

Tesis Doctoral

DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTRUCTURA DE DOMINIOS
HELICOIDALES
INFLUENCIA DE LA INTRODUCCIÓN DE AMINOÁCIDOS D

Carmen Giovana Granados Ramírez



Departamento de Química Orgánica
Facultad de Química
Universidad de Barcelona
Barcelona, 2007

MATERIALES y EQUIPOS

5. MATERIALES Y EQUIPOS

5.1. Generales

5.1.1. Reactivos y disolventes

5.1.1.1. Resinas y amino ácidos protegidos:

Aminoácidos L y D protegidos para la síntesis de péptidos siguiendo el esquema de protección Boc/Bn. NovaBiochem, Iris Biotech, Neosystem, y Advanced ChemTech.

Aminoácidos protegidos L y D para la síntesis de péptidos siguiendo el esquema de protección Fmoc/tBu: NovaBiochem, Iris Biotech, Neosystem y Advanced ChemTech.

Resinas usadas en la síntesis de los péptidos: Resina Amino PL-PEGA (0,4 mmol/g, Polymer laboratories), Resina *p*-MBHA (0,66 mmol/g Novabiochem)

5.1.1.2. Derivados de aminoácidos para síntesis Boc

Boc-Ala-OH	Novabiochem
Boc-Arg(Tos)-OH	Novabiochem
Boc-Asn-OH	Novabiochem
Boc-Asp(OcHx)-OH	Novabiochem
Boc-Glu(OcHx)-OH	Novabiochem
Boc-Gln-OH	Novabiochem
Boc-Gly-OH	Novabiochem
Boc-His(Bom)-OH	Novabiochem
Boc-Ile-OH	Novabiochem
Boc-Leu-OH	Novabiochem
Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH	Novabiochem
Boc-Phe-OH	Novabiochem
Boc-Pro-OH	Novabiochem
Boc-Ser(Bzl)-OH	Novabiochem
Boc-Thr(Bzl)-OH	Novabiochem
Boc-Trp(For)-OH	Novabiochem
Boc-Tyr(2-Br-Z)-OH	Novabiochem
Boc-Val-OH	Novabiochem

5.1.1.3. Derivados de aminoácidos para síntesis Fmoc

Fmoc-Ala-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Asn(Trt)-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Cys(tBu)	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Gly-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-His(Trt)-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Ile-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Leu-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Met-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Phe-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Pro-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Ser(tBu)-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Trp(Boc)-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Val-OH	Iris Biotech GmbH

5.1.1.4. Disolventes:

Acetona	SDS
ACN	SDS
AcOH	Sharlau
Ácido fórmico	SDS
Agua	Desionizada y filtrada con el sistema MilliQ Plus (Millipore)
Cloroformo	SDS
DCM	Sharlau
Dioxano	Fluka
DMF	Sharlau
Et2O	Sharlau

Etanol absoluto	Sharlau
Metanol	Sharlau, SDS
NMP	Sigma
tert-butilmetiléter	Sharlau
TFA	SDS
TFE	Fluka

5.1.1.5. Reactivos

Reactivos generales

Acetato de Sodio	Sigma
Ácido propiónico	Aldrich
Anhídrido acético	Aldrich
Carbonato de Sodio	Sigma
Carbonato de amonio	Sigma
CHCA	Aldrich
DIEA	Fluka
DIPCDI	Fluka
DMAP	Fluka
Fenol	Aldrich
Fosfato ácido de sodio	Sigma
Fosfato dibásico de sodio	Sigma
Gelatina	Sigma
HF anhidro	Ucar
HOBt	Novabiochem
KCN	Fluka
Morfolina	Aldrich
NaBH ₄	Fluka
NaCl	Sigma
Ninhidrina	Fluka
<i>p</i> -cresol	Aldrich
Piperidina	Aldrich
Piridina	Sharlau
TIS	Aldrich

TBTU	NovaBiochem
Triton x-100	Sigma
Tween 20	Sigma
Reactivos para SPR	
Carbohidrazida	Fluka
Cianoborohidruro de Sodio , <i>BIAcertified</i>	Fluka
Cisteína	Sigma
Hidrocloruro de etanolamina, <i>BIAcertified</i>	Biacore
EDC , <i>BIAcertified</i>	Biacore
Etilenglicol	Aldrich
NHS, <i>BIAcertified</i>	Biacore
Fragmento Fc purificado, de IgG humana, disolución estéril en tampón fosfato 100 mM, 250 mM Cloruro de sodio, pH 7.6. (2.2 mg/mL)	Chemicon International
HBS-EP	Biacore
Inmunoglobulina de conejo, liofilizada, purificada por fraccionamiento y cromatografía de intercambio iónico.	Sigma
Peryodato de Sodio	Fluka
PDEA, <i>BIAcertified</i>	Biacore
Sensor chip CM5, Serie S, <i>BIAcertified</i>	Biacore
Reactivos y materiales para RMN	
Oxido de deuterio, 99.95%	Sigma
DSS	Sigma
Tubos SHIGEMI	

5.2. Instrumentación general

Análisis de aminoácidos ^a	Derivatización post-columna: Beckman System 6300, columna de intercambio cationico de polisulfonato 250x4 mm con detección post-columna mediante derivatización por reacción con ninhidrina. Derivatización pre-columna: WATERS 600 Controller detector UV7Vis dual 2487,autoinyector 717 plus. Método AccQ.Tag
Balanzas	Sartorius modelo 2004 MP6 (0.01mg), Mettler Toledo modelos AB204-S (0.1mg) y PB303-S (0.01mg)
Centrifugas	Eppendorf modelo 5415 D y 5415 R y Beckman Coulter modelo Allegra 21R
Dicroísmo circular	Espectropolarímetro JASCO J-810 Julabo F25 Peltier JASCO CDF-426S
Espectrofotómetro	
Espectrometría de masas de rutina, ESI	Sistema ESI-MS Micromass modelo ZQ y programa de control <i>Masslynx v4.0</i>
Espectrometría de masas de rutina, MALDI-TOF	Applied Biosystems 4700, Proteomics Analyzer
HPLC analítico	WATERS Alliance 2695, detector UV/Vis de arreglo de diodos 996 y programa de control Millenium versión 3.5. WATERS Bomba binaria 1525, detector UV/Vis dual 2487 con auto-inyector 717 plus y programa de control Breeze versión 3.2
HPLC -MS analítico	WATERS Alliance 2695, detector UV/Vis dual 2487 con detector y analizador de masas "electrospray" Micromass ZQ
HPLC semi-preparativo	WATERS Delta 600, autoinyector Simple

^a Los análisis de aminoácidos fueron realizados por Dr. Alberto Adeva Antón y Victòria Ruiz-Calero Simanca en el Servei de Síntesis de Pèptids del Parc científic de Barcelona de la Universidad de Barcelona.

Incubadora para tubos de centrifuga	manager 2700, detector UV/Vis dual 2487, colector de fracciones automático y programa de control Masslynx versión 3.5
Liofilizador	Microtherm (CAMLAB)
Microscopio estereoscópico de fluorescencia	Vitris modelo Freezmobile 12EL
	leica MZFLIII, lámpara de Hg 100W, lámpara halógena con reflector. Filtros de fluorescencia GFP Plant (Filtros de excitación: 470/40 nm y filtros de emisión: 525/50 nm BP). Filtros de fluorescencia UV (Filtros de excitación: 360/40 nm y filtros de emisión: 420 nm LP). Filtros de fluorescencia verde (Filtros de excitación: 546/10 nm y filtros de emisión: 590 nm LP)
Microscopio invertido	Nikon modelo Eclipse TS100F, con soporte universal Nikon C-HU Universal Holder y provisto de cámara digital Nikon Coolpix 5000
Montaje para reacciones con fluoruro de hidrógeno	Sistema construido de Teflón y Kel-F de la casa Toho-Kasei Ltd. (Japón)
pH-metros	Crison GLP21
Resonancia de plasmon superficial	Biacore T100
Resonancia magnética nuclear ^b	Resonancia magnética nuclear roker DMX-800 DMX-500
Rotavapor	Rotavapores Heidolph modelo Laborota 400B conectado a bomba de vacío de membrana Vacubrand modelo MZ 2C o bomba de aceite Boc Edwards
Secuenciador de Edman	Procise® LC (protein sequencing system) de Applied Biosystems
Sintetizador automático de péptidos	Applied Biosystems AB433A
Sonicador	Sonicador Branson Sonifier 250

^b Los espectros de resonancia fueron obtenidos por la Dra. Margarida Gairí y la Dra. Maria Antonia Molins en el Servei de Ressonància Magnètica Nuclear del Parc científic de Barcelona de la Universidad de Barcelona.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

6. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

6.1. Métodos analíticos

6.1.1. Ensayo de ninhidrina cualitativa

Este ensayo permite controlar cualitativamente la eficiencia de los acoplamientos de aminoácidos en la síntesis en fase sólida de péptidos mediante la detección colorimétrica de grupos amino primarios libres en el extremo N-terminal de la cadena peptídica en crecimiento¹. En este ensayo se utilizan dos disoluciones diferentes de reactivos:

Disolución reactivo A: se prepara en caliente una disolución de 40 g de fenol en 10 mL de etanol absoluto. Por otro lado a 100 mL de piridina, recientemente destilada, se le adicionan 2 mL de una disolución acuosa de KCN (65 mg / 100 mL de H₂O). Las dos disoluciones se filtran y mezclan después de ser agitadas sobre 4 g de amberlite MB-3, durante 45 min

Disolución reactivo B: es una disolución de 2.5 g de ninhidrina en 50 mL de etanol absoluto. Esta disolución debe mantenerse protegida de la luz.

Para la realización del ensayo se introduce en un tubo pequeño de vidrio 1 mg aproximadamente de peptidil-resina previamente lavada con DCM. A esta muestra se le adicionan seis gotas del reactivo A y dos del reactivo B y se calienta hasta 110 °C durante tres minutos. El color azul de la disolución y de la resina indica la presencia de grupos amino primarios libres. En el caso de la prolina, la coloración azul verdosa de la disolución y resina rojiza indica la presencia de un grupo amino secundario.

6.1.2. Ensayo cualitativo para la detección de alcoholes

En este ensayo se usaron las siguientes disoluciones:

Disolución A: Cloruro de ácido p-toluensulfónico 0.09 M en tolueno

Disolución B: 4-Nitrobencilpiridina 0.225 M en tolueno

Disolución C: Piperidina al 10% (v/v) en cloroformo

Sobre una lámina para capa fina se pone una alícuota de peptidil-resina y se adicionan consecutivamente 2 gotas de DCM, 2 gotas de la disolución A y 2 gotas de la disolución B.

Se vaporan los disolventes secando suavemente con una pistola de aire caliente hasta que la resina se observe naranja. Por último se añaden dos gotas de la disolución C y se seca nuevamente. La coloración violeta de la resina indica la presencia de alcoholes².

6.1.3. Ensayo cualitativo de cloranilo para la detección de aminas secundarias

Se prepara una disolución saturada de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranilo) en tolueno 8 (75 mg en 25 mL). Para realizar el ensayo, se coloca una alícuota de resina en un tubo de vidrio pequeño, se añaden 5 gotas de la disolución de cloranilo y 20 gotas de acetona. Si el ensayo es positivo la resina se torna de color azul verdoso^{3,4}.

6.1.4. Hidrólisis y análisis de aminoácidos

Este método permite conocer la composición de aminoácidos de los péptidos y cuantificar la cantidad de péptido sintetizado, tanto el unido a la resina como en disolución. Inicialmente se hace la hidrólisis completa del péptido para liberar todos sus aminoácidos y posteriormente se analiza la mezcla obtenida por HPLC.

6.1.4.1. Hidrólisis

Hidrólisis de los péptidos unidos a la resina

En un tubo de ensayo (70 x150 mm) se pesan 2-10 mg de peptidil-resina y se añaden 400 µL HCl 6 M en ácido propiónico, si la secuencia tiene residuos de tirosina es necesario adicionar 0.1% de fenol a la disolución de hidrólisis. El tubo se cierra herméticamente fundiendo a la llama el borde superior. La mezcla de hidrólisis se deja a 110 °C por 48 h o a 150 °C por 2 horas. El tubo se abre y se rotaevapora el disolvente hasta sequedad. En el caso de péptidos desprotegidos unidos a resina PEGA la hidrólisis se realiza utilizando una mezcla HCl 6 M en agua a 110°C durante 72 h.

Hidrólisis de los péptidos libres

Se toma una alícuota de volumen conocido de una disolución de péptido previamente disuelto en agua, evitando la presencia de sustancias que en las condiciones de hidrólisis

puedan generar amoniaco o aminas primarias (p.e. ACN, carbonato de amonio, etc). A la disolución se le adicionan 400 μ L de HCl 6 M en agua con 0.1% de fenol si el péptido tiene tirosina en la secuencia. Como estándar interno se adiciona un volumen conocido de ácido 2-aminobutírico 2.5 mM, hasta obtener una concentración final de 0.1 mM en la disolución previa al análisis por HPLC. El tubo se cierra herméticamente y se deja en reflujo a 110 °C por 24 h.

6.1.4.2. Análisis por HPLC del hidrolizado

Análisis con derivatización post-columna

el producto seco obtenido se disuelve en la cantidad adecuada de tampón citrato 0.06 M (pH=2) de forma que la concentración de cada aminoácido este alrededor de 0.1 mM. La muestra se filtra a través de filtros de nylon de 0.45 μ m de poro para ser analizada por HPLC. El hidrolizado es separado en sus componentes en una columna de intercambio catiónico y cada uno de los aminoácidos es detectado por derivatización post-columna después de reaccionar con ninhidrina ⁵.

Análisis con derivatización

pre-columna: el producto seco obtenido se disuelve en HCl 20 mM de forma que la concentración final de cada aminoácido este alrededor de 0.1 mM. La muestra se pasa a través de filtros de nylon de 0.45 μ m de poro para ser analizada por HPLC. Los aminoácidos son derivatizados y posteriormente analizados con el método AccQ-Tag® (Waters)^{6,7} en el laboratorio de síntesis de péptidos de los servicios científico técnicos de la Universidad de Barcelona.

6.2. Síntesis automática de los péptidos por la estrategia Fmoc

6.2.1. Reducción de la funcionalización de la resina

Los péptidos se sintetizaron sobre un soporte de poliestireno entrecruzado con 1% de DVB funcionalizado con el espaciador Fmoc-Rink amida-gly-*p*-MBHA y un grado de funcionalización de 0.2 mmol/g resina.

Inicialmente la resina con el espaciador bifuncional *p*-MBHA (0.77 mmol/g resina) se solvató por lavados sucesivos con DCM (3x1 min), 10% TFA en DCM (1x10 min), 1% DIEA (3x1 min), DCM (3x1 min), DMF (3x1 min). Con el fin de reducir el grado de funcionalización se adicionaron 0,022 mmoles de aminoácido por cada gramo de resina, previamente activados empleando TBTU, HOBt, y DIEA en una relación molar de 1:1:1.5 en DMF. Esta disolución se adicionó sobre la resina y se dejó reaccionar por 2 h para asegurar su completa reacción. Posteriormente se bloquearon los grupos amino libres de resina en dos ciclos de acetilación con una disolución de anhídrido acético/DIEA/DMF (3:1:16) por 30 min. El grupo Fmoc se desprotegió con 50 % de piperidina en DMF (3x5 min). El espaciador bifuncional Fmoc-Rink amida (0,11 mmoles por gramo de resina) se disolvió en DMF y se preactivó con HOBt, TBTU y DIEA en una relación molar de 1:1:1.5. Esta mezcla se dejó reaccionar con la resina por 1 h. La finalización de la reacción se verificó mediante el ensayo de ninhidrina (ver 6.1.1).

6.2.2. Incorporación automática de los aminoácidos

La incorporación automática de los aminoácidos se realizó en un sintetizador Applied Biosystem AB433A usando la estrategia Fmoc/tBu. El control de la eficiencia de la desprotección del grupo amino terminal se llevó a cabo por medición de la conductividad de la disolución residual después del tratamiento con piperidina^{8,9}. La eliminación del grupo Fmoc por tratamiento con piperidina en DMF genera como subproducto el carbamato de piperidina, el cual se puede detectar por conductimetría.

Las síntesis se realizaron a una escala entre 0.07 y 0.1 mmol, según las propiedades de hinchamiento de la resina, siguiendo el programa de ciclos *Fast Moc* (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones de incorporación automática de los aminoácidos por la estrategia Fmoc/tBu

Operación	Reactivos y disolventes	Cantidad	Tiempo (min)
Desprotección	22% piperidina con 0.07% tritón X 100 en DMF		10 /ciclo*
Lavados	DMF (5X)		2.5
Acoplamiento**	Fmoc-AA-OH en DMF (2 mL)	1.0 mmol	9
	TBTU/HOBt (0.45 M) en DMF (2 mL)	0.9 mmol	
	DIEA (2M) en NMP (1 mL)	2.0 mmol	
Lavados	DMF (5X)		2.5

* Después de cada ciclo de desprotección la conductividad de la disolución fue monitoreada, la desprotección se da por terminada cuando dos ciclos consecutivos revelan la misma conductividad.

170 ** El aminoácido se preactiva 2 min antes de adicionarlo a la resina.

6.2.3. Acetilación del grupo amino terminal

El residuo amino terminal del péptido fue acetilado por tratamiento de la peptidil-resina con una mezcla de anhídrido acético/DIEA/DMF (3:1:16) en dos ciclos de 30 min. La reacción se monitoreo mediante el ensayo de ninhidrina (ver 6.1.1).

6.2.4. Desprotección de las cadenas laterales y liberación del péptido

La peptidil-resina, previamente dispuesta en un reactor de polipropileno con filtro poroso de polietileno, se hizo reaccionar con una mezcla de TFA/H₂O/TIS (94:4:2 v/v) por 5 min a 0°C y 1-2 h a temperatura ambiente con agitación suave. La mezcla se filtró y posteriormente se concentró por arrastre de vapor mediante una corriente de N₂. El péptido se precipitó por adición de TBME frío (0-4 °C) y se separó por centrifugación a 3000 rpm. El precipitado se lavó dos veces más con TBME frío para separar productos secundarios. Después de secar el producto a temperatura ambiente, el péptido se disolvió en el disolvente adecuado de acuerdo a sus propiedades de solubilidad, generalmente se empleó la mezcla agua/ACN 1:1. La disolución se liofilizó para obtener el péptido sólido. Finalmente, el péptido obtenido se cuantificó usando análisis de aminoácidos y se separó en alícuotas para ser usado en experimentos posteriores (6.1.4).

6.3. Síntesis automática de los péptidos por la estrategia Boc/Bzl

6.3.1. Incorporación automática de los aminoácidos

La síntesis se realizó sobre 0.1 mmoles de resina *p*-MBHA (0.7 mmoles/g resina) previamente solvatada en DCM. La incorporación automática de los aminoácidos se realizó en un sintetizador Applied Biosystem AB433A usando la estrategia Boc/Bzl. La síntesis se efectuó siguiendo el siguiente programa de ciclos (Tabla 2):

Tabla 2. Condiciones de incorporación automática de los aminoácidos por la estrategia Boc/Bzl

Operación	Reactivos y disolventes	Cantidad	Tiempo (min)
Desprotección	TFA 30% en DCM		3
	TFA 50% en DCM		11
Lavados y neutralización	DCM (5x)		2
	5% DIEA in DMF (2x)		2
	DMF (6x)		3

Acoplamiento *	Fmoc-AA-OH* en DMF (1.7 mL)	1.0 mmol	23
	DCC (1.0 M) en DMF (1 mL)	1.0 mmol	
	HOBt (1.0 M) en DMF (1 mL)	1.0 mmol	
Doble acoplamiento **	DMSO		8
	DIEA	3.8 mmol	4
Lavados	DMF		2
Acetilación	10% de Anhídrido acético, 5% de DIEA in DMF		5
Lavados	DCM (6x)		4

*Los aminoácidos se incorporan como ésteres activos de HOBt en DMF preactivados antes de adicionar a la resina. Después de cada acoplamiento se hace un ciclo de acetilación.

** Se adicionó DMSO hasta un 15% del volumen de la reacción y 3.8 equiv de DIEA sobre la mezcla de reacción.

Después del acoplamiento de todos los residuos, la resina se trasladó a un reactor de polipropileno con filtro y se lavó con DCM (3x1 min). Finalmente, el grupo amino terminal fue acetilado de acuerdo al procedimiento previamente descrito (ver 6.2.3).

6.3.2. Desprotección de las cadenas laterales y liberación del péptido

La desprotección de las cadenas laterales y la escisión del péptido de la resina se realizó tratando la peptidil-resina con una mezcla HF/*m*-cresol (5:95) por 1 h a 0°C. La reacción se llevó a cabo en un sistema especial de teflón y Kel-F de la casa Toho-Kasei Ltd. (Japón). La resina seca se introdujo en los reactores y se adicionó un 5% *m*-cresol, el reactor se acopló al montaje y se enfrió empleando N₂ líquido. El HF se destiló anhidro en su interior (5 mL por cada 300 mg de resina aproximadamente). La mezcla se dejó reaccionar por 90 min a 0 °C, tras lo cual el HF se evaporó al vacío. La resina y el péptido se transfirieron a un reactor de síntesis con filtro empleando éter dietílico frío, el cual se utilizó para precipitar el péptido, eliminar del *m*-cresol y los subproductos de desprotección. El péptido se extrajo de la resina después de tres ciclos de lavado y centrifugación con 10% de ácido acético. El producto fue liofilizado y posteriormente cuantificado por análisis de aminoácidos (6.1.4).

6.4. Cromatografía

6.4.1. Cromatografía líquida de alta resolución analítica

La pureza de los péptidos se analizó por cromatografía líquida de alta resolución a escala analítica usando una columna Symmetry C₁₈ (3.9 mm x 150 mm) con un tamaño de partícula de 5 μm y un tamaño de poro de 100 Å. Las muestras se eluyeron a un flujo de 1 mL/min

empleando gradientes lineales de los disolventes A: H₂O con un 0.045 % de TFA y B: ACN con un 0.036 % de TFA. La detección se realizó por UV a 220 nm.

6.4.2. HPLC-MS analítico

Los análisis de muestras por HPLC-MS fueron realizados usando una columna Symmetry C₁₈ (3.9 mm x 150 mm, Waters) con tamaño de partícula de 5 µm y tamaño de poro de 100 Å. Las muestras se eluyeron a un flujo de 1 mL/min empleando gradientes lineales de los disolventes A: H₂O con un 0.1 % de ácido fórmico y B: ACN con un 0.07 % de ácido fórmico. La detección por UV se realizó a 220 nm. Las condiciones concretas para la detección por ESI-MS, voltaje de cono y rango de masas, se optimizaron para cada muestra.

6.4.3. HPLC semipreparativo

Los productos fueron purificados por HPLC en fase reversa. La columna utilizada fue una Symmetry C18 (30 mm x 100 mm, Waters) con tamaño de partícula de 5 µm. Las muestras se eluyeron a un flujo de 10 mL/min empleando gradientes lineales de los eluyentes A: H₂O con un 0.1 % de TFA y B: ACN con un 0.1 % de TFA. La detección por UV se realizó a 220 nm.

6.5. Espectrometría de masas MALDI-TOF

Un volumen de 0.5 µL de una disolución acuosa de péptido 100-200 µM se mezcló con 0.5 µL de una disolución saturada de CHCA en H₂O/ACN (1:1) con 0.05% de TFA, directamente sobre el plato metálico de MALDI-TOF. El disolvente se dejó evaporar a temperatura ambiente y antes de la medida se hizo pasar una corriente de N₂. Los espectros de masas fueron obtenidos usando un espectrómetro de masas Applied Biosystems 4700.

Para determinar la secuencia de los péptidos los provenientes del análisis de la químioteca se obtuvieron los espectros de MS/MS MALDI-TOF. En este método se ioniza por MALDI la molécula para obtener primero un ión molecular estable que posteriormente se selecciona para ser fragmentado. La información de la secuencia de aminoácidos esta contenida en los iones producidos al hacer colisionar el ión precursor protonado con moléculas de gas a alta presión, este proceso se denomina, disociación inducida por colisión (del ingles, CID)¹⁰.

Los iones producidos se originan a partir del rompimiento de los enlaces entre C α_i -CO $_i$, CO $_i$ -

$N\alpha_{(i+1)}$ y $N\alpha_{(i+1)}-C\alpha_{(i+1)}$ (Figura 1). Esto genera la serie de iones derivados de los fragmentos generados en dirección carboxilo terminal (x,y,z) y la serie de iones derivados de los fragmentos en dirección amino terminal (a,b,c), de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Roepstorff, Fohlman y Johnson^{11,12}. La intensidad y frecuencia de los iones dependen de la ubicación de residuos básicos a lo largo de la secuencia; si un residuo básico se encuentra localizado cerca al residuo N-terminal predominan los iones b_n , si esta localizado en la región C-terminal predominan lo iones y_n .

Figura 1. Fragmentos producidos a partir de un péptido lineal protonado.

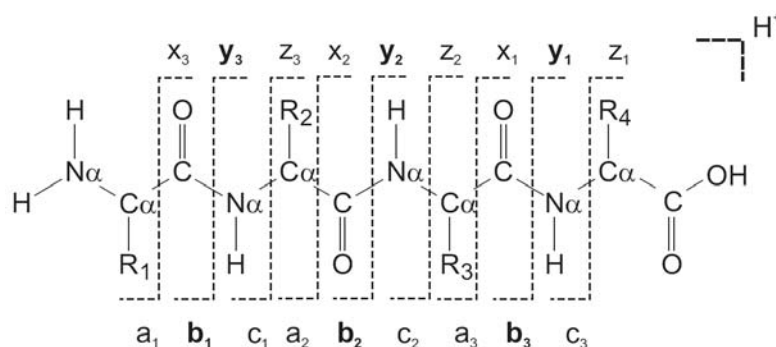


Tabla 3. Masas de los aminoácidos, iones imonio¹³ e iones relacionados.

Residuo	Código 3-letras	Código 1-letra	Masa monoisotópica	Ión imonio	Iones relacionados
Alanina	Ala	A	71.07	44	
Arginina	Arg	R	156.10	129	59,70,73,87,100,112
Asparagina	Asn	N	114.04	87	70
Ácido aspártico	Asp	D	115.03	88	70
Cisteina	Cys	C	103.01	76	
Ácido glutámico	Glu	E	129.04	102	
Glutamina	Gln	Q	128.06	101	56,84,129
Glicina	Gly	G	57.02	30	
Histidina	His	H	137.06	110	82,121,123,138,166
Isoleucina	Ile	I	113.08	86	44,72
Leucina	Leu	L	113.08	86	44,72
Lisina	Lys	K	128.09	101	70,84,112,129
Metionina	Met	M	131.04	104	61
Fenilalanina	Phe	F	147.07	120	91
Prolina	Pro	P	97.05	70	
Serina	Ser	S	87.03	60	
Treonina	Thr	T	101.05	74	
Triptófano	Trp	W	186.08	159	77,117,130,132,170,171
Tirosina	Tyr	Y	163.06	136	91,107
Valina	Val	V	99.07	72	41,55,69

6.6. Procedimientos experimentales del capítulo 1

6.6.1. Síntesis de los péptidos

C34L

Ac-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL-NH₂

WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL-NH₂

90 mg de producto crudo, 15 mg de producto purificado

Rendimiento de síntesis: 17 %.

Condiciones de purificación: Gradiente lineal inicial de 10-30 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 30 al 60 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 13.9 min (gradiente lineal del 10 al 50 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos [experimental (calculado)]: Asp/Asn: 5.1 (5), Glu/Gln: 11.0 (11), His: 11.0 (1), Ile: 2.9 (3), Lys: 0.9 (1), Leu: 4.3 (4), Met: 0.5 (1), Arg: 1.3 (1), Ser: 3.0 (3), Thr: 1.2 (1), Trp: 0.2 (2), Tyr: 0.33 (1)

MALDI-TOF: péptido acetilado (M+H)⁺= 4287.9(esperado 4288.0 m/z), péptido sin acetilo (M+H)⁺= 4245.6 (esperado 4246.0 m/z).

C34D

Ac-wmewdreinnytslihsliéesqnqqekneqell-NH₂

wmewdreinnytslihsliéesqnqqekneqell-NH₂

72 mg de producto crudo, 12 mg de producto purificado

Rendimiento de síntesis: 17 %.

Condiciones de purificación: Gradiente lineal inicial de 10-30 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 30 al 47 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 14.0 min (gradiente lineal del 10 al 50 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos [experimental (calculado)]: Asp/Asn: 4.8 (5), Glu/Gln: 11.5 (11), His: 0.70 (1), Ile: 3.2 (3), Lys: 1.0 (1), Leu: 4.1 (4), Met: 1.0 (1), Arg: 0.9 (1), Ser: 2.8 (3), Thr: 0.9

(1), Trp: ND (2), Tyr: 0.5 (1)

MALDI-TOF: péptido acetilado $(M+H)^+ = 4287.9$ (esperado 4288.0 m/z), péptido sin acetilo $(M+H)^+ = 4245.9$ (esperado 4246.0 m/z).

RC34L

Ac-LLEQENKEQQNQSEEILSHILSTYNNIERDWEMW-NH₂

91 mg de producto crudo, 12.6 mg de producto purificado

Rendimiento de síntesis: 18 %.

Condiciones de purificación: Gradiente lineal inicial de 10-30 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 30 al 47 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 14.4 min (gradiente lineal del 10 al 50 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos [experimental (calculado)]: Asp/Asn: 4.6 (5), Glu/Gln: 11.9 (11), His: 0.8 (1), Ile: 3.4 (3), Lys: 1.0 (1), Leu: 4.2 (4), Met: 0.9 (1), Arg: 1.3 (1), Ser: 2.5 (3), Thr: 0.8 (1), Trp: ND (2), Tyr: 0.3 (1)

MALDI-TOF: péptido acetilado $(M+H)^+ = 4287.9$ (esperado 4288.0 m/z).

RC34D

Ac-lleqenkeqqnqseeilshilstynnierdwemw-NH₂

93 mg de producto crudo, 13.2 mg de producto purificado

Rendimiento de síntesis: 18 %.

Condiciones de purificación: Gradiente lineal inicial de 10-30 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 30 al 47 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 14.4 min (gradiente lineal del 10 al 50 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos [experimental (calculado)]: Asp/Asn: 4.8 (5), Glu/Gln: 11.3 (11), His: 0.6 (1), Ile: 3.4 (3), Lys: 1.1 (1), Leu: 4.4 (4), Met: 1.1 (1), Arg: 0.9 (1), Ser: 2.8 (3), Thr: 0.5 (1), Trp: ND (2), Tyr: 0.4 (1)

MALDI-TOF: péptido acetilado $(M+H)^+ = 4287.5$ (esperado 4288.0 m/z).

M₁C34L

Ac- WEDMWRNNVTEYLSSILEHVEQQSNKQEEQENLL-NH₂

48 mg de producto crudo, 12.5 mg de producto purificado

Rendimiento de síntesis: 26 %.

Condiciones de purificación: Gradiente lineal inicial de 10-30 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 30 al 47 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 13.1 min (gradiente lineal del 10 al 50 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos [experimental (calculado)]: Asp/Asn:5.1 (5), Glu/Gln: 11.2 (11), His: 1.0 (1), Ile:1.4 (1), Lys: 1.0 (1), Leu: 4.1 (4), Met:1.0 (1), Arg:1.3 (1), Ser: 2.5 (3), Thr: 0.9 (1), Val: 2.0 (2), Trp: ND(2), Tyr: 0.5 (1)

MALDI-TOF: péptido acetilado (M+H)⁺= 4260.4 (esperado 4259.9 m/z).

M₁C34D

Ac- wedmwrnnvteylssilehveqqsnkqeeqenll-NH₂

53 mg de producto crudo, 17.0 mg de producto purificado

Rendimiento de síntesis: 32 %.

Condiciones de purificación: Gradiente lineal inicial de 10-30 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 30 al 47 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 13.1 min (gradiente lineal del 10 al 50 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos [experimental (calculado)]: Asp/Asn: 4.7 (5), Glu/Gln: 11.0 (11), His: 1.1 (1), Ile:1.4 (1), Lys: 1.0 (1), Leu: 4.3 (4), Met:1.0 (1), Arg:1.4 (1), Ser: 2.4 (3), Thr: 0.8 (1), Val: 2.1 (2), Trp: ND(2), Tyr: 0.6 (1)

MALDI-TOF: péptido acetilado: (M+H)⁺= 4259.8 (esperado 4259.9 m/z).

M₂C34

Ac-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQeKNEkELL -NH₂

53 mg de producto crudo, 14.0 mg de producto purificado

Rendimiento de síntesis: 26 %.

Condiciones de purificación: Gradiente lineal inicial de 20-35 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 35 al 55 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 13.1 min (gradiente lineal del 10 al 50 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos [experimental (calculado)]: Asp/Asn: 4.8 (5), Glu/Gln: 9.9 (10), His: 1.1 (1), Ile: 3.4 (3), Lys: 2.1 (2), Leu: 4.4 (4), Met: 0.4 (1), Arg: 1.1 (1), Ser: 2.9 (3), Thr: 0.7 (1), Trp: ND (2), Tyr: 0.3 (1)

MALDI-TOF: $(M+H)^+ = 4289.5$ (esperado 4288.1 m/z).

M₃C34

Ac-WeEWDRKINNYTSLIHSLIEESQNQQeKNEkELL -NH₂

57 mg de producto crudo, 19.7 mg de producto purificado

Rendimiento de síntesis: 34 %.

Condiciones de purificación: Gradiente lineal inicial de 10-30 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 30 al 50 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 11.6 min (gradiente lineal del 10 al 50 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos [experimental (calculado)]: Asp/Asn: 5.0 (5), Glu/Gln: 10.1 (10), His: 0.9 (1), Ile: 3.2 (3), Lys: 3.2 (3), Leu: 4.3 (4), Arg: 1.3 (1), Ser: 3.2 (3), Thr: 1.3 (1), Trp: ND (2), Tyr: 0.10 (1)

MALDI-TOF: $(M+H)^+ = 4286.6$ (esperado 4285.1 m/z).

N36

Ac-SGIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL-NH₂

Primera síntesis: 34 mg de producto crudo, 2.0 mg de producto purificado, rendimiento de síntesis: 6 %.

Segunda síntesis: 42 mg de producto crudo, 10.5 mg de producto purificado, rendimiento de síntesis: 24 %.

Condiciones de purificación: Gradiente lineal inicial de 10-30 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 30 al 55 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección

por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 9.1 min (gradiente lineal del 0 al 100 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos [experimental (calculado)]: Ala: 3.0 (3), Asn: 1.8 (2), Glu/Gln: 9.0 (9), Gly: 2.2 (2), His: 0.9 (1), Ile: 3.7 (4), Lys: 1 (1), Leu: 7.4 (7), Arg: 2.2 (2), Ser: 0.7 (1), Thr: 0.9 (1), Val: 1.9 (2), Trp: ND (1)

MALDI-TOF: $(M+H)^+ = 4162.6$ (esperado 4162.4 m/z).

Glioxilil-N36

OHCCO-GIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL-NH₂

30 mg de producto crudo (primera síntesis), 1.8 mg de producto purificado

Rendimiento de síntesis: 6 %.

Condiciones de purificación: Gradiente lineal inicial de 10-30 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 30 al 55 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

Análisis de aminoácidos [experimental (calculado)]: Ala: 3.0 (3), Asn: 1.8 (2), Glu/Gln: 9.0 (9), Gly: 2.2 (2), His: 0.9 (1), Ile: 3.7 (4), Lys: 1 (1), Leu: 7.4 (7), Arg: 2.2 (2), Thr: 0.9 (1), Val: 1.9 (2), Trp: ND (1)

MALDI-TOF: $(M+H)^+ = 4089.2$ (esperado 4090.3 m/z).

6.6.2. Ensayos de Inhibición de la fusión^a

6.6.2.1. Ensayo de Inhibición de la replicación de VIH-1

Células HeLa que expresan CD4 y CXCR4 se incubaron con 0.3 ng de VIH-1 Lai durante 2 horas a 37°C en medio con 2% de FCS (suero fetal bovino) en presencia de diferentes cantidades de péptido (10^{-6} - 10^{-11} M). Posteriormente, las células infectadas se lavaron dos veces con medio libre de FCS, y se cultivaron en presencia de varias concentraciones de péptido en medio con 10 % de FCS. Cada tres días el sobrenadante se recogió y cuantificó

^a Estos ensayos fueron realizados por Fabrice Gaston del grupo del profesor Elmostafa Bahraoui en el "Laboratoire d'Immuno-virologie des Lentivirus des Primates" de la Universidad Paul Sabatier en Toulouse (Francia).

la presencia de antígeno p24 VIH usando un kit de reactivos comercial (Innotest™ HIV antigen mAB-INNOGENETICS).

6.6.2.2. Ensayo de Inhibición de formación de sincitios^{14,15}

La actividad de los péptidos se ensayó a varias concentraciones para medir su habilidad de inhibir la formación de sincitios. Células HeLa que expresan CXCR4 CD4 se cultivaron con células HeLa que expresan gp120/gp41Lai en platos de 96 pozos en presencia de péptido a varias concentraciones. Después de 20 horas, se midió la cantidad de sincitios. Para contar la células, cada replica se dividió en cuatro partes, tras lo cual se calculó el porcentaje de inhibición de sincitios.

6.6.3. Dicroísmo circular de los péptidos y los complejos no covalentes

Los espectros se adquirieron en un espectropolarimetro JASCO 810 usando una cubeta de un paso óptico 0.1 mm y con cierre hermético de teflón. Las disoluciones de los péptidos se prepararon en tampón 10 mM de fosfato de potasio, 50 mM de fluoruro de potasio a pH 7.4. Las disoluciones de los péptidos derivados de C34 se prepararon a una concentración de 56 µM en tampón fosfato y en presencia de 30% de TFE. Los espectros de N36 se obtuvieron a diferentes concentraciones en el mismo tampón y también en presencia de 30 % de TFE.

Para obtener los espectros de la mezclas equimolares de N36 y péptidos derivados de C34 se prepararon disoluciones 10 mM en tampón fosfato. Cada o de los experimentos fue registrado bajo los siguientes parámetros:

Rango de longitudes de onda: 190-260 nm

Anchura de banda: 1 nm

Respuesta: 1 sec

Velocidad de barrido: 20 nm/min

Acumulaciones: 3

Paso de luz: 0.1 cm

Intervalo de datos: 0.2 nm

Número de datos: 351

Las medidas de dicroísmo fueron convertidas a elipticidad molar de acuerdo con la siguiente ecuación ¹⁶:

$$[\theta] = \frac{\theta}{10Cl}$$

Donde, θ es la elipticidad ("mdegrees" del ingles), C es la molaridad (M) y l es el paso óptico en cm. Para obtener las curvas de desnaturalización térmica de las mezclas se usaron las siguientes condiciones de medida:

Rango de temperaturas: 10-80 °C

Velocidad de calentamiento: 90°C/h

Intervalo de datos: 0.2 °C

Longitud de onda: 222 nm

Ancho de banda: 1 nm

Tiempo de respuesta: 1 s

6.6.4. Digestión con tripsina de los péptidos C34, M₂C34, M₃C34

Cada péptido se disolvió hasta alcanzar una concentración de 100 µM en tampón de carbonato de amonio 50 mM a pH 8.5 ajustado con ácido acético 1N. A continuación, la disolución de péptido se dividió en alícuotas de 50 µL acuerdo a los tiempos en que se controló la reacción (15, 30, 45, 60, 120 min. mínimo). La tripsina se adicionó a cada alícuota en una relación molar de enzima/péptido 1:1500 (masa molecular de la tripsina: 23865 Da). La hidrólisis se llevo a cabo con agitación continua a una temperatura constante de 37 °C en una incubadora para tubos de centrifuga Microtherm (CAMLAB). Para realizar el seguimiento de la reacción a los diferentes tiempos, la reacción enzimática se detuvo adicionando a cada alícuota 150 µL de una disolución de ácido acético 1M (o hasta obtener una concentración de péptido de 25 µM). Cada muestra se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a 20 °C en el congelador hasta ser analizada. Al final de la hidrólisis, las alícuotas se analizaron por RP-HPLC y espectrometría de masas.

La hidrólisis enzimática por tripsina sigue una cinética de primer orden. Lo que permitió ajustar los datos a la siguiente ecuación:

$$\ln A = \ln A_0 - K_e t$$

Donde A es la cantidad de péptido expresada como el porcentaje del área del pico de HPLC. A₀ corresponde a la concentración inicial de péptido y K_e es la constante experimental de degradación del péptido. El tiempo de vida media (t_{1/2}) de los péptidos se puede calcular a

partir de K_e mediante:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K}$$

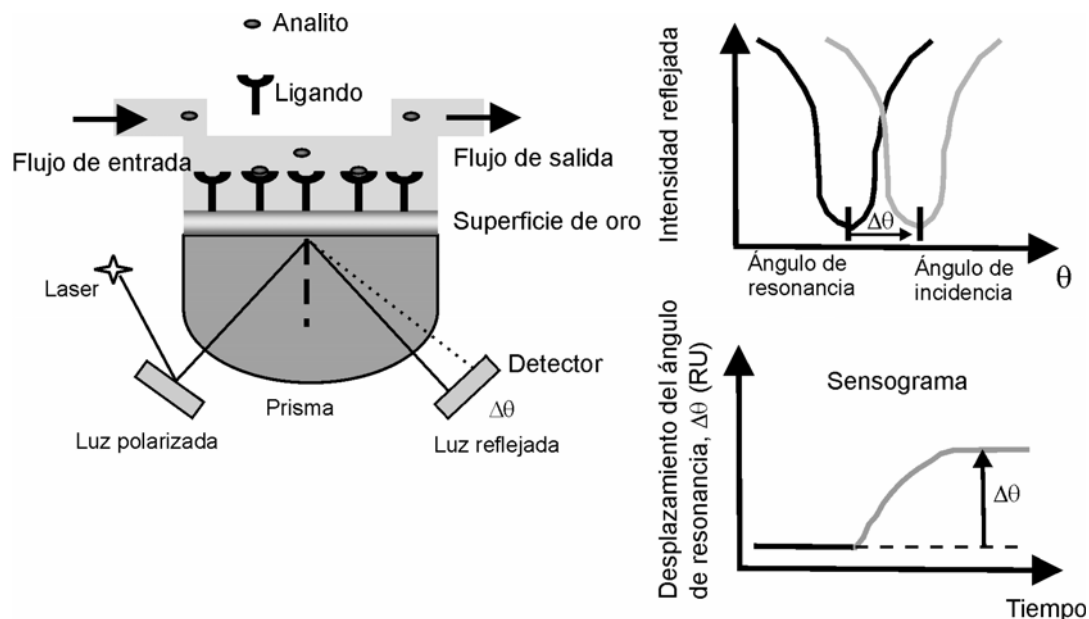
6.6.5. Determinación de la solubilidad en agua de los péptidos

Para determinar la solubilidad del péptido en agua, 1.0 mg de péptido se disolvió en carbonato de amonio 10 mM a pH 8.0. El pH de la disolución se neutralizó con ácido acético 1 N y se liofilizó. El liofilizado nuevamente se disolvió en 1 mL de agua milliQ y se dejó en agitación por 12 horas a 8 °C. Después de lo cual la disolución se centrifugo a 5000 rpm y el sobrenadante se paso por un filtro de 0.2 μm . Una alícuota de 500 μL de la disolución filtrada se derivatizó para cuantificar la concentración por análisis de aminoácidos (6.1.4). Solubilidad de los péptidos acetilados C34L (11.3 μM), M₂C34 (70 μM), M₃C34 (131 μM)

6.6.6. Resonancia de plasmon superficial

Esta técnica permite medir la unión entre un ligando unido a una superficie y un analito en disolución. El ligando se une a una superficie de oro recubierta una matriz de dextrano y el líquido que contiene el analito pasa a flujo constante sobre la superficie de unión. El sistema de detección consiste en un rayo de luz que pasa a través de un prisma. La luz es reflejada casi totalmente pero otro componente de la onda denominada onda evanescente, pasa por la capa de oro, donde produce la excitación de los electrones de la superficie. Si la longitud de onda y el ángulo ajustado son los correctos, una onda de electrones excitados (resonancia de plasmon) se produce sobre la superficie de oro, cambiando el ángulo de la luz reflejada. Este ángulo es sensible a la composición de la capa unida a la superficie de oro. El cambio de masa producido por la unión y la disociación del analito al ligando es suficiente para hacer cambiar este ángulo de resonancia (Figura 2).

Figura 2. Esquema general de la detección de la unión entre analito y ligando en resonancia de plasmon superficial



6.6.6.1. Generalidades

Como disolvente se usó tampón 10 mM de fosfato de sodio y 500 mM de NaCl pH 7.4. Las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro de 0.22 μm , las burbujas de aire se eliminaron por centrifugación de los tubos que se usaron para preparar las muestras.

En general se usaron sensores cuya superficie estaba funcionalizada con una matriz de dextrano caboximetilado unido covalentemente a una película de oro. El chip se dejó equilibrar a la temperatura de trabajo antes de introducirlo en el compartimiento del equipo. Posteriormente, el biosensor se dejó equilibrar por aproximadamente 30 min con el tampón de trabajo. En general se usaron Chip CM5 (serie S) los cuales están diseñados para ser usados en el equipo Biacore T100.

Las disoluciones de analitos fueron preparadas el mismo día del experimento. Los péptidos fueron cuantificados por análisis de aminoácidos y alícuotados de acuerdo a las cantidades necesarias para cada ensayo.

6.6.6.2. Interacción entre N36 y los péptidos

Oxidación del grupo amino terminal de N36

El grupo 1,2 amino alcohol del la serina N-terminal se oxidó hasta aldehído por tratamiento con periodato de sodio para dar OHCCO-N36. 34 mg de N36 con el grupo amino terminal libre se disolvieron en 4 mL de una disolución de periodato de sodio 20 μ M en tampón carbonato de amonio pH 8.8. La oxidación se dejó en agitación durante 10 min. Después de este tiempo se interrumpió la reacción con 1 mL de etilenglicol. El producto se purificó por RP-HPLC e inmediatamente después se liofilizó. El glioxilil péptido se guardó congelado a -20 °C en un recipiente con desecante y sellado hasta ser utilizado¹⁷.

Inmovilización de glioxilil-N36¹⁸

Sobre la superficie carboximetilada de un chip CM5 (serie S) se inyectaron 5 μ L de NaOH 50 mM a un flujo de 5 μ L/min para limpiar la superficie. Las medidas fueron obtenidas en un instrumento Biacore T100 y como tampón de arrastre se usó HBS EP plus (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y P20 0.0% a pH 7.4). Los grupos carboxílicos del sensor se activaron con la inyección de 30 μ L de una disolución de EDC 0.2 M y NHS 0.05 M en agua, mezclados justo antes de la inyección, a un flujo de 5 μ L/min. Después de la activación se inyectaron 35 μ L de carbohidrazida 120 mM en agua. Los grupos carboxílicos aun libres se bloquearon con una inyección de 35 μ L de etilendiamina 1M a pH 8.5. Para inmovilizar le péptido se inyectó una disolución de OHCCO-N36 0.5 μ M en tampón acetatos a pH 4.5 a un flujo de 5 μ L/min hasta alcanzar el grado de inmovilización deseado (60, 160, 500 RU). Después de lo cual el enlace hidrazona formado entre el péptido y la superficie se redujo a carbohidrazida por inyección de 40 μ L de cianoborohidruro de sodio 0.1 M en tampón acetatos (100 mM a pH 4.0) a un flujo reducido de 2 μ L/min, para evitar la formación de burbujas sobre la superficie. Los residuos y subproductos de esta serie de reacciones se eliminaron tras varias inyecciones de 5 μ L de HCL 20mM, NaOH 50 mM, SDS 0.5% y tritón X-100 0.03% a un flujo de 5 μ L/min. La superficie de referencia fue preparada al mismo tiempo eliminando la inyección de ligando de la serie de reacciones.

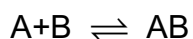
Evaluación de la interacción entre OHCCO-N36 y los derivados de C34

Para obtener los datos de unión entre los péptidos, cada péptido análogo de C34, en tampón 10 mM de fosfato de sodio y 500 mM de NaCl a pH 7.4, fue inyectada paralelamente an la celda de referencia y funcionalizada con OHCCO-N36 a diferentes concentraciones de

acuerdo a la solubilidad de cada péptido (entre 5 μM y 100 μM) usando un flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 25°C.

Los péptidos se inyectaron por 200 s y posteriormente se siguió la respuesta por 200 s en la fase de disociación. Para verificar los resultados obtenidos se las inyecciones se realizaron por duplicado para al menos tres concentraciones en cada caso. Después de cada ciclo de asociación y disociación la superficie del sensor se regeneró por inyección de una disolución con 0.3% de tritón X-100 en agua durante dos minutos.

Las constantes cinéticas de asociación (k_{as}) y de disociación (k_{dis}) de la interacción entre los péptidos se calcularon a partir de los datos suministrados por los sensogramas. Las diferentes curvas de asociación y disociación se ajustaron por métodos de regresión no lineal usando el programa Biaevaluation de la versión 4.1 (Biacore)^{19,20}, después de la substracción de la respuesta dada por la celda de referencia, para eliminar el efecto del tampón. Las constantes cinéticas y las de afinidad se calcularon por ajuste de los datos a un modelo de unión 1:1. En este modelo se asume que la unión se da bajo una cinética de pseudo primer orden, que describe la interacción entre un analito y un ligando inmovilizado. Esta aproximación es equivalente a la isoterma de Langmuir:



Los sitios sobre la superficie tienen una afinidad caracterizada por la constante de afinidad K_A (o $K_D = 1/K_A$) y una máxima capacidad de unión, R_{max} . La cinética de la unión a la superficie esta determinada por la constante de asociación, k_{as} , y por la constante de disociación, k_{dis} . Estas constantes cinéticas se relacionan con la K_A mediante la relación:

$$K_A = \frac{k_{\text{as}}}{k_{\text{dis}}}$$

El progreso de la unión $[\text{AB}](t)$ esta dada por la ecuación:

$$\frac{d[\text{AB}]}{dt} = k_{\text{as}}[\text{A}][\text{B}] - k_{\text{dis}}[\text{AB}]$$

Donde $[\text{A}]$, $[\text{B}]$ y $[\text{AB}]$ corresponden respectivamente a la concentración de analito inyectado, la cantidad de ligando inmovilizado y la cantidad de complejo formado. La cantidad de complejo $[\text{AB}]$ formado esta relacionado directamente con la respuesta R:

$$R = [AB]$$

Así que la ecuación se puede describirse en función de la señal RPS (R):

$$\frac{dR}{dt} = k_{as}[A](R_{max} - R) - k_{dis}R$$

El valor estadístico χ^2 se empleó para evaluar la proximidad entre los datos experimentales y los datos obtenidos después del ajuste. Este valor depende de la diferencia entre los datos experimentales (r_f) y los ajustados (r_x), del número de datos (n) y del número de parámetros ajustados (p), de acuerdo a la siguiente relación:

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (r_f - r_x)^2}{n-p}$$

6.7. Procedimientos experimentales del capítulo 2

6.7.1. Síntesis de la quimioteca

La quimioteca se sintetizó usando la estrategia Boc sobre una resina PEGA. Se usó el espaciador bifuncional HMFS el cual es lábil a medios básicos pero resistentes a las condiciones ácidas empleadas en la estrategia Boc²¹. Esta propiedad permitió obtener una quimioteca OBOC donde las cadenas pépticas libres de grupos protectores permanecieron unidas al soporte sólido^{22,23}.

6.7.1.1. Cálculos previos a la síntesis de la quimioteca “one-bead-one-compound” (OBOC)

Teniendo en cuenta que en este tipo de quimioteca sólo hay un tipo de compuesto por unidad de resina, fue necesario realizar la síntesis con mínimo la misma cantidad de unidades de resina que número de compuestos a sintetizar. Para obtener un 99 % de confianza de que los compuestos teóricos estén presentes y que estos estén repetidos en un número prefijado de veces se realizaron una serie de cálculos estadísticos^{24,25}. Estos cálculos dependen de los siguientes parámetros:

m (número de posiciones permutadas)

$r_1 \dots r_n$ (número de aminoácidos a introducir en cada posición permutada)

k (mínimo número de unidades de resinas por compuestos)

c (% de confianza)

El procedimiento para determinar el número de unidades de resina basado en el error relativo en un experimento división/mezcla con m posiciones variables se resume en los siguientes pasos:

(i) Calcular el número total de compuestos:

$$R = r_1 \times r_2 \times \dots \times r_m$$

(ii) Escoger el nivel de confianza, c (p.e. 99%), para calcular el valor p_c ,

$$p_c = \left(\frac{100-c}{100} \right) \times \frac{1}{R}$$

(iii) Calcular el valor percentil, Z_c , para el valor p_c escogido²⁴:

$$Z_c = t - \left(\frac{2.515517 + (0.802853 \times t) + (0.010328 \times t^2)}{1 + (1.432788 \times t) + (0.189269 \times t^2) + (0.001308 \times t^3)} \right)$$

Donde,

$$t = \sqrt{-2 \times \ln p_c}$$

(iv) Para una mezcla con m posiciones variables y r_n variaciones en cada posición la distribución es asintótica²⁴:

$$\nu = ((r_1 \times r_2 \times \dots \times r_m) - (r_1 + r_2 + r_m) + (m-1))$$

$$\nu = (R - (r_1 + r_2 + r_m) + (m-1))$$

(v) El tamaño de muestra o número de unidades de resina que asegura un 99% de confianza es²⁵:

$$n = \frac{1}{4} \left[\left(-Z_c \times \sqrt{\nu} \right) + \sqrt{\left(\nu \times Z_c^2 \right) + \left(4 \times R \times (k-1) \right)} \right]^2$$

El parámetro n corresponde al número de unidades de resina necesarias para tener un número fijo de compuestos con el número de replicadas deseadas. El peso de resina para ser usada en la síntesis se calculó a partir del número de unidades resina por gramo, el cual es un dato conocido o que se puede calcular fácilmente. Debido a las pérdidas de péptidil resina durante las síntesis, por la manipulación de la resina y las pruebas de ninhidrina, se adicionó un 10 % a la cantidad de resina calculada. El número de unidades de resina calculado fue de cerca de 165000.

$$N_{ur} = \frac{1}{\frac{4}{3} \pi \left(\frac{1}{2} D\right)^3 \rho_r}$$

Donde N_{ur} es el número de unidades de resina por gramo de resina (u_r/g), D es el diámetro promedio de las unidades de resina en cm y ρ_r corresponde a la densidad de la resina reportada por el fabricante (12 g/cm^3 de resina solvatada en metanol). Conociendo la funcionalización de la resina se puede calcular los nanomoles de sitios reactivos por unidad de resina (nmol/u_r):

$$\text{nmol}/u_r = \frac{10^6 F}{N_{ur}}$$

Donde u_r es una unidad de resina y F es el grado de funcionalización de la resina solvatada en metanol (moles/g resina). En el caso del lote de resina usada en esta síntesis el diámetro promedio de las unidades de resina es de $225 \mu\text{m}$, la densidad de la resina solvatada en metanol es de 0.083 g/cm^3 , el N_{ur} calculado fue de 103500 unidades de resina/g y cada unidad de resina tiene aproximadamente 0.5 nmol de sitios activos.

6.7.1.2. Acondicionamiento de resina y reducción de la funcionalización

La químioteca fue sintetizada sobre la resina biocompatible PEGA de funcionalización 0.4 mmol/g de resina seca (0.06 mmole/g de resina solvatada en metanol). Esta resina tiene dos propiedades que dificultan su manejo, en primer lugar tiene baja resistencia mecánica, y en segundo, esta se adhiere fuertemente a las superficies de vidrio. Por estas razones no se usaron sistemas de agitación internos y sólo se trabajó en reactores y utensilios de polipropileno. Inicialmente, la resina se dispuso en un reactor de polipropileno con filtro de polietileno, se solvató y acondicionó después de lavados sucesivos con metanol ($1 \times 10 \text{ min}$), DCM ($5 \times 1 \text{ min}$), 40 % TFA en DCM v/v ($1 \times 1 \text{ min}$ y $1 \times 20 \text{ min}$), 5% DIEA en DCM v/v ($4 \times$

2min), DCM (5x1 min), DMF (5x1 min).

La funcionalización de la resina se redujo hasta obtener una de 0.26 mmol/g resina. Para realizar esto se incorporaron dos Boc-aminoácidos consecutivos, no presentes en la secuencia de la quimioteca, para poder determinar la funcionalización final por análisis de aminoácidos, a partir de la relación entre los moles del primer y el segundo residuos acoplados a la resina. Para incorporar totalmente el primer aminoácido, se adicionaron a la resina 5 eq. de Boc-Gly -OH en DMF preactivada con el mismo número de excesos de DIP y HOBt, se dejó reaccionar por 1 hora y se repitió el acoplamiento. Después de verificar la finalización de la reacción mediante un ensayo de ninhidrina, se realizó la acetilación del exceso de grupos aminos libres de la resina, con una disolución de 15% anhídrido acético y 5% DIEA en DMF por 30 min. El grupo Boc se eliminó por tratamiento con 40% TFA en DCM v/v con 1% de DTT como capturador de carbocationes (1x1 min y 1x20 min). Posteriormente, la resina se neutralizó con 5% DIEA en DCM v/v (4x 2min) se lavó con DCM (5x1 min) y DMF (5x1 min). El siguiente residuo, Boc-Ile-OH, se incorporó en tres ciclos de una hora usando 0.6 eq. con los activadores usados previamente. En cada ciclo de acoplamiento se realizó análisis de aminoácidos de la péptidil-resina y se calculó la relación de las concentraciones entre Gly/Ile para obtener la funcionalización de la resina (6.1.4). Después de conseguir la incorporación de un 50-60% del segundo residuo, los grupos amino libres se bloquearon agregando una disolución con 25 eq. de anhídrido acético y 25 eq. de piridina en DMF, en cantidad suficiente para solvatar la resina. La reacción se dejó en agitación por 20 min y se verificó cualitativamente su eficiencia realizando el ensayo de ninhidrina¹.

6.7.1.3. Incorporación del espaciador bifuncional HMFS

El espaciador bifuncional se incorporó en dos ciclos de reacción por adición de 1.5 y 0.5 eq. de HMFS preactivado con DIP y HOBt en DMF, respectivamente. Cada ciclo se dejó en agitación por 12 h y se comprobó el acoplamiento total del espaciador mediante en ensayo de ninhidrina.

6.7.1.4. Acoplamiento del primer aminoácido

El primer residuo se incorporó en dos ciclos de reacción con 5 eq. de aminoácido preactivado con 0.5 eq. de DIP y 0.5 eq. de DMAP durante 1 h. Se verificó el acoplamiento del aminoácido mediante un ensayo cualitativo para la detección de alcoholes (ver 6.1.2). Se efectuó un paso adicional de acetilación con 25 eq. anhídrido acético y 25 eq. de piridina en

DMF por 20 min con el fin de bloquear cualquier grupo hidroxilo del espaciador que permaneciera aún sin reaccionar.

6.7.1.5. Desprotección de grupo Boc

La peptidil-resina protegida con el grupo Boc se hizo reaccionar con una disolución del 40% de TFA en DCM con un 1% de DTT durante 20 minutos. Se filtró la resina y se repitió el tratamiento una vez más. La resina se neutralizó con 5% de DIEA en DCM (4x2 min) y se lavó con DCM (3x1 min) y DMF (3x1 min).

6.7.1.6. Incorporación de los aminoácidos

En el proceso de síntesis de la quimioteca OBOC se utilizaron dos formas para incorporar los aminoácidos, dependiendo si se trataba de un residuo común a todos los péptidos y otra si había una posición variación. En las regiones donde la secuencia era igual para todos los elementos de la quimioteca los ciclos de acoplamiento y desprotección se realizaron en un único reactor. En las posiciones variables la peptidil-resina se distribuyó homogéneamente en diferentes reactores, de acuerdo al número de variaciones. En este caso los ciclos de acoplamiento y de desprotección se realizaron en cada reactor, en las condiciones que requiriera cada variación. Para dividir la resina homogéneamente se adicionó DMF y se mantuvo en suspensión agitando continuamente con un flujo lento y constante de N₂. Mientras las unidades de resina estaban suspendidas se tomaron alícuotas de igual volumen, que se distribuyeron en diferentes reactores con ayuda de una pipeta *Pasteur* de polipropileno. Este proceso permitió obtener cantidades muy similares entre si de peptidil-resina en los diferentes recipientes. Además, se evitó la rotura de unidades por choque mecánico característico de la resina PEGA.

Para incorporar los aminoácidos, se preactivaron 4 eq. del Boc-aminoácido con DIP y HOBt en una relación (1:1:1) usando como disolvente DMF. La peptidil resina se dejó reaccionar por 1 hora, tras lo cual se eliminó la disolución y se repitió el ciclo con disolución fresca de reactivos. Después del segundo ciclo se lavó la peptidil-resina con DMF (5x1 min) y DCM (5x1 min). Por último, se hizo un ensayo de ninhidrina para comprobar la finalización del acoplamiento. Si prolina era el residuo anterior al acoplamiento en curso, se realizó el ensayo de cloranilo para verificar el final de la reacción (ver 6.1.3).

Al finalizar la incorporación de todos los aminoácidos de la secuencia, el residuo N-terminal se acetiló con una mezcla de anhídrido acético y piridina en DMF (ver 6.7.1.2.)

6.7.1.7. Desprotección de las cadenas laterales

La desprotección de las cadenas laterales de los péptidos sintetizados se realizó tratando la peptidil-resina con una mezcla HF/*m*-cresol (95:5) por 1.5 h a 0°C. Para ello se empleó un sistema especial de teflón (ver 6.3.2). La resina se introdujo en los reactores solvatada en DCM. Se adicionó la cantidad adecuada de *m*-cresol y se acopló el reactor al sistema de desprotección. El reactor se enfrió empleando N₂ líquido y se condensó HF anhidro en su interior (5 mL por cada 300 mg de resina). La reacción se dejó proceder durante 90 min, sin agitación a 0 °C. Posteriormente el HF se evaporó al vacío y la peptidil-resina se transfirió a un reactor de síntesis empleando éter dietílico frío. Posteriormente, ésta se lavó con DMF (5×1 min), DCM (5×1 min), 1 % TFA en DCM (3×1 min), DCM (3×1 min) y se guardó a 20 °C.

El grupo fórmilo que protegía el nitrógeno del grupo indol del triptófano no se eliminó completamente en el tratamiento con HF. Para retirar este grupo, y otros que hubieran podido permanecer después del primer tratamiento con HF, la peptidil resina seca se hizo reaccionar con un cóctel de TFMSA/TFA/DMS/*m*-cresol/EDT^b (10:49:29:10:2, 100 mg resina seca en 1.0 mL de disolución) durante 2-3 horas entre 0 y 5 °C con agitación constante. A continuación, la resina se filtró a través de una jeringuilla con filtro de polipropileno. Para eliminar los restos de reactivos, la peptidil resina se lavó con éter (10x1 min), metanol (10x1 min), DCM (10x1 min) y se guardó solvatada a 20°C hasta su posterior uso²⁶.

6.7.1.8. Liberación del péptido de la resina

En el procedimiento general de desanclaje del péptido unido a HMFS se empleó una disolución de morfolina/DMF (1:4). La mezcla de reactivos que se adicionó sobre la resina previamente solvatada con DMF y se dejó reaccionar por 1 h. Posteriormente, la resina se separó por filtración y se evaporó el disolvente de la disolución resultante. El producto se recuperó por precipitación con TBME frío. Cuando la reacción se realizó sobre una unidad de resina el volumen de reacción fue de 2 µL y se dejó evaporar al ambiente. No obstante, las condiciones de esta reacción cambiaron según el análisis posterior a realizar (6.7.3).

^b Este procedimiento se puede realizar antes del tratamiento con HF.

6.7.2. Secuenciación de péptidos por degradación de Edman

La degradación de Edman es una técnica usada para obtener la secuencia de aminoácidos de péptidos y proteínas. Esta técnica permite derivatizar y escindir el residuo N-terminal y deja libre el siguiente grupo amino del residuo para el siguiente ciclo de derivatización. El grupo amino terminal del péptido o proteína reacciona con el reactivo de Edman (fenilisotiocianato, PITC) para producir un derivado tiourea. Posteriormente, el aminoácido N-terminal se escinde como un derivado 2-anilino-5-tiazolinona (ATZ) con ácido trifluoroacético. El derivado inestable ATZ se convierte en 3-fenil-2-tiohidantoína (PTH) en medio ácido, el cual es separado por RP-HPLC y la identificación se realiza por comparación con los tiempos de retención de los patrones estándar. Por medio de esta técnica se secuenciaron algunos de los péptidos de la quimioteca anclados a unidades de resina^c.

6.7.3. Identificación de los péptidos de la quimioteca afines a H₁₋₂

Por cada análisis 200 mg de peptidil resina solvatada en DCM se transfirieron a una jeringuilla con filtro de polietileno. La peptidil resina se lavó consecutivamente con DCM (10x1 min) y DMF (10x1 min). Para dividir la resina en alícuotas de aproximadamente 1000 bolas, se adicionó 1 mL de DMF y bajo agitación constante se transfirieron 40 µL a tubos de centrifuga jeringuillas con filtro de (0.45 µm).

Para solvatar la peptidil resina en disolución tampón se realizaron los siguientes lavados: agua/DMF 1:2 (10x1 min), agua/DMF 1:1 (10x1 min), agua/DMF 2:1 (10x1 min), agua (10x1 min) y tampón fosfato pH 7.4 (10 mM de fosfato, 2.7 mM cloruro de potasio 137 mM de cloruro de sodio) con 0.05% de tween 20 (10x1 min). Las interacciones inespecíficas de las paredes del tubo de centrifuga se bloquearon con una disolución de BSA al 1% en el mismo tampón fosfato (10x1 min, 1x60 min). Posteriormente, se realizaron varios lavados con BSA al 0.1% de tampón fosfatos (10x1 min).

Se preparó una disolución fresca de 2 µM de bH₁₋₂ (H₁₋₂ biotinilado) y 8 µM de estreptavidina-FITC en tampón fosfato pH 7.4, en un lugar con baja intensidad de luz. 250 µL de esta disolución se adicionaron a cada alícuota de peptidil resina. La mezcla protegida de la luz se dejó incubar con agitación constante (300 rpm) durante 2 h a temperatura ambiente. Las

^c Esta técnica se realizó en la plataforma mixta de proteómica de la unidad de servicios científico técnicos de la Universidad de Barcelona, por la Dra. Eliandre de Oliveira.

unidades de resina fluorescentes se identificaron visualmente con ayuda de un microscopio estereoscópico de fluorescencia Leica MZ FLIII. Para esto cada alícuota se transfirió a una cápsula de Petri con ayuda de una micropipeta y después de tres lavados de un minuto con tampón fosfatos con 0.05% de tween 20. Las unidades de peptidil resina fluorescentes se transfirieron, con ayuda de una micropipeta, a un tubo de centrifuga con filtro (de nylon y 0.45 μm de poro) para ser lavadas con tampón fosfatos y eliminar residuos de bH_{1-2} , estos tubos permitieron separar el líquido de la peptidil resina por centrifugación. A continuación, sobre estas unidades de resina se repitió el ensayo con el fin de verificar la actividad de las unidades de peptidil resina.

Las unidades de peptidil resina fueron lavadas nuevamente con disolución tampón de pH 7.4 con 0.05% de tween 20 (10x1 min) y con agua (10x1min) hasta eliminar las sales adsorbidas sobre la resina. Los péptidos activos unidos a la resina se escindieron con vapores de morfina y sus secuencias fueron identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF en tándem.

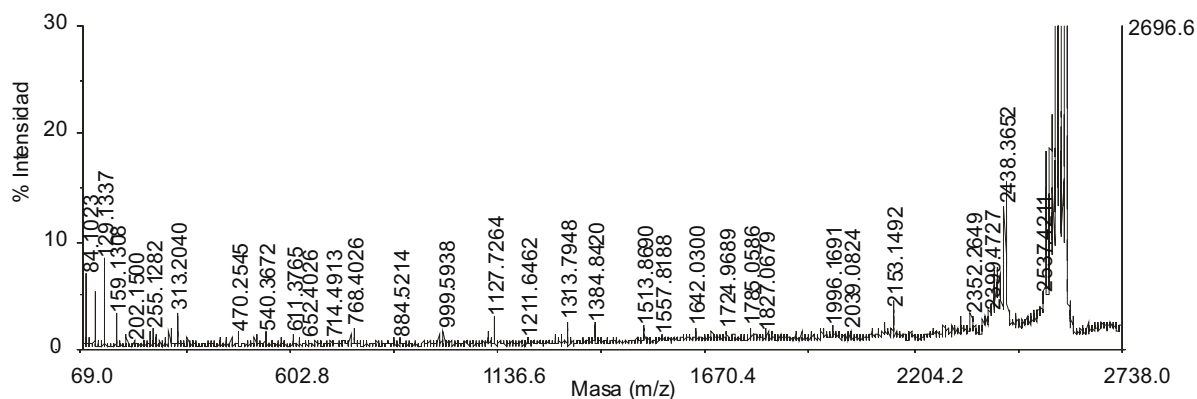
6.7.4. Espectros de masas MALDI TOF/TOF de los iones precursores de los péptidos todo-D activos de la quimioteca y asignación de las señales

Péptido: 1D
 Secuencia: Ac-dpsqlnawkeawkknkadqapk
 Masa molecular del ión precursor: 2595,0

Residuo	iones y	m/z (fragmentos encontrados)	m/z (fragmentos calculados)	iones b	m/z (fragmentos encontrados)	m/z (fragmentos calculados)
Ac		2595,4	2595,9			43,0
d	y22	2551,5	2552,9	b1	159,1	158,1
p	y21	2436,4	2437,8	b2	255,1	255,3
s	y20		2340,7	b3	342,2	342,3
q	y19		2253,6	b4	470,3	470,5
l	y18		2125,4	b5	583,3	583,6
n	y17		2012,3	b6		697,7
a	y16		1898,2	b7	768,4	768,8
w	y15	1827,1	1827,1	b8		955,0
k	y14	1642,0	1640,9	b9		1083,2
e	y13	1513,9	1512,7	b10	1211,6	1212,3
a	y12	1384,8	1383,6	b11	1282,7	1283,4
w	y11	1313,8	1312,5	b12		1469,6
k	y10	1127,6	1126,3	b13		1597,8
k	y9	999,6	998,1	b14	1725,0	1725,9
n	y8		870,0	b15		1840,1
k	y7	756,4	755,9	b16	1971,2	1968,2
a	y6	629,4	627,7	b17	2039,1	2039,3
d	y5		556,6	b18	2153,1	2154,4
q	y4	441,3	441,5	b19		2282,5
a	y3	313,2	313,4	b20	2352,3	2353,6
p	y2		242,3	b21		2450,7
k	y1		145,2	b22	2577,4	2578,9
OH			17,0		2595,4	2595,9

Espectro de masas MALDI TOF/TOF

4700 MS/MS Precursor 2595 Spec #1[BP = 2596.4, 8989]

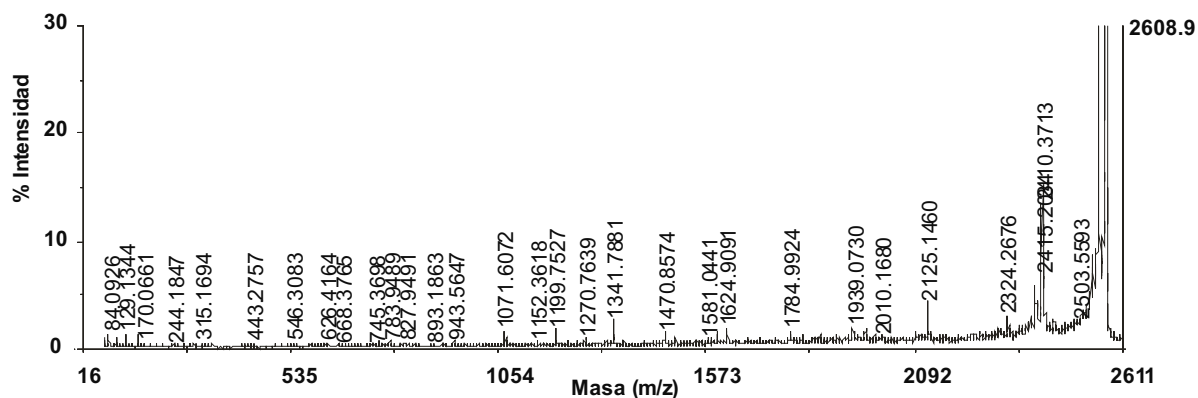


Péptido: 2D
 Secuencia: Ac-dpsqknawkeaakkwkadqapk
 Masa molecular del ión precursor: 2567,0

Residuo	iones y	m/z (fragmentos encontrados)	m/z (fragmentos calculados)	iones b	m/z (fragmentos encontrados)	m/z (fragmentos calculados)
Ac			2567,9			43,0
d	y22		2524,8	b1		158,1
p	y21	2409,3	2409,8	b2		255,3
s	y20		2312,6	b3		342,3
q	y19		2225,6	b4		470,5
k	y18		2097,4	b5		598,6
n	y17	1968,1	1969,3	b6		712,7
a	y16		1855,2	b7		783,8
w	y15	1785,0	1784,1	b8		970,0
k	y14	1598,9	1597,9	b9		1098,2
e	y13	1470,9	1469,7	b10		1227,3
a	y12	1341,8	1340,6	b11		1298,4
a	y11	1270,8	1269,5	b12		1369,5
k	y10	1199,8	1198,4	b13		1497,7
k	y9	1071,6	1070,2	b14	1624,9	1625,8
w	y8	943,6	942,1	b15	1812,0	1812,0
k	y7		755,9	b16	1939,1	1940,2
a	y6		627,7	b17		2011,3
d	y5		556,6	b18	2125,1	2126,4
q	y4		441,5	b19		2254,5
a	y3		313,4	b20	2324,3	2325,6
p	y2		242,3	b21		2422,7
k	y1		145,2	b22	2549,5	2550,9
OH			17,0			2567,9

Espectro de masas MALDI TOF/TOF

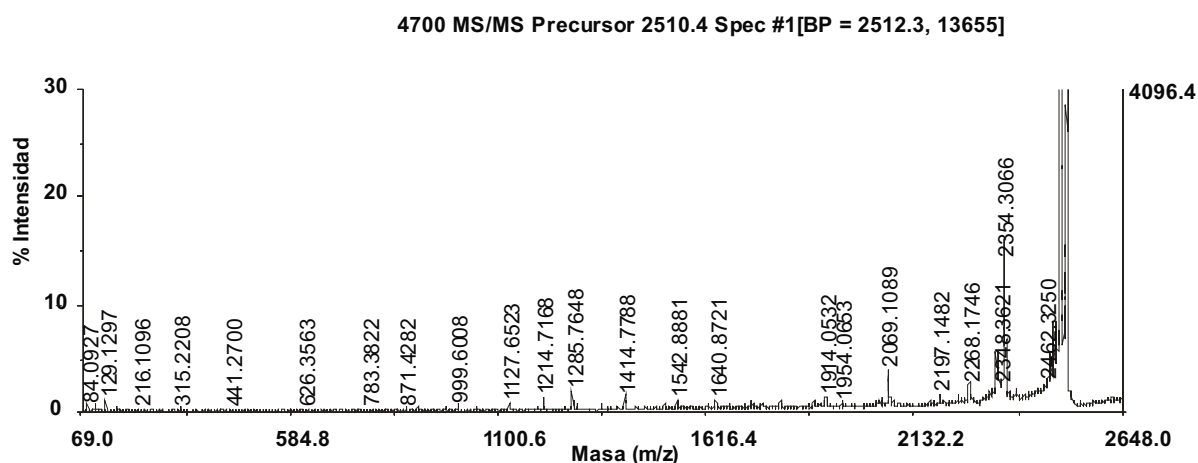
4700 MS/MS Precursor 2566 Spec #1[BP = 2568.4, 8696]



Péptido: 3D
 Secuencia: Ac-dpsqknawkeaskknkadqpk
 Masa molecular del ión precursor: 2511,0

Residuo	iones y	m/z (fragmentos encontrados)	m/z (fragmentos calculados)	iones b	m/z (fragmentos encontrados)	m/z (fragmentos calculados)
Ac		2511,3	2511,8			43,0
d	y22	2467,4	2468,7	b1	159,1	158,1
p	y21	2353,3	2353,6	b2		255,3
s	y20		2256,5	b3		342,3
q	y19		2169,5	b4		470,5
k	y18		2041,3	b5		598,6
n	y17	1914,1	1913,1	b6		712,7
a	y16		1799,0	b7	783,4	783,8
w	y15		1728,0	b8		970,0
k	y14	1542,9	1541,8	b9		1098,2
e	y13	1414,8	1413,6	b10		1227,3
a	y12	1285,8	1284,5	b11	1298,6	1298,4
s	y11	1214,7	1213,4	b12		1385,5
k	y10	1127,7	1126,3	b13	1512,8	1513,7
k	y9	999,6	998,1	b14	1640,9	1641,8
n	y8	871,4	870,0	b15		1755,9
k	y7		755,9	b16	1884,1	1884,1
a	y6	626,4	627,7	b17	1954,1	1955,2
d	y5		556,6	b18	2069,1	2070,3
q	y4	441,3	441,5	b19	2197,1	2198,4
a	y3	315,2	313,4	b20	2268,2	2269,5
p	y2		242,3	b21		2366,6
k	y1		145,2	b22	2493,4	2494,8
OH			17,0		2511,3	2511,8

Espectro de masas MALDI TOF/TOF

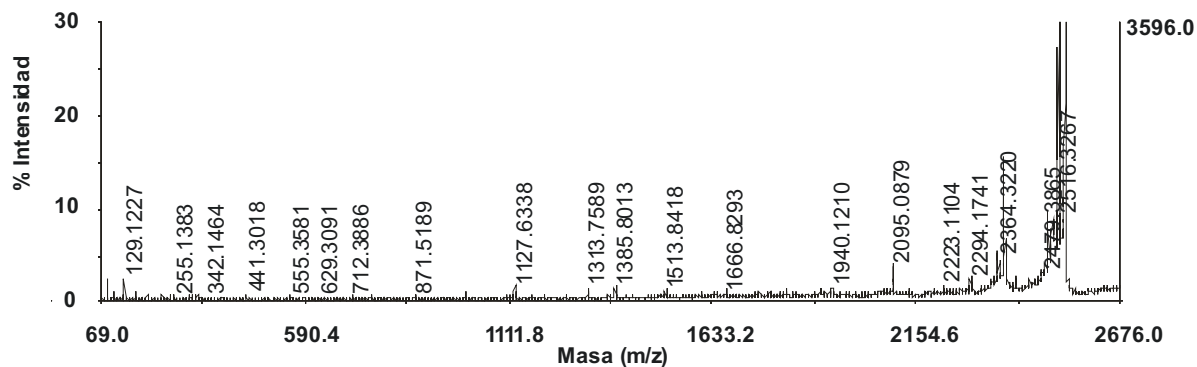


Péptido: 4D
 Secuencia: Ac-dpsqknalkeawkknkadqpk
 Masa molecular del ión precursor: 2537,0

Residuo	iones y	m/z (fragmentos encontrados)	m/z (fragmentos calculados)	iones b	m/z (fragmentos encontrados)	m/z (fragmentos calculados)
Ac		2537,3	2537,9			43,0
d	y22	2493,5	2494,8	b1		158,1
p	y21	2380,3	2379,7	b2	255,1	255,3
s	y20		2282,6	b3	342,1	342,3
q	y19		2195,5	b4		470,5
k	y18		2067,4	b5		598,6
n	y17	1940,1	1939,2	b6	712,4	712,7
a	y16		1825,1	b7		783,8
l	y15		1754,0	b8		897,0
k	y14		1640,9	b9		1025,2
e	y13	1512,8	1512,7	b10		1154,3
a	y12	1384,7	1383,6	b11		1225,3
w	y11	1313,8	1312,5	b12		1411,6
k	y10	1127,6	1126,3	b13		1539,7
k	y9		998,1	b14	1666,8	1667,9
n	y8	871,5	870,0	b15		1782,0
k	y7		755,9	b16		1910,2
a	y6	629,3	627,7	b17		1981,3
d	y5	555,4	556,6	b18	2095,1	2096,4
q	y4	441,3	441,5	b19	2223,1	2224,5
a	y3	313,2	313,4	b20	2294,2	2295,6
p	y2	244,2	242,3	b21		2392,7
k	y1		145,2	b22	2519,4	2520,9
OH			17,0			2537,9

Espectro de masas MALDI TOF/TOF

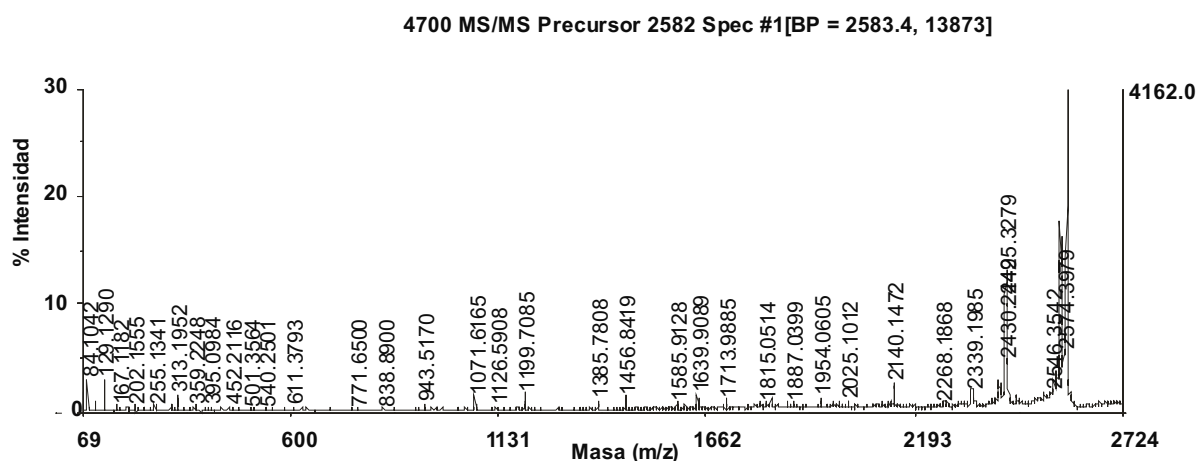
4700 MS/MS Precursor 2537 Spec #1[BP = 2538.3, 11987]



Péptido: 5D
 Secuencia: Ac-dpsqknaIteawkkwkadqpk
 Masa molecular del ión precursor: 2582,0

Residuo	iones y	m/z (fragmentos encontrados)	m/z (fragmentos calculados)	iones b	m/z (fragmentos encontrados)	m/z (fragmentos calculados)
Ac		2582,4	2582,9			43,0
d	y22		2539,9	b1		158,1
p	y21	2425,3	2424,8	b2	255,1	255,3
s	y20		2327,7	b3	342,2	342,3
q	y19		2240,6	b4	470,2	470,5
k	y18	2113,1	2112,4	b5		598,6
n	y17	1983,1	1984,3	b6		712,7
a	y16		1870,2	b7		783,8
l	y15		1799,1	b8		897,0
t	y14		1685,9	b9		998,1
e	y13	1585,9	1584,8	b10	1126,6	1127,2
a	y12	1455,9	1455,7	b11	1199,7	1198,3
w	y11	1385,8	1384,6	b12	1385,8	1384,5
k	y10	1197,5	1198,4	b13		1512,7
k	y9	1070,5	1070,2	b14	1639,9	1640,8
w	y8	943,5	942,1	b15	1824,9	1827,1
k	y7	756,9	755,9	b16	1954,1	1955,2
a	y6	629,3	627,7	b17	2025,1	2026,3
d	y5		556,6	b18	2140,1	2141,4
q	y4	443,3	441,5	b19	2268,2	2269,5
a	y3	313,2	313,4	b20	2339,2	2340,6
p	y2	242,1	242,3	b21		2437,7
k	y1		145,2	b22	2564,4	2565,9
OH			17,0		2582,4	2582,9

Espectro de masas MALDI TOF/TOF

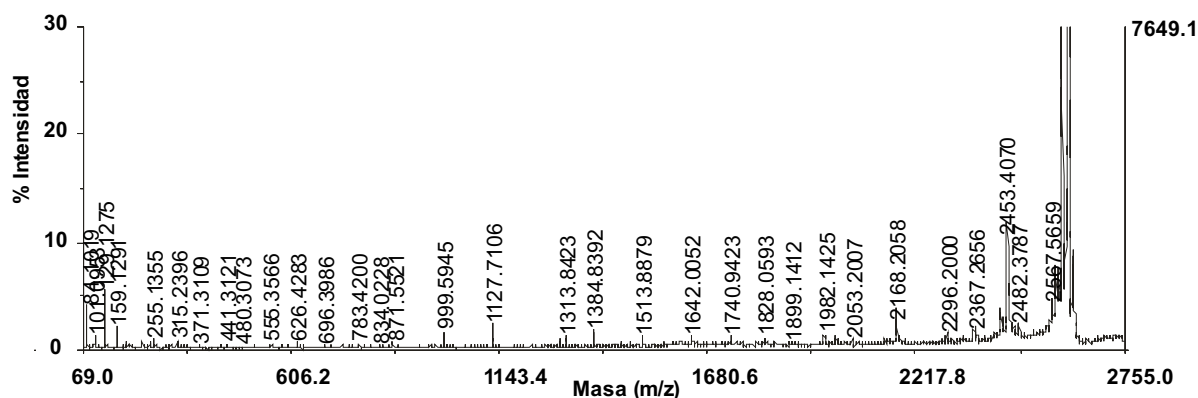


Péptido: 6D
 Secuencia: Ac-dpsqknawkeawkknkadqapk
 Masa molecular del ión precursor: 2610,9

Residuo	iones y	m/z (fragmentos encontrados)	m/z (fragmentos calculados)	iones b	m/z (fragmentos encontrados)	m/z (fragmentos calculados)
Ac		2610,4	2610,9			43,0
d	y22	2567,6	2567,9	b1	159,1	158,1
p	y21	2452,4	2452,8	b2	255,1	255,3
s	y20		2355,7	b3	342,2	342,3
q	y19		2268,6	b4		470,5
k	y18		2140,5	b5	598,3	598,6
n	y17	2011,2	2012,3	b6		712,7
a	y16	1899,1	1898,2	b7	784,6	783,8
w	y15	1828,1	1827,1	b8		970,0
k	y14	1641,0	1640,9	b9	1097,6	1098,2
e	y13	1512,8	1512,7	b10		1227,3
a	y12	1384,8	1383,6	b11	1297,7	1298,4
w	y11	1313,8	1312,5	b12		1484,6
k	y10	1127,7	1126,3	b13	1611,8	1612,8
k	y9	997,2	998,1	b14	1740,9	1741,0
n	y8	871,6	870,0	b15	1854,1	1855,1
k	y7		755,9	b16	1982,1	1983,2
a	y6	626,4	627,7	b17	2053,2	2054,3
d	y5	555,4	556,6	b18	2168,2	2169,4
q	y4	441,3	441,5	b19	2296,2	2297,5
a	y3	313,2	313,4	b20	2367,3	2368,6
p	y2	240,2	242,3	b21	2464,4	2465,7
k	y1		145,2	b22	2592,5	2593,9
OH			17,0		2610,4	2610,9

Espectro de masas MALDI TOF/TOF

4700 MS/MS Precursor 2611 Spec #1[BP = 2611.5, 25497]



6.7.5. Síntesis de los péptidos:

1D

Ac-dpsqlnawkeawkknkadqapk-NH₂

104 mg de producto crudo y 20 mg de producto purificado.

Rendimiento final de síntesis: 7.7 %.

Condiciones de purificación: flujo lineal inicial de 0-15 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 15 al 40 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 10.9 min (gradiente lineal del 0 al 40 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos: D-Ala: 3.9 (4), D-Asp/D-Asn: 4.1 (4), D-Glu/D-Gln: 3.1 (3), D-Leu: 1.3 (1), D-Lys: 5.0 (5), D-Pro: 1.8 (2), D-Ser: 0.6 (1), D-Trp: ND (2).

MALDI-TOF: (M+H)⁺= 2594.5 (2594.3 esperado *m/z*).

2D

Ac-dpsqknawkeaakkwkadqapk-NH₂

120 mg de producto crudo y 23.6 mg de producto purificado.

Rendimiento final de síntesis: 9.2 %.

Condiciones de purificación: flujo lineal inicial de 0-10 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 10 al 36 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 9.9 min (gradiente lineal del 0 al 40 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos: D-Ala: 5.2 (5), D-Asp/D-Asn: 3.0 (3), D-Glu/D-Gln: 3.0 (3), D-Lys: 6.1 (6), D-Pro: 1.9(2), D-Ser: 0.7 (1), D-Trp: ND (2).

MALDI-TOF: (M+H)⁺= 2566.5 (2566.3 esperado *m/z*).

3D

Ac-dpsqknawkeaskknkadqapk-NH₂

100 mg de producto crudo y 23.2 mg de producto purificado.

Rendimiento final de síntesis: 9.2 %.

Condiciones de purificación: flujo lineal inicial de 0-10 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 10 al 26 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 7.6 min (gradiente lineal del 0 al 40 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos: D-Ala: 4.2 (4), D-Asp/D-Asn: 4.1 (4), D-Glu/D-Gln: 3.1 (3), D-Lys: 6.4 (6), D-Pro: 1.9 (2), D-Ser: 1.3 (2), D-Trp: ND (1).

MALDI-TOF: $(M+H)^+$ = 2510.5 (2510.3 esperado m/z).

4D

Ac-dpsqknalkeawkknkadqapk-NH₂

108 mg de producto crudo y 24.0 mg de producto purificado.

Rendimiento final de síntesis: 9.5 %

Condiciones de purificación: flujo lineal inicial de 0-10 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 10 al 26 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 8.8 min (gradiente lineal del 0 al 40 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos: D-Ala: 4.3 (4), D-Asp/D-Asn: 4.3 (4), D-Glu/D-Gln: 3.2 (3), D-Lys: 6.4 (6), D-Pro: 1.9 (2), D-Ser: 0.7 (2), D-Trp: ND (1).

MALDI-TOF: $(M+H)^+$ = 2536.8 (2536.4 esperado m/z).

5D

Ac-dpsqknalteawkkwkadqapk-NH₂

140 mg de producto crudo y 30.0 mg de producto purificado.

Rendimiento final de síntesis: 11.6 %.

Condiciones de purificación: flujo isocrático inicial de 100% de A durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 0 al 40 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 11.9 min (gradiente lineal del 0 al 40 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos: D-Ala: 4.1 (4), D-Asp/D-Asn: 3.1 (3), D-Glu/D-Gln: 3.3 (3), D-Leu: 1.5

(1), D-Lys: 5.2 (5), D-Pro: 2.0 (2), D-Ser: 0.6 (1) , D-Thr: 0.9 (1), D-Trp: ND (2).

MALDI-TOF: $(M+H)^+ = 2581.6$ (2581.4 esperado m/z).

6D

Ac-dpsqknawkeawkknkadqapk-NH₂

120 mg de producto crudo y 24.8 mg de producto purificado.

Rendimiento final de síntesis: 9.5 %.

Condiciones de purificación: flujo isocrático inicial de 100 % de A durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 0 al 40 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >98 %.

RP-HPLC (t_R)= 9.4 min (gradiente lineal del 0 al 40 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos: D-Ala: 4.1 (4), D-Asp/D-Asn: 4.0 (4), D-Glu/D-Gln: 3.1 (3), D-Lys: 6.2 (6), D-Pro: 1.9 (2), D-Ser: 0.6 (1), D-Trp: ND (2).

MALDI-TOF: $(M+H)^+ = 2609.6$ (2609.4 esperado m/z).

Los procedimientos de usados para obtener los espectros de dicroísmo circular de los péptidos individuales y de las mezclas con H₁₋₂, así como, los experimentos de interacción en entre los péptidos y el fragmento H₁₋₂ se describirán dentro de los procedimientos experimentales del capítulo 3 (6.8.3 y 6.8.6.2).

6.8. Procedimientos experimentales del capítulo 3

6.8.1. Síntesis de los péptidos H_{3n}, H_{3a}, H_{3FANV}, H_{3FANK} y H₁₋₂

H_{3n}:

Ac-DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK-NH₂

61.9 mg. Rendimiento de síntesis: 26.4 %.

Condiciones de purificación: flujo isocrático inicial de 15 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 15 al 40 % de B durante 60 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >97 %.

RP-HPLC (t_R)= 6.2 min (gradiente lineal del 0 al 100 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min;

detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos: Asp/Asn: 4.2 (4.0), Ser: 1.7(2.0), Glu/Gln: 3.2 (3), Ala: 4.9 (5), Leu: 2.9 (3), Lys: 3.0 (3), Pro: 1.7 (2).

MALDI-TOF: $(M+H)^+ = 2349.9$ (esperado 2350.2 *m/z*).

H_{3a}:

Ac-AQKQASPDALKLNLPKADNASL-NH₂

92.3 mg.

Rendimiento de síntesis: 39 %.

Condiciones de purificación: Condiciones de purificación: flujo isocrático inicial de 15 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 15 al 40 % de B durante 60 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >97 %.

RP-HPLC (*t_R*)= 5.8 min (gradiente lineal del 0 al 100 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos: Asp/Asn: 4.1 (4.0), Ser: 1.6 (2.0), Glu/Gln: 3.2 (3), Ala: 4.8 (5), Leu: 2.9 (3), Lys: 3.0 (3), Pro: 2.1 (2).

MALDI-TOF: $(M+H)^+ = 2350.4$ (esperado 2350.2 *m/z*).

H_{3FANK}:

Ac-DPSQFANKLAEAKKLNDAPK-NH₂

57.5 mg. Rendimiento de síntesis: 23.7 %.

Condiciones de purificación: flujo isocrático inicial de 15 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 15 al 40 % de B durante 60 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >97 %.

RP-HPLC (*t_R*)= 5.9 min (gradiente lineal del 0 al 100 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos: Asp/Asn: 4.2(4.0), Ser: 0.9 (1.0), Glu/Gln: 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: $(M+H)^+ = 2425.6$ (esperado 2425.3 *m/z*).

H_{3FANV}:

Ac-DPSQFANVLAEAKKLNDAPK-NH₂

70.5 mg. Rendimiento de síntesis: 29.0 %.

Condiciones de purificación: flujo isocrático inicial de 15 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 15 al 40 % de B durante 60 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >97 %.

RP-HPLC (t_R)= 6.8 min (gradiente lineal) del 0 al 100 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos: Asp/Asn: 3.9 (4.0), Ser: 0.7 (1.0), Glu/Gln: 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: $(M+H)^+ = 2396.2$ (esperado 2396.3 m/z).

H₁₋₂:

Ac- APKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKD-NH₂

La peptidil resina fue dividida en tres partes iguales con el fin de obtener tres análogos con diferentes terminación N-terminal. De acuerdo al tipo de experimento a realizar se sintetizó el péptido H₁₋₂ N(t) acetilado, biotinilado y con la secuencia Cys-Ahx en el residuo amino terminal.

60 mg de crudo, 10 mg puros.

Rendimiento de síntesis: 16 %.

Condiciones de purificación: gradiente lineal inicial de 0-10 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 10-40 % de B durante 20 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza: >97 %.

RP-HPLC (t_R)= 11.2 min (gradiente lineal) del 0 al 50 % de B en 15 min; flujo 1 mL/min; detección por UV a 220 nm).

Análisis de aminoácidos: 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).

MALDI-TOF: $(M+H)^+ = 4641.4$ (esperado 4642.1 m/z).

6.8.2. Síntesis de los dominios covalentes

Dominio B:

Ac-APKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK-NH₂

204 100 mg crudo, 13 mg puros. Rendimiento de síntesis = 13 %.

Condiciones de purificación: gradiente lineal de inicial de 0-15 % de B durante 1 min seguido de un gradiente lineal del 15 al 40 % de B durante 40 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza > 98 %.

RP-HPLC (t_R) = 10.9 min (gradiente lineal de 0 to 50 % de B en 15 min) y 13.3 min (gradiente lineal de 0 to 35 % de B en 15 min).

Análisis de aminoácidos: Asp/Asn: 12.1(12), Ser: 2.57(3), Glu/Gln: 11.4(11), Gly: 0,9(1), Ala: 8,1(8), Ile: 1.7(2), Leu: 7.0(7), Tyr: 0.7(1), Phe: 2.6(3), His: 0.9(1), Lys: 6.9(7), Pro: 4.4 (4), Arg: 0.8(1).

MALDI-TOF: $(M+H)^+ = 6935.0$ (6.936,7 esperado m/z).

Dominio FANK

Ac-APKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQFANKLAEAKKLNDAQAPK-NH₂

127 mg de crudo, 18 mg puros. Rendimiento de síntesis = 14 %.

Condiciones de purificación: gradiente lineal inicial de 0-5 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 5 al 50 % de B durante 40 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza > 98%.

RP-HPLC (t_R) = 10.9 min (gradiente lineal de 0 to 50 % de B en 15 min, 14.36 min (gradiente lineal de 0 to 35 % de B en 15 min).

Análisis de aminoácidos: Asp/Asn: 12.3(12), Ser: 1.6(2), Glu/Gln: 10.7(11), Gly: 1.1(1), Ala: 7.5(8), Ile: 1.9(2), Leu: 6.1(6), Tyr: 0.7(1), Phe: 3.9(4), His: 0.9(1), Lys: 8.7(8), Pro: 4.4 (4), Arg: 0.9(1).

MALDI-TOF: $(M+H)^+ = 7009.0$ (esperado 7007.6 m/z).

Dominio FANV

Ac-APKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQFANVLAEAKKLNDAQAPK-NH₂

125 mg de crudo, 17.5 mg puros.

Rendimiento de síntesis = 14 %.

Condiciones de purificación: gradiente lineal inicial de 0-10 % de B durante 5 min seguido de un gradiente lineal del 10 al 40 % de B 45 min a un flujo de 10 mL/min; detección por UV a 220 nm.

Pureza > 98%.

RP-HPLC (t_R) = 10.6 min (gradiente lineal de 0 to 50 % de B en 15 min) y 14.82 min

(gradiente lineal de 0 to 35 % de B en 15 min).

Análisis de aminoácidos: Asp/Asn: 12.0(12), Ser: 1.5(2), Glu/Gln: 11.3(11), Pro: 4.4(4), Gly: 0.7(1), Ala: 7.8(8), Val 1.1(1), Ile: 1,7(2), Leu: 6.1(6), Tyr: 0.6(1), Phe: 4.8(4), His: 0.9(1), Lys: 7.1(7), Pro: 4.4 (4), Arg: 0.7(1)

MALDI-TOF: $(M+H)^+ = 6981.1$ (esperado 6978.6 m/z).

6.8.3. Dicroísmo circular de los complejos no covalentes

Por complejo no covalente se definió el complejo formado por el fragmento N-terminal (H_{1-2}) y el fragmento C-terminal (H_{3x}) del dominio B (H_{1-2}/H_{3x}). Los espectros se obtuvieron en un espectropolarímetro JASCO 810 con controlador de temperatura tipo Peltier acoplado a un termostato Julabo F25. Inicialmente, se prepararon las disoluciones patrón de los péptidos a 80 μM en disolución tampón de fosfatos 10 mM y 100 mM de NaCl a pH 7.4 y se filtraron a través de un filtro de 0.45 μM . Para obtener las disoluciones de los péptidos individuales, las disoluciones patrón se diluyeron hasta 40 μM con tampón. Para obtener las mezclas, cada una de las disoluciones de los péptidos H_{3x} se diluyó con igual volumen de la disolución del H_{1-2} , con lo cual se obtuvo una concentración final de 40 μM . Los experimentos se realizaron a 4 °C usando los siguientes parámetros de medida:

Rango de longitudes de onda: 190-260 nm

Anchura de banda: 1 nm

Respuesta: 1 sec

Velocidad de barrido: 50 nm/min

Acumulaciones: 3

Paso de luz: : 0.1 cm

Intervalo de datos: 0.2 nm

Número de datos: 351

Las medidas de dicroísmo se convirtieron a elipticidad molar de acuerdo a la siguiente ecuación¹⁶:

$$[\theta] = \frac{\theta}{10Cl}$$

Donde, θ es elipticidad molar ("mdegrees"), C es la molaridad (M) y l es el paso óptico en cm.

Las curvas de denaturación térmica de los complejos no covalentes se realizaron en una cubeta de un paso óptico 0.1 mm totalmente llena y con cierre hermético de teflón. Se usaron las siguientes condiciones de medida:

Rango de temperaturas: 4-45 °C

Velocidad de calentamiento: 1°C/min

Intervalo de datos: 0.2 °C

Numero de datos: 431

Longitud de onda: 222 nm

Ancho de banda: 1nm

Tiempo de respuesta: 1 s

La estimación de estructura secundaria se calculó a partir de los datos del espectro. Los datos se ajustaron usando una base de datos de espectros de proteínas de estructuras conocidas, considerando el espectro de dicroísmo circular como la combinación lineal de diferentes elementos estructurales y el ruido:

$$[\theta]_{\lambda} = \sum F_i S_{\lambda i} + \text{ruido}$$

Donde $[\theta]_{\lambda}$ es la elipticidad promedio por residuo; F_i fracción de cada estructura y $S_{\lambda i}$ es la base de espectros usados para el ajuste. Los componentes estructurales calculados incluyen hélices α , hojas β , giros y estructuras desordenadas. La estimación se realizó usando los métodos SELCON²⁷ y CONTINLL²⁸ del programa CDpro²⁹. La base escogida para realizar el ajuste contiene los datos de 48 proteínas³⁰⁻³³.

6.8.4. Dicroísmo circular de de el dominio B y análogos

Los espectros del dominio B y las curvas de estabilidad térmica se obtuvieron en las condiciones expuestas anteriormente (6.8.3). Las curvas de estabilidad térmica se registraron entre 4-90 °C. La temperatura de fusión fue determinada de la curva de denaturación asumiendo un mecanismo de dos estados usando un ajuste derivado de la ecuación de van't Hoff^{34,35}.

6.8.5. Resonancia magnética nuclear de el dominio B y análogos

6.8.5.1. Asignación

Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrómetro Bruker 800 MHz (Bruker Avance 800) a 30°C. Se realizaron experimentos TOCSY y NOESY. Tanto los experimentos los TOCSY como los NOESY fueron colectados con un tamaño de matriz de 4096x512. El tiempo de mezcla usado fue de 65 ms para los experimentos TOCSY y para los experimentos NOESY de 100 y 200 ms. La eliminación de la señal de agua se realizó usando la secuencia WATERGATE³⁶. Cada una de las disoluciones se preparó a una concentración de 1mM. Las muestras se disolvieron en 300 μ L de disolución tampón de fosfato de sodio 10 mM , NaCl 100 mM, 10% de D₂O, 0.1 mM DSS y 0.01% de Azida de sodio a pH 5.8. Los desplazamientos químicos ¹H se referenciaron a 0.00 ppm respecto al DSS³⁷. Los espectros fueron procesados y analizados usando los programas NMRPipe⁸ y NMRView J³⁹. Los espectros TOCSY fueron usados para asignar el sistema de espín de cada uno de los residuos y la asignación secuencial de los dominios se hizo en base a los espectros NOESY (Tabla 4,Tabla 5,Tabla 6).

Tabla 4. Desplazamiento químico de los protones en ppm de los protones H^N y H ^{α} del dominio B natural

	Residuo	δH^N (ppm)	δH^α (ppm)
1	Ala	8.29	4.08
3	Lys	8.27	4.18
4	Ala	7.91	4.45
5	Asp	8.27	4.53
6	Asn	8.24	4.56
7	Lys	8.16	4.19
8	Phe	7.96	5.03
9	Asn	8.45	4.74
10	Lys	8.32	3.98
11	Glu	8.25	4.11
12	Gln	8.51	3.88
13	Gln	8.70	3.96
14	Asn	8.30	4.63
15	Ala	7.94	4.07
16	Phe	8.14	3.80

17	Tyr	8.15	3.96
18	Glu	8.58	4.01
19	Ile	8.44	3.40
20	Leu	7.88	3.69
21	His	7.26	4.50
22	Leu	7.22	4.50
24	Asn	8.89	5.01
25	Leu	6.52	4.44
26	Asn	8.56	4.91
27	Glu	8.59	3.94
28	Glu	8.25	4.06
29	Gln	8.60	3.89
30	Arg	8.64	3.79
31	Asn	8.62	4.41
32	Gly	8.03	3.81
32	Gly	8.03	3.81
33	Phe	7.81	4.47
34	Ile	8.24	3.74
35	Gln	8.43	3.94
36	Ser	8.00	4.27
37	Leu	8.15	3.78
38	Lys	7.00	4.01
39	Asp	8.10	4.45
40	Asp	7.63	4.93
42	Ser	8.05	4.34
43	Gln	7.87	4.62
44	Ser	7.78	3.98
45	Ala	8.47	4.13
46	Asn	7.90	4.52
47	Leu	8.57	4.15
48	Leu	8.40	3.80
49	Ala	7.59	4.03
50	Glu	8.05	4.01
51	Ala	8.41	3.47
52	Lys	8.49	3.76
53	Lys	7.71	4.11
54	Leu	7.92	4.18

55	Asn	8.57	3.97
56	Asp	8.25	4.46
57	Ala	8.05	4.26
58	Gln	7.55	4.39
59	Ala	7.14	4.35
61	Lys	7.57	3.80

Tabla 5. Desplazamiento químico de los protones en ppm de los protones H^N y H^α del dominio FANK

	Residuo	δH ^N (ppm)	δH ^α (ppm)
1	Ala	8.18	4.54
3	Lys	8.39	4.31
4	Ala	8.31	4.16
5	Asp	8.07	4.49
6	Asn	8.26	4.56
7	Lys	8.24	4.16
8	Phe	8.01	4.96
9	Asn	8.33	4.67
10	Lys	8.34	3.91
11	Glu	8.31	3.94
12	Gln	8.26	4.06
13	Gln	8.64	3.91
14	Asn	8.28	4.56
15	Ala	7.74	4.19
16	Phe	8.08	3.90
17	Tyr	8.16	4.01
18	Glu	8.60	4.01
19	Ile	8.27	3.43
20	Leu	7.96	3.73
21	His	7.31	4.50
22	Leu	7.24	4.51
24	Asn	8.89	5.02
25	Leu	6.55	4.47
26	Asn	8.54	4.92
27	Glu	8.60	3.95
28	Glu	8.11	3.31
29	Gln	8.55	3.91

30	Arg	8.68	3.81
31	Asn	8.65	4.42
32	Gly	8.06	3.83
33	Phe	7.84	4.45
34	Ile	8.31	3.72
35	Gln	8.50	3.92
36	Ser	7.85	4.35
37	Leu	7.93	4.07
38	Lys	7.96	4.10
39	Asp	8.03	4.49
40	Asp	7.69	5.00
42	Ser	8.21	4.48
43	Gln	7.60	4.57
44	Phe	7.62	4.07
45	Ala	7.30	3.79
46	Asn	7.77	4.50
47	Lys	8.19	4.23
48	Leu	8.37	3.87
49	Ala	7.55	4.03
50	Glu	7.99	3.96
51	Ala	8.18	3.43
52	Lys	8.46	3.77
53	Lys	7.79	4.12
54	Leu	7.88	4.19
55	Asn	8.54	3.98
56	Asp	8.23	4.48
57	Ala	8.04	4.26
58	Gln	7.55	4.40
59	Ala	7.15	4.36
61	Lys	7.56	3.80

Tabla 6. Desplazamiento químico de los protones en ppm de los protones H^N y H^α del dominio FANV

	Residuo	δH ^N (ppm)	δH ^α (ppm)
1	Ala	8.17	4.56
3	Lys	8.45	4.32
4	Ala	8.28	4.09

5	Asp	7.95	4.46
6	Asn	8.26	4.52
7	Lys	8.37	4.32
8	Phe	8.04	5.05
9	Asn	8.32	4.69
10	Lys	8.30	3.91
11	Glu	8.24	3.91
12	Gln	8.08	4.40
13	Gln	8.64	3.92
14	Asn	8.25	4.58
15	Ala	8.12	4.06
16	Phe	8.05	3.84
17	Tyr	8.19	3.99
18	Glu	8.57	4.02
19	Ile	8.32	3.45
20	Leu	7.91	3.72
21	His	7.30	4.54
22	Leu	7.24	4.52
24	Asn	8.88	5.03
25	Leu	6.54	4.51
26	Asn	8.51	4.93
27	Glu	8.57	3.95
28	Glu	8.23	4.05
29	Gln	8.59	3.82
30	Arg	8.64	3.82
31	Asn	8.60	4.42
32	Gly	7.99	3.79
32	Gly	7.99	3.85
33	Phe	7.69	4.60
34	Ile	8.36	3.72
35	Gln	8.42	3.93
36	Ser	7.97	4.32
37	Leu	8.05	4.03
38	Lys	7.72	4.19
39	Asp	8.24	4.17
40	Asp	7.43	4.95
42	Ser	8.16	4.49

43	Gln	7.86	4.53
44	Phe	7.67	4.03
45	Ala	7.32	3.76
46	Asn	7.54	4.51
47	Lys	7.93	3.72
48	Leu	8.29	3.82
49	Ala	7.63	4.02
50	Glu	7.94	3.99
51	Ala	8.20	3.32
52	Lys	8.52	3.76
53	Lys	7.77	4.10
54	Leu	7.87	4.25
55	Asn	8.51	4.01
56	Asp	8.31	4.47
57	Ala	8.02	4.26
58	Gln	7.53	4.41
59	Ala	7.16	4.37
61	Lys	7.57	3.82

6.8.5.2. Intercambio Hidrógeno/Deuterio

Se preparó una disolución 1 mM de cada uno de los dominios justo antes de realizar los experimentos de resonancia. La muestra se disolvió en frío (2-4 °C) en un tampón fosfatos 10 mM en D₂O, NaCl 100mM, .1 mM DSS y 0.01% de Azida de sodio. El pH de la disolución se ajustó rápidamente a 5.8 con 0.02% NaOD en D₂O. El tiempo de preparación de la muestra y de ajuste de los parámetros de adquisición fue de aproximadamente 45±3 min, a partir del cual se adquirieron en una serie consecutiva experimentos TOCSY, con un tiempo de mezcla de 35 ms y con un tiempo de adquisición de 60 min cada uno, por mínimo 42 horas a 10°C.

6.8.6. Resonancia de plasmon superficial

6.8.6.1. Generalidades

Como disolvente se usó un tampón HEPES 10 mM a pH 7.4 con NaCl 150 mM, EDTA 3 mM

y 0.05 % (v/v) de surfactante P20^d (HBS-EP). Para desgasificar y eliminar partículas la disolución se filtró a través de un filtro de 0.22 μm ,

En general se usaron sensores (chips) cuya superficie estaba funcionalizada con una matriz de dextrano carboximetilado unido covalentemente a una película de oro. El sensor se dejó equilibrar a la temperatura de trabajo antes de introducirlo en el compartimiento del equipo. Posteriormente, la superficie del biosensor se dejó equilibrar por aproximadamente 30 min con el tampón de trabajo. En general se usaron dos tipos de sensores, los CM5 que están adaptados para equipos de modelo Biacore 1000, y los sensores CM5 (serie S) que están diseñados para ser utilizados en el modelo Biacore T100.

Todas las disoluciones de analitos fueron preparadas el mismo día del experimento. Los péptidos se cuantificaron por análisis de aminoácidos y se alicuotaron de acuerdo a las cantidades necesarias para cada ensayo. La disolución patrón de inmunoglobulina (IgG de conejo purificada, Sigma) 1 μM se preparó a partir del liofilizado disolviéndola en tampón HBS-EP y filtrándola a través de un filtro de 0.22 μm . La concentración final de inmunoglobulina fue determinada por la absorbancia a 280 nm considerando un $\epsilon=14$ (masa molecular: 150 kDa). La disolución del Fc de IgG humana (Chemicon) se diluyó a partir de una disolución patrón de 2.2 mg/mL (44 μM) en HBS-EP.

6.8.6.2. Interacción de los péptidos con H₁₋₂

Inmovilización de CAhxH₁₋₂

Para observar si este péptido era afín a la superficie, se inyectaron 10 μL de una disolución 1 μM de CAhxH₁₋₂ en tampón acetatos 20 mM a pH 4.5 y un flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ sobre la superficie carboximetilada del sensor CM5 (serie S). Posteriormente, la superficie se regeneró con una inyección de 48 μL de NaOH 50 mM. Los grupos carboxílicos de la superficie del sensor se activaron con una inyección de 20 μL de una disolución que contenía EDC 0.2 M y NHS 0.05 M en agua a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, mezclados justo antes de la inyección. Después de la activación se inyectaron 80 μL del reactivo de intercambio tiol-disulfuro (PDEA, 53 mM en tampón borato 100 mM pH 8.5, diluido a partir de una disolución patrón 80 mM justo antes de la inyección) a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

^d En los experimentos realizados en el instrumento Biacore 1000 la concentración de surfactante P20 en el tampón fue del 0.05 % (v/v).

Sobre el sensor se obtuvieron tres superficies con diferentes grados de inmovilización de CAhxH₁₋₂ (150, 500, 1000 RU). Las inmovilizaciones más altas fueron alcanzadas inyectando pulsos cortos de una disolución 25 µM de péptido en tampón acetatos 20 mM a pH 4.5 a un flujo de 5 µL/min. Para obtener la inmovilización más baja se usó una disolución 1 µM de péptido en tampón pH 4.0. La respuesta fue controlada hasta obtener el grado de inmovilización deseado.

Los grupos activos libres fueron bloqueados por inyección de 58 µL de una disolución de cisteína 50 mM y NaCl 1M en tampón de acetatos 100 mM a pH 4.0 a un flujo de 10 µL/min. Por último, la superficie se regeneró por inyección de 5 µL de HCl 50 mM y 5 µL de SDS 0.05%. La superficie de referencia se preparó paralelamente en el mismo sensor eliminando el ciclo de inyección de ligando de la serie de reacciones.

Análisis de la interacción

Cada uno de los péptidos se inyectó a diferentes concentraciones (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 µM) en superficies del sensor a 25 °C. La respuesta (RU) fue monitoreada en un equipo de Biacore T100. Todos los experimentos se realizaron inyectando 30 µL de péptido a un flujo de 30 µL/min usando tampón HBS-EP como disolución de arrastre. Entre inyecciones, las superficies se regeneraron por inyección de 15 µL de HCl 20 mM. Cada sensograma fue corregido por sustracción de la respuesta de unión no específica obtenida de la respuesta dada por superficie de referencia. Para analizar de los datos obtenidos se empleó el programa Biacore T100 evaluation (versión 1.1.1) o el programa BIAevaluation (versión 4.1). Las interacciones de baja constante de afinidad fueron analizadas a partir de las respuestas en el equilibrio (R_{eq}) a diferentes concentraciones de péptido⁴⁰. Para una interacción 1:1 las curvas se ajustaron a:

$$R_{eq} = \frac{(R_{max} * M)}{(K_D + M)} + c$$

Donde R_{eq} corresponde a la respuesta obtenida en el equilibrio menos la respuesta de la referencia. R_{max} es la máxima respuesta obtenida en condiciones de saturación. M es la concentración molar de péptido y c es una constante⁴¹.

6.8.6.3. Interacción de los complejos péptido/H₁₋₂ con IgG

Una cantidad constante de péptido se adicionó a la disolución de IgG para inducir la formación del complejo H₁₋₂/H_{3x}. La superficie de referencia y la funcionalizada con CAhxH₁₋₂

se prepararon como se describió en la sección anterior hasta alcanzar una respuesta de 150 RU. IgG de conejo fue usada como analito (Sigma).

Para medir el efecto de la presencia de péptido (H_{3n} , H_{3FANK} , H_{3FANV} , H_{3a}) se prepararon disoluciones de IgG a diferentes concentraciones (0.1, 0.25, 0.5, 1.5, 3.0 μ M) con 2.5 μ M de péptido. A esta concentración de péptido por sí solo no se observó un cambio detectable en la respuesta. Cada disolución de IgG y péptido se coinyectó por 7 min a un flujo de 10 μ L/min a 25 °C. La disociación se registró de dos formas; en primer lugar, la disociación de IgG en presencia de péptido se detectó durante 8.5 min, y posteriormente, la disociación de IgG en ausencia de péptido se siguió durante 10 min más. Finalmente, la superficie se regeneró con HCl 20 mM y 0.05% de SDS, inyectando cada disolución durante un minuto. Después de sustraer la respuesta dada por el canal de referencia, los sensogramas se analizaron con el programa Biacore T100 evaluation (versión 1.1.1) o el programa BIAevaluation (versión 4.1). Las constantes cinéticas y de afinidad fueron calculadas ajustando los datos a un modelo de unión 1:1.

6.8.6.4. Interacción del dominio B y análogos con IgG

Inmovilización de los dominios⁴²

La superficie carboximetilada de un sensor CM5 se activó con una inyección de 35 μ L de EDC 0.2 M y NHS 0.05 M en agua, mezclados justo antes de la inyección, a un flujo de 5 μ L/min. Para obtener un grado de inmovilización de 250 RU se inyectaron 15 μ L (10 μ M de proteína en tampón de acetatos 20 mM a pH 4.5) y una inyección de 35 μ L (50 μ M de proteína). Los grupos carboxilos activados que no llegaron a reaccionar se bloquearon por reacción con hidrócloruro de etanolamina 1 M (ajustado a pH 8.5) por inyección de 35 μ L. El exceso de reactivos se eliminó con inyecciones sucesivas de 5 μ L de SDS 0.05%, HCl 20 mM y NaOH 10 mM en agua.

Análisis cinético

Una serie de sensogramas se obtuvieron a diferentes concentraciones de IgG (10, 50, 100, 200, 300, 500 nM) a 25 °C. Todos los experimentos se realizaron usando HBS-EP como tampón. Los sensogramas se obtuvieron usando un flujo de 10 μ L/min en un instrumento Biacore 1000. Inicialmente se inyectaron 10 μ L de tampón tras lo cual se inyectaron 70 μ L de IgG de conejo. El complejo se dejó disociar por 7 min y la superficie se regeneró inyectando 10 μ L de HCl 20 mM. Los sensogramas finales se obtuvieron sustrayendo el

sensograma de la referencia. Los datos se analizaron con el programa BIAevaluation (versión 4.1)¹⁹.

6.8.6.5. Interacción del fragmento Fc con el dominio B y análogos

Inmovilización del fragmento Fc

El fragmento Fc se inmovilizó sobre la superficie de un sensor CM5 (Serie S). Inicialmente, se verificó la afinidad de Fc por la superficie del sensor por inyección de 10 μ L del fragmento Fc a un flujo de 5 μ L/min. Posteriormente, la proteína adsorbida se eliminó con una inyección de 48 μ L de NaOH 50 mM. Los grupos carboxílicos de la superficie se activaron inyectando 70 μ L de una disolución que contenía EDC 0.2 M y NHS 0.05 M en agua a un flujo de 10 μ L/min, mezclados justo antes de la inyección. El fragmento Fc se inmovilizó sobre la superficie después de una serie de inyecciones de pulsos cortos de una disolución 0.5 μ M en tampón acetato 20 mM a pH 4.5 a un flujo de 5 μ L/min. La respuesta se controló hasta alcanzar un grado de inmovilización de 2000 RU.

Los sitios de la superficie aun activos se bloquearon por reacción con hidrocloreto de etanolamina 1 M (pH 8.5) con una inyección de 70 μ L a un flujo de 10 μ L/min. La superficie de referencia se preparó en iguales condiciones eliminando el ciclo de inyección del fragmento Fc. El exceso de reactivos usados en el proceso se eliminaron con dos inyecciones sucesivas de 5 μ L de HCl 10 mM.

Análisis cinético:

Los sensogramas de asociación y disociación de cada dominio se obtuvieron a diferentes concentraciones (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5, 10, 25 μ M) a 25°C. De cada una de las disoluciones se inyectaron 150 μ L a un flujo de 30 μ L/min. Después de la inyección se dejaron 10 min de disociación antes de regenerar la superficie con 30 μ L de HCl 10 mM. Finalmente, los sensogramas de la referencia se sustrajeron de cada una de las muestras y los datos se analizaron con los programas Biacore T100 evaluation (versión 1.1.1) o BIAevaluation (versión 4.1)¹⁹.

Bibliografía

- (1) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.

- (2) Attardi, M. E.; Porcu, G.; Taddei, M. Malachite green, a valuable reagent to monitor the presence of free COOH on the solid-phase. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7391-7394.
- (3) Christensen, T. A chloranil color test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis. *Pept., Struct. Biol. Funct., Proc. Am. Pept. Symp., 6th* **1979**, 385-388.
- (4) Christensen, T. A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil. *Acta Chem. Scand. Serie B* **1979**, *B33*, 763-766.
- (5) Lamothe, P. J.; McCormick, P. G. Role of hydrindantin in the determination of amino acids using ninhydrin. *Anal. Chem.* **1973**, *45*, 1906-1911.
- (6) Cohen, S. A.; Michaud, D. P. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high- performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **1993**, *211*, 279-287.
- (7) De Antonis, K. M.; Brown, P. R.; Cohen, S. A. High-performance liquid chromatographic analysis of synthetic peptides using derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *Anal. Biochem.* **1994**, *223*, 191-197.
- (8) Schafer, N. C. Monitoring reactions in solid-phase peptide synthesis by conductivity measurements. In *PCT Int. Appl.*; (Biotech Instruments Ltd., UK). Wo, 1990; pp 52.
- (9) McFerran, N. V.; Walker, B.; McGurk, C. D.; Scott, F. C. Conductance measurements in solid phase peptide synthesis. I. Monitoring coupling and deprotection in Fmoc chemistry. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 382-387.
- (10) Kinter, M.; Sherman, N. E. *Protein sequencing and identificación using tandem mass spectrometry*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2000; 301.
- (11) Roepstorff, P.; Fohlman, J. Letter to the editors. *Biol. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601.
- (12) Johnson, R. S.; Martin, S. A.; Biemann, K.; Stults, J. T.; Watson, J. T. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2621-2625.
- (13) Falick, A. M.; Hines, W. M.; Medzihradszky, K. F.; Baldwin, M. A.; Gibson, B. W. Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 882-893.
- (14) Bar, S.; Alizon, M. Role of the ectodomain of the gp41 transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 in late steps of the membrane fusion process. *J. Virol.* **2004**, *78*, 811-820.
- (15) Ui, H.; Asanuma, S.; Chiba, H.; Takahashi, A.; Yamaguchi, Y. et al. Mycophenolic acid inhibits syncytium formation accompanied by reduction of gp120 expression. *J. Antibiot.* **2005**, *58*, 514-518.
- (16) Sreerama, N.; Woody, R. W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol.* **2004**, *383*, 318-351.
- (17) Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G. Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 138-146.
- (18) Lofås, S.; Johnsson, B.; Edstrom, A.; Hansson, A.; Lindquist, G. et al. Methods for site controlled coupling to carboxymethyl dextran surfaces in surface plasmon resonance sensors. *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 813-822.
- (19) *BIAevaluation version 4.0*; Biacore AB: Uppsala, Sweden, 2003; 310.
- (20) Myszka, D. G. Equilibrium, kinetic and thermodynamic analysis on BIACORE. *Methods Enzymol.* **2000**, *323*, 325-332.
- (21) Rabanal, F.; Giralt, E.; F., A. Synthesis and Applications of a New Base-Labile Fluorene Derived Linker for Solid-Phase Peptide Synthesis. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1449-1458.
- (22) Pastor, J. J.; Fernandez, I.; Rabanal, F.; Giralt, E. A new method for the preparation of unprotected peptides on biocompatible resins with application in combinatorial