizándolo y conduciéndolo a su descomposición, lo que origina toda una serie de fragmentos que son introducidos en el segundo analizador y separados en función de su masa. Este tipo de



**Figura 15** Esquema del proceso de obtención de espectros para la secuenciación de péptidos por MS/MS

fragmentación, conocida como *disociación inducida por colisión* o CID (*collision-induced dissociation*), es la que comúnmente se emplea para la secuenciación de péptidos por “tandem mass spectrometry”, aunque no es la única.<sup>56</sup> Los principios en los que se basa esta técnica han permitido el diseño de diferentes sistemas para la realización de los espectros, los cuales difieren entre ellos en el método utilizado para la ionización de la muestra (MALDI ó ESI) y en los pares de analizadores empleados (TOF/TOF o cuadrupolo/TOF, por ejemplo).

El MALDI-TOF PSD es una técnica muy similar pero difiere en algunos aspectos de la secuenciación por MS/MS. Para empezar, tanto la selección del ión padre como la fragmentación tienen lugar en el interior del analizador de tiempo de vuelo, ya que en este caso disponemos únicamente de un analizador (Figura 16). La excitación, por tanto, no se realiza en una cámara de colisión, sino que ocurre durante el proceso de ionización y aceleración de iones, por mecanismos varios (irradiación del láser, choques entre iones en fase gas, mecanismos térmicos, etc). Como la fragmentación aparece después de la aceleración, ión padre y fragmentos viajan a la misma velocidad por el analizador, lo que hace imposible diferenciarlos empleando detectores lineales. Es aquí donde interviene el reflector: una cámara capaz de separar iones por su relación  $m/z$  a partir de la aplicación de una diferencia de potencial. En este punto, los diferentes fragmentos pueden ser separados y detectados con masa correcta. El problema que se presenta es que el reflector sólo puede enfocar hacia el detector los iones de un determinado rango de masas, por lo que el análisis

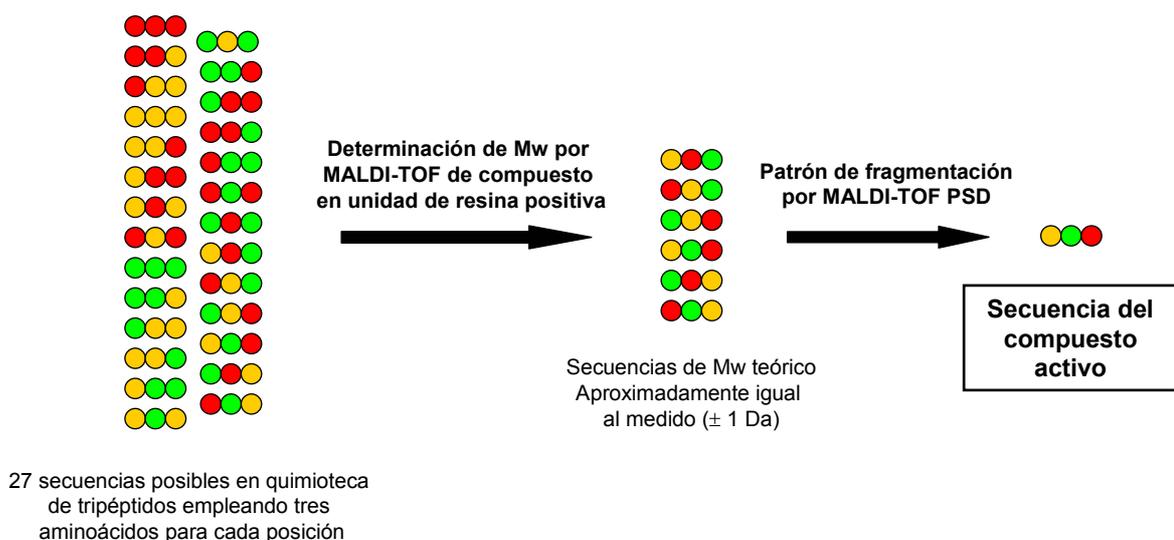


**Figura 16** Esquema del proceso de obtención de espectros para la secuenciación de péptidos por MALDI-TOF PSD. En la figura se encuentran especificados los componentes del sistema involucrados (fuente de ionización MALDI, analizador TOF...), por orden de intervención, así como los diferentes fenómenos que tienen lugar durante la realización de los espectros.

por PSD de un péptido requiere de la realización de varios espectros durante los cuales se varían los potenciales del reflector, de forma que sea posible detectar los fragmentos de todas las masas. El paso final del análisis consiste en la suma de todos estos espectros para la obtención de un espectro total que contiene todos los fragmentos registrados.<sup>57</sup>

De la comparación de ambas técnicas es posible deducir que la secuenciación por MS/MS ofrece mayores ventajas que el uso de MALDI-TOF PSD. Así, la adquisición de espectros es más rápida, ya que no es necesario realizar varios análisis de la misma muestra al disponer de un segundo analizador, el cual permite registrar todos los fragmentos de una sola vez. Esto mismo hace la calibración mucho más sencilla, ya que los espectros de PSD requieren de calibraciones especiales al trabajar con voltajes variables de reflector.<sup>57</sup> Finalmente, la cantidad de fragmentos producidos por MS/MS es menor que la que se genera en el análisis por PSD, donde además de los picos correspondientes a las series de fragmentación típicas ( $b_n/y_n$ ) se generan una gran cantidad de fragmentos internos, normalmente asociados a la presencia de prolinas en el compuesto. Aún así, en el momento en que la metodología fue diseñada y optimizada, el grupo de trabajo tenía acceso únicamente a sistemas capaces de realizar espectros PSD y no de MS/MS, lo cual nos llevó a escoger esta técnica para la secuenciación de positivos.

Aunque la bibliografía proporcionaba indicios de que la secuenciación directa por espectrometría de masas era adecuada para la identificación de positivos en quimiotecas “one-bead-one-compound”,<sup>58</sup> la secuenciación de moléculas desconocidas a partir de espectros de fragmentación no es todavía posible, como ya se ha comentado anteriormente. Esto que en principio se planteaba como un gran inconveniente, no lo era tanto si teníamos en cuenta que en realidad no se pretendía la secuenciación de un péptido totalmente desconocido, sino la identificación de una de las secuencias (compuesto activo) que componían la quimioteca analizada. En otras palabras, el *número de secuencias que podíamos encontrar era limitado y conocido de antemano*, al conocer la composición de la quimioteca. La información que nos proporcionaría un



**Figura 17** Ejemplo del proceso de secuenciación de un compuesto positivo empleando MALDI-TOF PSD para una quimioteca de tripéptidos, formada por permutación de los mismos tres aminoácidos en sus tres posiciones.

espectro de MALDI-TOF PSD debía ser, por tanto, suficiente. En primer lugar, tendríamos de la masa molecular del compuesto, la cual nos permitiría limitar el número de posibles secuencias a aquellas cuya masa molecular teórica se ajustase a la experimental. En segundo lugar tendríamos de un espectro de fragmentación del péptido, cuyos picos, al depender de su secuencia, debería permitirnos identificar el compuesto activo de entre ellas (Figura 17). Además, en las quimiotecas con las que se quería trabajar (péptidos de 22 aminoácidos) las variaciones en la secuencia que podían introducirse eran limitadas, ya que sino la cantidad de compuestos a sintetizar sería excesivamente elevada. De esta forma, existirían siempre partes de la secuencia que permanecerían constantes para todos los candidatos y que podían ser empleadas para simplificar la asignación. Lo que sí debía tenerse en cuenta era que la secuenciación por MALDI-TOF PSD *no era capaz de diferenciar entre aminoácidos de igual masa* o masa muy similar, como son los pares Leu/Ile o Gln/Lys. Por ello se decidió no introducir en una misma posición aminoácidos cuya diferencia de masa fuese inferior a una unidad, para hacer posible la secuenciación de los péptidos sin ambigüedades.

## 5. Conclusiones

La etapa de diseño realizada permitió concretar el objetivo principal de este trabajo en la optimización de la metodología combinatoria que se resume en la Figura 4 y que constaba de las siguientes etapas:

- Síntesis de quimiotecas “one-bead-one-compound” de análogos de la hélice III natural del dominio B para la búsqueda de compuestos capaces de interactuar con las hélices I y II naturales, dando lugar a dominios B no covalentes capaces de mantener o mejorar la actividad de unión a IgG. La síntesis de las quimiotecas se llevaría a cabo sobre resina PEGA, siguiendo un esquema de protección Boc/Bn y empleando un espaciador bifuncional que permitiese mantener el péptido unido al soporte sólido hasta el momento de su secuenciación.
- Evaluación de las quimiotecas a partir de un ensayo de actividad realizado con los candidatos unidos al soporte de síntesis, empleando IgG marcada con fluoresceína para la identificación de los dominios B no covalentes formados.
- Secuenciación de los péptidos activos por MALDI-TOF PSD, empleando el producto obtenido por desanclaje individual de las unidades de resina reveladas positivas.

## 6. Bibliografia

- <sup>1</sup> a) Sjöquist, J.; Forsgren, A. *J. Immunol.* **1966**, *97*, 822-827; b) Sjöquist, J.; Meloun, B.; Hjelm, H. *Eur. J. Biochem.* **1972**, *29*, 572-578; c) Björk, I.; Petersson, B.-A.; Sjöquist, J. *Eur. J. Biochem.* **1972**, *29*, 579-584; d) Uhlén, M.; Lindberg, M.; Philipson, L. *Immunol. Today* **1984**, *5*, 244-249
- <sup>2</sup> Deisenhofer, J.; Jones, T. A.; Huber, R. *H.-S. Z. Physiol. Chem.* **1978**, *359*, 975-985
- <sup>3</sup> a) Sjöholm, I. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *51*, 55-61; b) Uhlén, M.; Guss, B.; Nilsson, B.; Gatenbeck, S.; Lennart, P.; Lindberg, M. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 1695-1702
- <sup>4</sup> Sjö Dahl, J. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *73*, 343-351
- <sup>5</sup> Guss, B.; Uhlén, M.; Nilsson, B.; Lindberg, M.; Sjöquist, J.; Sjö Dahl, J. *Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 413-420
- <sup>6</sup> Kronvall, G.; Grey, H. M.; Williams Jr., R. C. *J. Immunol.* **1970**, *105*, 1116-1123
- <sup>7</sup> Reis, K. J.; Hansen, H. F.; Björk, L. *Mol. Immunol.* **1986**, *4*, 425-431
- <sup>8</sup> Starovasnik, M. A.; Skelton, N. J.; O'Connell, M. P.; Kelley, R. F.; Reilly, D.; Fairbrother, W. J. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15558-15569
- <sup>9</sup> Hartleib, J.; Köhler, N.; Dickinson, R. B.; Chhatwal, G. S.; Sixma, J. J.; Hartford, O. M.; Foster, T. J.; Peters, G.; Kehrel, B. E.; Herrmann, M. *Blood* **2000**, *96*, 2149-2156
- <sup>10</sup> Ray, P. K.; Raychaudhuri, S.; Allen, P. *Cancer Res.* **1982**, *42*, 4070-4974
- <sup>11</sup> Subbulakshmi, V.; Ghosh, A. K.; Das, T.; Ray, P. K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *250*, 15-21
- <sup>12</sup> Moks, T.; Abrahmsén, L.; Nilsson, B.; Hellman, U.; Sjöquist, J.; Uhlén, M. *Eur. J. Biochem.* **1986**, *156*, 637-643
- <sup>13</sup> Nilsson, B.; Moks, T.; Jansson, B.; Abrahmsén, L.; Elmlblad, A.; Holmgren, E.; Henrichson, C.; Jones, T. A.; Uhlén, M. *Protein Eng.* **1987**, *1*, 107-113
- <sup>14</sup> Deisenhofer, J. *Biochemistry* **1981**, *20*, 2361-2370
- <sup>15</sup> a) Torigoe, H.; Shimada, I.; Saito, A.; Sato, M.; Arata, Y. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8787-8793; b) Gouda, H.; Torigoe, H.; Saito, A.; Sato, M.; Arata, Y.; Shimada, I. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9665-9672
- <sup>16</sup> Alonso, D. O. V.; Daggett, V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 133-138
- <sup>17</sup> a) Cedergren, L.; Andersson, R.; Jansson, B.; Uhlén, M.; Nilsson, B. *Protein Eng.* **1993**, *6*, 441-448; b) Bottomley, N. P.; Popplewell, A.; Scawen, M.; Wan, T.; Sutton, B. J.; Gore, M. G. *Protein Eng.* **1994**, *7*, 1463-1470; c) Gouda, H.; Shiraiishi, M.; Takahashi, H.; Kato, K.; Torigoe, H.; Arata, Y.; Shimada, I. *Biochemistry* **1998**, *37*, 129-136
- <sup>18</sup> Jendeberg, L.; Tashiro, M.; Tejero, R.; Lyons, B. A.; Uhlén, M.; Montelione, G. T.; Nilsson, B. *Biochemistry* **1996**, *35*, 22-31
- <sup>19</sup> Kato, K.; Gouda, H.; Tanaha, W.; Yoshino, A.; Matsunaga, C.; Arata, Y. *FEBS Lett.* **1993**, *328*, 49-54
- <sup>20</sup> Chorev, M.; Goodman, M. *Trends Biotech.* **1995**, *13*, 438-445
- <sup>21</sup> Sánchez, Y. En *Departament de Química Orgànica*; Universitat de Barcelona: Barcelona, **1996**

- <sup>22</sup> González, M. J. En *Departament de Química Orgànica*; Universitat de Barcelona: Barcelona, **1999**
- <sup>23</sup> a) Furka, A.; Sebesteyén, F.; Asgedom, M.; Dibó, G. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1991**, *37*, 487-493; b) Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E.; Appel, J. R.; Dooley, C. T.; Cuervo, J. H. *Nature* **1991**, *354*, 84-86; c) Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. *Nature* **1991**, *354*, 82-84; d) Halkes, K. M.; St. Hilaire, P. M.; Crocker, P. R.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 18-27
- <sup>24</sup> a) Brenner, S.; Lerner, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5381-5383; b) Janda, K. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10779-10785; c) Ni, Z.-J.; McLean, D.; Holmes, C. P.; Murphy, M. M.; Ruhland, B.; Jacobs, J. W.; Gordon, E. M.; Gallop, M. A. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1601-1608
- <sup>25</sup> Dooley, C. T.; Cheng, N. N.; Wilkes, B. C.; Schiller, P. W.; Bidlack, J. M.; Pasternak, G. W.; Houghten, R. A. *Science* **1994**, *266*, 2019-2021
- <sup>26</sup> Lebl, M.; Krchnák, V.; Sepetov, N. F.; Seligmann, B.; Strop, P.; Felder, S.; Lam, K. S. *Biopolymers* **1995**, *37*, 177-198
- <sup>27</sup> a) Enjalbal, C.; Martinez, J.; Aubagnac, J.-L. *Mass Spectrom. Rev.* **2000**, *19*, 139-161; b) Kassel, D. B. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 255-267
- <sup>28</sup> Terrett, N. K. *Combinatorial Chemistry*; Oxford University Press: New York, **1998**
- <sup>29</sup> Camarero, J. A.; Cotton, G. J.; Adeva, A.; Muir, T. W. *J. Pept. Res.* **1998**, *51*, 303-316
- <sup>30</sup> Meldal, M. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077-3080
- <sup>31</sup> Meldal, M.; Svendsen, I.; Breddam, K.; Auzanneau, F.-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3314-3318
- <sup>32</sup> a) Halkes, K. M.; St. Hilaire, P. M.; Crocker, P. R.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 18-27; b) Willert, M.; Benito, J. M.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 91-101
- <sup>33</sup> Auzanneau, F.-I.; Meldal, M.; Bock, K. *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 31-44
- <sup>34</sup> Leon, S.; Quarrell, R.; Lowe, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2997-3002
- <sup>35</sup> Smith, H. K.; Bradley, M. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 326-332
- <sup>36</sup> Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1775-1778
- <sup>37</sup> Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1449-1458.
- <sup>38</sup> a) Nisiuchi, Y.; Inui, T.; Nishio, H.; Bodi, J.; Kimura, T.; Tsuji, F. T.; Sakakibara, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13549-13554; b) Sakakibara, S. *Biopolymers* **1999**, *51*, 279-296
- <sup>39</sup> Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157
- <sup>40</sup> Giralt, E.; Albericio, F.; Pedroso, E.; Granier, C.; van Rietschoten, J. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 1193-1208
- <sup>41</sup> a) Nicolás, E.; Clemente, J.; Perelló, M.; Albericio, F.; Pedroso, E.; Giralt, E. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2183-2186; b) Nicolás, E.; Clemente, J.; Ferrer, T.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3179-3194
- <sup>42</sup> a) Young Jr., W. W.; Tamura, Y.; Wolock, D. M.; Fox, J. W. *J. Immunol.* **1984**, *133*, 3163-3166; b) Vidal, M. A.; Conde, F. P. *J. Immunol.* **1985**, *135*, 1232-1238; c) Tashiro, M.; Tejero, R.;

- Zimmerman, D. E.; Celda, B.; Nilsson, B.; Montelione, G. T. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 573-590; d) Andersson, K.; Areskoug, D.; Hardenborg, E. *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 310-315
- <sup>43</sup> Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchnák, V. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411-448
- <sup>44</sup> Hilarie, P. M. S.; Lowary, T. L.; Meldal, M.; Bock, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13312-13320
- <sup>45</sup> Tam, J. P.; Lu, Y. A. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1583-1592
- <sup>46</sup> a) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. *Biochemistry* 1974, *13*, 211-222; b) Kim, M. K.; Kang, Y. K. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1492-1499; c) Li, S.-C.; Goto, N. K.; Williams, K. A.; Deber, C. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6676-6681
- <sup>47</sup> Geourjon, C.; Deléage, G. *Comput. Appl. Biosci.* **1995**, *11*, 681-684
- <sup>48</sup> Manku, S.; Wang, F.; Hall, D. G. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 379-391
- <sup>49</sup> Chávez, D.; Ochoa, A.; Madrigal, D.; Castillo, M.; Espinoza, K.; González, T.; Vélez, E.; Meléndez, J.; García, J. D.; Rivero, I. A. *J. Comb. Chem.* 2003, *5*, 149-154
- <sup>50</sup> a) Youngquist, R. S.; Fuentes, G. R.; Lacey, M. P.; Keough, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3900-3906; b) Davies, M.; Bradley, M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8565-8568; c) Graven, A.; St. Hilarie, P. M.; Sanderson, S. J.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 441-452
- <sup>51</sup> Hoffmann, C.; Blechschmidt, D.; Krüger, R.; Karas, M.; Griesinger, C. *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 79-86
- <sup>52</sup> a) Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301; b) Yamashita, M.; Fenn, J. B. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451-4459; c) Yamashita, M.; Fenn, J. B. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4671-4675; d) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Science* **1989**, *246*, 64-71
- <sup>53</sup> a) Giese, C. F.; Mater II, W. B. *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 739-748 ; b) Futrell, J. H.; Miller, C. D. *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37*, 1521-1526
- <sup>54</sup> a) Papayannopoulos, I. A. *Mass Spectrom. Rev.* **1995**, *14*, 49-73; b) Aebersold, R.; Mann, M. *Nature* **2003**, *422*, 198-207
- <sup>55</sup> a) Yalcin, T.; Csizmadia, I. G.; Peterson, M. R.; Harrison, A. G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6*, 1165-1174; b) Yalcin, T.; Csizmadia, I. G.; Peterson, M. R.; Harrison, A. G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**, *7*, 233-242; c) Summerfield, S. G.; Whiting, A.; Gaskell, S. J. *Int. J. Mass Spectrom.* **1997**, *162*, 149-161; d) Ambihapathy, K.; Yalcin, T.; Leung, H.-W.; Harrison, A. G. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 209-215
- <sup>56</sup> a) Futrell, J. H. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *200*, 495-508; b) Griffiths, W. J.; Jonsson, A. P.; Liu, S.; Rai, D. K.; Wang, Y. *Biochem. J.* **2001**, *355*, 545-561
- <sup>57</sup> Spengler, B. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 1019-1036
- <sup>58</sup> a) Brummel, C. L.; Vickerman, J. C.; Carr, S. A.; Hemling, M. E.; Roberts, G. D.; Johnson, W.; Weinstonck, J.; Gaitanopoulos, D.; Benkovick, S. J.; Winograd, N. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 237-242; b) Stevenson, C. L.; Augustijns, P. F.; Hendren, R. W. *Int. J. Pharm.* **1999**, *177*, 103-115



## **Capítulo 2: Desarrollo de la estrategia sintética**



## 1. Síntesis del péptido H3<sub>n</sub>

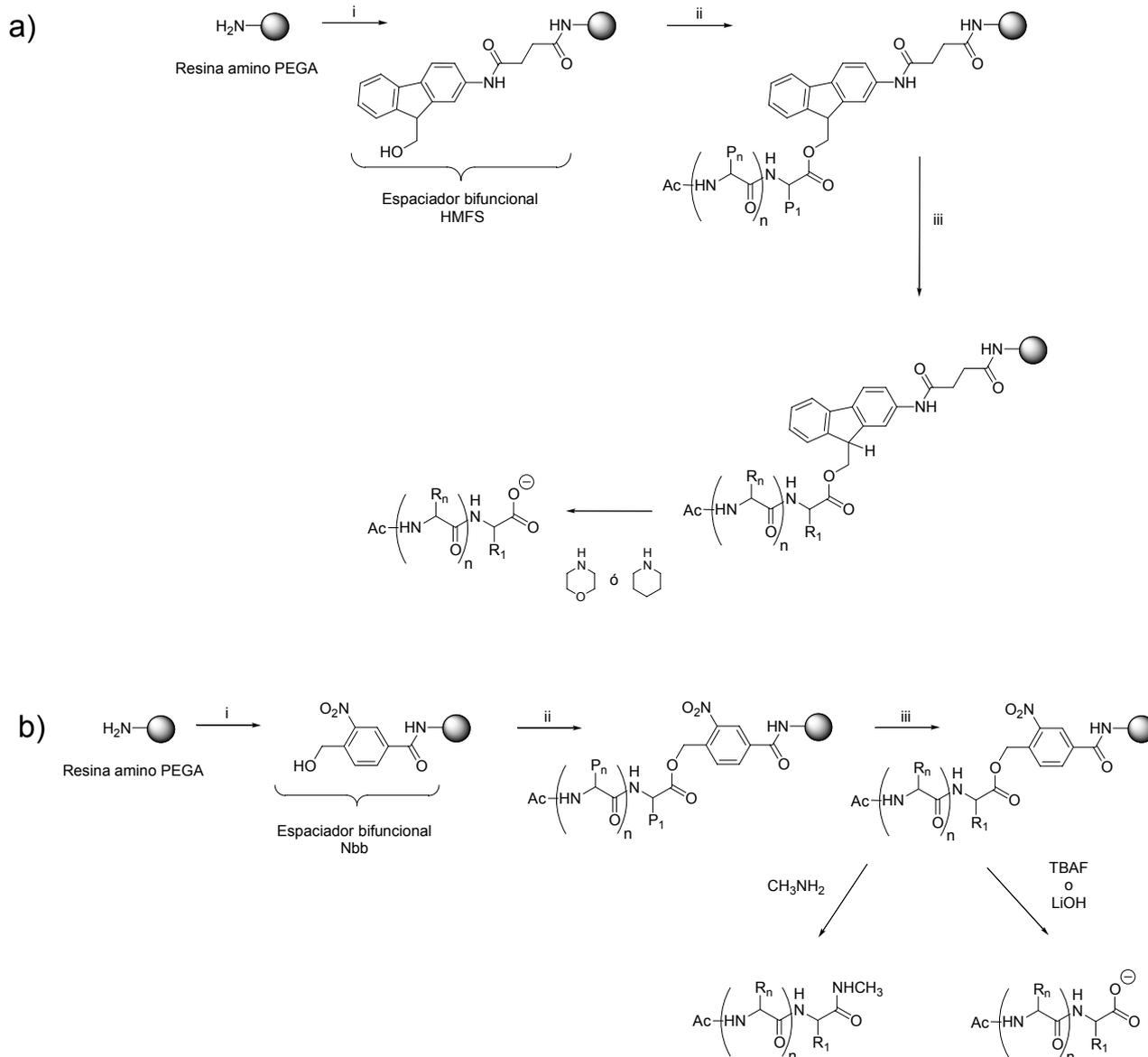
### *1.1 Prueba de estabilidad de los enlaces péptido-espaciador bifuncional*

Durante la etapa de diseño se plantearon dos posibles estrategias para la construcción de las quimiotecas “one-bead-one compound” de análogos de la hélice III natural, basadas en el uso de los espaciadores bifuncionales HMFS y Nbb (Figura 1). En ambos casos se pretendía la obtención de péptidos desprotegidos unidos a resina, que pudiesen ser fácilmente liberados tras los ensayos de actividad para su secuenciación. Resultaba imprescindible, por tanto, que los enlaces péptido-espaciador fuesen estables a todos los reactivos a emplear durante la síntesis, la cual se realizaría siguiendo un esquema de protección Boc/Bn. Como ya había sido descrito por Rabanal y col.<sup>1</sup> para el HMFS y por Nicolás y col.<sup>2</sup> para el Nbb, estos enlaces no se veían alterados durante la síntesis de péptidos protegidos siguiendo el esquema mencionado. Faltaba comprobar, sin embargo, su estabilidad frente al HF anhidro (Materiales y Métodos 4.1.5), utilizado en la etapa final del proceso sintético para la eliminación de los protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos. Por todo ello, el desarrollo de la estrategia sintética comenzó con el análisis de la integridad de los enlaces péptido-HMFS y péptido-Nbb en presencia de HF.

Este análisis se llevó a cabo sobre las peptidil-resinas modelo Ac-Phe-HMFS-Gly-PEGA y Ac-Phe-Nbb-Gly-PEGA, sintetizadas según se describe en el apartado 2.2.1 del capítulo de Procedimientos Experimentales. La estabilidad de los enlaces péptido-espaciador se cuantificó a partir de la pérdida de Ac-Phe durante el tratamiento con HF, determinada por análisis de aminoácidos de alícuotas de peptidil-resina antes y después del tratamiento. Los resultados experimentales mostraron una pérdida inferior al 5% para ambas resinas y por tanto, que ambos espaciadores cumplían los requisitos de estabilidad necesarios para la síntesis de nuestras quimiotecas.

## 1.2 Síntesis del péptido $H3_n$

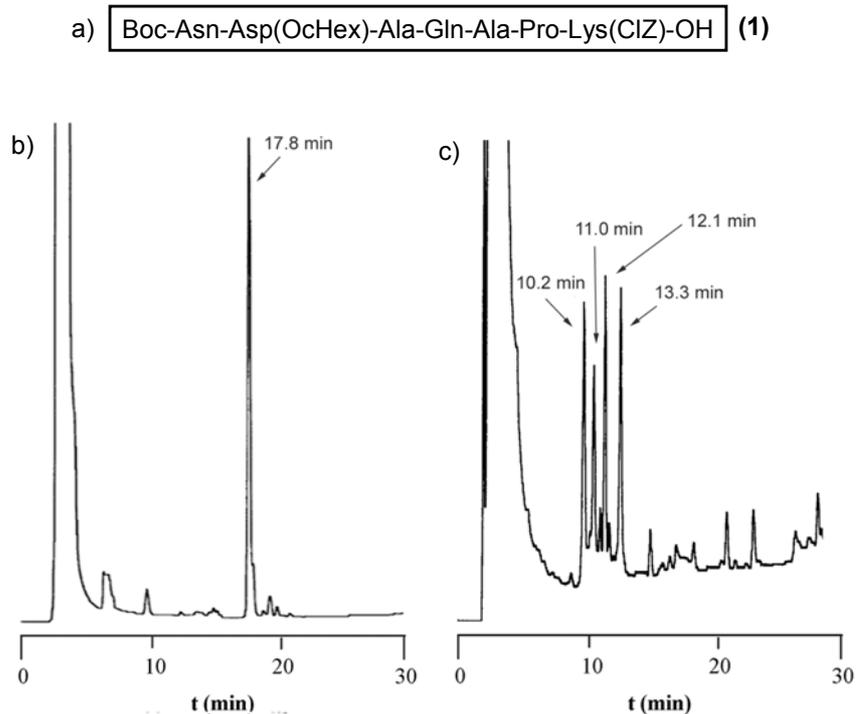
Una vez comprobada la estabilidad de los enlaces péptido-espaciador al HF, se procedió a la síntesis del péptido  $H3_n$  por ambas estrategias, que denominamos como HMFS/Boc/Bn y



**Figura 1** (a) Estrategia sintética HMFS/Boc/Bn. Partiendo de la resina PEGA, se procede a la incorporación del espaciador bifuncional (i) y a la elongación de la cadena siguiendo un esquema de protección Boc/Bn (ii). Tras la acetilación del extremo N-terminal se realiza la desprotección de las cadenas laterales (iii) obteniéndose el péptido desprotegido unido a resina. Este puede ser desancaldo fácilmente por tratamiento de la peptidil-resina con morfolina o piperidina. (b) Estrategia sintética Nbb/Boc/Bn. El procedimiento de síntesis (pasos i, ii y iii) es el mismo que para la ruta A, excepto para la incorporación del tercer aminoácido (neutralización in situ) y para la liberación del péptido, que en este caso puede realizarse con TBAF ó LiOH, si se desea obtener el péptido con el extremo C-terminal en forma de ácido carboxílico, o con  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  si se desea en forma de metilamida. En ambas rutas, las cadenas laterales de los aminoácidos se representan como  $\text{P}_n$  en su forma protegida y como  $\text{R}_n$  en la desprotegida.

Nbb/Boc/Bn. El objetivo de esta doble síntesis era el de conocer cual de ellas cumplía mejor con los requisitos requeridos para la síntesis de quimiotecas (pureza elevada del producto final, facilidad de síntesis, facilidad de desanclaje...).

Las síntesis se llevaron a cabo en paralelo y de forma manual (Materiales y Métodos 2.1. y 2.2) sobre 500 mg de resina PEGA cada una, cuya funcionalización inicial de 0.4 mmol/g fue reducida al 50% aproximadamente. La principal razón de esta reducción fue la de evitar una excesiva proximidad entre las cadenas de péptido de una misma unidad de resina, que dificultase la interacción de los dominios no covalentes con las IgG durante los ensayos de actividad, debido a su gran tamaño. La reducción de funcionalización se realizó intentando conservar las posiciones más reactivas y accesibles para la elongación de las cadenas (las del exterior), ya que probablemente sólo los péptidos situados en éstas serían capaces de interactuar con los anticuerpos marcados, al resultar difícil la penetración de la inmunoglobulina al interior de la resina PEGA, aun cuando su permeabilidad era elevada.<sup>3</sup> Las síntesis se desarrollaron siguiendo metodologías idénticas en todas las etapas, excepto para la incorporación del tercer aminoácido, que en la estrategia Nbb/Boc/Bn se realizó utilizando un protocolo de neutralización *in situ* dirigido a minimizar la posible formación de dicetopiperacinas (DKP),<sup>4</sup> reacción secundaria típica en el trabajo con este espaciador.



**Figura 2** (a) Secuencia del heptapéptido protegido esperado. Los aminoácidos se muestran en código de tres letras con los grupos protectores de sus cadenas laterales entre paréntesis. (b) Perfil cromatográfico del crudo de desanclaje obtenido empleando el HMFS como espaciador bifuncional. (c) Perfil cromatográfico del crudo de desanclaje obtenido empleando el Nbb como espaciador bifuncional. Sobre los principales picos de cada cromatograma se encuentran especificados sus tiempos de retención. Cromatogramas registrados empleando un gradiente lineal del 20 al 100% de B en A en 30 min (Materiales y Métodos 3.3.2).

El primer control de calidad de las síntesis se llevó a cabo en el estadio de heptapéptido, por análisis del producto contenido en alícuotas de 5 mg de ambas peptidil-resinas. Los desanclajes se realizaron empleando una mezcla de morfolina/DMF (1:4) para la síntesis realizada sobre HMFS-PEGA y con 8 eq. de TBAF en DMF para la realizada sobre Nbb-PEGA. De esta forma, los péptidos de ambos crudos dispondrían del extremo C-terminal en forma de ácido carboxílico, facilitando la comparación de resultados.

La Figura 2 muestra los perfiles cromatográficos de los crudos obtenidos, así como la secuencia del heptapéptido protegido, producto esperado de reacción (**1**). Como puede apreciarse, la síntesis realizada siguiendo la estrategia HMFS/Boc/Bn proporcionó un único compuesto mayoritario, de pureza superior al 90% y cuya masa molecular, determinada por HPLC-MS, correspondía con la del producto esperado, lo cual demostraba que la síntesis se estaba desarrollando con normalidad y conforme a los esperado. La estrategia Nbb/Boc/Bn mostraba, sin embargo, un crudo compuesto por un mínimo de cuatro especies importantes, en casi igual concentración entre ellas y cuyos tiempos de retención no se correspondían con los del producto **1**. El análisis por HPLC-MS permitió la identificación de los cuatro componentes principales de la muestra, así como poder explicar su formación.

Como puede apreciarse en la Tabla 1, los compuestos **2** y **3** provenían de un subproducto de deleción de Ala, probablemente la incorporada siguiendo el protocolo de neutralización *in situ*, al ser ésta la única etapa diferente entre estrategias y no detectarse la deleción en el crudo obtenido por la estrategia HMFS/Boc/Bn. A partir de la relación de intensidades entre los cuatro picos, era posible estimar que este subproducto se encontraba en la peptidil-resina en aproximadamente igual proporción que el producto esperado, del cual provenían **4** y **5**. La aparición de los compuestos **2-4** podía explicarse mediante la formación e hidrólisis de aspartimidas en el par Asp-Ala de ambos péptidos (el heptapéptido protegido esperado y el subproducto de deleción), debida a las condiciones básicas es las que tenía lugar el desanclaje.

Compuesto	t <sub>R</sub> (min)	Masa (m/z)	Estructura	Masa Teórica (m/z)	Abundancia (%)
<b>2</b>	10.2	937.3	$\alpha/\beta$ Boc-NDAQPK-OH	940.4	26
<b>3</b>	11.0	921.3	Boc-N <sub>c</sub> (DA)QAPK-OH	922.4	19
<b>4</b>	12.1	1011.0	$\alpha/\beta$ Boc-NDAQAPK-OH	1011.4	28
<b>5</b>	13.3	993.8	Boc-N <sub>c</sub> (DA)QAPK-OH	993.4	27

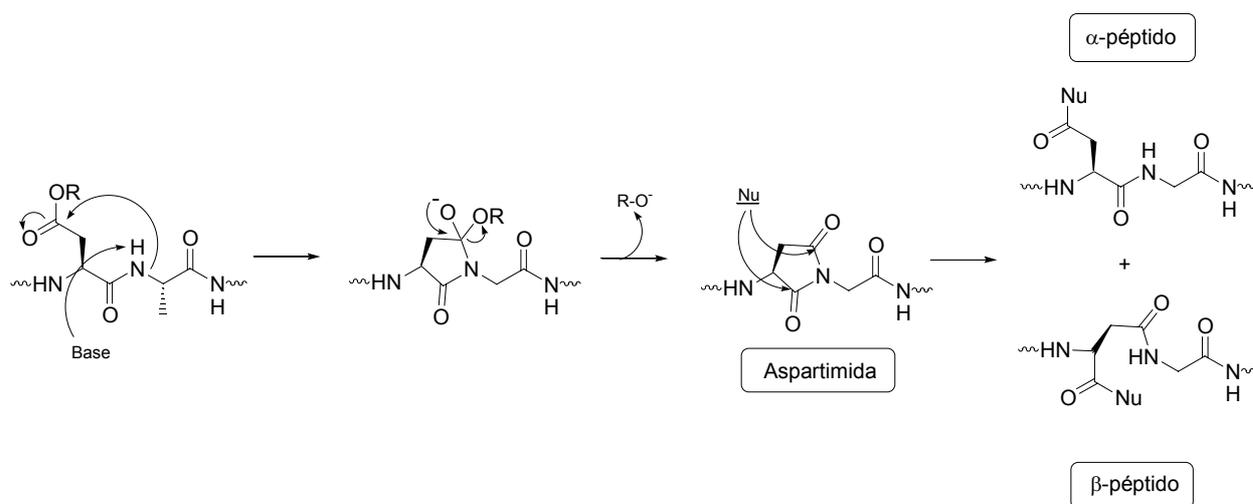
**Tabla 1** Resultados del análisis por HPLC-MS del crudo obtenido por la estrategia Nbb/Boc/Bn. Los aminoácidos se representan en notación de una letra, empleándose el término *c*(DA) para la representación de la aspartimida. Estimación de la abundancia por integración de áreas en el HPLC. Cromatograma registrado empleando un gradiente lineal del 20 al 100% de B en A en 30 min.

### 1.2.1 Formación de aspartimidias en el heptapéptido C-terminal del H3<sub>n</sub>

La formación de aspartimidias es una reacción secundaria que puede tener lugar en la síntesis de péptidos que contienen Asp en su secuencia y para la cual no existe todavía una solución general.<sup>5</sup> Esta reacción secundaria consiste en la formación de una succinimida que involucra el grupo  $\beta$ -carboxilo de éste aminoácido y el nitrógeno de la  $\alpha$ -carboxamida inmediatamente posterior, durante la cual se pierde el protector de la cadena lateral del Asp.<sup>5,6</sup> La reacción puede estar catalizada tanto por ácidos como por bases, por mecanismos diferentes, y depende principalmente de la secuencia Asp-X en cuestión, entre otros factores. Secuencias susceptibles para la formación de aspartimidias son los pares Asp-Gly, Asp-Ser, Asp-Thr y Asp-His.<sup>5,7</sup>

El mecanismo de esta reacción por catálisis básica, que es el que presumiblemente tenía lugar en nuestro caso, se muestra en la Figura 3. En este caso, tanto la fuerza de la base empleada como el impedimento estérico de ésta y de los aminoácidos que rodean al par Asp-X, así como la conformación del péptido y el disolvente, son factores importantes que influyen en la mayor o menor extensión de la reacción.<sup>5,6b,7a,8</sup> Un último factor a tener en cuenta es la calidad como grupo saliente del protector de la cadena lateral del ácido aspártico, siendo el grupo *OtBu* (esquemas de protección Fmoc/tBu) mejor que el *OcHex* (esquemas Boc/Bn) para prevenir la formación de estos subproductos.<sup>5,7a,8,9</sup>

Como puede apreciarse en la Figura 3, la formación e hidrólisis de aspartimidias genera en realidad tres compuestos por cada péptido de partida: la aspartimida, que puede detectarse o no en función del grado de hidrólisis, y los llamados  $\alpha$  y  $\beta$ -péptidos, de los cuales la forma  $\beta$  suele predominar sobre la  $\alpha$ .<sup>5-8</sup> En el crudo obtenido de la estrategia Nbb/Boc/Bn, sin embargo, sólo dos de estos tres compuestos fueron detectados para cada uno de los péptidos de partida, probablemente por coelución de las formas  $\alpha$  y  $\beta$  o por las escasa cantidad generada de las formas



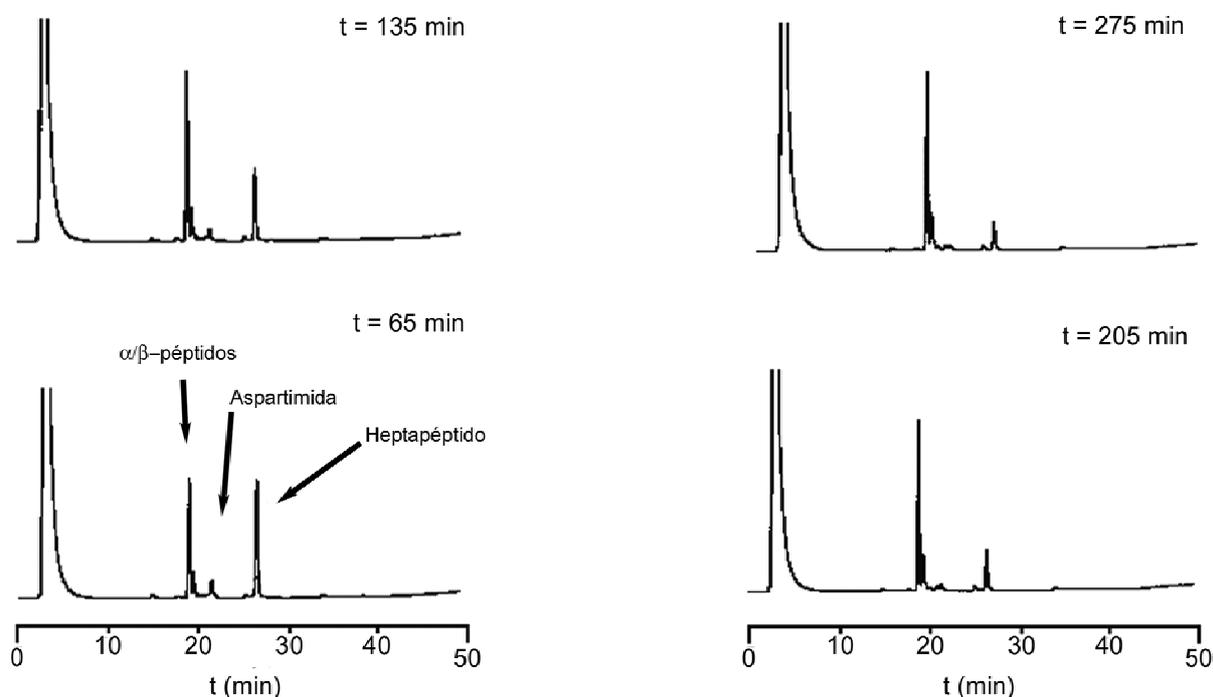
**Figura 3** Mecanismo de formación de aspartimidias y apertura del anillo de succinimida en medio básico, para el par Asp-Ala. El símbolo **R** representa cualquier grupo empleado en la protección de la cadena lateral del ácido aspártico.

$\alpha$ , que impedía su detección.

La teórica formación de aspartimidas como responsable de la aparición de estos subproductos fue comprobada empleando el crudo de desanclaje de una alícuota de 5 mg de peptidil-HMFS-resina, que, como ya se había demostrado, se encontraba libre de ellos (Figura 2). La mezcla heptapéptido/morfolina/DMF obtenida fue diluida 1:1 (v/v) en agua, con el objetivo de generar aniones hidroxilo en el medio ( $\text{pH}_{\text{mezcla}}=9-10$ ) y poder así estudiar la evolución del heptapéptido en su presencia por HPLC-MS. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2, mostrándose además en la Figura 4 algunos de los perfiles cromatográficos registrados.

	1 min	2 min	10 min	30 min	65 min	135 min	205 min	275 min
$\alpha/\beta$ Boc-NDAQPK-OH	0	0	4	16	48	65	75	83
Boc-Nc(DA)QAPK-OH	3	4	9	10	7	5	4	0
Boc-ND(OcHex)AQAPK-OH	97	96	87	74	45	30	21	17

**Tabla 2** Resultados del análisis por HPLC-MS de la evolución morfolina/DMF/H<sub>2</sub>O (1:4:5 v/v/v). Los resultados se expresan en porcentaje de producto en la muestra, estimado por integración de áreas. Los compuestos se representan en código de una letra empleando el término c(DA) como símbolo para la aspartimida.



**Figura 4** Evolución de los perfiles cromatográficos de la mezcla morfolina/DMF/H<sub>2</sub>O (1:4:5 v/v/v) con el tiempo. Los cromatogramas se registraron empleando flujo isocrático al 20% durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 20 al 100% de B en A durante 50 min. Los tiempos de reacción a los que corresponde cada perfil se muestran sobre los cromatogramas.

Estos resultados permitían demostrar la tendencia de la secuencia Asp-Ala del heptapéptido protegido a sufrir este tipo de reacción secundaria en presencia de aniones hidroxilo, confirmándose además, a partir de los tiempos de retención de los subproductos y de sus masas moleculares experimentales, la identidad de los compuestos del crudo obtenido por la estrategia Nbb/Boc/Bn y la validez de nuestra hipótesis sobre su origen.

La ausencia de estos subproductos en el crudo de la estrategia HMFS/Boc/Bn, nos llevó a preguntarnos hasta que punto la prevención de la reacción secundaria era debida a la base empleada en el desanclaje (de mayor impedimento estérico que un hidroxilo) o si, por el contrario, existían otros factores que no se habían tenido en cuenta. Para responder esta pregunta, se procedió al desanclaje del péptido contenido en dos alícuotas de peptidil-HMFS-PEGA con dos bases de igual impedimento estérico pero diferente fuerza: la morfolina (pKa=8.3) y la piperidina (pKa=11.1), en relación base/DMF 1:4 (v/v). El análisis de los crudos a diferentes tiempos por HPLC-MS mostró como, tras 6 h de reacción, el tratamiento con piperidina proporcionaba únicamente un 50% del producto esperado y toda una serie de subproductos derivados de la formación de aspartimidias y apertura de la imida por parte de la base, dando lugar a las llamadas  $\alpha$  y  $\beta$ -piperididas. El desanclaje con morfolina, sin embargo, daba lugar al heptapéptido protegido sin deterioro alguno, permitiendo atribuir a las características de la base (fuerza e impedimento estérico) la eliminación de esta reacción secundaria en una secuencia propensa a darla. Por tanto, era posible establecer que la estrategia HMFS/Boc/Bn, empleando morfolina para el desanclaje, era una excelente aproximación para la obtención de péptidos protegidos en disolución, utilizados en la síntesis de péptidos por metodologías convergentes, gracias a que la suavidad de las condiciones de liberación de los péptidos permitían prevenir la formación de estos subproductos.<sup>10</sup>

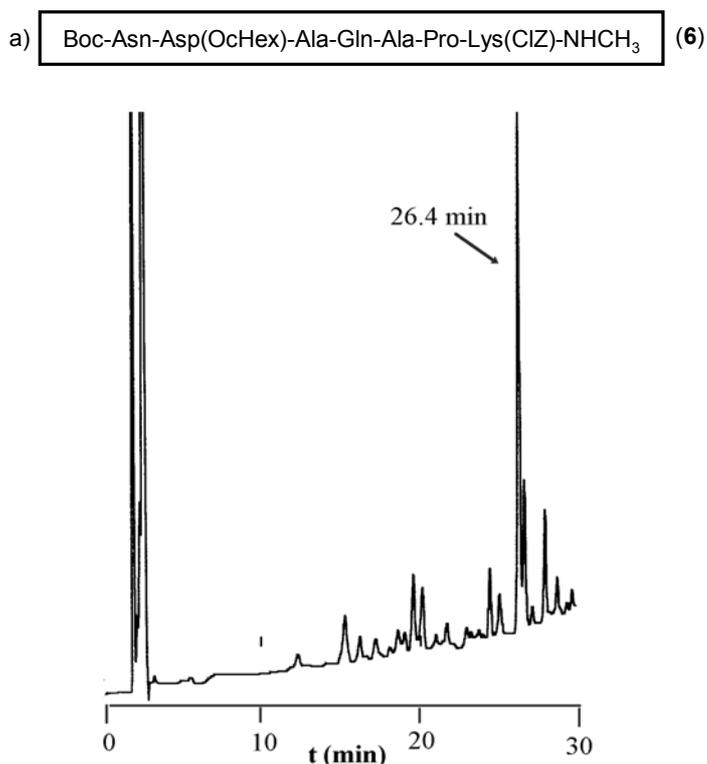
### 1.2.2 Modificación de la estrategia Nbb/Boc/Bn

Llegados a este punto, resultaba evidente que la estrategia HMFS/Boc/Bn ofrecía claras ventajas sobre la Nbb/Boc/Bn, al no dar lugar a subproductos de deleción ni a la degradación de los compuestos por formación de aspartimidias (cuando se empleaba morfolina para el desanclaje). Aunque descartar esta segunda estrategia hubiese sido lo más aconsejable, se decidió realizar en ella las modificaciones necesarias para poder abordar la síntesis de H3<sub>n</sub> con un mínimo de garantías. Ello era debido a que, si bien hasta el momento el trabajo con HMFS proporcionaba resultados ideales, nos encontrábamos todavía muy lejos del final de la ruta diseñada y no era posible predecir la pureza con la que el péptido completo sería obtenido, dejando aún las puertas abiertas a que el uso de Nbb fuese la mejor opción para la síntesis de las quimiotecas. Estas modificaciones se basaron en doblar el número de equivalentes empleados en el acoplamiento del tercer aminoácido para minimizar la aparición de subproductos de deleción (de 3 eq. de aminoácido se decidió pasar a 6 eq., siguiendo el protocolo de neutralización *in situ*) y en emplear

nucleófilos diferentes del anión hidroxilo en el desanclaje (más grandes y/o menos básicos), con la intención de minimizar la formación de aspartimidias.

Una vez definidas estas modificaciones, se procedió al inicio de una nueva síntesis de H3<sub>n</sub> por la estrategia Nbb/Boc/Bn, siguiendo la misma metodología empleada anteriormente a excepción de las modificaciones comentadas. La síntesis se llevó a cabo también de modo manual sobre 500 mg de resina PEGA de funcionalización inicial reducida al 50%. El primer control de calidad volvió a realizarse en el estadio de heptapéptido, por desanclaje y análisis del producto contenido en 5 mg de peptidil-resina. En este caso se empleó CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>/DCM en condiciones anhidras como nucleófilo para la liberación del péptido (base de fuerza intermedia e impedimento estérico superior al del anión hidroxilo), descrita por Nicolás y col.<sup>2</sup> para la obtención de péptidos protegidos en disolución con el extremo C-terminal en forma de metilamida.

El análisis del crudo por HPLC reveló que nos encontrábamos ante una mezcla compleja de compuestos, de entre los cuales destacaba un único producto mayoritario de pureza ligeramente inferior al 70%, determinada por integración de áreas (Figura 5). Ninguno de ellos pudo ser caracterizado por HPLC-MS, por lo que se nos planteaba la duda de si el compuesto mayoritario era realmente el producto esperado (**6**) y de si las subespecies encontradas se habían generado durante la síntesis, el desanclaje o ambos. Para intentar resolver estas cuestiones, se llevó a cabo la liberación del producto contenido en alícuotas de 5 mg de peptidil-resina con diferentes cantidades



**Figura 5** (a) Secuencia del heptapéptido protegido esperado. Los aminoácidos se muestran en código de tres letras con los grupos protectores de sus cadenas laterales entre paréntesis. (b) Perfil cromatográfico del crudo de desanclaje obtenido en la etapa de heptapéptido de la segunda síntesis de H3<sub>n</sub>, empleando Nbb como espaciador bifuncional. Cromatograma registrado empleando un gradiente lineal del 20 al 100% de B en A (Materiales y Métodos 3.3.2).

de amina y a diferentes tiempos de reacción. En todos los casos el perfil cromatográfico de los crudos mostraba mezclas igualmente complejas a la de la Figura 5, con un compuesto mayoritario a 26,4 min pero con diferentes subespecies de concentración variable en función de las condiciones. Ello nos llevó a concluir que, probablemente, la mayoría de los subproductos obtenidos se formaban durante el proceso de desanclaje, por mecanismos desconocidos al no poder elucidar su estructura. El heptapéptido protegido parecía, además, demasiado sensible a los reactivos empleados para su liberación como para poder caracterizar adecuadamente la calidad de la síntesis en este punto.

Con la intención de conseguir algún indicio de que la síntesis se estaba desarrollando con normalidad, se procedió finalmente al análisis de aminoácidos de una alícuota de la peptidil-Nbb-resina. Como puede apreciarse en la tabla 3, el resultado de éste análisis permitió determinar que la composición del péptido contenido en la resina se correspondía con la teórica del compuesto **6** y que, por tanto, no parecían existir problemas de síntesis importantes, exceptuando aquellos generados por el proceso de desanclaje.

	Asp	Glu	Ala	Lys	Pro
Composición esperada	2	1	2	1	1
Composición experimental	1.7	0.9	2.0	1.0	1.1

**Tabla 3** Composición esperada y experimental del heptapéptido C-terminal de la Hélice III natural del dominio B ( $H3_n$ ), sintetizada según la estrategia Nbb/Boc/Bn.

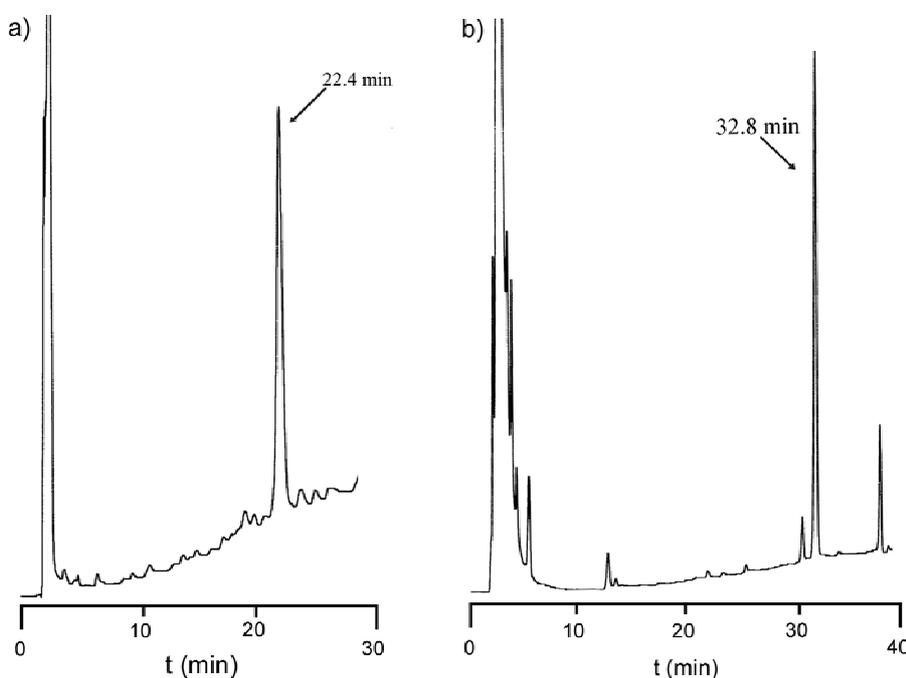
### ***1.3 Continuación de la síntesis del péptido $H3_n$***

Una vez solventados los problemas sintéticos de la estrategia Nbb/Boc/Bn y llegados al estadio de heptapéptido de forma satisfactoria, se prosiguió con la síntesis de  $H3_n$ , de nuevo en paralelo, siguiendo las dos estrategias planteadas (Procedimientos Experimentales 2). Acabadas las etapas de acoplamiento, se procedió a la desprotección del extremo N-terminal del péptido y a su acetilación empleando una mezcla de anhídrido acético/piridina (25 eq.) en DMF, lo cual nos proporcionó la hélice III natural del dominio B unida al soporte sólido y con las cadenas laterales de los aminoácidos protegidas (péptido  $H3_nR$ ). Este producto fue analizado por HPLC, empleando el crudo obtenido por desanclaje de alícuotas de 5 mg de ambas peptidil-resinas, y por análisis de aminoácidos realizados directamente sobre muestras de las peptidil-resinas. Los desanclajes se llevaron a cabo con una mezcla de morfolina/DMF (1:4) para el péptido sintetizado sobre HMFS y con  $CH_3NH_2$  en DCM para el sintetizado sobre Nbb.

	Asp	Ser	Glu	Ala	Leu	Lys	Pro
Composición esperada H <sub>3</sub> <sub>n</sub> R	4	2	3	5	3	3	2
Composición H <sub>3</sub> <sub>n</sub> R por estrategia HMFS/Boc/Bn	4.0	0.6	3.2	4.9	3.0	3.1	1.9
Composición H <sub>3</sub> <sub>n</sub> R por estrategia Nbb/Boc/Bn	3,9	0.6	3.1	5.1	3.0	3.2	1.8

**Tabla 4** Composición esperada y experimental (calculada por análisis de aminoácidos) del péptido H<sub>3</sub><sub>n</sub>R anclado a las peptidil-resinas obtenidas de las síntesis realizadas siguiendo las estrategias HMFS/Boc/Bn y Nbb/Boc/Bn.

Como puede apreciarse en la Figura 6, los crudos obtenidos mostraban un único compuesto mayoritario de pureza superior al 85%, suficiente para la síntesis de nuestras quimiotecas. Aunque la identidad de estos productos no pudo ser determinada por espectrometría de masas, el análisis de aminoácidos de las peptidil-resinas confirmó que la composición de los péptidos anclados sobre las resinas se correspondía con la teórica de H<sub>3</sub><sub>n</sub>R (Tabla 4), a excepción de la serina, debido a su degradación durante el tratamiento de los péptidos con HCl 6M (Materiales y Métodos 3.2). Por tanto, a falta de la desprotección de las cadenas laterales, ambas síntesis se habían desarrollado con éxito. La ausencia de la gran cantidad de subproductos observados en el análisis del heptapéptido C-

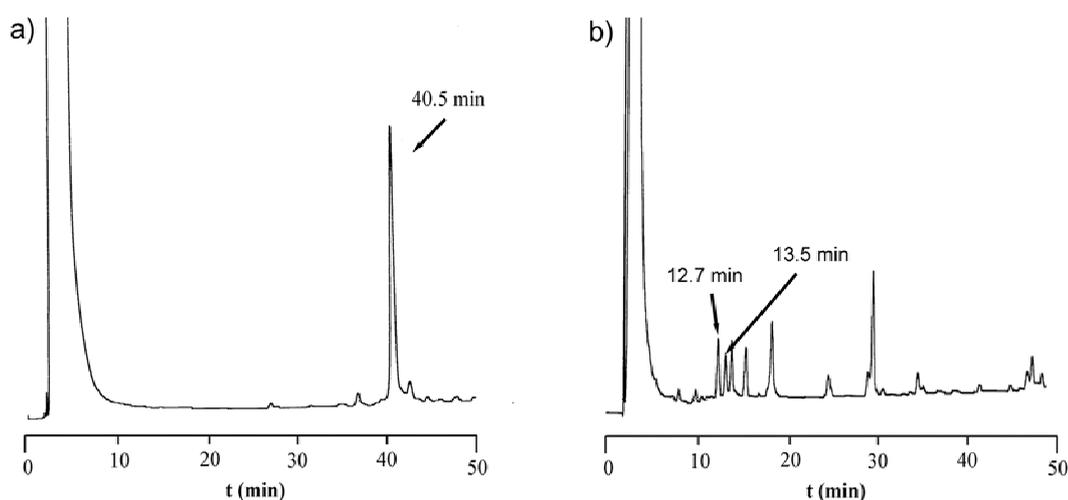


**Figura 6** (a) Perfil cromatográfico del crudo de desanclaje obtenido para la síntesis del péptido H<sub>3</sub><sub>n</sub>R mediante la estrategia HMFS/Boc/Bn. Cromatograma registrado empleando un gradiente lineal del 60 al 100% de B en A en 30 min. (b) Perfil cromatográfico del el crudo obtenido mediante la estrategia Nbb/Boc/Bn. Cromatograma registrado empleando un gradiente lineal al 60% de B en A durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 60 al 100% de B en A en 30 min.

terminal obtenido en la síntesis con Nbb confirmaba, además, la sensibilidad de éste a las condiciones de desanclaje, como ya se había supuesto anteriormente (apartado 1.2.2 de este capítulo).

Tras el análisis de los péptidos protegidos, se procedió a la división de las peptidil-resinas en dos mitades iguales, una de las cuales fue conservada intacta mientras que la otra fue sometida al último paso de síntesis: la eliminación de los protectores de las cadenas laterales mediante tratamiento con HF anhidro, lo cual condujo a la obtención de la *hélice III natural desprotegida* ( $H3_n$ ) y unida a resina. Este tratamiento se llevó a cabo con las peptidil-resinas solvatadas en DCM, empleado una mezcla 9:1 de HF/*p*-cresol (5 mL) con un tiempo de reacción de 1.5 h a 0 °C (Materiales y Métodos 4.1.5). Tras la evaporación del HF al vacío, las peptidil-resinas se suspendieron en DMF y fueron transferidas a reactores de síntesis, donde se eliminó la DMF así como el exceso de *p*-cresol y los subproductos generados durante la desprotección, mediante lavados con DMF y DCM. Es importante destacar que, debido a la afinidad que la resina PEGA posee por el vidrio y a su fragilidad frente a la acción de fuerzas mecánicas,<sup>11</sup> fue necesario realizar el trasvase de la resina con *micropipetas o pipetas Pasteur de plástico, para evitar una pérdida masiva de peptidil-resina, y llevar a cabo el tratamiento con HF en ausencia absoluta de agitación magnética, para mantener en la medida de lo posible su integridad.*

La caracterización de los productos se realizó por desanclaje del péptido contenido en alícuotas de 5 mg de las dos peptidil-resinas, en las condiciones descritas anteriormente, y análisis de los crudos por HPLC y HPLC-MS. Se realizaron además análisis de aminoácidos de los péptidos unidos a resina para comprobar que su composición era correcta, así como para controlar la pérdida de péptido durante el proceso de desprotección. Para ello se comparó la relación de



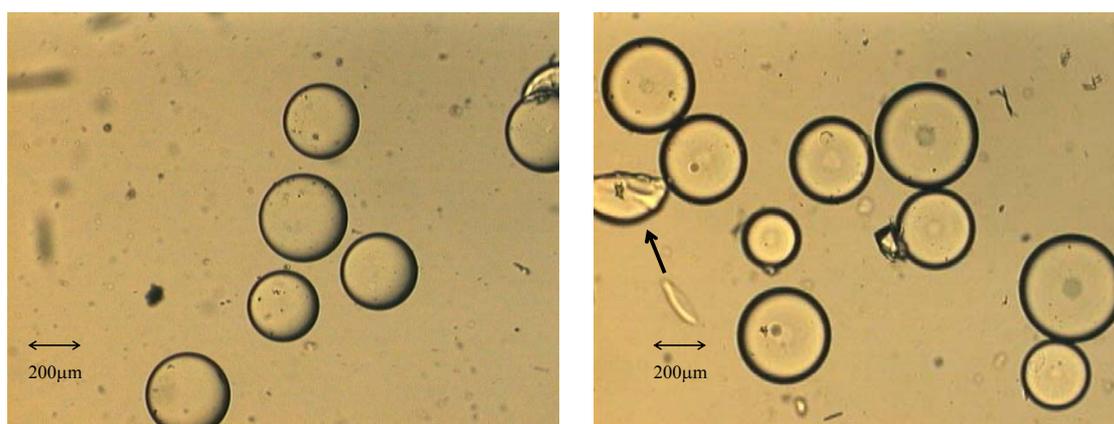
**Figura 7** (a) Perfil cromatográfico del crudo de desanclaje obtenido para la síntesis del péptido  $H3_n$  mediante la estrategia HMFS/Boc/Bn. Cromatograma registrado empleando un gradiente lineal del 10 al 35% de B en A en 50 min. (b) Perfil cromatográfico del el crudo obtenido mediante la estrategia Nbb/Boc/Bn. Cromatograma registrado empleando un gradiente lineal del 20 al 70% de B en A en 50 min. Los picos sobre los que se especifica el tiempo de retención son aquellos correspondientes al péptido  $H3_n$ , ya sea en su forma C-terminal de ácido carboxílico o de metilamida (ambos para el segundo cromatograma).

concentraciones péptido/Phe (aminoácido de referencia empleado en la reducción de funcionalización de la resina PEGA) de las peptidil-resinas protegidas y de las sometidas al tratamiento con HF.

La Figura 7 muestra los perfiles cromatográficos de los crudos obtenidos. Como puede apreciarse, la estrategia HMFS/Boc/Bn proporcionó un único producto mayoritario de pureza superior al 85%, suficiente para su aplicación a ensayos de actividad. El análisis por HPLC-MS reveló que la masa de éste se correspondía con la de H3<sub>n</sub>, el cual se encontraba acompañado de pequeñas impurezas de deleción y desprotección parcial, en ningún caso superiores al 10%. La composición del péptido determinada por análisis de aminoácidos corroboró que el compuesto que la resina contenía era el producto esperado, confirmándose además la estabilidad del enlace péptido-HMFS al tratamiento con HF, al estimarse la pérdida de péptido durante la desprotección inferior al 5% (Tabla 5). Finalmente se procedió al estudio de una muestra de la peptidil-resina por microscopía óptica, para determinar el estado de las unidades de resina tras el proceso completo de síntesis, comprobándose que la gran mayoría no habían sufrido daño alguno (Figura 8).

	Asp	Ser	Glu	Ala	Leu	Lys	Pro
Composición esperada H3 <sub>n</sub>	4	2	3	5	3	3	2
Composición H3 <sub>n</sub> por estrategia HMFS/Boc/Bn	4.1	0.8	3.2	4.9	3.2	2.9	1.9
Composición H3 <sub>n</sub> por estrategia Nbb/Boc/Bn	3,9	0.6	3.2	5.1	2.9	2.8	1.9

**Tabla 5** Composición esperada y experimental (calculada por análisis de aminoácidos) del péptido H3<sub>n</sub> anclado a las peptidil-resinas obtenidas de las síntesis realizadas siguiendo las estrategias HMFS/Boc/Bn y Nbb/Boc/Bn.



**Figura 8** Imágenes obtenidas por microscopía óptica ( $\times 50$  aumentos) de una muestra de peptidil-HMFS-PEGA tras ser sometida al tratamiento con HF. La resina se encuentra suspendida en agua tras haber sido acondicionada a éste disolvente. Como puede apreciarse, la resina tolera muy bien el medio acuoso y conserva la mayoría de sus unidades intactas, siendo la proporción de bolas deterioradas muy pequeña (derecha)

Al contrario que para la síntesis sobre HMFS-PEGA, la segunda estrategia proporcionó un crudo formado por una mezcla de compuestos donde ninguno era mayoritario (Figura 7b). El análisis por HPLC-MS de esta mezcla permitió identificar el péptido H3<sub>n</sub> en los dos primeros picos, debiéndose esta dualidad a la existencia del producto en forma C-terminal de ácido carboxílico (12.7 min) y de metilamida (13.5 min), originada seguramente por la presencia de trazas de agua en el reactivo de desanclaje. El resto de compuestos que pudieron ser identificados correspondían a subproductos de desprotección parcial, reteniéndose principalmente los grupos Bn y cHex, además de la presencia de subproductos de deleción y compuestos consecuencia de ambas reacciones secundarias (deleción más desprotección parcial). Finalmente, aunque la composición del péptido unido a resina se correspondía con la de H3<sub>n</sub> (Tabla 5), la pérdida de péptido durante la desprotección se estimó alrededor del 15%, aceptable pero superior a la encontrada en la anterior estrategia. Estos resultados permitían concluir que existían dificultades importantes en la etapa de desprotección final, las cuales generaban una gran cantidad de subproductos, además de continuar encontrando problemas en la metodología de desanclaje, que ahora, aunque no deterioraban el compuesto, proporcionaban dos especies con diferente extremo C-terminal.

Con el objetivo de solucionar estos problemas, se decidió someter una muestra de la peptidil-Nbb-resina protegida que aún conservábamos a un nuevo tratamiento con HF, en las mismas condiciones anteriormente comentadas pero aumentando el tiempo de reacción a 2 h, doblando la cantidad de HF/*p*-cresol (10 mL) y agitando intermitentemente la mezcla a intervalos de 10 min. El análisis del crudo obtenido proporcionó resultados análogos a los anteriormente comentados. A parte de las dos especies generadas por la presencia de agua en el reactivo de desanclaje, existían todavía una gran cantidad de subproductos parcialmente protegidos. Dado que la estructura de las peptidil-resinas sintetizadas por ambas estrategias diferían únicamente en el espaciador bifuncional, *no fue posible encontrar ninguna explicación para la ineficacia en la desprotección con HF* encontrada en esta segunda estrategia. El análisis de la resina por microscopía óptica mostraba además una gran proporción de unidades de resina deterioradas, lo cual hacía la muestra inservible para ser sometida a ensayos de actividad, independientemente de la calidad del producto contenido.

Las principales diferencias en los resultados obtenidos para la síntesis de H3<sub>n</sub> por las dos estrategias se resumen a continuación:

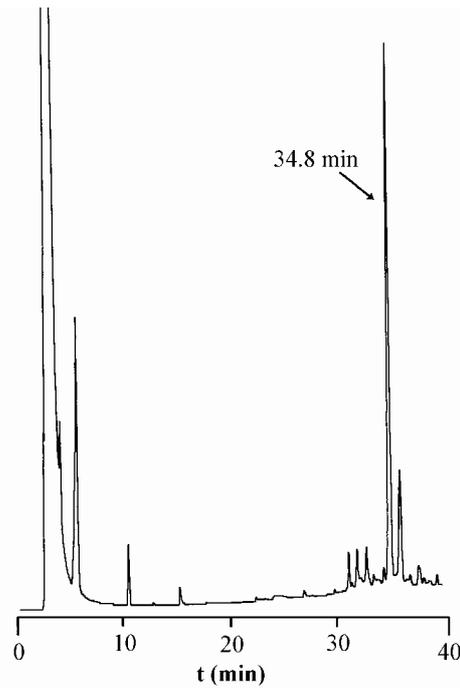
- La estrategia HMFS/Boc/Bn no había presentado problemas sintéticos en ningún momento, dando lugar al producto deseado con pureza suficiente para la realización de ensayos de actividad directamente sobre el péptido unido a fase sólida. Las condiciones empleadas para el desanclaje de los productos sintetizados (morfolina/DMF 1:4) habían demostrado además no alterar la estructura del péptido.
- La estrategia Nbb/Boc/Bn presentaba problemas en la etapa de desprotección de las cadenas laterales, la cual no era satisfactoria. No se había encontrado evidencia alguna que

permitiese establecer una hipótesis razonable sobre este fenómeno. Por otro lado, las mejores condiciones de desanclaje encontradas para la estrategia Nbb/Boc/Bn ( $\text{CH}_3\text{NH}_2$  en DCM) generaban dos productos en aproximadamente igual proporción, uno con el extremo C-terminal en forma de amida y otro en forma de ácido. Las peores condiciones probadas (TBAF en DMF) deterioraban hasta tal punto el péptido de partida que resultaba imposible su detección.

Aunque los contratiempos encontrados en la síntesis de  $\text{H3}_n$  por la estrategia Nbb/Boc/Bn podían ser solucionados modificando convenientemente las etapas “difíciles” del proceso (desprotección final y desanclaje), la estrategia HMFS/Boc/Bn cumplía todos los requisitos necesarios para la síntesis de nuestras quimiotecas sin necesidad de modificación alguna, por lo que fue escogida como la metodología sintética de trabajo. La estrategia era capaz de proporcionar péptidos desprotegidos unidos reversiblemente al soporte de síntesis, con pureza suficiente para ser sometidos a ensayos de actividad sobre fase sólida sin necesidad de purificación alguna. Estos péptidos podían además ser liberados para su caracterización fácilmente, sin peligro de deterioro. Finalmente, cabía destacar que la separación de las etapas de desprotección de las cadenas laterales y de desanclaje, juntamente con las condiciones en las que éste tenía lugar, hacían la estrategia ideal no tan solo para su aplicación a la síntesis de quimiotecas “one-bead-one-compound”, sino también para la obtención de péptidos desprotegidos en disolución que podían ser ensayados directamente. Ello era debido a que los reactivos y subproductos de desprotección podían ser lavados sin dificultad al encontrarse el producto deseado todavía unido al soporte de síntesis, mientras que las condiciones de desanclaje no daban lugar a la formación de subproducto alguno y permitían la eliminación del exceso de reactivos empleado por simple evaporación al vacío. De esta forma se obtenía el producto desanclado libre de las impurezas típicas de un proceso de síntesis de péptidos estándar (capturadotes de carbocationes, grupos protectores liberados en sus diversas formas...), las cuales harían necesaria su purificación.<sup>12</sup>

## 2. Síntesis del péptido $\text{H3}_a$

La síntesis de  $\text{H3}_n$  nos había permitido establecer la estrategia HMFS/Boc/Bn como la óptima para la síntesis de nuestras quimiotecas. Era sin embargo necesario corroborar esta afirmación y comprobar hasta que punto la estrategia era susceptible de automatización, uno de los requisitos deseable aunque no imprescindible en química combinatoria. Para ello se decidió realizar la síntesis de un péptido análogo a  $\text{H3}_n$  (22 aminoácidos) siguiendo esta misma ruta sintética, pero empleando un sintetizador automático. Ya que para la optimización de los ensayos de actividad era necesario disponer tanto del control positivo ( $\text{H3}_n$ ) como del negativo ( $\text{H3}_a$ ) unidos a resina y el primero ya había sido sintetizado, se encogió el péptido  $\text{H3}_a$  como modelo para el desarrollo de esta segunda síntesis.



**Figura 9** Perfil cromatográfico del crudo de desanclaje obtenido para la síntesis de H<sub>3a</sub>R. Cromatograma registrado empleando un gradiente lineal del 15 al 100% de B en A en 40 min.

La síntesis se realizó sobre 450 mg de resina PEGA de funcionalización inicial reducida al 50% (Materiales y Métodos 4.1.3). Tanto la reducción de funcionalización como la incorporación del HMFS y del primer aminoácido se llevaron a cabo de forma manual, siguiendo un protocolo análogo al empleado para H<sub>3n</sub>. Una vez la resina preparada, fue introducida en el reactor adecuado y el resto de la síntesis programada a escala 0.1 mmol en el sintetizador automático de Applied Biosystem 430 A. Los aminoácidos se acoplaron como anhídridos simétricos, utilizando 10 eq. de exceso y DCC y HOBt como agentes de activación, excepto para Asn y Gln, que se introdujeron como ésteres activos de HOBt. Tras los acoplamientos, la peptidil-resina se traspasó a un reactor de síntesis manual donde se llevó a cabo la desprotección del extremo N-terminal y su acetilación.

	Asp	Ser	Glu	Ala	Leu	Lys	Pro
Composición esperada H <sub>3a</sub>	4	2	3	5	3	3	2
Composición experimental H <sub>3a</sub> protegido	4.3	0.9	3.1	4.8	3.0	2.9	1.8
Composición experimental H <sub>3a</sub> desprotegido	4.0	0.8	3.1	4.8	3.0	2.9	2.2

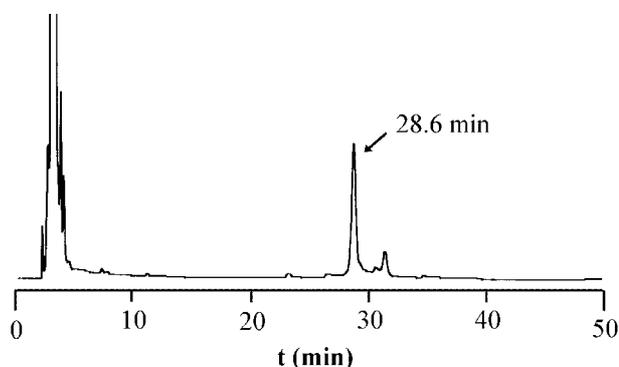
**Tabla 6** Composición esperada y experimental (calculada por análisis de aminoácidos) del péptido H<sub>3a</sub>, tanto protegido como totalmente desprotegido, anclado a HMFS-PEGA.

La Figura 9 muestra el perfil cromatográfico del crudo obtenido por desanclaje de una alícuota de 5 mg de la peptidil-resina protegida (péptido H3<sub>a</sub>R) empleando una mezcla de morfolina/DMF (1:4). Como puede apreciarse, la síntesis proporcionaba un único producto mayoritario de pureza superior al 80%, acompañado de cuatro pequeñas impurezas. Aunque ninguno de los compuestos pudo ser caracterizado por HPLC-MS, el análisis de aminoácidos de una alícuota de peptidil-resina reveló que la composición del péptido sintetizado se correspondía con la esperada para H3<sub>a</sub>R y que, por tanto, la síntesis parecía haberse desarrollado con éxito (Tabla 6).

Una vez caracterizado convenientemente el producto protegido, la peptidil-resina fue dividida en dos mitades, una de las cuales se guardó intacta mientras que la otra fue sometida al tratamiento con HF anhidro necesario para la desprotección de las cadenas laterales. La desprotección se realizó en las mismas condiciones que para H3<sub>n</sub> (5 mL HF/*p*-cresol (9:1), 0°C, 1.5 h, sin agitación magnética), de igual modo que la recuperación y lavados de la peptidil-resina desprotegida. La Figura 10 muestra el perfil cromatográfico del crudo obtenido.

Como puede apreciarse, la síntesis automática de H3<sub>a</sub> proporcionó un único producto mayoritario de pureza superior al 80%, estimada por integración de áreas, y por tanto suficiente para su uso directo en ensayos de actividad. El análisis por HPLC-MS del crudo reveló que la masa del compuesto mayoritario se correspondía con la esperada de H3<sub>a</sub>, así como su composición determinada por análisis de aminoácidos de una alícuota de peptidil-resina (Tabla 6). La relación entre la cantidad de péptido en resina y el aminoácido de referencia Phe, antes y después del tratamiento con HF, permitieron estimar la pérdida de péptido durante la desprotección en un 15%, superior a la obtenida para H3<sub>n</sub> pero aceptable. Las principales impurezas identificadas correspondían a subproductos de deleción, generados por un rendimiento más bajo de lo esperado en algunos de los acoplamientos. Este bajo rendimiento de incorporación, sin embargo, podría haber sido detectado en caso de que la síntesis se hubiese realizado de forma manual, donde es posible seguir el avance de las reacciones de acoplamiento mediante la prueba de ninhidrina, permitiendo el reacoplamiento de los aminoácidos en cuestión si fuera necesario.

La estrategia HMFS/Boc/Bn había permitido, por tanto, la obtención de H3<sub>a</sub> unida a resina



**Figura 10** Perfil cromatográfico del crudo de desanclaje obtenido para la síntesis de H3<sub>a</sub>. Cromatograma registrado empleando un gradiente lineal del 15 al 40% de B en A en 50 min.

y con una pureza suficiente para ser empleado en la optimización del ensayo de actividad. Este resultado corroboraba que la estrategia resultaba idónea para la síntesis de quimiotecas “one-bead-one-compound” de análogos de la hélice III natural del dominio B y que, además, era posible automatizarla.

### 3. Conclusiones

Los resultados obtenidos durante la etapa de optimización de la estrategia sintética nos habían permitido establecer que la estrategia *HMFS/Boc/Bn* era adecuada para la síntesis de las quimiotecas “one-bead-one-compound” de análogos de la hélice III natural del dominio B. Gracias a esto, se disponía de los controles positivo ( $H3_n$ ) y negativo ( $H3_a$ ) desprotegidos y unidos a resina, con pureza suficiente para su uso directo en la optimización del ensayo de actividad. La metodología podía ser automatizada y el *desanclaje de los péptidos* unidos a HMFS, empleando morfolina/DMF, había demostrado *mantener la integridad de sus estructuras*, lo que facilitaba la caracterización de los compuestos anclados al polímero.

Por el contrario, la estrategia *Nbb/Boc/Bn* presentaba problemas tanto en la etapa de desprotección de las cadenas laterales como en desanclaje, proporcionando crudos cuya pureza era insuficiente para su uso en ensayos de actividad. Aunque los problemas en la etapa de desanclaje parecían tener solución secando adecuadamente los reactivos empleados, la ineficacia del tratamiento con HF no podía ser explicada razonablemente y resultaba, por tanto, difícil de solventar.

Finalmente, la estrategia *HMFS/Boc/Bn*, gracias a la separación de las etapas de desprotección final y de desanclaje, junto con la limpieza de las condiciones en las que éste tenía lugar, permitía obtener *péptidos desprotegidos en disolución listos para su evaluación biológica* directa sin necesidad de purificación previa. Ello era debido a que los excesos de reactivos y los subproductos que acompañan a un péptido tras la desprotección final y desanclaje, que en metodologías estándar de síntesis en fase sólida tienen lugar en una sola etapa, aquí podían ser fácilmente eliminados lavando conveniente la peptidil-resina desprotegida, al permanecer el producto aún unido a fase sólida. Tras el desanclaje, la simple evaporación de la mezcla morfolina/DMF proporcionaba el péptido libre de los contaminantes anteriormente comentados.

## 4. Bibliografía

- <sup>1</sup> a) Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1775-1778; b) Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1449-1458
- <sup>2</sup> a) Nicolás, E.; Clemente, J.; Perelló, M.; Albericio, F.; Pedroso, E.; Giralt, E. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2183-2186; b) Nicolás, E.; Clemente, J.; Ferrer, T.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3179-3194
- <sup>3</sup> Meldal, M.; Svendsen, I.; Breddam, K.; Auzanneau, F.-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3314-3318
- <sup>4</sup> a) Gairí, M.; Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7363-7366, b) Alsina, J.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4195-4198
- <sup>5</sup> Tam, J. P.; Riemen, M. W.; Merrifield, R. B. *Peptide. Res.* **1988**, *1*, 6-18
- <sup>6</sup> a) Sondheimer, E.; Holley, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 2467-2470; b) Bernhard, S.A.; Berger, A.; Carter, J. H.; Katchalski, E.; Sela, M.; Shalitin, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 2421-2434
- <sup>7</sup> a) Nicolás, E.; Pedroso, E.; Giralt, E. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 497-500; b) Anisfeld, S. T.; Lansbury Jr., P. T. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5560-5562; c) Lauer, J. L.; Fields, C. G.; Fields, G. B.; *Lett. Pept. Sci.* **1994**, *1*, 197-205
- <sup>8</sup> Kates, S. A.; Albericio, F. *Lett. Pept. Sci.* **1994**; *1*, 213-220
- <sup>9</sup> Kiso, Y.; Itoh, H.; Tanaka, S.; Kimura, T.; Akaji, K. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7599-7602
- <sup>10</sup> Rabanal, F.; Pastor, J. J.; Nicolás, E.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8093-8096
- <sup>11</sup> a) Meldal, M. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077-3080; b) Auzanneau, F.-I.; Meldal, M.; Bock, K. *J. Peptide Sci.* **1995**, *1*, 31-44
- <sup>12</sup> Pastor, J. J.; Fernández, I.; Rabanal, F.; Giralt, E. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3831-3833

## **Capítulo 3: Desarrollo de la metodología de secuenciación**



Como ya se indicó en el Capítulo 1, el desarrollo de nuestra metodología combinatoria requería de un sistema para la secuenciación de los péptidos revelados positivos durante el ensayo de actividad, reconocidos por la fluorescencia de las unidades de resina donde se encontrarían anclados tras la unión con la IgG marcada. De las diferentes herramientas disponibles se decidió utilizar la espectrometría de masas, y más concretamente la técnica de MALDI-TOF PSD, debido a que sus propiedades la convertían en idónea para tal fin. De esta forma, la secuenciación de los positivos se llevaría a cabo directamente, empleando el producto contenido en una única unidad de resina (100-200 pmol). Aún así, como también se comentó en el Capítulo 1, paralelamente a la secuenciación por MALDI-TOF PSD y durante una estancia en el laboratorio del Prof. Mark Bradley, se desarrolló una segunda metodología de secuenciación por espectrometría de masas basada en la generación de escaleras de secuencias parciales marcadas isotópicamente. Esta segunda metodología, aunque fuera del marco general del presente trabajo, se encontraba íntimamente ligada al tipo de quimiotecas con las que se pretendía trabajar (“one-bead-one-compound”) y suponía, por lo tanto, una alternativa al MALDI-TOF PSD en caso de que éste no proporcionase los resultados esperados. Por ello, la optimización de esta segunda metodología también será descrita en este capítulo, aunque de forma independiente.

## **1. Generación de una escalera de secuencias parciales marcadas isotópicamente como método de secuenciación<sup>1</sup>**

El desarrollo de esta metodología de secuenciación se encontraba englobado dentro de un proyecto para la búsqueda de tripéptidos con capacidad para catalizar la reacción de Diels-Alder por química combinatoria, empleando para tal fin quimiotecas “one-bead-one-compound” ensayadas con los candidatos unidos a fase sólida. En el momento del inicio de esta colaboración, la secuenciación de los compuestos activos se realizaba por degradación de Edman, ya que todos los aminoácidos empleados en la síntesis de las quimiotecas eran aminoácidos naturales y el extremo N-terminal de todos los compuestos se encontraba libre. Sin embargo, el deseo de sintetizar nuevas quimiotecas con aminoácidos no naturales o con el extremo N-terminal

modificado, junto con la lentitud y elevado coste de la degradación de Edman, les llevó a diseñar una nueva metodología de secuenciación basada en el uso de la espectrometría de masas y la generación de escaleras de secuencias parciales, la optimización de la cual fue mi principal tarea durante la estancia.

La metodología de secuenciación por generación de escaleras de secuencias parciales fue desarrollada por Keough y col. en 1995<sup>2</sup> como un medio rápido, sencillo y eficaz para la secuenciación de péptidos empleando el producto aislado de una unidad de resina. Las ventajas que esta metodología ofrecía sobre las ya existentes permitieron su rápida expansión dentro de la química combinatoria, hasta convertirla en una de las técnicas de rutina para la identificación de compuestos revelados biológicamente activos en el trabajo con quimiotecas “one-bead-one-compound”.<sup>3</sup>

La metodología original se basaba, como puede apreciarse en la Figura 1, en la terminación parcial (10%) de las cadenas en crecimiento durante el acoplamiento de cada aminoácido, empleando para tal fin una mezcla 9:1 del aminoácido a incorporar con *N*-acetil-D,L-alanina. Las diferencias en la velocidad de incorporación de la Ala comparada con el resto de aminoácidos conducían, sin embargo, a un grado de terminación irregular que dificultaba la interpretación de los resultados. Ello llevó a Bock y col.<sup>3b</sup> a su modificación, pasando a utilizar mezclas 9:1 del mismo aminoácido con el grupo  $\alpha$ -amino protegido ortogonalmente (Fmoc/Boc o bien Fmoc/Alloc),\* asegurando así una terminación homogénea de las cadenas en crecimiento, fuese cual fuese el aminoácido incorporado. Este proceso de terminación parcial hacía que, al final de la síntesis, cada unidad de resina contuviera el péptido de secuencia total de forma mayoritaria, acompañado de un pequeño porcentaje de subespecies que formaban la llamada “escalera de secuencias parciales”. El análisis por MALDI-TOF del crudo obtenido por desanclaje de una sola unidad de resina permitía la detección de todas estas moléculas y, por tanto, la identificación de la secuencia, a partir de la diferencia de masas entre picos consecutivos.

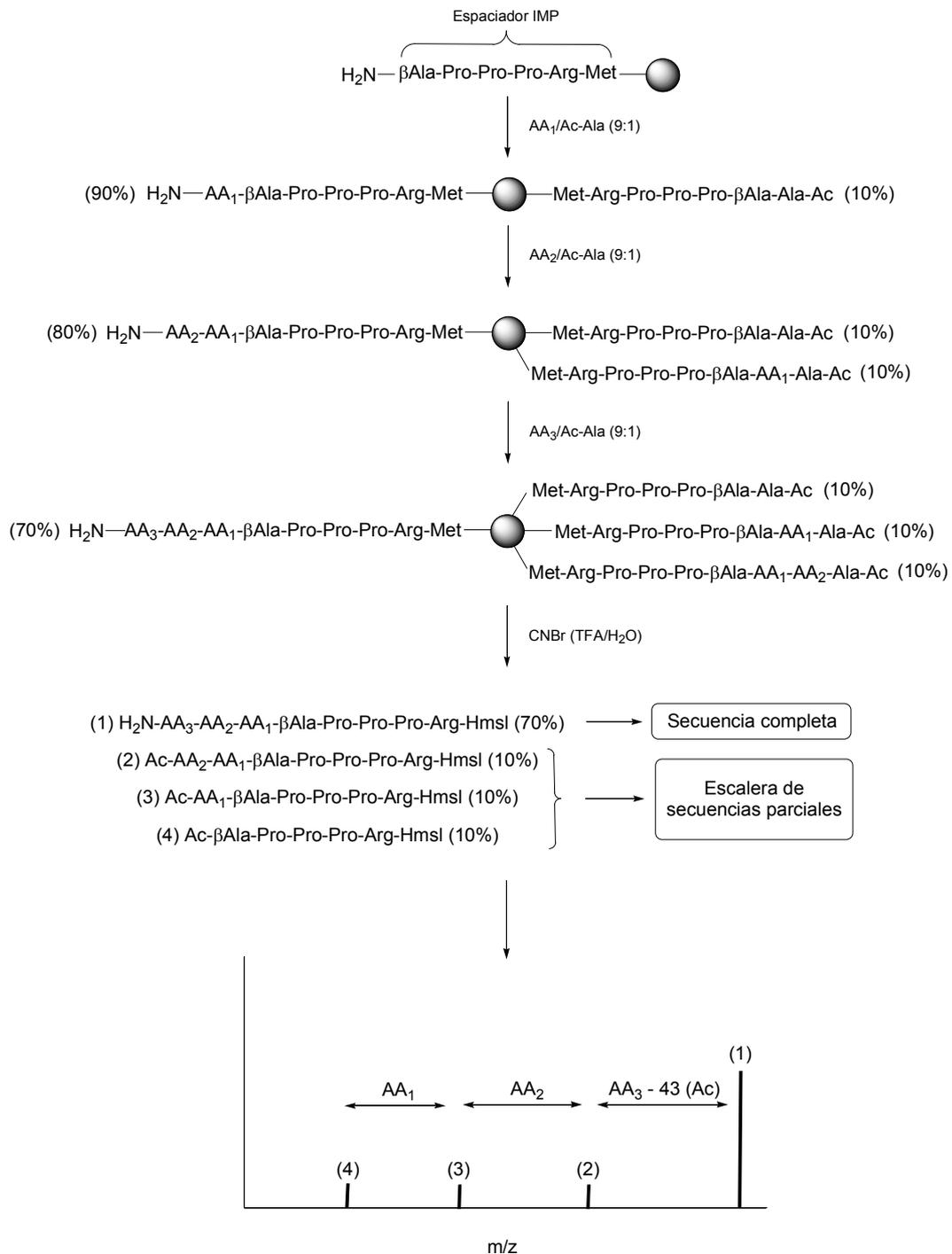
Además de la terminación parcial de las cadenas, la metodología incluía también la incorporación del espaciador  $\beta$ -AlaProProProArgMet entre los péptidos de la quimioteca y la resina. El espaciador indicado tenía en realidad múltiples funciones: i) la Met se empleaba como espaciador bifuncional, al ser estable a todas las condiciones de síntesis y permitir la liberación del producto por tratamiento con CNBr; ii) el uso de Arg perseguía el aumento de la eficiencia de ionización de los compuestos para facilitar su detección por MS, al incorporar un sitio seguro de protonación; iii) el espaciador completo aumentaba el peso molecular de todos los compuestos por encima de 500 Da, alejándolos del ruido de la matriz en los espectros de MALDI, lo que facilitaba su detección; iv) finalmente, la secuencia  $\beta$ -AlaProProPro fue escogida debido a su baja afinidad frente a los receptores estudiados, para la separación los péptidos de la quimioteca de la metionina,

---

\* El uso de los grupos Boc y Alloc, resistentes a las condiciones de eliminación del grupo Fmoc, permiten la terminación del crecimiento de las cadenas en las cuales han sido incorporados. Al final de las síntesis estos protectores pueden ser fácilmente eliminados, al mismo tiempo que los protectores de las cadenas laterales en caso del Boc, o en tratamientos posteriores de las peptidil-resinas en el caso del Alloc, dando lugar a la escalera de secuencias parciales totalmente desprotegida.

la arginina y la propia resina, evitando así posibles interferencias en los ensayos de actividad. Este tipo de espaciadores fue bautizado con el nombre de “espaciador IMP” (*ionization/mass peptide spacer*).<sup>3b</sup>

Aunque la metodología ofrecía claras ventajas en términos de rapidez y coste, comparada



**Figura 1** Representación esquemática de la metodología desarrollada por Keough y col.<sup>2</sup> para la secuenciación de péptidos por espectrometría de masas, empleando el producto contenido en una sola unidad de resina. Los aminoácidos se muestran en notación de tres letras, empleando el término Hmsl para representar la lactona de homoserina generada a partir de la Met durante el desanclaje de los péptidos por tratamiento con CNBr.

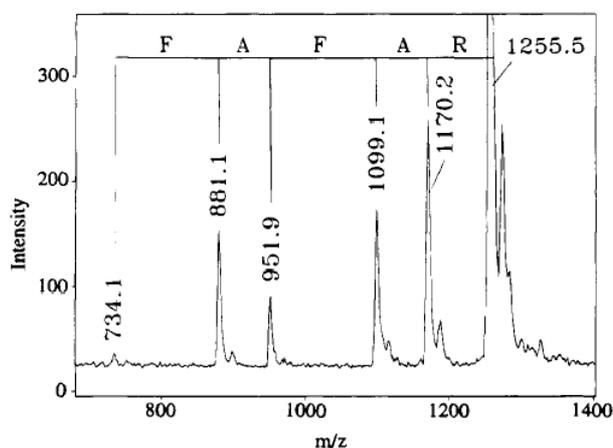
con el resto de técnicas aplicadas a la identificación de compuestos activos provenientes de quimiotecas “one-bead-one-compound”, presentaba también una serie de inconvenientes importantes que ya fueron comentados en detalle en el Capítulo 1 de esta tesis (apartado 4). A modo de resumen se enumeran a continuación:

- Reducción de la cantidad de producto (péptido de secuencia completa) disponible para la realización de los ensayos de actividad, causado por la terminación parcial de las cadenas en crecimiento. Ello disminuía la sensibilidad de los ensayos, limitando los compuestos que podían ser detectados a aquellos con elevada afinidad por el receptor. Este problema fue parcialmente resuelto por Griesinger y col.<sup>4</sup> con el uso de programas informáticos y varios reactivos para la generación de las escaleras de secuencias parciales, que hacían innecesaria la etapa de terminación parcial después de cada acoplamiento. El problema era mayor cuanto mayor era el tamaño de los péptidos que formaban las quimiotecas.

- Posible interferencia de las secuencias parciales durante los ensayos de actividad, con la consiguiente identificación de falsos positivos o negativos.

- Para finalizar, existía un último inconveniente que, aunque no fue comentado en el Capítulo 1, podía resultar crítico a la hora de la secuenciación, y para cuya solución se diseñaron y optimizaron las modificaciones de la metodología general que se comentan más adelante. Si pensábamos en la cantidad limitada de producto que presentaba una unidad de resina (100-200 pmoles), era fácil darse cuenta que la concentración de los péptidos con secuencia parcial en el crudo de desanclaje se encontraba cerca de los límites de detección del MALDI-TOF. Es por ello que en ocasiones se obtenían espectros *donde la señal de alguno de estos compuestos era confundida con el ruido de fondo* (Figura 2), o se tomaban por buenos picos intensos que en realidad no pertenecían a ninguno de ellos, proporcionando secuencias incompletas o incorrectas.

Con el objetivo de proporcionar una solución a este último problema, se decidió modificar

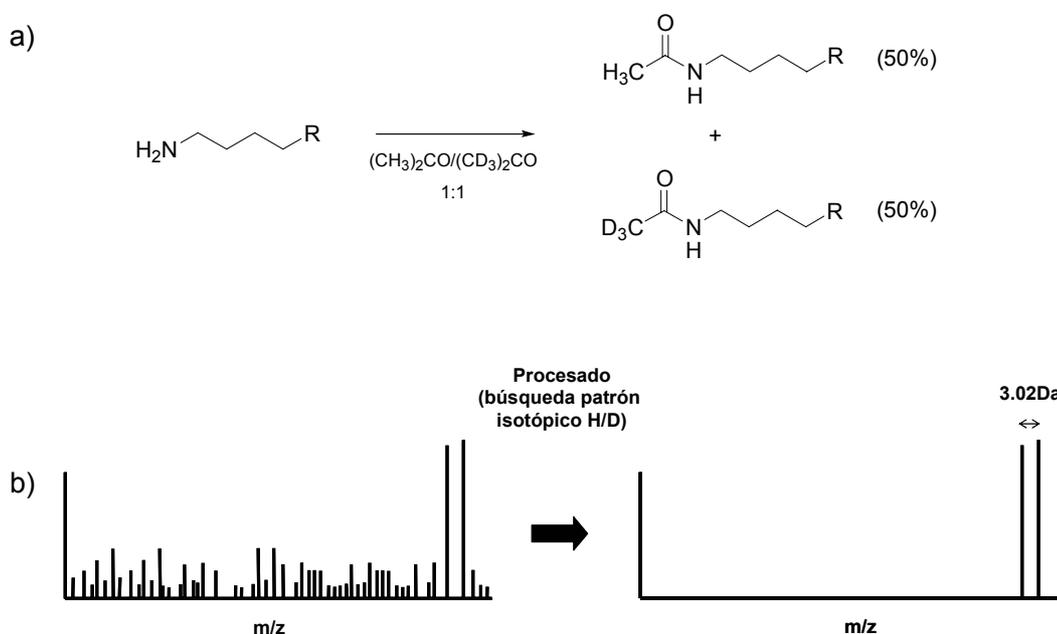


**Figura 2** Espectro de MALDI-TOF de uno de los crudos obtenidos por Keough y col.<sup>2</sup> durante el desarrollo de la metodología de secuenciación. Sobre el espectro se muestran los aminoácidos identificados por diferencia de masa entre picos consecutivos. Como puede apreciarse, el último compuesto (734.1 m/z) proporciona una señal muy poco intensa, que puede llegar a confundirse con el ruido de fondo.

la metodología general de Keough haciendo uso de las *técnicas de marcaje isotópico y análisis de patrones isotópicos*, como medio para *aumentar tanto la sensibilidad como la especificidad* de la detección de las secuencias parciales.<sup>5</sup>

### 1.1 Primer diseño

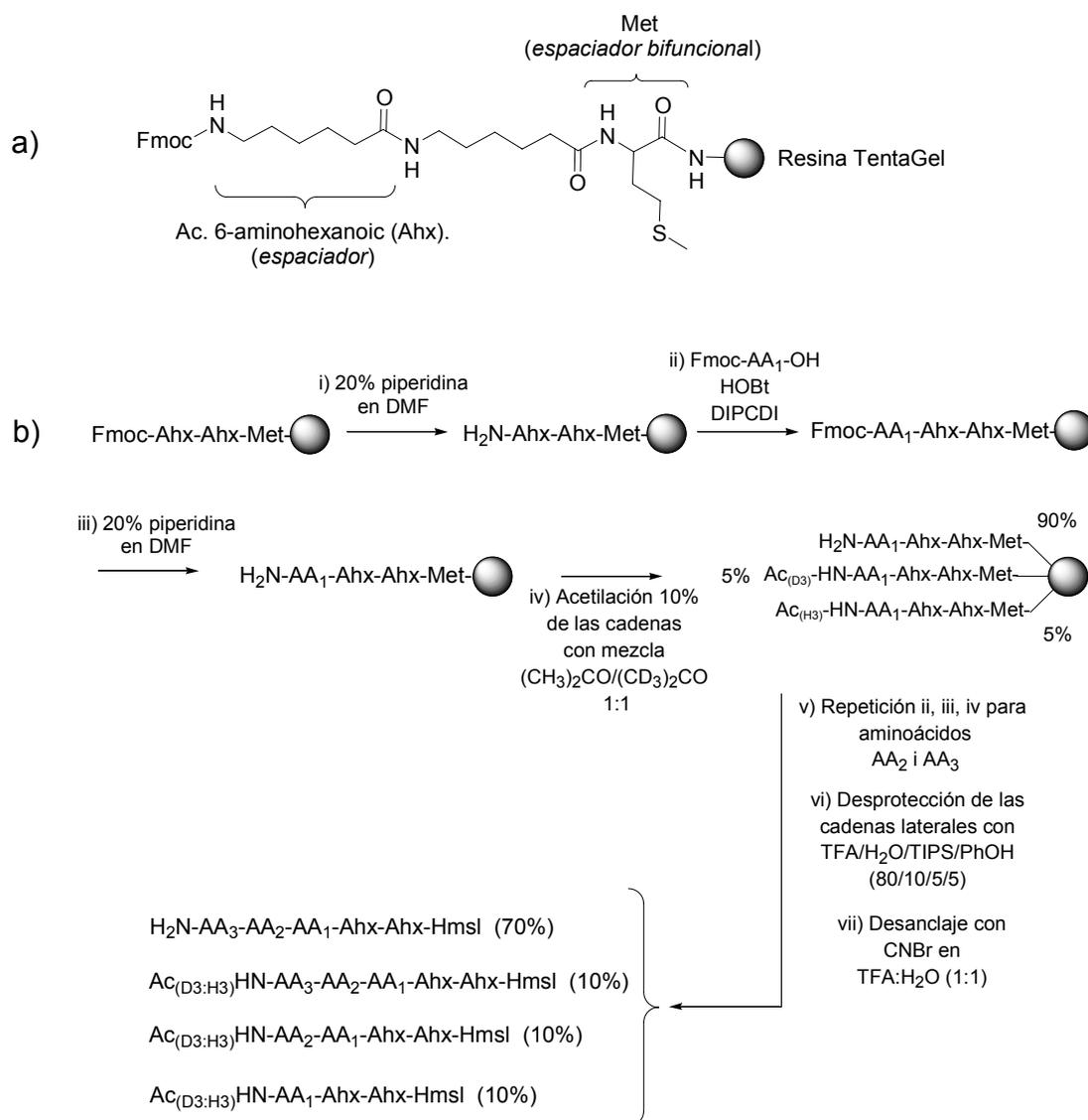
Las técnicas de marcaje isotópico se basan en el uso de mezclas controladas de reactivos durante la síntesis, formadas por un compuesto dado y un análogo de éste enriquecido isotópicamente en alguno o algunos de sus átomos (por ejemplo mezclas de  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}/(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  (1:1) para la acetilación de aminas). Este tipo de reacciones generan lo que llamamos un *patrón isotópico*, es decir, *una mezcla de productos de propiedades prácticamente análogas, en relación de concentraciones conocida* (en función de la proporción de cada reactivo en la mezcla de reacción) *y cuyas masas moleculares difieren unas pocas unidades de masa debido a los diferentes isótopos que componen su estructura*. En el ejemplo anteriormente propuesto (Figura 3), el uso de la mezcla de anhídridos generaría dos tipos de acetilamida en proporción casi equimolar: una donde el acetilo estaría compuesto por tres hidrógenos y otra donde lo estaría por tres deuterios. Aunque las propiedades de ambos compuestos serían muy similares sus masas moleculares diferirían 3.018 Da (la diferencia entre 3D y 3H). El análisis exhaustivo del espectro de masas de



**Figura 3** (a) Ejemplo de la aplicación de la técnica de marcaje isotópico para el análisis de aminas primarias, empleando una mezcla de anhídrido acético/anhídrido acético deuterado (1:1). (b) Esquema del teórico espectro de masas que se obtendría en el análisis de la mezcla de amidas sintetizadas, antes y después del procesado para la búsqueda de marcaje isotópico introducido.

la mezcla en busca de este patrón isotópico (picos en relación 1:1 con una diferencia en su masa de 3.02 Da) permitiría tanto su identificación (aumento de sensibilidad) como su asignación unívoca (aumento de especificidad), pues sólo aquellos productos provenientes de la reacción con los anhídridos contendrían este tipo de marca y podrían ser detectados, aun cuando la intensidad de los picos fuese pequeña.

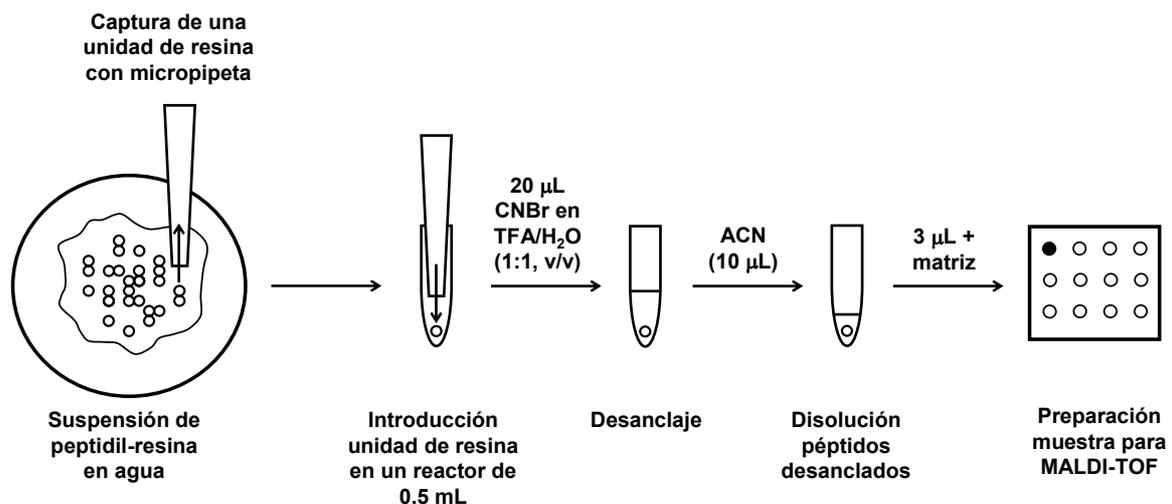
La aplicación de este principio a la secuenciación de péptidos por generación de escaleras de secuencias parciales dio como fruto la metodología que se esquematiza en la Figura 4. Como puede apreciarse, la metodología diseñada se basó en la síntesis de quimiotecas “one-bead-one-



**Figura 4** a) Estructura del espaciador Ahx-Ahx-Met empleado. El espaciador permite la síntesis de péptidos desprotegidos unidos al soporte de síntesis, gracias al uso de Met en C-terminal, los cuales pueden ser liberados por tratamiento con CNBr. b) Esquema de la estrategia diseñada para la secuenciación del péptido contenido en una sola unidad de resina por generación de escaleras de secuencias parciales marcadas isotópicamente. Los aminoácidos se representan en código de tres letras, empleando la notación *Ahx* para el ácido 6-aminohexanoico y *HmsI* para la lactona de homoserina generada a partir de la Met durante el tratamiento con CNBr.

compound” siguiendo un esquema de protección Fmoc/tBu y empleando resina TentaGel como soporte polimérico, ampliamente utilizado en el trabajo con este tipo de quimiotecas debido a su compatibilidad tanto con disolventes orgánicos como acuosos.<sup>6</sup> De igual modo que en la metodología original, se decidió incluir un espaciador entre la resina y los péptidos (Ahx-Ahx-Met en nuestro caso) que permitiese: i) la síntesis de péptidos desprotegidos unidos a resina reversiblemente, gracias a la labilidad del enlace Met-resina al tratamiento con CNBr; ii) aumentar la masa molecular de los productos sintetizados para que éstos quedasen alejados del ruido de la matriz en los espectros. La introducción del marcaje isotópico se decidió llevarla a cabo por acetilación parcial de las cadenas en crecimiento tras la incorporación de cada aminoácido, empleando para tal fin una mezcla de  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}/(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ /trietilamina (0.5:0.5:1, 0.1 eq.). Ello permitiría que, a la vez que se generaban los péptidos de secuencia parcial, éstos quedasen marcados por la formación de dos especies diferentes en cantidad equimolar, las cuales diferían 3.02 Da (10% en total cada vez).

La aplicabilidad de esta metodología se puso a prueba con la síntesis del péptido modelo Phe-Gly-Val-espaciador sobre 300 mg de resina. La elección de un tripéptido vino condicionada por el tipo de quimiotecas con las que se pretendía trabajar (quimiotecas de tripéptidos, como se ha comentado anteriormente), mientras que su secuencia se determinó de forma aleatoria, procurando sin embargo que los tres aminoácidos fuesen de diferente masa y evitando la presencia de aminoácidos que pudiesen provocar problemas de síntesis importantes. La síntesis se llevó a cabo de forma manual según se describe en Procedimientos Experimentales 7.1, empleando excesos de 5 eq. en los acoplamientos y DIPCDI/HOBt como agentes de activación. La terminación parcial de las cadenas en crecimiento se realizó generando primero una suspensión homogénea de la peptidil-resina en una disolución de la mezcla de anhídridos en DMF, sobre la cual se añadió la trietilamina. La finalidad de éste protocolo no era otra que procurar una acetilación homogénea de las cadenas en crecimiento en todas las unidades de resina, ya que si los reactivos se añadían de forma conjunta, al encontrarse éstos en defecto, las unidades de resina situadas en la parte superior



**Figura 5** Esquema del proceso seguido para la obtención del producto contenido en una sola unidad de resina para su análisis por MALDI-TOF

del reactor en cada momento sufrirían una terminación muy superior al resto. Una vez acabada la incorporación de los aminoácidos y las acetilaciones parciales, se procedió al tratamiento de la peptidil-resina con TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS/fenol (8:1:0.5:0.5). Aunque la etapa resultaba innecesaria para el péptido sintetizado al carecer de protectores en sus cadenas laterales, se realizó el tratamiento con el objetivo de comprobar que efectivamente el sistema era estable a las condiciones de desprotección, conservándose el péptido unido a resina sin alteraciones evidentes de su estructura.

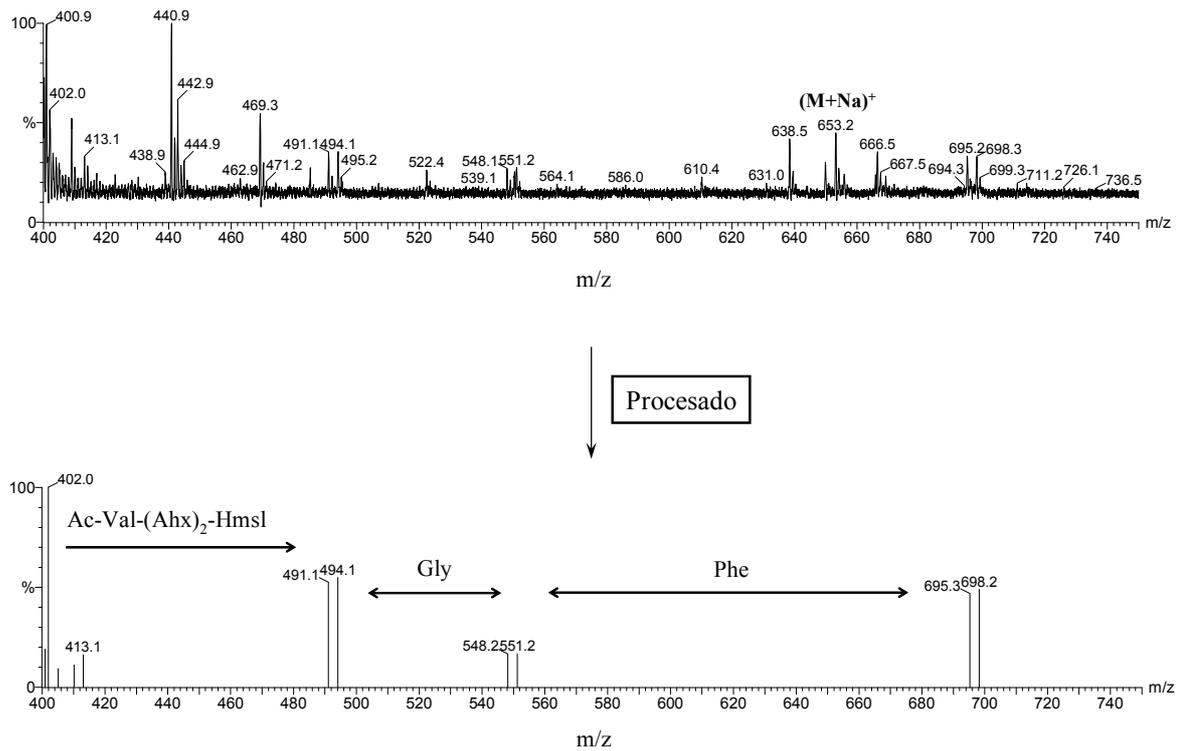
La evaluación de la metodología se realizó mediante el análisis por MALDI-TOF del producto contenido en 20 unidades de resina, liberado de forma individual. El proceso seguido para la preparación de las muestras se esquematiza en la Figura 5. Partiendo de una alícuota de peptidil-resina suspendida en 500  $\mu$ L de agua y colocada en el centro de una cápsula de Petri, las bolas de resina se succionaron una a una con una micropipeta y se introdujeron en reactores independientes de 0.5 mL, siguiendo la operación con un microscopio óptico. El desanclaje se llevó a cabo por tratamiento de cada unidad con 20  $\mu$ L de una disolución de CNBr en TFA/H<sub>2</sub>O (1:1, 24h en ausencia de luz) y posterior evaporación al vacío de los reactivos,<sup>7</sup> tras lo cual el crudo obtenido fue disuelto en 10  $\mu$ L de acetonitrilo. De esta disolución sólo 3  $\mu$ L se emplearon en la preparación de la muestra para su análisis por MS, utilizando ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico como matriz.

Estructura	Abundancia (%)	(M+H) <sup>+</sup> teórico (m/z)	(M+Na) <sup>+</sup> teórico (m/z)
Phe-Gly-Val-(Ahx)2-Hmsl	70	631.4	653.4
Ac <sub>(H3:D3)</sub> -Phe-Gly-Val-(Ahx)2-Hmsl	5/5	673.4/676.4	695.4/698.4
Ac <sub>(H3:D3)</sub> -Gly-Val-(Ahx)2-Hmsl	5/5	526.3/529.3	548.3/551.3
Ac <sub>(H3:D3)</sub> -Val-(Ahx)2-Hmsl	5/5	469.3/472.3	491.3/494.3

**Tabla 1** Composición teórica de los productos contenidos en el crudo de desanclaje. La tabla muestra la estructura de los péptidos en código de tres letras, empleando la notación Ahx para el ácido 6-aminohexanoico y Hmsl para la lactona de homoserina generada a partir de la Met en el tratamiento con CNBr. El término H3:D3 se utiliza como medio para representar que cada uno de los péptidos de secuencia parcial se encuentra en forma de dos compuestos en proporción equimolar: uno donde el grupo acetilo sólo contiene H y otro donde sólo contiene D.

La Figura 6 muestra uno de los espectros registrados durante el análisis de las 20 muestras preparadas, antes y después de ser procesado en busca del patrón isotópico introducido. Como puede apreciarse, antes del procesado era posible diferenciar claramente el pico correspondiente a la masa del producto principal esperado (Tabla 1), así como las tres parejas de picos correspondientes a las escaleras de secuencias parciales marcadas isotópicamente. La intensidad de estos picos no era, sin embargo, muy elevada, por lo que si en lugar de tratarse de un péptido de estructura conocida nos encontrásemos ante un positivo obtenido de un ensayo de actividad, la identificación de la secuencia podría resultar francamente difícil, en estas condiciones.

Los espectros de MALDI-TOF adquiridos se procesaron empleando el programa MassLynx® para la búsqueda de picos gemelos (intensidad 1:1) separados 3.02 Da,



**Figura 6** Espectros de MALDI-TOF de uno de los 20 crudos obtenidos por desanclaje del producto contenido en las unidades de resina aisladas. La parte superior de la figura muestra el espectro registrado sin modificación alguna. La parte inferior muestra el resultado del procesado del espectro en busca del patrón isotópico introducido (picos de intensidad 1:1 separados 3.02 Da). Sobre el espectro se especifican los aminoácidos identificados a partir de la diferencia de masa entre pares de picos consecutivos.

correspondientes al patrón isotópico introducido. Como se observa en la parte inferior de la figura, después del procesado los espectros pasaban a contener únicamente los picos pertenecientes a la escalera de péptidos de secuencias parciales, facilitando la secuenciación. Resultaba evidente que la metodología era efectiva y que, por tanto, la introducción del patrón isotópico permitía aumentar tanto la sensibilidad de la detección como su especificidad, ya que sólo aquellos compuestos marcados permanecían tras el procesado.

Aunque los resultados obtenidos resultaban prometedores, menos de la mitad de los 20 crudos analizados proporcionaron espectros donde todos los compuestos de la escalera de secuencias parciales eran detectables, incluso después del procesado, mostrando una *eficacia de secuenciación excesivamente baja* para la aplicación de la metodología al trabajo con quimiotecas “one-bead-one-compound”. La intensidad tanto de la señal correspondiente al producto principal como del resto de compuestos sufría además grandes variaciones de una unidad de resina a otra. Estas observaciones nos llevaron a concluir que el protocolo para la acetilación parcial no permitía una terminación homogénea de las cadenas en crecimiento, necesaria para que el péptido contenido en todas las unidades de resina pudiese ser secuenciado.

## 1.2 Segundo diseño

Con el objetivo de solucionar este problema de la falta de homogeneidad, se procedió a la modificación de la etapa de acetilación parcial de la metodología diseñada. El uso de anhídridos se había mostrado del todo inadecuado. La pequeña cantidad de éstos empleada (0.1 eq.) y su elevada reactividad hacían posible que la reacción tuviese lugar sin necesidad de trietilamina (añadida en nuestro caso de forma separada para asegurar una terminación parcial homogénea en toda la peptidil-resina), debido probablemente a la presencia de trazas de base en la DMF. El inicio de la reacción tenía lugar, por tanto, en el preciso momento de la adición de la mezcla de anhídridos a la peptidil-resina, conduciendo a una mayor acetilación en unas unidades de resina que en otras.

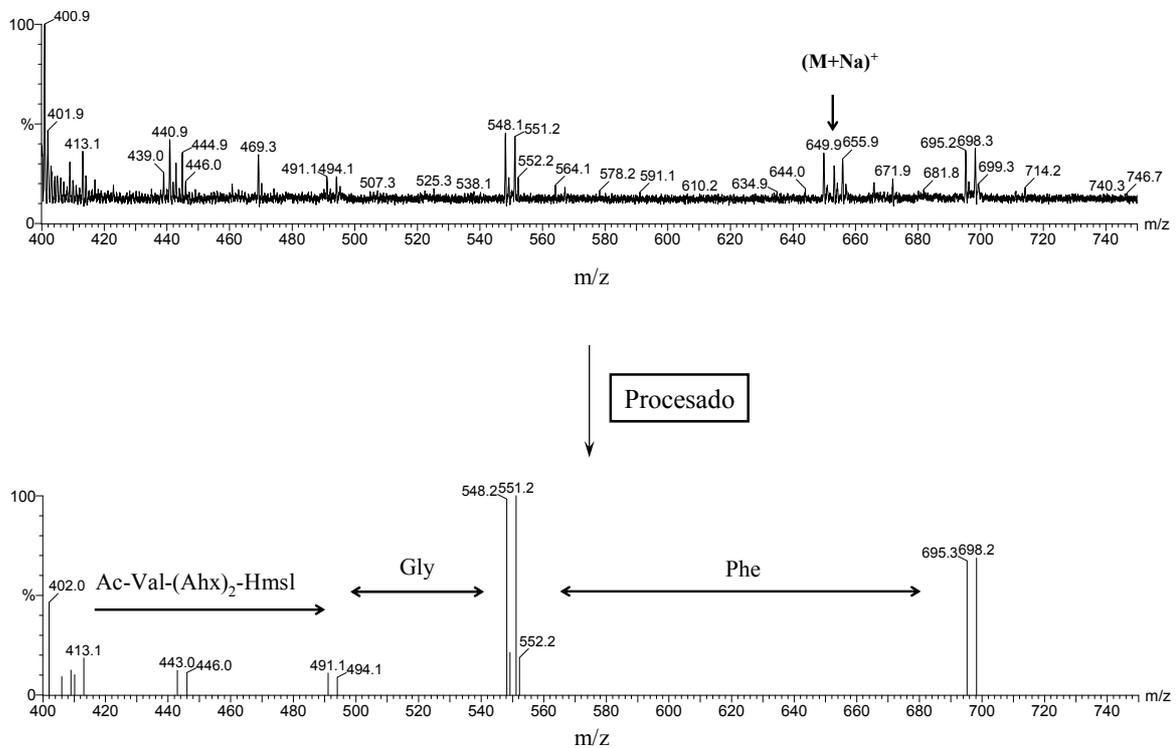
Resultaba evidente que el nuevo protocolo debía permitir la homogenización de la mezcla peptidil-resina/reactivos de forma previa al inicio de la reacción. Por ello se decidió emplear una mezcla de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CD}_3\text{COOD}$  (1:1, 0.1 eq.) para la acetilación parcial, ya que estos podían ser puestos en contacto con la peptidil-resina sin peligro alguno de reacción, hasta la adición del agente de activación. Esta nueva metodología para la generación de las secuencias parciales comenzaría con la generación de una suspensión homogénea de la peptidil-resina en una disolución de los ácidos en DMF, sobre la que se añadiría un exceso de agentes de activación de forma que se asegurase la total incorporación de los ácidos introducidos. Como agentes de activación se escogieron el par PyBOP/DIEA (3 eq.) ya que, al contrario que las carbodiimidas o sales de uronio, el PyBOP no provocaba la guanilidación de los grupos  $\alpha$ -amino libres.<sup>8</sup>

Con el protocolo de acetilación parcial rediseñado, se procedió de nuevo a la síntesis del péptido control Phe-Gly-Val-espaciador sobre 300 mg de resina TentaGel. La síntesis se llevó a cabo manualmente, de forma análoga a la anterior excepto para la etapa de terminación parcial de cadenas en crecimiento. Una vez el péptido sintetizado, se procedió al aislamiento de 20 unidades de resina y al análisis de sus crudos por MALDI-TOF, previo desanclaje con CNBr.

La Figura 7 muestra uno de los espectros de MALDI-TOF adquiridos, antes y después de su procesado. Como puede apreciarse en el espectro normal, tanto la señal correspondiente al producto principal como las correspondientes a los pares de secuencias parciales (Tabla 1) eran claramente visibles, aún antes del análisis de los datos. El procesado del espectro en busca del patrón isotópico introducido, sin embargo, eliminaba todas las señales irrelevantes, facilitando el proceso de asignación de picos y, por tanto, la secuenciación. Al contrario que en la síntesis anterior, en este caso la mayoría de los crudos analizados (18 de 20) permitieron la secuenciación completa del péptido de forma inequívoca, ya que, tras el procesado, sólo las 6 señales correspondientes a las secuencias parciales permanecían en el espectro.

Los resultados obtenidos demostraban, por tanto, que la metodología de secuenciación desarrollada permitía la secuenciación del péptido contenido en una sola unidad de resina, empleando únicamente 1/3 del producto desanclado. La introducción del patrón isotópico proporcionaba un aumento tanto de la sensibilidad en la detección como de la especificidad, ya que el procesado del espectro eliminaba todas aquellas señales irrelevantes facilitando el proceso de

identificación de los picos correspondientes a los compuestos de secuencia parcial, que en algunos casos podían ser confundidos con el ruido de fondo en el espectro normal.

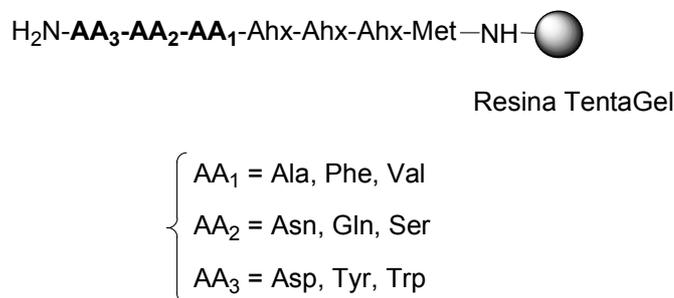


**Figura 7** Espectros de MALDI-TOF de uno de los 20 crudos obtenidos por desanclaje del producto contenido en las unidades de resina aisladas. La parte superior de la figura muestra el espectro registrado sin modificación alguna. La parte inferior muestra el resultado del procesado del espectro en busca del patrón isotópico introducido (picos de intensidad 1:1 separados 3.02 Da). Sobre el espectro se especifican los aminoácidos identificados a partir de la diferencia de masa entre pares de picos consecutivos.

### 1.3 Síntesis de la quimioteca L27-1

Una vez comprobado el buen funcionamiento de la metodología, se procedió a su aplicación a la secuenciación de péptidos provenientes de quimiotecas “one-bead-one-compound”, para lo cual se sintetizó la quimioteca de 27 tripéptidos que se muestra en la Figura 8. Como puede apreciarse, la secuencia del espaciador fue modificada con respecto a las síntesis anteriores con la incorporación de un tercer Ahx, ya que, como se había comprobado durante el análisis del péptido modelo, algunas de las señales se encontraban todavía demasiado cercanas a la zona del espectro contaminada por el ruido de la matriz, lo que dificultaba su identificación. Los aminoácidos que componían la quimioteca se escogieron de forma aleatoria entre los aminoácidos naturales (excepto Cys), procurando que ninguno de ellos estuviese repetido y todos dispusiesen de diferente

masa, para facilitar la secuenciación. La síntesis se llevó a cabo sobre 300 mg de resina de forma manual, según se describe en Materiales y Métodos 6.4, siguiendo el protocolo estándar de *mezcla y separación* (Introducción 2.1.5).<sup>9</sup>



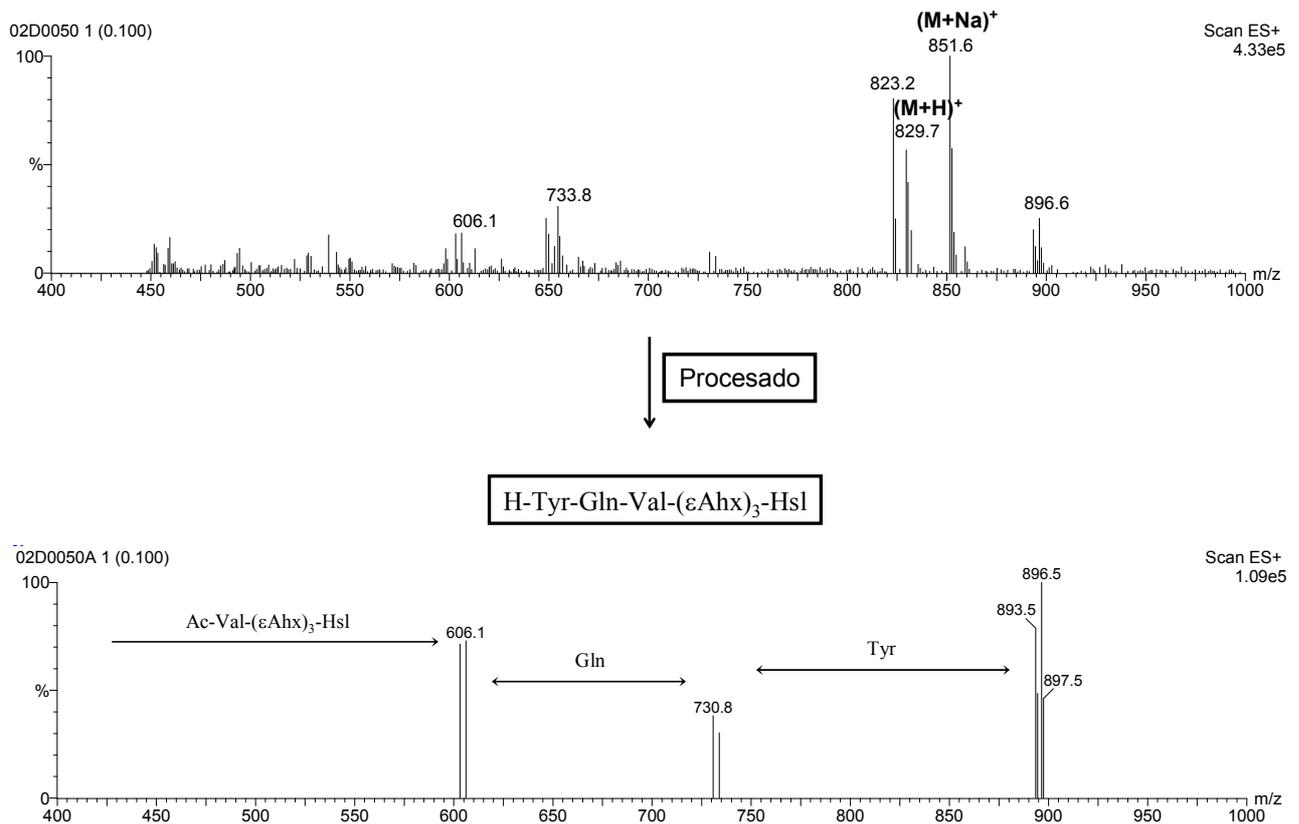
**Figura 8** Estructura de la quimioteca L27-1. Los aminoácidos se representan en código de tres letras, empleando el término Ahx para el ácido 6-aminohexanoico. El término AA<sub>n</sub> (n = 1,2 ó 3) se utiliza para indicar las posiciones donde se incorporó más de un aminoácido, la identidad de los cuales se especifica en la parte inferior de la figura.

Cada ciclo de síntesis comenzó con la división de la resina en tres porciones iguales, para lo cual la peptidil-resina se suspendió en DMF y fue dividida en tres volúmenes equivalentes con una micropipeta. Una vez la resina en reactores independientes, se procedió a la incorporación de los aminoácidos asignados a esa posición, uno en cada reactor. Para ello se emplearon excesos de 5 eq. y DIPCDI/HOBt como agentes de activación. Finalizado el acoplamiento, se llevó a cabo la desprotección de los grupos α-amino, con la resina todavía separada, y la terminación parcial de las cadenas en crecimiento, siguiendo el protocolo desarrollado. Las acetilaciones parciales se realizaron en este punto y no tras el proceso de mezcla para asegurar que *tenían lugar de forma homogénea* sobre todas las unidades de resina, ya que la *diferente velocidad de reacción de los tres aminoácidos introducidos* en cada posición podía conducir a una acetilación preferente sobre unas unidades que sobre otras. Acabado el proceso de generación de secuencias parciales, el total de la resina se introdujo en un único reactor y se mezcló convenientemente suspendiéndola en DMF. Finalmente se procedió a la desprotección de las cadenas laterales de los péptidos por tratamiento de la peptidil-resina con TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS/fenol (8:1:0.5:0.5) y la quimioteca se lavó convenientemente y se guardó seca en el congelador.

<b>Secuencias teóricas</b>	27
<b>Secuencias identificadas</b>	13
<b>Unidades de resina analizadas</b>	30
<b>Unidades secuenciadas con éxito</b>	30

**Tabla 2** Resumen de los resultados obtenidos tras el procesado de los espectros de MALDI-TOF, registrados durante el análisis de los productos contenidos en las unidades de resina aisladas de la quimioteca L27-1.

El análisis de la aplicabilidad de la metodología al trabajo con quimiotecas se llevó a cabo a partir de los espectros de MALDI-TOF registrados para los crudos obtenidos de 30 unidades de resina, sometidas de forma independiente al proceso de desanclaje. En la Tabla 2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos y en las Figura 9 y Figura 10 algunos ejemplos de los espectros registrados, antes y después del procesado (ver resto de espectros en páginas 214 a 217 del Anexo).

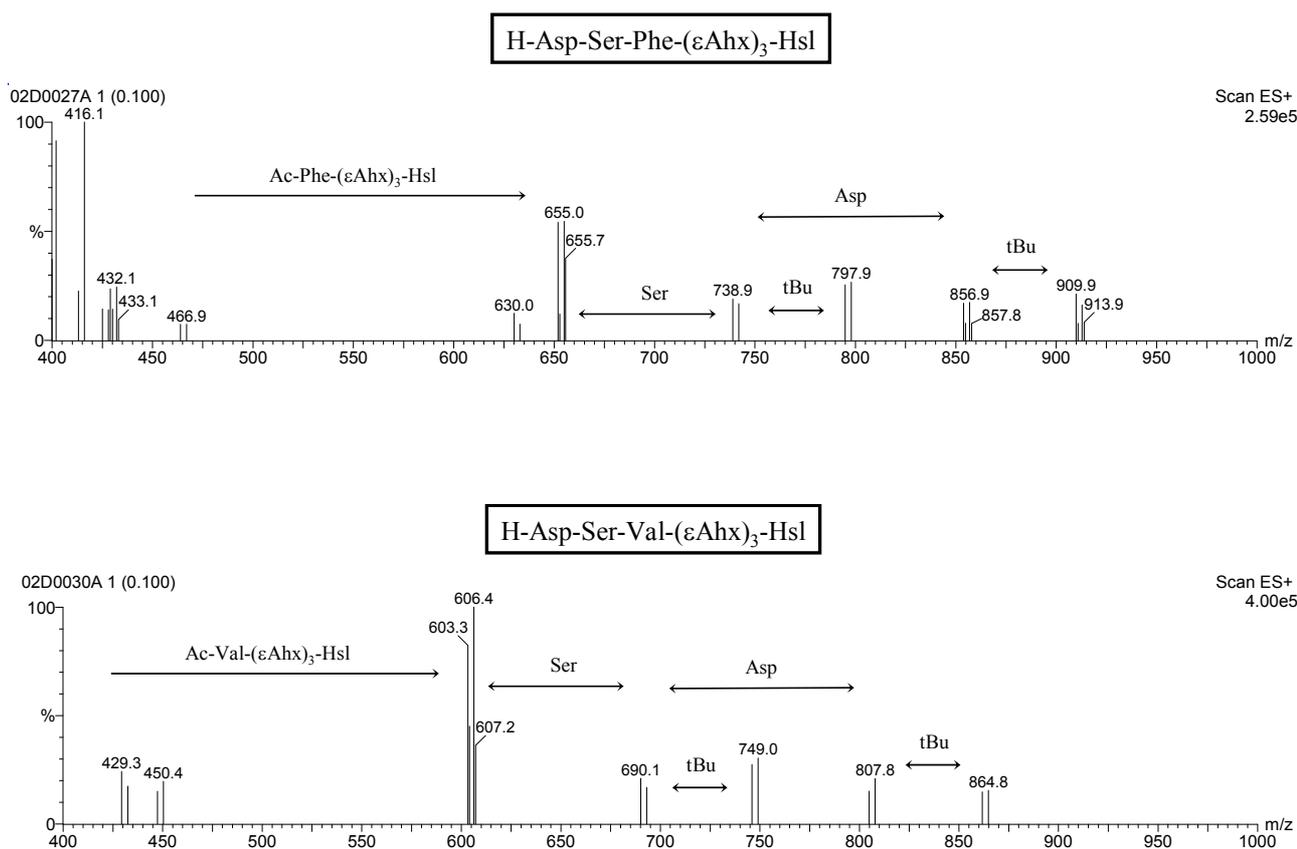


**Figura 9** Espectros de MALDI-TOF de uno de los crudos de la quimioteca L27-1 analizados. La figura muestra el espectro sin procesar en la parte superior, con las señales correspondientes a la masa molecular de la secuencia deducida destacadas. En la parte inferior se muestra el resultado del procesado del espectro para la búsqueda del patrón isotópico introducido, así como los aminoácidos identificados a partir de las señales de la escalera de secuencias parciales y la secuencia total del péptido analizado.

Como puede apreciarse, estos resultados nos permitieron corroborar las conclusiones extraídas del análisis del péptido modelo sintetizado en el apartado anterior. El uso de una tercera parte del producto contenido en una unidad de resina era suficiente para la adquisición de espectros de MALDI-TOF de elevada calidad, los cuales podían ser fácilmente interpretados tras el procesado de los datos en busca del patrón isotópico introducido, con elevada eficacia (Tabla 2). La eliminación del ruido de fondo y de señales irrelevantes permitía destacar las señales pertenecientes a péptidos de secuencia parcial y detectar aquellas que en condiciones normales se hubiesen pasado por alto debido a su baja intensidad, realizándose la asignación de forma directa e

inequívoca. Se aumentaba así tanto la sensibilidad como la especificidad de la secuenciación, ya que solamente aquellas señales pertenecientes a la escalera de secuencias parciales permanecían en el espectro. El trabajo con quimiotecas nos permitió observar, además, que la metodología hacía posible no tan solo la secuenciación de péptidos, sino también la *identificación de reacciones secundarias* ocurridas durante la síntesis. Estas reacciones tenían lugar tanto en el producto principal como en los péptidos de secuencia parcial, lo cual conducía a subproductos marcados isotópicamente cuyas señales permanecían en el espectro tras el procesado (señales “no esperadas”). A modo de ejemplo, la Figura 10 muestra la detección de problemas en la desprotección de la cadena lateral de Ser en algunos de los crudos analizados (desprotección parcial), identificados a partir de la diferencia de masa entre los picos pertenecientes a péptidos de secuencia parcial y las señales “no esperadas” aparecidas del espectro.

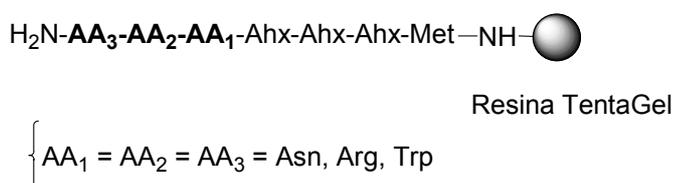
Quedaba demostrado, por tanto, que la metodología desarrollada podía ser aplicada a la secuenciación de péptidos provenientes de quimiotecas “one-bead-one-compound”, solventando los problemas de falta de sensibilidad y especificidad que presentaba la metodología original de Keough.



**Figura 10** Espectros de MALDI-TOF procesados obtenidos del análisis de los crudos de la quimioteca L27-1. Los espectros muestran los aminoácidos y las reacciones secundarias identificadas a partir de las señales generadas por la escalera de secuencias parciales. En la parte superior de cada espectro se muestra la secuencia total deducida del espectro.

### 1.4 Síntesis de la quimioteca L27-2

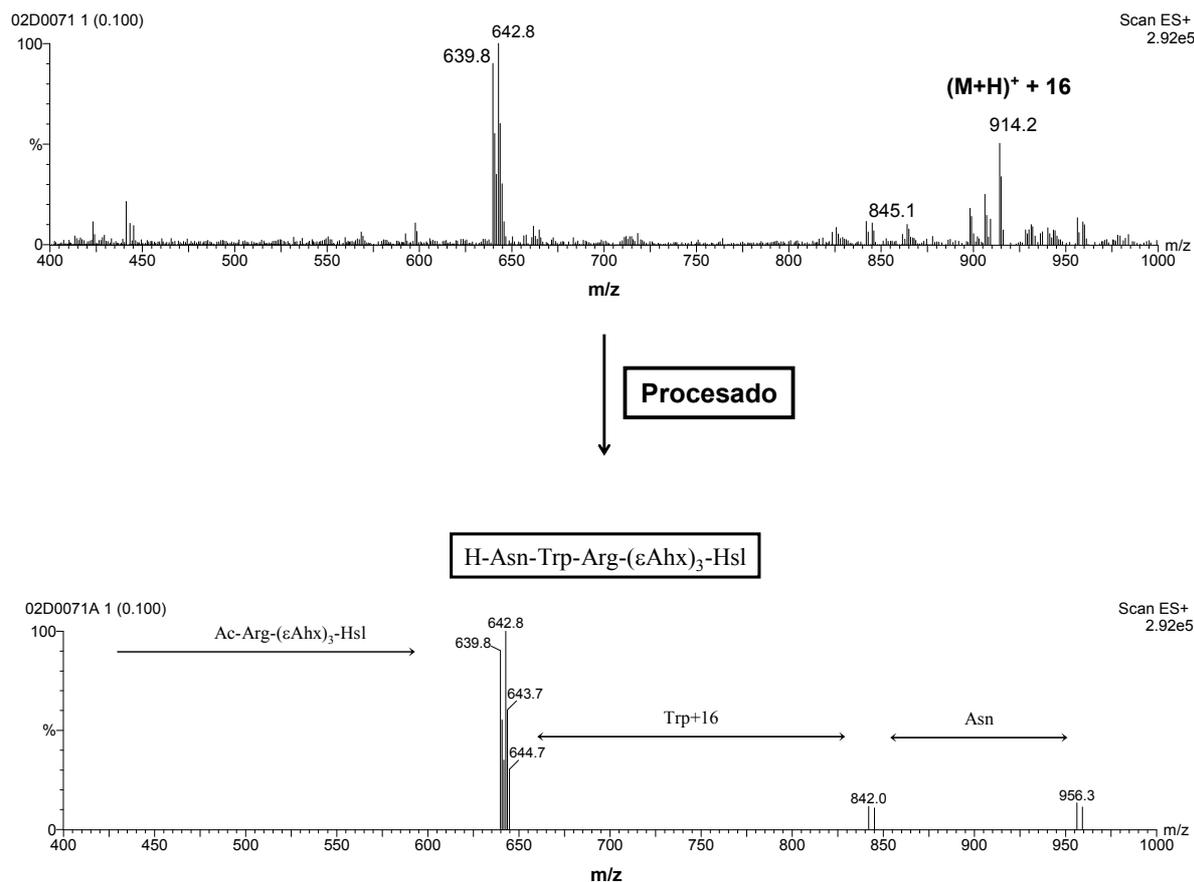
Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos con la quimioteca L27-1, se procedió a la síntesis de una segunda quimioteca de 27 tripéptidos empleando, en este caso, los mismos aminoácidos para las tres posiciones permutadas (Figura 11). De entre ellos, la Arg se escogió para comprobar si la ionización de los péptidos mejoraba de forma importante con ella y el Trp para poner a prueba la capacidad de detección de reacciones secundarias, muy comunes en su presencia debido a su tendencia a la captura de carbocationes. El tercer aminoácido se escogió de forma totalmente aleatoria.



**Figura 11** Estructura de la quimioteca L27-2. Los aminoácidos se representan en código de tres letras, empleando el término Ahx para el ácido 6-aminohexanoico. El término AA<sub>n</sub> (n = 1,2 ó 3) se utiliza para indicar las posiciones donde se incorporaron más de un aminoácido, la identidad de los cuales se especifica en la parte inferior de la figura.

La síntesis de la quimioteca se llevó a cabo sobre 300 mg de resina siguiendo un procedimiento análogo al del apartado anterior, excepto para la desprotección de las cadenas laterales de la peptidil-resina que en este caso se realizó también con una mezcla de TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS/fenol (8:1:0.5:0.5) pero aumentando el tiempo de reacción a 2 h, debido a la presencia del protector Pmc. Acabada la síntesis, se procedió al desanclaje del producto contenido en 27 unidades de resina aisladas y al análisis de los crudos obtenidos por MALDI-TOF más procesado.

Como puede apreciarse, la aplicación de la metodología de secuenciación a los péptidos sintetizados en esta segunda quimioteca proporcionó resultados análogos a los obtenidos anteriormente. Los espectros de MALDI-TOF registrados eran de elevada calidad, aun empleando una tercera parte del producto contenido en una unidad de resina. El procesamiento de los datos para la búsqueda del patrón isotópico introducido proporcionaba espectros donde sólo las señales correspondientes a la escalera de secuencias parciales estaban presentes, facilitando en gran medida la interpretación y obteniéndose picos que en el espectro normal pasaban desapercibidos (Figura 12 y páginas 218 a 221 del Anexo). De las 27 unidades de resina analizadas se obtuvieron 23 secuencias completas (Tabla 3), lo cual demostraba la elevada eficacia de la metodología, más teniendo en cuenta que las cuatro unidades de resina no secuenciadas no proporcionaron pico alguno en el espectro de MALDI-TOF, debido probablemente a problemas en el desanclaje o a la pérdida de las unidades de resina antes de que éste se llevase a cabo. La identificación de

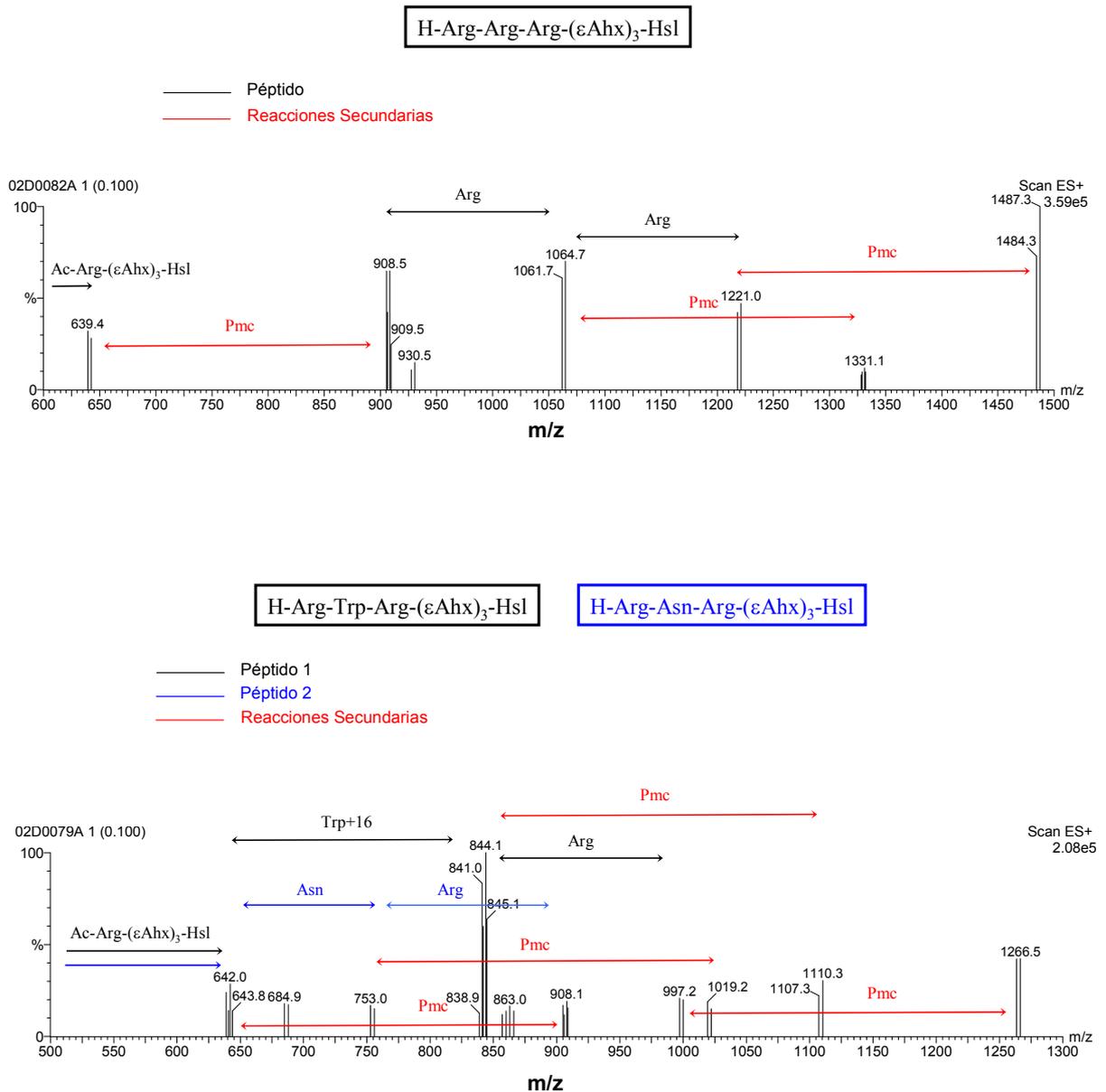


**Figura 12** Espectros de MALDI-TOF de uno de los crudos de la quimioteca L27-2 analizados. La figura muestra el espectro sin procesar en la parte superior, con las señales correspondientes a la masa molecular de la secuencia deducida destacadas. En la parte inferior se muestra el resultado del procesado del espectro para la búsqueda del patrón isotópico introducido, así como los aminoácidos identificados a partir de las señales de la escalera de secuencias parciales y la secuencia total del péptido analizado.

reacciones secundarias ocurridas durante la síntesis era también un hecho comprobado, como se muestra en la Figura 13, donde se puede observar claramente la existencia de subproductos de desprotección parcial de Arg. El potencial de la metodología era suficiente como para permitir la identificación de los dos péptidos contenidos en un mismo crudo, procedente de dos unidades de resina sometidas juntas al proceso de desanclaje por un error en su aislamiento (Figura 13). Finalmente, cabe destacar que la presencia de Arg en los péptidos analizados aumentaba de forma considerable la intensidad de sus señales en los espectros de MALDI-TOF. Resultaba factible pensar, por tanto, que la secuenciación podía llevarse a cabo con una menor cantidad de producto, por lo que la introducción de este aminoácido sobre el espaciador permitiría el desarrollo de una nueva metodología análoga donde la terminación parcial de las cadenas en crecimiento se realizase con la mitad de los equivalentes de ácido acético utilizados hasta el momento. Esta nueva metodología solucionaría parcialmente otro de los problemas importantes de la metodología original: la pérdida de compuesto de secuencia total disponible para los ensayos de actividad (ver apartado 1 del presente capítulo).

<b>Secuencias teóricas</b>	27
<b>Secuencias identificadas</b>	15
<b>Unidades de resina analizadas</b>	27
<b>Unidades secuenciadas con éxito</b>	23

**Tabla 3** Resumen de los resultados obtenidos tras el procesamiento de los espectros de MALDI-TOF registrados durante el análisis de los productos contenidos en las unidades de resina aisladas de la quimioteca L27-2.



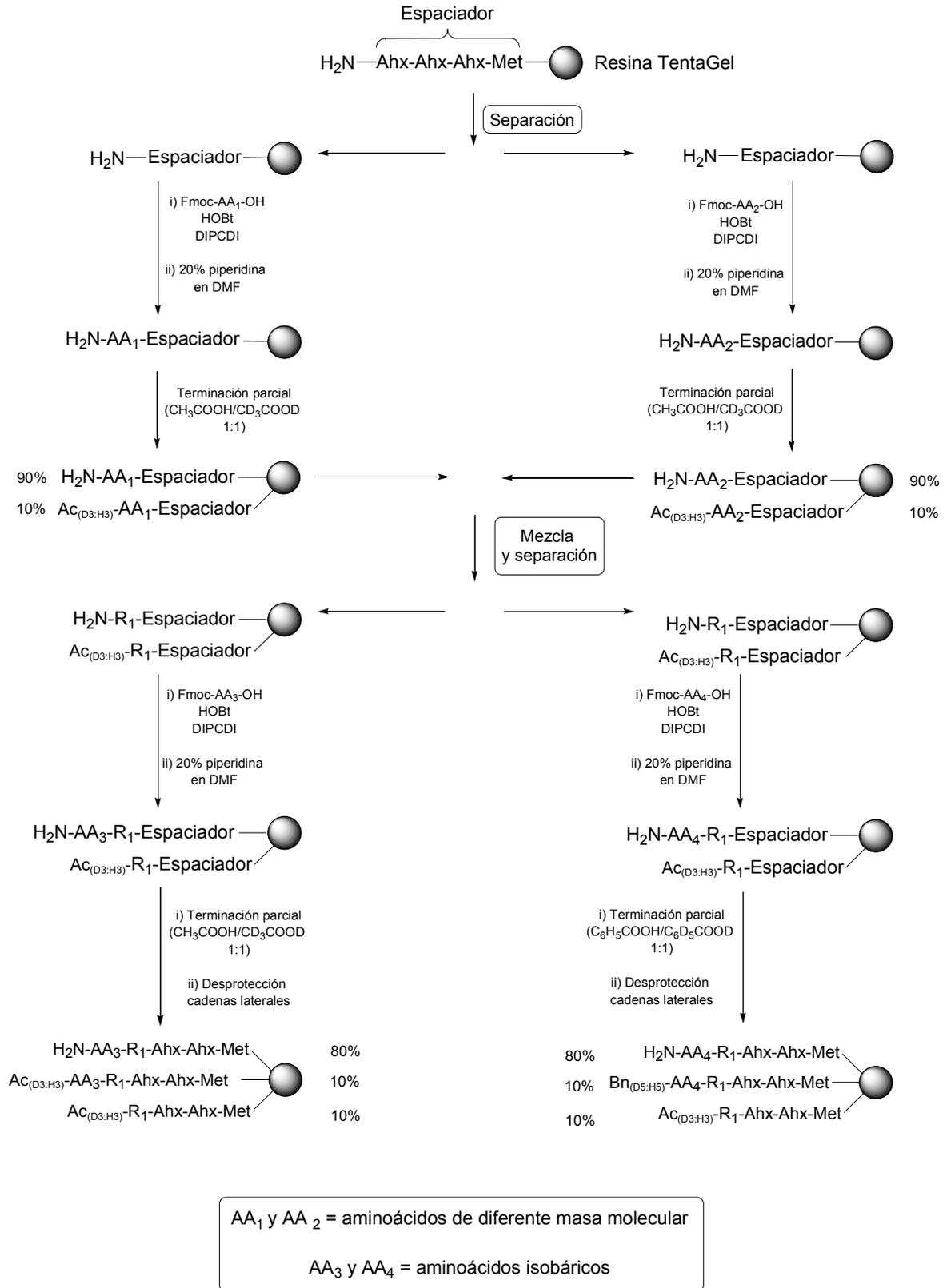
**Figura 13** Espectros de MALDI-TOF de uno de los crudos de la quimioteca L27-2 analizados. La figura muestra el espectro sin procesar en la parte superior, con las señales correspondientes a la masa molecular de la secuencia deducida destacadas. En la parte inferior se muestra el resultado del procesamiento del espectro para la búsqueda del patrón isotópico introducido, así como los aminoácidos identificados a partir de las señales de la escalera de secuencias parciales y la secuencia total del péptido analizado.

De esta forma, quedaba demostrado que el marcaje isotópico de las escaleras de secuencias parciales permitía solucionar la falta de sensibilidad y de especificidad de la metodología de Keough, y que, por tanto, la nueva metodología diseñada resultaba ideal para la secuenciación de péptidos pequeños provenientes de quimiotecas “one-bead-one-compound”.

### **1.5 Síntesis de la quimioteca L6**

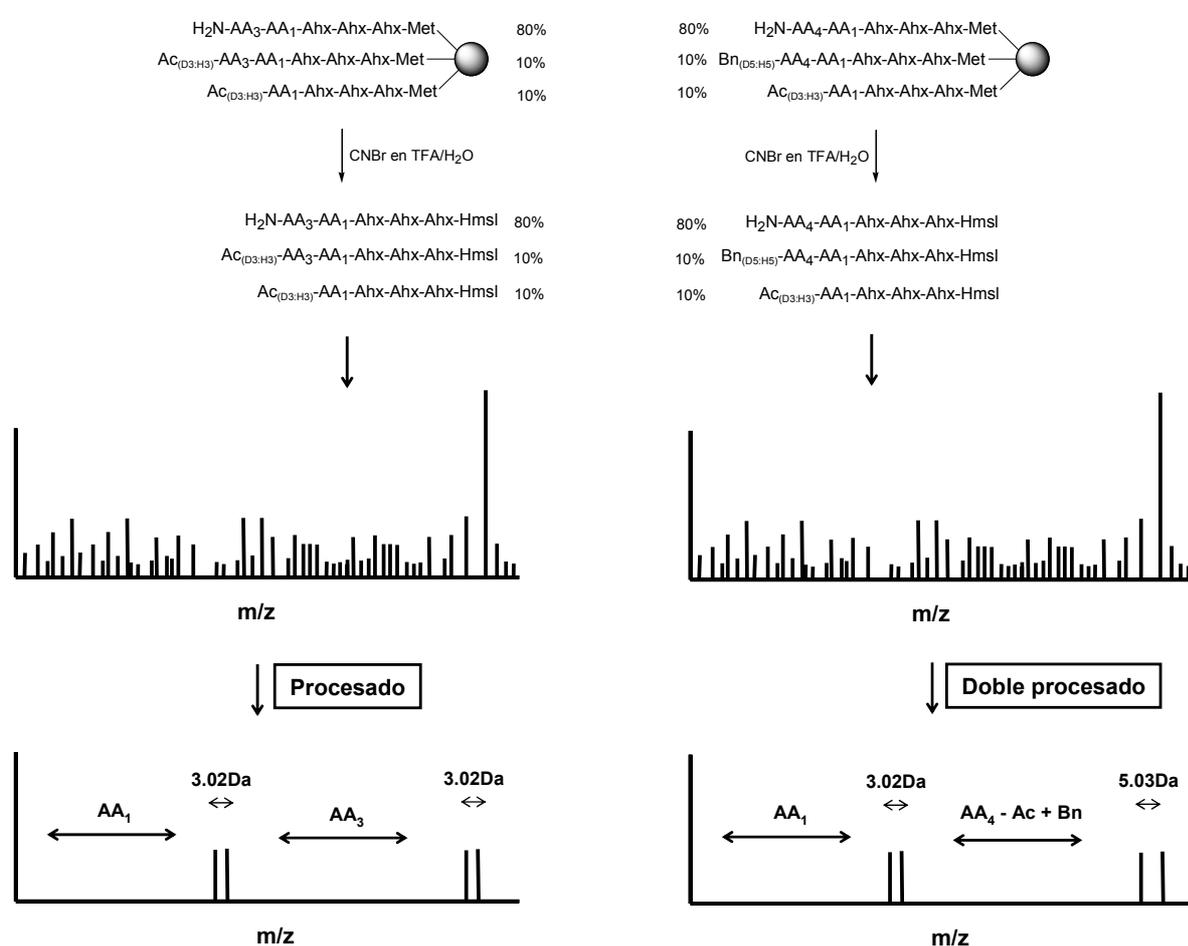
Uno de los principales problemas que presenta el uso de la espectrometría de masas para la secuenciación de péptidos es la imposibilidad de diferenciar aminoácidos isobáricos (de igual masa) presentes en una misma posición, como son por ejemplo los pares Leu/Ile o Lys/Gln. La metodología desarrollada, aunque muy efectiva, no ofrecía ninguna solución a éste problema, lo cual limitaba el número de aminoácidos que podían ser utilizados para la síntesis de las quimiotecas. Sin embargo, la introducción del patrón isotópico por acilación con una mezcla del mismo ácido formado por diferentes isótopos ofrecía una gran versatilidad, ya que existían múltiples mezclas de éste tipo que podían ser empleadas para el mismo fin, las cuales generarían diferentes tipos de patrón isotópico (señales de intensidad 1:1 separadas por diferentes intervalos de masa). Este hecho nos condujo a pensar que el marcaje isotópico podía ser empleado no solamente como medio para aumentar la sensibilidad y especificidad de la secuenciación, sino también para la “codificación” de estos pares de aminoácidos. Con esta idea se llevó a cabo el diseño de la metodología que se describe a continuación (Figura 14), basada en la introducción de un doble patrón isotópico en la escalera de secuencias parciales.

Como puede apreciarse, la metodología diseñada era análoga a la empleada hasta el momento. Ésta se basaba en la síntesis de las quimiotecas por el procedimiento estándar de *mezcla y separación*, llevando a cabo la terminación parcial de las cadenas en crecimiento (10 %) tras cada paso de acoplamiento, separadamente en las diferentes alícuotas de peptidil-resina. En este punto se introdujo el sistema de doble marcaje isotópico. Cuando todos los aminoácidos incorporados en una posición presentaban masa molecular diferente ( $AA_1$  y  $AA_2$  en la Figura 14), la acilación se realizaba nuevamente con una mezcla de  $CH_3COOH/CD_3COOD$ . Por el contrario, en el caso de que dos aminoácidos isobáricos fuesen incorporados en la misma posición ( $AA_3$  y  $AA_4$  en la Figura 14), la terminación parcial de las cadenas se realizaba con la mezcla anterior para todos los aminoácidos de masa diferente y uno de los isobáricos, mientras que la peptidil-resina que incorporaba el segundo aminoácido isobárico se acilaba con una mezcla de  $C_6H_5COOH/C_6D_5COOD$ , empleando también 0.1 eq. y los mismo agentes de activación. De esta forma se generaban dos tipos de peptidil-resina, una que incorporaba un único patrón isotópico (picos 1:1 separados 3.02 Da) y otra que incorporaba un doble patrón: el normal y otro con picos de intensidad 1:1 separados 5.03 Da (5D-5H) y que necesitaba un doble procesado para la identificación de todas las cadenas de secuencia parcial (Figura 15).



**Figura 14** Esquema de la metodología diseñada para la síntesis de quimiotecas “one-bead-one-compound” de dipéptidos, con secuencias codificadas por escaleras de secuencias parciales marcadas isotópicamente, empleando un doble marcaje isotópico para la diferenciación de aminoácidos isobáricos. Los aminoácidos se representan en código de tres letras. El término AA<sub>n</sub> se emplea para representar un aminoácido cualquiera, mientras que el término R1 se utiliza para representar todos los aminoácidos incorporados en una misma posición.

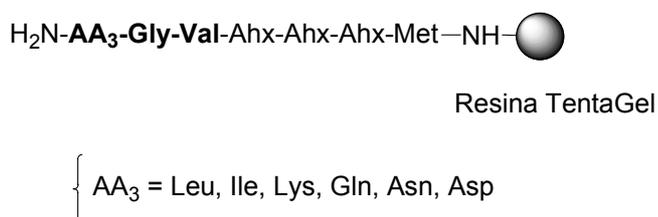
En el primer caso, el procesado en busca de picos de igual intensidad separados 3.02 Da revelaría todas las señales correspondientes a estas secuencias parciales, las cuales permitirían conocer la identidad de los aminoácidos que componían la secuencia, incluida la del aminoácido isobárico ( $AA_3$  siguiendo el ejemplo de la Figura 14), ya que el patrón isotópico realizaría también la función de “codificador”, al haber sido introducido sólo en uno de ellos. En el segundo caso, resultarían necesarios dos procesados para revelar todas las señales correspondientes a secuencias parciales, el anterior y otro en busca de pares de picos separados 5.03 Da. De nuevo, la diferencia de masas entre pares de picos consecutivos, corregida en este caso por la presencia de agentes acilantes diferentes ( $mAA = \Delta m + mAc - mBn$ ;  $m = \text{masa}$ ), permitiría la secuenciación completa del péptido, incluyendo la identidad del aminoácido isobárico  $AA_4$ , que al presentar un patrón isotópico diferente de  $AA_3$  quedaría también “codificado”.



**Figura 15** Representación esquemática de los dos tipos de unidades de resina proporcionados por la metodología diseñada y del tipo de procesado a llevar a cabo para la secuenciación de los péptidos, empleando como modelo una quimioteca de dos aminoácidos incluyendo un par de aminoácidos isobáricos:  $AA_3$  y  $AA_4$ .

Una vez diseñada la metodología, se llevó a cabo la síntesis de una pequeña quimioteca de seis tripéptidos, donde la posición N-terminal fue la única variada, incorporando dos parejas de

aminoácidos isobáricos y otros dos aminoácidos cuya diferencia de masa era del orden de 1 Da y que, en función de la calidad de la calibración del espectro, podían llegar a ser difíciles de diferenciar (Figura 16). La síntesis se desarrolló sobre 300 mg de resina, siguiendo la metodología anteriormente descrita, análoga a la utilizada para las síntesis de las quimiotecas L27-1 y L27-2. En este caso, sin embargo, la terminación parcial de las cadenas en crecimiento se realizó empleando una mezcla de CH<sub>3</sub>COOH/CD<sub>3</sub>COOD (1:1, 0.1 eq.) para las alícuotas donde se había incorporado Leu, Asp y Lys, mientras que para las otras tres alícuotas (Ile, Gln y Asn) se utilizó una mezcla de C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COOH/C<sub>6</sub>D<sub>5</sub>COOD (1:1, 0.1 eq.). Una vez acabas las etapas de acoplamiento y de bloqueo parcial, se llevó a cabo la mezcla final de la resina y la desprotección de las cadenas laterales por tratamiento de la peptidil-resina protegida con TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS/fenol (8:1:0.5:0.5) durante una hora. Finalmente, la peptidil-resina desprotegida se lavó convenientemente y se guardó en el congelador, a excepción de ocho unidades de resina que se trataron individualmente con CNBr y se analizaron por MALDI-TOF.



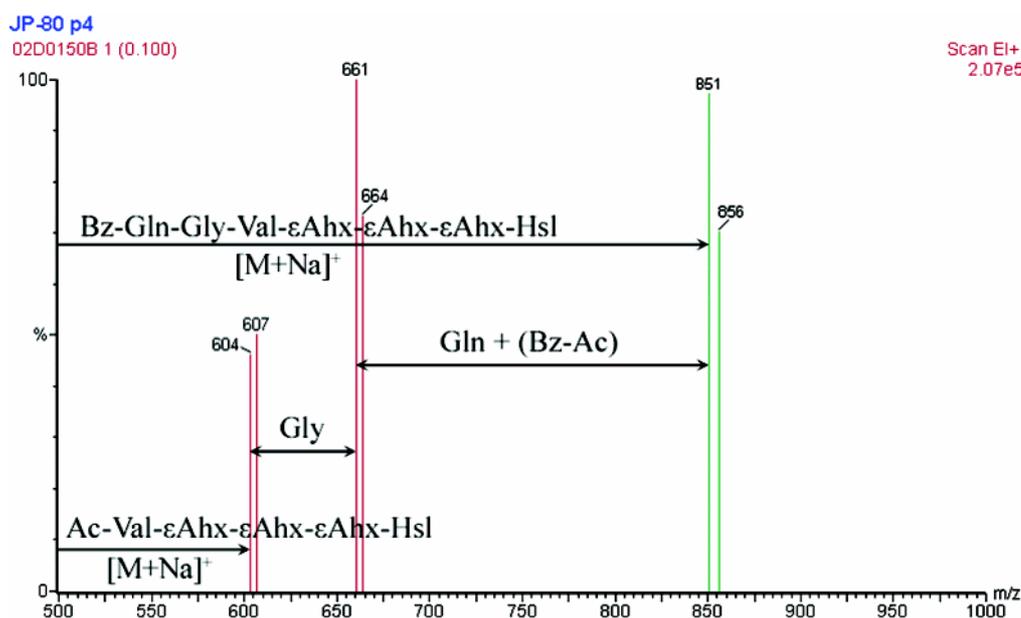
**Figura 16** Estructura de la quimioteca L6. Los aminoácidos se representan en código de tres letras, empleando el término Ahx para el ácido 6-aminohexanoico. El término AA<sub>3</sub> se utiliza para indicar la posición donde se incorporó más de un aminoácido, la identidad de los cuales se especifica en la parte inferior de la figura.

<b>Secuencias teóricas</b>	6
<b>Secuencias identificadas</b>	4
<b>Unidades de resina analizadas</b>	8
<b>Unidades secuenciadas con éxito</b>	8

**Tabla 4** Resumen de los resultados obtenidos tras el procesado de los espectros de MALDI-TOF registrados durante el análisis de los productos contenidos en las unidades de resina aisladas de la quimioteca L6.

Como se muestra en la Figura 17, el procesado del espectro nos permitía de nuevo filtrar las señales irrelevantes para la secuenciación, dejando visibles sólo aquellas correspondientes a la escalera de secuencias parciales. El uso de un doble patrón isotópico no proporcionaba problemas adicionales ni en el procesado ni en la interpretación y, como puede apreciarse, a partir de la diferencia de masa entre picos consecutivos y del patrón isotópico que codificaba el aminoácido isobárico era posible identificar de forma inequívoca la secuencia del péptido. Si nos fijamos en la Figura 17, aplicando la fórmula anteriormente comentada para la diferencia de masas entre los dos

pares de picos de mayor masa molecular, obteníamos un  $\Delta m = 128$ , correspondiente a Lys o Gln. Ya que el patrón isotópico de esta secuencia parcial era 5.03 Da, nos encontrábamos ante una terminación parcial realizada con la mezcla de ácidos benzoicos, la cual codifica la Gln y nos permitía conocer la identidad exacta del aminoácido, cosa que de otra forma no hubiese sido posible. De las 8 unidades de resina analizadas se obtuvieron 8 secuencias completas (Tabla 4), demostrando que esta nueva metodología, de igual modo que la anterior, permitía la secuenciación de péptidos provenientes de quimiotecas “one-bead-one-compound” con gran eficacia, empleando solamente una tercera parte del producto contenido en una unidad de resina, ofreciendo además un medio para poder diferenciar entre aminoácidos isobáricos acoplados en una misma posición.



**Figura 17** Combinación del doble procesado de uno de los espectros de MALDI-TOF obtenidos en el análisis de los crudos de la quimioteca L6. El espectro muestra los aminoácidos identificados a partir de las señales generadas por la escalera de secuencias parciales.

## **2. Desarrollo de la metodología de secuenciación por MALDI-TOF PSD**

Como ya se comentó al principio del presente capítulo, durante la etapa de diseño de la metodología combinatoria para la modificación de la hélice C-terminal del dominio B (apartado 4 del Capítulo 1) se decidió llevar a cabo la secuenciación de los péptidos activos de forma directa, empleando para tal fin la técnica de MALDI-TOF PSD.

La identificación de secuencias desconocidas por espectrometría de masas resulta una tarea francamente difícil, debido a la complejidad de los datos que se obtienen de los espectros de

fragmentación.<sup>10</sup> El trabajo con quimiotecas de compuestos presentaba, sin embargo, una serie de ventajas que permitían mirar con optimismo la metodología elegida. Para empezar, el número de moléculas entre las cuales se encontrarían los compuestos analizados era limitado y la identidad de todas ellas conocida *a priori*. La medida de la masa molecular del péptido problema debería permitirnos, por tanto, acotar las secuencias posibles a aquellas cuya masa molecular teórica coincidiese con la experimental, dentro de un intervalo de error aceptable, de entre las cuales podríamos identificar la correcta a partir del patrón de fragmentación del espectro de PSD. Teniendo en cuenta además que el tamaño de los péptidos con los que se quería trabajar (22 aminoácidos) hacían imposible una permutación masiva de todas las posiciones (demasiados compuestos a sintetizar), resultaba evidente que partes de la secuencia *permanecerían constantes* para todos los candidatos, las cuales podrían ser *utilizadas como “marcadores”* durante la asignación. En otras palabras, la identificación de los picos de las series  $\mathbf{b}_n$  y/o  $\mathbf{y}_n$  (las más abundantes normalmente) de estas zonas permitirían diferenciar con mayor facilidad entre los picos desconocidos de ambas series, lo cual a su vez facilitaría la secuenciación. Finalmente, cabe destacar que, aparte de los inconvenientes ya comentados para la secuenciación de péptidos por espectrometría de masas, existía un último problema que era necesario tener en cuenta. Aunque la técnica de MALDI-TOF PSD había sido aplicada de forma rutinaria a la secuenciación de péptidos, el tamaño máximo de las moléculas secuenciadas se encontraba alrededor de los 1800 Da, con lo que su respuesta frente a moléculas de mayor tamaño, como el péptido  $\mathbf{H3}_n$  (2350.22 Da), resultaba una incógnita.

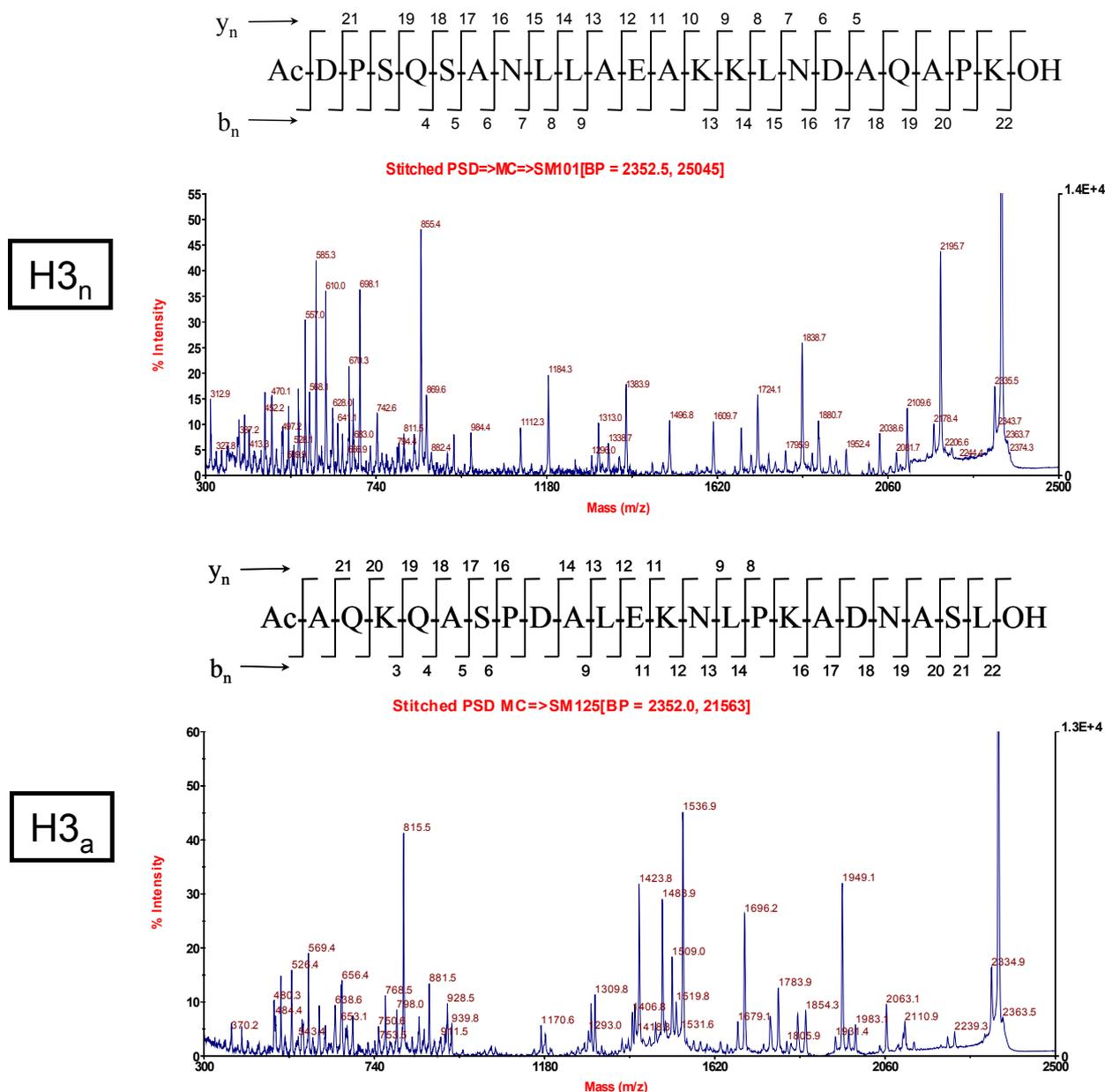
De lo aquí expuesto era posible deducir que, para el desarrollo de la metodología de secuenciación, era necesario comprobar que: i) los espectros de MALDI-TOF PSD proporcionaban suficiente información para la identificación total de la secuencia de péptidos análogos a  $\mathbf{H3}_n$ , ya que éstos serían los compuestos sintetizados en nuestras quimiotecas; ii) que esta información podía ser deducida a partir del producto contenido en una única unidad de resina.

## **2.1 MALDI-TOF PSD de alícuotas de $\mathbf{H3}_n$ y $\mathbf{H3}_a$**

La optimización de la metodología de secuenciación partió del análisis por MALDI-TOF PSD de los péptidos  $\mathbf{H3}_n$  y  $\mathbf{H3}_a$ , obtenidos por tratamiento con morfolina/DMF (1:4) de 5 mg de las peptidil-HMFS-resinas sintetizadas durante el desarrollo de la estrategia sintética (Capítulo 2). El objetivo de este análisis era comprobar si los espectros de PSD eran capaces de proporcionar suficiente información para la secuenciación total de péptidos de 22 aminoácidos, sin tener en cuenta la cantidad de producto limitada disponible en una única unidad de resina. De esta forma, en caso de que las secuenciaciones no pudiesen ser llevadas a cabo con éxito, la prueba con unidades de resina aisladas resultaría totalmente innecesaria. El uso de los péptidos  $\mathbf{H3}_n$  y  $\mathbf{H3}_a$  para el análisis resultaba, además, muy adecuado, al disponer éstos de la misma masa, misma composición y diferente secuencia, ya que simulaban muy bien las condiciones de trabajo en las

que nos encontraríamos durante la secuenciación de los compuestos positivos de quimiotecas, donde la masa molecular del péptido activo nos conduciría a diferentes secuencias posibles, de entre las cuales deberíamos identificar la correcta a partir del patrón de secuenciación.

Las muestras para el análisis por PSD se prepararon directamente a partir de los crudos obtenidos del tratamiento con morfolina de las peptidil-resinas. Estos crudos se separaron de la resina por filtración, se eliminó el exceso de reactivos por evaporación al vacío y los péptidos se disolvieron en 100  $\mu\text{L}$  de una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1, 0.1 % de TFA). Cada muestra se



**Figura 18** Espectros de MALDI-TOF PSD de los péptidos H3<sub>n</sub> (arriba) y H3<sub>a</sub> (abajo), registrados a partir de las muestras preparadas con el producto obtenido de 5 mg de peptidil-resina. La figura muestra una vista general de los espectros así como las secuencias de los péptidos y los picos de las series  $b_n$  y  $y_n$  identificados para cada secuencia. Los aminoácidos se muestran en código de una letra y los fragmentos identificados a partir del número  $n$  de la serie a la que corresponden. Los espectros se adquirieron en las condiciones descritas en Materiales y Métodos 9.1.

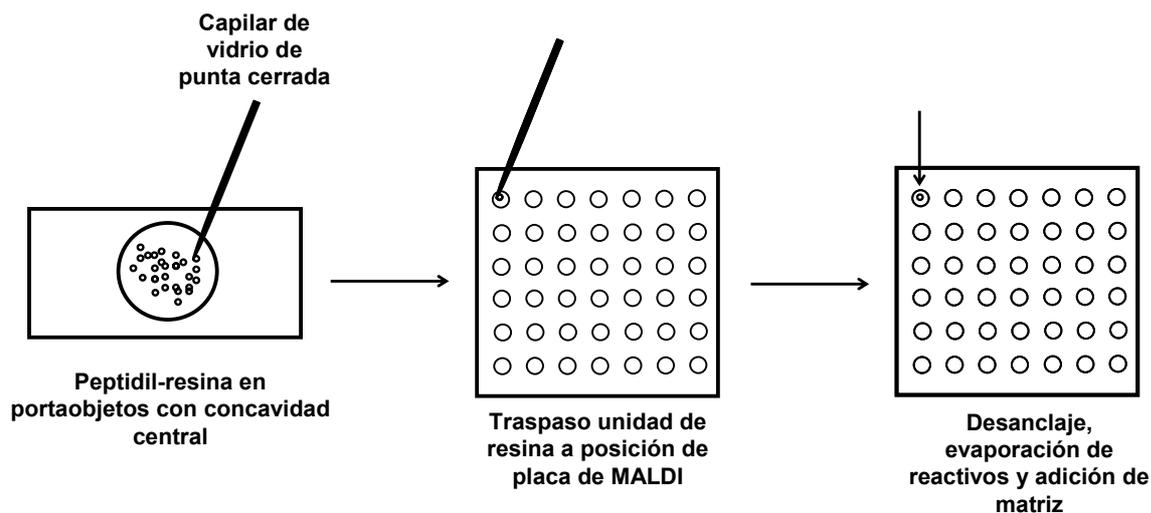
preparó por mezcla de 1  $\mu\text{L}$  de una de las disoluciones con 1  $\mu\text{L}$  de disolución de matriz (CHCA).

La Figura 18 muestra los espectros de PSD de los péptido  $\text{H3}_n$  y  $\text{H3}_a$ , registrado en las condiciones determinadas como óptimas durante las pruebas de secuenciación (Materiales y Métodos 9.1). Como puede apreciarse, la calidad de los espectros era más que aceptable, al presentar una gran cantidad de picos de fragmentación de intensidades muy elevadas. La asignación de las señales correspondientes a las series de fragmentos  $\mathbf{b}_n$  y  $\mathbf{y}_n$  permitía la identificación de la mayoría de los aminoácidos de las secuencias (ver figura), siendo posible resolver las zonas de ambigüedad (pares PK y PD en el péptido  $\text{H3}_a$ ) a partir de los picos correspondientes a los fragmentos internos dirigidos por prolina. Como se puede observar además, los patrones de fragmentación de ambos péptidos eran totalmente diferentes, lo cual hacía posible diferenciar fácilmente entre ambos compuestos, proporcionando indicios satisfactorios sobre la posibilidad de aplicar con éxito la metodología a la secuenciación de péptidos semidesconocidos provenientes de quimiotecas.

Quedaba demostrado, por tanto, que la técnica de MALDI-TOF PSD era capaz de proporcionar la información necesaria para la secuenciación total de péptidos de 22 aminoácidos, permitiendo diferenciar fácilmente entre sistemas de igual masa molecular pero diferente secuencia, resultando factible su aplicación en química combinatoria. Sin embargo, era todavía necesario comprobar la capacidad de la técnica para proporcionar esta información empleando el producto contenido en una única unidad de resina, de forma que fuese posible extender su aplicación a la secuenciación de péptidos provenientes de quimiotecas “one-bead-one-compound”.

## **2.2 MALDI-TOF PSD de los péptidos $\text{H3}_n$ y $\text{H3}_a$ empleando el producto de unidades de resina aisladas**

El análisis del péptido contenido en una única unidad de resina requería del desarrollo de una metodología que permitiese aislar las unidades de resina, desanclar el producto contenido y preparar con él las muestras para la adquisición de los espectros de PSD. Gracias al trabajo realizado durante la estancia en la Universidad de Southampton disponíamos ya de una posible vía de acción, basada en el uso de suspensiones de peptidil-resina en disolventes no volátiles y al aislamiento de las unidades de resina con micropipeta (ver apartado 1 del presente capítulo y Figura 5). La utilización de morfolina/DMF para el desanclaje de los péptidos contenidos en las peptidil-HMFS-resinas y la afinidad de la resina PEGA por el vidrio, sin embargo, nos llevó a diseñar un nuevo protocolo de trabajo mucho más práctico, ya que ofrecía la posibilidad de disponer de todo el producto liberado de la resina directamente sobre la placa de MALDI.

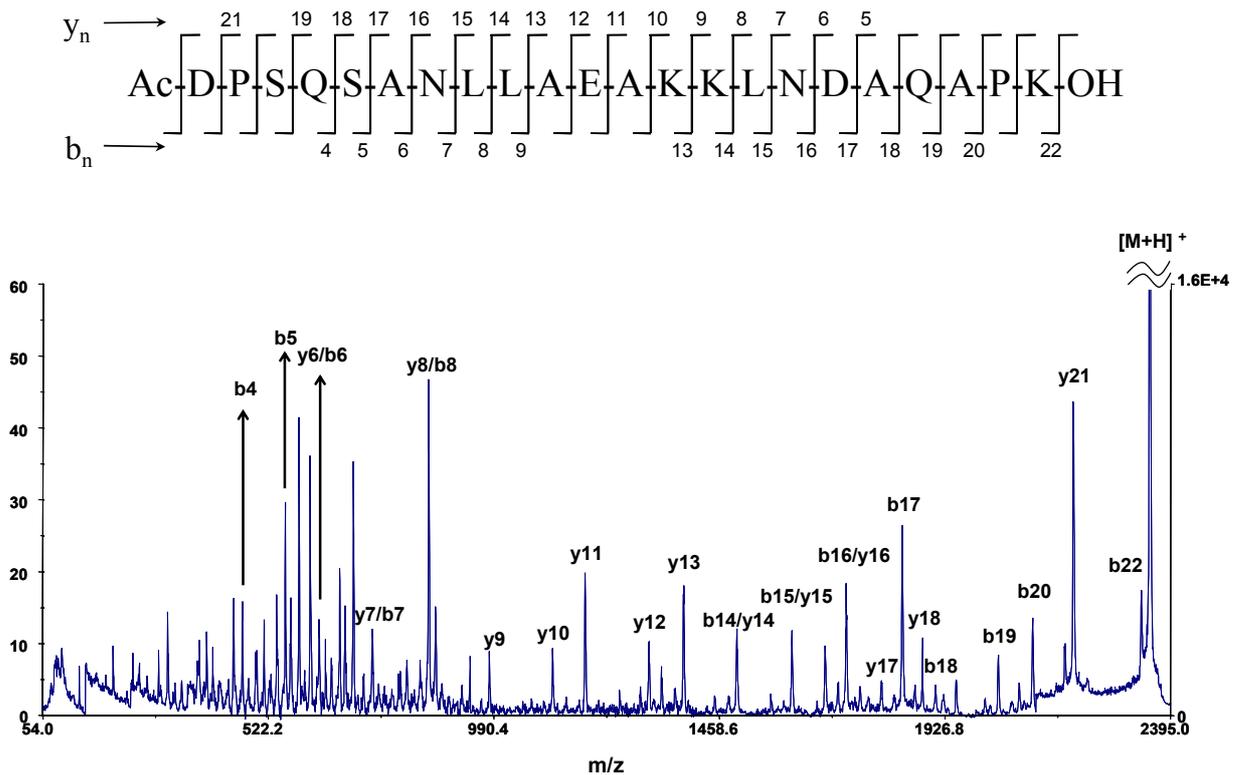


**Figura 19** Esquema del protocolo diseñado para el aislamiento de unidades de peptidil-resina y liberación de producto directamente sobre una placa de MALDI.

Como puede apreciarse en la Figura 19, el protocolo de trabajo diseñado partía de la peptidil-resina dispuesta en un portaobjetos con concavidad central, por si era necesaria la adición de disolvente en algún momento. La peptidil-resina había sido lavada con DMF, por lo que se encontraba solvatada en este disolvente, pero no en suspensión. Gracias a la afinidad de la resina por el vidrio, las bolas podían ser aisladas empleando un capilar de este mismo material de punta cerrada y transferidas directamente a una posición concreta de una placa de MALDI-TOF, sobre la que se había dispuesto  $1\mu\text{L}$  de la disolución de desanclaje (morfolina/DMF 1:1) para facilitar separación de la resina, sumergiendo la punta del capilar en la disolución. La reacción de desanclaje tenía lugar hasta la total evaporación de los reactivos (20 min aprox), tras lo cual se adicionaban  $2\mu\text{L}$  de disolución de matriz, succionándola y liberándola varias veces para lograr una buena mezcla con el producto liberado. Una vez evaporados los disolventes, la muestra estaba lista para ser analizada por MALDI-TOF PSD.

Siguiendo el protocolo descrito, se llevó a cabo el desanclaje individual del péptido contenido en 30 unidades de las peptidil-resinas de los péptidos  $\text{H3}_n$  y  $\text{H3}_a$  (15 y 15), los cuales fueron analizados por MALDI-TOF PSD en las condiciones óptimas desarrolladas en el apartado anterior. Como puede apreciarse en la Figura 20, los espectros obtenidos eran de igual calidad a los registrados con concentraciones superiores de péptido (Figura 18), siendo posible la total determinación de ambas secuencias sin problema, así como la diferenciación entre ellas. La técnica permitía, por tanto, no sólo obtener suficiente información para la secuenciación completa de péptidos de 22 aminoácidos, como ya se había comprobado, sino que esta información podía ser deducida empleando únicamente el producto contenido en una unidad de resina, demostrando así que su aplicación a la secuenciación de péptidos provenientes de quimiotecas “one-bead-one-compound” era posible.

Durante el análisis de los datos obtenidos se observó que los *espectros de PSD presentaban problemas de calibración importantes* que era necesario corregir, ya que nos proporcionaban



**Figura 20** Espectro de MALDI-TOF PSD del péptido H3<sub>n</sub>, registrado empleando el producto contenido en una única unidad de resina. Las señales correspondientes a los fragmentos de las series b<sub>n</sub> y y<sub>n</sub> identificadas se encuentran destacadas en el espectro. La parte superior de la figura muestra la secuencia del péptido así como los fragmentos b<sub>n</sub> y y<sub>n</sub> encontrados durante el análisis del espectro de PSD.

diferencias entre la masa teórica y experimental de los fragmentos de hasta 2 Da, dificultando en algunos casos la asignación de las señales. Como ya se explicó durante el diseño de la metodología combinatoria (apartado 4 del Capítulo 1), la técnica de MALDI-TOF PSD requiere de un calibrado especial al trabajar con voltajes de reflector variables.<sup>11</sup> Este calibrado suele llevarse a cabo registrando el espectro de un péptido patrón de fragmentación conocida (angiotensina por ejemplo) de forma previa al inicio del análisis de las muestras, la asignación manual del cual permite la creación de un archivo de calibración que puede ser aplicado al resto de los espectros de PSD. En nuestro caso, debido a la diferencia de masa entre la Angiotensina y los péptidos H3<sub>n</sub> y H3<sub>a</sub> (más de 1000 Da), la calibración resultaba del todo inefectiva. Por ello, se decidió llevar a cabo la creación del archivo de calibración a partir de la interpretación manual de uno de los espectros de H3<sub>a</sub>, utilizando únicamente aquellas señales que podían ser asignadas de forma inequívoca, al disponer de una masa que no se solapaba con la de ningún otro fragmento (Tabla 5). De este modo fue posible reducir la diferencia entre masa teórica y experimental de los fragmentos a aproximadamente 1 Da, la cual consideramos suficiente aunque distaba de ser óptima, ya que nos impedía introducir en una misma posición de la quimioteca no tan sólo aminoácidos isobáricos, sino también aminoácidos cuyo incremento de masa fuese inferior a 1 Da (Gln/Glu, Leu/Asn y Asn/Asp por ejemplo).

Fragmento	Masa Teórica	Tipo Masa	Fragmento	Masa Teórica	Tipo Masa
b <sub>22</sub>	2334.6	media	b <sub>14</sub>	1536.8	monoisotópica
b <sub>19</sub>	2063.3	media	a <sub>14</sub>	1508.8	monoisotópica
y <sub>19</sub>	1983.2	media	y <sub>14</sub>	1483.8	monoisotópica
b <sub>18</sub>	1949.2	media	y <sub>12</sub>	1299.7	monoisotópica
y <sub>18</sub>	1855.1	media	y <sub>11</sub>	1170.7	monoisotópica
b <sub>17</sub>	1834.1	media	y <sub>9</sub>	928.5	monoisotópica
y <sub>17</sub>	1784.0	media	y <sub>8</sub>	815.4	monoisotópica
b <sub>16</sub>	1763.1	media	b <sub>6</sub>	656.3	monoisotópica
y <sub>16</sub>	1696.9	media	b <sub>3</sub>	370.2	monoisotópica

**Tabla 5** Tabla de los fragmentos de H3<sub>a</sub> utilizados para la creación del archivo de calibración. La tabla muestra la identidad del fragmento y su masa molecular teórica (indicando en cada caso si ha sido calculada como masa molecular media o monoisotópica).

### 3. Conclusiones

Los resultados del trabajo realizado con las escaleras de compuestos de secuencias parciales nos permitieron extraer las siguientes conclusiones:

- Se había desarrollado una nueva metodología para la secuenciación de péptidos pequeños provenientes de quimiotecas “one-bead-one-compound”, basada en el uso de escaleras de secuencias parciales marcadas isotópicamente.
- El marcaje isotópico de las secuencias parciales permitía eliminar el ruido de fondo y las señales “irrelevantes”, de forma que solo aquellas pertenecientes a estos compuestos permanecían en el espectro después del procesado. Se aumentaba así la sensibilidad en la detección, pues las señales de baja intensidad se detectaban sin problema, además de la especificidad y facilidad de interpretación.
- La metodología desarrollada no tan sólo permitía la secuenciación de los péptidos con gran eficacia, sino también la identificación de reacciones secundarias ocurridas durante la síntesis.
- El uso de un doble patrón isotópico permitía diferenciar entre aminoácidos isobáricos acoplados en una misma posición, sin que ello aumentase la dificultad ni de la síntesis ni de la interpretación de los datos.

Por otro lado, de los resultados obtenidos en el análisis por MALDI-TOF PSD de los péptidos H3<sub>n</sub> y H3<sub>a</sub> fue posible concluir que:

- 
- La técnica de secuenciación por espectrometría de masas MALDI-TOF PSD permitía la secuenciación completa de péptidos de 22 aminoácidos.
  - La información necesaria para la secuenciación podía ser obtenida con el producto contenido en una única unidad de peptidil-HMFS-resina, empleando la metodología de desanclaje sobre placa. El uso de MALDI-TOF PSD para la secuenciación de péptidos activos análogos a  $H3_n$ , provenientes de las quimiotecas “one-bead-one-compound” resultaba, por tanto, factible.
  - La calibración de los espectros de PSD requería de la secuenciación previa de un péptido de similar masa molecular y patrón de fragmentación conocido, por lo que el péptido  $H3_a$  sería empleado como patrón para la calibración de los espectros obtenidos durante la secuenciación de los productos activos de nuestras quimiotecas.

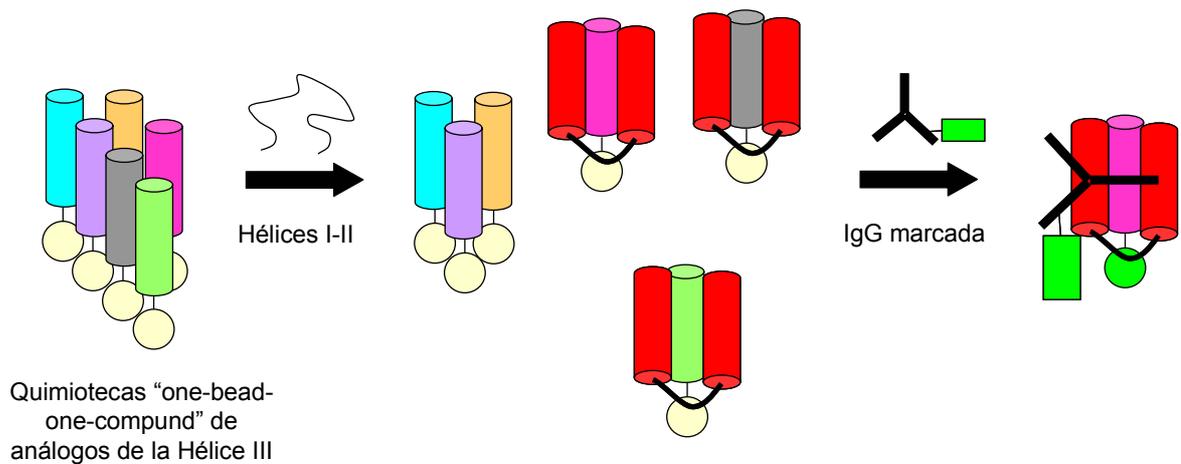
## 4. Bibliografía

- <sup>1</sup> Pastor, J. J.; Lingard, I.; Bahalay, G.; Bradley, M. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 85-90
- <sup>2</sup> Youngquist, R. S.; Fuentes, G. R.; Lacey, M. P.; Keough, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3900-3906
- <sup>3</sup> a) Davies, M.; Bradley, M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8565-8568; b) Hilarie, P. M. S.; Lowary, T. L.; Meldal, M.; Bock, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13312-13320; c) Hu, Y.-J.; Wei, Y.; Zhou, Y.; Rajagopalan, P. T. R.; Pei, D. *Biochemistry* **1999**, *38*, 643-650; d) Beebe, K. D.; Wang, P.; Arabaci, G.; Pei, D. *Biochemistry* **2000**, *39*, 13251-1326; e) Buchardt, J.; Schiødt, C. B.; Krogh-Jensen, C.; Delaissé, J.-M.; Foged, N. T.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 624-638; f) Willert, M.; Benito, J. M.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 91-101 g) Manku, S.; Wang, F.; Hall, D. G. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 379-391
- <sup>4</sup> Hoffmann, C.; Blechschmidt, D.; Krüger, R.; Karas, M.; Griesinger, C. *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 79-86
- <sup>5</sup> Lane, S. J.; Pipe, A. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 782-793
- <sup>6</sup> Terrett, N. K. *Combinatorial Chemistry*; Oxford University Press: New York, **1998**
- <sup>7</sup> Hancock, W. S.; Marshall, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 7488-7489
- <sup>8</sup> Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4853-4856
- <sup>9</sup> Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchnák, V. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411-448
- <sup>10</sup> Papayannopoulos, I. A. *Mass Spectrom. Rev.* **1995**, *14*, 49-73
- <sup>11</sup> Spengler, B. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 1019-1036

## **Capítulo 4: Desarrollo del ensayo de actividad**



Como ya se comentó en el Capítulo 1, el objetivo del presente trabajo doctoral se concretó en la búsqueda de análogos de la hélice C-terminal del dominio B mediante el uso de quimiotecas “one-bead-one-compound”, con el fin de encontrar secuencias *capaces de interactuar con las hélices I-II del dominio natural ( $H_{I-II}$ ) induciéndolas a adoptar una estructura tridimensional compatible con la del dominio nativo*, de forma que se *conservase o incluso se mejorase la actividad de unión a inmunoglobulinas*. El ensayo de actividad para la evaluación de las quimiotecas debía ser capaz, por tanto, de revelar las unidades de resina que contuvieran péptido de estas características, con la mayor sensibilidad posible.



**Figura 1** Protocolo para la evaluación de quimiotecas “one-bead-one-compound” de análogos de la Hélice C-terminal del dominio B ( $H_{3n}$ ).

En trabajos previos en nuestro laboratorio se demostró que los péptidos  $H_{3n}$  y  $H_{I-II}$  eran capaces de interactuar en disolución, aun cuando no se encontraban unidos covalentemente, dando lugar a estructuras no covalentes de alto contenido helicoidal y similares a las del dominio natural.<sup>1</sup> Partiendo de estos estudios de interacción se llevó a cabo el diseño del ensayo para la evaluación de las quimiotecas que se muestra en la Figura 1. El protocolo de ensayo comenzaba con el tratamiento de las unidades de peptidil-resina con una disolución del péptido  $H_{I-II}$  de concentración adecuada, para dar lugar, tras un período de tiempo suficiente, a la formación de

complejos no covalentes análogos al dominio B (péptidos activos), además de generar agregados no covalentes con diferentes estructuras. La identificación de las unidades de resina conteniendo análogos activos se llevaría a cabo en una segunda fase, por adición a la mezcla de una disolución de IgG marcada con un fluoróforo, la cual quedaría retenida únicamente sobre las unidades de resina donde el plegamiento del dominio no covalente fuese correcto, volviéndolas fluorescentes.

Durante el diseño de la estrategia combinatoria (apartado 3 del Capítulo 1), el estudio de los trabajos realizados sobre el dominio B natural<sup>2</sup> y de las quimiotecas sintetizadas utilizando resina PEGA como soporte polimérico,<sup>3</sup> nos condujeron a la decisión de emplear tampón fosfato como disolvente para el ensayo (10 mM, pH = 7.4-7.5, 100 mM NaCl) e IgG de conejo marcada con fluoresceína para detectar la interacción. Se decidió además poner a punto el ensayo para alícuotas de 1000 unidades de resina y no realizar ningún tipo de lavado entre el tratamiento con H<sub>I-II</sub> e IgG, todo ello dirigido a aumentar al máximo la sensibilidad, dado que la afinidad de los análogos de H<sub>3<sub>n</sub></sub> por H<sub>I-II</sub> y de los haces de tres hélices  $\alpha$  formados por la IgG se esperaba que fuese bastante baja, al ser todos los complejos de carácter no covalente.

Durante la etapa de optimización de la metodología sintética (Capítulo 2), se llegó a la conclusión de que la mejor vía para la obtención de las quimiotecas era la llamada estrategia HMFS/Boc/Bn, por lo que las peptidil-HMFS-resinas de H<sub>3<sub>n</sub></sub> y H<sub>3<sub>a</sub></sub> se utilizaron como controles positivo y negativo respectivamente para la puesta a punto del ensayo. El desarrollo del ensayo de actividad requería, por tanto:

- Probar que el ensayo diseñado permitía detectar las unidades de peptidil-resina que contenían péptido activo (H<sub>3<sub>n</sub></sub>), diferenciándolas claramente de las que contenían péptidos inactivos (H<sub>3<sub>a</sub></sub>), tanto con las unidades de resina por separado como en mezclas donde el segundo tipo de peptidil-resina predominase sobre el primero (condiciones de trabajo normales en química combinatoria, donde el número de compuestos activos suele ser una pequeña parte del total de la quimioteca).<sup>4</sup>
- Encontrar las concentraciones adecuadas de H<sub>I-II</sub> e IgG, así como los tiempos de tratamiento con cada una de las disoluciones que permitiesen el desarrollo de un ensayo de sensibilidad y selectividad máxima.

## 1. Síntesis del péptido H<sub>I-II</sub>

La optimización del ensayo de actividad requería disponer de cantidades suficientes de H<sub>I-II</sub> para la realización de todas aquellas pruebas que fuesen necesarias, por lo que se comenzó con la síntesis de dicho péptido.

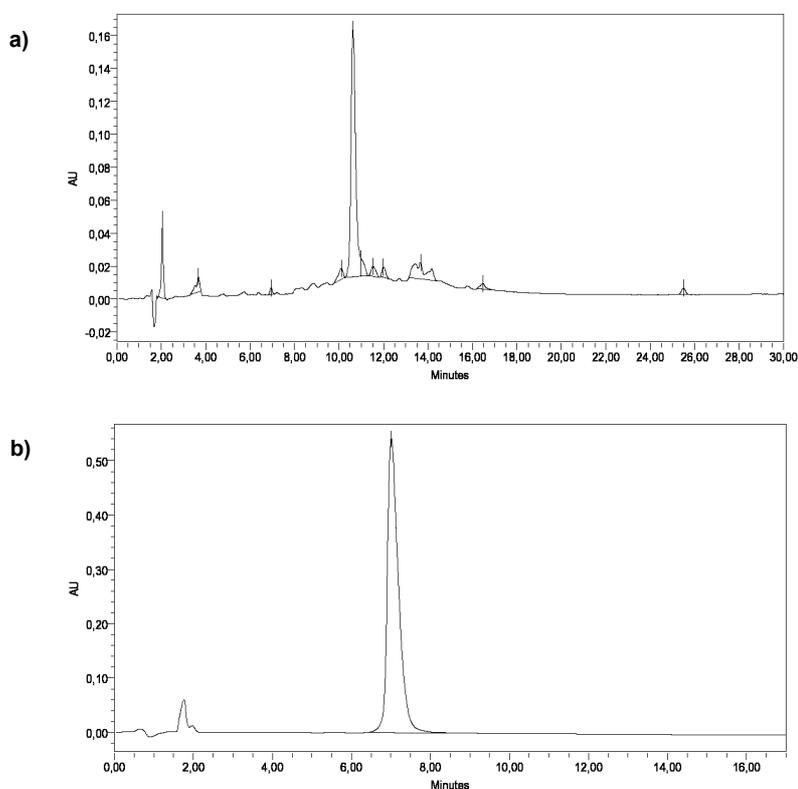
La síntesis del péptido H<sub>I-II</sub> (Figura 2) se llevó a cabo de forma manual sobre 430 mg de resina *p*-MBHA (funcionalización inicial 0.52 mmol/g), siguiendo un esquema de protección

Ac-APKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKD-NH<sub>2</sub>

**Figura 2** Estructura del péptido H<sub>I-II</sub> sintetizado. Los aminoácidos se representan en código de una letra, con el extremo N-terminal en forma de acetil amida y el C-terminal en forma de amida.

Boc/Bn. Los aminoácidos se acoplaron por neutralización *in situ* empleando excesos de 4 eq. y TBTU/DIEA (4 eq./12 eq., 20 min) como agentes de activación, realizando la desprotección de los grupos  $\alpha$ -amino con TFA 100 %. De esta forma, al eliminar la etapa de neutralización y acortar la duración tanto de los acoplamientos como de las desprotecciones, cada ciclo de síntesis necesitaba la mitad de tiempo con respecto al protocolo general de síntesis Boc/Bn para ser completado, siendo así posible la obtención del producto satisfactoriamente con mayor rapidez. Tras la incorporación de todos los aminoácidos, se procedió a la acetilación del extremo N-terminal y al tratamiento de la peptidil-resina con HF anhidro para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión del enlace péptido-resina.

La Figura 3a muestra el perfil cromatográfico del crudo obtenido. Como puede apreciarse, la síntesis proporcionó un producto mayoritario de pureza superior al 60 %, cuya masa molecular medida por MALDI-TOF se correspondía con la teórica de H<sub>I-II</sub>. Podíamos concluir, por tanto, que la síntesis se había desarrollado con éxito, pero que aun así era necesario purificar el producto, lo



**Figura 3** (a) Perfil cromatográfico del crudo obtenido en la síntesis del péptido H<sub>I-II</sub>. Condiciones de elución: gradiente lineal del 20 al 50 % de B en A en 30 min ( $t_R = 10.6$  min). (b) Perfil cromatográfico del péptido H<sub>I-II</sub> puro. Condiciones de elución: gradiente lineal del 25 al 35 % de B en A en 15 min ( $t_R = 6.3$ )

cual se llevó a cabo por HPLC semipreparativo. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por HPLC, juntando aquellas que contenían el producto deseado en pureza superior al 95 %. Tras eliminar el acetonitrilo por evaporación al vacío y liofilizar el resto de la disolución se obtuvieron 88 mg de péptido, determinados por análisis de aminoácidos cuantitativo (rendimiento final de síntesis = 8.5 %). La Figura 3b muestra el perfil cromatográfico del producto purificado, que poseía la masa correcta por MALDI-TOF y la composición adecuada según mostraban los resultados del análisis de aminoácidos, recogidos en la Tabla 1.

	Asp	Ser	Glu	Gly	Ala	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Pro
Composición esperada H <sub>I-II</sub>	8	1	8	1	3	2	4	1	3	1	4	1	2
Composición experimental H <sub>I-II</sub>	8,2	0,9	8,4	1,1	2,7	1,8	4,1	1,0	2,8	0,6	3,7	1,0	2,6

**Tabla 1** Composiciones esperada y experimental, determinada por análisis de aminoácidos, del péptido H<sub>I-II</sub> puro.

## **2. Primera etapa de optimización: comprobación del funcionamiento del ensayo de actividad**

Ya que los ensayos de actividad habían sido diseñados para realizarse sobre un número determinado de unidades de resina, era necesario disponer de un sistema para alicuotar cualquier muestra de peptidil-resina en fracciones donde la cantidad de unidades fuese conocida y controlada, de forma previa al inicio de la optimización. Para ello, se generaron suspensiones homogéneas de peptidil-resina en DMF (1 mg/100  $\mu$ L, peso de resina solvatada en DMF) y se contaron el número de bolas contenido en alícuotas de 5 y 100  $\mu$ L, mediante el uso de un microscopio óptico. El análisis de éstas alícuotas nos llevó a concluir que cada 5  $\mu$ L de suspensión contenían aproximadamente entre 8-15 unidades de resina, mientras que 100  $\mu$ L de suspensión nos proporcionaba una media de 250 unidades. A partir de esta relación fue posible en todo momento llevar a cabo los ensayos con el número de unidades de resina deseado.

El inicio del proceso de optimización propiamente dicho comenzó con la comprobación del funcionamiento de la metodología diseñada, a la vez que se determinaban las concentraciones y tiempos de tratamiento idóneos para las disoluciones de H<sub>I-II</sub> e IgG-FITC. Para ello, se prepararon 36 muestras de 10 unidades de resina cada una, 24 muestras de H<sub>3<sub>n</sub></sub>-HMFS-PEGA y 12 de H<sub>3<sub>a</sub></sub>-HMFS-PEGA, las cuales fueron sometidas en paralelo a las condiciones de ensayo que se muestran en la Tabla 2, excepto 12 muestras de H<sub>3<sub>n</sub></sub>-HMFS-PEGA que se utilizaron como ensayos en blanco, sometiéndolas a las condiciones especificadas en la tabla pero cambiando la disolución de H<sub>I-II</sub> por Tampón 1.

Experimento	Concentración H <sub>I-II</sub>	Tiempo	Dilución IgG	Tiempo
1	10 $\mu$ M	16 h	1/1000	1 h
2	10 $\mu$ M	16 h	1/10000	1 h
3	10 $\mu$ M	16 h	1/100000	1 h
4	10 $\mu$ M	16 h	1/1000	6 h
5	10 $\mu$ M	16 h	1/10000	6 h
6	10 $\mu$ M	16 h	1/100000	6 h
7	100 $\mu$ M	16 h	1/1000	1 h
8	100 $\mu$ M	16 h	1/10000	1 h
9	100 $\mu$ M	16 h	1/100000	1 h
10	100 $\mu$ M	16 h	1/1000	6 h
11	100 $\mu$ M	16 h	1/10000	6 h
12	100 $\mu$ M	16 h	1/100000	6 h

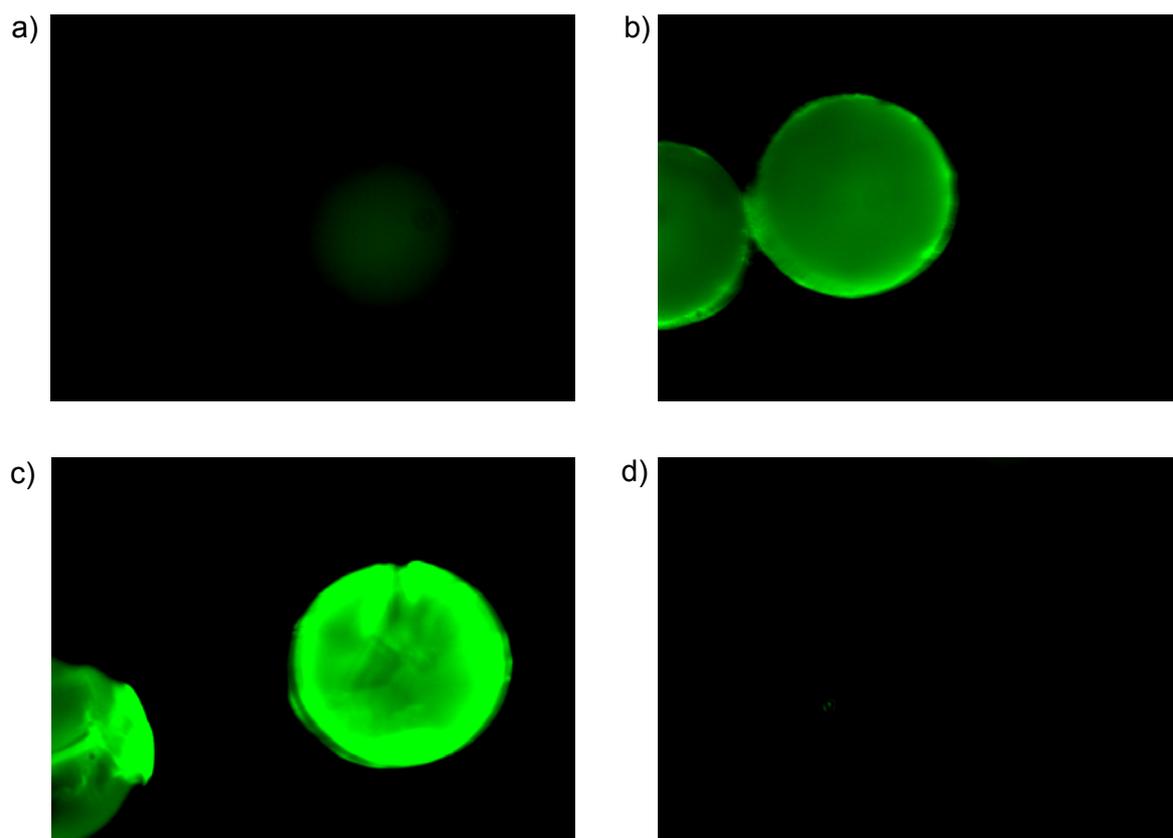
**Tabla 2** Resumen de las condiciones utilizadas en la optimización del ensayo de actividad. La tabla muestra la concentración de la disolución de H<sub>I-II</sub>, la dilución de disolución madre de IgG-FITC y los tiempos de tratamiento empleados en cada uno de los experimentos. De cada una de las disoluciones se utilizaron 250  $\mu$ L por experimento. Las concentraciones de H<sub>I-II</sub> se escogieron para contener en 250  $\mu$ L la cantidad de péptido suficiente para encontrarse en relación 1:1 (10  $\mu$ M) y 10:1 (100  $\mu$ M) con respecto a la H<sub>3<sub>n</sub></sub> disponible en 10 unidades de resina. Las diluciones de IgG se escogieron para cubrir el rango de máxima y mínima dilución de trabajo recomendadas por la casa comercial.

El protocolo de ensayo (Materiales y Métodos 8) daba comienzo con la introducción en una jeringuilla de 2 mL, provista de un filtro de polietileno poroso en la base, de 5  $\mu$ L de una suspensión de peptidil-resina en DMF (1 mg/100  $\mu$ L, 10 unidades de resina aproximadamente). El disolvente de solvatación se sustituía progresivamente por agua a través del lavado de la resina con mezclas de DMF/H<sub>2</sub>O, con mayor proporción cada vez del segundo componente hasta llegar al 100% del total. Una vez la resina solvatada en agua, se lavaba primero con el llamado Tampón 1 (tampón 10 mM fosfato, pH = 7.4-7.5, 100 mM NaCl, 0.05 % Tween 20; 10 min) y posteriormente con el Tampón 2 (tampón 10 mM fosfato, pH = 7.4-7.5, 100 mM NaCl, 0.1 % gelatina; 1 h), ambos destinados a la eliminación de posibles interacciones inespecíficas tanto de la resina como de los péptidos.<sup>5</sup> Acabados estos tratamientos, la resina se acondicionaba de nuevo con el tampón de ensayo (Tampón 1), tras lo cual se incubaba con 250  $\mu$ L de la disolución de H<sub>I-II</sub> durante el tiempo establecido, con agitación constante. Pasado este tiempo, se adicionaban sobre la mezcla 250  $\mu$ L de la disolución de IgG, recién preparada, y el sistema se mantenía con agitación constante y en ausencia de luz hasta el final. A continuación se eliminaba el exceso de reactivos por filtración, la resina se lavaba convenientemente con el Tampón 1 y se transfería a una cápsula Petri de plástico generando suspensiones de peptidil-resina en agua, las cuales se analizaban inmediatamente con un microscopio o lupa de fluorescencia empleando luz azul para la excitación de la fluoresceína.

Como puede apreciarse en la Figura 4, los experimentos realizados mostraban claramente que el ensayo diseñado funcionaba correctamente. Para empezar, el ensayo dotaba de fluorescencia a las unidades de resina que contenían péptido activo (H<sub>3<sub>n</sub></sub>), en mayor o menor grado en función de

las condiciones empleadas, mientras que aquellas unidades de resina que contenían el control negativo ( $H3_a$ ) permanecían inalteradas. El ensayo era, por tanto, específico para  $H3_n$  y suficientemente sensible para ser empleado en la evaluación de quimiotecas, ya que la intensidad de fluorescencia de las unidades de resina positivas permitía diferenciarlas claramente del resto. Los ensayos realizados sobre  $H3_n$ -HMFS-PEGA en ausencia de las hélices I-II, además, no emitían fluorescencia. Estos resultados confirmaban que el péptido  $H_{I-II}$  era necesario para el funcionamiento del ensayo y que la respuesta obtenida, tal y como se había supuesto durante la etapa de diseño, era debida a la interacción de las moléculas de IgG con los dominios B no covalentes formados sobre la resina y no a otro tipo de interacciones inespecíficas. De las condiciones experimentales probadas, las que se mostraron óptimas fueron aquellas en las que se trataba la peptidil-resina con una disolución 100  $\mu$ M de  $H_{I-II}$  durante 16 h, seguido del tratamiento de la mezcla con una disolución 1/1000 de IgG-FITC durante 6 h (experimento 10, Tabla 2), al proporcionar una diferencia máxima entre la intensidad de la fluorescencia de la resina de los controles positivo y negativo (ruido de fondo).

Estos resultados demostraban el buen funcionamiento del ensayo de actividad diseñado y establecían las condiciones óptimas para el ensayo. De estas condiciones, la concentración de  $H_{I-II}$



**Figura 4** Imágenes de microscopía de fluorescencia de las muestras de  $H3_n$ -HMFS-PEGA tratadas con las siguientes condiciones experimentales : **a)**  $H_{I-II}$  10  $\mu$ M (16 h), IgG 1/1000 (1 h), **b)**  $H_{I-II}$  100  $\mu$ M (16 h), IgG 1/1000 (1 h), **c)**  $H_{I-II}$  100  $\mu$ M (16 h), IgG 1/1000 (6 h). Imágenes captadas en las mismas condiciones de exposición y ganancia, ajustadas de forma que la unidades de resina de  $H3_a$ -HMFS-PEGA (control negativo) tratadas con  $H_{I-II}$  100  $\mu$ M (16 h) y IgG 1/1000 (6 h), fuesen invisibles (imagen **d**). Parámetros de adquisición: i) ganancia = 100 %; ii) exposición = 30 seg.; ii)  $\times 100$  aumentos.

óptima era aquella que proporcionaba, en 250  $\mu\text{L}$ , 10 eq. de este péptido con respecto a la cantidad de  $\text{H3}_n$  contenida en 10 unidades de peptidil-resina. Aunque esta relación resultaba adecuada para la evaluación de quimiotecas, donde la probabilidad de obtener más de 10 unidades de resina positivas por cada 1000 era limitada, cabía tener en cuenta que una quimioteca con un elevado número de péptidos activos podría proporcionar resultados negativos, al ser la cantidad de haces de tres hélices  $\alpha$  por unidad de resina muy pequeña y la IgG unida insuficiente para ser detectada. En este caso, sin embargo, un aumento de la concentración de  $\text{H}_{\text{I-II}}$ , una reducción del número de unidades de resina por ensayo o el uso de una cantidad adecuada de  $\text{H3}_n$  en disolución, como mecanismo de competición con los péptidos anclados a resina para descartar aquellos de menor afinidad que la hélice III natural, debería ser suficiente para la recuperación de la respuesta.

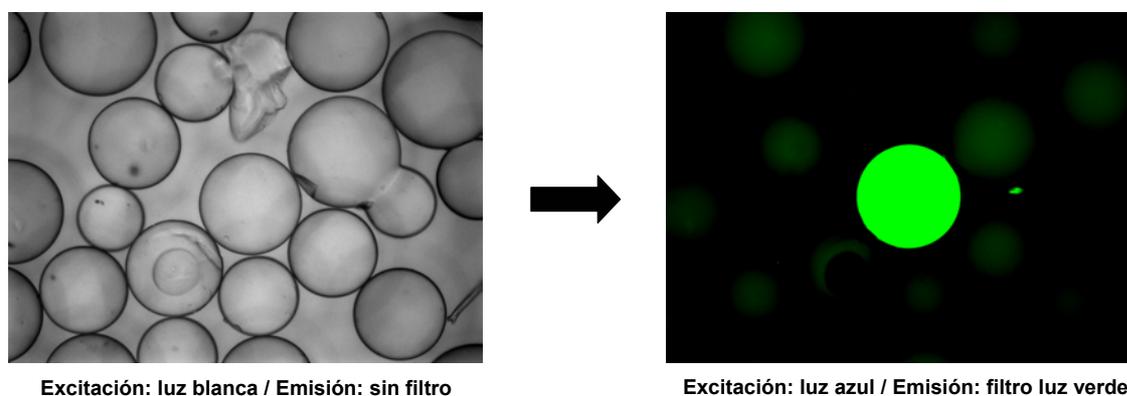
### **3. Segunda etapa de optimización: mezclas de $\text{H3}_n$ -HMFS-PEGA y $\text{H3}_n$ -HMFS-PEGA**

Tras la comprobación del funcionamiento del ensayo y la optimización de sus condiciones con muestras separadas de los controles positivo y negativo, resultaba imprescindible conocer si estas mismas condiciones eran también aplicables a la evaluación de quimiotecas, es decir, al trabajo con muestras de 1000 unidades de resina donde solamente unas pocas dispusiesen de péptido activo. Para ello, se decidió aplicar la metodología desarrollada sobre muestras de 1000 unidades de resina, formadas por mezclas 1/100 de ambos controles (positivo/negativo). En caso de que la metodología nos permitiese identificar de forma sencilla la resina que contenía  $\text{H3}_n$ , la aplicabilidad de ésta a la evaluación de quimiotecas de análogos de  $\text{H3}_n$  quedaría demostrada. En caso contrario sería necesaria una nueva optimización de las condiciones de ensayo o incluso un nuevo diseño de la metodología.

Las mezclas de controles se generaron a partir de suspensiones homogéneas de ambas peptidil-HMFS-resinas en DMF (1 mg/100  $\mu\text{L}$ , peso de resina solvatada en DMF). La adición a un mismo reactor de 5  $\mu\text{L}$  de la suspensión de control positivo y 400  $\mu\text{L}$  de la de control negativo proporcionaba el número de unidades de resina deseado en la relación adecuada, dentro de unos límites de error aceptables. Se generaron en total 10 mezclas, las cuales fueron tratadas, de forma independiente, según la metodología de ensayo establecida en el apartado anterior. Una vez acabado el ensayo, las mezclas se lavaron con  $3 \times 300$   $\mu\text{L}$  (1 min) de Tampón 1 y se transfirieron a cápsulas de Petri de plástico, suspendiendo el contenido del reactor en 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y trasvasando la suspensión por medio de una micropipeta. Este proceso se repitió un total de cuatro veces por muestra para asegurar que la cantidad de resina que permanecía en el reactor era mínima, procediendo finalmente al análisis de las suspensiones directamente por microscopía óptica y de fluorescencia, en el mismo microscopio.

Como puede apreciarse en la Figura 5, la aplicación del ensayo a estas mezclas proporcionaba resultados análogos a los obtenidos en el apartado anterior. Las unidades de resina de ambos compuestos eran indistinguibles cuando se observaban por microscopía óptica, es decir, iluminando la muestra con luz blanca y en ausencia de filtros para la visualización selectiva de la luz emitida. La aplicación de los filtros adecuados para la detección de fluoresceína (excitación con luz azul, observación en verde) permitía, sin embargo, revelar entre 7-12 unidades de resina por muestra, cuya fluorescencia era claramente superior a la del resto y que podíamos asumir que contenían  $H3_n$ , basándonos en los resultados del apartado anterior y en la coincidencia del número de positivos encontrados por muestra con el número teórico de unidades de  $H3_n$ -HMFS-PEGA introducidas. Parecía evidente, por tanto, que los dominios B no covalentes formados sobre estas bolas de resina eran capaces de retener la cantidad suficiente de IgG-FITC para su detección, permitiéndonos concluir que el ensayo desarrollado podía ser aplicado a la evaluación de mezclas de los controles y, por extensión, a la búsqueda de análogos activos de  $H3_n$  en quimiotecas “one-bead-one-compound”.

La confirmación de la aplicabilidad del ensayo a la evaluación de quimiotecas de análogos de  $H3_n$  requería, sin embargo, que fuese comprobada la presencia del control positivo en las unidades de resina fluorescentes, con el objetivo de descartar que esta fluorescencia fuese debida a algún tipo de interacción inespecífica. Para ello, se procedió a la separación y secuenciación por MALDI-TOF PSD del péptido contenido en las unidades de resina reveladas positivas de dos de las mezclas analizadas. La captura de estas unidades se llevó a cabo partiendo directamente de las suspensiones de resina en agua, succionándolas selectivamente con una micropipeta y depositándolas sobre un portaobjetos provisto de concavidad central, donde se lavaron convenientemente con agua y DMF para la eliminación de sales y restos de reactivos adheridos ( $H_{I-II}$  e IgG). Los lavados se realizaron adicionando 50  $\mu$ L del disolvente en cuestión y extrayéndolos, pasado un minuto, con un capilar de vidrio de diámetro inferior al diámetro de las bolas de resina, para evitar que fueran succionadas junto con el disolvente. Acabados los lavados, las unidades de resina fueron transferidas una a una a posiciones concretas de una placa de

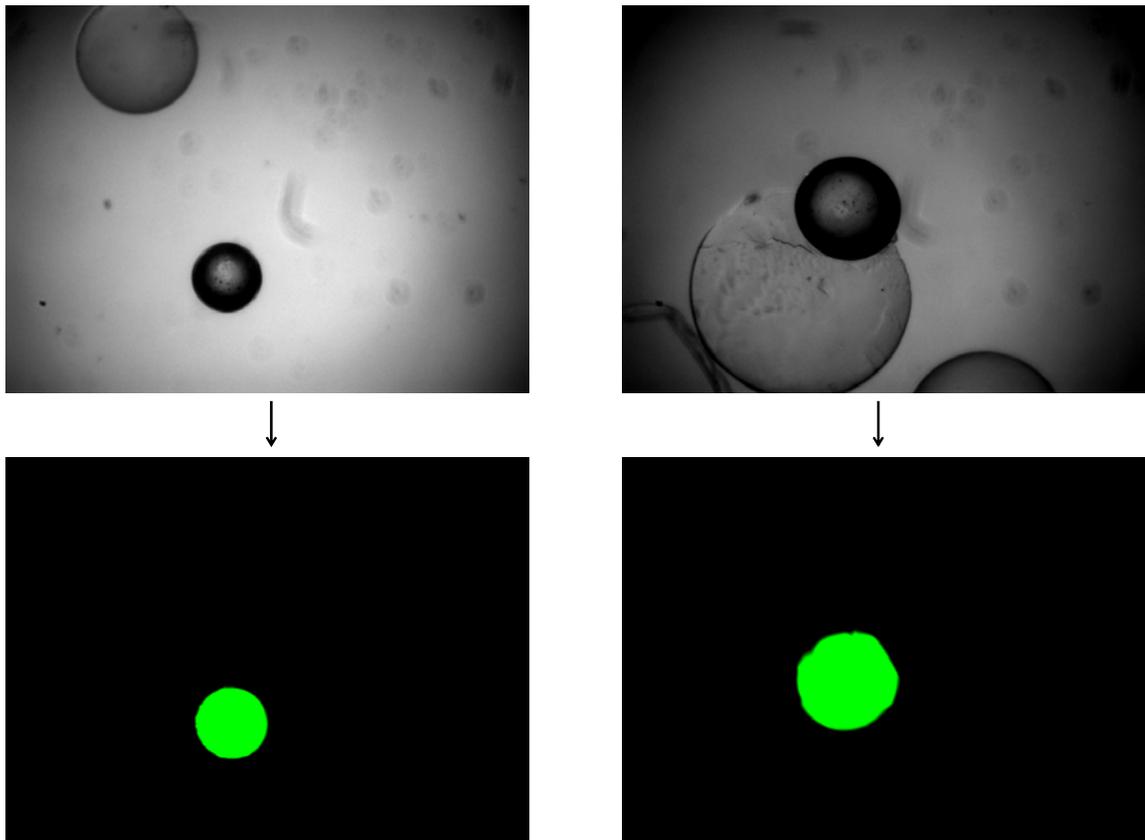


**Figura 5** Sección de una de las mezclas de controles generada bajo condiciones normales de microscopía óptica (izquierda) y tras la aplicación de los filtros necesarios para la excitación y visualización selectiva de fluoresceína (derecha). Parámetros de adquisición (izquierda): i) exposición = 0.5 seg; ii) ganancia = 100 %; iii)  $\times 100$  aumentos. Parámetros adquisición (derecha): exposición = 30 seg; ii) ganancia = 100 %; iii)  $\times 100$  aumentos

MALDI-TOF y el péptido desanclado y preparado para su análisis por PSD, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2 del Capítulo 3.

En total se separaron 18 unidades de resina de las dos mezclas de controles, de las cuales sólo 15 pudieron ser sometidas al proceso de desanclaje y análisis por PSD, debido a la pérdida de tres de ellas durante el proceso de lavado. De las 15 muestras analizadas, el péptido contenido en 12 pudo ser secuenciado completamente, obteniéndose en todos los casos espectros de fragmentación análogos a los de H3<sub>n</sub>. Se confirmaba de esta forma que el péptido anclado sobre las unidades de resina reveladas positivas durante el ensayo era el control positivo (H3<sub>n</sub>) y que, por tanto, el ensayo funcionaba perfectamente también para mezclas de compuestos y podía ser utilizado en la evaluación de quimiotecas.

Las muestras de las que no se pudo extraer ninguna secuencia, en realidad no proporcionaron ninguna señal diferente de las de la matriz en el espectro normal de MALDI-TOF, aunque el análisis de la placa por microscopía óptica mostraba que todas ellas contenían una unidad de resina. De estos resultados se podía deducir que, o bien el proceso de preparación de muestra había fallado en algún punto, o bien las unidades de resina no contenían péptido por motivos desconocidos, indicando que el ensayo proporcionaba también un número limitado de falsos positivos. El análisis en profundidad de estas unidades de resina por microscopía óptica y de



**Figura 6** Imágenes de dos falsos positivos registradas bajo condiciones normales de microscopía de óptica (arriba) y tras la aplicación de los filtros necesarios para la excitación y visualización selectiva de la fluoresceína (abajo). Parámetros de adquisición (arriba): i) exposición = 0.1 seg; ii) ganancia = 100 %; iii)  $\times 100$  aumentos. Parámetros adquisición (abajo): exposición = 30 seg; ii) ganancia = 100 %; iii)  $\times 100$  aumentos

fluorescencia reveló que se trataba de un tipo de unidades de propiedades muy diferentes a las normales de la peptidil-HMFS-PEGA (Figura 6):

- Tamaño inferior al del resto de las unidades de resina.
- Opacidad total cuando eran observadas por microscopía óptica, tanto en suspensión acuosa como en medio orgánico, al contrario que el resto de la resina, que se mostraba totalmente transparente.
- Alta fluorescencia por sí mismas en todas las longitudes de onda abarcadas por el microscopio (emisión en verde, rojo y azul), aun sin haber estado en contacto con IgG-FITC.

Estas características nos llevaron a concluir que nos encontrábamos frente a unidades de resina defectuosas posiblemente por problemas durante el proceso de fabricación, que hacían imposible que sobre ellas pudiese sintetizarse producto alguno y que además eran fluorescentes. El ensayo proporcionaba, por tanto, falsos positivos, pero no por interacciones inespecíficas de la muestra con los reactivos utilizados, sino por el propio soporte sobre el que se encontraban los péptidos. Sin embargo, gracias a sus características físicas (tamaño y fluorescencia en varias longitudes de onda), éstas unidades de resina podían distinguirse fácilmente de los positivos auténticos y ser discriminadas.

#### **4. Tercera etapa de optimización: ensayos de inhibición con H3<sub>n</sub> en disolución**

Llegados a este punto, las pruebas experimentales de las que disponíamos nos permitían afirmar que el ensayo de actividad optimizado resultaba adecuado para la búsqueda de péptidos análogos a H3<sub>n</sub> en quimiotecas “one-bead-one-compound”. La fluorescencia de las unidades de resina positivas parecía provocada por el mecanismo supuesto, es decir, por interacción de las moléculas de IgG-FITC con los dominios B no covalentes formados sobre ellas, proporcionando fuertes evidencias de ello la ausencia de fluorescencia de las muestras de H3<sub>n</sub>-HMFS-PEGA cuando el ensayo se realizaba en ausencia de H<sub>I-II</sub> (apartado 1 de este capítulo). Aun así, se creyó necesario llevar a cabo un último experimento que permitiese corroborar que la respuesta de las unidades de resina positivas estaba realmente generada por este mecanismo y no por otro tipo de interacciones.

Uno de los medios para la búsqueda selectiva de ligandos de alta afinidad en la evaluación de quimiotecas “one-bead-one-compound” es mediante el uso de ensayos de inhibición competitiva.<sup>6</sup> En estos ensayos, el tratamiento de los compuestos de la quimioteca se realiza con una disolución que contiene, además del receptor para el que se buscan nuevos ligandos, una cantidad determinada de un ligando conocido, de afinidad media/elevada por el receptor. En las

condiciones adecuadas, sólo aquellos candidatos que dispongan de una afinidad igual o mayor que la del inhibidor introducido son capaces de mantener el receptor unido y revelar su actividad en el ensayo, permaneciendo el resto de compuestos de la muestra aparentemente inalterado (moléculas inactivas y ligandos de baja afinidad). Este tipo de ensayo no es tan sólo válido para la búsqueda de compuestos de elevada afinidad, sino que también puede ser utilizado para la confirmación del sitio de unión de los positivos encontrados. Tras la separación de los compuestos activos, un segundo ensayo empleando en la disolución de incubación un exceso de un ligando de sitio de unión conocido, permitiría discriminar entre aquellos compuestos con afinidad por este mismo sitio de unión, los cuales no darían respuesta alguna, de los afines por otras regiones del receptor, que continuarían revelándose como moléculas activas.

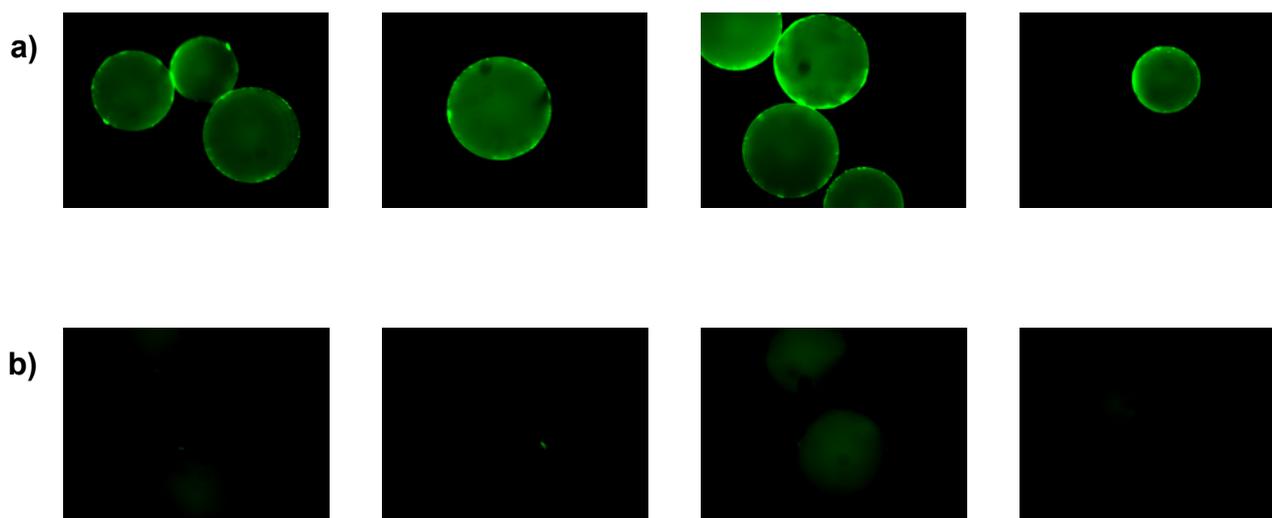
Basándonos en este tipo de metodologías se decidió llevar a cabo experimentos de inhibición con muestras de 10 unidades de H3<sub>n</sub>-HMFS-PEGA, las cuales serían tratadas según el ensayo desarrollado, utilizando concentraciones crecientes de H3<sub>n</sub> en la disolución de H<sub>I-II</sub>. La inhibición de la respuesta del ensayo confirmaría que la fluorescencia de las unidades de resina positivas era debida a la interacción de las moléculas de IgG-FITC con los haces de tres hélices  $\alpha$  no covalentes formados sobre ella. En caso contrario, se revelaría la existencia de algún tipo de interacción desconocida entre la inmunoglobulina, el péptido H<sub>I-II</sub>, que como ya se había demostrado era necesario para la detección de actividad, y algún componente de la H3<sub>n</sub>-HMFS-PEGA que no era la hélice III natural.

Experimento	Disolución de tratamiento (concentración H <sub>I-II</sub> : relación H3 <sub>n</sub> en disolución / H3 <sub>n</sub> en 10 unidades de resina)	Dilución IgG
1	10 $\mu$ M : -	1/1000
2	10 $\mu$ M : 10/1	1/1000
3	10 $\mu$ M : 100/1	1/1000
4	- : -	1/1000

**Tabla 3** Resumen de las condiciones empleadas en los ensayos de inhibición. La tabla muestra la concentración la H<sub>I-II</sub> y la relación entre H3<sub>n</sub> en disolución y en fase sólida en la primera disolución de incubación, así como la dilución de disolución madre de IgG-FITC empleada.

En total se prepararon 8 muestras de 10 unidades de resina H3<sub>n</sub>-HMFS-PEGA cada una, las cuales se trataron, de dos en dos, en las condiciones de ensayo que se muestran en la Tabla 3. Como puede apreciarse, se realizaron un total de 2 ensayos de inhibición, empleando excesos de 10 y 100 eq. de H3<sub>n</sub> en disolución con respecto a la cantidad de péptido contenida en las diez unidades de resina, además de un ensayo en condiciones estándar y un ensayo en blanco (en ausencia de H<sub>I-II</sub>). El péptido H3<sub>n</sub> se introdujo en la misma disolución que H<sub>I-II</sub>, ya que era con este reactivo y no con la IgG con el que interaccionaba,<sup>7</sup> haciendo así el tiempo de competición máximo. El resto de las condiciones empleadas durante los ensayos fueron las determinadas óptimas en el apartado 1 de este capítulo (tiempos de tratamiento, tampones, lavados...).

La observación por microscopía de fluorescencia de las muestras sometidas a los diferentes ensayos demostraron que la adición de H3<sub>n</sub> a la disolución de H<sub>I-II</sub> provocaba una disminución de

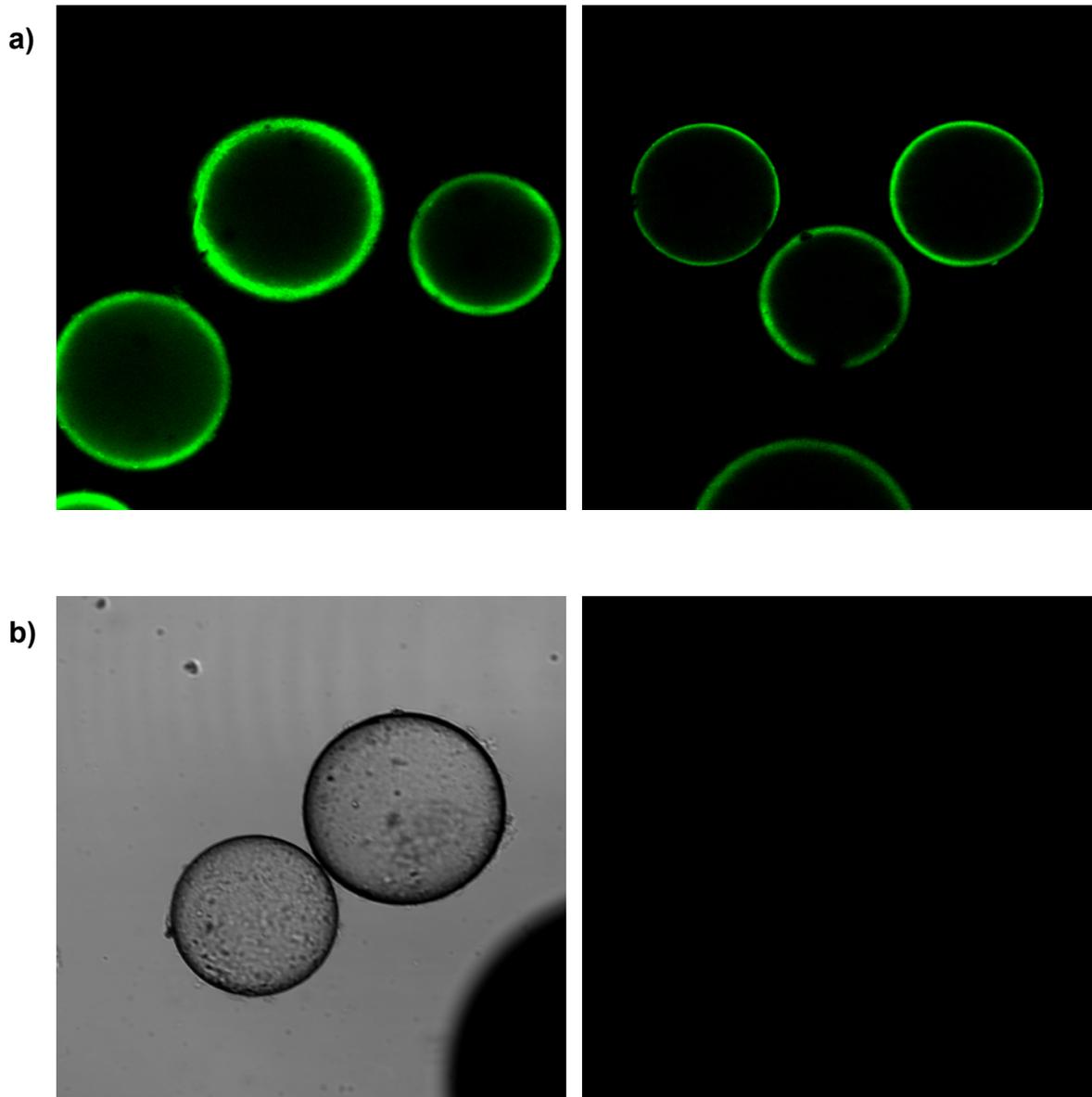


**Figura 7** Imágenes de microscopía de fluorescencia de las muestras de  $H3_n$ -HMFS-PEGA sometidas al ensayo normal de actividad (a) y al ensayo de inhibición empleando 100 eq. de  $H3_n$  en disolución (b), registradas empleando los mismos parámetros de adquisición (exposición = 20 seg; ii) ganancia = 100 %; iii)  $\times 100$  aumentos). Estos parámetros fueron ajustados de forma que las unidades de resina sometidas al ensayo en blanco no fuesen visibles.

la fluorescencia de las unidades de resina, llegando incluso a eliminarla completamente cuando se empleaba una cantidad suficiente de “inhibidor”. En estas condiciones, como puede apreciarse en la Figura 7, las unidades de  $H3_n$ -HMFS-PEGA presentaban una intensidad de fluorescencia similar a la de las sometidas al ensayo en blanco, por lo que resultaban prácticamente indistinguibles. Los resultados obtenidos corroboraban que las unidades de resina positivas adquirirían fluorescencia por el mecanismo supuesto durante el diseño del ensayo y que, por tanto, éste funcionaba correctamente y podía ser utilizado para la evaluación de quimiotecas de análogos de  $H3_n$ .

## **5. Estudio por microscopía confocal de la disposición de las moléculas de IgG-FITC en las unidades de resina positivas**

Como ya se comentó durante el diseño de la estrategia sintética, la resina PEGA presentaba entre sus propiedades más destacables un gran tamaño de poro, el cual permitía el libre acceso de macromoléculas de hasta 50 kDa a las posiciones del interior de las unidades de resina.<sup>8</sup> Aunque el tamaño de la inmunoglobulina utilizado en el ensayo desarrollado era muy superior a este máximo propuesto ( $M_w$  IgG  $\approx$  150 kDa), pareciendo evidente que las moléculas de IgG-FITC interaccionarían solamente con los dominios B no covalentes formados sobre la superficie de la resina, se creyó conveniente estudiar en qué parte de la resina ejercían su acción las inmunoglobulinas. Para ello, se prepararon muestras de 10 unidades de resina de  $H3_n$ -HMFS-



**Figura 8** (a) Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de dos secciones centrales de unidades de resina de la muestra de H3<sub>n</sub>-HMFS-PEGA. Parámetros de adquisición: i) excitación a 488 nm y emisión a 510-530 nm; ii) objetivo de inmersión 10×0.4. (b) Imágenes de microscopía confocal de la sección de central de dos unidades de resina de la muestra de H3<sub>a</sub>-HMFS-PEGA, bajo luz blanca (izquierda) y en condiciones de visualización selectiva de luz emitida por fluoresceína (derecha). Parámetros adquisición (izquierda): i) excitación luz blanca; ii) objetivo de inmersión 10×0.4. Parámetros adquisición (derecha): i) excitación a 488 nm y emisión a 510-530 nm; ii) objetivo de inmersión 10×0.4.

PEGA y H3<sub>a</sub>-HMFS-PEGA las cuales se sometieron al ensayo de actividad y se examinaron por microscopía confocal de fluorescencia.

La microscopía confocal de fluorescencia es una técnica de análisis análoga a la microscopía de fluorescencia común, que se diferencia principalmente en la potencia del microscopio, en cuanto a la posibilidad de aumentar la imagen, y en el modo excitación de los fluoróforos de la muestra. En microscopía de fluorescencia, la muestra es irradiada normalmente con lámparas de

Hg, seleccionando la longitud de onda de excitación por medio de filtros de luz. En microscopía confocal, en cambio, la excitación se lleva a cabo por irradiación de la muestra con un láser de la longitud de onda deseada. El uso de este tipo de sistemas hace posible, no sólo la obtención de respuestas más potentes debido al aumento de la intensidad de la luz irradiada, sino también la irradiación selectiva de áreas de la muestra o más concretamente, de planos de ésta. En otras palabras, la microscopía confocal nos permite seccionar virtualmente la muestra en varios planos y observar de forma independiente como está repartido el fluoróforo en cada uno de ellos.

El análisis por microscopía confocal se llevó a cabo ajustando los parámetros de adquisición de forma que las unidades de resina de H3<sub>a</sub>-HMFS-PEGA no fueran visibles (Figura 8b), para que toda la fluorescencia observada fuese debida a la presencia de IgG marcada unida específicamente, y captando imágenes de secciones de las unidades de H3<sub>n</sub>-HMFS-PEGA cada cuatro micras. Se registraron un total de 60 imágenes de secciones, con las cuales se consiguió un análisis completo de aproximadamente la mitad de las esferas de resina, lo que nos permitió establecer el tamaño medio de las unidades de resina entre 200-300 µm, en estas condiciones. Como puede apreciarse en la Figura 8a, las imágenes registradas mostraban claramente que las moléculas de IgG permanecían en la superficie y que no penetraban al interior de la resina, corroborando lo que ya se suponía en un principio. Era posible observar además que la inmunoglobulina se distribuía más o menos homogéneamente por toda la periferia de la resina, a excepción de determinadas “*zonas negras*” carentes de ella, probablemente por defectos en el proceso de fabricación de la resina que impedían la presencia de H3<sub>n</sub> y, por tanto, la formación de dominios B no covalentes a los que unir se.

## 6. Conclusiones

Los resultados obtenidos durante la optimización del ensayo de actividad nos permitieron extraer las conclusiones que se detallan a continuación:

- Disponíamos de un ensayo adecuado para la evaluación de quimiotecas “one-bead-one-compound” de análogos de la hélice C-terminal del dominio B sintetizadas sobre HMFS-PEGA. El mecanismo de revelado de las unidades de resina que contenían péptido activo se basaba en la unión de IgG marcada con fluoresceína a los haces de tres hélices  $\alpha$  no covalentes análogos al dominio B formados sobre la resina, a partir de la interacción del péptido H<sub>I-II</sub> con el péptido anclado.
- El ensayo no tan sólo revelaba como positivas las unidades de resina con péptido activo, sino que existía también un número limitado de falsos positivos (unidades de resina fluorescentes pero sin péptido). Estos falsos positivos, sin embargo, podían ser fácilmente diferenciados de los positivos auténticos debido a sus propiedades físicas (opacidad de la resina

por microscopía óptica y fluorescencia en todas las longitudes de onda de excitación disponibles por el microscopio).

- Las moléculas de IgG marcada actuaban únicamente sobre los dominios B no covalentes formados en la superficie de las unidades de resina, de forma más o menos homogénea. Debido a su gran tamaño, estas moléculas eran incapaces de penetrar en el interior de la resina, aun teniendo en cuenta el gran tamaño de poro de la resina PEGA.

- Se había desarrollado también una metodología que permitía aislar las unidades de resina que resultaban positivas en el ensayo cuando se encontraban en presencia de unidades conteniendo péptido inactivo, y desanclar el péptido contenido directamente sobre placas de MALDI-TOF para su análisis por PSD.

## 7. Bibliografía

<sup>1</sup> González, M. J. Tesis Doctoral en *Departament de Química Orgànica*; Universitat de Barcelona: Barcelona, **1999**

<sup>2</sup> a) Torigoe, H.; Shimada, I.; Saito, A.; Sato, M.; Arata, Y. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8787-8793; b) Gouda, H.; Torigoe, H.; Saito, A.; Sato, M.; Arata, Y.; Shimada, I. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9665-9672; c) Cedergren, L.; Andersson, R.; Jansson, B.; Uhlén, M.; Nilsson, B. *Protein Eng.* **1993**, *6*, 441-448; d) Bottomley, N. P.; Popplewell, A.; Scawen, M.; Wan, T.; Sutton, B. J.; Gore, M. G. *Protein Eng.* **1994**, *7*, 1463-1470; e) Gouda, H.; Shiraishi, M.; Takahashi, H.; Kato, K.; Torigoe, H.; Arata, Y.; Shimada, I. *Biochemistry* **1998**, *37*, 129-136; f) Kato, K.; Gouda, H.; Tanaha, W.; Yoshino, A.; Matsunaga, C.; Arata, Y. *FEBS Lett.* **1993**, *328*, 49-54

<sup>3</sup> a) Hilarie, P. M. S.; Lowary, T. L.; Meldal, M.; Bock, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13312-13320; b) Leon, S.; Quarrell, R.; Lowe, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2997-3002, c) Buchardt, J.; Schiødt, C. B.; Krog-Jensen, C.; Delaissé, J.-M.; Foged, N. T.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 624-638; d) Halkes, K. M.; St. Hilaire, P. M.; Crocker, P. R.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 18-27

<sup>4</sup> Lebl, M. comunicación personal

<sup>5</sup> Lam, K. S.; Lebl, M. *Methods* **1994**, *6*, 372-380

<sup>6</sup> Gordon, E. M.; Barreto, R. W.; Dower, W. J.; Fodor, S. P. A.; Gallop, M. A. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1385-1401

<sup>7</sup> a) Deisenhofer, J. *Biochemistry* **1981**, *20*, 2361-2370; b) Gouda, H.; Torigoe, H.; Saito, A.; Sato, M.; Arata, Y.; Shimada, I. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9665-9672; c) Cedergren, L.; Andersson, R.; Jansson, B.; Uhlén, M.; Nilsson, B. *Protein Eng.* **1993**, *6*, 441-448; d) Bottomley, N. P.; Popplewell, A.; Scawen, M.; Wan, T.; Sutton, B. J.; Gore, M. G. *Protein Eng.* **1994**, *7*, 1463-1470; e) Gouda, H.; Shiraishi, M.; Takahashi, H.; Kato, K.; Torigoe, H.; Arata, Y.; Shimada, I. *Biochemistry* **1998**, *37*, 129-136

<sup>8</sup> Auzanneau, F.-I.; Meldal, M.; Bock, K. *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 31-44

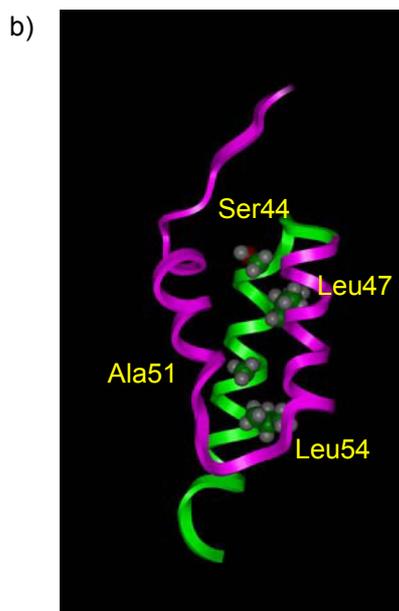
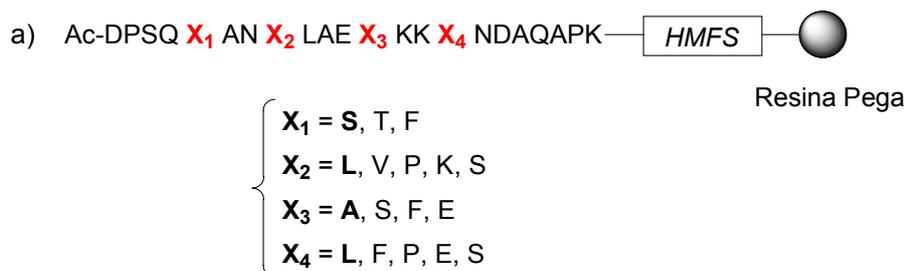
## **Capítulo 5: Síntesis y evaluación de la quimioteca de prueba L300**



## 1. Diseño de la quimioteca L300

Tras el diseño general de la estrategia y la optimización de las etapas de síntesis, evaluación y secuenciación de positivos descritas en los capítulos anteriores, disponíamos ya de todo lo necesario para la búsqueda de análogos de la hélice C-terminal del dominio B por química combinatoria. El funcionamiento de las diferentes etapas por separado no significaba, sin embargo, que la metodología en su conjunto pudiese ser aplicada con éxito a tal fin, por lo que resultaba imprescindible la síntesis y evaluación de una pequeña quimioteca de prueba para averiguarlo. Esta quimioteca de prueba, para poder ser considerada como tal, debía cumplir una serie de requisitos que permitiesen afirmar sin ningún tipo de dudas que, en caso de no encontrar ninguna unidad de resina positiva durante los ensayos de actividad o no poder secuenciar los péptidos correspondientes, el error era debido a la metodología en sí y no a los compuestos que la formaban, ofreciendo además la posibilidad de optimizar convenientemente las condiciones necesarias para dar solución a los diferentes problemas hallados. Para ello, la quimioteca debía estar formada por un *número de candidatos limitado* (menos de 500), de forma que fuese posible caracterizar en profundidad los compuestos sintetizados y detectar problemas en el proceso de síntesis. Entre estos candidatos debía existir, además, un *compuesto activo de secuencia conocida*, que asegurase la presencia de moléculas activas durante la evaluación de la quimioteca y, por tanto, de unidades de resina fluorescentes. Finalmente, se debía introducir algún *mecanismo de regulación del número de péptidos potencialmente activos*, ya que un número excesivo de éstos podría conducir a ensayos de actividad totalmente negativos por causas ajenas a la propia metodología.

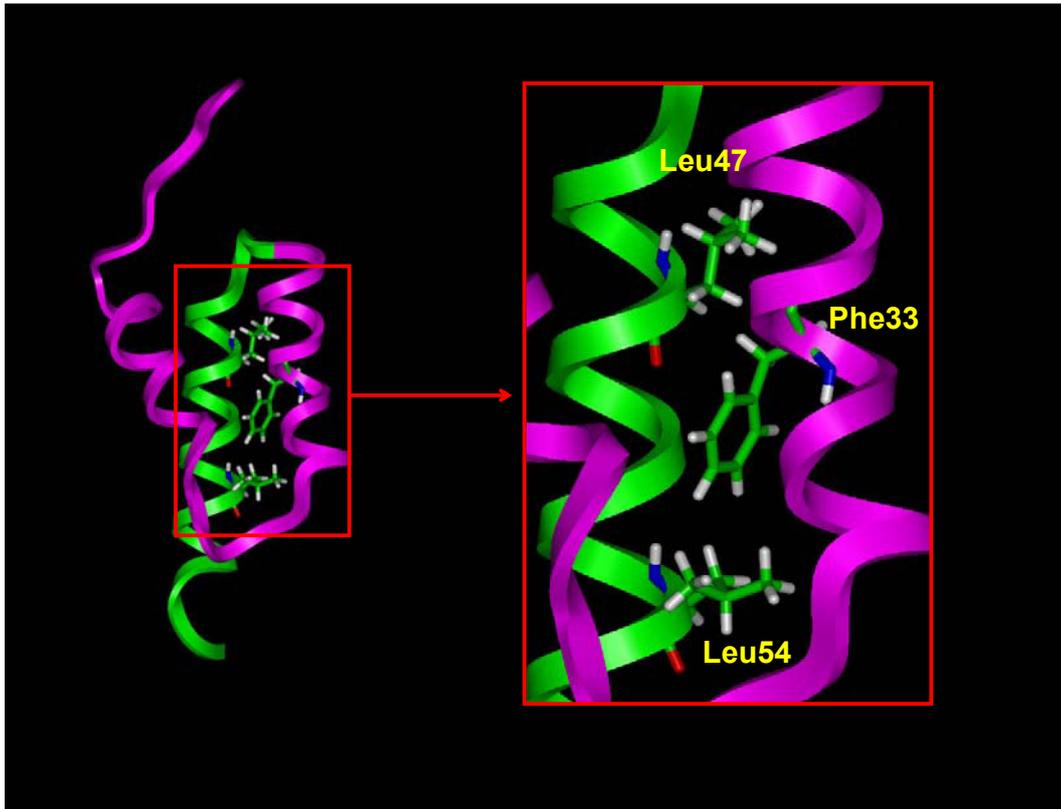
Basándonos en estas premisas, se decidió llevar a cabo la síntesis de una pequeña quimioteca de análogos de H3<sub>n</sub> que, además de incluirlo como péptido activo conocido, permitiese extraer información estructural importante sobre el dominio B y más concretamente, sobre las interacciones de los residuos de H3<sub>n</sub> situados en el interior hidrofóbico con las hélices I-II, la cual podría ser de gran utilidad en el desarrollo futuras quimiotecas de análogos de la hélice III natural. La llamada quimioteca L300 se diseñó a partir de la permutación de cuatro de las seis posiciones de H3<sub>n</sub> situadas en el interior hidrofóbico del dominio (Figura 1). Los aminoácidos a incorporar en cada una de las posiciones se escogieron siguiendo los criterios que se detalla a continuación:



**Figura 1** (a) Estructura general de la quimioteca L300. Los aminoácidos se muestran en código de una letra, empleando el término  $X_n$  para las posiciones a las que corresponde más de un aminoácido, la identidad de los cuales se especifica debajo. En negrita se destacan los aminoácidos que de forma natural se encuentran en estas posiciones en la secuencia de  $H3_n$ . (b) Estructura tridimensional del dominio B natural donde se destacan la posición e identidad de los aminoácidos de  $H3_n$  sometidos a permutación en la quimioteca. El esqueleto de la molécula se representa en forma de cintas con las hélices I-II (extremo N-terminal) en violeta y en primer plano y la hélice III (extremo C-terminal) en verde y en el plano posterior.

- **Ser44 ( $X_1$ ):** es el primer aminoácido de  $H3_n$  situado en el interior hidrofóbico del dominio B. En esta posición se decidió incorporar *treonina* y *fenilalanina* además del aminoácido natural, con el objetivo de comprobar si el hidroxilo de la cadena lateral de la serina se encontraba formando algún enlace de hidrógeno importante para el plegamiento correcto del sistema o si, por el contrario, primaban las interacciones hidrofóbicas y favoreciéndolas se daba lugar a haces de tres hélices  $\alpha$  no covalentes más compactos y activos.

- **Leu47 ( $X_2$ ):** este aminoácido se encuentra implicado, junto con la Leu54 que encontramos en  $X_4$ , en una de las interacciones consideradas clave para el buen plegamiento del dominio, al flanquear por arriba y por abajo la Phe33 de la hélice II (Figura 2).<sup>1</sup> En esta posición se decidió incorporar, además de la leucina natural, *valina*, *lisina*, *serina* y *prolina*. La valina se escogió para introducir un cambio conservador en el sistema, que dejase prácticamente inalterada a



**Figura 2** Estructura tridimensional del dominio B natural donde se destacan la posición de los aminoácidos Leu47, Phe33 y Leu54, implicados en una de las interacciones más importantes para el plegamiento correcto de la proteína. La figura muestra la estructura completa del dominio, con el esqueleto en forma de cintas, las hélice I-II (extremo N-terminal de la molécula) en violeta y en primer plano y la hélice III (extremo C-terminal) en verde y en el plano posterior. La figura muestra además una ampliación de la zona donde se encuentran los aminoácidos citados.

H3<sub>n</sub> y proporcionase algún compuesto positivo adicional a la hélice III natural. Lisina y serina se eligieron para determinar el efecto de la incorporación de cargas o cadenas laterales polares en el interior hidrofóbico. Por último, la prolina, aminoácido desestabilizante de estructuras secundarias  $\alpha$ -helicoidales, se introdujo como medio de control del número de péptidos potencialmente activos en la quimioteca, ya que aquellos que no tuviesen la capacidad de dar lugar a hélices  $\alpha$  serían probablemente incapaces de interactuar con las hélices I-II naturales de forma correcta.

- **Ala51 (X<sub>3</sub>):** el papel de este aminoácido en el plegamiento correcto del dominio es probablemente crucial, al encontrarse en el centro del interior hidrofóbico de la proteína. En esta posición se decidió incorporar, además de la alanina natural, *fenilalanina*, *serina* y *ácido glutámico*. Con ello se pretendía conocer el efecto sobre la proteína de la introducción de aminoácidos de mayor superficie hidrofóbica así como de aminoácidos con cadenas laterales polares o cargadas.

- **Leu54 (X<sub>4</sub>):** como ya se ha comentado anteriormente, esta leucina se encuentra implicada, junto con la Leu47 y la Phe33, en una de las interacciones más importantes para la estructura del sistema. Es esta posición se decidió incorporar, a parte del aminoácido natural, *fenilalanina*, *ácido glutámico*, *serina* y *prolina*. La incorporación de fenilalanina buscaba explorar

la posibilidad de reforzar la interacción con la Phe33 a través de la *interacción entre anillos aromáticos*, descrita como crucial para la obtención de proteínas *de novo* con estructura de proteína nativa.<sup>2</sup> Con la incorporación de serina y ácido glutámico se pretendía conocer el efecto de la introducción de cadenas laterales polares y cargadas en esta posición del interior hidrofóbico, mientras que la prolina fue elegida de nuevo como elemento de control del número de compuestos con potencial actividad. La elección de ácido glutámico en lugar de lisina, como se hizo en la posición X<sub>2</sub>, se llevó a cabo para evitar dotar a algunos candidatos de un exceso de carga positiva, compensando la carga extra aportada por la lisina con el ácido carboxílico de la cadena lateral del glutámico.

De esta forma, la quimioteca diseñada cumplía, *a priori*, todos los requisitos necesarios para poder ser utilizada como quimioteca de prueba. Para empezar, el número de candidatos que la formaban ( $3 \times 5 \times 4 \times 5 = 300$ ) era suficientemente elevado para simular las condiciones normales de trabajo en química combinatoria, pero adecuado para permitir la caracterización detallada de los compuestos sintetizados y la detección de problemas en la metodología de síntesis. La quimioteca contenía la hélice III natural como péptido activo conocido y un número de secuencias potencialmente activas limitado, gracias a la introducción de prolinas en posiciones adecuadas, las cuales evitarían que muchos de los candidatos adoptaran estructura helicoidal. Finalmente, las modificaciones introducidas abrían además las puertas a la obtención de información importante, en caso de funcionar la estrategia combinatorial, sobre la naturaleza de las interacciones de los aminoácidos de H3<sub>n</sub> situados en el interior hidrofóbico con las hélices I-II y, porqué no, a la búsqueda de análogos de H3<sub>n</sub> capaces de dar lugar a nuevos “dominios B” más estables o activos.

## 2. Síntesis de la quimioteca L300

Las quimiotecas “one-bead-one-compound” se componen de una mezcla de compuestos unidos a soporte sólido, sintetizados de forma que cada unidad de resina contiene múltiples copias de una única secuencia. La síntesis de una quimioteca de este tipo requiere, por tanto, partir de, como mínimo, tantas unidades de resina como candidatos contiene la quimioteca, si se pretende que todas las secuencias estén presentes en la mezcla final. Realizando la síntesis de este modo, sin embargo, la quimioteca obtenida carecería de un número más o menos importante de candidatos, debido principalmente a la imperfección del proceso de *mezcla y separación*. Para que esto no ocurriese, las alícuotas generadas durante la etapa de separación deberían contener la misma cantidad exacta de unidades de resina y la recuperación de éstas del interior de un reactor debería ser del 100 %, ambas cosas imposibles. Además, aunque una síntesis perfecta resultase factible, la quimioteca obtenida contendría cada candidato en una única unidad de resina, por lo que la caracterización de los compuestos sintetizados no podría llevarse a cabo, ya que los candidatos

caracterizados no se encontraría disponibles para la posterior evaluación de la quimioteca. Por todo ello, la síntesis de este tipo de quimiotecas se suele abordar partiendo de un número de unidades de resina bastante superior al de candidatos a sintetizar. Sin embargo, ¿cuál es la cantidad de resina adecuada de la que se debe partir?. Chapman y col.<sup>3</sup> proporcionaron una respuesta a esta pregunta a partir del análisis estadístico de los errores intrínsecos al proceso de *mezcla y separación*, lo cual condujo a una serie de fórmulas matemáticas que permiten el cálculo del número inicial mínimo de unidades de resina para que la quimioteca sintetizada contenga, dentro de un intervalo de confianza prefijado, todos los candidatos diseñados repetidos el número de veces que se desee (Materiales y Métodos 6.1).

La aplicación de este formalismo estadístico a la quimioteca L300, imponiendo que los 300 candidatos diseñados debían encontrarse en la mezcla final en un mínimo de 10 unidades de resina con un 99 % de confianza, dio como resultado que eran necesarios como mínimo 80 mg de resina PEGA para llevar a cabo la síntesis, después de añadir al resultado final del cálculo un 10 % extra de unidades de resina para contrarrestar las pérdidas ocasionadas por los ensayos de ninhidrina a realizar tras los acoplamientos. Debido a que se trataba de una quimioteca de prueba y se pretendía, por tanto, la caracterización en profundidad de los compuestos sintetizados además de su evaluación, se decidió aumentar esta cantidad de resina de partida a 300 mg para disponer de suficiente peptidil-resina.

La síntesis de la quimioteca L300 se llevó a cabo siguiendo el protocolo estándar de síntesis de quimiotecas por *mezcla y separación* que se describe en Materiales y Métodos 6.3. Tras el acondicionamiento de la resina, reducción de su funcionalización inicial de 0.4 mmol/g a 0.23 mmol/g e introducción del espaciador bifuncional HMFS, se procedió a la incorporación de los diferentes aminoácidos de la secuencia empleando excesos de 4 eq. (5 eq. para la Lys C-terminal), DIPCDI y HOBt como agentes de activación y doble acoplamiento sistemático para todos los ellos. La *separación* de la resina para la incorporación de los aminoácidos de las cuatro posiciones permutadas se realizó partiendo de una suspensión de peptidil-resina en DMF (1 mL por cada aminoácido asignado a esa posición), la cual se dividió con una micropipeta en tantos volúmenes iguales como aminoácidos a acoplar. La división se realizó introduciendo 500  $\mu$ L de la suspensión en cada reactor, reponiendo el disolvente extraído y repitiendo el proceso tantas veces como fuera necesario para asegurar que no quedaba peptidil-resina en el reactor común. De igual modo, la devolución de la resina proveniente de las diferentes alícuotas al reactor común después de los acoplamientos, en la llamada etapa de *mezcla*, se realizó suspendiendo la resina en DMF y transfiriendo todo el volumen a este reactor, proceso que se repitió dos o tres veces para asegurar la máxima recuperación de peptidil-resina. El resto de reacciones (desprotecciones y acoplamiento de aminoácidos comunes a todas las secuencias) se desarrollaron con toda la peptidil-resina introducida en un mismo reactor.

Una vez acabadas las etapas de acoplamiento, se procedió a la desprotección y acetilación del extremo N-terminal y a la eliminación de los protectores de las cadenas laterales por tratamiento con HF anhidro. De igual modo que durante la síntesis de los péptidos H3<sub>n</sub> y H3<sub>a</sub> (Capítulo 2), la desprotección se llevó a cabo en ausencia total de agitación magnética para la

preservación de la integridad de la peptidil-resina. Finalmente la resina se recuperó con ayuda de suspensiones de DMF, fue lavada convenientemente con DCM y DMF y dividida en fracciones de aproximadamente 100 mg (peso de peptidil-resina solvatada en DMF), para facilitar su manipulación. La quimioteca se almacenó a -20 °C después de ser lavada con DCM (1 % TFA) y DCM.

El control de calidad de la quimioteca sintetizada se llevó a cabo por análisis de la mezcla de compuestos de tres formas diferentes, tal y como se describe en Materiales y Métodos 6.2:

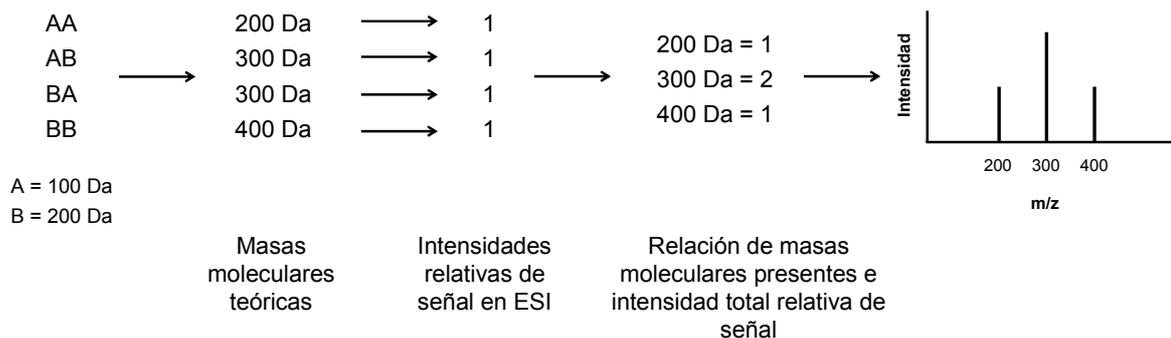
- Análisis de aminoácidos cualitativo de una alícuota de peptidil-resina para conocer si la composición media de la quimioteca se correspondía con la composición teórica.
- Análisis por espectrometría de masas del crudo obtenido por desanclaje de una alícuota de la quimioteca que contuviera todos los candidatos, lo cual nos permitiría detectar la presencia de subproductos importantes generados durante la síntesis, a partir de la comparación de la distribución teórica y experimental de los pesos moleculares de los productos sintetizados.
- Análisis por espectrometría de masas y MALDI-TOF PSD del producto contenido en un número representativo de unidades de peptidil-resina, desanclado de forma independiente.

	Asp	Thr	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Phe	Lys	Pro
Composición esperada L300	4	0.3	2.0	3.5	4.3	0.2	1.4	0.8	3.2	2.4
Composición experimental L300	4,0	0.2	1.2	3.3	4.4	0.2	1.3	-	3.5	2.3

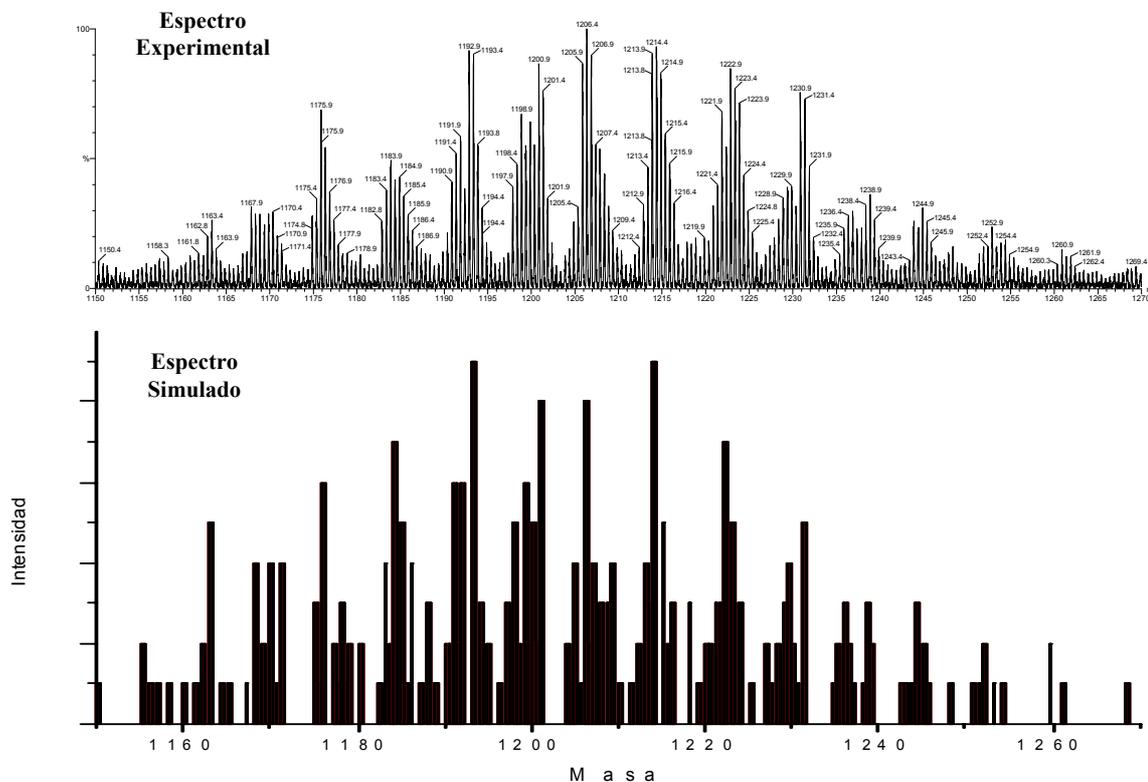
**Tabla 1** Composición media esperada y experimental (calculada por análisis de aminoácidos) de los compuestos que componen la quimioteca L300.

Como puede apreciarse en la Tabla 1, la composición media de la quimioteca L300 se correspondía aceptablemente con la composición teórica, calculada a partir de los candidatos que componían la quimioteca suponiendo que todos se encontraban en proporciones equimolares en la mezcla final. Este resultado indicaba que la síntesis parecía haberse desarrollado correctamente y que, por lo menos durante las etapas de acoplamiento, no se había presentado ningún problema importante. La cantidad de Phe en la muestra analizada no pudo determinarse, no por problemas sintéticos o de detección, sino debido a que este mismo aminoácido había sido utilizado para la disminución de la funcionalización de la resina, por lo que la cantidad de Phe medida provenía de aquí y de la Phe presente en los candidatos de la quimioteca, sin que existiese posibilidad alguna de diferenciar entre ellas.

El análisis por espectrometría de masas (ESI-MS) de la mezcla de compuestos que formaban la quimioteca se llevó a cabo por desanclaje del producto contenido en una alícuota de aproximadamente 3000 unidades de resina (1.2 mL de una suspensión de 1 mg de peptidil-resina solvatada en DMF por cada 100  $\mu$ L), de forma que cada uno de los 300 candidatos se encontrase

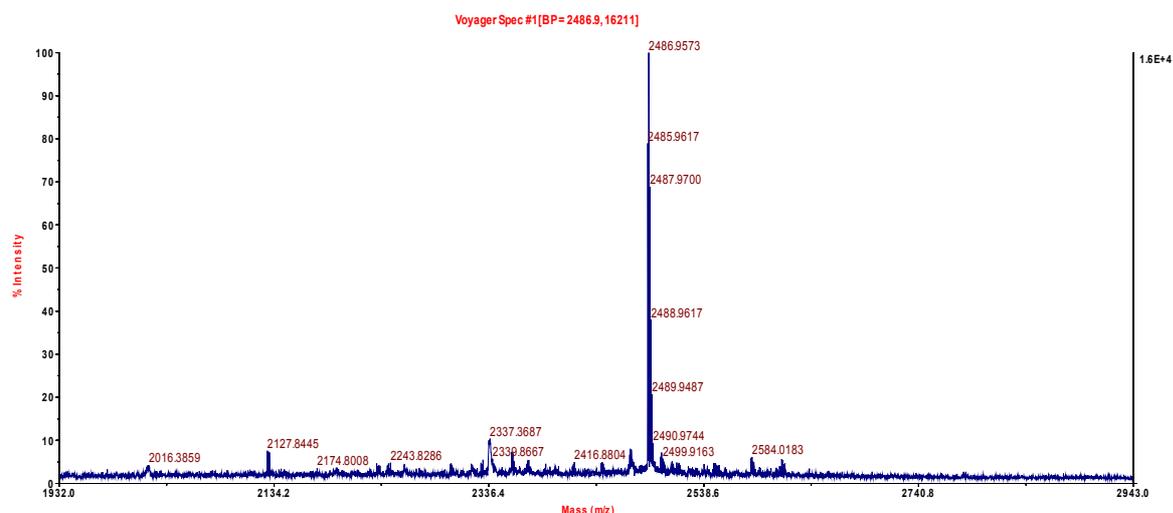


**Figura 3** Ejemplo del proceso de generación de un espectro de masas simulado para una quimioteca de 4 dipéptidos formada a partir de los aminoácidos A y B, de 100 y 200 Da respectivamente.



**Figura 4** Comparación del espectro de ESI-MS registrado experimentalmente a partir del producto obtenido de una alícuota de 3000 unidades de peptidil-resina de la quimioteca L300 con el espectro simulado.

presente en unas 10 unidades de resina. El espectro experimental registrado se comparó con un espectro teórico simulado, el cual fue generado de la siguiente forma (Figura 3): i) se calculó primero la masa molecular de todos los candidatos de la quimioteca; ii) a cada masa molecular se le asignó una intensidad teórica en el espectro de electrospray de 1; iii) se sumaron las intensidades de todos aquellos compuestos de igual masa molecular ( $\pm 0.5$  Da), obteniéndose así una lista de todas las masas moleculares teóricas presentes en la mezcla y la intensidad relativa teórica de sus



**Figura 5** Espectro de MALDI-TOF de uno de los 20 crudos analizados provenientes de unidades de resina aisladas. El pico principal del espectro ( $m/z = 2486.96$  Da) corresponde a la secuencia Ac-DPSQFANKLAEFKKPNDQAQPK-OH según fue determinado por MALDI-TOF PSD ( $m/z$  teórico = 2486.27 Da), donde los aminoácidos que se destacan en negrita corresponden a los aminoácidos situados en las posiciones de  $H3_n$  sometidas a premutación para la construcción de la quimioteca.

señales de electrospray; iv) finalmente, la representación en un gráfico de estos datos (intensidad relativa frente a masa molecular) proporcionó el espectro de masas simulado de la quimioteca. Es necesario destacar que el cálculo del espectro teórico presupone que todos los candidatos se encuentran en la mezcla final en cantidades equimolares y que la intensidad de ionización de todos los compuestos es la misma.

Como puede apreciarse en la Figura 4, el espectro registrado para la mezcla de compuestos y el espectro simulado mostraban muy buena correspondencia. Independientemente de las intensidades de las señales, debido a que las diferencias en la eficacia de ionización de las especies analizadas no fueron tenidas en cuenta durante la simulación, tanto la distribución de los picos a lo largo del espectro como el rango en el que éstos aparecían eran análogos en ambos casos. Estos resultados proporcionaban una nueva prueba a favor de que la síntesis se había desarrollado correctamente. La ausencia de señales intensas fuera del rango de masas marcado por los candidatos de la quimioteca y la analogía en la distribución de las señales indicaban que no existían impurezas importantes en la mezcla final de compuestos. Este hecho se corroboró a partir del análisis por MALDI-TOF y MALDI-TOF PSD del producto contenido en 20 unidades de peptidil-resina, desanclado de forma independiente siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2 del Capítulo 3. Todos los crudos analizados contenían una única señal mayoritaria (Figura 5), acompañada de unas pocas señales de muy baja intensidad correspondientes a subproductos, entre los cuales pudieron identificarse sistemas con deleciones de Phe y Asp y péptidos parcialmente protegidos. La masa molecular del pico mayoritario y la secuencia deducida

por PSD se correspondían además, en todos los casos, con secuencias presentes en la quimioteca L300.

Quedaba demostrado, por tanto, que la quimioteca había sido sintetizada correctamente y que parecía contener todos los candidatos diseñados con una pureza suficiente para proceder a su evaluación. Se comprobaba además que la estrategia HMFS/Boc/Bn era adecuada para la síntesis de quimiotecas “one-bead-one-compound”.

### 3. Evaluación de la quimioteca L300

Una vez finalizada la síntesis y caracterización de la quimioteca L300, se procedió a la evaluación de la actividad de sus compuestos por medio del ensayo desarrollado en el Capítulo 4. Se realizaron un total de cinco ensayos en paralelo, cuatro en condiciones estándar y uno donde el tratamiento con la disolución de hélices I-II fue sustituido por un tratamiento con Tampón 1 (ensayo en blanco). De esta forma, cada candidato de la quimioteca se hallaba presente en unas 13 unidades de resina en los ensayos normales, mientras el ensayo en blanco nos ofrecía la oportunidad de detectar la presencia de falsos positivos por unión inespecífica de la IgG marcada u otros mecanismo.

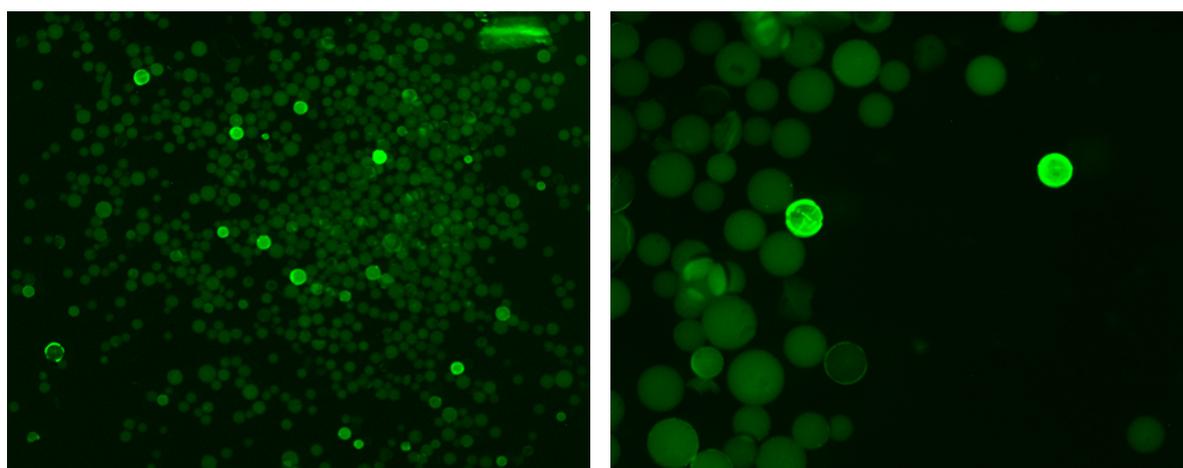
Etapa	Reactivo*	Ciclos
1	DMF/H <sub>2</sub> O (3:1)	10×1 min
2	DMF/H <sub>2</sub> O (1:1)	10×1 min
3	DMF/H <sub>2</sub> O (1:3)	10×1 min
4	H <sub>2</sub> O	10×1 min
5	Tampón1	10×1 min
6	Tampón 1	1×10 min
7	Tampón 2	10×1 min
8	Tampón 2	1×1 h
9	Tampón 1	10×1 min
10	Hélices I-II 100 µM en Tamón 1	1×16 h
11	IgG-FITC 1/1000 en Tampón 1	1×6 h
12	Lavados (Tampón 1)	3×1 min

**Tabla 2** Etapas del ensayo de actividad para la evaluación de los compuestos de la quimioteca L300. Tampón 1: tampón fosfato (10 mM fosfato, 100 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, pH=7.4). Tampón 2: tampón fosfato (10 mM fosfato, 100 mM NaCl, 0.1 % gelatina, pH=7.4). \*Proporciones volumétricas entre reactivos.

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en reactores de 2 mL análogos a los usados para la síntesis manual de péptidos. Las aproximadamente 1000 unidades de peptidil-resina de cada muestra se introdujeron por adición de 400  $\mu\text{L}$  de una suspensión de la quimioteca en DMF (1 mg/100  $\mu\text{L}$ , peso de resina solvatada en DMF). Una vez las muestras preparadas, se procedió a la realización de los ensayos siguiendo el protocolo que se muestra en la Tabla 2, excepto para el ensayo en blanco donde, como ya se ha comentado, la disolución utilizada en la etapa 10 fue sustituida por Tampón 1. Se emplearon 250  $\mu\text{L}$  de cada uno de los reactivos por ciclo, los cuales fueron eliminados por filtración al final del mismo, excepto para las etapas 10 y 11, donde la disolución de IgG se adicionó directamente sobre las suspensiones de peptidil-resina en la disolución de  $\text{H}_{\text{I-II}}$  (o Tampón 1 en caso del ensayo en blanco).

Una vez acabado el protocolo de ensayo, se procedió a traspasar la peptidil-resina de cada una de las muestras a una cápsula Petri para su análisis por microscopía de fluorescencia. Para ello, se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de agua en el interior de cada uno de los reactores y las suspensiones generadas se trasvasaron con una micropipeta. Este proceso se repitió un total de cuatro veces por muestra con el objetivo de recuperar el máximo de resina posible de cada reactor. El análisis por microscopía se realizó directamente con las unidades de peptidil-resina suspendidas en agua, empleando una lupa de fluorescencia *Leica* provista de los filtros adecuados para la visualización selectiva de fluoresceína.

En la Figura 6 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en la evaluación de la quimioteca L300, los cuales demostraban que el ensayo de actividad desarrollado funcionaba correctamente. Como puede apreciarse, al contrario que en el ensayo en blanco, donde no se halló ninguna unidad de resina fluorescente, las alícuotas de quimioteca sometidas a las condiciones de ensayo normales mostraban entre 20 y 30 unidades de resina cuya fluorescencia era claramente superior a la del resto y que, por tanto, contenían péptido activo, o lo que es lo mismo, un péptido capaz de interactuar con  $\text{H}_{\text{I-II}}$  para dar lugar a un haz de tres hélices  $\alpha$  no covalente de estructura



**Figura 6** Imágenes de microscopía de fluorescencia de dos de las muestras de la quimioteca L300 sometidas al ensayo de actividad. **Izquierda:** vista general del total de las unidades de resina de una de las muestras (condiciones de adquisición: i) amplificación: 80 %; ii) exposición: 0.35 seg). **Derecha:** imagen ampliada de dos unidades de resina reveladas positivas en el ensayo (condiciones de adquisición: i) amplificación: 80 %; ii) exposición: 0.35 seg).

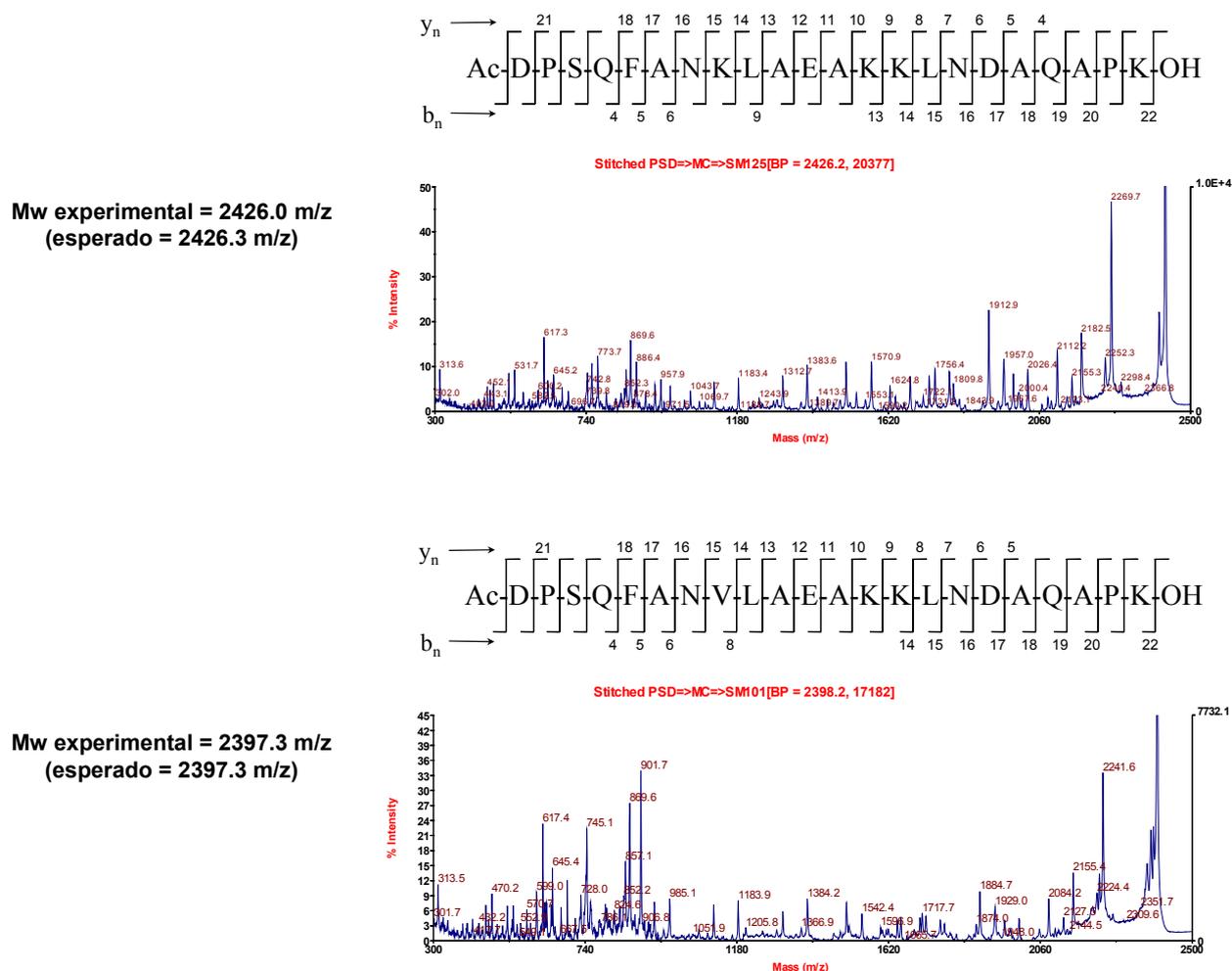
análoga a la del dominio B natural, conservando su capacidad de unión a IgG. Dado que cada una de las muestras disponía de cada candidato en unas tres unidades de resina, resultaba evidente que la quimioteca presentaba más de una secuencia activa, entre las cuales debía estar incluida la de la hélice III natural (positivo seguro introducido).

La separación de las unidades de resina positivas para la secuenciación de los péptidos activos se llevó a cabo empleando una micropipeta de 2  $\mu$ L. Ya que la intensidad de la fluorescencia era indicativa de la cantidad de anticuerpo unido a una unidad de resina, se decidió tomar este parámetro como medida cualitativa de la afinidad de los dominios no covalentes por las moléculas de IgG y, por tanto, de la actividad de los compuestos, olvidando por el momento los efectos sobre la fluorescencia de la falta de homogeneidad tanto en el tamaño como en la funcionalización de las bolas de resina. Siguiendo este criterio, se aislaron únicamente aquellas unidades de mayor fluorescencia (péptidos más activos), succionándolas individualmente de las suspensiones acuosas y depositándolas en la concavidad central de un portaobjetos. Para ello, se procedió a ajustar los parámetros de análisis de forma que la resina sometida al ensayo en blanco no fuese detectable y a separar las bolas de resina que en estas condiciones continuaban siendo claramente visibles, procurando que no presentasen fluorescencia en ninguna otra longitud de onda, propiedad típica de los falsos positivos hallados durante el desarrollo del ensayo. En total se consiguieron aislar 56 unidades de resina, un número bastante inferior al contabilizado en primera instancia (aproximadamente 100), debido principalmente a la pérdida de fluorescencia de la resina a medida que la muestra permanecía expuesta a la lámpara del microscopio, la cual llegaba a desaparecer prácticamente tras 15 minutos de exposición continuada.

#### **4. Secuenciación de positivos por MALDI-TOF PSD**

La secuenciación de los péptidos contenidos en las unidades de resina aisladas se llevó a cabo por MALDI-TOF PSD, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3 del Capítulo 4. Las bolas de resina se lavaron primero con agua y DMF para la eliminación de sales y reactivos adheridos, tras lo cual fueron transferidas a posiciones individuales de una placa de MALDI-TOF que contenían 1  $\mu$ L de una disolución de morfolina en DMF (1:4). La reacción de desanclaje se mantuvo hasta la total evaporación de los reactivos, finalizando la preparación de las muestras con la adición de 2  $\mu$ L de disolución de matriz (CHCA) a cada una de las posiciones. Los espectros de PSD se registraron en condiciones habituales (Materiales y Métodos 9.1).

El proceso de secuenciación propiamente dicho comenzó con la calibración de los espectros de fragmentación adquiridos, empleando el espectro de PSD de una muestra de H3<sub>a</sub> preparada sobre la misma placa y analizada de forma previa al resto de los compuestos. Tras la calibración, se procedió a la asignación de las señales correspondientes a las *zonas de secuencia conocidas* (no permutadas), tomando como referencia el espectro de PSD de H3<sub>n</sub>, ya que la



**Figura 7** Espectros de MALDI-TOF PSD de dos de los péptidos contenidos en las unidades de resina de la quimioteca L300 reveladas positivas en el ensayo de actividad. La figura muestra, además de los espectros, las secuencias deducidas a partir de ellos, donde se destacan los principales fragmentos  $b_n$  y  $y_n$  identificados. A la izquierda de cada espectro se indica la masa molecular medida para cada uno de los compuestos así como la masa molecular esperada de la secuencia deducida.

similitud de secuencia entre los diferentes candidatos de la quimioteca proporcionaba patrones de fragmentación muy similares. Llegados a este punto, la identidad de los aminoácidos situados en las posiciones permutadas pudo ser fácilmente deducida a partir de las señales no asignadas, gracias al conocimiento de los diferentes aminoácidos introducidos en cada una de estas posiciones y de las secuencias de la quimioteca cuya masa molecular coincidía con la del producto analizado ( $\pm 1$  Da). El tiempo requerido para la extracción de una secuencia completa, desde la adquisición del espectro hasta su interpretación, fue en todos los casos inferior a los 30 min.

La Figura 7 muestra dos de los espectros de PSD adquiridos, así como las secuencias deducidas a partir de ellos (ver resto de espectros en las páginas 222 a 230 del Anexo). Como puede apreciarse, el producto contenido en una única unidad de resina era suficiente para la obtención de espectros de PSD de elevada calidad, los cuales podían ser fácilmente interpretados siguiendo el procedimiento detallado anteriormente. De las 56 muestras preparadas, 53 permitieron

la deducción de una secuencia completa, lo cual indicaba que la metodología era, además, altamente efectiva. Estos resultados demostraban, por tanto, que el MALDI-TOF PSD representaba una poderosa herramienta para la secuenciación de péptidos activos provenientes de quimiotecas “one-bead-one-compound”, de forma rápida, eficaz, a bajo coste y sin necesidad de perder parte del producto disponible para los ensayos de actividad en la generación de escaleras de secuencias parciales.

Secuencia	Número de unidades de resina
(1) Ac-DPSQ <b><u>F</u></b> AN <b><u>K</u></b> LAE <b><u>A</u></b> KK <b><u>L</u></b> NDAQAPK-OH	11
(2) Ac-DPSQ <b><u>F</u></b> AN <b><u>V</u></b> LAE <b><u>A</u></b> KK <b><u>L</u></b> NDAQAPK-OH	11
(3) Ac-DPSQ <b><u>F</u></b> AN <b><u>V</u></b> LAE <b><u>A</u></b> KK <b><u>F</u></b> NDAQAPK-OH	7
(4) Ac-DPSQ <b><u>T</u></b> AN <b><u>L</u></b> LAE <b><u>A</u></b> KK <b><u>L</u></b> NDAQAPK-OH	7
(5) Ac-DPSQ <b><u>F</u></b> AN <b><u>L</u></b> LAE <b><u>A</u></b> KK <b><u>L</u></b> NDAQAPK-OH	6
(6) Ac-DPSQ <b><u>S</u></b> AN <b><u>V</u></b> LAE <b><u>A</u></b> KK <b><u>L</u></b> NDAQAPK-OH	5
(7) Ac-DPSQ <b><u>T</u></b> AN <b><u>V</u></b> LAE <b><u>A</u></b> KK <b><u>L</u></b> NDAQAPK-OH	4
(8) Ac-DPSQ <b><u>F</u></b> AN <b><u>V</u></b> LAE <b><u>A</u></b> KK <b><u>S</u></b> NDAQAPK-OH	1
(9) Ac-DPSQ <b><u>S</u></b> AN <b><u>L</u></b> LAE <b><u>A</u></b> KK <b><u>L</u></b> NDAQAPK-OH	1
<b>Total secuencias identificadas = 9</b>	<b>Total unidades de resina secuenciadas = 53</b>

**Tabla 3** Resumen de las secuencias identificadas en el análisis por MALDI-TOF PSD de los péptidos contenidos en las unidades de resina de la quimioteca L300 reveladas positivas. La tabla muestra las secuencias de los péptidos en código de una letra, con los aminoácidos correspondientes a las posiciones permutadas en negrita y subrayados, así como el número de unidades de resina total en que se encontró cada secuencia. En la parte final de la tabla se indican el número total de secuencias diferentes identificadas así como el número de unidades de resina secuenciadas satisfactoriamente.

En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos en el análisis por PSD de los productos contenidos en las unidades de resina positivas aisladas. Como puede apreciarse, las 53 muestras de las que pudo extraerse una secuencia completa revelaron un total de nueve péptidos activos, entre los cuales se encontraba la hélice III natural del dominio B (positivo 9). Parecía evidente, por tanto, que el ensayo de actividad no generaba unidades de resina fluorescentes de forma aleatoria, lo cual no hubiese permitido encontrar la misma secuencia en 11 bolas de resina diferentes, sino que confería fluorescencia específicamente a aquellas que contenían una serie de secuencias concretas, como era la de H3<sub>n</sub>. Estos resultados, unidos a la ausencia de prolinas en los péptidos activos (elemento disruptor de hélice  $\alpha$ ), confirmaban la validez de la estrategia combinatoria diseñada y la eficacia del ensayo de actividad desarrollado para la identificación de péptidos

análogos a la hélice III natural, es decir, péptidos capaces de formar con las hélices I-II haces de tres hélices  $\alpha$  de igual o mayor afinidad por inmunoglobulinas que el dominio B nativo.

Considerando que todas las unidades de resina aisladas poseían aproximadamente la misma intensidad de fluorescencia (de manera cualitativa), resultaba factible establecer una relación entre el número de veces que una misma secuencia había sido identificada y la actividad de dicho péptido. Como ya se comentó anteriormente, la fluorescencia de una unidad de resina era producto de la inmunoglobulina unida, la cual dependía, entre otros factores, de la cantidad de dominios no covalentes formados sobre la resina y de la afinidad de éstos por las moléculas de IgG. Al contrario que la afinidad, sin embargo, el número de dominios formados variaba de una unidad de resina a otra, debido a la falta de homogeneidad tanto en el tamaño como en la funcionalización de las unidades de resina PEGA con las que se llevó a cabo este trabajo. Dos bolas de resina que dispusiesen de una cantidad diferente del mismo péptido activo presentarían diferente fluorescencia en el ensayo de actividad, ya que una de ellas sería capaz de formar una mayor cantidad de estos dominios y de unir más IgG. Aquellas secuencias encontradas menos veces correspondían, por tanto, a péptidos de actividad baja/media contenidos en unidades de resina de alta funcionalización, lo cual les había permitido unir suficiente inmunoglobulina para revelarse positivos. Por el contrario, las secuencias más repetidas correspondían a péptidos de elevada actividad, capaces de unir suficiente IgG incluso cuando se encontraban anclados en unidades de resina de inferior funcionalización.

Basándonos en estas consideraciones, los resultados obtenidos de la secuenciación nos permitían afirmar que los positivos **1** y **2** poseían una mayor actividad que  $H3_n$ , al haber sido ambas secuencias identificadas casi tantas veces como el número de unidades de resina en el podían hallarse presentes en las muestras analizadas.\* Ello significaba que los péptidos eran capaces de interaccionar con las Hélices I-II dando lugar a la formación de “dominios B” no covalentes, cuya afinidad por las moléculas de IgG era mayor que la del dominio no covalente natural. Ya que la comprobación final del funcionamiento de la estrategia combinatorial requería de la síntesis de alguno de los positivos a escala sintética, con el objetivo de confirmar su actividad, *se decidió escoger las secuencias de estos dos péptidos para tal fin*, al ser los compuestos probablemente más activos.

## **5. Síntesis de los péptidos $H3_n$ , $H3_a$ , P1 y P2 a gran escala**

La síntesis de los positivos 1 y 2 (compuestos P1 y P2, Figura 8) a escala sintética se llevó a cabo en paralelo y de forma automática junto con la síntesis de la hélice III natural del dominio B

---

\* Teniendo en cuenta que la quimioteca poseía 300 compuestos y que un total de 4000 unidades de resina se sometieron al ensayo de actividad, cada candidato se encontraba presente, en principio, en unas 13 bolas de resina. Los Positivos **1** y **2** fueron hallados un total de 11 veces, tal como se especifica en la Tabla 3.

(H3<sub>n</sub>) y del péptido H3<sub>a</sub>, los cuales fueron empleados como controles positivo y negativo respectivamente en los ensayos de interacción realizados. Las síntesis se desarrollaron siguiendo un esquema de protección Fmoc/tBu sobre 137 mg de resina Rink amida cada una (escala de trabajo = 0.1 mmol), empleando 4 eq. de exceso para la incorporación de los aminoácidos y TBTU/DIEA como mezcla de activación. Esta síntesis proporcionó los diferentes péptidos con el extremo C-terminal en forma de carboxiamida, lo cual obedecía a la intención de que los productos se asemejasen lo máximo posible a como se encontraban sobre resina, por lo que resultaba imprescindible la eliminación de la carga negativa extra que un extremo C-terminal en forma de ácido carboxílico libre aportaba.

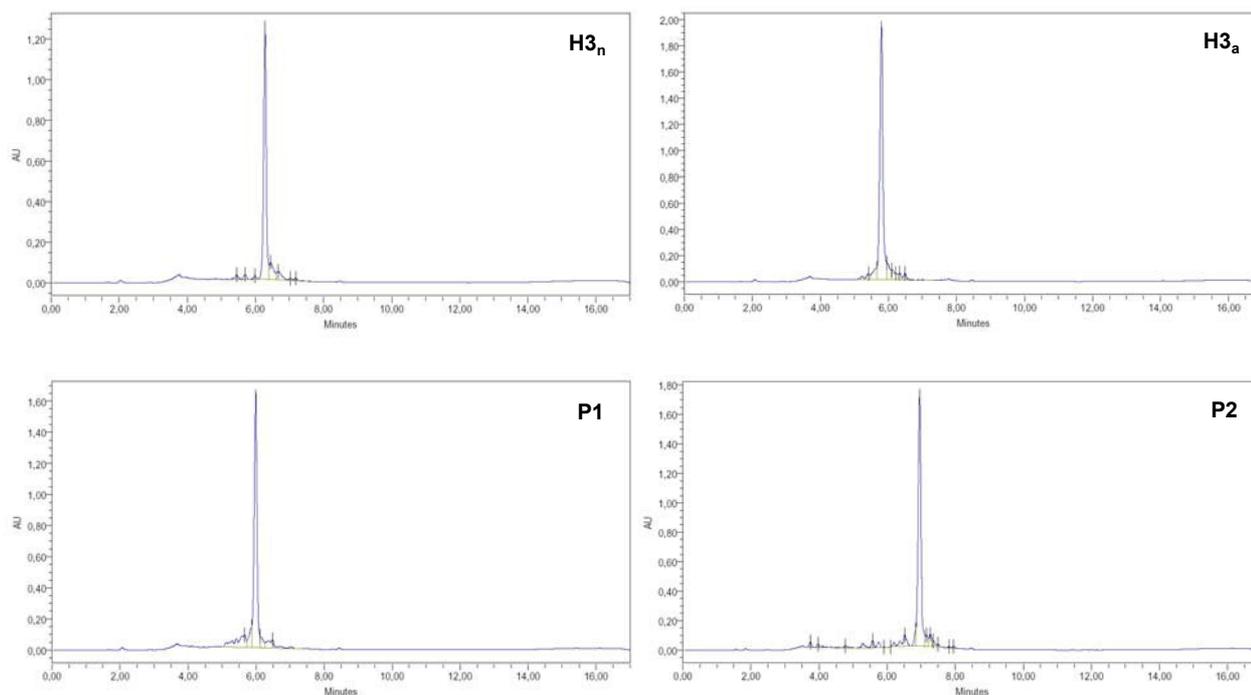


**Figura 8** Secuencias de los péptidos H3<sub>n</sub>, H3<sub>a</sub>, P1 y P2 sintetizados. Los aminoácidos se muestran en código de una letra, destacando en negrita aquellos situados en las posiciones variadas para la generación de la quimioteca L300 (Figura 1).

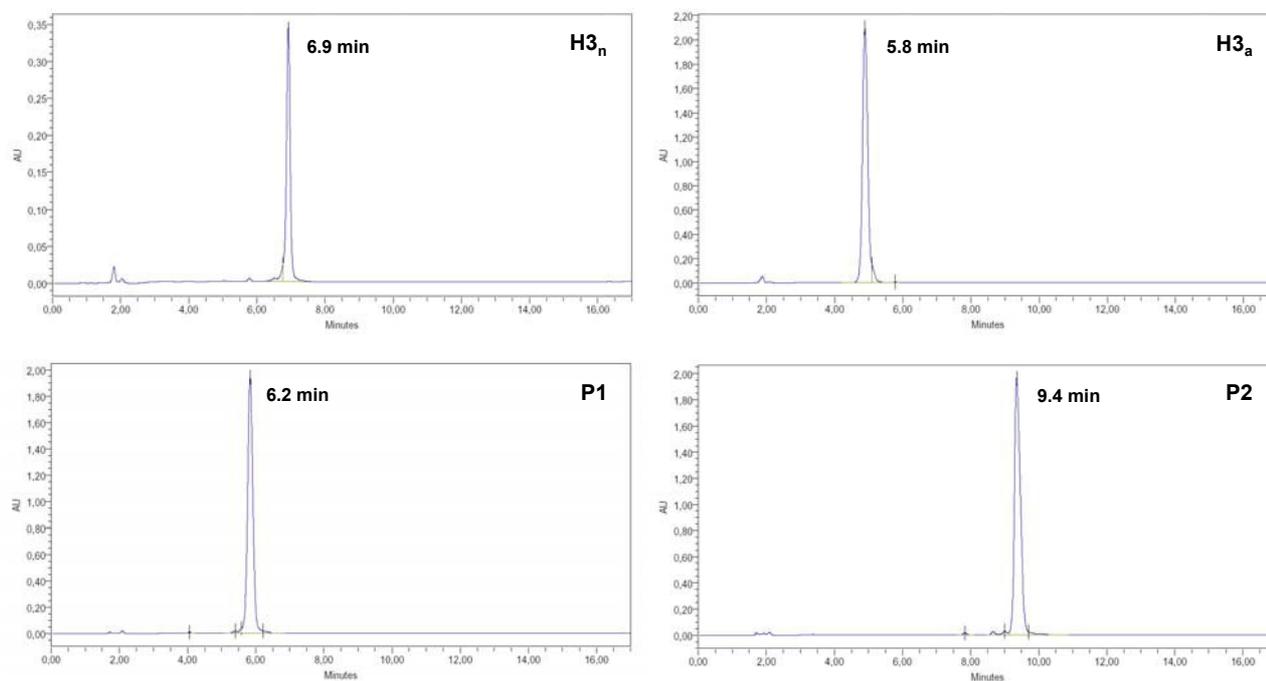
Una vez finalizadas las etapas de incorporación de aminoácidos, las peptidil-resinas fueron transferidas del sintetizador múltiple a reactores independientes de síntesis manual, donde se procedió a la desprotección y acetilación de los grupos  $\alpha$ -amino terminales. La última etapa de la ruta sintética (desprotección de las cadenas laterales y escisión de los enlaces péptido-resina) se realizó en estos mismos reactores por tratamiento de las peptidil-resinas con una mezcla de TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS/fenol (9:0.5:0.25:0.25 v/v/v/p). De esta forma se obtuvieron los cuatro péptidos desprotegidos y libres en disolución, que tras ser lavados con éter dietílico y disueltos en la mínima cantidad de agua (0.1 % TFA) posible, se liofilizaron y almacenaron a -20 °C hasta el momento de su purificación.

Péptido	Cantidad (mg)	Rendimiento final (%)	Masa teórica (M+H) <sup>+</sup>	Masa experimental (M+H) <sup>+</sup>
H3 <sub>n</sub>	62	26.4	2350.2	2350.2
H3 <sub>a</sub>	92.3	39	2350.2	2350.4
P1	57.7	23.7	2425.3	2425.6
P2	70.5	29	2396.3	2396.3

**Tabla 4** Resultados obtenidos en la síntesis de los péptidos H3<sub>n</sub>, H3<sub>a</sub>, P1 y P2. La tabla muestra la cantidad obtenida de cada uno de los compuestos, determinada por análisis de aminoácidos cuantitativo, el rendimiento final de síntesis y las masas moleculares teóricas y experimentales determinadas por MALDI-TOF.



**Figura 9** Perfiles cromatográficos de los crudos obtenidos en la síntesis de los péptidos H3<sub>n</sub>, H3<sub>a</sub>, P1 y P2. Los cromatogramas fueron registrados empleando un gradiente lineal del 0 a 100 % de B en A en 15 min (Materiales y Métodos 3.3.2).

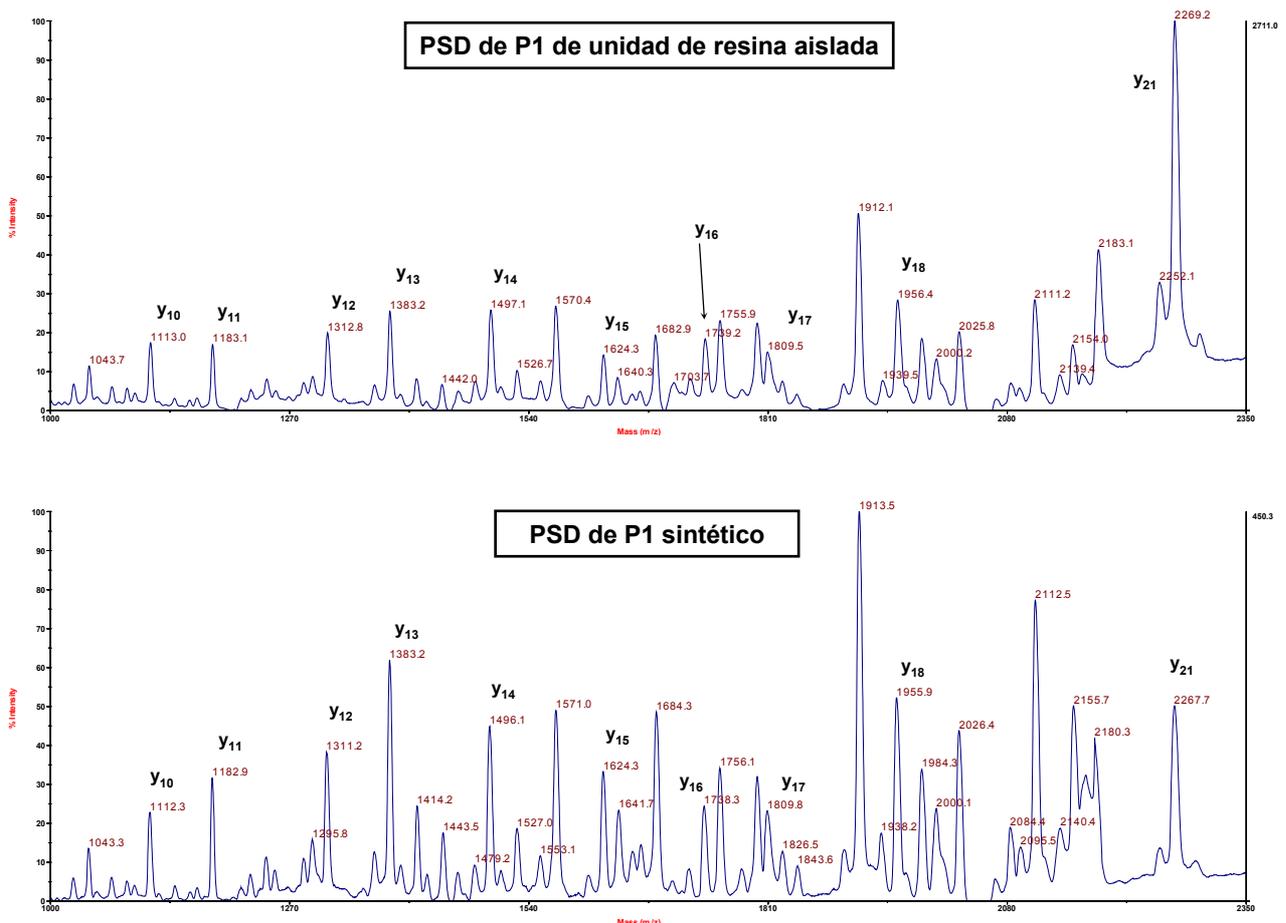


**Figura 10** Perfiles cromatográficos de los péptidos H3<sub>n</sub>, H3<sub>a</sub>, P1 y P2 tras su purificación por HPLC semipreparativo. Los cromatogramas fueron registrados empleando un gradiente lineal del 15 a 40 % de B en A en 15 min (Materiales y Métodos 3.3.2).

El análisis por HPLC de los crudos obtenidos proporcionó los resultados que se muestran

en la Figura 9. Como puede apreciarse, todos ellos contenían una única especie mayoritaria de pureza superior al 70 %, cuya masa molecular, determinada por HPLC-MS, coincidía con la de los productos esperados. Ya que estos compuestos estaban destinados a la realización de ensayos de interacción para la comprobación de su actividad, se estableció que debían disponer de una pureza final mínima del 95 %, por lo que se procedió a su purificación por HPLC semipreparativo. Los productos puros se caracterizaron convenientemente por HPLC analítico y espectrometría de masas y se cuantificaron por análisis de aminoácidos. Como se refleja en la Tabla 4 y en la Figura 10, todos los péptidos se obtuvieron con la pureza deseada y elevado rendimiento.

Con el objetivo de verificar que las secuencias deducidas de los espectros de PSD eran correctas, es decir, que se correspondían con los productos que las unidades de resina positivas aisladas contenían realmente, se procedió al análisis de los péptidos P1 y P2 sintetizados por MALDI-TOF PSD y a la comparación de estos espectros de fragmentación con los registrados para las muestras de donde se obtuvo su secuencia. Como se muestra en la Figura 11, el patrón de fragmentación del producto contenido en las 11 unidades de resina donde se identificó la secuencia



**Figura 11** Espectros de MALDI-TOF PSD (ventana espectral de 1000 a 2350 Da) de P1 obtenidos durante el análisis de los péptidos contenidos en las unidades de resina positivas aisladas (arriba) y del producto sintetizado a gran escala (abajo). La figura muestra la masa de los principales picos detectados así como la identidad de los fragmentos pertenecientes a la serie  $y_n$  identificados.

de P1 mostraba un claro paralelismo con el del producto puro, con la serie  $y_n$  desplazada aproximadamente 1 Da debido al diferente extremo C-terminal en ambos casos (ácido carboxílico libre tras la escisión del enlace péptido-HMFS en la quimioteca, carboxiamida en la síntesis a gran escala realizada). Este mismo resultado se repitió para P2, confirmando que la asignación de los espectros de PSD se había realizado correctamente y que las secuencias deducidas correspondían verdaderamente a las de los péptidos anclados a las bolas de resina aisladas.

## **6. Análisis por dicroísmo circular de la interacción de los péptidos H3<sub>n</sub>, H3<sub>a</sub>, P1 y P2 con las hélices I-II naturales del dominio B**

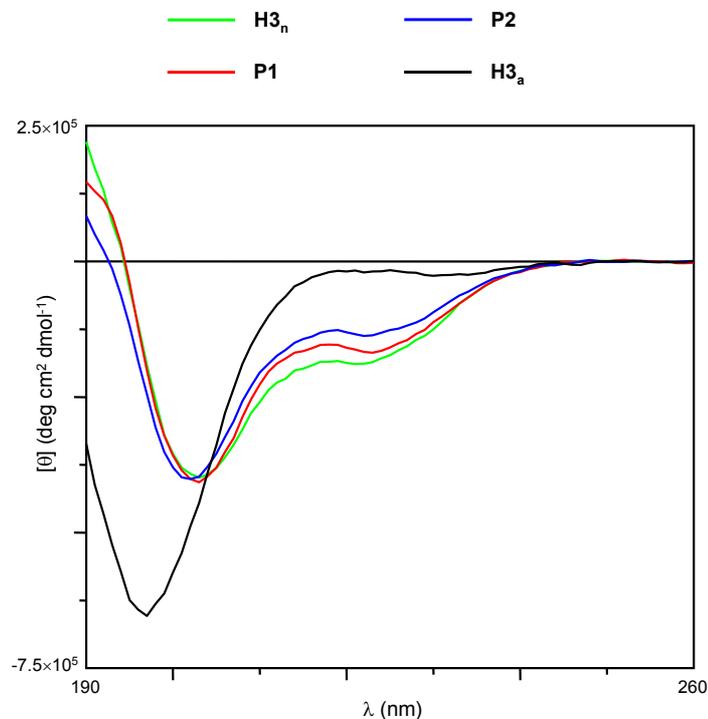
El dicroísmo circular (DC) se ha mostrado como una técnica válida para el análisis de la estructura de proteínas en disolución, debido a que sus elementos conformacionales más comunes, incluyendo las hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$ , presentan espectros de DC en el UV lejano (178-250 nm) característicos. Dado que el espectro de una proteína es básicamente la suma de los espectros de cada una de sus estructuras secundarias, el DC permite estimar de forma aproximada que elementos de estructura presenta y en que proporción. Los grupos cromóforos de los aminoácidos suelen encontrarse además en ambientes disimétricos cuando la proteína está plegada, lo que resulta en espectros de DC particulares en la zona del UV cercano (250-300 nm). La técnica permite también la determinación de los parámetros termodinámicos y cinéticos de plegamiento y desnaturalización, así como del efecto sobre una estructura plegada de mutaciones específicas y el estudio de procesos de interacción ligando-proteína y similares.<sup>4</sup>

Dentro de este último campo, cabe tener en cuenta que el DC, como otras técnicas analíticas ópticas, es una técnica cuantitativa que obedece la ley de Beer: el espectro de cada componente en disolución es proporcional a su concentración, siendo el espectro total de una mezcla la suma de las contribuciones de todos los componentes. El cambio en el espectro de DC de una proteína tras la adición de un ligando es, por tanto, directamente proporcional a la cantidad de proteína que éste es capaz de alterar y a la magnitud de la alteración. Este fenómeno permite, por tanto, que el dicroísmo circular sea una técnica muy útil para la detección de interacciones no covalentes entre péptidos y el estudio de los cambios conformacionales que estas interacciones provocan. Así, las diferencias en el espectro de DC de una mezcla de compuestos, al ser comparado con el espectro generado por suma aritmética de los espectros de cada uno de sus componentes registrados de forma independiente, serían producto únicamente de las interacciones existentes entre ellos y del cambio estructural que éstas provocarían.

En nuestro grupo ya se había demostrado que el dicroísmo circular podía ser utilizado para la detección de la formación de dominios B no covalentes en mezclas formadas por las hélices I-II naturales y diferentes análogos de la hélice III, entre los cuales se encontraba la secuencia natural.<sup>5</sup> Así, por ejemplo, la comparación del espectro de DC de una mezcla formada por los péptidos H<sub>i</sub>.

$\text{H}_{\text{II}}/\text{H}_{3\text{n}}$  en proporción 1:1 con la suma de los espectros de ambos péptidos registrados por separado (denominado espectro “suma”), mostraba un claro aumento de la cantidad de hélice  $\alpha$  presente en el sistema, el cual podía ser directamente atribuido a la interacción entre ellos para la formación de dominios B no covalentes. La ausencia de estos incrementos en los espectros registrados para el resto de mezclas permitieron descartar la interacción entre los análogos de  $\text{H}_{3\text{n}}$  sintetizados ( $\text{H}_{3\text{n}}$  retro, enanito, y retro-enantio) y las hélices I-II, demostrando la no aplicabilidad de la hipótesis retro-enantio para sistemas que adoptan estructura de hélice  $\alpha$ .

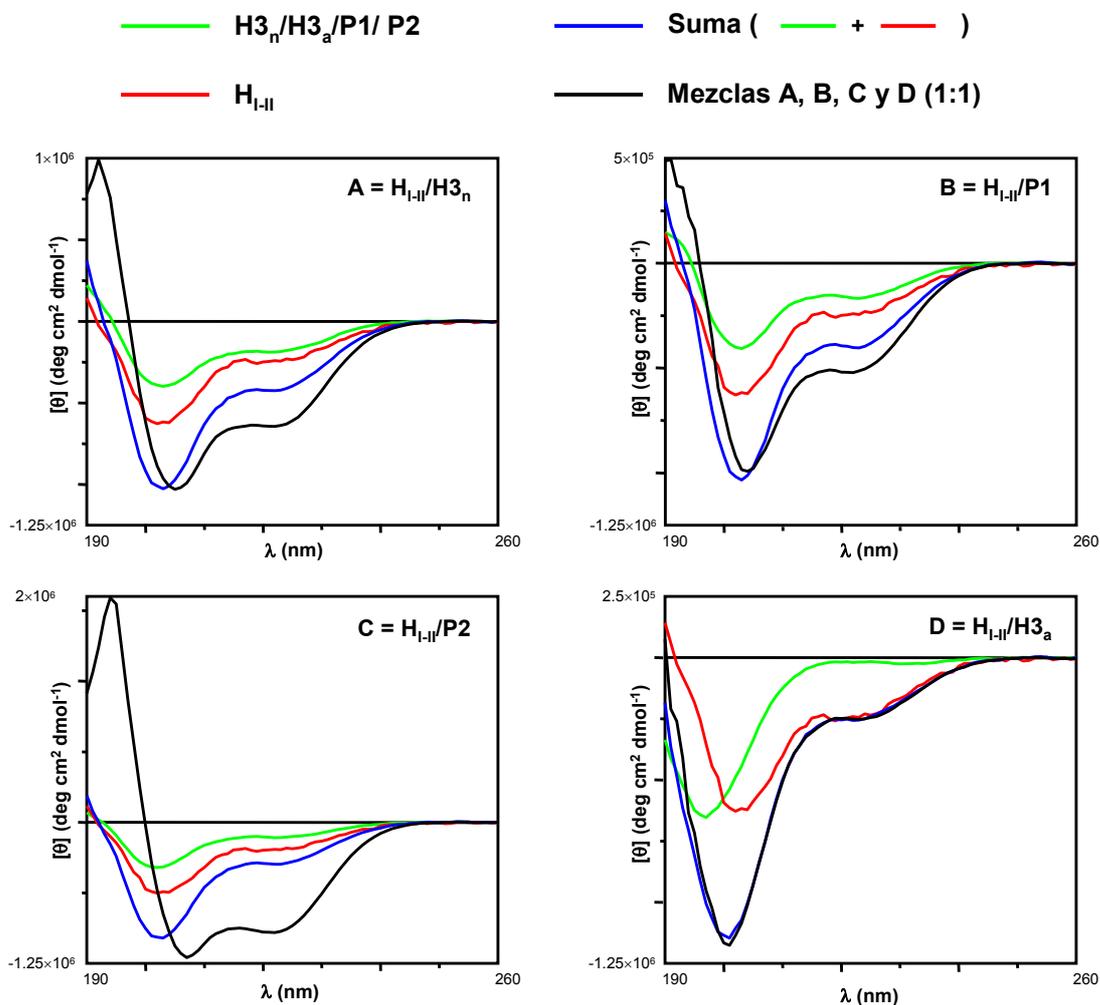
Basándonos en estos resultados, se decidió estudiar la interacción de los péptidos  $\text{H}_{3\text{n}}$ ,  $\text{H}_{3\text{a}}$ , P1 y P2 con las hélices I-II del dominio B por DC, con el fin de demostrar que las secuencias identificadas correspondían realmente a péptidos activos, o lo que es lo mismo, capaces de interactuar con  $\text{H}_{\text{I-II}}$  dando lugar a la formación de pseudo-dominios B no covalentes, con el consiguiente aumento en la helicidad del sistema. Para ello, se procedió en primer lugar a registrar los espectros de DC de los cinco péptidos por separado, empleando disoluciones  $40 \mu\text{M}$  de péptido en solución acuosa de fosfato  $10 \text{ mM}$  ( $\text{pH} = 7.4$ ,  $50 \text{ mM KF}$ , Materiales y Métodos 7). Como puede apreciarse en la Figura 12, tal y como era de prever, tanto la hélice III natural como los péptidos P1 y P2 presentaban espectros de dicroísmo correspondientes a sistemas con un cierto porcentaje de estructura  $\alpha$ -helicoidal, con bandas negativas importantes a  $206$  y  $222 \text{ nm}$  pero de intensidad muy diferente, lo que indicaba que, aunque los compuestos eran propensos a adoptar este tipo de estructura secundaria, el equilibrio conformacional no estaba desplazado hacia el sistema estructurado. Los espectros mostraban que la tendencia a adoptar estructuras helicoidales era  $\text{H}_{3\text{n}} > \text{P1} > \text{P2}$  y que, por el contrario, el péptido  $\text{H}_{3\text{a}}$  se encontraba totalmente desplegado en



**Figura 12** Espectros de dicroísmo circular de los péptidos  $\text{H}_{3\text{n}}$ ,  $\text{H}_{3\text{a}}$ , P1 y P2 registrados empleando disoluciones  $40 \mu\text{M}$  en tampón fosfato ( $10 \text{ mM}$  fosfato,  $50 \text{ mM KF}$ ,  $\text{pH} = 7.4$ ).

disolución, lo que corroboraba los cálculos de predicción de estructura secundaria realizados durante el diseño de la metodología combinatorial (apartado 3 del Capítulo 1). Ninguno de los péptidos presentaba además la capacidad de interactuar consigo mismo para dar lugar a agregados más estructurados, como mostraron los espectros de DC registrados a mayores concentraciones de producto (80 y 150  $\mu\text{M}$ ). El análisis de las hélices I-II reveló que éstas se comportaban de forma análoga a  $\text{H3}_n$ , P1 y P2, tanto en el tipo de estructura adoptado como en la incapacidad de formar complejos con ella misma.

Una vez determinada la estructura de los péptidos por separado, se procedió al estudio de la interacción de  $\text{H3}_n$  y sus análogos con las hélices I-II naturales. Para ello, se prepararon mezclas 1:1 de las cuatro combinaciones posibles ( $\text{H}_{\text{I-II}}/\text{H3}_n$ ,  $\text{H}_{\text{I-II}}/\text{H3}_a$ ,  $\text{H}_{\text{I-II}}/\text{P1}$  y  $\text{H}_{\text{I-II}}/\text{P2}$ ) y se procedió a registrar sus espectros de DC en las mismas condiciones anteriormente comentadas. La comparación de estos espectros con los obtenidos por suma aritmética de los espectros de los

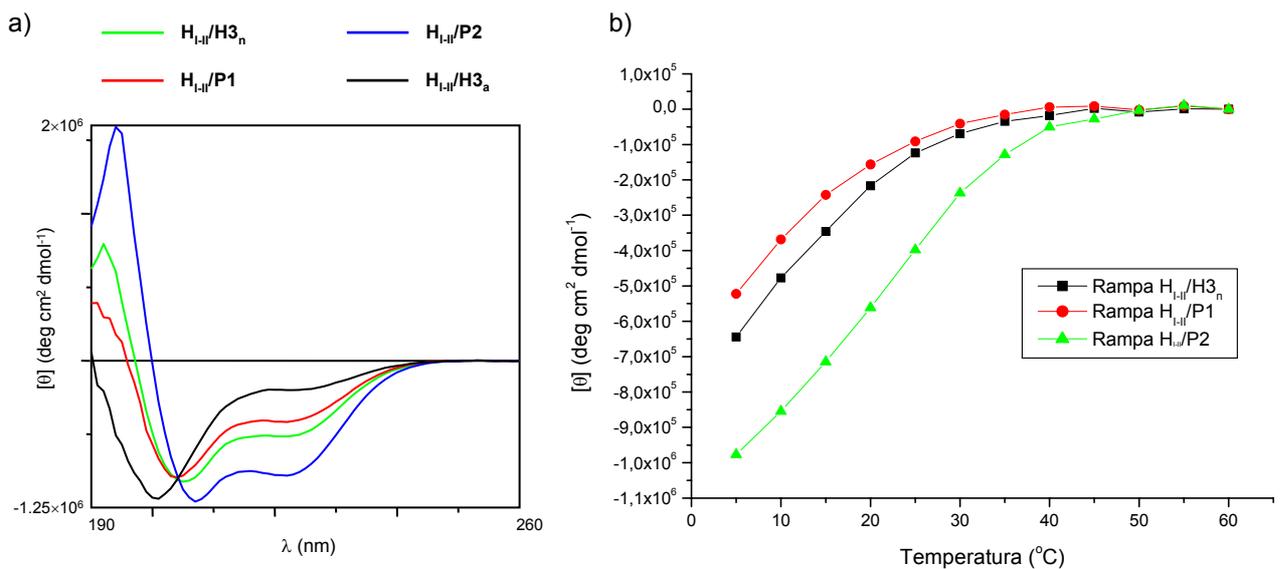


**Figura 13** Estudio por dicroísmo circular de la interacción de los péptidos  $\text{H3}_n$ ,  $\text{H3}_a$ , P1 y P2 con las hélices I-II naturales del dominio B. La figura muestra, para cada una de las cuatro mezclas posibles ( $\text{H}_{\text{I-II}}/\text{H3}_n$ ,  $\text{H}_{\text{I-II}}/\text{H3}_a$ ,  $\text{H}_{\text{I-II}}/\text{P1}$ ,  $\text{H}_{\text{I-II}}/\text{P2}$ ), todos los espectros registrados en la realización del estudio: los de los componentes por separado, la suma aritmética de estos espectros y el de la mezcla de péptidos. Los espectros fueron registrados empleando disoluciones 40  $\mu\text{M}$  de los péptidos en tampón fosfato 10 mM (pH = 7.4, KF 50 mM).

componentes individuales de cada mezcla proporcionaron los resultados que se muestran en la Figura 13.

Como puede apreciarse, mientras que para H3<sub>a</sub> el espectro de la mezcla y el espectro “suma” resultaban análogos, indicando la ausencia de interacción, las mezclas generadas con H3<sub>n</sub>, P1 y P2 mostraban un claro aumento de la cantidad de hélice  $\alpha$  presente en el sistema. Este incremento podía atribuirse a la capacidad de los péptidos H3<sub>n</sub>, P1 y P2 de interaccionar con las hélices I-II naturales para dar lugar a la formación de haces  $\alpha$ -helicoidales no covalentes análogos al dominios B, con el consiguiente aumento del grado de estructuración. Ello demostraba que los péptidos P1 y P2 identificados en el ensayo de actividad eran realmente activos, lo cual validaba de forma definitiva la estrategia combinatoria desarrollada.

La comparación de los espectros obtenidos para las cuatro mezclas, así como el seguimiento de la estabilidad de los complejos formados con la temperatura (Figura 14), mostraban que P2 formaba los complejos no covalentes más estables y estructurados con H<sub>I-II</sub>, con un proceso de desnaturalización que empezaba a presentar algo de cooperatividad, seguido de H3<sub>n</sub> y P1. Estos resultados contradecían, en principio, las conclusiones extraídas del análisis estadístico de las secuencias identificadas en el ensayo de actividad, que indicaban que P1 debía resultar más activo que H3<sub>n</sub>, al haber sido hallado en un mayor número de unidades de resina positivas (apartado 4 del presente capítulo). Sin embargo, teniendo en cuenta que el ensayo de actividad no tan solo media la capacidad de los análogos de la hélice III de formar complejos no covalentes con las hélices I-II, sino también la afinidad de estos complejos por las moléculas de IgG, sobre la cual los análisis por DC realizados no proporcionaban ninguna información, existían dos posibles explicaciones para este fenómeno:



**Figura 14** (a) Comparación de los espectros de DC registrados para las mezclas de péptidos H<sub>I-II</sub>/H3<sub>n</sub>, H<sub>I-II</sub>/H3<sub>a</sub>, H<sub>I-II</sub>/P1 y H<sub>I-II</sub>/P2. (b) Estudio de la evolución de la elipticidad molar a 222 nm con la temperatura de los complejos H<sub>I-II</sub>/H3<sub>n</sub>, H<sub>I-II</sub>/P1 y H<sub>I-II</sub>/P2.

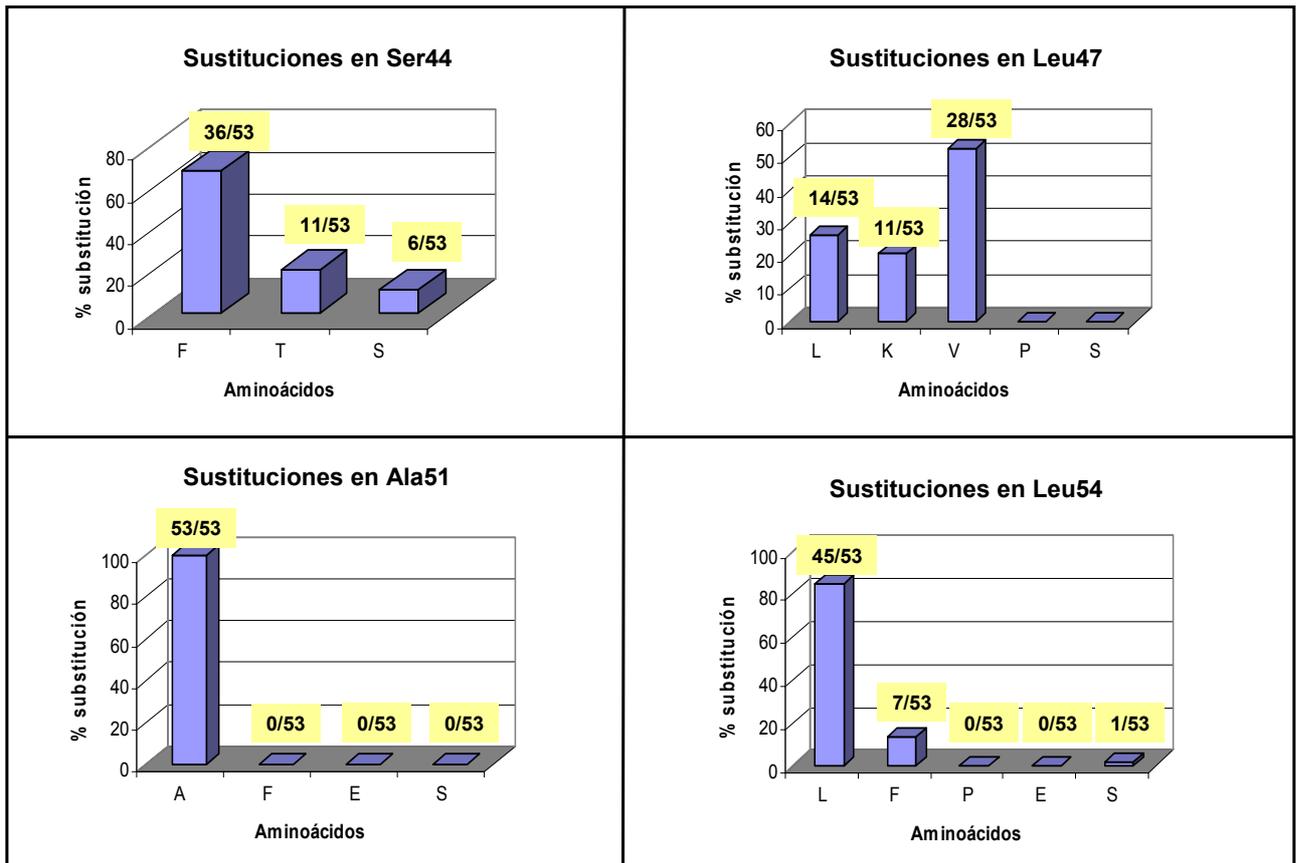
- Que la afinidad de P1 por las hélices I-II naturales fuese mayor que la de H3<sub>n</sub> aunque el grado de estructuración del complejo fuese menor, lo que generaría una mayor cantidad de pseudo-dominios B sobre las unidades de resina de P1 y por tanto una mayor respuesta en el ensayo, a igual o similar actividad de unión a IgG. Esta explicación resultaba factible ya que las constantes de interacción entre las hélices I-II y los diferentes análogos de la hélice III no habían sido medidas.
- Que el pseudo-dominios B no covalente formados por P1 y las hélices I-II, aunque con un menor grado de helicidad y estabilidad frente a temperatura, presentase los residuos implicados en la interacción con inmunoglobulinas mejor dispuestos que dominio natural, por lo que su afinidad por IgG sería mayor y, por tanto, también su respuesta al ensayo.

En ambos casos la actividad de P1 sería mayor que la de H3<sub>n</sub> ya que, como se comentó durante la etapa de diseño (Capítulo 1), se definió péptido activo como aquel capaz de interaccionar con las hélices I-II naturales para dar lugar a la formación de haces helicoidales no covalentes análogos al dominios B, de afinidad por IgG igual o superior a la del domino nativo no covalente, independientemente de que ésta viniese dada por un aumento de la afinidad del análogo de la hélice III por las hélices I-II o de la afinidad del complejo formado por las moléculas de inmunoglobulina.

Los resultados de DC permitían demostrar que los péptidos P1 y P2 eran realmente activos, lo cual verificaba el funcionamiento de la estrategia combinatoria desarrollada y ofrecía fuertes garantías de que el resto de secuencias identificadas en el ensayo de actividad eran también secuencias activas. En el futuro se llevará a cabo una verificación más exhaustiva que incluya la comprobación de la capacidad de estos dominios no covalentes de unir moléculas de IgG y el cálculo de las constantes de afinidad de los análogos de H3<sub>n</sub> por las hélices I-II y de los dominios formados por inmunoglobulinas.

## **7. Análisis de las secuencias positivas identificadas en el ensayo de actividad**

Tras confirmar individualmente la actividad de las mejores secuencias identificadas, se llevó a cabo un análisis de los resultados obtenidos con el objetivo de obtener la máxima información estructural posible sobre el dominio B, la cual sería de gran utilidad en el futuro diseño de nuevas quimiotecas de análogos de H3<sub>n</sub> más activos. Este análisis pretendía, por un lado, conocer la naturaleza de las interacciones existentes entre los aminoácidos de la hélice III natural situados en las posiciones variadas en la quimioteca con las hélices I-II, responsables en parte del buen plegamiento de la proteína. Por otro lado, se buscaba poder establecer hipótesis que explicasen de forma satisfactoria las modificaciones de la secuencia natural que incorporaban los

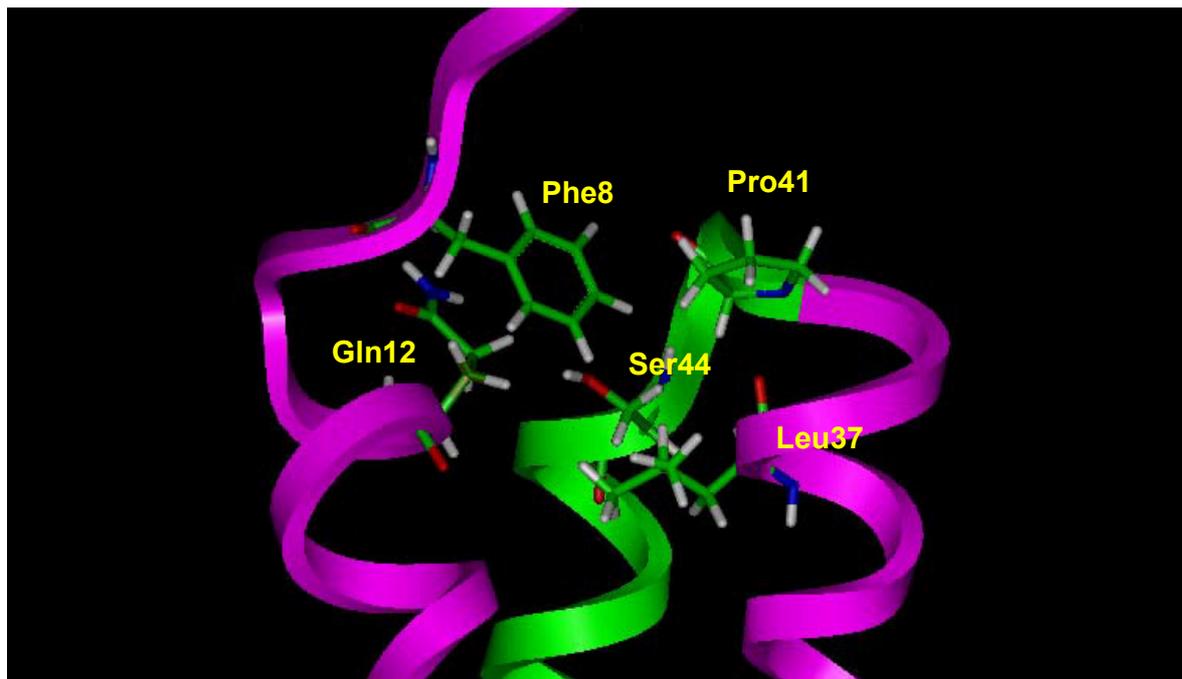


**Figura 15** Representación gráfica de los aminoácidos hallados en las posiciones de la hélice III natural permutadas en la quimioteca L300. Los gráficos muestran los diferentes aminoácidos introducidos en cada una de estas posiciones y el número de veces que estos fueron identificados en las 53 unidades de resina positivas para las que pudo extraerse una secuencia completa, expresado en tanto por ciento. Sobre cada una de las barras se muestra, en forma de fracción, el número real de veces en que fue encontrado cada aminoácido en las 53 secuencias identificadas.

positivos hallados, las cuales daban lugar a péptidos de similar o mayor actividad que la propia hélice III natural.

La Figura 15 muestra una representación gráfica de los aminoácidos introducidos en las cuatro posiciones de la hélice III natural variadas en la quimioteca, frente al número de veces en que fueron encontrados en las 53 secuencias identificadas. Estos resultados nos permitieron llevar a cabo las siguientes observaciones:

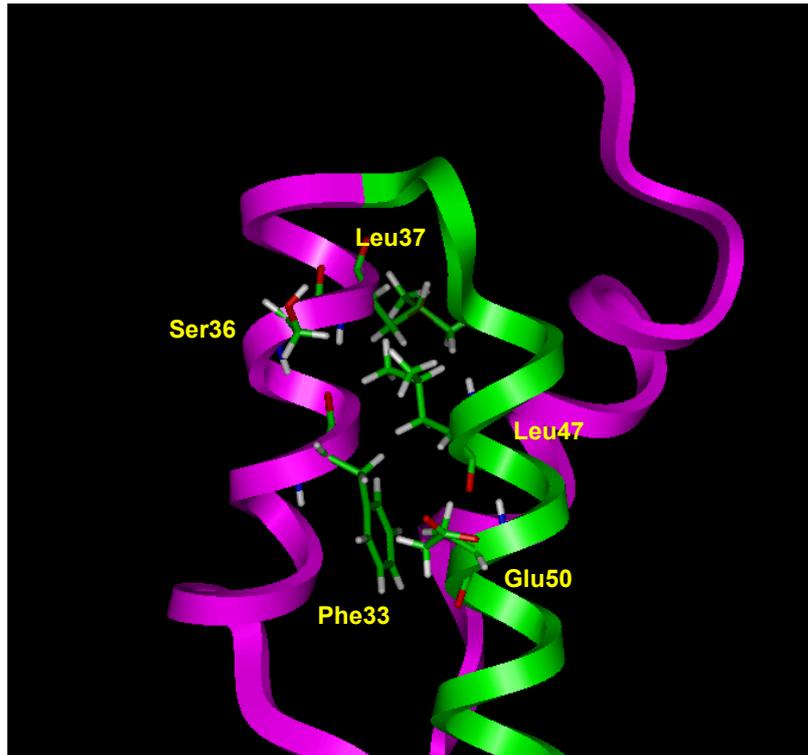
- **Ser44 (X<sub>1</sub>):** como puede apreciarse en la Figura 16, la Ser44 era el primer residuo de H3<sub>n</sub> situado en el interior hidrofóbico de la proteína y se encontraba en una zona relativamente flexible de la estructura, debido principalmente a que la falta de unión covalente entre las hélices I y II les otorgaba un cierto grado de movilidad. La sustitución de esta Ser por Phe en casi el 70 % de las secuencias identificadas indicaba que el grupo hidroxilo de su cadena lateral no parecía hallarse implicado en la formación de ningún enlace de hidrógeno importante. Por el contrario, al favorecer las interacciones hidrofóbicas se aumentaba la actividad de los análogos, la cual iba asociada a un aumento en el grado de estructuración y estabilidad de los complejos formados con



**Figura 16** Situación de la Ser44 en la estructura tridimensional del dominio B. La figura muestra las tres hélices que forman el dominio en forma de cintas (hélices I-II en violeta, hélice III en verde) así como la posición de las cadenas laterales de la Ser44 y de los aminoácidos cercanos a ella. Los átomos se muestran en código de color por átomo (verde = C, blanco = H, rojo = O, azul = N).

H<sub>I-II</sub>, como se extraía de los estudios de DC realizados con P2, que además de Phe en X<sub>1</sub> disponía de Val en lugar de la Leu47 natural (X<sub>2</sub>), un cambio bastante conservador. Esta hipótesis se veía corroborada por la mayor presencia de Thr que de Ser en esta misma posición. Un análisis de los aminoácidos situados en alrededor de la Ser44 (Figura 16) hacían factible pensar que, o bien la interacción del aminoácido en X<sub>1</sub> con la Phe8 (interacción entre anillos aromáticos en el caso de la sustitución por Phe), o bien su inserción entre la Gln12 y la Leu37 podían ser los responsables de este aumento de actividad y estructura.

- **Leu47 (X<sub>2</sub>):** la Leu47 se encontraba parcialmente conservada y parcialmente sustituida por Lys y Val. Como ya se comentó durante el diseño de la quimioteca, el cambio de Leu por Val era un cambio bastante conservador que de hecho ya existía de forma natural en los dominios E y D de la proteína A. La presencia de Lys en esta posición, con la hipotética introducción de una carga positiva en el interior hidrofóbico de la proteína resultaba, por otro lado, bastante sorprendente, más cuando una de las secuencias más activas la incorporaba (P1). La estructura tridimensional del dominio B indicaba que la Leu47 formaba parte del interior hidrofóbico de la proteína, pero en una zona cercana al disolvente (Figura 17). Esto haría posible que la Lys llevase a cabo todas las interacciones hidrofóbicas necesarias para el plegamiento correcto del sistema con la parte alifática de su cadena lateral, dejando la carga positiva del grupo  $\epsilon$ -amino expuesta al disolvente, como ya había sido descrito por Karn y col. para proteínas similares.<sup>6</sup> Este cambio, sin embargo, se había encontrado únicamente en P1, por lo que parecía requerir la presencia de Phe en X<sub>1</sub> para dar lugar a una secuencia activa. Los resultados indicaban,



**Figura 17** Situación de las Leu47 en la estructura tridimensional del dominio B. La figura muestra las tres hélices que forman el dominio en forma de cintas (hélices I-II en violeta, hélice III en verde) así como la posición de las cadenas laterales de la Leu47 y de los aminoácidos cercanos a ella. Los átomos se muestran en código de color por átomo (verde = C, blanco = H, rojo = O, azul = N).

por tanto, que aunque en algunos haces de hélices  $\alpha$  la Leu podía ser sustituida por Lys, en nuestro caso esto no ocurría de forma independiente, sino que iba asociado a las modificaciones de otras posiciones. La sustitución de Lys por Leu, por sí sola, parecía desestabilizar los dominios no covalentes formados y debía estar acompañada de aminoácidos que aportasen una estabilización extra a estos complejos para que pudiesen unir IgG, eso sí, con afinidad aumentada con respecto al dominio natural no covalente. La menor estructuración y estabilidad del complejo  $H_{I-II}/P1$  comparado con el complejo natural ( $H_{I-II}/H3_n$ ) parecía corroborar esta hipótesis.

- **Ala51 (X<sub>3</sub>):** este aminoácido se encontraba conservado en todas las secuencias activas identificadas, lo cual demostraba su importancia para el plegamiento correcto de la proteína, como era de esperar debido su situación en el centro del interior hidrofóbico del dominio. La flexibilidad del interior hidrofóbico en esta zona parecía no ser suficiente como para acomodar residuos hidrofóbicos más voluminosos y la introducción de cargas o residuos polares desestabilizaba la estructura.

- **Leu54 (X<sub>4</sub>):** la Leu de esta posición se encontraba fundamentalmente conservada en los positivos identificados, sustituida por Phe sólo en algunas de las secuencias, pero no de forma significativa. Estos resultados parecían indicar que esta Leu daba lugar fundamentalmente a interacciones hidrofóbicas, debido a la ausencia de residuos polares o cargados en esta posición, pero que la zona de la estructura donde se encontraba disponía de poca libertad de movimiento

(interior hidrofóbico compacto) y no podía acomodar residuos más voluminosos, o bien que la Phe no era capaz de reproducir todas las interacciones en las que la Leu se hallaba implicada.

## 8. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente capítulo nos permitieron extraer las siguientes conclusiones:

- La estrategia combinatorial desarrollada para la modificación de la hélice C-terminal del dominio B se había demostrado satisfactoria y podía, por tanto, ser empleada para la generación de nuevos dominios B más activos y para la modificación de sus propiedades fisicoquímicas. Esta estrategia era susceptible, además, de ser aplicada a la modificación de proteínas similares al dominio B así como a la modificación de las otras hélices  $\alpha$  del dominio.
- A partir de los positivos de la quimioteca L300 identificados habían sido posible la extracción de información estructural importante sobre el dominio B y más concretamente, de hipótesis sobre la naturaleza de algunas de las interacciones del interior hidrofóbico de la proteína, responsables de su plegamiento. Esta información resultaba de gran utilidad para el futuro diseño de nuevas quimiotecas de análogos de H3<sub>n</sub> más activos.

## 9. Bibliografía

- <sup>1</sup> a) Torigoe, H.; Shimada, I.; Saito, A.; Sato, M.; Arata, Y. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8787-8793; b) Gouda, H.; Torigoe, H.; Saito, A.; Sato, M.; Arata, Y.; Shimada, I. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9665-9672
- <sup>2</sup> Dolphin, G. T.; Brive, L.; Johansson, G.; Baltzer, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11297-11298
- <sup>3</sup> a) Zhao, P.-L.; Zambias, R.; Bolognese, J. A.; Boulton, D.; Chapman, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10121-10126; b) Zhao, P.-L.; Nachbar, R. B.; Bolognese, J. A.; Chapman, K. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 350-352
- <sup>4</sup> Greenfield, N. J. *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **1999**, *18*, 236-244
- <sup>5</sup> González, M. J. *Departament de Química Orgànica*; Universitat de Barcelona: Barcelona, **1999**
- <sup>6</sup> a) McLachlan, A. D.; Karn, J. *J. Mol. Biol.* **1983**, *164*, 605-626; b) O'Shea, E. K.; Rutkowski, R.; III, W. F. S.; S.Kim, P. *Science* **1989**, *245*, 646-648



## **Conclusiones**



Los resultados obtenidos del trabajo realizado durante la presente tesis doctoral han conducido en último término al *desarrollo y aplicación de una metodología combinatoria para la modificación de la hélice  $\alpha$  C-terminal del dominio B de la proteína A de Staphylococcus Aureus*, principal objetivo de la misma. El desarrollo de esta metodología implica, sin embargo, que se han completado con éxito toda una serie de etapas intermedias, las principales conclusiones de las cuales se resumen a continuación:

- Se ha desarrollado una metodología sintética para la síntesis de quimiotecas “one-bead-one-compound” aplicada a la preparación de derivados de la hélice III natural del dominio B. Esta metodología, basada en el uso del espaciador bifuncional HMFS, permite la obtención de péptidos desprotegidos unidos reversiblemente a resina PEGA con elevada pureza, los cuales pueden ser evaluados en este estado y liberados fácilmente para su secuenciación mediante el tratamiento de la peptidil-resina con morfolina/DMF (1:4).

- Se ha desarrollado una metodología para la secuenciación de péptidos de 22 aminoácidos derivados de la hélice III natural por MALDI-TOF PSD, empleando el producto contenido en una única unidad de peptidil-HMFS-PEGA. Las condiciones de desanclaje permiten liberar el péptido contenido en una unidad de resina directamente sobre la placa de muestras, lo que da acceso a la obtención de espectros de PSD de elevada calidad y con suficiente información para la total secuenciación de los péptidos.

- Se ha desarrollado un ensayo de actividad para la evaluación de las quimiotecas de análogos de H3<sub>n</sub> con los péptidos unidos a resina. Este ensayo se basa en el tratamiento de la peptidil-resina con una disolución de las hélices I-II naturales del dominio B y el posterior tratamiento de la mezcla con una disolución de inmunoglobulina de conejo marcada con fluoresceína. Las unidades de resina que contienen péptido activo, es decir, un compuesto capaz de interactuar con las hélices I-II dando lugar a la formación de pseudo-dominios B no covalentes, se vuelven fluorescentes por unión de moléculas de IgG-FITC, lo que permite diferenciarlas fácilmente del resto.

- El funcionamiento de la metodología combinatoria desarrollada se ha comprobado con la síntesis y evaluación de una quimioteca de 300 compuestos. Esta quimioteca se ha generado a partir de la secuencia de la hélice III natural, por introducción de varios aminoácidos en cuatro de sus posiciones, situadas todas ellas en el interior hidrofóbico de la estructura de la proteína nativa.

El trabajo con esta quimioteca no tan solo ha corroborado que la metodología funciona correctamente, sino que además ha permitido obtener información estructural importante sobre la naturaleza de algunas de las interacciones responsables del plegamiento correcto del dominio.

## **Materiales y Métodos**



## 1. Reactivos y disolventes

### Resinas y amino ácidos protegidos:

Aminoácidos protegidos para la síntesis de péptidos siguiendo el esquema de protección Boc/Bn (NovaBiochem, Neosystem y Advanced ChemTech)

Aminoácidos protegidos para la síntesis de péptidos siguiendo el esquema de protección Fmoc/tBu (NovaBiochem, Neosystem y Advanced ChemTech)

Resina Amino PEGA (NovaBiochem)

Resina *p*-MBHA (NovaBiochem)

Resina Rink Amida (NovaBiochem)

Resina TentaGel (NovaBiochem)

### Disolventes:

AcOEt	(Panreac)
Acetona	(SDS)
AcCN	(SDS)
AcOH	(Sharlau)
Ácido fórmico	(SDS)
Cloroformo	(SDS)
DCM	(Sharlau)
Dioxano	(Fluka)
DMF	(Sharlau)
Et <sub>2</sub> O	(Sharlau)
EtOH absoluto	(Sharlau)
MeOH	(Sharlau, SDS)
<i>tert</i> -butilmetiléter	(Sharlau)
THF	(Sharlau)
TFA	(SDS)

### Reactivos generales:

Ácido 4-bromometil-3-nitrobenzoico	(Aldrich)
(d <sub>4</sub> )-Ácido acético deuterado	(Aldrich)
Ácido benzoico	(Fluka)
(d <sub>6</sub> )-Ácido benzoico deuterado	(Aldrich)
Ac <sub>2</sub> O	(Fluka)
(d <sub>6</sub> )-Ac <sub>2</sub> O deuterado	(Aldrich)

---

Ácido propiónico	(Aldrich)
Anhídrido succínico	(Aldrich)
Boc <sub>2</sub> O	(Fluka)
CHCA	(Aldrich)
CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O (8:2)	(Aldrich)
CNBr	(Aldrich)
DCC	(Fluka)
DIEA	(Fluka)
DIPCDI	(Fluka)
DMAP	(Fluka)
Et <sub>3</sub> N	(Aldrich)
Fenol	(Aldrich)
Formiato de Etilo	(Aldrich)
Gelatina	(Sigma)
HCl	(Sharlau)
HCl (4N)-dioxano	(Aldrich)
HF anhidro	(Ucar)
HOBt	(Novabiochem)
KCN	(Fluka)
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	(Sigma)
KHSO <sub>4</sub>	(Fluka)
LiOH	(Fluka)
MgSO <sub>4</sub>	(Panreac)
Morfolina	(Aldrich),
NaBH <sub>4</sub>	(Fluka)
NaCl	(Sigma)
80% NaH sobre parafina	(Aldrich)
NaHCO <sub>3</sub>	(Sigma)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Sigma)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(Sigma)
Ninhidrina	(Fluka)
p-cresol	(Aldrich)
Piperidina	(Aldrich)
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	(Panreac)
Piridina	(Sharlau)
PyBOP	(NovaNiochem)
TIPS	(Aldrich)
TBAF · 3H <sub>2</sub> O	(Fluka)
TBTU	(NovaBiochem)
THF	(Sharlau)

Tween 20

(Sigma)

## 2. Instrumentación general

- Liofilizador **Vitris** modelo *Freezmobile*
- Microscopio invertido **Nikon** modelo *Eclipse TS100F*, con soporte universal **Nikon C-HU Universal Holder** y provisto de cámara digital **Nikon Coolpix 5000**
  - Balanzas **Sartorius** modelos 2004 MP6 (0.01mg) y MC1 RC210P (0.01 mg) y **Mettler Toledo** modelos AB-S (0.1mg) y PB-S (0.01mg)
  - pHmetros **Crison** modelos *micropH2002* y *GLP 21* con electrodo **Crison 52-01**
  - Centrifugas **Eppendorf** modelo *5415 D* y *5415 R* y **Beckman Coulter** modelo *Allegra 21R*
  - Rotavapores **Heidolph** modelo *Laborota 4003* conectado a bomba de vacío de membrana **Vacuubrand** modelo *MZ 2C* o bomba de aceite **Boc Edwards**
  - Sistemas de RMN **Varian** modelo *Gemini 200*
  - Espectrometría de masas de rutina: i) ESI y FAB en sistema de **FISONS Instruments** modelo *VG-QUATPRO*; ii) MALDI-TOF en sistema de **PE Biosystems** modelo *Voyager-DE-RP*
    - Sonicador Branson Sonifier 250
    - Analizador de aminoácidos **Beckman System 6300**
    - Microscopio de fluorescencia **Leica** modelo *DMRB* provisto de una lámpara de vapor de Hg para emisión y una lámpara halogenada para transmisión. Filtros de excitación en UV (340-380 nm), Azul (450-490 nm) y verde (5815-560 nm). Cámara *Cooled CCD Micromax*. Oculares de  $\times 10$  y objetivos de  $\times 10$  y  $\times 20$ .
    - Microscopio confocal **Leica** modelo *TCS SPII* provisto de cuatro láseres independientes: i) Ar para excitación a 458, 476, 488 y 514 nm); ii) Green HeNe para excitación a 543 nm; iii) Red HeNe para excitación a 633 nm); iv) Ar-UV para excitación a 351 y 364 nm).

## 3. Métodos analíticos

### 3.1 Prueba de ninhidrina cualitativa<sup>1</sup>

Esta prueba permite la detección de aminas primarias libres, por lo que se empleó para controlar cualitativamente si los acoplamientos de aminoácidos sobre una cadena peptídica en crecimiento habían sido completos.

Para la realización de cada prueba se introdujeron en un tubo de vidrio entre 0.5 y 2 mg de peptidil-resina, lavada con DCM. A la muestra se le añadieron seis gotas del *reactivo A* y dos del *reactivo B* y se calentó la mezcla a 110 °C durante tres minutos. Tras su enfriamiento, el color de la disolución permitía conocer si el acoplamiento había sido completo (color azul/azul verdoso) o no (color amarillo), con un límite de detección del orden del 0.5 % de aminas libres en resina. En paralelo a cada ensayo se realizó una prueba en blanco (sin peptidil-resina) para detectar falsos resultados positivos.

La preparación de los reactivos **A** y **B** se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

- **Reactivo A:** se prepara por un lado una disolución de fenol (40 g) en EtOH absoluto (10 mL) en caliente. Por otro lado se toman 2 ml de una disolución de KCN (65 mg) en H<sub>2</sub>O (100 mL) y se añaden sobre 100 mL de piridina acabada de destilar. Se agitan por separado las dos disoluciones con 4 g de resina Amberlite MB-3 cada una, durante 45 min. Finalmente se filtran las disoluciones y se mezclan los filtrados.
- **Reactivo B:** disolución de ninhidrina (2.5 g) en 50 mL de EtOH absoluto. Es necesario mantenerla protegida de la luz.

### 3.2 Hidrólisis y análisis de aminoácidos

Este método analítico se empleó con una doble función: i) conocer la composición aminoacídica de los péptidos sintetizados, unidos a resina o en disolución; ii) cuantificar la cantidad de péptido obtenida tras una síntesis, en peso si se trataba de péptido libre o en funcionalización (milimoles por gramo de resina) en caso de que todavía se encontrara unido al polímero.

La metodología se basa en la hidrólisis completa del péptido para liberar todos sus aminoácidos y el posterior análisis de la mezcla por cromatografía de intercambio iónico para determinar que aminoácidos la componen y en que proporción. El procedimiento estándar de trabajo se detalla a continuación:

- Péptidos unidos a resina: se pesan entre 2 y 8 mg de peptidil-resina en un tubo de hidrólisis (tubo de vidrio de paredes gruesas) y se añaden 300 µL de una mezcla de HCl/ácido propiónico 1:1 (v/v) con un 0.1 % de fenol en caso de péptidos con tirosina. El tubo se cierra a la llama y se mantiene a 110 °C durante 48 h ó a 150 °C durante 2 h. Después de la hidrólisis se abre el tubo y se evapora la mezcla a sequedad. El producto obtenido se disuelve en la cantidad adecuada de tampón citrato 0.06 M (pH=2) de forma que la concentración de cada aminoácido

quede comprendida entre 2-20 nmol/50  $\mu$ L.\* Antes de inyectar la muestra en el analizador se filtra a través de filtros de nylon de 0.45  $\mu$ m de poro. En caso de *péptidos desprotegidos unidos a resina PEGA* la hidrólisis se realiza utilizando una mezcla de HCl/H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v) y a 110°C durante 72 h.

- *Péptidos libres*: se disuelve el péptido en un volumen conocido de H<sub>2</sub>O o similar y se añade a un tubo de hidrólisis la cantidad necesaria para realizar el análisis. Para la hidrólisis se emplean 300  $\mu$ L de HCl/H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v) con un 0.1 % de fenol en caso que el péptido contenga tirosina. Se cierra el tubo a la llama y se mantiene a 110 °C durante 24 h o 150 °C durante 1h. A partir de aquí se procede como en el caso anterior.†

### 3.3 Cromatografía

#### 3.3.1 Cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina se realizó sobre cromatofolios de gel de sílice 60 de Merck, con 0.2 mm de espesor e indicador de fluorescencia. Las condiciones de elución se describen para cada caso en concreto (capítulo de Procedimientos Experimentales). El revelado se llevó a cabo utilizando el indicador fluorescente o mediante una prueba de ninhidrina. En este caso la fase estacionaria fue rociada con el *reactivo C* y la capa fina calentada a 110 °C durante 3 min para detectar la presencia de aminas libres, o a 160 °C para detectar aminas protegidas con Boc (el protector salta a elevadas temperaturas). El *reactivo C* se preparó disolviendo 1 g de ninhidrina en 10 mL de  $\gamma$ -colidina, 33 mL de AcOH y 290 mL de EtOH absoluto.

#### 3.3.2 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) analítica

La cromatografía líquida de alta eficacia a escala analítica se llevó a cabo en los siguientes sistemas:

---

\* En caso de desear realizar un análisis cuantitativo del péptido unido a la resina, el peso de resina seca utilizado debe ser conocido con exactitud (mínimo  $\pm$  0.05mg), así como los volúmenes de tampón utilizados para la disolución de la muestra. Es conveniente utilizar un patrón (volumen conocido de una disolución de concentración conocida de un aminoácido no presente en el péptido analizado) para la corrección de los resultados obtenido de posibles errores durante la manipulación de la muestra o su análisis.

† En caso de realizar un análisis cuantitativo, el volumen inicial en que se ha disuelto el péptido, el volumen de esta disolución utilizado para el análisis así como los volúmenes de tampón citrato utilizados para preparar la muestra a analizar deben ser conocidos con exactitud. Es conveniente, como en el caso anterior, el uso de un patrón.

- Sistema *Shimadzu* constituido por dos bombas modelo *LC-6A*, autoinyector modelo *SIL-6B/9A*, detector de longitud de onda variable modelo *SPD-6A*, controlador del sistema modelo *SCL-6B* i registrador/integrador modelo *Chromatopac C-R6A*.
- Sistema *Waters* constituido por un controlador modelo *600E* con bomba de doble inyección, autoinyector modelo *717*, detector de doble longitud de onda variable modelo *490E* y registrador/integrador *Shimadzu* modelo *C-R5A*.
- HPLC *Waters* modelo *Alliance 2695* con detector de diodos modelo *966* y software de control *Millenium* versión 3.5.
- Sistema *Waters* constituido por una bomba binaria modelo *1525*, autoinyector modelo *Autosampler 717 plus*, detector de doble longitud de onda variable *2487*, y software de control *Breeze* versión 3.2.

Las columnas utilizadas fueron: i) Nucleosil C18 (0.4×25 cm) con relleno de tamaño de partícula de 5-10 µm; ii) Symmetry C18 (4.6×150 mm) con relleno de tamaño de partícula de 5 µm. Las muestras se eluyeron a un flujo de 1 mL/min empleando gradientes lineales de los eluyentes **A** y **B** (**A**: H<sub>2</sub>O con un 0.045 % de TFA; **B**: MeCN con un 0.036 % de TFA). La detección se realizó por UV a 220 nm.

### 3.3.3 HPLC-MS analítico

Los análisis de muestras por HPLC-MS fueron realizados en los siguientes sistemas:

- HPLC *Waters* modelo *Alliance 2690*, detector de longitud de onda variable *Kontron Instruments* modelo *535*, registrador/integrador *Merk/Hitachi* modelo *D-2520 GPC* y sistema de ESI-MS *Fisons Instruments* modelo *VG-platform*. La columna empleada fue una columna de fase reversa *Nucleosil C18* (0.4×25 cm) con relleno de tamaño de partícula de 5-10 µm. Las condiciones de elución (eluyentes, flujo y detección por UV/Vis) fueron las mismas que la empleadas en HPLC analítico.
- HPLC *Waters* modelo *Alliance 2796*, detector de UV/Vis de doble longitud de onda variable modelo *2487*, sistema de ESI-MS *Micromass* modelo *ZQ* y software de control *Masslynx* versión 4.0. La columna utilizada fue una *Symmetry300 C18* (3.9×150 mm) con relleno de tamaño de partícula de 5 µm. Las muestras se eluyeron a un flujo de 1 mL/min empleando gradientes lineales de los eluyentes **A** y **B** (**A**: H<sub>2</sub>O con un 0.1 % de ácido fórmico; **B**: MeCN con un 0.07 % de ácido fórmico). La detección por UV se realizó a 220 nm.

En ambos sistemas las condiciones concretas para la detección por ESI-MS fueron optimizadas para cada muestra (fundamentalmente voltaje de cono y rango de masas de detección).

### 3.3.4 HPLC semipreparativo

Esta técnica se utilizó para la purificación de los péptidos sintetizados. Las purificaciones se llevaron a cabo en un sistema *Waters* constituido por un autoinyector modelo *Simple Manager 2700*, un detector UV/Vis de doble longitud de onda variable modelo *2487*, un HPLC modelo *Controller 600*, un colector de fracciones automático modelo *Fraction Collector II* y software de control *Masslynx* versión 3.5. La columna utilizada fue una *Symmetry C18* (30×100 mm) con relleno de tamaño de partícula de 5 µm. Las muestras se eluyeron a un flujo de 10 mL/min empleando gradientes lineales de los eluyentes **A** y **B** (**A**: H<sub>2</sub>O con un 0.1 % de TFA; **B**: MeCN con un 0.1 % de TFA). La detección por UV se realizó a 220 nm.

## 4. Síntesis manual de péptidos en fase sólida

La síntesis manual de péptidos en fase sólida se realizó en jeringuilla de polipropileno provistas de un filtro de polietileno poroso, de volumen adecuado en función de la cantidad de resina utilizada. Los disolventes y mezclas de reacción añadidas se eliminaron por filtración aplicando vacío. Para la agitación se emplearon varillas de teflón, excepto para las síntesis sobre resina PEGA, donde no se llevó a cabo agitación alguna durante los lavados de la resina y se utilizó un agitador orbital durante los acoplamientos.

El proceso estándar de síntesis de péptidos consta de los siguientes pasos: i) acondicionamiento de la resina; ii) reducción de la funcionalización en caso necesario; iii) acoplamiento del espaciador bifuncional adecuado, también en aquellos casos en que sea necesario; iv) elongación de la cadena; v) desprotección de las cadenas laterales y escisión del enlace péptido resina, que pueden realizarse en una misma etapa o por separado. Estos procesos se comentan con detalle a continuación.

### 4.1 Síntesis mediante la estrategia Boc/Bn

#### 4.1.1 Acondicionamiento de la resina

Previamente al inicio de una síntesis, las resinas se sometieron a un proceso de acondicionamiento que consta de los pasos que se detallan en la Tabla 1. Este proceso tiene como principal función solvatar adecuadamente la resina para que las reacciones sobre ésta y la transferencia de reactivos sea eficiente.

Etapa	Reactivo*	Ciclos
1	DCM	1×10 min
2	DCM	5×1 min
3	TFA/DCM (4:6)	1×1 min
4	TFA/DCM (4:6)	1×20 min
5	DCM	5×1 min
6	DIEA/DCM (5:95)	4×2 min
7	DCM	5×1 min
8	DMF	5×1 min

\*Proporciones volumétricas entre reactivos y disolventes

**Tabla 1** Ciclo de acondicionamiento de resinas previo al inicio de una síntesis mediante el esquema de protección Boc/Bn.

#### 4.1.2 Incorporación de aminoácidos

El procedimiento para la incorporación de aminoácidos utilizado (agente de activación, tiempo de reacción, etc.) fue variado convenientemente en función del péptido sintetizado y se especifica para cada caso concreto en el capítulo de Procedimientos Experimentales. La incorporación de los aminoácidos se realizó normalmente tras un periodo de preactivación de 1-3 min, con los reactivos disueltos en la mínima cantidad de DMF necesaria para cubrir la resina. El grupo protector Boc se eliminó tras la incorporación de cada aminoácido siguiendo los pasos 2 a 7 de la Tabla 1, salvo excepciones.

#### 4.1.3 Reducción de funcionalización

La síntesis de péptidos empleando resina PEGA comenzó con la reducción de su funcionalización inicial (0.4 mmol/g) a la mitad. Para ello se realizó un primer doble acoplamiento

de Boc-Gly-OH (5 eq.) con la intención de ocupar todos los sitios reactivos de la resina, empleando DIPCDI y HOBt como agentes de activación y una hora de reacción cada vez. Tras obtener una prueba de ninhidrina negativa, se procedió a la incorporación de un segundo aminoácido (Boc-Phe-OH) utilizando defectos de 0.8 y 0.6 equivalentes respectivamente, con los mismos agentes de activación y el mismo tiempo de reacción. En este caso, primero se añadieron sobre la resina el aminoácido y el HOBt disueltos en DMF y posteriormente, tras la homogenización de la mezcla, la DIPCDI. Con este procedimiento se pretendía conseguir una reducción de funcionalización uniforme en toda la resina. La proporción de sitios activos conservados se calculó por la relación de concentraciones Phe/Gly determinadas por análisis de aminoácidos. Una vez conseguida una relación del 50-60%, el resto de las posiciones activas se eliminaron por acetilación con una mezcla de anhídrido acético (25 eq.) y piridina (25 eq.) en DMF (20 min de reacción).

#### **4.1.4 Incorporación de espaciadores bifuncionales**

La incorporación de los espaciadores bifuncionales HMFS y Nbb se realizó utilizando un doble acoplamiento de 1.5 y 0.5 equivalentes, con DIPCDI y HOBt como agentes de activación. El tiempo de reacción fue de 12-16 h y la total incorporación del espaciador se comprobó mediante la prueba de ninhidrina.

#### **4.1.5 Desprotección de las cadenas laterales y liberación del péptido**

Las desprotecciones de las cadenas laterales se realizaron mediante el tratamiento de las peptidil-resinas con *p*-cresol/HF anhidro (5:95). Para ello se empleó un sistema especial de teflón y Kel-F de la casa Toho-Kasei Ltd. (Japón). Este tratamiento implicaba también la escisión del enlace péptido-resina para aquellos péptidos sintetizados sobre resina *p*-MBHA, mientras que los péptidos sintetizados sobre resina PEGA empleando los espaciadores bifuncionales Nbb i HMFS permanecían anclados a resina. Es por ello que la metodología general de desprotección se adaptó a cada situación.

En el caso de los péptidos *sintetizados sobre p-MBHA*, la resina se introdujo seca en los reactores del sistema. Tras la adición de la cantidad adecuada de *p*-cresol, el reactor se acopló al sistema de desprotección, se enfrió empleando N<sub>2</sub> líquido y se destiló HF anhidro en su interior (5 mL por cada 300 mg de resina aproximadamente). La reacción se dejó proceder una hora a 0 °C con agitación constante, tras la cual el HF se evaporó al vacío. La resina se traspasó a un reactor de síntesis empleando éter dietílico frío, el cual sirvió además para la precipitación del péptido y la eliminación del medio del *p*-cresol y subproductos de desprotección. La recuperación del péptido

se realizó lavando la mezcla péptido/resina con H<sub>2</sub>O (10 % de ac. acético). Los lavados fueron recogidos en tubos de criogenización de 50 mL y el disolvente eliminado por liofilización para la obtención del péptido sólido.

Para la desprotección de las cadenas laterales de los péptidos *sintetizados sobre HMFS-PEGA o Nbb-PEGA*, la resina se introdujo en los reactores solvatada en DCM. A partir de aquí se procedió de forma análoga a la explicada anteriormente, empleando un tiempo de reacción de 90 min y eliminando por completo la agitación magnética. Tras la evaporación del HF, la peptidil-resina se recuperó suspendiéndola en DMF y trasvasándola a un reactor de síntesis utilizando una micropipeta. Posteriormente se lavó con DMF (5×1 min), DCM (5×1 min), 1 % TFA en DCM (3×1 min), DCM (3×1 min) y se almacenó a -20 °C.

#### 4.1.6 Escisión de los enlaces péptido-Nbb i péptido-HMFS

##### 4.1.6.1 Péptido-Nbb

La escisión del enlace péptido desprotegido-Nbb se llevó a cabo empleando diferentes mezclas de reactivos, según se deseara recuperar el péptido con el extremo C-terminal en forma de ácido o de metilamida.

Para la obtención del péptido en su forma C-terminal de *ácido carboxílico*, se empleó TBAF · 3H<sub>2</sub>O (8 eq.) en DMF o LiOH (15 eq.) en DMF/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v). En el primero de los casos, la peptidil-resina se lavó con DCM (5×1min), DMF (5×1 min) y se trató posteriormente con el reactivo de desanclaje (45 min). El crudo se separó de la resina por filtración, se transfirió a un matraz de volumen adecuado y el disolvente fue eliminado por evaporación al vacío. En el segundo caso, la peptidil-resina se lavó con DCM (5×1min), DMF (5×1 min), DMF/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v; 5×1 min) y trató posteriormente con la disolución de LiOH (10 min). A partir de aquí se procedió de forma análoga que en el caso anterior.

La obtención del péptido en forma C-terminal de *metilamida* se realizó tratando la peptidil-resina con una disolución seca de CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> en DCM, previo lavado de la resina con DCM. Esta disolución se preparó por extracción de una disolución al 80 % de CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> en agua (el volumen necesario para disponer de un exceso de 200-300 equivalentes sobre la cantidad de péptido en resina) con la mínima cantidad posible de DCM, secando la mezcla después con MgSO<sub>4</sub>. Pasadas 5 h el crudo se separó de la resina por filtración, se transfirió a un matraz de volumen adecuado y el disolvente fue evaporado al vacío.

#### 4.1.6.2 Péptido-HMFS

El desanclaje del péptido unido a HMFS se realizó empleando una disolución de morfolina/DMF (20:80 v/v) sobre la peptidil-resina, lavada previamente con DCM (5×1min) y DMF (5×1 min). La reacción se dejó proceder durante una hora, tras la cual se separó el crudo por filtración, se transfirió a un matraz de volumen adecuado y se eliminaron los reactivos al vacío. Resultados similares se obtuvieron empleando una mezcla de piperidina/DMF (5:95 v/v) durante 20 minutos.

### 4.2 Síntesis mediante la estrategia Fmoc/tBu

#### 4.2.1 Acondicionamiento de la resina

De la misma forma que en la síntesis de péptido por la estrategia Boc/Bn, antes de empezar la síntesis las resinas se sometieron a un proceso de acondicionamiento que consta de los pasos que se muestran en la Tabla 2.

Etapa	Reactivo*	Ciclos
1	DCM	1×10 min
2	DCM	5×1 min
3	DMF	5×1 min
4	Piperidina/DMF (2:8)	2×10 min
5	DMF	5×1 min
*Proporciones volumétricas entre reactivos y disolventes		

**Tabla 2** Ciclo de acondicionamiento de resinas previo al inicio de una síntesis mediante el esquema de protección Fmoc/tBu.

#### 4.2.2 Incorporación de aminoácidos

La incorporación de los aminoácidos al péptido en crecimiento se realizó empleando excesos de 5 equivalentes, DIPCDI y HOBt como agentes de activación y tiempo de reacción de 1 hora. Al igual que en la incorporación de aminoácidos mediante la estrategia Boc/Bn (Materiales y

Métodos 4.1.2) los aminoácidos se añadieron tras un periodo de preactivación de 1-3 minutos. Un ciclo estándar de síntesis constaba de los pasos que se detallan en la Tabla 3.

Etapa	Reactivo*	Ciclos
1	Piperidina/DMF (2:8)	2×10 min
2	DMF	5×1 min
3	Aminoácido preactivado	1×1 h
4	DMF	5×1 min
*Proporciones volumétricas entre reactivos y disolventes		

**Tabla 3** Ciclo de síntesis mediante el esquema de protección Fmoc/tBu.

### 4.2.3 Generación de la “escalera” de secuencias parciales marcadas isotópicamente

La “escalera” de secuencias parciales marcadas isotópicamente<sup>2</sup> de los péptidos sintetizados por la estrategia Fmoc/tBu se generó por acetilación de un 10 % de las cadenas en crecimiento tras la incorporación de cada aminoácido. Se utilizaron dos métodos de acetilación: i) en el primer método la acetilación se realizó con una mezcla 1:1 de  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}/(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  (0.1 eq.) y  $\text{Et}_3\text{N}$  como base (0.1 eq.) que se añadió conjuntamente sobre la resina tras la desprotección del grupo  $\alpha$ -amino y los correspondientes lavados, dejando la reacción proceder durante 1h; ii) en el segundo método se añadió una mezcla 1:1 de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CD}_3\text{COOD}$  (0.1 eq.) sobre la resina, previa desprotección del grupo  $\alpha$ -amino, y tras la homogenización de la mezcla se añadió un exceso de 3 equivalentes de PyBOP y DIEA, con un tiempo de reacción de 1h. Acabado el proceso de acetilación, por cualquiera de los métodos, se llevó a cabo la incorporación del siguiente aminoácido.

### 4.2.4 Desprotección de las cadenas laterales y liberación del péptido

La desprotección de las cadenas laterales de los péptidos sintetizados se realizó tratando las peptidil-resinas con una mezcla TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /TIPS/fenol (80:10:5:5 v/v/v/p), 1mL por cada 100 mg de resina. Las resinas se trataron durante una hora con esta mezcla, excepto para aquellos péptidos que contenían Arg(Pmc), para los cuales el tratamiento se alargó a 2 h. Este tratamiento implicaba la escisión del enlace péptido-resina para los péptidos sintetizados sobre resina Rink amida, mientras que los sintetizados empleando metionina como espaciador bifuncional permanecían unidos a resina, por lo que la metodología concreta empleada en cada caso fue diferente.

En los péptidos sintetizados sobre resina Rink amida, tras el tratamiento con TFA la mezcla péptido/resina se lavó primero tres veces con TBME frío, el cual se eliminó por decantación. La recuperación del péptido se realizó empleando H<sub>2</sub>O (10 % ac. acético) para la disolución del péptido y separando la disolución de la resina por filtración. La disolución se transfirió a tubos de criogenización de 50 mL y el disolvente fue eliminado por liofilización.

En los péptidos sintetizados sobre resina TentaGel, empleando metionina como espaciador bifuncional, la mezcla de desprotección se eliminó por filtración. La peptidil-resina desprotegida se lavó con DCM (5×1 min), DMF (5×1min), DCM (5×1min), MeOH (5×1min), se secó al vacío y se almacenó a -20 °C.

#### **4.2.5 Escisión del enlace metionina-resina**

La escisión del enlace metionina-resina se realizó con una mezcla de 20 mg/mL de CNBr en TFA/H<sub>2</sub>O (1:1). La reacción se dejó proceder durante 24 h a temperatura ambiente protegida de la luz. La mezcla de reacción se eliminó por evaporación al vacío, el péptido obtenido se disolvió en MeCN y se separó de la resina por filtración.

## **5. Síntesis automática de péptidos**

### **5.1 Síntesis mediante la estrategia Boc/Bn**

La síntesis automática de péptidos mediante la estrategia Boc/Bn se realizó en un sintetizador Beckman modelo 403A (Applied Biosystem) siguiendo el programa SSRC (Small Scale Rapid Cycles).

La escala de trabajo fue de 0.1 mmol y los aminoácidos se incorporaron empleando excesos de 10 equivalentes. Los aminoácidos fueron activados como anhídridos simétricos empleando DCC, excepto para glutamina y asparagina, que se incorporaron como ésteres activos, utilizando DCC y HOBT como agentes de activación. La desprotección de las cadenas laterales y la escisión del enlace péptido-resina se llevaron a cabo de la forma descrita en Materiales y Métodos 4.1.5 y 4.1.6.

## 5.2 Síntesis mediante la estrategia Fmoc/tBu

La síntesis automática de péptidos mediante la estrategia Fmoc/tBu se realizó en un sintetizador 496  $\Omega$  MOS de Advanced ChemTech. La escala de trabajo fue de 0.1 mmol y los aminoácidos se incorporan empleando excesos de 4 equivalentes y TBTU y DIEA como agentes de activación. La desprotección de las cadenas laterales y la escisión del enlace péptido-resina se llevaron a cabo de la forma descrita en Materiales y Métodos 4.2.4.

## 6. Síntesis de quimiotecas

La síntesis de las quimiotecas empleadas en este trabajo se realizó siguiendo la metodología estándar de *mezcla y separación* (split and mix).<sup>3</sup> Se sintetizaron quimiotecas siguiendo tanto esquemas de protección Boc/Bn como Fmoc/tBu, siempre de forma manual.

### 6.1 Cálculos previos

Antes del inicio de la síntesis de una quimioteca, se realizaron los cálculos estadísticos necesarios para determinar la cantidad de resina a utilizar.<sup>4</sup>

Como es sabido, en la quimiotecas del tipo “*one-bead-one-compound*” cada unidad de resina contiene múltiples copias de un único candidato, por lo que es necesario realizar la síntesis con, como mínimo, la misma cantidad de unidades de resina que compuestos a sintetizar. Estos cálculos proporcionan el número idóneo de unidades de resina a utilizar en la síntesis de una quimioteca para que ésta esté compuesta con un 99 % de confianza de todos los compuestos teóricos, repetidos un número de veces prefijado.

Para la realización de los cálculos se partió de los siguientes parámetros:

$$\begin{aligned}
 & m \text{ (n}^\circ \text{ de posiciones permutadas)} \\
 & r_1 \dots r_n \text{ (n}^\circ \text{ de aminoácidos a introducir en cada posición permutada)} \\
 & k \text{ (mínimo número de unidades de resina por compuesto)} \\
 & c \text{ (% confianza)}
 \end{aligned}$$

El número idóneo de unidades de resina se calculó de la siguiente empleando las ecuaciones (1) a (6):

$$(1) \boxed{R = (r_1 \times r_2 \times \dots \times r_n)} \text{ (n}^\circ \text{ de compuestos total a sintetizar)}$$

$$(2) \boxed{v = R - \sum (r_1 + r_2 + \dots + r_n) + (m-1)}$$

$$(3) \boxed{p_c = \frac{(100 - c/100)}{R}}$$

$$(4) \boxed{t = \sqrt{-2 \times \ln p}}$$

$$(5) \boxed{Z_c = -1 \times \left[ t - \left( \frac{2,515517 + 0,802853 \times t + 0,010328 \times t^2}{1 + 1,432788 \times t + 0,189269 \times t^2 + 0,001308 \times t^3} \right) \right]}$$

$$(6) \boxed{n = \frac{1}{4} \times \left[ -Z \times \sqrt{v} + \sqrt{(v \times Z^2 + 4 \times R \times (k-1))} \right]^2}$$

Siendo  $n$  el número de unidades de resina del que debemos partir. Dado que el número de unidades de resina por gramo es un dato conocido gracias a las casas comerciales, de aquí se extrajo la peso de resina a utilizar para la síntesis de una quimioteca dada. A la cantidad de resina calculada se añadió un 10 % extra, para tener en cuenta la cantidad de resina perdida durante las pruebas de ninhidrina y las diferentes manipulaciones de la muestra.

## 6.2 Caracterización

La caracterización de las quimiotecas del tipo “one-bead-one-compound” es un trabajo difícil por dos factores: i) la quimioteca está compuesta por una mezcla grande de compuestos, lo que hace imposible que todos ellos sean caracterizados individualmente; ii) estos compuestos se encuentran unidos a fase sólida. Para controlar la calidad de la síntesis de las quimiotecas se emplearon los siguientes métodos:

- Análisis de aminoácidos de una fracción representativa de resina.<sup>3c</sup> La metodología de síntesis presupone que todos los compuestos se encuentran en la misma proporción dentro de la quimioteca, y que, por tanto, la composición aminoacídica de la quimioteca es constante en las posiciones permutadas. Es decir, en una biblioteca en la que una de las posiciones permutadas estuviese compuesta por tres aminoácidos (A, B y C), cogiendo una cantidad representativa de peptidil-resina (aunque no todos los compuestos estuviesen presentes) 1/3 de ellos presentaría A en esta posición, 1/3 B y 1/3 C, en condiciones ideales. Una variación pronunciada en esta relación

indicaría problemas durante el acoplamiento de alguno de los aminoácidos, y por tanto una quimioteca de baja calidad. Por esta razón la comparación de la composición teórica de la quimioteca con la real se empleó como criterio de la bondad de la síntesis.

- Espectrometría de masas del crudo obtenido por desanclaje del péptido contenido en una muestra de la quimioteca que contenga todos los compuestos en cantidad suficiente para ser detectados.<sup>3c,5</sup> Este espectro, comparado con una simulación del mismo realizada considerando que todos los compuestos se encuentran en igual proporción en la quimioteca y que su capacidad de ionización es la misma, proporcionó un segundo criterio de la calidad de la síntesis. En la evaluación de estos espectros debe tenerse en cuenta el rango de masas experimental en el que se encuentra la quimioteca corresponda con el rango teórico de masas moleculares y que la distribución de pesos moleculares (compuestos de igual peso molecular) sea similar. Desplazamientos del inicio del espectro a masas más bajas que las teóricas indicarían deleciones en la síntesis, mientras que desplazamientos del final del espectro a masas más altas indicarían problemas asociados a desprotecciones parciales de las cadenas laterales o reacciones secundarias varias. Un cambio en la distribución de los pesos moleculares indicaría que los compuestos de la quimioteca, aunque de peso molecular adecuado no tienen la composición correcta o no se encuentran en igual cantidad.

- Análisis por espectrometría de masas y secuenciación de algunos de los compuestos de la quimioteca, desanclados individualmente de las unidades de resina que los contienen.<sup>2,3c,6</sup>

### **6.3 Síntesis de quimiotecas mediante la estrategia HMFS/Boc/Bn**

La síntesis de las quimiotecas se realizó en los mismos reactores utilizados para la síntesis manual de péptidos. En todas las síntesis por química Boc/Bn se empleó resina PEGA como soporte polimérico ( $f_i = 0.4$  mmol/g; 125000 unidades de resina/g) y HMFS como espaciador bifuncional.

Previamente al inicio de la síntesis la resina se acondicionó (Materiales y Métodos 4.1.1), se llevó a cabo la reducción de su funcionalización (Materiales y Métodos 4.1.3) y finalmente se incorporó el espaciador HMFS (Materiales y Métodos 4.1.4). La metodología para la incorporación de los aminoácidos se detalla a continuación.

#### **6.3.1 Incorporación de aminoácidos en “posiciones comunes”**

Llamamos “*posiciones comunes*” a aquellas posiciones de la secuencia peptídica en las que todos los compuestos de la quimioteca poseen el mismo aminoácido.

Para la incorporación de estos aminoácidos toda la resina de la quimioteca se colocó en un único reactor de volumen adecuado. Los aminoácidos se incorporaron empleando excesos de 5 equivalentes para los acoplamientos y DIPCIDI y HOBT como agentes de activación (1 hora) excepto para el primer aminoácido, el cual se acopló sobre el espaciador bifuncional empleando DIPCIDI (5 eq.) y DMAP (0.5 eq.) como agentes de activación y 45 min de tiempo de reacción. Todos los aminoácidos fueron reacoplados sistemáticamente, preactivándolos entre 1-3 min antes de su adición a la resina. Cada ciclo de síntesis constó de los pasos que se detallan en la Tabla 4.

Etapa	Reactivo*	Ciclos
1	DCM	5×1 min
2	TFA/DCM (4:6)	1×1 min
3	TFA/DCM (4:6)	1×20 min
4	DCM	7×1 min
5	DIEA/DCM (5:95)	4×2 min
6	DCM	5×1 min
7	DMF	5×1 min
8	Aminoácido preactivado	2×1 h
9	DMF	5×1 min
10	DCM	7×1 min
11	Prueba de ninhidrina	
*Proporciones volumétricas entre reactivos y disolventes		

**Tabla 4** Ciclo de síntesis para la incorporación de aminoácidos comunes en quimiotecas sintetizadas por química Boc/Bn.

### 6.3.2 Pasos de “separación y mezcla”

En aquellos pasos en que varios aminoácidos debían ser incorporados en una misma posición de la secuencia peptídica, el ciclo de síntesis comenzó también en un único reactor que alojaba toda la resina. Se procedió primero a la desprotección del grupo  $\alpha$ -amino de todos los péptidos siguiendo los pasos 1 a 4 de la Tabla 4. Seguidamente la resina se lavó con DMF (5×1 min) y fue dividida en tantos reactores como aminoácidos diferentes a incorporar en aquella posición. Para ello la resina se suspendió en DMF y alícuotas del mismo volumen se añadieron a cada uno de los reactores (empleando una micropipeta), previa homogenización de la suspensión. Este proceso se repitió tantas veces como fue necesario hasta asegurar que en el reactor inicial no quedaba resina. A partir de aquí, la resina de cada reactor se lavó con DCM (5×1 min) y se

continuó en paralelo con el ciclo de síntesis general en todos los reactores (Tabla 4), incorporando un aminoácido diferente en cada reactor.

Tras obtener una prueba de ninhidrina negativa para todos los acoplamientos, la resina se lavó con DMF (5×1 min) y transfirió a un mismo reactor, suspendiéndola en DMF y trasvasando esta suspensión por medio de una micropipeta. Finalmente el total de la resina se resuspendió en DMF y se dejó 30 min en un agitador orbital para asegurar la buena mezcla de las porciones provenientes de las diferentes reacciones.

### 6.3.3 Pasos finales

Una vez acabada la síntesis de una quimioteca, el extremo N-terminal de todos los péptidos fue acetilado, previa eliminación del protector (pasos 1 a 7 de la Tabla 4). Para ello se empleó una mezcla de anhídrido acético (25 eq.) y piridina (25 eq.) en DMF (20 min). La total acetilación se comprobó por prueba de ninhidrina. Para la desprotección de las cadenas laterales, el total de la peptidil-resina se dividió en fracciones de unos 300 mg de resina, que fueron sometidos por separado al tratamiento de HF anhidro tal como se explica en Materiales y Métodos 4.1.5. Las quimiotecas se almacenaron solvatadas en DCM a -20 °C.

## 6.4 Síntesis de quimiotecas mediante la estrategia Fmoc/tBu

Las quimiotecas sintetizadas por química Fmoc/tBu fueron sintetizadas sobre resina TentaGel ( $f_i = 0.29$  mmol/g). La resina se acondicionó siguiendo la metodología estándar (Materiales y Métodos 4.2.1) y el espaciador bifuncional, el aminoácido metionina para todas ellas, se incorporó según se describe en Materiales y Métodos 4.2.2.

### 6.4.1 Incorporación de aminoácidos en posiciones comunes

La incorporación de aminoácidos en “*posiciones comunes*” se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos 4.2.2.

#### 6.4.2 Pasos de “separación y mezcla” y finalización parcial de secuencias en crecimiento

El proceso de síntesis de las quimiotecas por química Fmoc/tBu vino complicado por el paso de acetilación parcial después del acoplamiento de cada aminoácido, para la generación de la “escalera de secuencias parciales marcadas isotópicamente” necesaria para la secuenciación de los péptidos.

Cada ciclo de síntesis constó de los pasos que se describen en la Tabla 5.

Etapa	Reactivo*	Ciclos
1	DMF	5×1 min
2	Piperidina/DMF (2:8)	2×10 min
3	DMF	5×1 min
4	Finalización parcial de cadenas en crecimiento	1 h
5	DMF	5×1 min
6	Mezcla	1×30 min
7	Separación	
8	Aminoácido preactivado	1×1 h
9	DMF	5×1 min
*Proporciones volumétricas entre reactivos y disolventes		

**Tabla 5** Ciclo de síntesis para los pasos de mezcla y separación en quimiotecas sintetizadas por química Fmoc/tBu.

La metodología de acoplamiento de los aminoácidos y de acetilación parcial se describe en Materiales y Métodos 4.2.2 y 4.2.3. En todos los casos, la acetilación se realizó empleando la mezcla de ácidos y PyBOP/DIEA como agentes de activación. La bencilación parcial de las cadenas en crecimiento para el desarrollo del método de *doble marcaje isotópico*, se realizó con una mezcla 1:1 de ácido benzoico/(d<sub>6</sub>)-ácido benzoico (0.1 eq.) y PyBOP/DIEA (3 eq.) como agentes de activación, añadiendo también primero a la resina la mezcla de ácidos y posteriormente el agente de activación (1 h de reacción). El proceso de *mezcla y separación* se realizó de la misma forma que para las quimiotecas sintetizadas por química Boc/Bn: a partir de suspensiones homogéneas de resina en DMF (Materiales y Métodos 6.2.2).

#### 6.4.3 Pasos finales

Acabada la síntesis de una quimioteca, la resina se juntó en un único reactor y se procedió a la desprotección de las cadenas laterales siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos 4.2.4.

## 7. Dicroísmo circular

Los experimentos de dicroísmo circular se llevaron a cabo en un espectropolarímetro *Jasco* modelo *J-720*, con portacubetas termostatazadas por un sistema de refrigeración *Neslab* modelo *RP-100*. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- **Temperatura:** 4 °C
- **Cubeta:** 0.1 cm de paso de luz
- **Anchura de banda:** 1 nm
- **Sensibilidad:** 100 mgrados
- **Tiempo de respuesta:** 4 seg
- **Rango de longitud de onda:** 195-260 nm
- **Resolución por paso:** 1 nm
- **Velocidad de barrido:** 50 nm/min
- **Número de acumulaciones:** 4
- **Disolvente:** tampón fosfato (10 mM fosfato, 50 mM KF, pH=7.4)
- **Concentración:** 40  $\mu$ M

La medida del cambio en la elipticidad de las muestras con la temperatura se realizó empleando los siguientes parámetros:

- **Longitud de onda:** 222 nm
- **Rango de temperatura:** 5-60 °C
- **Resolución por paso:** 5 °C
- **Tiempo de espera:** 120 seg
- **Velocidad de incremento de temperatura:** 120 °C/h
- **Tiempo de respuesta:** 4 seg
- **Anchura de banda:** 1 nm
- **Sensibilidad:** 100 mgrados
- **Disolvente:** tampón fosfato (10 mM fosfato, 50 mM KF, pH=7.4)
- **Concentración péptidos:** 40  $\mu$ M

Para la preparación de las muestras se partió de disoluciones madre de concentración conocida por análisis de aminoácidos. De cada muestra se preparó 1 mL de disolución. Para el estudio de las interacciones no covalentes, las disoluciones mezcla de ambos péptidos (40  $\mu$ M de cada uno) se prepararon media hora antes de registrar el espectro, como medida de precaución para dar tiempo a la formación de los dominios no covalentes. Las muestras fueron añadidas a la cubeta de medida tras ser ésta lavada tres veces con el tampón de trabajo y tres con la misma muestra a

analizar, para evitar en lo posible efectos de dilución. Una vez la muestra introducida en la cubeta, se dejó que llegara a la temperatura de trabajo (3-5 min) y se registró el espectro.

## 8. Ensayos de actividad

La actividad de las quimiotecas sintetizadas por la estrategia HMFS/Boc/Bn se analizó con los péptidos unidos a la resina PEGA. Los ensayos se optimizaron para el análisis de aproximadamente 1000 unidades de resina cada vez. Los reactores empleados fueron jeringuillas de 2 mL de polipropileno provistas de un filtro de polietileno poroso. El número de unidades de resina introducido en cada reactor se controló generando suspensiones de peptidil-resina en DMF de 100  $\mu$ L por cada mg de resina (peso de resina solvatada en DMF). 400  $\mu$ L de esta suspensión contenían aproximadamente el número deseado de unidades de resina.

Etapa	Reactivo*	Ciclos
1	DMF/H <sub>2</sub> O (3:1)	10×1 min
2	DMF/H <sub>2</sub> O (1:1)	10×1 min
3	DMF/H <sub>2</sub> O (1:3)	10×1 min
4	H <sub>2</sub> O	10×1 min
5	Tampón 1	10×1 min
6	Tampón 1	1×10 min
7	Tampón 2	10×1 min
8	Tampón 2	1×1 h
9	Tampón 1	10×1 min
*Proporciones volumétricas entre reactivos y disolventes		

**Tabla 6** Proceso de acondicionamiento de la resina para el ensayo de actividad. Tampón 1: tampón fosfato (10 mM fosfato, 100 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, pH=7.4). Tampón 2: tampón fosfato (10 mM fosfato, 100 mM NaCl, 0.1 % gelatina, pH=7.4).

Partiendo de una alícuota de la quimioteca de unos 100 mg de peptidil-resina (peso de resina solvatada en DMF), el ensayo se inició con el acondicionamiento de la resina. Para ello se procedió a su lavado con DCM (1×10 min y 10×1min) y DMF (10×1 min). Una vez la resina solvatada en DMF se generó la comentada suspensión de peptidil-resina en DMF y se cogieron tantas alícuotas de ésta como ensayos a realizar, en reactores independientes. La preparación de la peptidil resina para el ensayo constó de los pasos detallados en la Tabla 6.

Una vez la resina acondicionada, se procedió a la adición de 250  $\mu$ L de una disolución del péptido H<sub>I-II</sub> en el Tampón 1 (la concentración de la disolución se encuentra especificada para cada

caso los capítulos 4 y 5) o de Tampón 1 sólo para el ensayo en blanco. El tiempo de reacción fue de 16 h a temperatura ambiente. A continuación se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de una disolución de IgG marcada fluorescentemente en el Tampón 1 (dilución 1:1000 v/v de la disolución comercial). El sistema se dejó evolucionar a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 6 h. Finalmente, la disolución se eliminó por filtración, la resina se lavó  $3 \times 1$  min con 300  $\mu\text{L}$  de Tampón 1 y se transfirió a una cápsula Petri, generando suspensiones de resina en  $\text{H}_2\text{O}$  ( $4 \times 300$   $\mu\text{L}$ ). Estas suspensiones se analizaron por microscopía de fluorescencia y aquellas unidades de resina fluorescentes (portadoras de péptido activo) se separaron del resto, succionándolas con una micropipeta.

Para el análisis de la resina se empleó una lupa **Leica** modelo *MZ FLIII* provista de una lámpara de Hg de 100 W, filtros de excitación de 360/40 nm, 470/40 nm y 546/10 nm y una cámara modelo DC 250 para la captación de imágenes.

## 9. Secuenciación de péptidos por MS

### 9.1 Secuenciación de péptidos por MALDI-TOF PSD

Esta técnica fue empleada para la secuenciación de los péptidos sintetizados mediante la estrategia HMFS/Boc/Bn (Materiales y Métodos 6.2), utilizando la cantidad de producto contenido en una única unidad de resina. Los espectros de MALDI-TOF PSD fueron registrados en un sistema Voyager-DE STR (PerSeptive Biosystems). Los parámetros de adquisición fueron:

- **Láser de nitrógeno** (337 nm, 1 nseg/pulso)
- **Adquisición:** iones positivos
- **Delayed Extraction:** 100 nseg
- **Voltaje de aceleración:** 20 kV
- **Voltaje del Grid:** 70 %
- **Mirror Ratio:** 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1

La preparación de las muestras para su análisis se realizó como se describe a continuación. Primero se procedió al lavado de las unidades de resina para la eliminación de las sales y reactivos adheridos procedentes del el ensayo de actividad, empleando  $10 \times 1$  min de  $\text{H}_2\text{O}$  (50  $\mu\text{L}$ ) y  $10 \times 1$  min de DMF (50  $\mu\text{L}$ ). Las unidades de resina se encontraban colocadas en la concavidad central de un portaobjetos, sobre el que se añadieron los diferentes disolventes con una micropipeta y fueron

extraídos posteriormente empleando un capilar de vidrio de diámetro inferior al de las unidades de resina, para evitar que fueran succionadas.

El desanclaje del péptido se realizó directamente sobre la placa de MALDI. En primer lugar se depositó 1  $\mu\text{L}$  de una disolución de morfolina/DMF (2:8 v/v) sobre una posición concreta de la placa, sobre la que posteriormente se colocó una unidad de resina empleando un capilar de vidrio de punta cerrada. La reacción se dejó proceder hasta la evaporación completa de los reactivos y finalmente se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de la disolución de matriz (10 mg de CHCA en  $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$  con un 0.1 % de TFA).

## **9.2 Secuenciación de péptidos por análisis de la “escalera” de secuencias parciales marcadas isotópicamente**

Esta técnica se empleó para la secuenciación de péptidos de las quimiotecas sintetizadas por química Fmoc/tBu (Materiales y Métodos 6.3), utilizando el producto contenido en una única unidad de resina. Los espectros de MALDI se registraron en un sistema Voyager-DE-RP (PE Biosystems). Las condiciones de adquisición fueron:

- **Láser de nitrógeno** (337 nm, 3-20 nseg/pulso)
- **Adquisición:** iones positivos
- **Delayed Extraction:** 300 nseg
- **Voltaje de aceleración:** 20 kV
- **Voltaje del Grid:** 70 %

La preparación de las muestras se realizó partiendo de una suspensión de peptidil-resina en  $\text{H}_2\text{O}$ , de la cual se aislaron las unidades de resina por medio de una micropipeta y se introdujeron en reactores de 0.5 mL. 20  $\mu\text{L}$  de la disolución de desanclaje (Materiales y Métodos 4.2.5) se añadieron a cada reactor y la reacción se dejó proceder durante 24 h protegida de la luz. A continuación se eliminaron los reactivos por evaporación al vacío y el péptido se disolvió en 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{CN}$ . De esta disolución se añadieron 3  $\mu\text{L}$  sobre una posición de la placa de MALDI, se evaporó el disolvente al aire y finalmente se mezcló la muestra con 1  $\mu\text{L}$  de matriz (la misma que en el apartado anterior).

Una vez los espectros adquiridos se transformaron a formato ASCII y de aquí a un formato compatible con el software *MassLynx* v 3.2 mediante el programa *DataBridge* que éste proporciona. Los datos se procesaron mediante el análisis de “clusters” que el programa dispone, empleando los siguientes parámetros:

- **$\Delta m$  picos:** 3.02 ó 5.03 para los productos bencilados

- **Tolerancia:**  $\pm 0.1$  Da
- **Relación de intensidad entre picos:** 1:1
- **Tolerancia en la relación de intensidades:**  $\pm 80$  %
- **Intensidad de pico mínima:** entre 0.1-1 %.

## 10. Bibliografía

- <sup>1</sup> Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. L. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-599
- <sup>2</sup> Pastor, J. J.; Lingard, I.; Bhalay, G.; Bradley, M. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5(2)*, 85-90
- <sup>3</sup> a) Furka, A.; Sebesteyén, F.; Asgedom, M.; Dibó, G. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1991**, *37*, 487-493; b) Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E.; Appel, J. R.; Dooley, C. T.; Cuervo, J. H. *Nature* **1991**, *354*, 84-86; c) Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. *Nature* **1991**, *354*, 82-84; d) Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchnák, V. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411-448
- <sup>4</sup> a) Zhao, P.-L.; Zambias, R.; Bolognese, J. A.; Boulton, D.; Chapman, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10121-10126; b) Zhao, P.-L.; Nachbar, R. B.; Bolognese, J. A.; Chapman, K. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 350-352
- <sup>5</sup> a) Loo, J. A. *Eur. Mass Spectrom.* **1997**, *3*, 93-104; b) Demirev, P. A.; Zubarev, R. A. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2893-2900; c) Enjalbal, C.; Martinez, J.; Aubagnac, J.-L. *Mass Spectrom. Rev.* **2000**, *19*, 139-161; d) Yates, N.; Wislocki, D.; Roberts, A.; Berk, S.; Klatt, T.; Shen, D.-M.; Willoughby, C.; Rosauer, K.; Chapman, K.; Griffin, P. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2941-2951
- <sup>6</sup> a) Youngquist, R. S.; Fuentes, G. R.; Lacey, M. P.; Keough, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 77-81; b) Youngquist, R. S.; Fuentes, G. R.; Lacey, M. P.; Keough, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3900-3906; c) Davies, M.; Bradley, M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8565-8568; c) Hoffmann, C.; Blechschmidt, D.; Krüger, R.; Karas, M.; Griesinger, C. *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 79-86; d) Pastor, J. J.; Fernández, I. Rabanal, F.; Giralt, E. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3831-3833



## **Procedimientos Experimentales**



## 1. Síntesis de los espaciadores bifuncionales

### 1.1 Síntesis del ácido 4-hidroximetil-3-nitrobenzoico<sup>1</sup>

A 1 g de ácido 4-bromometil-3-nitrobenzoico se le añadieron 30 mL de disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> en un balón provisto de refrigerante para reflujo, llevándose el sistema a 90-95 °C. La reacción se siguió por CCf empleando CMA (100:50:0.1; v/v/v) como fase móvil. Cuando la reacción se consideró finalizada (10 min aproximadamente), la disolución obtenida se filtró en caliente y se acidificó después con HCl (12 N) hasta pH=1-2. El precipitado aparecido se extrajo con AcOEt (3×25mL), las fracciones orgánicas se lavaron con una disolución acuosa de NaCl<sub>sat</sub> y se secaron con MgSO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se eliminó al vacío, obteniéndose un producto sólido de color amarillento.

**Rendimiento:** 85 %. **Rf:** 0.3 (CMA; 100:50:0.1; v/v/v). **Pf:** 168.3-169.7°C. **HPLC (t<sub>R</sub>)=** 7.2 min (gradiente lineal del 20 al 100% de B en A en 30 min; flujo 1 ml/min, detección por UV a 220nm). **Pureza:** >97% por integración de áreas en HPLC. **RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** 4.91 ppm (s, 2H), 7.91 ppm (d, J=8Hz, 1H), 8.22 ppm (dd, J=8, 1.8 Hz, 1H), 8.53 ppm (d, J=1.8 Hz, 1H).

### 1.2 Síntesis del ácido N-[9-hidroximetil]-2-fluorenil succinámico<sup>2</sup>

#### 1.2.1 Síntesis del 2-(Boc-amino)fluoreno

A una suspensión de 2-aminofluoreno (20 g, 110 mmol) en una mezcla de 200 mL de dioxano/H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) y 60 mL de NaOH 2N se le añadieron 26.5 g (121 mmol) de Boc<sub>2</sub>O, a 0 °C y con agitación magnética constante. La reacción se llevó a temperatura ambiente y se dejó proceder, siguiéndose su evolución por CCf empleando CMA (95:5:3 v/v/v) como eluyente. El pH de la mezcla se mantuvo entre 8-9 por adición de NaOH 2N en caso necesario. La reacción se consideró acabada tras la total desaparición del producto de partida (12-24 h). La suspensión obtenida se acidificó hasta pH=3 por adición de KHSO<sub>4</sub> 1M. El sólido se separó por filtración y fue lavado con H<sub>2</sub>O fría, dioxano-H<sub>2</sub>O (2:1 v/v), hexano y secado sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Se obtuvieron 30.1 g de un sólido amarillo pálido que se identificó como 2-(Boc-amino)fluoreno.

**Rendimiento etapa:** 97 %. **Rf:** 0.70 (CMA; 95:5:3; v/v/v). **RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** 1.6 ppm (s, 9H), 3.9 ppm (s, 2H), 6.6 ppm (banda ancha, 1H), 7.1-7.8 ppm (m, 7H).

### 1.2.2 Síntesis del 9-hidroximetil-2-aminofluoreno

Una disolución de 2-(Boc-amino)fluoreno (14.3 g, 51 mmol) en THF anhidro (recién destilado) fue añadida sobre una suspensión de NaH (80 % en parafina, 5 g, 167 mmol) sobre THF anhidro, lentamente y bajo atmósfera de argón. El desprendimiento de hidrógeno y calentamiento espontáneo del sistema indicaron el inicio de la reacción. Seguidamente se adicionaron 10.2 mL de formiato de etilo (126 mmol), tratados previamente con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  para eliminar las trazas de ácido fórmico que pudiese contener, obteniéndose una mezcla color marrón oscuro. El desprendimiento de hidrógeno se mantuvo durante todo el proceso, por lo que fue necesario equipar al matraz de una salida de gases. La reacción se siguió por capa fina, empleando CMA (95:5:3; v/v/v) como eluyente. Se consideró la reacción acabada tras la desaparición total del producto de partida o la aparición de subproductos varios (20 min aproximadamente). La reacción se detuvo con la adición de 100 mL de agua helada. El THF se eliminó por evaporación al vacío y se lavó la fase acuosa con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3×50 mL). Durante los lavados con éter apareció una interfase sólida que contenía la mayoría del producto de la reacción, según se comprobó por CCf. Esta interfase se hizo desaparecer basificando el medio con NaOH 2M. La fase acuosa se llevó a 0 °C empleando un baño de hielo y se acidificó a pH=5 con AcOH glacial, observándose la aparición de un sólido de color amarillento que fue extraído con AcOEt (3×100 mL). Tras juntar las fracciones orgánicas se lavaron con una disolución de  $\text{NaHCO}_3$  sat (3×100 mL), de  $\text{NaCl}_{\text{sat}}$  después (3×100 mL) y se secaron con  $\text{MgSO}_4$  anhidro. El AcOEt se eliminó por rotavaporación y el sólido obtenido se secó al vacío sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

El producto obtenido se suspendió en 100 mL de MeOH (calidad HPLC) y se le añadieron 2.1 g (55 mmol) de  $\text{NaBH}_4$ . El sistema se mantuvo bajo atmósfera de argón durante 4 h, siguiendo la reacción por CCf con CMA (95:5:3; v/v/v). Tras comprobar que el reactivo de partida no se había consumido completamente, se adicionaron pequeñas porciones extra de  $\text{NaBH}_4$  hasta su total desaparición. La reacción se detuvo añadiendo 300 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y se acidificó el sistema hasta pH=5 con AcOH glacial, observándose la aparición de un sólido amarillento que se extrajo con AcOEt (3× 100 mL). Las fracciones orgánicas se lavaron con una disolución acuosa de  $\text{NaCl}_{\text{sat}}$  (3×100 mL), se secaron con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y el disolvente se eliminó por evaporación al vacío.

El producto obtenido (13.0 g, 41.8 mmol) se suspendió en una disolución de HCl (4N)/dioxano frío y se dejó reaccionar durante 2 h a 0 °C y una hora más a temperatura ambiente. El HCl se eliminó por evaporación al vacío, se añadieron 800 mL de DCM y el sistema se llevó a 0 °C empleando un baño de agua. El sólido obtenido se separó por filtración.

La sal de amonio cuaternaria obtenida se disolvió en 150 mL de agua y se basificó el medio hasta pH=8 con  $\text{NaHCO}_3$ (s). El sólido aparecido se extrajo con AcOEt (3×100 mL), las fases

orgánicas se lavaron con una disolución acuosa de  $\text{NaCl}_{\text{sat}}$  ( $3 \times 100$  mL), se secaron con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se eliminó el disolvente por evaporación al vacío. Se obtuvieron 7.7 g de un sólido marrón identificado como 9-hidroximetil-2-aminofluoreno.

**Rendimiento etapa:** 71 %. **Rf:** 0.33 (CMA; 75:23:2; v/v/v). **RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):** 3.72 ppm (m, 3H), 6.64 ppm (dd,  $J=7.6$ , 2 Hz, 1H), 6.91 ppm (d,  $J=2.2$  Hz, 1H), 7.03 ppm (ddd,  $J=7.2$ , 7.2, 1 Hz, 1H), 7.16 ppm (ddd,  $J=7.2$ , 7.2, 1 Hz, 1H), 7.30 ppm (d,  $J=7.3$  Hz, 1H), 7.39 ppm (d,  $J=7.4$  Hz, 1H), 7.46 ppm (d,  $J=7.2$  Hz, 1H).

### 1.2.3 Síntesis del ácido *N*-[(9-hidroximetil)-2-fluorenil] succinámico (HMFS)

6.8 g (32.2 mmol) de 9-hidroximetil-2-aminofluoreno se disolvieron en la mínima cantidad posible de THF anhidro (recién destilado), bajo atmósfera de argón. Se adicionaron 3.4 g de anhídrido succínico en pequeñas porciones, siguiendo la reacción por CCf empleando CMA (95:15:3; v/v/v) como eluyente. Pasados 20 min empezó a precipitar un sólido de color marrón, que se recuperó por filtración y recristalizó en THF/Hexano con unas gotas de MeOH. Fueron necesarias 6 etapas de cristalización con volúmenes crecientes de hexano (8-40 %) sobre el volumen de THF inicial. Al final de la síntesis se obtuvieron 9.1 g de HMFS puro.

**Rendimiento etapa:** 91 %. **Rendimiento total de síntesis:** 63 %. **Rf:** 0.26 (CMA; 95:15:3; v/v/v). **Pf:** 168.6-169.5°C. **HPLC ( $t_R$ )=** 12.9 min (gradiente lineal del 20 al 100% de B en A en 30 min; flujo 1mL/min, detección por UV a 220 nm). **Pureza:** >95%, por integración de áreas en HPLC. **RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):** 2.44 ppm (s, 4H), 3.64 ppm (d,  $J=7.4$  Hz, 1H), 3.64 ppm (d,  $J=6$ Hz, 1H), 3.76 ppm (dd,  $J=6.6$ , 6.6 Hz, 1H), 7.01 ppm (ddd,  $J=7.2$ , 6.8, 1.2 Hz, 1H), 7.10 ppm (ddd,  $J=7.2$ , 7, 1 Hz, 1H), 7.28 ppm (dd,  $J=8.4$ , 1.8 Hz, 1H), 7.38 ppm (d,  $J=7.4$  Hz, 1H), 7.47 ppm (d,  $J=8$  Hz, 1H), 7.47 ppm (d,  $J=7$  Hz, 1H), 7.65 ppm (d,  $J=1.8$  Hz, 1H). **ESI-MS:** ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ = 311.6 (esperado 312.1 m/z), ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ = 333.5 (esperado 334.1 m/z), ( $\text{M}+\text{K}$ ) $^+$ = 349.6 (esperado 350.1 m/z).

## 2. Síntesis de la “Hélice III natural” ( $\text{H3}_n$ ) unida a fase sólida

### 2.1 Síntesis utilizando la estrategia *Nbb/Boc/Bn*

### 2.1.1 Prueba de estabilidad del espaciador Nbb al HF

La prueba de la estabilidad del enlace péptido-Nbb se realizó estudiando la relación de concentraciones Phe/Gly del sistema control Ac-Phe-Nbb-Gly-PEGA, determinada por análisis de aminoácidos, antes y después de su tratamiento con HF anhidro (Materiales y Métodos 4.1.5). La síntesis se llevó a cabo de forma manual (Materiales y Métodos 4.1) sobre 50 mg de resina PEGA de funcionalización inicial 0.4 mmol/g. Se empleó un doble acoplamiento de 5 equivalentes de exceso para la incorporación de ambos aminoácidos, con DIPCDI (5 eq.) y HOBt (5 eq.) como agentes de activación para la Gly (1 h de reacción) y DIPCDI (5 eq.) y DMAP (0.5 eq.) para la Phe (45 min de reacción). El espaciador se incorporó según Materiales y Métodos 4.1.4.

La pérdida de aminoácido tras la desprotección se estimó inferior al 5 %.

### 2.1.2 Síntesis de la H3<sub>n</sub> unida a Nbb-PEGA

La síntesis se llevó a cabo sobre 0.5 g de resina amino PEGA de funcionalización inicial 0.4 mmol/g, que se redujo a 0.23 mmol/g según se describe en Materiales y Métodos 4.1.3. La síntesis se realizó de forma manual siguiendo un esquema de protección Boc/Bn (Materiales y Métodos 4.1). Los aminoácidos protegidos empleados fueron: Boc-Ala-OH, Boc-Asn-OH, Boc-Asp(OcHex)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Glu(OcHex)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Lys(ClZ)-OH, Boc-Pro-OH y Boc-Ser(OBn)-OH.

El primer aminoácido se incorporó sobre el espaciador bifuncional Nbb utilizando un doble acoplamiento de 5 equivalentes y DIPCDI (5eq.) y DMAP (0.5 eq.) como agentes de activación, con tiempos de reacción de 45 min. El resto de aminoácidos se incorporaron empleando excesos de 4 equivalentes y DCC y HOBt como agentes de activación (1 h de reacción), excepto para el tercer aminoácido. Éste se incorporó siguiendo un protocolo de neutralización *in situ*,<sup>3</sup> con un exceso de 6 equivalentes de aminoácido protegido y BOP (6 eq.), HOBt (6 eq.) y DIEA (24 eq.) como agentes de activación (1 h de reacción). La extensión de los acoplamientos se siguió por prueba de ninhidrina, reacoplado cuando la prueba se revelaba positiva. Para los acoplamientos sobre prolina se llevó a cabo un doble acoplamiento sistemático.

Acabada la síntesis se procedió a la desprotección del grupo  $\alpha$ -amino, a la acetilación del extremo N-terminal empleando Ac<sub>2</sub>O (25 eq.), piridina (25 eq.), DMF como disolvente y 20 min de reacción y a la desprotección de las cadenas laterales según se describe en Materiales y Métodos 4.1.5. Para la caracterización del producto se desancló el péptido contenido en una alícuota de unos 5 mg de peptidil-resina con CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> según se describe en Materiales y Métodos 4.1.6.1.

**Heptapéptido C-terminal protegido:** HPLC ( $t_R$ )= 26.4 min (gradiente lineal del 20 al 100% de B en A en 30 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

**H3<sub>n</sub> protegida:** HPLC ( $t_R$ )= 32.8 min (gradiente isocrático al 60 % durante los primeros 5 min, y posteriormente lineal del 60 al 100% de B en A en 30 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). AAA: Asp: 3.9 (4), Ser: 0.6 (2), Glu: 3.1 (3), Ala: 5.1 (5), Leu: 3.0 (3), Lys: 3.2 (3), Pro: 1.8 (2).

**H3<sub>n</sub> desprotegida:** HPLC ( $t_R$ )= 16.6 min (gradiente lineal del 5 al 65% de B en A en 20 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). HPLC ( $t_R$ )= 20.7 min (gradiente lineal del 10 al 40% de B en A en 20 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). HPLC ( $t_R$ )= 13.3 min (gradiente lineal del 20 al 70% de B en A en 50 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). HPLC ( $t_R$ )= 40.9 min (gradiente lineal del 10 al 35% de B en A en 50 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). ESI-MS: (M+3H)<sup>3+</sup>= 789.7 (esperado 784.4 m/z), (M+2H)<sup>2+</sup>= 1184.3 (esperado 1176.1 m/z). AAA: Asp: 3.9 (4), Ser: 0.6 (2), Glu: 3.2 (3), Ala: 5.1 (5), Leu: 2.9 (3), Lys: 2.8 (3), Pro: 1.9 (2).

## **2.2 Síntesis utilizando la estrategia HMFS/Boc/Bn**

### **2.2.1 Prueba de estabilidad del espaciador HMFS al HF**

La prueba de la estabilidad del enlace péptido-HMFS se realizó estudiando la relación de concentraciones Phe/Gly del sistema control Ac-Phe-HMFS-Gly-PEGA, determinada por análisis de aminoácidos, antes y después de su tratamiento con HF anhidro (Materiales y Métodos 4.1.5). La síntesis se llevó a cabo de forma manual (Materiales y Métodos 4.1) sobre 50 mg de resina PEGA de funcionalización inicial 0.4 mmol/g. Se empleó un doble acoplamiento de 5 equivalentes de exceso para la incorporación de ambos aminoácidos, con DIPCDI (5 eq.) y HOBt (5 eq.) como agentes de activación para la Gly (1 h de reacción) y DIPCDI (5 eq.) y DMAP (0.5 eq.) para la Phe (45 min de reacción). La incorporación del espaciador se realizó según Materiales y Métodos 4.3.4.

La pérdida de aminoácido durante la desprotección se estimó inferior al 5%.

### **2.2.2 Síntesis de la H3<sub>n</sub> unida a HMFS-PEGA**

La síntesis se llevó a cabo sobre 0.5 g de resina PEGA de funcionalización inicial 0.4 mmol/g, que se redujo a 0.19 mmol/g según se describe en Materiales y Métodos 4.1.3. La síntesis

se realizó de forma manual siguiendo un esquema de protección Boc/Bn (Materiales y Métodos 4.1). Los aminoácidos protegidos empleados fueron: Boc-Ala-OH, Boc-Asn-OH, Boc-Asp(OcHex)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Glu(OcHex)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Lys(ClZ)-OH, Boc-Pro-OH y Boc-Ser(OBn)-OH.

El primer aminoácido se incorporó sobre el espaciador bifuncional HMFS utilizando un doble acoplamiento de 5 equivalentes y DIPCDI (5eq.) y DMAP (0.5 eq.) como agentes de activación, con tiempos de reacción de 45 min. El resto de aminoácidos se incorporaron empleando excesos de 4 equivalentes y DCC y HOBt como agentes de activación (1 h de reacción). La extensión de los acoplamientos se siguió por prueba de ninhidrina, reacoplado cuando la prueba se revelaba positiva. Para los acoplamientos sobre prolina se llevó a un cabo doble acoplamiento sistemático.

Acabada la síntesis se procedió a la desprotección del grupo  $\alpha$ -amino, a la acetilación del extremo N-terminal empleando  $\text{Ac}_2\text{O}$  (25 eq.), piridina (25 eq.), DMF como disolvente y 20 min de reacción y a la desprotección de las cadenas laterales según se describe en Materiales y Métodos 4.1.5. Para la caracterización del producto se desancló el péptido contenido en una alícuota de unos 5 mg de peptidil-resina, según se describe en Materiales y Métodos 4.1.6.2.

**Heptapéptido C-terminal protegido:** HPLC ( $t_R$ )= 17.8 min (gradiente lineal del 20 al 100% de B en A en 30 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). ESI-MS: 1115.8 ( $M+\text{Na}$ )<sup>+</sup>.

**H<sub>3n</sub> protegida:** HPLC ( $t_R$ )= 22.4 min (gradiente lineal del 60 al 100% de B en A en 30 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). AAA: Asp: 4.0 (4), Ser: 0.6 (2), Glu: 3.2 (3), Ala: 4.9 (5), Leu: 3.0 (3), Lys: 3.1 (3), Pro: 1.9 (2).

**H<sub>3n</sub>desprotegida:** HPLC ( $t_R$ )= 13.7 min (gradiente lineal del 5 al 65% de B en A en 20 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). HPLC ( $t_R$ )= 18.1 min (gradiente lineal del 10 al 40% de B en A en 20 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). HPLC ( $t_R$ )= 15.7 min (gradiente lineal del 20 al 70% de B en A en 50 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). HPLC ( $t_R$ )= 40.5 min (gradiente lineal del 10 al 35% de B en A en 50 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). Pureza: >85% (por integración de áreas). ESI-MS: ( $M+3H$ )<sup>3+</sup>= 785.6 (esperado 784.4 m/z), ( $M+2H$ )<sup>2+</sup>= 1176.2 (esperado 1176.1 m/z). AAA: Asp: 4.1 (4), Ser: 0.8 (2), Glu: 3.2 (3), Ala: 4.9 (5), Leu: 2.9 (3), Lys: 3.2 (3), Pro: 1.9 (2). MALDI-TOF: ( $M+H$ )<sup>+</sup>= 2351.03 (esperado 2351.2 m/z). MALDI-TOF PSD (fragmentos  $b_n$  y  $y_n$ ):  $b_{22}$ = 2335.5 (esperado 2334.6 m/z, *average*),  $b_{20}$ = 2109.6 (esperado 2109.3 m/z, *average*),  $b_{19}$ = 2038.6 (esperado 2038.2 m/z, *average*),  $b_{18}$ = 1910.5 (esperado 1910.1 m/z, *average*),  $b_{17}$ = 1838.7 (esperado 1839.0 m/z, *average*),  $b_{16}$ = 1724.1 (esperado 1723.9 m/z, *average*),  $b_{15}$ = 1609.7 (esperado 1610.8 m/z, *average*),  $b_{14}$ = 1496.8 (esperado 1495.8 m/z, *monoisotópico*),  $b_{13}$ = 1367.3 (esperado 1367.7 m/z, *monoisotópico*),  $b_9$ = 969.6 (esperado 968.5 m/z, *monoisotópico*),  $b_8$ = 855.4 (esperado 855.4 m/z, *monoisotópico*),  $b_7$ = 742.6 (esperado 742.3 m/z, *monoisotópico*),  $b_6$ = 628.0 (esperado 628.3 m/z, *monoisotópico*),  $b_5$ = 557.0 (esperado 557.2 m/z, *monoisotópico*),  $b_4$ = 470.1 (esperado 470.2 m/z, *monoisotópico*),  $y_{21}$ = 2195.7 (esperado 2195.5 m/z, *average*),  $y_{19}$ = 2011.3 (esperado 2011.3 m/z,

*average*),  $y_{18}$ = 1882.5 (esperado 1883.2 m/z, *average*),  $y_{17}$ = 1795.9 (esperado 1796.1 m/z, *average*),  $y_{16}$ = 1724.1 (esperado 1725.0 m/z, *average*),  $y_{15}$ = 1609.7 (esperado 1609.9 m/z, *average*),  $y_{14}$ = 1496.8 (esperado 1496.8 m/z, *monoisotópico*),  $y_{13}$ = 1383.9 (esperado 1383.8 m/z, *monoisotópico*),  $y_{12}$ = 1313.0 (esperado 1312.7 m/z, *monoisotópico*),  $y_{11}$ = 1184.3 (esperado 1183.7 m/z, *monoisotópico*),  $y_{10}$ = 1112.3 (esperado 1112.6 m/z, *monoisotópico*),  $y_9$ = 984.4 (esperado 984.6 m/z, *monoisotópico*),  $y_8$ = 855.4 (esperado 856.5 m/z, *monoisotópico*),  $y_7$ = 743.3 (esperado 743.4 m/z, *monoisotópico*),  $y_6$ = 628.9 (esperado 629.3 m/z, *monoisotópico*),  $y_5$ = 514.2 (esperado 514.3 m/z, *monoisotópico*). Ver Anexo, página 211.

### **3. Síntesis de la “Hélice III Control Negativo” (H3<sub>a</sub>) unida a HMFS-PEGA**

La síntesis se realizó sobre 0.45 g de resina PEGA de funcionalización inicial 0.4 mmol/g, reducida a 0.32 mmol/g según se describe en Materiales y Métodos 4.1.3. La síntesis se llevó a cabo de forma automática siguiendo un esquema de protección Boc/Bn (Materiales y Métodos 5.1), previa incorporación manual del espaciador bifuncional HMFS (Materiales y Métodos 4.1.4) y del primer aminoácido, empleando un doble acoplamiento de 5 equivalentes de exceso de aminoácido y DIPCDI (5 eq.) y HOBt (5 eq.) como agentes de activación. Los aminoácidos protegidos empleados fueron: Boc-Ala-OH, Boc-Asn-OH, Boc-Asp(OcHex)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Glu(OcHex)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Lys(CIz)-OH, Boc-Pro-OH y Boc-Ser(OBn)-OH.

Acabada la síntesis se procedió a la acetilación del extremo N-terminal y a la desprotección de las cadenas laterales de forma análoga que para H3<sub>n</sub>. La caracterización del producto se llevó a cabo por desanclaje del péptido contenido en alícuotas 5 mg de peptidil-resina, según se describe en Materiales y Métodos 4.1.6.2.

**H3<sub>a</sub> protegida**: HPLC ( $t_R$ )= 34.8 min (gradiente lineal del 15 al 100% de B en A en 40 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). AAA: Asp: 4.3 (4), Ser: 0.9 (2), Glu: 3.1 (3), Ala: 4.8 (5), Leu: 3.0 (3), Lys: 2.9 (3), Pro: 1.8 (2).

**H3<sub>a</sub> desprotegida**: HPLC ( $t_R$ )= 9.3 min (gradiente lineal del 20 al 50% de B en A en 60 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). HPLC ( $t_R$ )= 28.6 min (gradiente lineal del 10 al 40% de B en A en 60 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). Pureza: >80%. ESI-MS: (M+3H)<sup>3+</sup>= 784.6 (esperado 784.4 m/z), (M+2H)<sup>2+</sup>= 1176.2 (esperado 1176.1 m/z). AAA: Asp: 4.0 (4), Ser: 0.8 (2), Glu: 3.1 (3), Ala: 4.8 (5), Leu: 3.0 (3), Lys: 2.9 (3), Pro: 2.2 (2). MALDI-TOF: (M+H)<sup>+</sup>= 2351.2 (esperado 2351.2 m/z). MALDI-TOF PSD (fragmentos  $b_n$  y  $y_n$ ):  $b_{22}$ = 2335.0 (esperado 2334.6 m/z, *average*),  $b_{21}$ = 2221.1 (esperado 2221.4 m/z, *average*),  $b_{20}$ = 2134.5 (esperado 2134.4 m/z, *average*),  $b_{19}$ = 2063.1 (esperado 2063.3 m/z, *average*),  $b_{18}$ = 1949.1 (esperado 1949.2 m/z, *average*),  $b_{17}$ = 1834.1 (esperado 1834.1 m/z, *average*),  $b_{16}$ = 1763.1

(esperado 1763.0 m/z, *average*),  $b_{14}$ = 1536.9 (esperado 1536.8 m/z, *monoisotópico*),  $b_{13}$ = 1423.8 (esperado 1423.7 m/z, *monoisotópico*),  $b_{12}$ = 1309.8 (esperado 1309.7 m/z, *monoisotópico*),  $b_{11}$ = 1181.7 (esperado 1181.6 m/z, *monoisotópico*),  $b_9$ = 939.8 (esperado 939.5 m/z, *monoisotópico*),  $b_6$ = 656.4 (esperado 656.3 m/z, *monoisotópico*),  $b_5$ =569.4 (esperado 569.3 m/z, *monoisotópico*),  $b_4$ = 498.3 (esperado 498.3 m/z, *monoisotópico*),  $b_3$ = 370.2 (esperado 370.2 m/z, *monoisotópico*),  $y_{21}$ = 2239.3 (esperado 2239.5 m/z, *average*),  $y_{20}$ = 2111.0 (esperado 2111.4 m/z, *average*),  $y_{19}$ = 1983.1 (esperado 1983.2 m/z, *average*),  $y_{18}$ = 1854.9 (esperado 1855.1 m/z, *average*),  $y_{17}$ = 1783.9 (esperado 1784.0 m/z, *average*),  $y_{16}$ = 1696.2 (esperado 1696.9 m/z, *average*),  $y_{14}$ = 1483.9 (esperado 1483.8 m/z, *monoisotópico*),  $y_{13}$ = 1412.8 (esperado 1412.7 m/z, *monoisotópico*),  $y_{12}$ = 1299.8 (esperado 1299.7 m/z, *monoisotópico*),  $y_{11}$ = 1170.6 (esperado 1170.7 m/z, *monoisotópico*),  $y_9$ = 928.5 (esperado 928.5 m/z, *monoisotópico*),  $y_8$ = 815.5 (esperado 815.4 m/z, *monoisotópico*). Ver Anexo, página 212.

#### 4. Síntesis del péptido “Hélices I-II naturales” ( $H_{I-II}$ )

La síntesis se realizó sobre 430 mg de resina *p*-MBHA de funcionalización inicial 0.52 mmol/g. La síntesis se llevó a cabo de forma manual siguiendo un esquema de protección Boc/Bn (Materiales y Métodos 4.1). Los aminoácidos protegidos empleados fueron: Boc-Ala-OH, Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-Asn-OH, Boc-Asp(OcHex)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Glu(OcHex)-OH, Boc-His(Bom)-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Lys(ClZ)-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Ser(OBn)-OH y Boc-Tyr(BrZ)-OH.

Los aminoácidos se incorporaron empleando un protocolo de neutralización *in situ* que consta de los pasos que se describen en la Tabla 1.

Etapa	Reactivo	Ciclos
1	DCM	5×1 min
2	TFA	1×1 min
3	TFA	1×5 min
4	DCM	7×1 min
5	DMF	7×1 min
6	Boc-AA-OH (4 eq.)/TBTU (4 eq.)/DIEA (12 eq.)	1×20 min
7	DMF	5×1 min
8	DCM	5×1 min
9	Prueba de ninhidrina	

**Tabla 1** Ciclo estándar empleado para la síntesis del péptido  $H_{I-II}$ .

Acabada la elongación de la cadena, se procedió a la acetilación del extremo N-terminal del péptido, de forma análoga a la descrita para la síntesis de la H3<sub>n</sub>, y a la desprotección de las cadenas laterales y escisión del enlace péptido-resina según se describe en Materiales y Métodos 4.1.5. El crudo fue purificado por HPLC semi-preparativo y el péptido puro liofilizado y almacenado a -20 °C.

**Condiciones de Purificación:** condiciones isocráticas del 15 % de B en A durante 5 min seguidas de un gradiente lineal del 15 al 50 % de B en A durante 60 min. Flujo 10 mL/min. Detección por UV a 220 nm. Velocidad de colección de fracciones: 30 seg/fracción.

**Péptido H<sub>I-II</sub>:** 88 mg (cuantificación por AAA). **Rendimiento de síntesis:** 8.5 %. **Pureza:** > 95 %. **HPLC (t<sub>R</sub>)= 7.0 min** (gradiente lineal del 0 al 100 % de B en A en 15 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). **HPLC (t<sub>R</sub>)= 6.3 min** (gradiente lineal del 25 al 35 % de B en A en 15 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). **MALDI-TOF:** (M+H)<sup>+</sup> = 4642.1 (esperado 4642.3 m/z). **AAA:** Asp: 8.2 (8), Ser: 0.9 (1), Glu: 8.4 (8), Gly: 1.1 (1), Ala: 2.7 (3), Ile: 1.8 (2), Leu: 4.1 (4), Tyr: 1.0 (1), Phe: 2.8 (3), His: 0.6 (1), Lys: 3.7 (4), Pro: 2.6 (2), Arg: 1.0 (1).

## 5. Síntesis de la quimioteca L300

La síntesis de quimioteca L300 se realizó sobre 300 mg de resina PEGA de funcionalización inicial 0.4 mmol/g, reducida a 0.23 mmol/g según se describe en Materiales y Métodos 4.1.3. Se utilizó más resina de la calculada teóricamente (80 mg, Materiales y Métodos 6.1) para disponer de una cantidad suficiente para su fácil manipulación. La síntesis de la quimioteca se realizó siguiendo la estrategia HMFS/Boc/Bn según se describe en Materiales y Métodos 6.2. Los aminoácidos protegidos empleados para la síntesis fueron: Boc-Ala-OH, Boc-Asn-OH, Boc-Asp(OcHex)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Glu(OcHex)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Lys(ClZ)-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Ser(OBn)-OH, Boc-Thr(OBn)-OH y Boc-Val-OH. La caracterización de la biblioteca se realizó según se explica en Materiales y Métodos 6.2.4.

**AAA:** Asp: 4.0 (4.0), Thr: 0.2 (0.3), Ser: 1.2 (2.0), Glu: 3.3 (3.5), Ala: 4.4 (4.3), Val: 0.2 (0.2), Leu: 1.3 (1.4), Phe: 0.9 (0.8), Lys: 3.5 (3.2), Pro: 2.3 (2.4). **ESI-MS (Anexo, página 213):** inicio espectro= 1158 (esperado 1150.0 m/z); final espectro 1269 (esperado 1268 m/z). **Péptidos individuales analizados:** pico principal de secuencia correcta por MALDI-TOF PSD; pequeñas impurezas por delección de Asp y Phe.

## 6. Síntesis de los péptidos P1, P2 H3<sub>n</sub> y H3<sub>a</sub>

La síntesis de los péptidos se realizó en paralelo y de forma automática, siguiendo un esquema de protección Fmoc/tBu (Materiales y Métodos 5.2). Se emplearon 137 mg de resina Rink amida ( $f_i = 0.7$  mmol/g) para la síntesis de cada péptido. Los aminoácidos protegidos utilizados fueron: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH y Boc-Val-OH.

Acabada la síntesis, los extremos N-terminal de los péptidos fueron acetilados manualmente, empleando una mezcla de Ac<sub>2</sub>O (25 eq.) y piridina (25 eq.) en DMF (20 min de reacción). Finalmente se procedió a la desprotección de las cadenas laterales y escisión del enlace péptido-resina según se describe en Materiales y Métodos 4.2.4. Los crudos se purificaron por HPLC semipreparativo y los péptidos puros fueron liofilizados y almacenados a -20 °C.

**Péptido P1**: 57.5 mg. **Rendimiento síntesis**: 23.7 %. **Condiciones de purificación**: condiciones isocráticas del 15 % de B en A durante 5 min seguidas de un gradiente lineal del 15 al 40 % de B en A durante 60 min; flujo 10 mL/min; detección por UV a 220 nm; velocidad de colección de fracciones: 30 seg/fracción. **Pureza**: >95 %. **HPLC (t<sub>R</sub>)**= 8.0 min (gradiente lineal del 15 al 40 % de B en A en 15 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). **AAA**: Asp: 4.2 (4.0), Ser: 0.9 (1.0), Glu: 3.2 (3), Ala: 4.9 (5), Leu: 1.9 (2), Phe: 1.0 (1), Lys: 3.9 (4), Pro: 1.8 (2). **MALDI-TOF**: (M+H)<sup>+</sup>= 2425.6 (esperado 2425.3 m/z). **MALDI-TOF PSD (fragmentos b<sub>n</sub> y y<sub>n</sub>)**: b<sub>22</sub>= 2410.3 (esperado 2409.7 m/z, *average*), b<sub>20</sub>= 2180.4 (esperado 2184.4 m/z, *average*), b<sub>19</sub>= 2113.3 (esperado 2113.3 m/z, *average*), b<sub>18</sub>= 1986.8 (esperado 1985.2 m/z, *average*), b<sub>17</sub>= 1913.7 (esperado 1914.1 m/z, *average*), b<sub>16</sub>= 1799.9 (esperado 1799.0 m/z, *average*), b<sub>15</sub>= 1684.2 (esperado 1684.9 m/z, *average*), b<sub>14</sub>= 1572.3 (esperado 1571.8 m/z, *average*), b<sub>9</sub>= 1045.2 (esperado 1043.5 m/z, *monoisotópico*), b<sub>5</sub>= 617.2 (esperado 617.3 m/z, *monoisotópico*), b<sub>4</sub>= 470.4 (esperado 470.2 m/z, *monoisotópico*), y<sub>21</sub>= 2271.4 (esperado 2269.6 m/z, *average*), y<sub>19</sub>= 2085.7 (esperado 2085.4 m/z, *average*), y<sub>18</sub>= 1958.8 (esperado 1957.3 m/z, *average*), y<sub>17</sub>= 1811.2 (esperado 1810.1 m/z, *average*), y<sub>16</sub>= 1740.8 (esperado 1739.0 m/z, *average*), y<sub>15</sub>= 1625.0 (esperado 1624.9 m/z, *average*), y<sub>14</sub>= 1498.5 (esperado 1496.8 m/z, *average*), y<sub>13</sub>= 1383.7 (esperado 1382.8 m/z, *monoisotópico*), y<sub>12</sub>= 1313.6 (esperado 1311.7 m/z, *monoisotópico*), y<sub>11</sub>= 1182.7 (esperado 1182.7 m/z, *monoisotópico*), y<sub>10</sub>= 1113.0 (esperado 1111.7 m/z, *monoisotópico*), y<sub>9</sub>= 986.0 (esperado 983.6 m/z, *monoisotópico*), y<sub>8</sub>= 856.3 (esperado 855.5 m/z, *monoisotópico*), y<sub>7</sub>= 744.2 (esperado 742.4 m/z, *monoisotópico*), y<sub>6</sub>= 627.9 (esperado 628.3 m/z, *monoisotópico*), y<sub>5</sub>= 512.7 (esperado 513.3 m/z, *monoisotópico*).

**Péptido P2**: 70.5 mg. **Rendimiento síntesis**: 29.0 %. **Condiciones de purificación**: condiciones isocráticas del 15 % de B en A durante 5 min seguidas de un gradiente lineal del 15 al 40 % de B en A durante 60 min; flujo 10 mL/min; detección por UV a 220 nm; velocidad de colección de fracciones: 30 seg/fracción. **Pureza**: >95 %. **HPLC (t<sub>R</sub>)**= 11.1 min (gradiente lineal

del 15 al 40 % de B en A en 15 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). **AAA:** Asp: 3.9 (4.0), Ser: 0.7 (1.0), Glu: 3.1 (3), Ala: 5.0 (5), Val: 0.9 (1), Leu: 2.1 (2), Phe: 1.0 (1), Lys: 3.0 (3), Pro: 1.7 (2). **MALDI-TOF:** (M+H)<sup>+</sup>= 2396.2 (esperado 2396.3 m/z). **MALDI-TOF PSD (fragmentos  $b_n$  y  $y_n$ ):**  $b_{22}$ = 2380.6 (esperado 2380.7 m/z, *average*),  $b_{20}$ = 2154.3 (esperado 2155.4 m/z, *average*),  $b_{19}$ = 2084.5 (esperado 2084.3 m/z, *average*),  $b_{18}$ = 1957.5 (esperado 1956.2 m/z, *average*),  $b_{17}$ = 1884.5 (esperado 1885.1 m/z, *average*),  $b_{16}$ = 1770.8 (esperado 1770.0 m/z, *average*),  $b_{15}$ = 1655.1 (esperado 1655.9 m/z, *average*),  $b_{14}$ = 1543.3 (esperado 1542.7 m/z, *average*),  $b_8$ = 901.7 (esperado 901.4 m/z, *monoisotópico*),  $b_7$ = 802.0 (esperado 802.3 m/z, *monoisotópico*),  $b_6$ = 687.9 (esperado 688.3 m/z, *monoisotópico*),  $b_5$ = 617.8 (esperado 617.3 m/z, *monoisotópico*),  $b_4$ = 469.5 (esperado 470.2 m/z, *monoisotópico*),  $y_{21}$ = 2242.1 (esperado 2240.6 m/z, *average*),  $y_{19}$ = 2056.8 (esperado 2056.4 m/z, *average*),  $y_{18}$ = 1929.8 (esperado 1928.2 m/z, *average*),  $y_{17}$ = 1781.9 (esperado 1781.1 m/z, *average*),  $y_{16}$ = 1711.6 (esperado 1710.0 m/z, *average*),  $y_{15}$ = 1595.9 (esperado 1595.9 m/z, *average*),  $y_{14}$ = 1498.5 (esperado 1496.8 m/z, *average*),  $y_{13}$ = 1383.7 (esperado 1382.8 m/z, *monoisotópico*),  $y_{12}$ = 1313.0 (esperado 1311.7 m/z, *monoisotópico*),  $y_{11}$ = 1182.5 (esperado 1182.7 m/z, *monoisotópico*),  $y_{10}$ = 1112.2 (esperado 1111.7 m/z, *monoisotópico*),  $y_9$ = 985.7 (esperado 983.6 m/z, *monoisotópico*),  $y_8$ = 856.3 (esperado 855.5 m/z, *monoisotópico*),  $y_7$ = 745.7 (esperado 742.4 m/z, *monoisotópico*),  $y_6$ = 628.8 (esperado 628.3 m/z, *monoisotópico*),  $y_5$ = 512.7 (esperado 513.3 m/z, *monoisotópico*).

**H<sub>3n</sub>:** 61.9 mg. **Rendimiento síntesis:** 26.4 %. **Condiciones de purificación:** condiciones isocráticas del 15 % de B en A durante 5 min seguidas de un gradiente lineal del 15 al 40 % de B en A durante 60 min; flujo 10 mL/min; detección por UV a 220 nm; velocidad de colección de fracciones: 30 seg/fracción. **Pureza:** >95 %. **HPLC (t<sub>R</sub>)**= 8.9 min (gradiente lineal del 15 al 40 % de B en A en 15 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). **AAA:** Asp: 4.2 (4.0), Ser: 1.7 (2.0), Glu: 3.2 (3), Ala: 4.9 (5), Leu: 2.9 (3), Lys: 3.0 (3), Pro: 1.7 (2). **MALDI-TOF:** (M+H)<sup>+</sup>= 2349.9 (esperado 2350.2 m/z). **MALDI-TOF PSD (fragmentos  $b_n$  y  $y_n$ ):**  $b_{22}$ = 2333.1 (esperado 2334.6 m/z, *average*),  $b_{20}$ = 2107.6 (esperado 2109.3 m/z, *average*),  $b_{19}$ = 2037.9 (esperado 2038.2 m/z, *average*),  $b_{18}$ = 1910.9 (esperado 1910.1 m/z, *average*),  $b_{17}$ = 1838.0 (esperado 1839.0 m/z, *average*),  $b_{16}$ = 1724.6 (esperado 1723.9 m/z, *average*),  $b_{15}$ = 1608.8 (esperado 1609.8 m/z, *average*),  $b_{14}$ = 1497.1 (esperado 1496.7 m/z, *average*),  $b_{13}$ = 1368.8 (esperado 1367.7 m/z, *monoisotópico*),  $b_8$ = 855.7 (esperado 855.4 m/z, *monoisotópico*),  $b_7$ = 743.8 (esperado 742.3 m/z, *monoisotópico*),  $b_6$ = 628.2 (esperado 628.3 m/z, *monoisotópico*),  $b_5$ = 558.4 (esperado 557.2 m/z, *monoisotópico*),  $b_4$ = 469.0 (esperado 470.2 m/z, *monoisotópico*),  $y_{21}$ = 2195.5 (esperado 2194.5 m/z, *average*),  $y_{19}$ = 2010.4 (esperado 2010.3 m/z, *average*),  $y_{18}$ = 1880.7 (esperado 1882.2 m/z, *average*),  $y_{17}$ = 1794.7 (esperado 1795.1 m/z, *average*),  $y_{16}$ = 1724.6 (esperado 1724.0 m/z, *average*),  $y_{15}$ = 1608.8 (esperado 1609.9 m/z, *average*),  $y_{14}$ = 1497.1 (esperado 1496.8 m/z, *average*),  $y_{13}$ = 1382.6 (esperado 1382.8 m/z, *monoisotópico*),  $y_{12}$ = 1312.1 (esperado 1311.7 m/z, *monoisotópico*),  $y_{11}$ = 1184.7 (esperado 1182.7 m/z, *monoisotópico*),  $y_{10}$ = 1111.8 (esperado 1111.7 m/z, *monoisotópico*),  $y_9$ = 985.2 (esperado 983.6 m/z, *monoisotópico*),  $y_8$ = 855.7 (esperado 855.5 m/z, *monoisotópico*),  $y_7$ = 743.8 (esperado 742.4 m/z, *monoisotópico*),  $y_6$ = 628.2 (esperado 628.3 m/z, *monoisotópico*),  $y_5$ = 515.2 (esperado 513.3 m/z, *monoisotópico*).

**H3<sub>a</sub>**: 92.3 mg. **Rendimiento síntesis**: 39 %. **Condiciones de purificación**: condiciones isocráticas del 15 % de B en A durante 5 min seguidas de un gradiente lineal del 15 al 40 % de B en A durante 60 min; flujo 10 mL/min; detección por UV a 220 nm; velocidad de colección de fracciones: 30 seg/fracción. **Pureza**: >95 %. **HPLC (t<sub>R</sub>)**= 7.2 min (gradiente lineal del 15 al 40 % de B en A en 15 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm). **AAA**: Asp: 4.1 (4.0), Ser: 1.6 (2.0), Glu: 3.2 (3), Ala: 4.8 (5), Leu: 2.9 (3), Lys: 3.0 (3), Pro: 2.1 (2). **MALDI-TOF**: (M+H)<sup>+</sup>= 2350.4 (esperado 2350.2 m/z). **MALDI-TOF PSD (fragmentos b<sub>n</sub> y y<sub>n</sub>)**: b<sub>22</sub>= 2334.5 (esperado 2334.6 m/z, *average*), b<sub>20</sub>= 2136.2 (esperado 2134.4 m/z, *average*), b<sub>19</sub>= 2063.4 (esperado 2063.3 m/z, *average*), b<sub>18</sub>= 1950.7 (esperado 1949.2 m/z, *average*), b<sub>17</sub>= 1834.0 (esperado 1834.1 m/z, *average*), b<sub>16</sub>= 1764.2 (esperado 1763.0 m/z, *average*), b<sub>14</sub>= 1538.0 (esperado 1537.7 m/z, *average*), b<sub>13</sub>= 1426.3 (esperado 1423.7 m/z, *monoisotópico*), b<sub>12</sub>= 1310.5 (esperado 1309.7 m/z, *monoisotópico*), b<sub>11</sub>= 1182.6 (esperado 1181.6 m/z, *monoisotópico*), b<sub>9</sub>= 938.4 (esperado 939.5 m/z, *monoisotópico*), b<sub>6</sub>= 655.2 (esperado 656.3 m/z, *monoisotópico*), b<sub>5</sub>=570.5 (esperado 569.3 m/z, *monoisotópico*), b<sub>4</sub>= 497.7 (esperado 498.3 m/z, *monoisotópico*), b<sub>3</sub>= 371.4 (esperado 370.2 m/z, *monoisotópico*), y<sub>20</sub>= 2108.4 (esperado 2110.4 m/z, *average*), y<sub>19</sub>= 1983.1 (esperado 1982.2 m/z, *average*), y<sub>18</sub>= 1853.2 (esperado 1854.1 m/z, *average*), y<sub>17</sub>= 1783.3 (esperado 1783.0 m/z, *average*), y<sub>16</sub>= 1697.3 (esperado 1695.9 m/z, *average*), y<sub>14</sub>= 1484.8 (esperado 1483.7 m/z, *average*), y<sub>13</sub>= 1413.5 (esperado 1411.8 m/z, *monoisotópico*), y<sub>12</sub>= 1299.6 (esperado 1298.7 m/z, *monoisotópico*), y<sub>11</sub>= 1169.6 (esperado 1169.6 m/z, *monoisotópico*), y<sub>9</sub>= 926.7 (esperado 927.5 m/z, *monoisotópico*), y<sub>8</sub>= 815.5 (esperado 814.4 m/z, *monoisotópico*).

## **7. Secuenciación por análisis de la “escalera” de secuencias parciales marcadas isotópicamente**

### **7.1 Primera síntesis del control Phe-Gly-Val-εAhx-εAhx-Met unido a resina TentaGel**

La síntesis del péptido se realizó sobre 300 mg de resina TentaGel de funcionalización inicial 0.29 mmol/g. La síntesis se llevó a cabo de forma manual siguiendo un esquema de protección Fmoc/tBu (Materiales y Métodos 4.2). Los aminoácidos protegidos empleados fueron: Fmoc-εAhx-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH y Fmoc-Val-OH.

Los aminoácidos del espaciador se introdujeron de forma estándar, empleando 5 equivalentes de exceso y DIPCDI y HOBt como agentes de acoplamiento (1 h de reacción). A partir de aquí, tras la incorporación de cada aminoácido se procedió a la acetilación parcial de las cadenas en crecimiento, previa desprotección de su grupo α-amino. En esta primera síntesis la

“escalera” de secuencias parciales se generó empleando una mezcla 1:1 de  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}/(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  (0.1 eq.) y  $\text{Et}_3\text{N}$  como base (0.1 eq.), con una hora de reacción. Acabada la síntesis se procedió a la desprotección de las cadenas laterales del péptido (Materiales y Métodos 4.2.4) y al almacenamiento de la peptidil-resina.

La caracterización se realizó por análisis mediante MALDI-TOF del producto desanclado de 10 unidades de resina (Materiales y Métodos 9.2).

**H-Phe-Gly-Val- $\epsilon$ Ahx- $\epsilon$ Ahx-Hsl**: MALDI-TOF:  $(\text{M}+\text{H})^+= 631.0$  (esperado 631.4 m/z),  $(\text{M}+\text{Na})^+= 653.2$  (esperado 653.4 m/z).

**Ac-Phe-Gly-Val- $\epsilon$ Ahx- $\epsilon$ Ahx-Hsl/(d<sub>3</sub>)-Ac-Phe-Gly-Val- $\epsilon$ Ahx- $\epsilon$ Ahx-Hsl**: MALDI-TOF:  $(\text{M}+\text{H})^+= 673.3/676.3$  (esperado 673.4/676.4 m/z),  $(\text{M}+\text{Na})^+= 695.3/698.3$  (esperado 695.4/698.4 m/z).

**Ac-Gly-Val- $\epsilon$ Ahx- $\epsilon$ Ahx-Hsl/(d<sub>3</sub>)-Ac-Gly-Val- $\epsilon$ Ahx- $\epsilon$ Ahx-Hsl**: MALDI-TOF:  $(\text{M}+\text{H})^+= 526.3/529.3$  (esperado 526.3/529.3 m/z),  $(\text{M}+\text{Na})^+= 548.2/551.2$  (esperado 548.3/551.3 m/z).

**Ac-Val- $\epsilon$ Ahx- $\epsilon$ Ahx-Hsl/(d<sub>3</sub>)-Ac-Val- $\epsilon$ Ahx- $\epsilon$ Ahx-Hsl**: MALDI-TOF:  $(\text{M}+\text{H})^+= 469.3/472.3$  (esperado 469.3/472.3 m/z),  $(\text{M}+\text{Na})^+= 491.2/494.3$  (esperado 491.3/494.3 m/z).

## **7.2 Segunda síntesis del control Phe-Gly-Val- $\epsilon$ Ahx- $\epsilon$ Ahx-Met unido a resina TentaGel**

La segunda síntesis del péptido control se realizó sobre 300 mg de resina TentaGel de funcionalización 0.29 mmol/g, siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior excepto para la acetilación parcial de las cadenas en crecimiento. En esta segunda síntesis la acetilación se llevó a cabo por tratamiento de la peptidil-resina con una mezcla 1:1 de ácido acético/(d<sub>4</sub>)-ácido acético (0.1 eq.) y PyBOP/DIEA (3 eq.) como agentes de activación (1 h de reacción). Primero se añadió la mezcla de ácidos disuelta en la cantidad necesaria de DMF para suspender la resina y, tras la homogenización del sistema, se adicionaron los agentes de activación, también disueltos en un mínimo volumen de DMF.

El péptido se caracterizó por desanclaje del producto contenido en 10 unidades de resina y análisis por MALDI-TOF. El análisis del espectro para la búsqueda de los picos correspondientes a la “escalera” de secuencias parciales marcadas isotópicamente se realizó según Materiales y Métodos 9.2.

**H-Phe-Gly-Val- $\epsilon$ Ahx- $\epsilon$ Ahx-Hsl**: MALDI-TOF:  $(\text{M}+\text{H})^+= 631.4$  (esperado 631.4 m/z),  $(\text{M}+\text{Na})^+= 653.5$  (esperado 653.4 m/z).

**Ac-Phe-Gly-Val-εAhx-εAhx-Hsl/(d<sub>3</sub>)-Ac-Phe-Gly-Val-εAhx-εAhx-Hsl**: MALDI-TOF: (M+H)<sup>+</sup>= 673.3/676.3 (esperado 673.4/676.4 m/z), (M+Na)<sup>+</sup>= 695.3/698.3 (esperado 695.4/698.4 m/z).

**Ac-Gly-Val-εAhx-εAhx-Hsl/(d<sub>3</sub>)-Ac-Gly-Val-εAhx-εAhx-Hsl**: MALDI-TOF: (M+H)<sup>+</sup>= 526.2/529.2 (esperado 526.3/259.3 m/z), (M+Na)<sup>+</sup>= 548.2/551.3 (esperado 548.3/551.3 m/z).

**Ac-Val-εAhx-εAhx-Hsl/(d<sub>3</sub>)-Ac-Val-εAhx-εAhx-Hsl**: MALDI-TOF: (M+H)<sup>+</sup>= 469.3/472.3 (esperado 469.3/472.3 m/z).

### 7.3 Síntesis de la quimioteca L27-1

La síntesis de la quimioteca L27-1 se realizó sobre 300 mg de resina TentaGel de funcionalización inicial 0.29 mmol/g, siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos 6.4. Los aminoácidos protegidos empleados fueron: Fmoc-εAhx-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH y Fmoc-Val-OH.

La caracterización de los compuestos se llevó a cabo por análisis mediante MALDI-TOF de los productos desanclados individualmente de 30 unidades de resina. El análisis de los espectros para la búsqueda de los picos correspondientes a la “escalera” de secuencias parciales marcadas isotópicamente se realizó según Materiales y Métodos 9.2. El péptido contenido en todas las unidades de resina fue secuenciado satisfactoriamente (ver Anexo, páginas 214 a 217).

### 7.4 Síntesis de la quimioteca L27-2

La síntesis de la quimioteca L27-2 se realizó sobre 300 mg de resina TentaGel de funcionalización inicial 0.29 mmol/g, siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos 6.4. Los aminoácidos protegidos empleados fueron: Fmoc-εAhx-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH y Fmoc-Trp(Boc)-OH.

La caracterización de los compuestos se llevó a cabo por análisis mediante MALDI-TOF de los productos desanclados individualmente de 27 unidades de resina. El análisis de los espectros para la búsqueda de los picos correspondientes a la “escalera” de secuencias parciales marcadas isotópicamente se realizó según Materiales y Métodos 9.2. El péptido contenido en 23 de las 27 unidades de resina analizadas fue secuenciado satisfactoriamente (ver Anexo, páginas 218 a 221).

## 7.5 Síntesis de la quimioteca L6

La síntesis de la quimioteca L6 se realizó sobre 300 mg de resina TentaGel de funcionalización inicial 0.29 mmol/g, siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos 6.4. Los aminoácidos protegidos empleados fueron: Fmoc- $\epsilon$ Ahx-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH y Fmoc-Val-OH.

La caracterización de los compuestos se llevó a cabo por análisis mediante MALDI-TOF de los productos desanclados individualmente de 8 unidades de resina. El análisis de los espectros para la búsqueda de los picos correspondientes a la “escalera” de secuencias parciales marcadas isotópicamente se realizó según Materiales y Métodos 9.2. El péptido contenido en todas las unidades de resina analizadas fue secuenciado satisfactoriamente.

## 8. Bibliografía

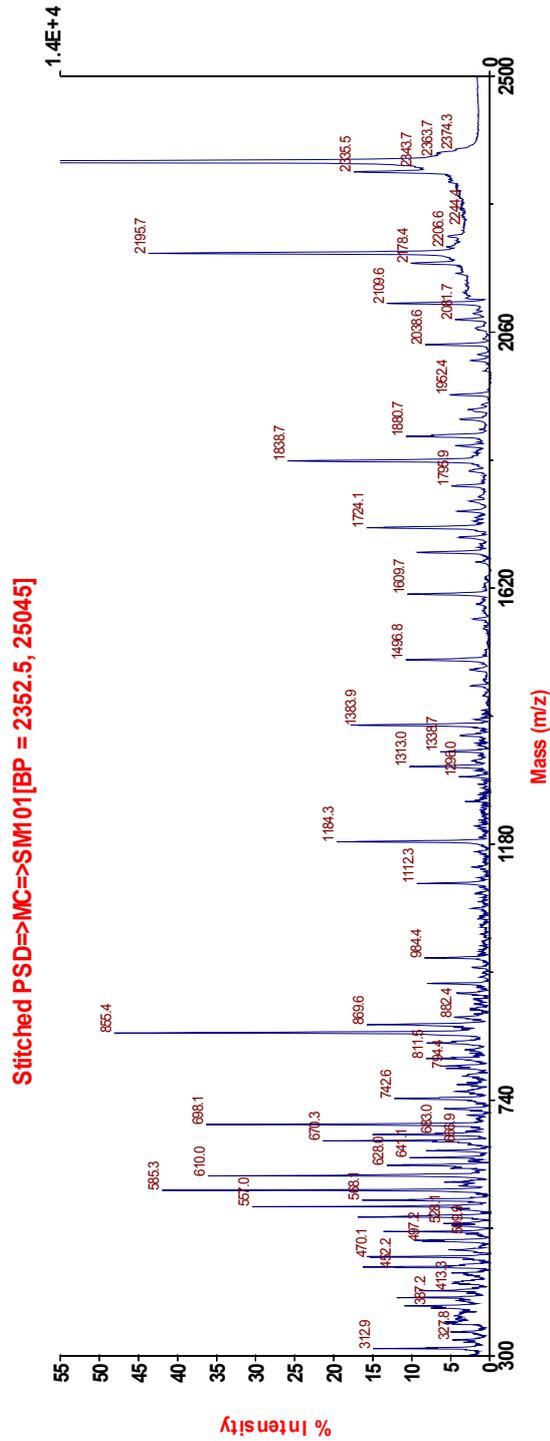
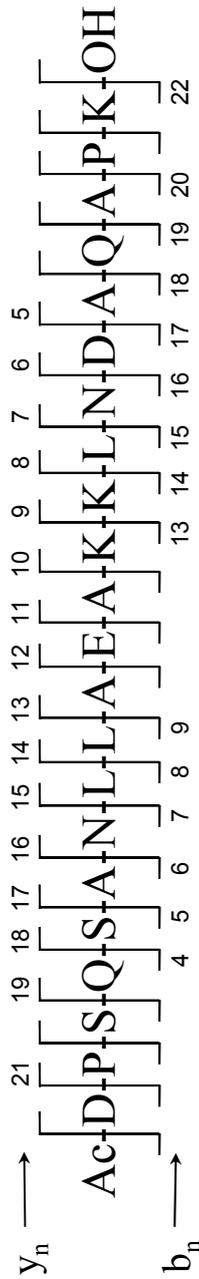
- <sup>1</sup> a) Nicolás, E.; Clemente, J.; Perelló, M.; Albericio, F.; Pedroso, E.; Giralt, E. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2183-2186; b) Nicolás, E.; Clemente, J.; Ferrer, T.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3179-3194
- <sup>2</sup> a) Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1775-1778; b) Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1449-1458; c) Albericio, F.; Cruz, M.; Debethune, L.; Eritja, R.; Giralt, E.; Grandas, A.; Marchan, V.; Pastor, J. J.; Pedroso, E.; Rabanal, F.; Royo, M. *Synthetic Commun.* **2001**, *31*, 225-232
- <sup>3</sup> a) Gairí, M.; Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7363-7366; b) Alsina, J.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4195-4198

**Anexo**

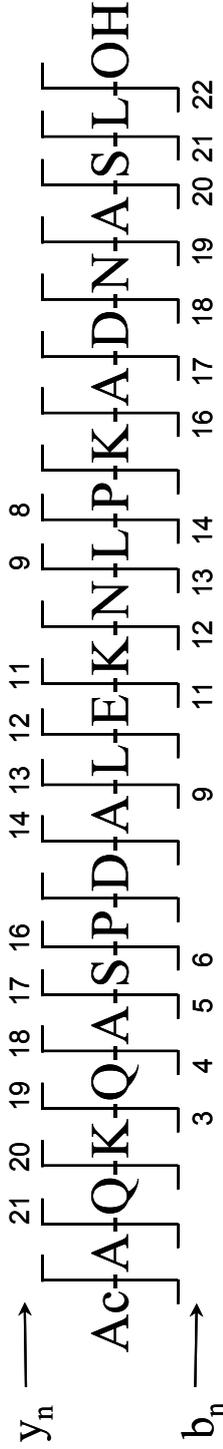


# 1. MALDI-TOF PSD de los péptidos H3<sub>n</sub> y H3<sub>a</sub> unidos a HMFS-PEGA

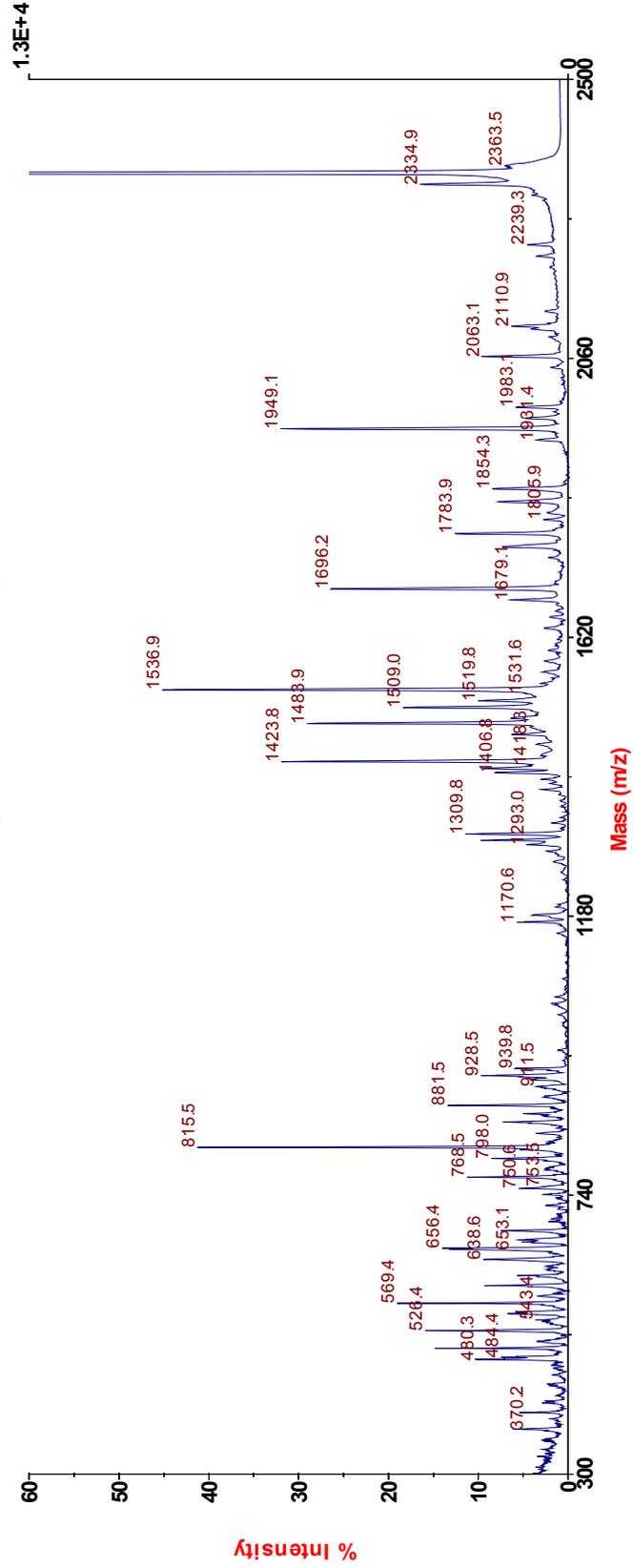
## 1.1 H3<sub>n</sub>



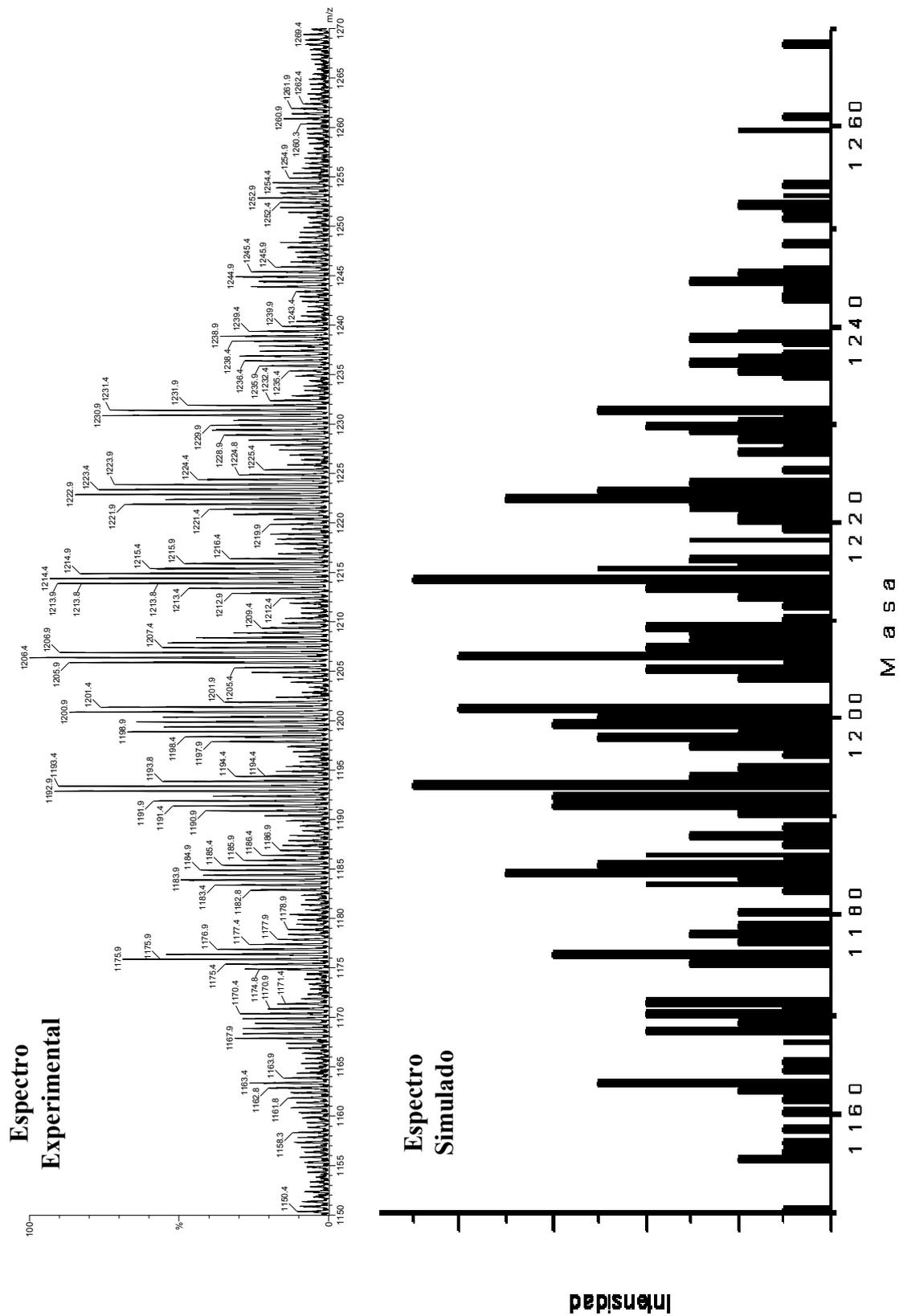
1.2  $H3_n$



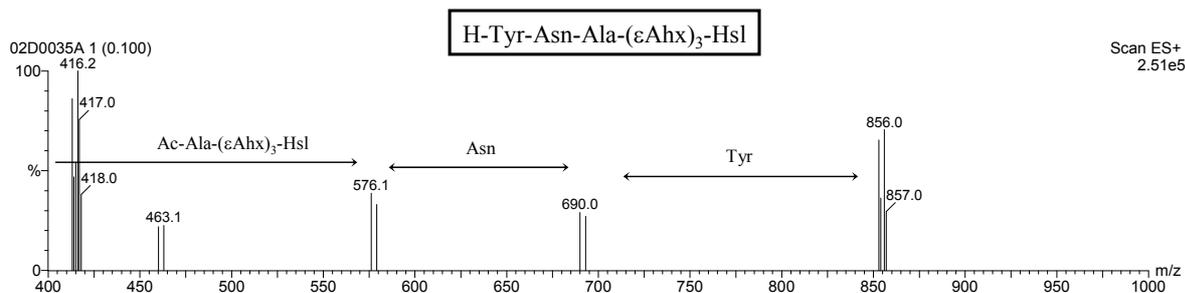
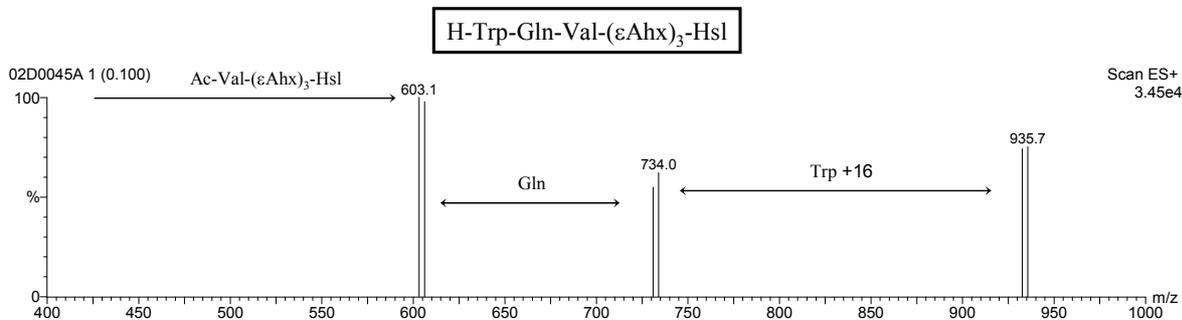
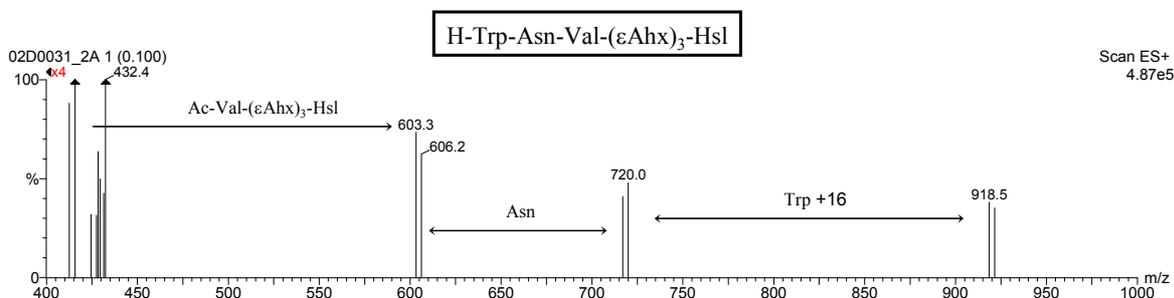
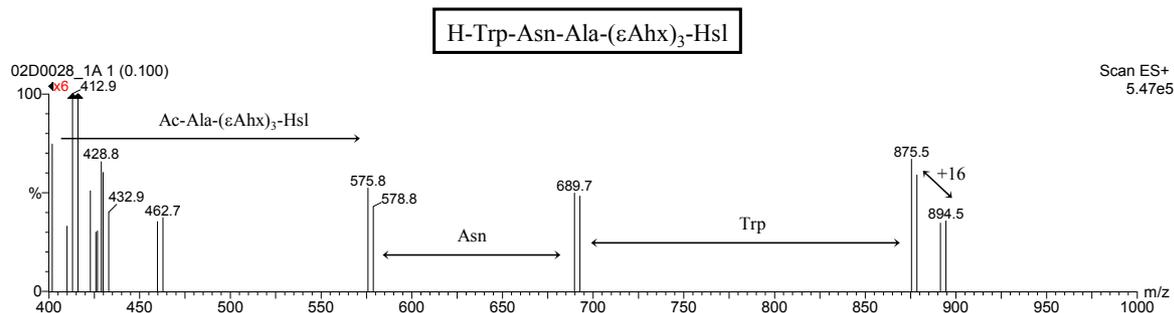
Stitched PSD MC=>SM 125[BP = 2352.0, 21563]



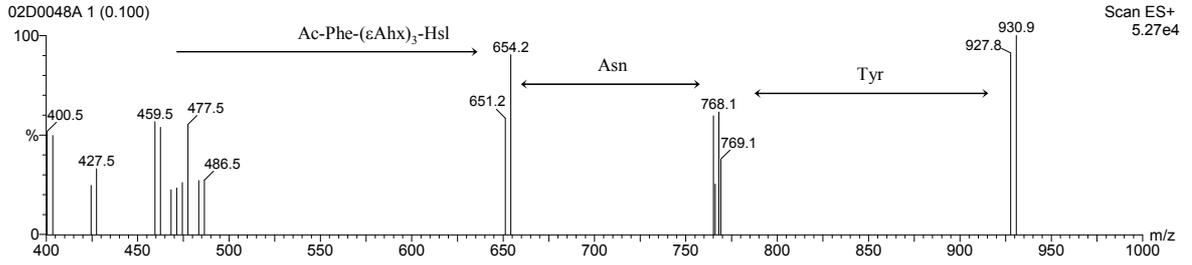
## 2. ESI-MS de la quimioteca L300



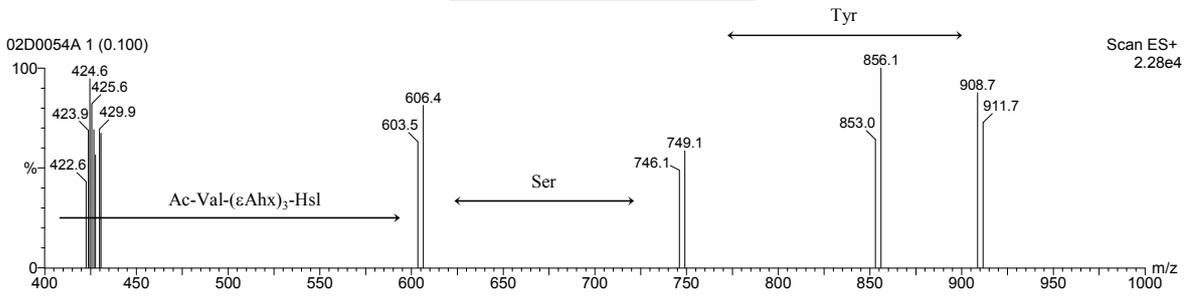
### 3. Quimioteca L27-1



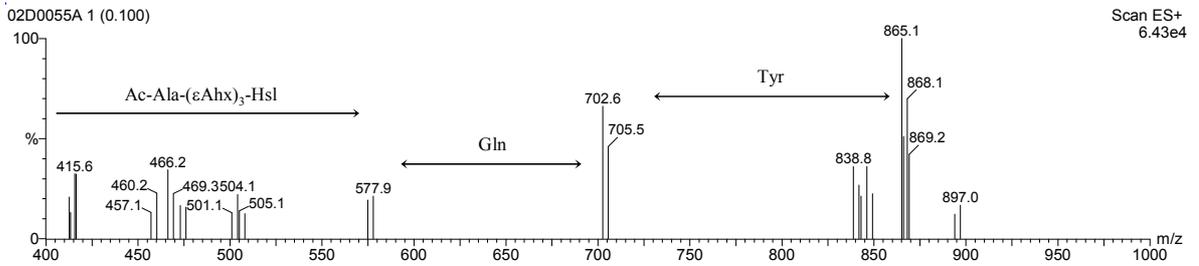
H-Tyr-Asn-Phe-(εAhx)<sub>3</sub>-Hsl



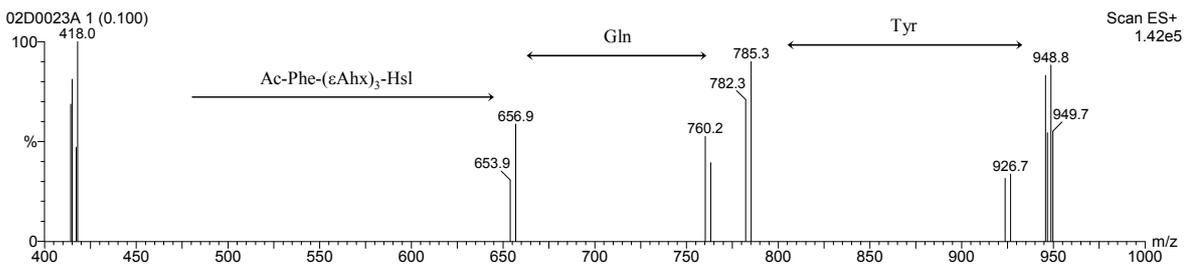
H-Tyr-Ser-Val-(εAhx)<sub>3</sub>-Hsl



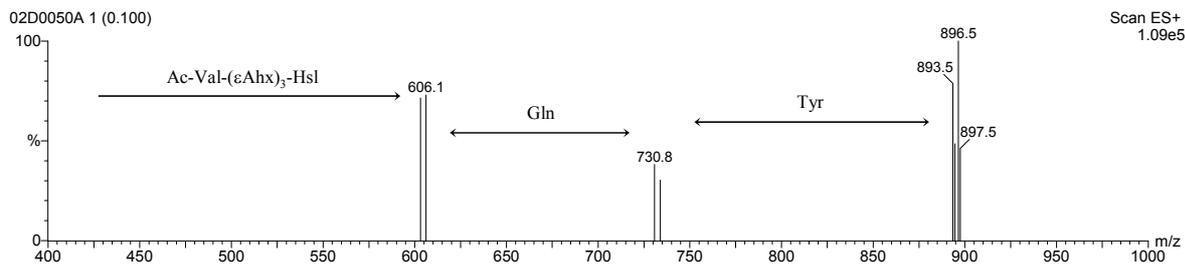
H-Tyr-Gln-Ala-(εAhx)<sub>3</sub>-Hsl



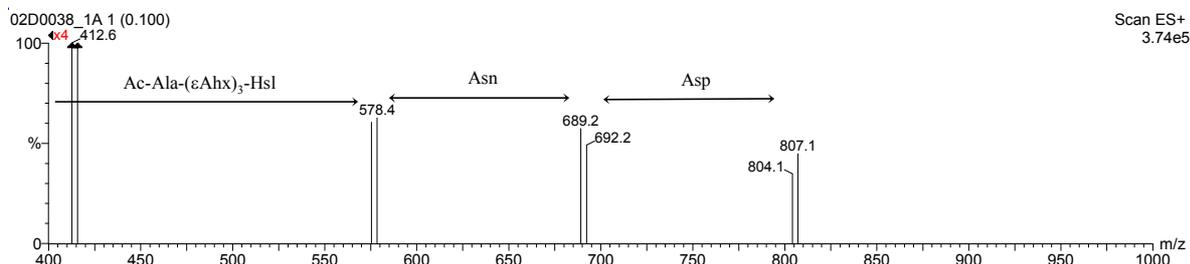
H-Tyr-Gln-Phe-(εAhx)<sub>3</sub>-Hsl



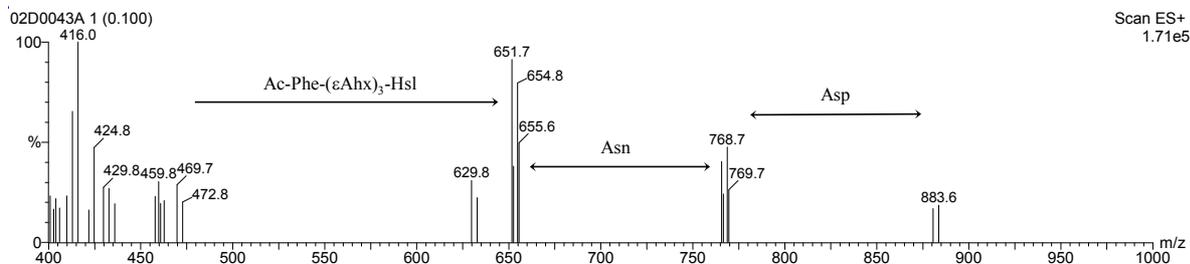
### H-Tyr-Gln-Val-( $\epsilon$ Ahx)<sub>3</sub>-Hsl



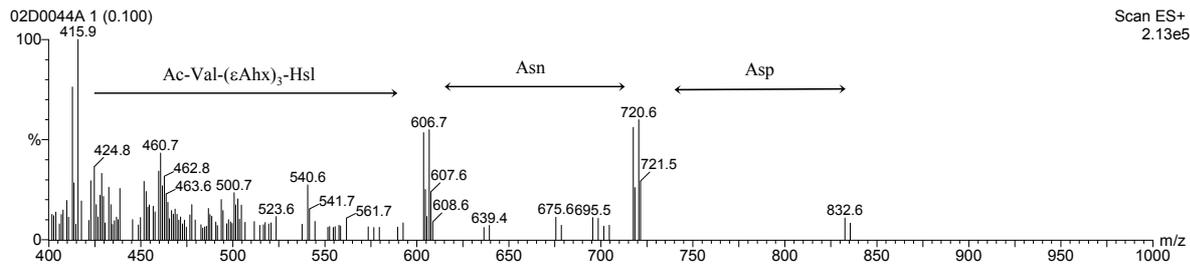
### H-Asp-Asn-Ala-( $\epsilon$ Ahx)<sub>3</sub>-Hsl

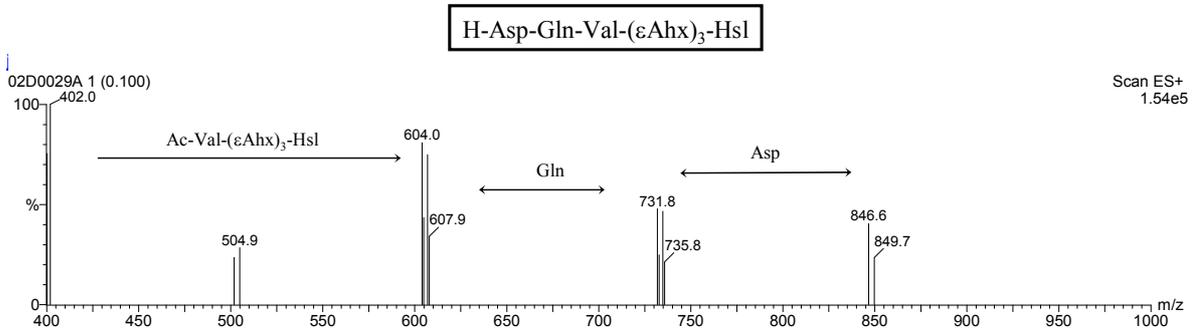
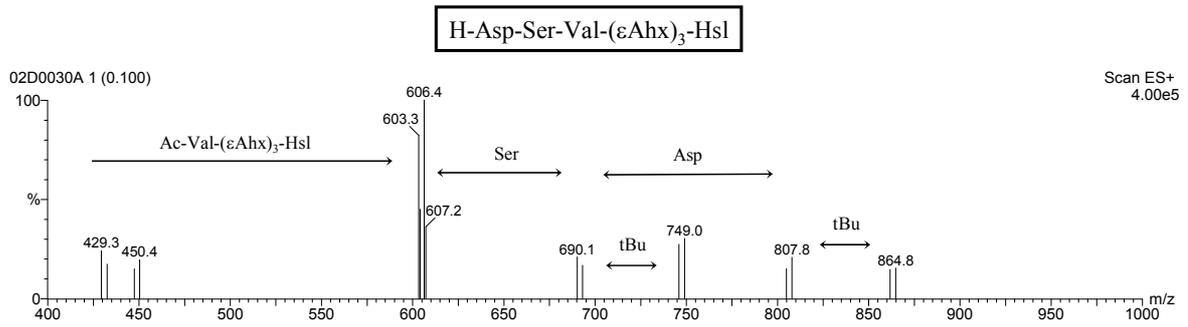
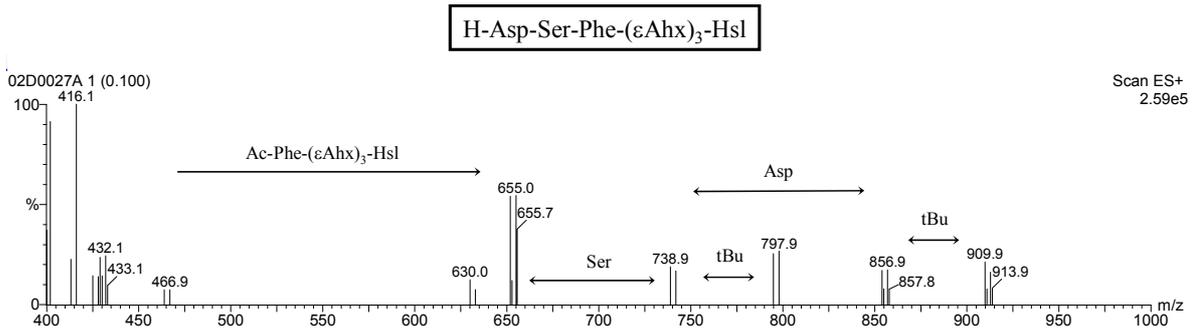


### H-Asp-Asn-Phe-( $\epsilon$ Ahx)<sub>3</sub>-Hsl

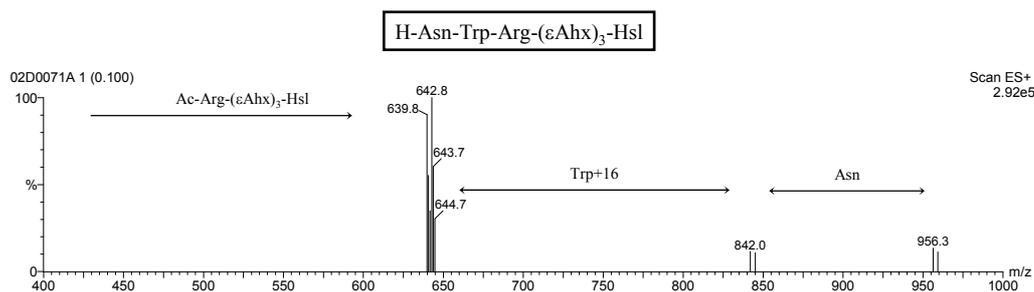
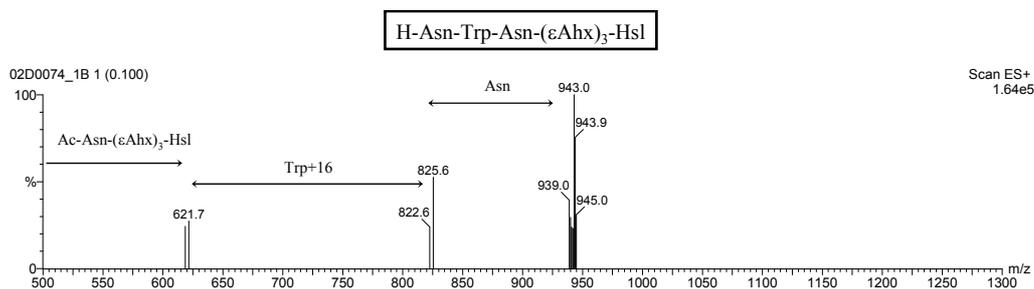


### H-Asp-Asn-Val-( $\epsilon$ Ahx)<sub>3</sub>-Hsl





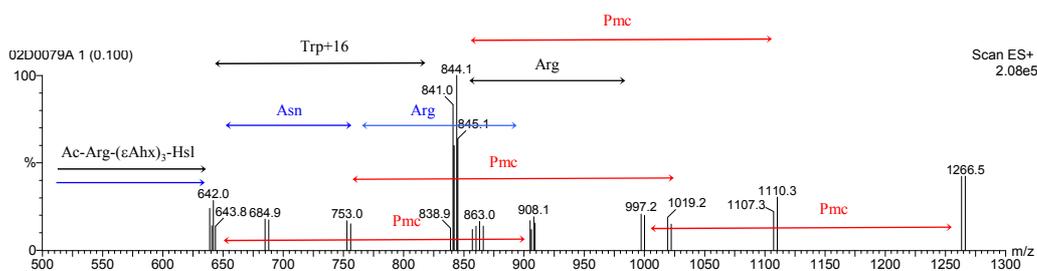
## 4. Quimioteca L27-2



H-Arg-Trp-Arg-( $\epsilon$ Ahx)<sub>3</sub>-Hsl

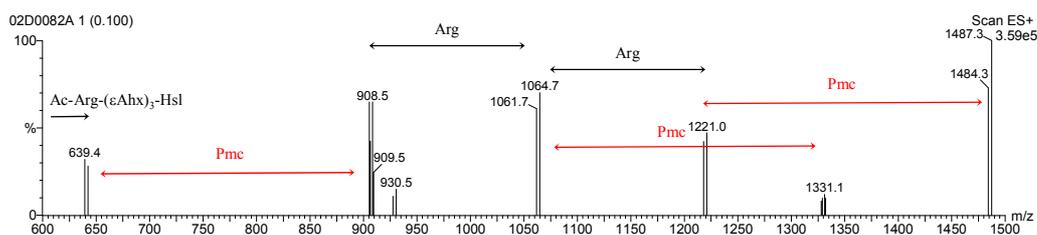
H-Arg-Asn-Arg-( $\epsilon$ Ahx)<sub>3</sub>-Hsl

— Péptido 1  
 — Péptido 2  
 — Reacciones Secundarias

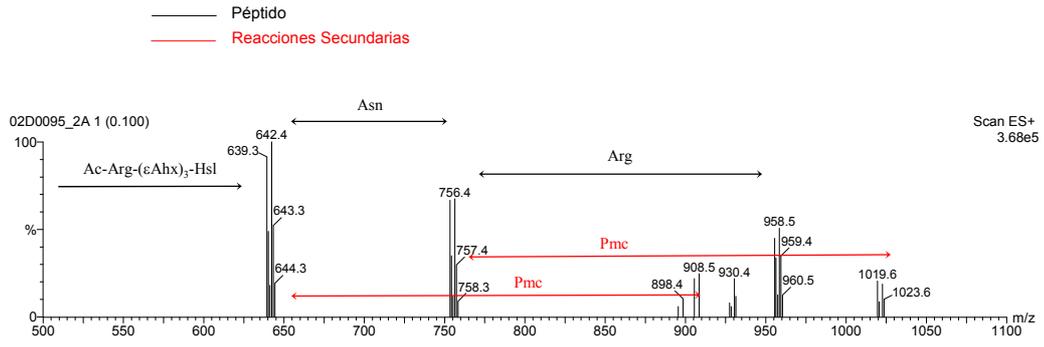


H-Arg-Arg-Arg-( $\epsilon$ Ahx)<sub>3</sub>-Hsl

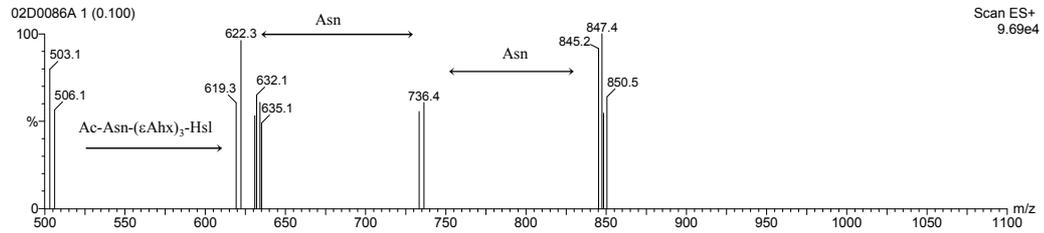
— Péptido  
 — Reacciones Secundarias



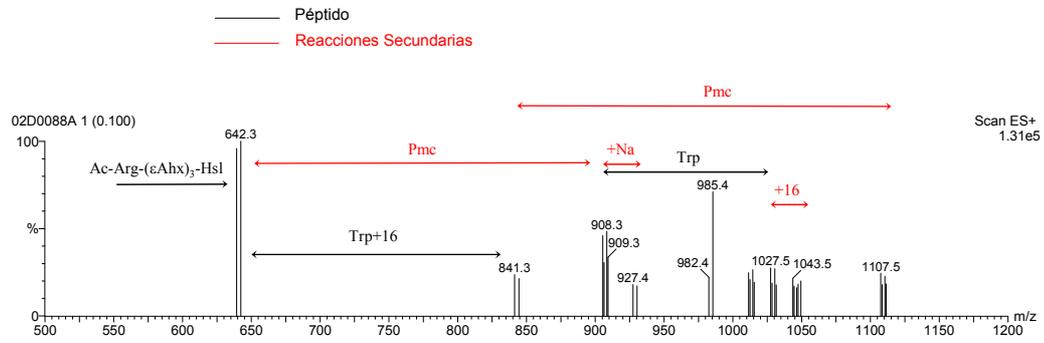
H-Arg-Asn-Arg-(εAhx)<sub>3</sub>-Hsl



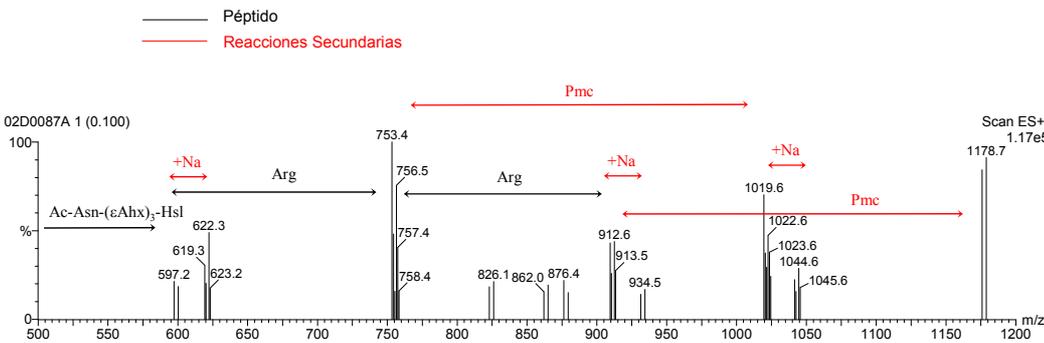
H-Asn-Asn-Asn-(εAhx)<sub>3</sub>-Hsl



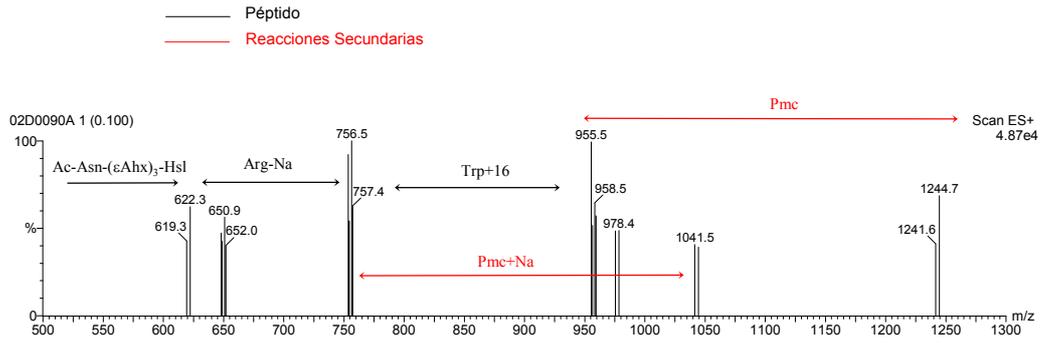
H-Trp-Trp-Arg-(εAhx)<sub>3</sub>-Hsl



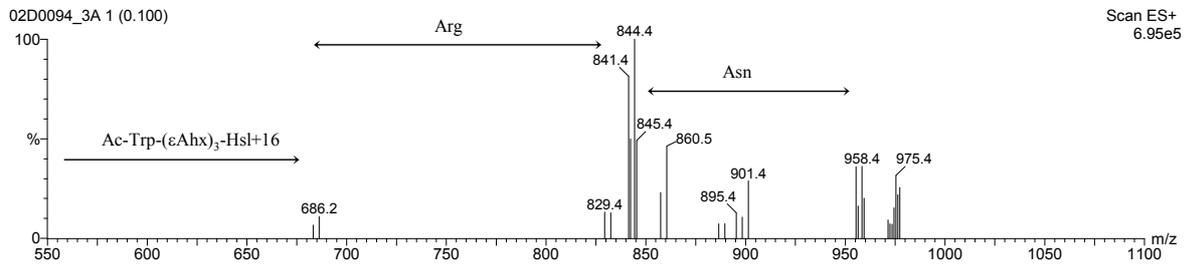
H-Arg-Arg-Asn-(εAhx)<sub>3</sub>-Hsl



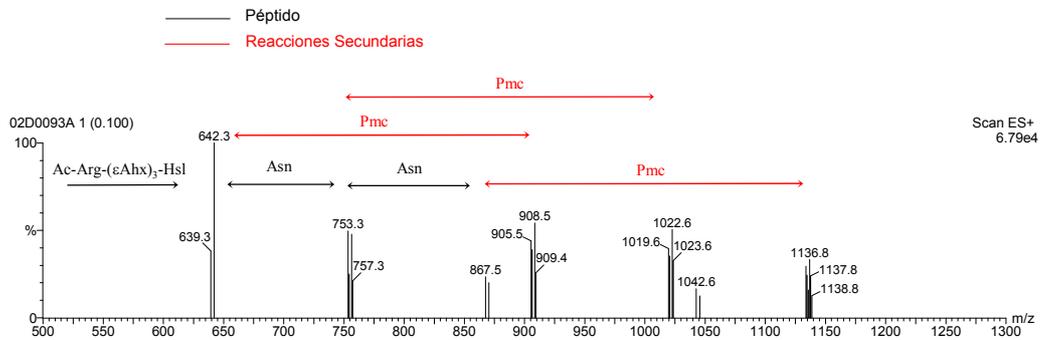
H-Trp-Arg-Asn-( $\epsilon$ Ahx)<sub>3</sub>-Hsl



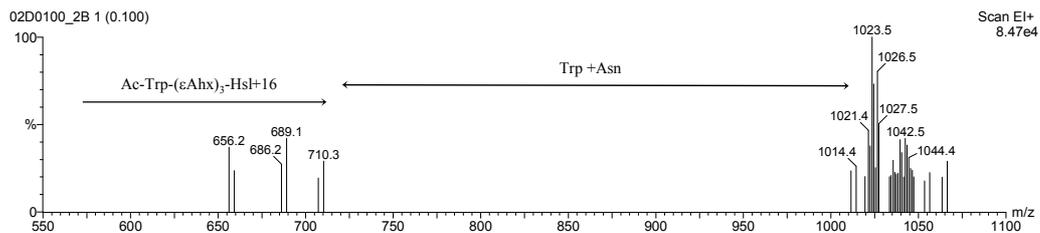
H-Asn-Arg-Trp-( $\epsilon$ Ahx)<sub>3</sub>-Hsl

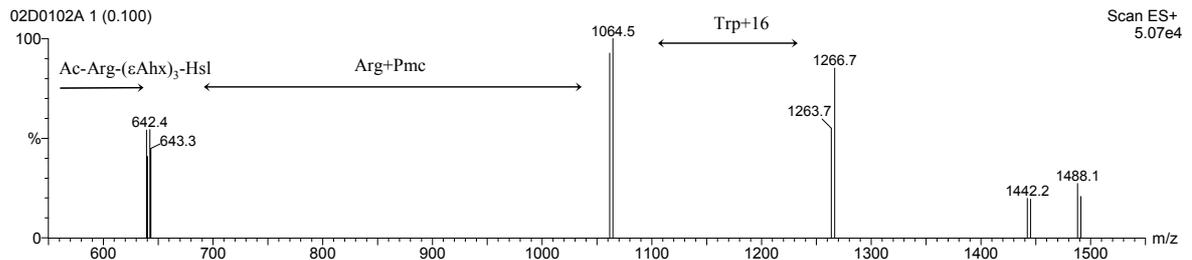
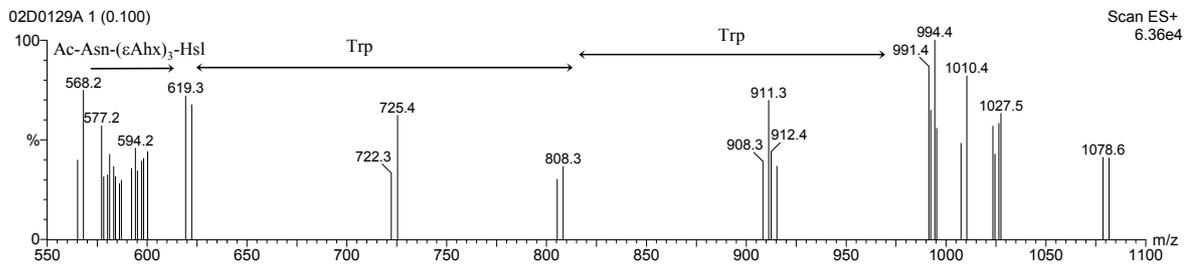


H-Asn-Asn-Arg-( $\epsilon$ Ahx)<sub>3</sub>-Hsl



H-(Asn,Trp)-Trp-( $\epsilon$ Ahx)<sub>3</sub>-Hsl

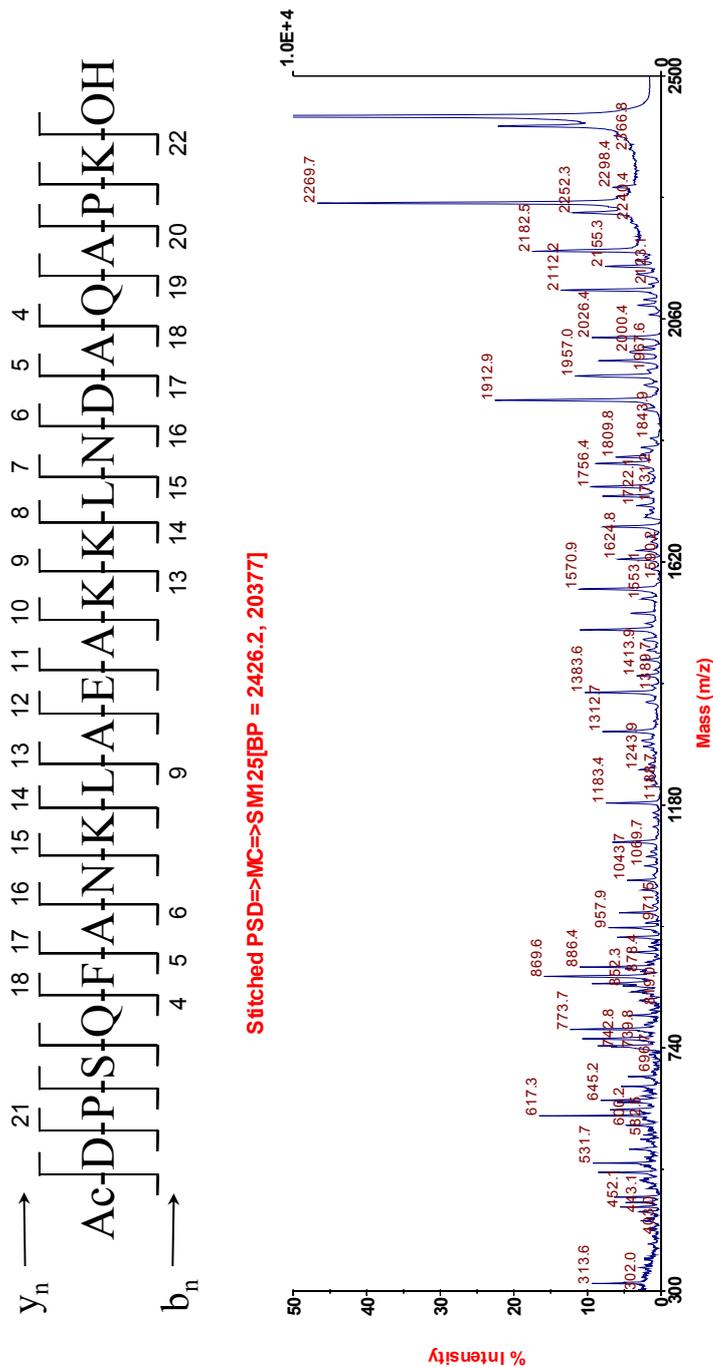


**H-Trp-Arg-Arg-( $\epsilon$ Ahx)<sub>3</sub>-Hsl****H-Trp-Trp-Asn-( $\epsilon$ Ahx)<sub>3</sub>-Hsl**

## 5. MALDI-TOF PSD de los péptidos activos de la quimioteca L300

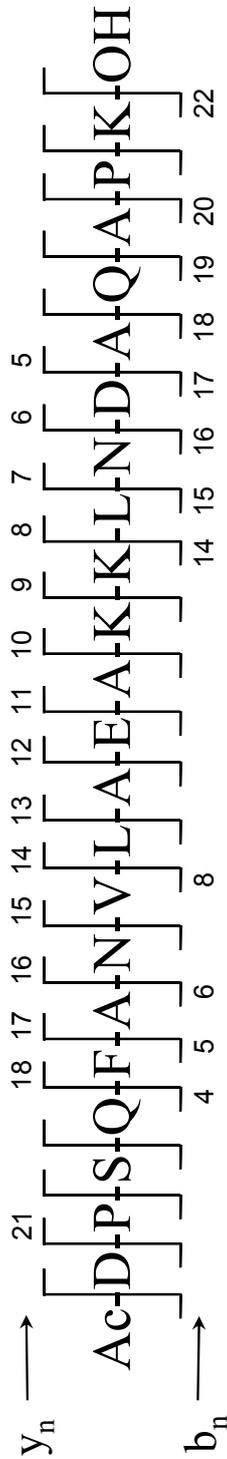
### 5.1 Positivo 1

Masa molecular experimental= 2426.0 (esperado 2426.3 m/z). Encontrado 11 veces de 53 unidades de resina positivas secuenciadas.

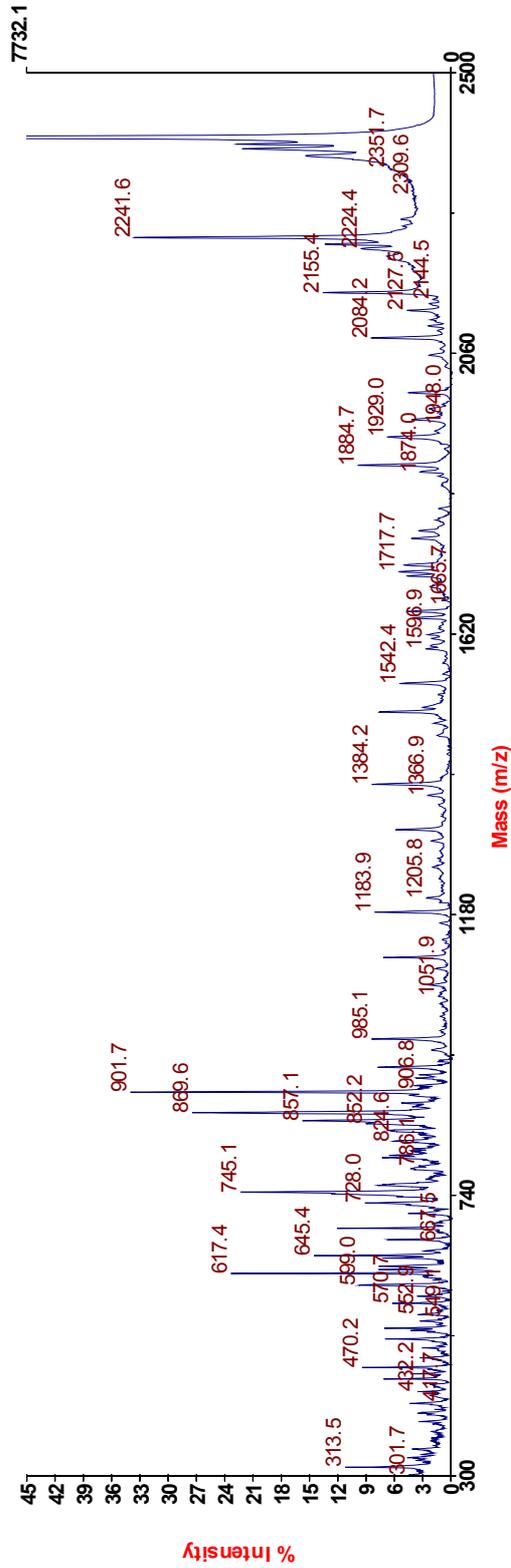


### 5.2 Positivo 2

Masa molecular experimental= 2397.3 (esperada 2397.3). Encontrado 11 veces de 53 unidades de resina positivas secuenciadas.

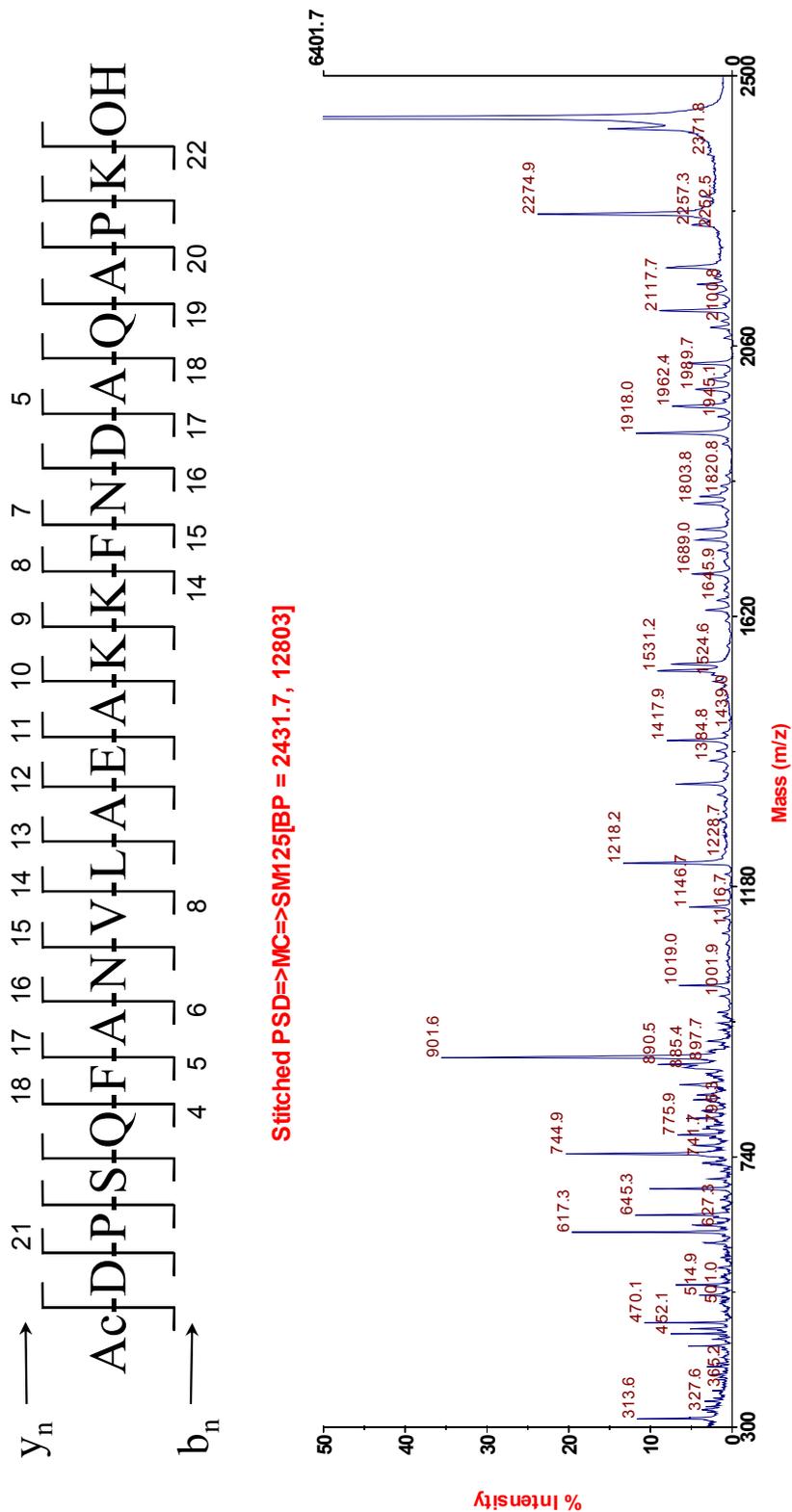


Stitched PSD=>MC=>SM101[BP = 2398.2, 17182]



### 5.3 Positivo 3

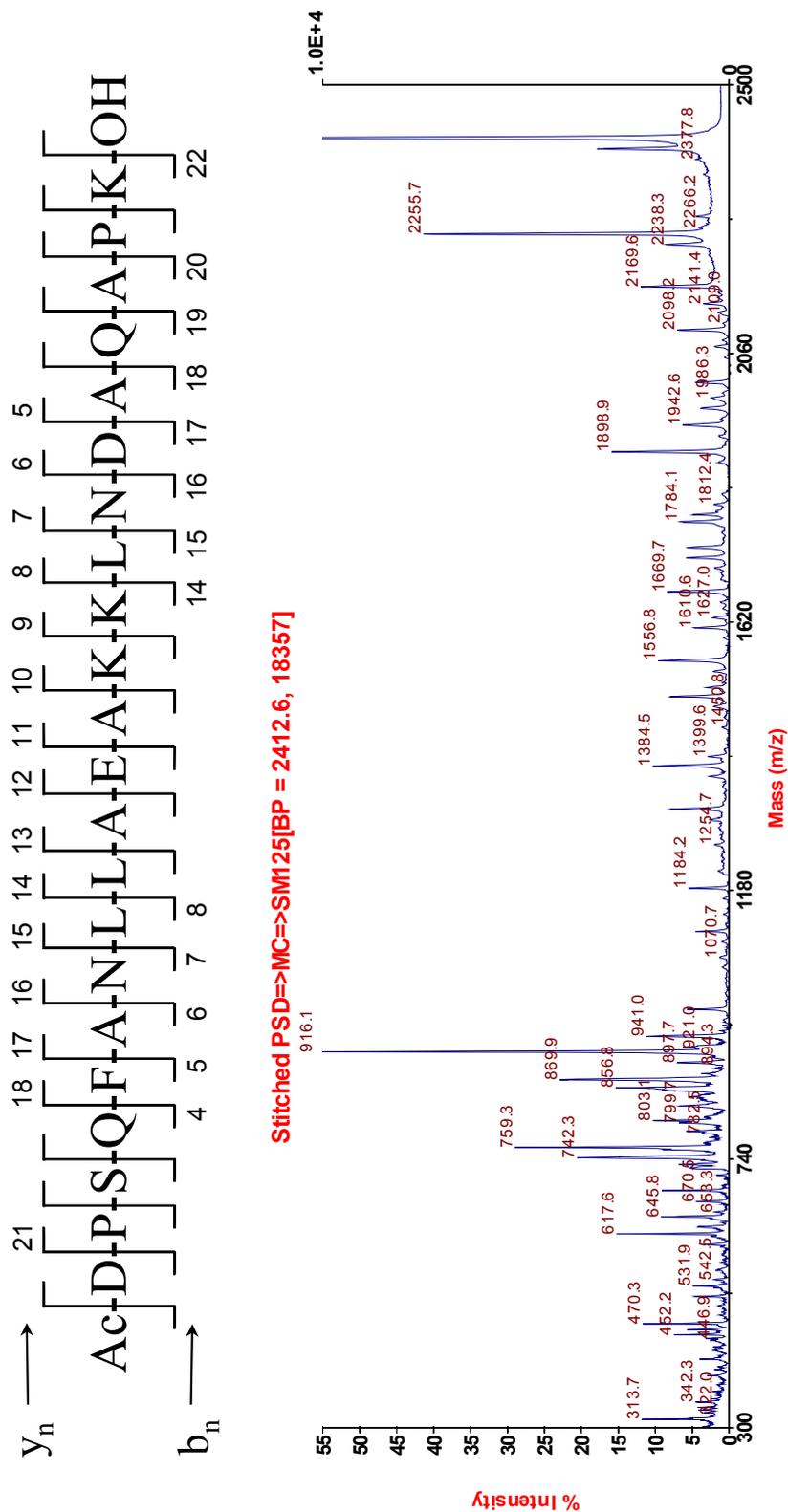
Masa molecular experimental= 2431.3 (esperada 2431.2). Encontrado 7 veces de 53 unidades de resina positivas secuenciadas.





### 5.5 Positivo 5

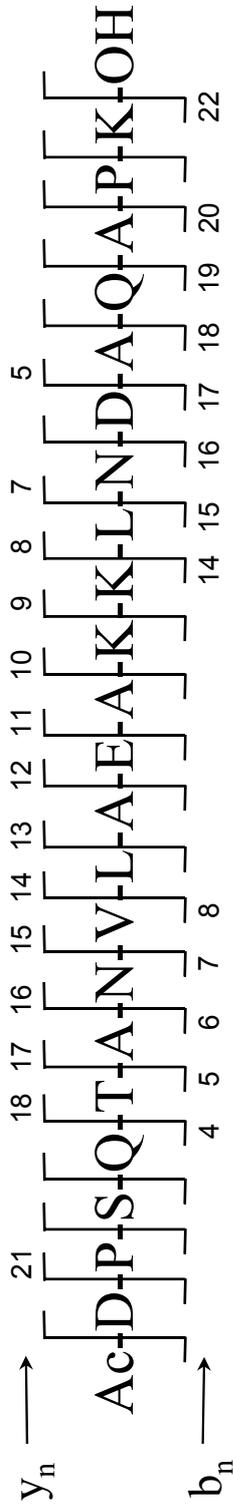
Masa molecular experimental= 2411.3 (esperada 2411.3). Encontrado 6 veces de 53 unidades de resina positivas secuenciadas.



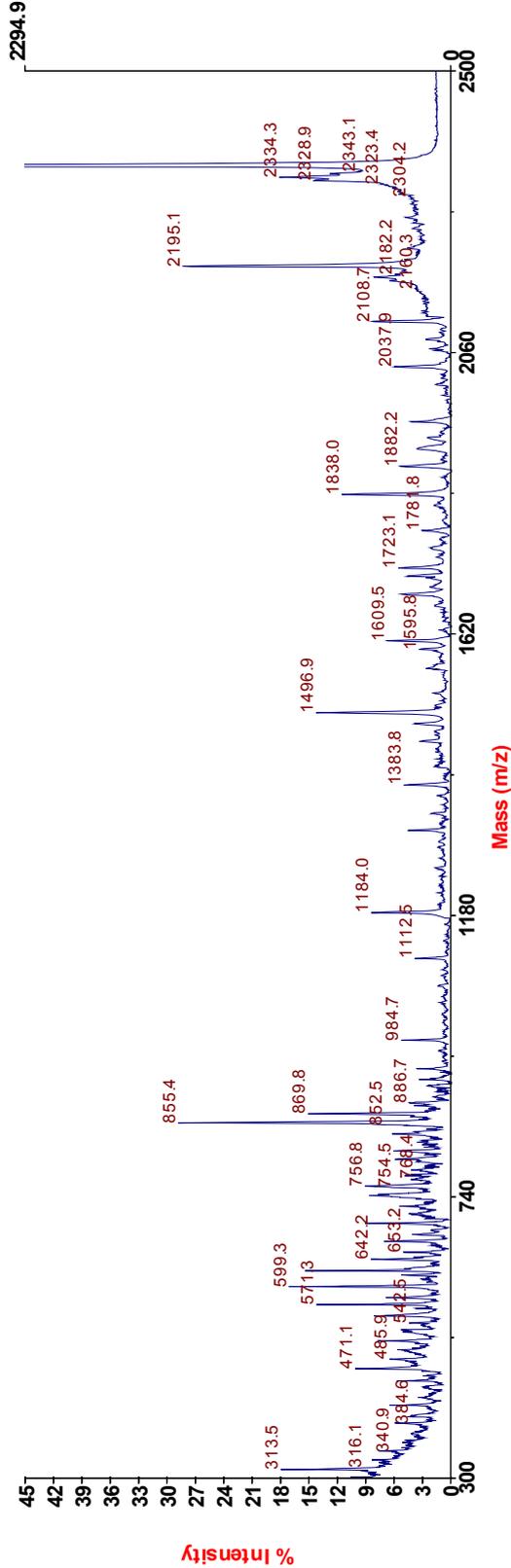


### 5.7 Positivo 7

Masa molecular experimental= 2351.4 (esperada 2351.2). Encontrado 4 veces de 53 unidades de resina positivas secuenciadas.



Stitched PSD=>MC=>SMI25[BP = 2352.1, 5100]





### **5.9 Positivo 9**

Péptido H3<sub>n</sub> (ver Anexo, página 208). Encontrado 1 veces de 53 unidades de resina positivas secuenciadas.