

PART EXPERIMENTAL

0 MATERIALS I MÈTODES

0.1 PRINCIPALS DISSOLVENTS I REACTIUS

Resines i aminoàcids

Resines <i>p</i> -MBHA i Rink amida MBHA	Novabiochem
Aminoàcids en general	Neosystem, Advanced ChemTech
Fmoc-Arg(Pbf)-OH impurificada d'AcOH	GL Biochem Shanghai

Reactius d'acoblament

DIPCDI	Merck
DCC	Fluka
HOBt	SDS
HOAt	GL Biochem Shangai
PyBOP	Novabiochem
PyAOP	Applied Biosystems
TBTU	Albatros Chem. Inc.
HATU	Biosystems

Altres reactius

1,3-di-Boc-2-(trifluorometilsulfonyl)guanidina	Fluka
5-(6)-carboxifluoresceïna	Acros Organics
Biotin-OSu	Biochemika
Estreptavidina	Calbiochem
EDC, NHS i ETH	Biacore AB
Octil D-glucòsid	Aldrich
DMPC, Biotin-DSPE	Northern Lipids, Inc.
Triton X-100	Fluka
Pd(PPh ₃) ₄	Aldrich
PhSiH ₃	Fluka

Expressió de proteïnes

Sals i components dels medis de cultiu	Aldrich, Merck (qualitat "biologia molecular")
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, glucosa- ^{13}C	Cambridge Isotops Laboratories
Glicerol 87%	Merck
TEMED	Sigma
APS	Sigma
Acrilamida:bisacrilamida (37,5:1)	Amresco

Dissolvents i reactius generals

DCM	SDS (qualitat "anàlisi")
DMF	SDS (qualitat "síntesi de pèptids")
DIEA	Merck
TFA	Scharlau, Fluorochem (qualitat "HPLC")
Piperidina	SDS (qualitat "síntesi")
Fluorur d'hidrogen	Ucar
TBME	SDS (>99%)
Et_2O	SDS
Metanol	SDS (qualitat "HPLC")
Etanol	Panreac
Àcid acètic	SDS
Anhidrid acètic	Aldrich
ACN	SDS (qualitat "HPLC gradient")
Anisole, tioanisole	Fluka
EDT	Aldrich
Fenol	Fluka
HCl	Scharlau
NaOH	JEscuder
Toluè	SDS
DMSO	Panreac
Àcid sinapínic	Fluka
Àcid 2,5-dihidroxibenzoic	Aldrich
Àcid α -ciano-4-hidroxicinnàmic	Aldrich
NaH_2PO_4 i Na_2HPO_4	Aldrich (qualitat "biologia molecular")
D_2O	SDS
NaN_3	Fluka
H_2O	Desionitzada i filtrada amb un sistema Milli-Q (Millipore)

0.2 INSTRUMENTACIÓ GENERAL

Síntesi automàtica de pèptids	Applied Biosystems 430 A Advanced ChemTech 496 Ω MOS
Anàlisi d'aminoàcids	Beckman System 6300
Purificació de proteïnes	ÄKTA FPLC d'Amersham Biosciences ÄKTA Explorer d'Amersham Biosciences
Sonicador	IKASONIC U200-S d'IKA Labortechnik
Electroforesi en gel	Hofer "mighty small" SE250/SE260 amb font Apllex PS304 minipac II
Espectrometria de masses	
Electrosprai (EM-ES)	Micromass model VG-QUATTRO
MALDI-TOF	PEBiosystmes model VOYAGER-DE-RP PerSeptive Biosystems model VOYAGER-DE STR
Espectroscòpia UV-visible	Perkin-Elmer model Lambda 5 UV/Vis Shimadzu UV1240
Espectroscòpia de fluorescència	Aminco Bowman Series 2 amb termostat Haake DC 10
Dicroïsme circular	JASCO J-715 amb termostat JASCO PTC-343
Ressonància magnètica nuclear	Bruker DMX-500 Varian Inova 500
Ressonància de plasmó superficial	Biacore 1000
Calorimetria	MCS ITC unit de Microcal Inc.

HPLC analític

- Sistema Shimadzu amb controlador SCL-6B, bombes LC-6A, autoinjector SIL-6B/9A, detector UV-Vis SPC-6A i registrador Chromatopac C-R6A
 - Sistema WATERS 2695 amb detector "photodiode Array" WATERS 996
 - Sistema WATERS 1525 amb autoinjector WATERS 717 i detector UV-Vis dual WATERS 2487
-

HPLC-MS analític

- Sistema WATERS 2795 amb detector UV-Vis dual WATERS 2487 i detector Micromass ZQ
-

HPLC-MS preparatiu

- Sistema WATERS 600 amb autoinjector WATERS 2767, detector "photodiode array" WATERS 996 i detector Micromass ZQ
-

0.3 SÍNTESI I PURIFICACIÓ DE PÈPTIDS¹⁸⁷

0.3.1 ESTRATÈGIA Boc/Bzl

Elongació de la cadena peptídica

En tots els pèptids sintetitzats seguint l'esquema de protecció Boc/Bzl, la síntesi s'ha realitzat utilitzant el programa OPT21MT del sintetitzador automàtic Applied Biosystems 430 A, el qual utilitza en cada acoblament 10eq. del Boc-aa-OH corresponent. Pel que fa als agents acoblants s'ha utilitzat DCC / HOBt.

Per tal d'acetilar l'extrem N-terminal, s'ha traspasat la peptidil-resina a una xeringa de polipropilè provista d'un filtre de polietilè porós, i s'ha seguit el següent protocol:

¹⁸⁷ Lloyd-Williams, P., Albericio, F. & Giralt, E., "Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins", CRC Press, Boca Raton, 1997, pp. 48-75

Operació	Dissolvents i reactius	Tractaments
Rentat	DCM	5 x 1min.
Desprotecció Boc	TFA 40% en DCM	1 x 1min. + 1 x 20min.
Rentat	DCM	5 x 1min.
Neutralització	DIEA 5% en DCM	5 x 1min.
Rentat	DCM	5 x 1min.
Rentat	DMF	5 x 1min.
Acetilació	10eq. Ac ₂ O + 10eq. DIEA en DMF	1 x 20min.
Rentat	DMF	5 x 1min.
Rentat	DCM	5 x 1min.

Desprotecció de les cadenes laterals i escissió de l'enllaç pèptid-resina

Per tal d'eliminar el grup formil (protector de la cadena lateral del triptòfan) en aquesta estratègia, abans de dur a terme el tractament acidolític amb HF, es realitza el següent tractament:

Operació	Dissolvents i reactius	Tractaments
Rentat	DMF	5 x 1min.
Desprotecció formil	50% piperidina en DMF	1 x 1min. + 1 x 20min.
Rentat	DMF	10 x 1min.
Rentat	MeOH	5 x 1min.

Després del rentat de la peptidil-resina amb MeOH, aquesta s'asseca bé per succió i mitjançant un dessecador de buit.

Per tal de realitzar el tractament amb HF, es traspassa la resina a un reactor de tefló i Kel-F (Toho-Kasei Ltd.) i s'hi afegeixen 500µl de *p*-cresol (agent captador de carbocacions). El sistema es refreda amb N_{2(l)} i s'hi afegeixen 5ml de HF per destil·lació. A continuació, es deixa reaccionar a 0°C durant 1h i s'elimina el HF en excés mitjançant una trompa d'aigua durant uns 30min.

Per tal de precipitar el pèptid desprotegit i la resina, a la suspensió resultant s'hi addiciona Et₂O (assecat amb sodi) i es filtra a través d'una xeringa de polipropilè provista d'un filtre de polietilè porós. Per tal de solubilitzar el pèptid, es renta el precipitat amb AcOH 10%, es recull la solució resultant i es liofilitza.

0.3.2 ESTRATÈGIA Fmoc/^tBu

Elongació de la cadena peptídica

En les síntesis realitzades seguint l'estratègia Fmoc/^tBu s'han utilitzat diferents agents acoblants. De tota manera, en general, per a la incorporació de cada aminoàcid s'ha seguit el procés descrit a continuació:

Operació	Dissolvents i reactius	Tractaments
Rentat	DCM	5 x 1min.
Rentat	DMF	5 x 1min.
Desprotecció Fmoc	Piperidina 20% en DMF	1 x 1min. + 2 x 10min.
Rentat	DMF	5 x 1min.
Rentat	DCM	5 x 1min.
Control	Test de Kaiser	-
Rentat	DMF	5 x 1min.
Acoblament	Neq Fmoc-aa-OH + Neq. agents acoblants + 2*Neq. DIEA	1h-1h.30min
Rentat	DMF	5 x 1min.
Rentat	DCM	5 x 1min.
Control	Test de Kaiser	-

Les síntesis s'han realitzat en xeringues de polipropilè provistes de filtres de polietilè porós.

En el cas de les síntesis automàtiques, s'ha utilitzat el sintetitzador automàtic d'Advanced ChemTech 496 Ω MOS, el qual utilitza en cada acoblament 4eq. del Fmoc-aa-OH corresponent, TBTU / HOBt com a agents acoblants i piperidina 25% en DMF en les desproteccions.

En totes les síntesis, l'etapa final d'acetilació s'ha realitzat mitjançant un tractament amb 20eq. d'anhídrid acètic i 20eq. de DIEA en DMF durant 20min (prèvia desprotecció del grup Fmoc).

Desprotecció de les cadenes laterals i escissió de l'enllaç pèptid-resina

La desprotecció i escissió dels pèptids preparats seguint l'estratègia Fmoc/^tBu, s'ha realitzat mitjançant tractament acidolític amb el còctel K, el qual té la següent composició¹⁸⁸:

TFA / tioanisol / fenol/ EDT/ H₂O

82,5:5:5:2,5:5

¹⁸⁸ Mergler, M. & Durieux, J.P., "The BACHEM practice of SPPS", Bachem AG, 2000

En cada cas, la peptidil-resina prèviament secada amb rentats de MeOH i Et₂O per succió, es transfereix a un tub de centrífuga de 50ml i s'hi addiciona 1 ml de còctel K per cada 100mg de peptidil-resina (aproximadament). La mescla es deixa reaccionar durant 1-4h en funció del nombre d'arginines de la seqüència. Passat aquest temps, s'addicionen 40ml de TBME molt fred, s'agita bé i es centrifuga (4000rpm, 10min i 4°C). A continuació, es decanta el sobrenadant i es ressuspen el sediment en uns 15-20ml de TBME molt fred, s'agita bé i es torna a centrifugar (4000rpm, 10min i 4°C). Aquest rentat amb 15-20ml de TBME es repeteix dues vegades més.

Finalment s'obté un sediment en el qual hi ha la resina i el pèptid desprotegit. El pèptid es dissol amb mescles d'AcOH, H₂O i acetonitril i se separa de la resina per filtració. La solució resultant es liofilitza.

0.3.3 MÈTODES ANALÍTICS

Test de Kaiser

Altament anomenat, test de ninhidrina, s'ha utilitzat per comprovar l'eficàcia dels diferents acoblaments realitzats sobre amines primàries¹⁸⁹.

Anàlisi d'aminoàcids

S'ha utilitzat per comprovar que la composició aminoacídica és la correcte i per quantificar el pèptid present tant en solució com ancorat a la resina.

Per dur a terme la hidròlisi de pèptids en solució, es col·loca un volum conegut en un tub de vidre i s'hi addiciona HCl_(aq.) fins a una concentració 6N, juntament amb 1% de fenol. El tub es tanca amb una flama i es deixa reaccionar a 155°C durant 1h. Passat aquest temps, s'evapora l'àcid fins sequedat, es redissol el residu en tampó citrat 0,06M pH 2, es filtra (0,45µm) i se n'analitza una dilució adequada.

Per hidrolitzar pèptids units a la resina, es fa un procediment anàleg però afegint una solució d'HCl:àcid propiònic (1:1) a una quantitat coneguda de peptidil-resina ben seca. A més a més, la mescla es deixa reaccionar durant 1h i 30min.

Com a patró intern, en general, s'ha utilitzat isoleucina. En el cas de l'anàlisi de peptidil-resines en les quals s'ha utilitzat la resina Rink amida MBHA, com a patró intern s'ha utilitzat la norleucina que incorpora la pròpia resina.

¹⁸⁹ Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D. & Cook, P.I., *Anal. Biochem.*, (1970), **34**, 595-598

Cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC)

Durant la realització d'aquesta tesi, s'han utilitzat diferents aparells i columnes amb rebliments C₁₈, per analitzar tant la qualitat dels crus com la puresa dels pèptids purificats. En general, però, s'ha utilitzat un flux de 1ml/min amb el següent sistema d'eluent:

A - H ₂ O + 0,045% TFA
B - ACN + 0,036% TFA

Espectrometria de masses

En el cas de les anàlisis realitzades mitjançant HPLC-MS, en general s'han utilitzat les següents condicions:

Columna:	Symmetry300™ C ₁₈ (3,9x150mm) (WATERS)
Eluents:	A – H ₂ O + 0,1% fòrmic B – ACN + 0,07% fòrmic
Flux:	1ml/min
Temperatura font:	70°C
Temperatura dessolvatació:	200°C
Voltatge con:	20, 40 i 60V
Detecció:	ESP (+)

En el cas de les anàlisis realitzades mitjançant MALDI-TOF, alíquotes d'1µl de cada mostra s'han mesclat amb volums iguals d'una matriu de DHB o d'ACH (10 mg/ml en H₂O/ACN (1:1) + 1%TFA) i s'han deixat assecar sobre la placa de MALDI corresponent.

0.3.4 PURIFICACIÓ

Per purificar els pèptids presentats en aquest treball s'han utilitzat dues tècniques diferents:

Cromatografia líquida de mitja pressió (MPLC)

En aquest cas, s'ha utilitzat un sistema format per una bomba de pistó, una columna de vidre amb rebliment tipus Vydac-C₁₈ (26x2,5cm), un detector de longitud d'ona variable, un col·lector automàtic i un registrador.

Per dur a terme l'elució, s'han utilitzat gradients lineals entre dues mescles d'H₂O i ACN de diferents proporcions, ambdues amb un 0,05% de TFA i a un flux d'uns 2ml/min.

HPLC-MS d'escala preparativa

En general, en les purificacions realitzades mitjançant aquesta tècnica s'han utilitzat les següents condicions:

Columna:	Symmetry300™ C ₁₈ (19x150mm) (WATERS)
Eluents:	A – H ₂ O + 0,1% TFA B – ACN + 0,1% TFA
Flux:	25 ml/min
Temperatura font:	150°C
Temperatura dessolvatació:	300°C
Voltatge con:	20, 40 i 60V
Detecció:	ESP (+)

Tot i això, per a certs casos ha estat necessari canviar els eluents i utilitzar:

A - H ₂ O + 0,1% fòrmic
B - ACN + 0,07% fòrmic

1 PART EXPERIMENTAL CAPÍTOL 1

1.1 EXPRESSIÓ P53_TETS

Per tal d'obtenir la p53_tetS s'han utilitzat els següents protocols:

Preparació de cèl·lules competents

A 10ml de medi LB s'hi addicionen 10 μ l de glicerolat de la soca d'interès, i es deixa amb agitació constant durant una nit i a 37°C. S'inoculen 4ml d'aquest pre-cultiu en 400ml de medi LB i es deixa créixer a 37°C i amb agitació constant fins a una A_{595nm} d'entre 0,35 i 0,40. S'aliquota en tubs de centrifuga SS34 de 40ml i s'incuba en gel durant 5min. A continuació, es centrifuga (3600rpm, 8min i 4°C). Mantinent els tubs sempre en gel, s'elimina el sobrenadant i es ressuspenen els sediments, molt suaument, en 4ml de solució de CaCl₂. Es centrifuga la suspensió (3000rpm, 5min i 4°C). S'elimina el sobrenadant, es ressuspenen els sediments en 8ml de solució de CaCl₂ i es deixa en gel durant 30min. A continuació, es torna a centrifugar (3000rpm, 5min i 4°C), s'elimina el sobrenadant, es ressuspenen els sediments en 1,6ml de solució de CaCl₂, s'uneixen les suspensions dels diferents tubs, es fan alíquotes de 400 μ l i es congela ràpidament en neu carbònica i etanol o en N₂(l). Les alíquotes es conserven a -80°C.

En tot aquest procés s'ha de ser molt cuidados en les etapes de ressuspensió, ja que si no es fa suaument es poden trencar les cèl·lules.

Transformació

Es deixa descongelar en gel una alíquota de cèl·lules competents, se'n mesclen 50 μ l amb uns 500ng del plàsmid que conté l'ADN codificant per la proteïna, i s'incuba en gel durant 30min. A continuació es realitza un tractament tèrmic mitjançant incubació a 42°C durant exactament 45seg, seguit d'incubació en gel durant 2min. Després d'aquest tractament, s'addiciona 1ml de medi LB i s'incuba a 37°C amb agitació suau durant 60min. Es centrifuga (10000rpm, 1min), es decanta la major part del sobrenadant, es ressuspen el sediment en el sobrenadant restant i es plaqueja en una placa de medi LB-agar (+ el corresponent antibiòtic). Es manté la placa a 37°C durant tota la nit. L'endemà s'observa l'aparició de diferents colònies de cèl·lules les quals han incorporat l'ADN codificant per la proteïna corresponent.

Per assegurar que no hi ha cap contaminació, paral·lelament, és convenient realitzar un control negatiu en el qual es fa exactament el mateix però sense addicionar-hi l'ADN.

Expressió en medi ric (proteïna no marcada)

La composició dels antibiòtics utilitzats en els medis de cultiu, depèn de la soca de bacteries i del plàsmid utilitzats. En aquest cas, s'ha utilitzat la soca BL21(DE3) i el plàsmid pET-23b.

Es transfereix una colònia (idealment recentment transformada) a 10ml de medi LB (+100µg/ml d'ampicilina) i s'incuba tota la nit a 37°C i agitació intensa. En erlenmeyers de 2 litres amb 500ml de medi LB (+100µg/ml d'ampicilina), s'hi inoculen 5ml de pre-cultiu anterior i es deixa créixer a 37°C i agitació intensa, fins que l' A_{600nm} arribi a 1,0-1,2. A continuació s'indueix l'expressió, mitjançant l'addició d'IPTG 1M fins a una concentració de 0,4mM. Es mantenen els cultius a 37°C i agitació intensa durant 3h. Passat aquest temps, es transfereixen a botelles hermètiques de rotor GS3 i es centrifuga (6000rpm, 10min i 4°C). Finalment, es decanten els sobrenadants assegurant que no en quedin restes, i es guarden els sediments a -20°C.

Expressió en medi mínim M9 (proteïna marcada)

En aquest cas, el procediment és quasi el mateix que el descrit en l'expressió en medi ric, però tenint en compte les següents variacions:

- S'utilitza la soca BL21(DE3)pLysS.
- En lloc de medi LB s'utilitza medi mínim M9, el qual conté $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ i Glucosa- ^{13}C (en el cas que es vulgui la doble marca isotòpica).
- En el medi de cultiu a part dels 100µg/ml d'ampicilina, també s'hi addiciona cloroamfenicol 34µg/ml.
- Els bacteris, obligatòriament, han de ser recentment transformats.
- El cultiu es deixa créixer fins a A_{600nm} de 1,2-1,3.
- S'addiciona IPTG 1M fins a una concentració de 1mM.

Composició dels medis utilitzats

Medi LB (Luria-Bertani):	1% triptona 0,5% extracte de llevat 1% NaCl pH 7,5 (ajust amb NaOH)	Plaques LB-agar:	Medi LB 1,5% agar antibiòtic
Medi mínim M9:	200ml concentrat de sals 2ml MgSO ₄ 1M 2ml solució Q 5ml ¹⁵ NH ₄ Cl 0,2g/ml 10ml mesclat vitamines 20ml glucosa- ¹³ C 0,2g/ml 780ml H ₂ O	Solució de CaCl₂:	60mM CaCl ₂ 15% glicerol 10mM PIPES pH 7

La composició de les solucions que formen el medi mínim és:

Concentrat de sals (1L.):	6,4% Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 1,5% KH ₂ PO ₄ 0,25% NaCl	Solució Q (1L.)	8ml HCl 5M 5g FeCl ₂ ·4H ₂ O 184mg CaCl ₂ ·2H ₂ O 64mg H ₃ BO ₃ 18mg CoCl ₂ ·6H ₂ O 4mg CuCl ₂ ·2H ₂ O 340mg ZnCl ₂ 605 mg Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 40mg MnCl ₂ ·4H ₂ O
Mesclat de vitamines (100ml):	50mg Tiamina 10mg D-biotina 10mg Clorur de colina 10mg Àcid fòlic 10mg Niacinamida 10mg Àcid D-pantotènic 10mg Piridoxal 1mg Riboflavina		

Totes les solucions s'han d'esterilitzar abans de ser utilitzades. En general, l'esterilització es realitza mitjançant autoclau, excepte pel concentrat de vitamines i la solució de glucosa-¹³C, que es realitza per filtració. El antibiòtics, en tots el casos s'addicionen després de l'esterilització.

1.2 PURIFICACIÓ P53_TETS

Aquest procés és idèntic tant per a la proteïna marcada com per a la no marcada.

S'addicionen 20ml de tampó A al sediment que prové de cada 500ml de medi de cultiu, es deixa descongelar i es ressuspèn fins aconseguir una suspensió homogènia. S'uneixen les diferents suspensions en un vas de precipitats i mantenint-ho sempre en un bany de gel, se sonica amb punta grossa i una potència del 80% (20 pulsos de 15seg, separats per intervals de 30seg). En aquest procés és important que no s'escalfi la suspensió. S'obté una suspensió menys viscosa que es centrifuga en un rotor SS34 (18000rpm, 30min i 4°C). Es recull el sobrenadant evitant la capa tèrbola que queda més propera al sediment, es filtra (0,22µm) i es conserva a -20°C. Fins que no s'hagi comprovat que la proteïna està en el sobrenadant, no es llencen els sediments.

Bescanvi iònic

Aquesta primera etapa de purificació es fa directament amb tot el sobrenadant resultant de la sonicació (filtrat prèviament). Després de carregar la columna, el gradient per tal d'eluir la proteïna no es comença fins que l' A_{280nm} s'ha estabilitzat a un valor inferior de 0,1. Les condicions de l'elució són les següents:

Columna: Hi-Trap SP-Sepharose de 5ml (Amersham Biosciences)

Elució inicial: Tampó A

Gradient: De 0 a 70% de tampó B en 20 volums de columna, seguit d'un rentat a 100% de tampó B.

Flux: 2ml/min

Fraccions: 3ml

λ lectura: 280nm

Temperatura: Ambient

La p53_tetS elueix aproximadament al 20% de B

Exclusió molecular

Mitjançant aquesta tècnica no es poden carregar volums més grans que 5% del volum de la columna, de manera que per purificar tota la mostra que prové de l'etapa anterior, sovint s'han de fer varies injeccions. Les condicions d'elució són les següents:

Columna: Superdex 75 prep. grade 16x80 empaquetada al laboratori (Amersham Biosciences)

Tampó d'elució: Tampó C

Volum injecció: Entre 3 i 5ml

Flux: 1ml/min

Fraccions: 3ml

λ lectura: 280nm

Temperatura: Ambient

La p53_tetS elueix aproximadament als 100ml.

Dessalat

Per dessalar mostres de p53_tetS, s'han utilitzat les següents condicions:

Columna: Hiprep Desalting 16/10 (Amersham Biosciences)

Tampó d'elució: H₂O o tampó fosfat 25mM pH 7

Volum injecció: Com a màxim 11,5ml

Flux: 8ml/min

Fracçons: 6ml

λ lectura: 280nm

Temperatura: Ambient

Composició dels tampons utilitzats en les diferents etapes de purificació:

Tampó A: MES 40mM pH 6

Tampó B: MES 40mM pH 6
NaCl 1M

Tampó C: MES 40mM pH 6
NaCl 200mM

Electroforesi SDS-PAGE

L'anàlisi de les fraccions obtingudes en les diferents etapes de purificació, així com el control del nivell d'expressió s'ha realitzat mitjançant electroforesi SDS-PAGE amb gels de 15% acrilamida-glicerol, els quals permeten detectar amb claredat espècies de baix pes molecular com és el monòmer de p53_tetS (6,5KDa aprox.).

La composició dels gels és la següent:

	Gel separador (part inferior)*	Gel concentrador (part superior)*
TrisHCl 3M pH 8,5	6ml	1,8ml
Acrilamida:bisacrilamida (37,5:1)	7,2ml	700µl
H ₂ O	4,5ml	4,9ml
SDS 10%	300µl	88µl
Glicerol 87%	2,4ml	-
TEMED	12µl	6µl
APS 15% (p/v)	60µl	40µl

* Quantitats necessàries per preparar 2 gels

La preparació de la mostra, es realitza mitjançant la mescla de volums iguals de mostra i tampó de mostra, addició de β -mercaptoetanol fins a un 3% (v/v) i calentament de la mescla resultant a 90°C durant 2min.

La composició del tampó de mostra és la següent:

TrisHCl 0,5M pH 6,8	250 μ l
Glicerol 87%	2ml
H ₂ O	250 μ l
SDS 10%	4ml
Blau de bromofenol 0,4% (p/v)	1ml

L'electroforesi es realitza en les següents condicions:

Tampó d'electroforesi: Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1% pH 8,3-8,8

Voltatge: Inicialment uns 80V i al cap de 30min uns 120V (constantment uns 30-40mA)

En general la tinció dels gels s'ha fet amb Coomassie R250, tot i que es poden utilitzar altres mètodes.

HPLC

S'han utilitzat les mateixes condicions descrites per a la síntesi de pèptids però utilitzant la columna adequada en cada cas.

Espectrometria de masses

En general, s'han utilitzat les mateixes condicions descrites per a l'anàlisi de mostres de pèptids, excepte en el cas del MALDI-TOF, ja que en aquest cas, la mostra s'ha preparat utilitzant una matriu d'àcid sinapínic (10 mg/ml en H₂O/ACN (1:1) + 1% TFA). A més a més, abans de deixar assecar la mescla mostra/matriu en la placa de MALDI, prèviament s'hi ha deixat assecar 1 μ l de matriu sola.

2 PART EXPERIMENTAL CAPÍTOL 2

2.1 MODELAT MOLECULAR

Tots els càlculs de modelat molecular així com la visualització i obtenció de imatges s'han realitzat mitjançant el programa InsightII®95.0 de la companyia Biosym/MSI (San Diego). La construcció de les diferents estructures s'ha realitzat amb el mòdul "Biopolymer", en els càlculs s'ha utilitzat el mòdul "Discover3" i en l'anàlisi dels resultats s'ha utilitzat el mòdul "Analysis"

En tots els casos s'ha utilitzat l'estructura del domini determinada per RMN¹⁹⁰.

En l'annex A.4, s'hi poden trobar els programes bàsics utilitzats en els càlculs de minimització energètica i de dinàmica molecular.

2.2 SÍNTESI DELS PÈPTIDS

Aminoàcids utilitzats:

Arg	Boc-Arg(Tos)-OH	Asn	Boc-Asn-OH
Gly	Boc-Gly-OH	Gln	Boc-Gln-OH
Ala	Boc-Ala-OH	Ser	Boc-Ser(Bzl)-OH
Trp	Boc-Trp(For)-OH	Leu	Boc-Leu-OH

2.2.1 CANDIDAT 2

La síntesi i purificació s'ha realitzat seguint les condicions descrites a continuació:

¹⁹⁰ Clore, G.M., Ernst, J., Clubb, R., Omichinski, J.G., Kennedy, W.M.P., Sakaguuchi, K., Appella, E. & Gronenborn, A.M., *Nat. Struct. Biol.*, (1995), **2**, 321-333

Síntesi	Estratègia:	Síntesi automàtica Boc/Bzl
	Resina:	<i>p</i> -MBHA
	f _{inicial} :	0,70mmol/g
	Escala:	0,1mmol
	Seqüència:	Ac-NAAAWAQRARSQLRNALRG-NH ₂
	Massa	2351 Da
<hr/>		
Purificació	Tècnica:	MPLC
	Eluents:	A – 10% ACN en H ₂ O + 0,5% TFA
		B – 35% ACN en H ₂ O + 0,5% TFA
	Rendiment global:	6,2%

2.2.2 CANDIDAT 4

1era preparació d'Ac-Candidat 4 i H-Candidat 4

Per obtenir el pèptid H-Candidat 4 s'ha separat, per pes, el 40% de la peptidil-resina abans de fer l'acetilació final. Les condicions utilitzades en la síntesi i la purificació, estan descrites a continuació:

Síntesi	Estratègia:	Síntesi automàtica Boc/Bzl
	Resina:	<i>p</i> -MBHA
	f _{inicial} :	0,7mmol/g
	Escala:	0,1mmol
	Seqüència:	Ac/H-AGAAGWARGRARSR-NH ₂
<hr/>		
Purificació Ac-Candidat 4	Tècnica:	MPLC
	Eluents:	A – 10% ACN en H ₂ O + 0,5% TFA
		B – 35% ACN en H ₂ O + 0,5% TFA
Rendiment global:	26%	
<hr/>		
Purificació H-Candidat 4	Tècnica:	MPLC
	Eluents:	A – 5% ACN en H ₂ O + 0,5% TFA
		B – 35% ACN en H ₂ O + 0,5% TFA
Rendiment global:	37%	

Zona preparació d'Ac-Candidat 4, H-Candidat 4, Biotina-Candidat 4 i CF-Candidat 4

En aquest cas un cop desprotegit l'últim aminoàcid de la cadena, s'ha al·liquotat la peptidil-resina en quatre parts iguals mitjançant suspensions en DMF. La síntesi s'ha dut a terme seguint les següents condicions:

Síntesi	Estratègia:	Síntesi manual Fmoc/tBu
	Resina:	Rink Amida MBHA
	f _{inicial} :	0,73mmol/g
	Escala:	0,1mmol
	Seqüència:	Ac/H/Biotina/CF-AGAAGWARGRARSR-NH ₂
	Acoblaments:	5eq. Fmoc-aa-OH + 5eq PyBOP + 5eq. HOBt + 10eq. DIEA

Segons el test de Kaiser, tots els acoblaments han estat quantitius.

Les reaccions de biotinitiació i d'acoblament de carboxifluoresceïna (CF) s'han fet utilitzant les següents condicions.

	Reactiu	Agents acoblants	Dissolvent	Temps	Reacoblament
Biotinitiació:	5eq. Biotin-OSu	5eq. HOBt (+ 10eq. DIEA)*	DMF	3h	Sí (5eq., 2h)
Acoblament CF:	5eq. CF	5eq. PyAOP / HOAt (+10eq. DIEA)	DMF	3h	Sí (5eq., 2h)

* Amb 5eq. de DIEA ja seria suficient

Segons el test de Kaiser, la reacció de biotinitiació ha estat pràcticament quantitativa després del reacoblament. Per contra, a la reacció d'acoblament de carboxifluoresceïna encara li faltava un pèl després del reacoblament. Tot i això, s'ha considerat suficient i s'ha procedit a l'escissió i desprotecció del pèptid.

Per a tots quatre pèptids l'etapa de desprotecció de les cadenes laterals i escissió de la resina s'ha realitzat mitjançant el tractament amb el còctel K durant 4h i 15min.

La purificació de cadascun dels pèptids s'ha realitzat mitjançant HPLC-MS preparatiu amb un gradient del 0 al 30% de B en 15min.

2.3 ESPECTROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

2.3.3 CONSIDERACIONS GENERALS

En totes les mesures de fluorescència realitzades en aquesta tesi s'han tingut en compte les següents consideracions:

Cubetes:	Hellma QS de 600 μ l de capacitat
Pas de banda:	Excitació: 4nm Emissió: 4nm
λ excitació:	295nm
Rang λ emissió:	305-450nm
Velocitat d'escombrat:	1 ó 2 nm/s
Voltatge fotomultiplicadors:	Per a cada cas s'ha utilitzat un voltatge uns 100V inferior a l'obtingut amb "l'Auto-range".
Correccions:	<i>De canal:</i> Per compensar les fluctuacions de la làmpada. <i>De instrument:</i> Per compensar les irregularitats de l'òptica de l'aparell

En les valoracions, després de cada addició, la solució s'ha mesclat bé amb l'ajuda d'una micropipeta i la mesura s'ha pres després de deixar temperar la mostra durant 5 minuts.

2.3.4 CANDIDAT 2

S'ha comparat la fluorescència de tres solucions preparades independentment, amb 10 μ M de Candidat 2 i concentracions creixents de p53_tetS en tampó fosfat 25mM pH 7. En tots el casos, s'ha utilitzat un voltatge de 745V, una velocitat d'escombrat de 1nm/s i no s'ha controlat la temperatura.

2.3.5 CANDIDAT 4

Anàlisi preliminar

S'ha comparat la fluorescència de quatre solucions preparades independentment, amb 2,7 μ M de Ac-Candidat 4 i concentracions creixents de p53_tetS en tampó fosfat 25mM pH 7. En tots el casos, s'ha utilitzat un voltatge de 800V, una velocitat d'escombrat de 1nm/s i no s'ha controlat la temperatura.

Anàlisi acurada

Sobre una solució de Ac-Candidat 4 $2,7\mu\text{M}$ en tampó fosfat 25mM pH 7, s'han addicionat petits volums d'una solució de p53_tetS $89\mu\text{M}$ dissolta en el mateix tampó. En totes les mesures, s'ha utilitzat un voltatge de 800V , una velocitat d'escombrat de 1nm/s i s'ha controlat la temperatura a 25°C mitjançant un bany extern.

Control negatiu

S'ha comparat la fluorescència de tres solucions preparades independentment, amb $2,7\mu\text{M}$ de Ac-Candidat 4 i concentracions creixents d'Ubiquitina en tampó fosfat 25mM pH 7. En tots el casos, s'ha utilitzat un voltatge de 800V , una velocitat d'escombrat de 1nm/s i no s'ha controlat la temperatura.

L'Ubiquitina, en les condicions d'anàlisi utilitzades, presenta una lleugera fluorescència, de manera que també s'han preparat les mateixes solucions però sense pèptid. L'espectre de fluorescència obtingut amb aquestes solucions, s'ha restat de l'obtingut amb les mostres que contenen pèptid i Ubiquitina.

3 PART EXPERIMENTAL CAPÍTOL 3

3.1 RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR

3.1.1 CONSIDERACIONS GENERALS

Totes les mostres estudiades s'han preparat incorporant-hi un 10% de D₂O i un 0,02% de NaN₃. Així mateix, en tots els casos s'han utilitzat tubs d'alt camp (527-8-PP, Wilmad) i els espectres s'han adquirit a 500MHz.

Els espectres obtinguts s'han processat utilitzant el programa NMRPipe/NMRDraw¹⁹¹ i posteriorment s'han visualitzat i analitzat utilitzant el programa NMRview¹⁹².

3.1.2 [¹H-¹⁵N]-HSQC

Els espectres s'han adquirit en el Varian Inova 500 mitjançant la seqüència de pulsos gNhsqc (HSQC amb increment de sensibilitat) i 32 adquisicions. L'eliminació de l'aigua s'ha realitzat mitjançant presaturació.

[¹H-¹⁵N]-HSQC en tampó fosfat 25mM pH 7

Per dur a terme la valoració, s'han enregistrat els espectre d'una solució de 550µl p53_tetS-¹⁵N,¹³C 350µM en tampó fosfat 25mM pH 7,26, amb concentracions creixents de Candidat 4. Per fer les addicions de pèptid, s'han utilitzat petits volums d'una solució d'Ac-Candidat 4 8,75mM en aigua.

[¹H-¹⁵N]-HSQC aigua pH 7

En aquest cas, per dur a terme la valoració s'ha partit d'una mostra de 500µl de p53_tetS-¹⁵N 200µM en aigua i pH 7,08 (ajustat amb petits volums de NaOH 10mM i HCl 10mM). Per fer les addicions de pèptid, s'han utilitzat petits volums d'una solució 8,75mM d'Ac-Candidat 4 en aigua.

¹⁹¹ Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer & Bax, A., *J. Biomol. NMR*, (1995), **6**, 277-293

¹⁹² Johnson, B.A. & Blevins, R.A., *J. Biomol. NMR*, (1994), **4**, 603-614

3.1.3 TOCSY I NOESY

Els espectres s'han adquirit en el Bruker DMX-500. Les seqüències de pulsos utilitzades són les proveïdes per la pròpia casa comercial. En aquest cas, l'eliminació de l'aigua s'ha realitzat mitjançant "watergate".

TOCSY

S'ha utilitzat una mostra de pèptid Ac-Candidat 4 1,38mM i pH 6,32 (ajustat amb petits volums de NaOH 10mM i HCl 10mM). S'ha utilitzat un pH més baix de l'habitual, perquè a pH 7 la sensibilitat dels protons amida era molt baixa.

En aquests experiments s'ha utilitzat un temps de mescla de 70ms i 32 adquisicions.

NOESY

S'ha utilitzat la mateixa mostra que en els experiments tipus TOCSY.

En aquest cas, els experiments s'han realitzat amb un temps de mescla de 300ms i 32 adquisicions.

En el cas dels experiments de trNOE, s'han adquirit els espectres NOESY després d'addicionar petits volums de p53_tetS-¹⁵N 475 μ M en aigua. Per tal de mantenir exactament el mateix nivell de sensibilitat, després de cada addició de proteïna el pH s'ha reajustat a 6,32 mitjançant petits volums de NaOH 10mM i HCl 10mM.

3.2 RESSONÀNCIA DE PLASMÓ SUPERFICIAL

Per dur a terme els estudis de RPS, s'han utilitzat les consideracions descrites en l'apartat 3.2.2 del capítol 2. En l'annex A.5, hi ha un exemple del mètode bàsic utilitzat per programar els diferents cicles d'anàlisi de cada avaluació.

Pel que fa a la immobilització del pèptid Candidat 4 a les diferents superfícies s'han utilitzat diferents protocols en funció del tipus de superfície utilitzada:

3.2.4 XIPS CM5

Amb aquests xips, en tots els casos s'ha utilitzat el tampó HBS-EP, el qual té la següent composició:

0,01M HEPES
0,15M NaCl
3mM EDTA
0,005% (v/v) P20 (surfactant)

El protocol d'immobilització ha estat el següent:

Operació	Reactiu	Volum (μ l)	Flux (μ l/min)
Activació	0,2M EDC + 0,05M NHS	35	5
Immobilització	H-Candidat 4 0,5 μ M en tampó acetat 10mM pH 5,5	30	5
Eliminació ésters actius	ETH	35	5
Rentat	HCl 10mM	5	5

Mitjançant aquest protocol s'aconsegueixen uns nivells d'immobilització d'aproximadament 150RUs.

En la immobilització en xips B1, s'ha utilitzat aquest mateix protocol.

3.2.5 XIPS C1

En aquest cas, s'ha utilitzat el següent protocol d'immobilització:

Operació	Reactiu	Volum (μ l)	Flux (μ l/min)
Condicionament	0,1M Glicina/NaOH pH 12 0,3% Triton X100	15 x 2	10
Activació	0,2M EDC + 0,05M NHS	35	5
Imm. Estreptavidina	Estreptavidina 250 μ g/ml	50 x 2	5
	Estreptavidina 250 μ g/ml	50	2
Eliminació ésters actius	ETH	35	5
Rentat	HCl 10mM	5	5
Imm. Candidat 4*	Biotina-Candidat 4 35 μ M	60 x 3	2

* Abans d'immobilitzar el pèptid, es deixa passar un flux continu a 5 μ l/min durant dues hores

Tant l'Estreptavidina com el Biotina-Candidat 4, s'utilitzen dissolts en el mateix tampó en el qual es realitza tot el procés (tampó fosfat 25mM pH 7).

Mitjançant aquest protocol s'aconsegueixen uns nivells d'immobilització de pèptid d'aproximadament 100RUs.

En les diferents anàlisis realitzades amb aquest tipus de xip, la regeneració s'ha dut a terme mitjançant injeccions de NaCl 1M durant 1min.

3.2.6 XIPS HPA

Abans d'utilitzar aquest tipus de xips, és convenient netejar l'aparell mitjançant els protocols "desorb" i "sanitize", i deixar el sistema a flux continu amb H₂O.

Amb aquest xips s'ha seguit el següent protocol d'immobilització:

Operació	Reactiu	Volum (μl)	Flux (μl/min)
Condicionament	Octil D-glucòsid 40mM en H ₂ O	100	10
Formació monocapa	500μM liposomes DMPC 1% (p/p) Biotina-DSPE	60 x 6	2
Rentat	NaOH 10mM	20	100
Imm. Estreptavidina*	Estreptavidina 1mg/ml	30 x 3	5
Imm. Candidat 4	Biotina-Candidat 4	60 x 2	2
Rentat	NaOH 10mM	10	10

* Abans d'immobilitzar l'estreptavidina es deixa passar un flux continu a 10μl/min fins que s'estabilitza la resposta

Els liposomes, l'Estreptavidina i el pèptid, s'utilitzen dissolts en el mateix tampó en el qual es realitza tot el procés (tampó fosfat 25mM pH 7).

Mitjançant aquest protocol s'aconsegueixen uns nivells d'immobilització de pèptid d'aproximadament 100RUs.

En les diferents anàlisis realitzades amb aquest tipus de xip, la regeneració s'ha dut a terme mitjançant injeccions de HCl 5mM durant 1min.

Preparació liposomes

Inicialment, es prenen per pesada les quantitats necessàries de DMPC i Biotin-DSPE (estocs dissolts en cloroform), i es rotavapora a 40°C durant 15min (es pot observar la formació d'un tel blanquinós). A continuació, s'addiciona el tampó, es sonica en un bany d'aigua fins que s'observa la formació d'un emulsió blanquinosa i s'agita suaument durant 15min.

Per formar els lioposomes de $0,1\mu\text{m}$ de diàmetre, es filtra l'emulsió resultant a través de filtres de $0,8\mu\text{m}$, $0,4\mu\text{m}$, $0,2\mu\text{m}$ i $0,1\mu\text{m}$. L'emulsió es filtra cinc vegades per a cada tamany de porus. La solució resultant, es guarda a temperatura ambient i protegida de la llum com a màxim durant una setmana.

3.3 ESPECTROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

Les mesures s'han realitzat seguint les consideracions generals descrites en la part experimental del capítol 2.

Avaluació en aigua a pH7

Sobre una solució de Candidat 4 $3\mu\text{M}$ en aigua a pH 7 (ajustat amb petits volums de NaOH 10mM i HCl 10mM), s'han addicionat petits volums d'una solució de p53_tetS- ^{15}N $163\mu\text{M}$ en aigua. En totes les mesures, s'ha utilitzat un voltatge de 800V, una velocitat d'escombrat de 2nm/s i s'ha controlat la temperatura a 25°C mitjançant un bany extern.

Ajust matemàtic

Per ajustar les dades experimentals al model matemàtic descrit en l'apartat 3.3.1, s'ha utilitzat el programa Origin 5.0.

Experiments de competició

Inicialment, sobre una solució de Candidat 4 $3\mu\text{M}$ en aigua a pH 7,0 (ajustat amb petits volums de NaOH 10mM i HCl 10mM), s'han addicionat petits volums d'una solució de p53_tetS- ^{15}N $75\mu\text{M}$ en aigua. A continuació, s'han addicionat petits volums de solució $150\mu\text{M}$ ó $300\mu\text{M}$ del compost tetraguanidínic 1 en aigua.

En totes les mesures, s'ha utilitzat un voltatge de 800V, un velocitat d'escombrat de 1nm/s i s'ha controlat la temperatura a 25°C mitjançant un bany extern.

Per construir el gràfic de la figura 3.33 s'ha utilitzat la següent aproximació: a partir de la diferència entre la $F_{350\text{nm}}$ obtinguda al final de la valoració i la $F_{350\text{nm}}$ inicial, s'ha estimat la $F_{350\text{nm}}$ deguda a la contribució de les tirosines en cada punt de la valoració. Aquesta estimació s'ha restat de cada punt abans de construir el gràfic.

3.4 MICROCALORIMETRIA

La valoració calorimètrica isotèrmica s'ha dut a terme mitjançant l'addició de petits volums (1-10 μ l) d'una solució d'Ac-Candidat 4 6,5mM sobre una solució de p53_tetS-¹⁵N 50 μ M. El pH d'ambdues solucions s'ha ajustat prèviament a 7 mitjançant petits volums de NaOH 10mM i HCl 10mM.

Al final de la valoració, s'ha pogut comprovar que en les condicions utilitzades el pH pràcticament no varia i només disminueix entre 0,05 i 0,1 unitats.

El blanc s'ha realitzat mitjançant l'addició de les mateixes quantitats d'Ac-Candidat 4 6,5mM sobre una solució que només conté aigua a pH 7 (ajustat amb petits volums de NaOH 10mM i HCl 10mM).

L'ajust de les dades experimentals als diferents models matemàtics, s'ha dut a terme mitjançant el programa Origin 5.0 ITC.

4 PART EXPERIMENTAL CAPÍTOL 4

4.1 SÍNTESI DE LA QUIMIOTECA

4.1.1 TRONC COMÚ

Aminoàcids utilitzats:

Ala	Fmoc-Ala-OH.H ₂ O	Trp	Fmoc-Trp(Boc)-OH
Gly	Fmoc-Gly-OH		

Seqüència del tronc comú:



Per tal de sintetitzar tots els pèptids de la quimioteca, s'han fet dues preparacions de tronc comú.

Tronc comú generacions 1 i 2:

Nom:	TrC 1	Resina:	Rink amida MBHA	f _{inicial} :	0,73mmol/g	Escala:	2,67mmol
Síntesi							
Residu	n ^o eq	Agents acoblants		Dissolvent	n ^o acoblaments	Acetilació*	
Ala	4	TBTU		DMF	2	Sí	
Gly	4	TBTU		DMF	2	Sí	
Ala	4	TBTU		DMF	2		
Ala	4	TBTU		DMF	2		
Gly	4	TBTU		DMF	1		
Trp**	4	TBTU		DMF	1		
Ala	4	TBTU		DMF	2		

* En els casos que l'acoblament no ha estat quantitatiu, s'han acetilat les amines restants abans de continuar l'elongació de la cadena peptídica.

**Abans d'incorporar el triptòfan, s'ha assecat la peptidil-resina i se n'ha separat per pesada una alíquota de 0,066mmol. A aquesta alíquota no se l'hi ha incorporat el Trp, però sí la posterior Ala [nom alíquota: TrC1(-W)].

Mitjançant anàlisi d'aminoàcids de la peptidil-resina, s'ha comprovat que la síntesi ha transcorregut amb un rendiment del 96%.

La peptidil-resina resultant, s'ha assecat amb rentats de MeOH i Et₂O, i s'ha guardat en un dessecador de buit.

Tronc comú generació 3:

Nom: TrC 2 Resina: Rink amida MBHA f_{inicial}: 0,73mmol/g Escala: 1,62mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Ala*	0,6	PyBOP / HOBt	DMF	1	
Gly	4	PyBOP / HOBt	DMF	1	
Ala	4	PyBOP / HOBt	DMF	1	
Ala	4	PyBOP / HOBt	DMF	1	
Gly	4	PyBOP / HOBt	DMF	1	
Trp	4	PyBOP / HOBt	DMF	1	
Ala	4	PyBOP / HOBt	DMF	1	

*A partir de la quantificació del grup Fmoc alliberat en la desprotecció d'aquest residu, s'ha comprovat que s'ha reduït la funcionalització a 0,40mmol/g.

En aquest cas la peptidil-resina resultant s'ha al·licotat mitjançant suspensions en DMF.

4.1.2 GENERACIÓ 1

Aminoàcids utilitzats:

Arg	Fmoc-Arg(Pmc)-OH	Nva	Fmoc-Nva-OH
Gly	Fmoc-Gly-OH	Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH
Ala	Fmoc-Ala-OH.H ₂ O	Ser	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH

En tots els casos s'ha acetilat l'extrem N-terminal seguint el procediment descrit en l'aparat de materials i mètodes.

Seqüència dels pèptids sintetitzats:

Ac-R/X-S-R/X-A-R/X-G-R/X-TrC1

Nom: RRRR Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg	4	TBTU	DMF	3	
	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	Si
Gly	4	PyBOP	DMF	1	
	8	DIPCDI (anhídrid simètric)*	DMF:DCM	1	Si
Arg	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	Si
Ala	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	
Arg	4	HATU	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DCM	1 (O.N.)	
	4	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	Si
Ser	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
Arg	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyAOP / HOAt	NMP	1	

* Per formar l'anhídrid simètric s'addicionen N/2 eq. de DIPCDI per cada N eq. d'aminoàcid.

Nom: KR3 Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg					
Gly					
Arg					
Ala					
Arg					
Ser					
Lys	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Igual que el pèptid RRRR

Nom: K2R2 Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg					
Gly					
Arg					
Ala					
Lys	4	PyBOP	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DCM	1 (O.N.)	
Ser	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
Lys	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Nom: K3R Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg					
Gly					
Lys	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	
Ala	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	
Lys	4	PyBOP	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DCM	1 (O.N.)	
Ser	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
Lys	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Nom: KKKK Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Lys	4	TBTU	DMF	3	
	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	Sí
Gly	4	PyBOP	DMF	1	
	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	Sí
Lys	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	
Ala	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	
Lys	4	PyBOP	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DCM	1 (O.N.)	
Ser	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
Lys	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Nom: RKRR Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg					
Gly					
Arg					
Ala					
Lys	4	PyBOP	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DCM	1 (O.N.)	
Ser	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
Arg	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyAOP / HOAt	NMP	1	

Igual que el pèptid RRRR

Nom: KRKR Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg		Igual que el pèptid RRRR			
Gly					
Lys	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	
Ala	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	
Arg	4	HATU	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DCM	1 (O.N.)	
	4	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	Sí
Ser	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
Lys	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Nom: KRRK Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Lys	4	Igual que el pèptid KKKK			
Gly	4				
Arg	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	Sí
Ala	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	
Arg	4	HATU	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DCM	1 (O.N.)	
	4	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	Sí
Ser	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
Lys	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Nom: KKRK Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Lys		Igual que el pèptid KKKK			
Gly		Igual que el pèptid KKKK			
Arg	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	Sí
Ala		Igual que el pèptid KKKK			
Lys		Igual que el pèptid KKKK			
Ser		Igual que el pèptid KKKK			
Lys		Igual que el pèptid KKKK			

Nom: NvaR3 Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg		Igual que el pèptid RRRR			
Gly		Igual que el pèptid RRRR			
Arg		Igual que el pèptid RRRR			
Ala		Igual que el pèptid RRRR			
Arg		Igual que el pèptid RRRR			
Ser		Igual que el pèptid RRRR			
Nva	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	

Nom: Nva2R2 Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg		Igual que el pèptid RRRR			
Gly					
Arg					
Ala					
Nva	4	PyBOP	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DCM	1 (O.N.)	
Ser	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
Nva	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	

Nom: Nva3R Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg		Igual que el pèptid RRRR			
Gly					
Nva	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	
Ala	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	
Nva	4	PyBOP	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DCM	1 (O.N.)	
Ser	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
Nva	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	

Nom: Nva4 Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Nva	4	TBTU	DMF	3	
	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	Sí
Gly	4	PyBOP	DMF	1	
	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	Sí
Nva	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	
Ala	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	
Nva	4	PyBOP	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DCM	1 (O.N.)	
Ser	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	
Nva	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Nom: SR3 Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg					
Gly					
Arg					
Ala					
Arg					
Ser					
Ser	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Igual que el pèptid RRRR

Nom: S2R2 Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg		Igual que el pèptid RRRR			
Gly					
Arg					
Ala					
Ser	4	PyBOP	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DCM	1 (O.N.)	
Ser	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
Ser	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Nom: S3R Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg		Igual que el pèptid RRRR			
Gly					
Ser	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	
Ala	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	
Ser	4	PyBOP	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DCM	1 (O.N.)	
Ser	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
Ser	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Nom: SSSS Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Ser	4	TBTU	DMF	3	
	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	Sí
Gly	4	PyBOP	DMF	1	
	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	Sí
Ser	4	PyBOP	DMF:DCM (1:1)	1	
	4	PyBOP	NMP	1	
Ala	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	
Ser	4	PyBOP	NMP	1	
	4	DIPCDI / HOBt	DCM	1 (O.N.)	
Ser	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF	1	
Ser	4	PyBOP	NMP 20% DMSO	2	
	4	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

4.1.3 GENERACIÓ 2

Abans de continuar l'elongació de la peptidil-resina TrC1, en tots els casos s'ha fet un tractament per recuperar-ne la solvatació. Aquest tractament s'ha realitzat mitjançant addició d'uns 5ml de DMSO a cada alíquota i escalfament a 60°C amb agitació suau durant 2h.

A més a més, en alguns casos aquest tractament s'ha repetit en el transcurs de la síntesi.

Aminoàcids utilitzats:

Arg	Fmoc-Arg(Pmc)-OH	Dapa	Fmoc-Dapa(Boc)-OH
Gly	Fmoc-Gly-OH	Dab	Fmoc-Dab(Boc)-OH
Ala	Fmoc-Ala-OH.H ₂ O	Orn	Fmoc-Orn(Boc)-OH
Ser	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH		

En tots els casos s'ha acetilat l'extrem N-terminal seguint el procediment descrit en l'aparat de materials i mètodes.

Les desproteccions s'han realitzat mitjançant tractaments amb DBU/piperidina/toluè/DMF (5:5:20:70) (1 x 1min + 2 x 10min).

Seqüència dels pèptids sintetitzats:

Ac-R/X-S-R/X-A-R/X-G-R/X-TrC1

Nom: DapaR3 Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg	5	PyBOP/HOBt	DMSO	1	
	2	PyBOP/HOBt	DMSO	1	Sí
Gly	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	
	5	PyBOP/HOBt	DMSO	2	
Arg	5	PyBOP/HOBt	DMSO	1	
	5	DIPCDI/HOBt	Toluè + 25% DMSO	1	
	5	PyBOP/HOBt	NMP + 20% DMSO	1	Sí

Tractament amb DMSO, 60°C, 2h

Ala	5	PyBOP/HOBt	DMSO	2	
	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	
Arg	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	Sí
Ser	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	
Dapa	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Nom: Dapa2R2 Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg					
Gly		Igual que el pèptid DapaR3			
Arg					

Tractament amb DMSO, 60°C, 2h

Ala		Igual que el pèptid DapaR3			
Dapa	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	
Ser	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	
Dapa	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Nom: Dapa3R Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg	Igual que el pèptid DapaR3				
Gly					
Dapa	5	PyBOP/HOBt	DMSO	1	
	3	DIPCDI/HOBt	Toluè + 25% DMSO	1	
Tractament amb DMSO, 60°C, 2h					
Ala	5	PyBOP/HOBt	DMSO	2	
	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	
Dapa	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	Sí
Ser	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	
Dapa	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Nom: Dapa4 Peptidil resina: TrC 1 Escala: 0,066mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Dapa	5	PyBOP/HOBt	DMSO	1	
Gly	8	DIPCDI (anhídrid simètric)	DMF:DCM	1	
	5	PyBOP/HOBt	DMSO	2	
Dapa	5	PyBOP/HOBt	DMSO	1	
	3	DIPCDI/HOBt	Toluè + 25% DMSO	1	
Tractament amb DMSO, 60°C, 2h					
Ala	5	PyBOP/HOBt	DMSO	2	
	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	
Dapa	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	Sí
Ser	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	
Dapa	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

Pèptid	Síntesi
DabR3 i OrnR3	Mateix procediment que el pèptid DapaR3, però utilitzant Dab i Orn respectivament.
Dab2R2 i Orn2R2	Mateix procediment que el pèptid Dapa2R2, però utilitzant Dab i Orn respectivament.
Dab3R i Orn3R	Mateix procediment que el pèptid Dapa3R, però utilitzant Dab i Orn respectivament.
Dab4 i Orn4	Mateix procediment que el pèptid Dapa4, però utilitzant Dab i Orn respectivament.

Nom: NoW Peptidil resina: TrC 1 (-W) Escala: 0,066mmol

Síntesi					
Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	2	Sí
Gly	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	
Arg	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	
	3	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	
Ala	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	
Arg	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	
	3	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	
	1,5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	Sí
Ser	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	
Arg	5	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1 (O.N.)	
	3	DIPCDI / HOBt	DMF:DCM (1:1)	1	

4.1.4 GENERACIÓ 3

Aminoàcids utilitzats:

Arg	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Dab	Fmoc-Dab(Alloc)-OH
Gly	Fmoc-Gly-OH	Orn	Fmoc-Orn(Alloc)-OH
Ala	Fmoc-Ala-OH.H ₂ O	Lys	Fmoc-Lys(Alloc)-OH
Ser	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH		

En tots els casos s'ha acetat l'extrem N-terminal seguint el procediment descrit en l'aparat de materials i mètodes. La reacció de guanidiliació, en cada cas s'ha realitzat després d'aquesta etapa d'acetilació.

Condicions utilitzades per desprotegir el grup Alloc:

Operació	Dissolvents i reactius	Tractaments
Rentat	DCM	5 x 1min
Desprotecció Alloc	0,1eq. Pd(PPh ₃) ₄ + 10eq. PhSiH ₃ en DCM	2 x 15min 1 x 1h 1 x 20min 1 x 15min*
Rentat	DCM	5 x 1min
Rentat	DMF	5 x 1min
Rentat	Dietilditiocarbamat sòdic 0,02M en DMF	2 x 15min

* En principi, haurien d'haver estat suficients 3 tractaments de 15min.

Condicions utilitzades en les etapes de guanidilació:

Guanidilació amb el reactiu 3a [1,3-di-Boc-2-(trifluorometilsulfonyl)guanidina]	Guanidilació amb HATU
5eq. 3a + 5eq. trietilamina en DCM	3eq. HATU + 6eq. DIEA en DMF

Seqüència dels pèptids sintetitzats:

Ac-R/X-S-R/X-A-R/X-G-R/X-TrC2

Nom: RabR3 Peptidil resina: TrC 2 Escala: 0,074mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Gly	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Arg	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Ala	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Arg	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Ser	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Dab	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	

Acetilació extrem N-terminal

Desprotecció grup Alloc

Guanidilació amb el reactiu **3a**:

1 x 18h

Nom: Rab2R2 Peptidil resina: TrC 2 Escala: 0,074mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Gly	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Arg	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Ala	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Dab	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Ser	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Dab	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	

Acetilació extrem N-terminal

Desprotecció grup Alloc

Guanidilació amb el reactiu **3a**:

1 x 18h + 1 x 5h

Nom: Rab4 Peptidil resina: TrC 2 Escala: 0,074mmol

Síntesi

Residu	n ^o eq	Agents acoblants	Dissolvent	n ^o acoblaments	Acetilació
Dab	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Gly	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Dab	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Ala	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Dab	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Ser	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Dab	5	PyBOP/HOBt	DMF	2	

Acetilació extrem N-terminal

Desprotecció grup Alloc

Guanidilació amb el reactiu **3a**:

2 x 24h + 1 x 72h

Pèptid

Síntesi

RysR3	Mateix procediment que el pèptid RabR3, però utilitzant Lys en comptes de Dab.
Rys2R2	Mateix procediment que el pèptid Rab2R2, però utilitzant Lys en comptes de Dab.
Rys4	Mateix procediment que el pèptid Rab4, però utilitzant Lys en comptes de Dab.

Nom: hR3 Peptidil resina: TrC 2 Escala: 0,074mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Gly	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Arg	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Ala	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Arg	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Ser	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Om	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	

Acetilació extrem N-terminal

Desprotecció grup Alloc

Guanidilació amb HATU:

1 x 12h

Nom: h2R2 Peptidil resina: TrC 2 Escala: 0,074mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Arg	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Gly	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Arg	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Ala	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Om	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Ser	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Om	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	

Acetilació extrem N-terminal

Desprotecció grup Alloc

Guanidilació amb HATU:

1 x 12h

Nom: hhhh Peptidil resina: TrC 2 Escala: 0,074mmol

Síntesi

Residu	n°eq	Agents acoblants	Dissolvent	n° acoblaments	Acetilació
Om	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Gly	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Om	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Ala	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Om	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Ser	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	
Om	5	PyBOP/HOBt	DMF	1	

Acetilació extrem N-terminal

Desprotecció grup Alloc

Guanidilació amb HATU:

1 x 12h + 1 x 2h

Acetilació

4.1.5 GENERACIÓ 4

Aminoàcids utilitzats:

Arg	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Asn	Fmoc-Asn(Trt)-OH
Gly	Fmoc-Gly-OH	Trp	Fmoc-Trp(Boc)-OH
Ala*	Fmoc-Ala-OH.H ₂ O	Leu	Fmoc-Leu-OH
Ser*	Fmoc-Ser(^t Bu)-OH		

*En el cas dels aminoàcids D, s'han utilitzat els mateixos grups protectors

En tots els casos s'ha acetat l'extrem N-terminal seguint el procediment descrit en l'aparat de materials i mètodes.

Síntesi	Estratègia:	Síntesi automàtica en paral·lel Fmoc/ ^t Bu
	Resina:	Rink amida MBHA
	f _{inicial} :	0,73mmol/g
	Escala:	0,1mmol

Seqüències	Daa*	Ac-RsRaRGRaWGAAGA-NH ₂
	2xaa	Ac-RSSRAARGGRAWGAAGA-NH ₂
	0xaa	Ac-RRRRRAWGAAGA-NH ₂
	Aleatori	Ac-RLRARNRAWGAAGA-NH ₂
	ASG	Ac-RARSRGRAWGAAGA-NH ₂

* En aquest cas s'ha utilitzat el lot d'arginina impurificat d'àcid acètic

4.1.6 ESCISSIÓ I DESPROTECCIÓ

L'escissió de l'enllaç pèptid-resina i desprotecció de les cadenes laterals de cadascun dels pèptids de la quimioteca s'ha realitzat mitjançant tractaments de 1 a 4 hores amb el còctel K. Així, els pèptids amb una arginina s'han tractat durant 1h, els pèptids amb dues arginines durant 2h i els pèptids amb tres o quatre arginines durant 4h-4h30min.

4.2 PURIFICACIÓ DE LA QUIMIOTECA

La purificació dels pèptids s'ha realitzat mitjançant HPLC-MS preparatiu i utilitzant els següents gradients:

Gradient A	0-40%B en 15min.
Gradient B	0-30% B en 15min.
Gradient C	Isocràtic al 5% de B durant 5min i després gradient 5-30% de B en 15min.
Gradient D	Isocràtic al 5% de B durant 5min i després gradient 5-25% de B en 15min.
Gradient E	Isocràtic al 0% de B durant 5min i després gradient 0-30% de B en 15min.

A continuació hi ha una taula amb el gradient i el contraió utilitzats per purificar cadascun dels pèptids de la quimioteca, així com la seva massa molecular.

Pèptid	Gradient	Contraió fase mòbil	Massa (Da)	Pèptid	Gradient	Contraió fase mòbil	Massa (Da)
RRRR	A	TFA	1483	Dab4	B	TFA	1259
KR3	A	TFA	1455	OrnR3	B	TFA	1441
K2R2	A	TFA	1427	Orn2R2	B	TFA	1399
K3R	A	TFA	1399	Orn3R	B	TFA	1357
KKKK	A	TFA	1371	Orn4	B	TFA	1315
RKRR	A	TFA	1455	NoW	B	Fòrmic	1297
KRKR	A	TFA	1427	Daa ^a	E	TFA	1483
KRRK	A	TFA	1427	2xaa	C	Fòrmic	1698
KKRK	A	TFA	1399	0xaa	B	Fòrmic	1268
NvaR3	D	Fòrmic	1426	Aleatori	C	Fòrmic	1566
SR3	C	Fòrmic	1414	ASG	C	Fòrmic	1483
S2R2	C	Fòrmic	1345	hR3 ^b	C	Fòrmic	1539
S3R	D	Fòrmic	1276	h2R2 ^b	C	Fòrmic	1595
DapaR3	B	TFA	1413	hhhh ^b	C	Fòrmic	1707
Dapa2R2	B	TFA	1343	RabR3	C	TFA	1469
Dapa3R	B	TFA	1273	Rab2R2	C	TFA	1455
Dapa4	B	TFA	1203	Rab4	C	TFA	1427
DabR3	B	TFA	1427	RysR3 ^a	E	TFA	1497
Dab2R2	B	TFA	1371	Rys2R2 ^a	E	TFA	1511
Dab3R	B	TFA	1315	Rys4	C	TFA	1539

^a- Pèptids purificats amb una columna Symmetry C₁₈. En el cas dels pèptids RysR3 i Rys2R2, s'ha separat una fracció impura que s'ha repurificat amb una columna Symmetry300 C₁₈, utilitzant el gradient C i amb fòrmic en la fase mòbil

^b- Pèptids que prèviament s'havien intentat purificar mitjançant el gradient C i TFA en la fase mòbil, sense poder-ne separar cap fracció pura.

Un cop purificats, s'ha comprovat la massa de cadascun dels pèptids mitjançant espectrometria de masses MALDI-TOF. Pel que fa a la puresa, aquesta s'ha determinat mitjançant HPLC analític.

4.3 ESPECTROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

Les mesures s'han realitzat seguint les consideracions generals descrites en la part experimental del capítol 2.

Avaluació

Per a cadascun dels pèptids de la quimioteca, sobre una solució 3 μ M del pèptid en tampó fosfat 5mM NaCl 1mM pH 7, s'han addicionat petits volums d'una solució concentrada de p53_tetS-¹⁵N en tampó fosfat 5mM NaCl 1mM pH 7.

S'han utilitzat dos estocs de p53_tetS-¹⁵N, un de concentració 274 μ M i un altre de concentració 404 μ M. Per a cada estoc de proteïna, s'ha realitzat el blanc a partir del qual s'ha obtingut la relació lineal utilitzada en la correcció de les dades experimentals.

Per comprovar que el resultat és el mateix amb els dos estocs, el pèptid Candidat 4 s'ha analitzat amb tots dos, obtenint-se el mateix valor de K_D .

En totes les mesures, s'ha utilitzat un voltatge de 800V, una velocitat d'escombrat de 2nm/s i s'ha controlat la temperatura a 25°C mitjançant un bany extern.

Ajust matemàtic

Per ajustar les dades experimentals al model matemàtic descrit en l'apartat 3.3.1, s'ha utilitzat el programa Origin 5.0.

5 PART EXPERIMENTAL CAPÍTOL 5

Tant l'assaig d'internalització en cèl·lules com l'anàlisi per determinar la toxicitat del pèptid (assaig MTT), s'han realitzat seguint el procediment descrit en la bibliografia¹⁹³.

¹⁹³ Fernández-Carneado, J., Kogan, M.J., Castel, S. & Giralt, E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2004), *in press*

