

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

CAPÍTULO 2
*Identificación de complejos heteroquirales entre péptidos todo-D y el
fragmento N-terminal del dominio de B de la proteína A de
Staphylococcus aureus*

2. Identificación de complejos heteroquirales entre péptidos todo-D y el fragmento N-terminal del dominio de B de la proteína A de *staphylococcus aureus*

2.1. Introducción

Los aminoácidos L fueron seleccionados en la evolución química de los seres vivos como los bloques de construcción de las proteínas. Las proteínas están constituidas básicamente de aminoácidos L a excepción de la glicina cuyo carbono α es aquiral. No obstante, algunos seres vivos han roto parcialmente la homoquiralidad intrínseca de las proteínas y han introducido puntualmente aminoácidos D en algunos de sus péptidos y proteínas. Esto ha sido observado desde organismos unicelulares como bacterias hasta multicelulares tan complejos como los vertebrados. Por ejemplo, la presencia de aminoácidos D en medio de secuencias con aminoácidos todo L se han encontrado en proteínas que componen la pared celular de algunas bacterias¹ y en algunas proteínas humanas relacionadas de la piel, huesos o en el cristalino del ojo².

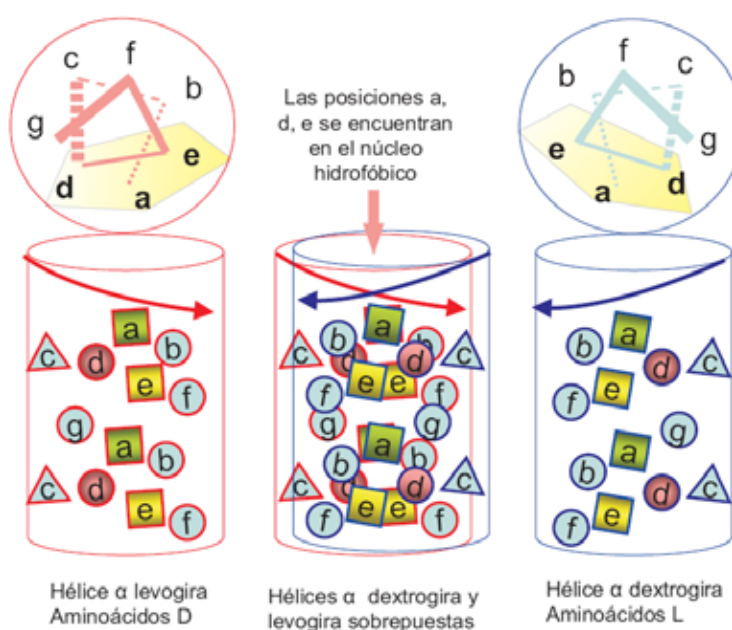
La introducción de aminoácidos D en una proteína requiere un alto gasto de recursos por parte de la célula. En la naturaleza no se han observado secuencias con más de dos aminoácidos D continuos. El cambio de quiralidad de un residuo es una modificación post-traslacional que requiere de la actividad de enzimas que inviertan el carbono α asimétrico del residuo en cuestión³. Esta maquinaria sólo es usada por la célula cuando la modificación estereoquímica del residuo se traduce en la obtención de estructuras difícilmente asequibles con sólo aminoácidos L. Los péptidos naturales así generados confieren resistencia proteolítica y mayor diversidad estructural ampliando el espectro de funcionalidades.

Por otra parte, la inversión total de la quiralidad de una proteína conduce a un enantiómero con estructura covalente igual pero con estructura y actividad especulares. Esto significa que conserva su actividad frente a ligandos o sustratos que también hayan invertido su quiralidad. Esto fue demostrado tras la síntesis total de los enantiómeros de la proteasa del VIH-1 los cuales mostraron tener actividad sólo frente a sus pares quirales⁴.

El uso de péptidos formados únicamente por aminoácidos D (o péptidos todo-D) ha sido especialmente satisfactoria en casos en los cuales estos interactúan con membranas celulares o donde las interacciones involucradas se encuentran dispuestas espacialmente en una sola cara dentro del espacio. Cuando estas interacciones no se dan bajo un mismo

plano en el espacio, como es el caso de las interacciones entre haces de hélices⁵ o en hojas plegadas distorsionadas, el uso de péptidos todo-D no han proporcionado los resultados esperados⁶. En estructuras helicoidales el cambio de quiralidad de todos los residuos cambia la disposición espacial de las cadenas laterales, de forma que se pierden gran parte de la interacciones posibles en el núcleo hidrofóbico (Figura 1).

Figura 1. Comparación de la disposición geométrica de los residuos de una hélice α proyectada en el plano. La figura de la izquierda se representa una hélice α dextrógira y la de la derecha un hélice α levógira. La imagen del centro muestra la superposición de las dos hélices.



En la búsqueda de péptidos todo-D activos se han utilizado diferentes aproximaciones como, el diseño racional, el diseño *de novo* y también estrategias combinatorias. El uso de péptidos todo-D has sido aplicada en casos donde su actividad implica interacciones entre elementos transmembranales, dentro de los cuales se incluyen algunos péptidos antibióticos⁷⁻⁹. Análogos todo-D de péptidos antimicrobianos de origen natural como la cecropina A, la melitina y la magainina han mostrado que retienen la actividad antimicrobiana en un espectro amplio de especies⁷. Incluso en el caso de la melitina los diferentes isómeros enatio-, retro- y retroenantió conservan la actividad antimicrobiana del péptido todo-L¹⁰. También se ha descrito un enantiómero de un péptido de 9 residuos derivado del dominio transmembranal del receptor de células T (TCR), el cual conserva la actividad *in vitro* y *in vivo*, inhibiendo el ensamblaje del complejo TCR con su coreceptor CD3¹¹. En este caso, el péptido enantiómero se reorienta dentro de una membrana, de forma que en conjunto las interacciones importantes en el proceso de reconocimiento se conservan,

independientemente de la quiralidad.

El reconocimiento entre superficies peptídicas todo-L con superficies todo-D se dan principalmente en casos en los cuales los residuos localizados en una cara interactúan con residuos ubicados bajo un mismo plano en la otra superficie. Más aun, la estabilidad es mayor si existen interacciones entre residuos cargados en la formación del complejo. Complejos formados por hélices levógiras y dextrógiras se han diseñado, desde el punto de vista del diseño *de novo*, basándose en las propiedades anfipáticas de hélices α donde una tiene características ácidas y la otra básicas¹². El diseño del complejo D/L se basa en que el ángulo formado por los ejes principales de dos hélices es 0° . En disolución estos péptidos se organizan en estructuras helicoidales como tetrámeros heteroquirales. Esto difiere de la mayoría de haces de hélices α naturales en las que en general se observa una desviación de 10 a 20° entre los ejes principales de las hélices¹³.

Mezclas heteroquirales de péptidos pueden inducir cambios en las tendencias conformacionales de los ensamblajes formados en disolución. El péptido basado en poli(L-lisina) sufre una transición de hélice α a hoja β cuando se encuentra a pH superiores a 11 y temperaturas mayores de 40°C . Sin embargo, en mezclas de poli(L-lisina) y poli(D-lisina) la transición α/β se da cerca de los 15°C , lo que hace que a temperatura ambiente se encuentren estructuradas como hojas β , formando fibras parecidas a las amiloides^{14,15}.

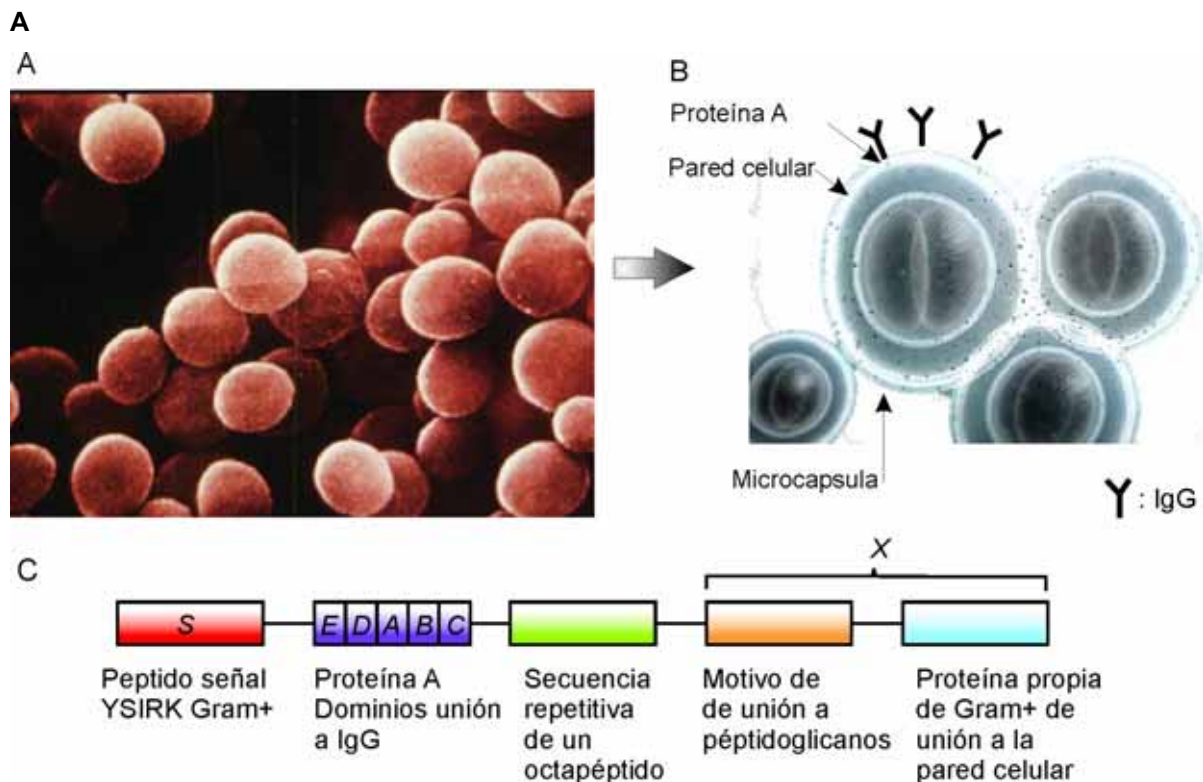
La interacción efectiva entre péptidos todo-L y péptidos todo-D para formar complejos heteroquirales depende del tamaño de la superficie y el número de residuos involucrados en la interacción. Péptidos que poseen pocos residuos tiene menor dependencia de la quiralidad. Sin embargo, péptidos demasiados cortos no consiguen adquirir estructuras estables en disolución. La utilización de péptidos todo D que interactúen con péptidos o proteínas todo-L requiere de llegar a un balance entre la superficie de contacto, el número y localización de los residuos involucrados.

En nuestro sistema se parte de un modelo derivado de un dominio proteico natural. El dominio B de la proteína A es un dominio que se pliega en un trímero de hélices antiparalelas. En nuestro diseño este dominio se dividió en dos fragmentos, uno de los cuales se tomó como base para modificar la quiralidad de todos los residuos. Teniendo en cuenta que en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se ha observado que el enantiómero todo-D no interactúa con el fragmento todo-L, en el presente trabajo este fragmento se ha rediseñado y aplicado una estrategia combinatoria para identificar péptidos que formen complejos heteroquirales con el fragmento nativo.

2.1.1. Dominio B de la proteína A de *Staphylococcus aureus*

La proteína A hace parte de la pared celular del *Staphylococcus aureus*^a. La bacteria se une a través de la proteína A al fragmento cristalizante de inmunoglobulinas G, Fc, en una orientación que bloquea el proceso de opsonización y fagocitosis¹⁶. La inhibición de la interacción entre la bacteria y los neutrófilos en presencia de anticuerpos anti-proteína A disminuyen la virulencia en modelos animales¹⁷. La afinidad de esta proteína por Fc es utilizada para purificar anticuerpos¹⁸ y como soporte de construcción en el diseño de moléculas afines a proteínas para ser usados en purificación y diagnóstico¹⁹(Figura 2).

Figura 2. A. Fotografía de una colonia de *S. aureus*²⁰ B. Representación ampliada de *S. aureus* donde los puntos sobre la superficie representan proteínas de adhesión y proteína A de la pared celular de la bacteria. C. Esquema de las diferentes regiones funcionales de la proteína A



Esta proteína de 42 kDa esta compuesta por tres regiones diferentes; la región S, la cual es procesada durante el proceso de secreción²¹; 5 dominios homólogos denominados E, D, A, B y C en este orden desde la región N-terminal²² y una región que une la proteína a la pared celular denominada X²³. Cada uno de los dominios homólogos contiene aproximadamente

^a El *S. aureus* es una bacteria que esta asociada a diferentes tipos de infecciones cutáneas, endocarditis, síndrome del shock tóxico, neumonía y septicemia. Las infecciones por *S. aureus* de sepsis resistentes a antibióticos están asociadas a un gran porcentaje de

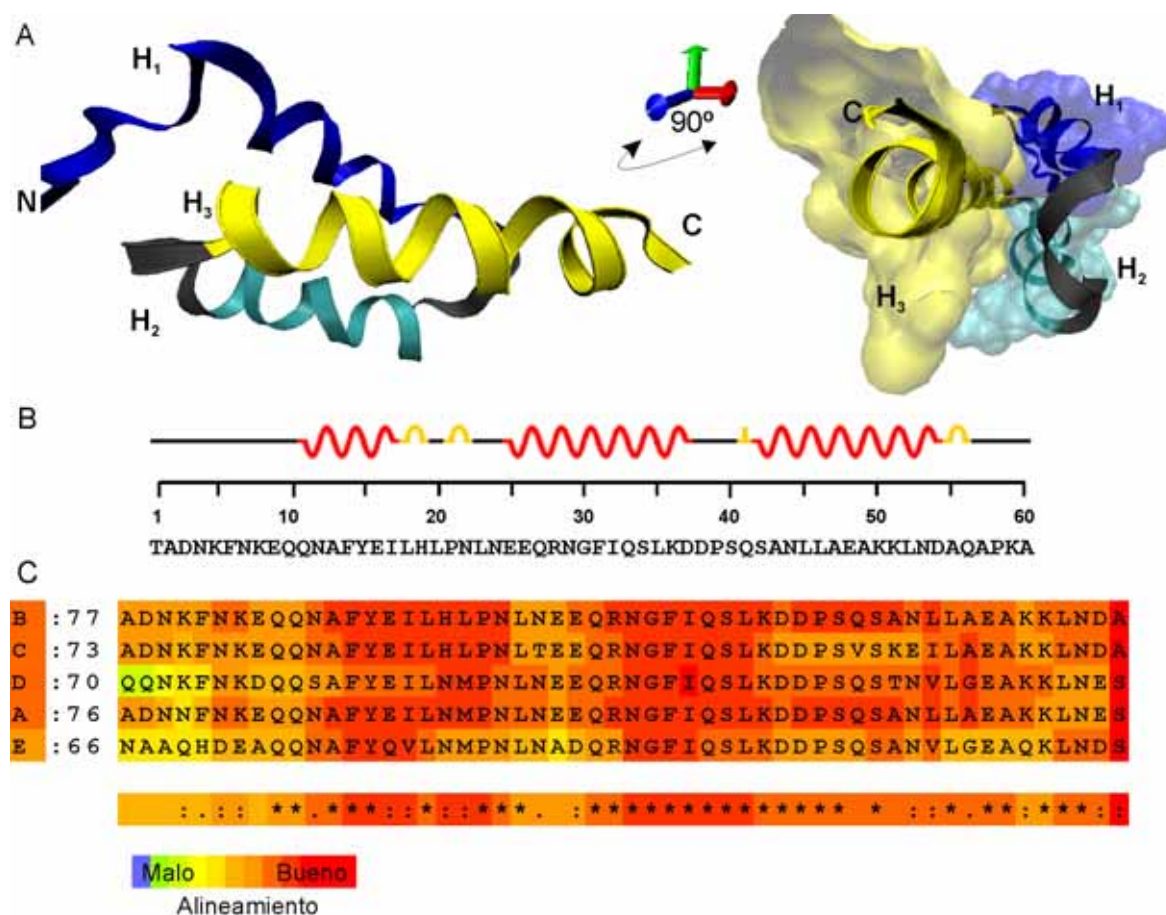
58 residuos y entre ellos comparten entre un 65-90% de homología de la secuencia. Todos los dominios poseen alta afinidad por Fc de inmunoglobulina G. Los dominios D y E muestran también alta afinidad por el fragmento de unión al antígeno, o Fab, de las inmunoglobulinas. Los 5 dominios son capaces de unirse independientemente al Fc de IgG1, IgG2 e IgG4 pero sólo débilmente a IgG3²⁴. Esta afinidad también muestra dependencia de la especie; así, esta proteína presenta una alta afinidad por IgG de humano, de conejo y de conejillos de indias pero una baja afinidad por IgG de bovinos y de ratón²⁵.

Los dominios comparten gran similitud en su secuencia que en consecuencia los lleva a tener estructuras tridimensionales muy similares^{26,27} (Figura 3). El dominio B es un has de tres hélices antiparalelas muy estable que conserva la afinidad por IgG al estar aislado de la proteína A. La eliminación de la secuencia que contiene la hélice C-terminal de este dominio hace que el fragmento restante pierda estructura y se encuentre como una estructura desordenada en disolución (capítulo 3). Sin embargo, la región de las hélices N-terminales interaccionan con el péptido correspondiente a la tercera hélice para formar complejos no covalentes en disolución con alto contenido helicoidal^{28,29}. Esta propiedad hace que este sistema sea un buen candidato como modelo de interacción de péptidos estructurados en disolución.

2.1.2. Química combinatoria. Químicas OBOC

El principio aplicado en química combinatoria se basa en que, la probabilidad de tener éxito en encontrar moléculas activas aumenta con el tamaño y diversidad del conjunto de compuestos analizados. La estrategia combinatoria en química ha permitido ampliar la posibilidad de encontrar nuevos compuestos, con aplicación directa en el diseño de fármacos y en ciencia de materiales, al hacer posible la síntesis y/o análisis de conjuntos de compuestos, denominadas quimiotecas. Las quimiotecas poseen un gran número moléculas que comparten estructuras similares, pero difieren en los grupos funcionales unidos a la base. En lugar de evaluar cada compuesto frente una actividad o propiedad específica se evalúa un conjunto de compuestos y posteriormente se selecciona los que pueden ser de interés para ser analizadas individualmente³⁰⁻³².

Figura 3. A. Estructura del dominio B de la proteína A de *S. aureus*²⁶. La imagen de la izquierda es una vista lateral de la representación tipo cintas de la proteína. La imagen de la derecha muestra la representación con vista frontal de la proteína tipo cintas y superficie. La primera y segunda hélices están coloreadas de azul oscuro y claro, respectivamente (H_{1,2}); la tercera hélice (H_{3n}) está coloreada de amarillo. B. En la parte inferior, se encuentra la descripción gráfica de la estructura secundaria junto con la secuencia del dominio B. C. Alineamiento de las secuencias de los 5 dominios homólogos de la proteína A.



La síntesis en fase sólida permite obtener muchos compuestos en paralelo, en diferentes reactores o en diferentes unidades de resina³³. El hecho de que en fase sólida se pueda construir paso a paso cadenas de monómeros sobre un soporte insoluble hace posible que cada unidad de resina pueda ser considerada un reactor³⁴ o que la resina pueda ser dividida en porciones que en paralelo permita la síntesis de varias moléculas³⁵. La técnica de división y mezcla (del inglés split and mix) permite realizar en un sólo reactor las reacciones que son comunes para todos los elementos de la quimioteca y dividir en diferentes alícuotas las reacciones que deben llevarse de modo diferente o con diferentes reactivos. Esta metodología permite controlar que en cada unidad de resina se obtenga sólo un tipo de

compuesto, generados quimiotecas en las cuales sólo hay un tipo de compuesto por unidad de resina, denominadas OBOC (del inglés, one-bead-one-compound) (Figura 4)³⁴. En consecuencia, la síntesis de este tipo de quimiotecas requiere que todas las reacciones que se realizan tengan rendimientos altos donde el nuevo compuesto después de cada reacción sea único. Estas características son propias de la síntesis en fase sólida de péptidos. Por esta razón, esta técnica desde sus inicios ha estado asociada a péptidos y moléculas análogas.

El uso de aminoácidos D en el diseño de péptidos y proteínas amplía la diversidad en estructuras, propiedades y estabilidad frente a la proteólisis que pueden ser alcanzadas³⁶. Quimiotecas de péptidos que incluyen aminoácidos D se han diseñado y evaluado frente a una gran gama de actividades como: Inhibidores de la actividad citolítica del péptido antimicrobiano, melitina, por medio de una quimioteca de hexapéptidos³⁷; identificación de un ligando de un receptor opiode, que además demostró tener actividad analgésica en ratones, a partir de una quimioteca de hexapeptidos³⁸; Identificación de nuevos inhibidores enzimáticos con la introducción de un sólo aminoácido D en una quimioteca de octapéptidos³⁹; o incluso la identificación de péptidos capaces de adherirse a células tumorales humanas^{40,41}.

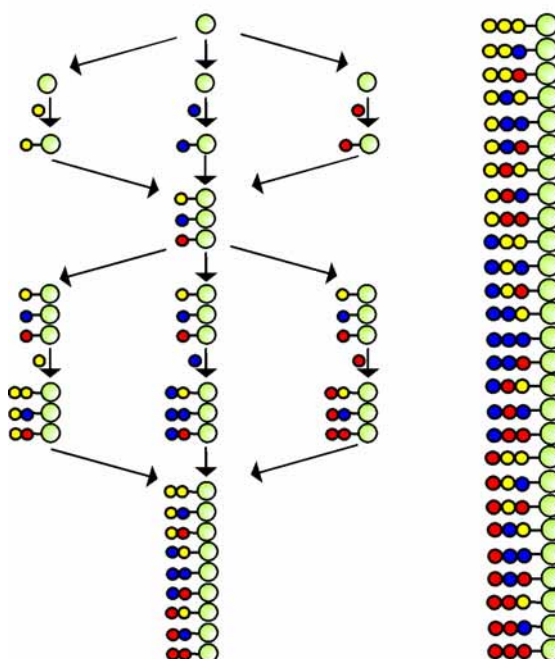
2.1.3. Objetivos

El objetivo general del trabajo expuesto en este capítulo estaba orientado a la identificación de péptidos todo-D capaces de formar complejos heteroquirales no covalentes con una secuencia encontrada en la naturaleza, en este caso el fragmento correspondiente al fragmento N-terminal del dominio B de la proteína A de *s. aureus*.

A partir del objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar, sintetizar y evaluar una quimioteca de péptidos todo-D derivados de las secuencias de la hélice C-terminal del dominio B.
- Detectar e identificar las secuencias de los péptidos activos de la quimioteca que son afines a al fragmento N-terminal del dominio B.
- Resíntetizar los elementos activos más representativos de la quimioteca y validar los resultados encontrados del análisis de la quimioteca a pequeña escala.

Figura 4. Diagrama de la metodología de síntesis de una quimioteaca OBOC por la estrategia de división y mezcla³³. A. preparación de un quimioteaca de 9 dipéptidos sobre resina. Las flechas divergentes representan los pasos de división en porciones iguales, las flechas verticales indican acoplamientos, las flechas convergentes indican pasos de mezcla y homogenización. B. Resultado de la síntesis de una quimioteaca de tripéptidos con tres posiciones variables. Los círculos (azules, amarillos y rojos) indican aminoácidos o monómeros orgánicos y los verdes indican unidades de resina.



2.2. Diseño de la quimioteaca D4096

La secuencia inicial se diseñó a partir de la secuencia de la tercera hélice del dominio B (H_{3n}). El cambio de quiralidad de los aminoácidos en una hélice α cambia las posiciones de las cadenas laterales y la dirección del giro de la cadena principal. Por esta razón, el diseño de la secuencia del péptido todo-D de partida se basó en intentar mantener la disposición topológica de las diferentes cadenas laterales de los aminoácidos. Las variaciones de la quimioteaca se realizaron en la región central de la secuencia, donde se encuentran las vueltas de hélice α de la H_{3n} en el dominio B²⁶. Inicialmente, las modificaciones realizadas involucraron la permutación de los residuos ubicados en las posiciones de la septena, (c)↔(b), (e) ↔ (d), y (f) ↔ (g), como se observa en la (Figura 5). Los residuos ubicados en las posiciones (a), ubicados en el núcleo hidrofóbico permanecieron intactos.

La quimioteca de péptidos todo-D se diseñó de forma que las posiciones variables se localizaron básicamente en los residuos del núcleo hidrofóbico. Aunque los péptidos de la quimioteca tienen 22 residuos, sólo 5 posiciones son variables, para ajustar las variaciones en los residuos que podrían intervenir directamente en la interacción. En cada posición variable se permitieron 4 posibilidades que conducían a obtener 4096 diferentes péptidos, de aquí se originó el nombre de la quimioteca, D4096. Las sustituciones se escogieron intentando abarcar el máximo de diversidad con el mínimo de residuos posible. Así, en cada posición variable podía encontrarse un residuo de carácter hidrofóbico alifático, uno hidrofóbico aromático, uno polar con carga o uno polar sin carga (Tabla 1).

En la posición variable x_1 , se conservó la serina de la secuencia natural y se adicionó fenilalanina porque podría estabilizar interacciones con los residuos aromáticos que se encuentran en H_{1-2} , lisina como residuo polar con carga positiva y la leucina por su alta propensión a estar presentes en hélices α ⁴².

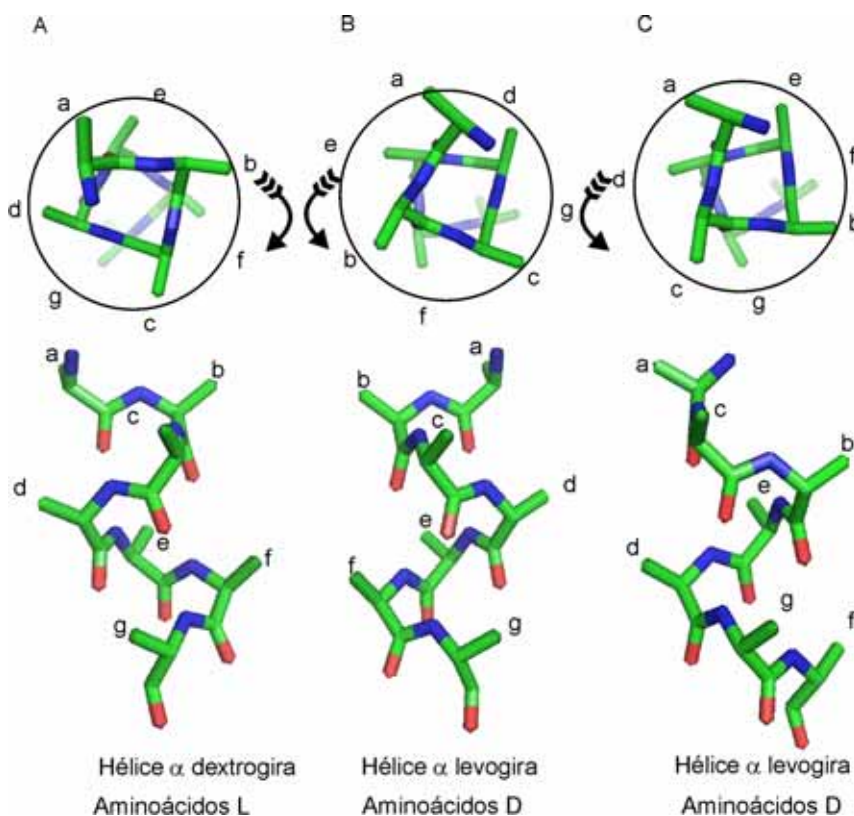
En la posición variable x_2 , al igual que en los casos anteriores se conservó el residuo de la secuencia natural que en este caso es leucina. El triptófano se escogió como residuo hidrofóbico aromático, debido a que tiene una gran superficie y el glutámico se escogió como residuo cargado negativamente.

En la posición variable x_3 y x_6 , se introdujeron los residuos leucina, fenilalanina, lisina o treonina. El residuo de leucina de la secuencia natural, la fenilalanina se escogió por la misma razón expuesta para x_1 ; la lisina como residuo cargado positivamente; y la treonina como residuo polar, que facilita el análisis de secuencia por espectrometría de masas, ya que otros residuos polares como la asparagina y la glutamina tienen masas moleculares similares a la leucina y la lisina

En la posición variable x_4 , se conservó la alanina presente en la secuencia natural, como residuo aromático hidrofóbico se escogió el triptófano, como residuo polar con carga el glutámico y como residuo polar sin carga la serina, puesto que tiene un tamaño similar a la alanina.

En la posición variable x_5 se incluyó asparagina, presente en la secuencia natural, como residuo hidrofóbico aromático se introdujo el triptófano, como residuo cargado negativamente el glutámico y la valina como residuo hidrofóbico alifático.

Figura 5. Representación de dos giros de hélice α canónica indicando la posiciones de la septena “abcdefg”. En la parte superior se representa la vista axial de las hélices y en la parte inferior se observa una vista lateral. A. Hélice α dextrógira con aminoácidos L. B. Hélice α levógira con aminoácidos D. C. Hélice α levógira donde las posiciones de la septena “abcdefg” se han cambiado por la septena “acbedgf” de forma que las cadenas laterales de los residuos queden ubicados en el espacio en forma similar a las cadenas laterales de la hélice α dextrógira.



2.3. Síntesis y caracterización de la quimioteca D4096

2.3.1. Síntesis de la quimioteca D4096

La síntesis combinatoria para obtener un péptido en cada unidad de resina (OBOC) se basó en la estrategia de división y mezcla de resina en los ciclo de acoplamiento de los residuos de las posiciones variables usando la estrategia de síntesis de péptidos Boc/Bzl (ver 6.7.1). Esta metodología considera que cada unidad de resina es en si misma un reactor. La síntesis de la quimioteca se realizó como si se tratara de un sólo péptido, con la diferencia de que en las regiones donde hay variación en la secuencia, la peptidil resina se dividió en el número de variaciones requeridas, se realizaron los respectivos acoplamientos y al final

se volvieron a unir las distintas fracciones en un único reactor para continuar la síntesis (Figura 4).

Tabla 1. Diseño de la químioteca d4096, de péptidos todo-D. A partir de la secuencia de la tercera hélice del domino B, H_{3n} todo-L, se diseñó la secuencia base de la químioteca compuesta exclusivamente de aminoácidos D, D₃. Entre los residuos 5 y 16 se realizaron permutaciones de acuerdo a la posición del residuo en la septena helicoidal, “abcdefg”, por la secuencia “acbedgf”, a, d y e se establecieron como posiciones variables (x₁, x₂, x₃, x₄, x₅, x₆). En la parte inferior de la tabla se indica, para cada posición variable, los cuatro diferentes residuos que podían estar presentes en los elementos de la químioteca.

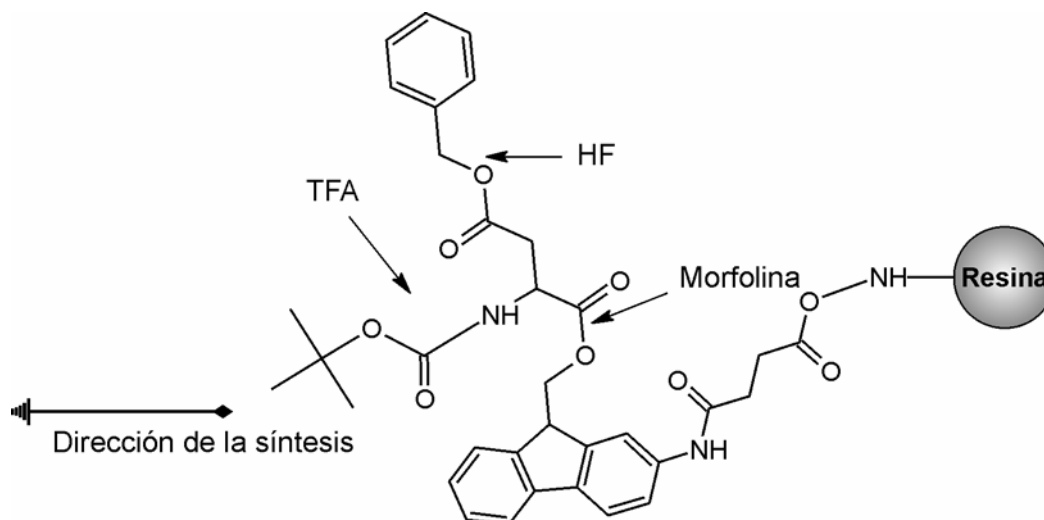
Número de residuo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Cargas	-									-		+	+				-					+
H ₃ Todo-L	D	P	S	Q	S	A	N	L	L	A	E	A	K	K	L	N	D	A	Q	A	P	K
Septena					a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e						
Cargas	-									-		+	+				-					+
D ₃ Todo-D	d	p	s	q	s	n	a	l	l	e	a	a	k	k	n	l	d	a	q	a	p	k
Septena					a	c	b	e	d	g	f	a	c	b	e	d						
Posición Variable					x ₁			x ₂	x ₃			x ₄			x ₅	x ₆						
Variación1					s			l	l			a			n	l						
Variación2					f			e	f			e			e	f						
Variación3					l			t	k			s			v	k						
Variación4					k			w	t			w			w	t						

Al final de la síntesis cada unidad de resina contiene ancladas cadenas peptídicas con una única secuencia. La actividad de los diferentes péptidos así obtenidos se evaluó en conjunto en un mismo ensayo. Puesto que este ensayo de actividad se realizó directamente sobre la resina, esta debe tener propiedades que la hagan compatible con los reactivos y condiciones con las cuales va a ser tratada tanto en la síntesis como en la detección de actividad. En este caso se usó como soporte sólido la resina PEGA⁴³, la cual es un copolímero de polietilenglicol y poliacrilamida, que se solvata bien en la mayoría de solventes usados en síntesis de péptidos y en especial en medios acuosos. Estas propiedades, unidas a su buena resistencia a la presencia de ácidos fuertes como TFA y HF, hicieron que se seleccionase esta resina para realización de la síntesis⁴⁴.

El espaciador bifuncional HMFS se usó en esta síntesis para unir el primer residuo a la

resina. Este espaciador permite anclar el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal por medio de un enlace tipo éster. El desanclaje se realiza en medio básico, particularmente con morfolina en DMF (20-50%)⁴⁵. Este enlace es compatible con química Boc/Bzl porque es resistente a las condiciones ácidas usadas durante la desprotección del grupo N- α -amino terminal después de cada acoplamiento y al tratamiento con fluoruro de hidrógeno usado al final de la síntesis⁴⁴.

Figura 6. Diagrama resumido de la estrategia sintética usada. El soporte sólido (resina PEGA) se funcionalizó con el espaciador HMFS, la secuencia se sintetizó usando derivados de aminoácidos protegidos según el esquema Boc/Bzl. El grupo protector N- α -t.-Boc se eliminó con ácido trifluoroacético, los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos se eliminaron por tratamiento con fluoruro de hidrógeno. El péptido se escindió de la resina por tratamiento con morfolina.



Los diferentes Boc-aminoácidos se activaron con diisopropil carbodiimida y HOBt en DMF con el fin de obtener el éster de benzotriazol de cada aminoácido para hacerlo reaccionar con el grupo amino terminal de la cadena peptídica en crecimiento. Para asegurar la completa introducción de los aminoácidos y la buena calidad de los péptidos obtenidos al final de la síntesis, se realizaron siempre dos ciclos de acoplamiento. Después del acoplamiento del último residuo de la secuencia, el grupo amino terminal se acetiló con anhídrido acético (ver 6.2.3.). Finalmente, para obtener la peptidil-resina libre de grupos protectores en las cadenas laterales de los aminoácidos, esta se trató con fluoruro de hidrógeno usando un 1 % de *m*-cresol como capturador de los carbocationes generados en la reacción.

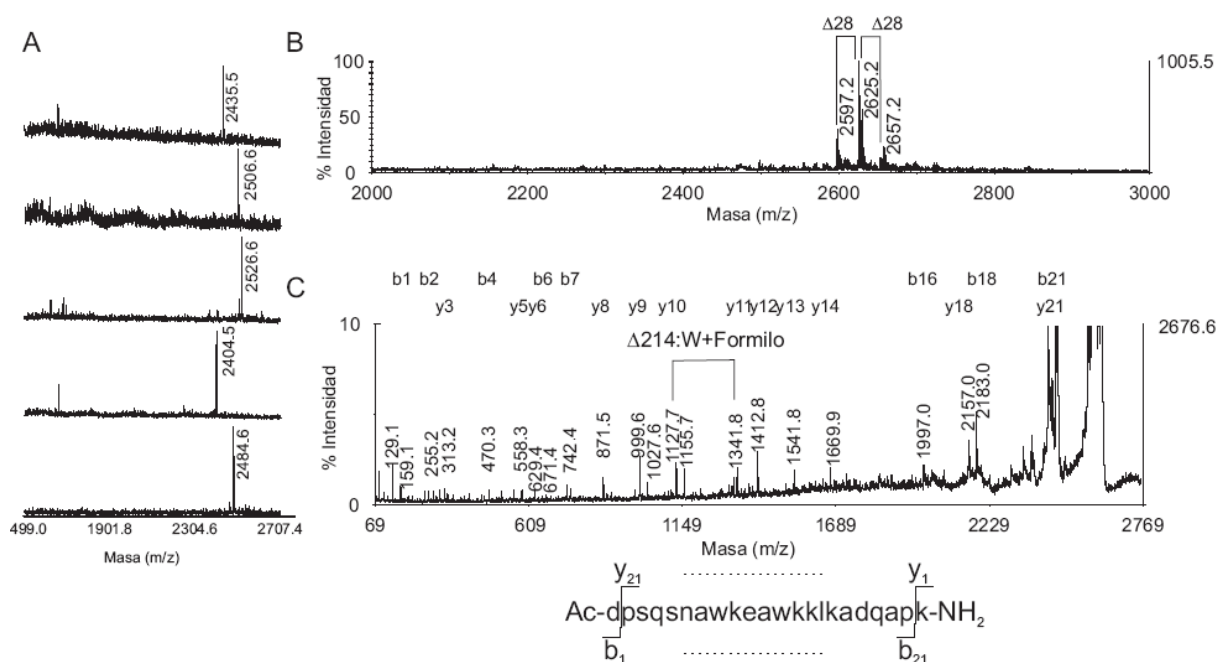
2.3.2. Caracterización de la químioteca

2.3.2.1. Identificación de subproductos de la síntesis

La caracterización de una químioteca OBOC de miles de compuestos es una tarea compleja, puesto que en una pequeña alícuota de resina pueden encontrarse decenas o centenares de moléculas diferentes. Por esta razón se realizaron dos tipos de caracterización; en primer lugar, la caracterización global sobre alícuotas de peptidil-resina; y en segundo lugar, la caracterización de algunas unidades de resina.

Una alícuota de peptidil-resina se escindió por tratamiento con 20% de morfolina en DMF para obtener una distribución general de masas de la químioteca por espectrometría de masas MALDI-TOF y análisis de aminoácidos (Figura 11). Por otro lado, los péptidos unidos a algunas unidades de resina se escindieron para ser analizados individualmente por espectrometría de masas MALDI-TOF y masas en tándem (Figura 7).

Figura 7. Espectro de masas MALDI-TOF y de fragmentación de péptidos de la químioteca seleccionados al azar. A. La mayoría de péptidos mostraron un espectro de masas limpio con sólo un producto (A). Sin embargo, algunos espectros mostraron perfiles más complejos (B). En estos péptidos se identificaron residuos de triptófano formilado en el espectro de fragmentación del pico principal (C).



Inicialmente, se observó que los datos de caracterización obtenidos estaban de acuerdo con lo esperado. Sin embargo, algunas de las unidades de resina escogidas al azar fueron imposibles de analizar, debido a que después de la escisión se observaron señales en el espectro de masas MALDI-TOF de muy baja intensidad. Este comportamiento aislado hizo necesario realizar un análisis aun más exhaustivo de la químioteca. Para esto se exploraron una serie de variaciones en el procedimiento de escisión del péptido de la resina (Tabla 2), encontrándose que al usar como base una disolución saturada de bicarbonato de amonio se obtenía la cantidad necesaria de péptido para ser analizado por espectrometría de masas MALDI-TOF y obtener el espectro de fragmentación. En estos péptidos, de difícil caracterización, la presencia de morfolina en DMF ejercía un efecto negativo en la preparación y análisis de la muestra.

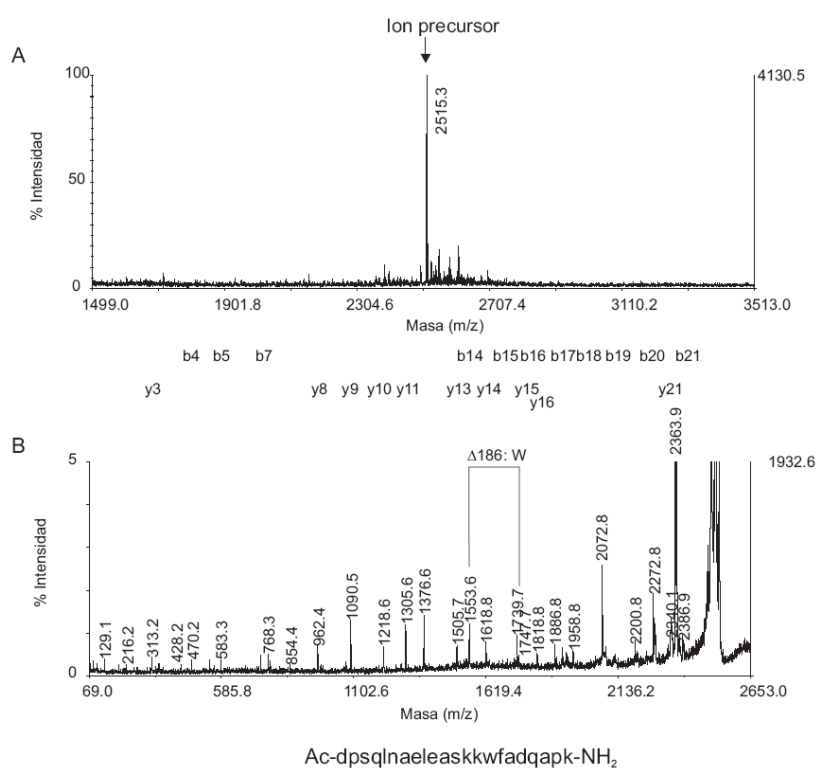
Tabla 2. Diferentes condiciones de preparación de muestra para analizar por espectrometría de masas MALDI-TOF el péptido anclado en una unidad de resina (UR). Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, 0.1%TFA, agua/ACN 1:1 (ACH-TFA), Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, 0.1% ácido fórmico, agua/ACN 1:1 ((ACH-Fórmico), Ácido sinapínico, 0.1%TFA, agua/ACN 1:1 (AS-TFA), Ácido dihidroxibenzoico, 0.1%TFA, agua/ACN 1:1 (DHB-TFA), diaza(1,3)biciclo[5.4.0]undecano (DBU). (*) El desanclaje del péptido de una unidad de resina con los vapores de morfolina concentrados en un recipiente sellado.

Condiciones de desanclaje	Característica	Matriz	Calidad del espectro
1 μ L/UR 20% morfolina/DMF, 1h	poco volátil	(ACH-TFA)	+
1 μ L/UR 20% morfolina/DMF, 1h	poco volátil	(ACH-Fórmico)	++
1 μ L/UR 50% morfolina/DMF, 1h	poco volátil	(ACH-TFA)	-
1 μ L/UR 2% DBU/5% morfolina/DMF, 1h	poco volátil	(ACH-TFA)	-
1 μ L/UR 32% bicarbonato de amonio, 1h	volátil	(ACH-TFA)	++
1 μ L/UR 32% bicarbonato de amonio, 1h	volátil	(AS-TFA)	-
1 μ L/UR 32% bicarbonato de amonio, 1h	volátil	(DHB-TFA)	-
1 μ L/UR 10% amoníaco, 1h	volátil	(ACH-TFA)	+
1 μ L/UR 30% amoníaco, 1h	volátil	(ACH-TFA)	+
1 μ L/UR amoníaco en metanol, 1h	volátil	(ACH-TFA)	-
* vapores de morfolina, 1h	poco volátil	(ACH-TFA)	+++

Algunos de los péptidos, de unidades de resina de difícil caracterización, se identificaron por análisis de los espectros de fragmentación MS/MS encontrándose que en común todos los péptidos poseían triptófano y que parte del producto obtenido tenía como impureza el péptido con el grupo protector formilo en este residuo (Figura 7). La presencia de esta

impureza se consiguió identificar al usar como base una disolución de bicarbonato de amonio para liberar el péptido de la resina, puesto que la presencia de morfolina era capaz de eliminar el grupo formilo del triptófano y esta impureza permanecería indetectable. Debido a la pequeña diferencia de masas entre el péptido con triptófano con y sin el grupo formilo, de sólo 28 unidades, la caracterización global de la quimioteca no discriminaba esta diferencia.

Figura 8. A. Espectro de masas MALDI-TOF de un péptido obtenido a partir de una unidad de resina de la quimioteca. B. Espectro de fragmentación del ión precursor (2515.3 m/z) e identificación de la secuencia (Ac-dpsqlnaeleaskkwfadqpk-NH₂)



2.3.2.2. Eliminación de los subproductos de la síntesis

Como se ha comentado anteriormente, los resultados mostraron la presencia del grupo formilo unido a la cadena lateral del triptófano después del tratamiento con fluoruro de hidrógeno. Este grupo protector se eliminó posteriormente, por tratamiento de la péptidil resina con una disolución de TFMSA/TFA/DMS/*m*-cresol/EDT (10:49:29:10:2). A esta concentración de ácido el EDT actúa como nucleófilo eliminando el grupo fórmilo del triptófano⁴⁶. En esta condiciones de reacción la presencia de dimetilsulfuro como disolvente dirige el mecanismo de reacción hacia una sustitución de tipo bimolecular que evita la

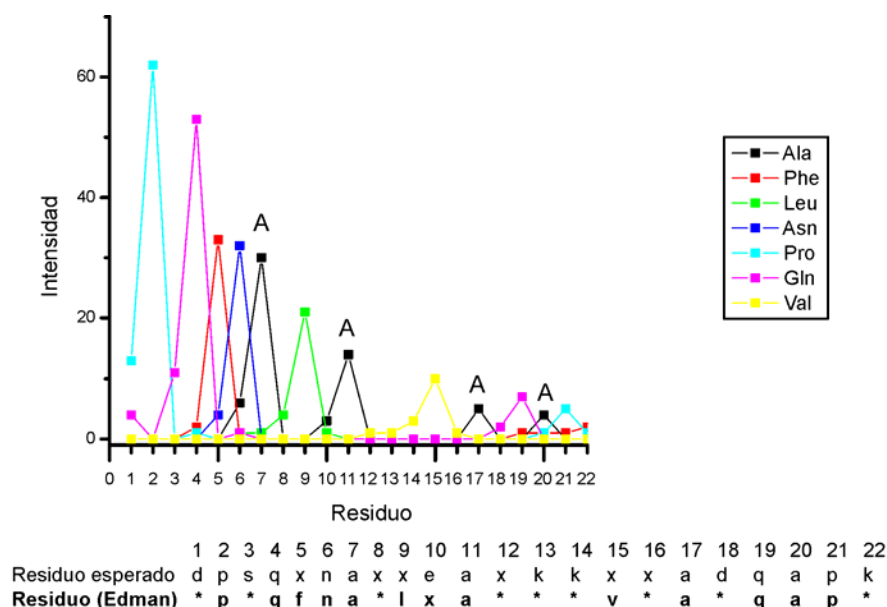
formación de carbocationes, y evita reacciones laterales de acilación⁴⁷.

La peptidil resina libre de todos los grupos protectores tuvo que caracterizarse nuevamente. De manera similar al análisis previo de la químioteca, un grupo de unidades de resina se escogieron al azar, para escindir individualmente el péptido. Las secuencias de algunas de ellas se identificaron por medio de su espectro de fragmentación, tras lo cual fue posible identificar que las unidades con triptófano no poseían el grupo formilo (Figura 8).

2.3.2.3. Degradación de Edman de unidades de peptidil resina

La degradación de Edman se usó para obtener la secuencia de aminoácidos de algunas de las unidades de peptidil resina. En esta técnica se derivatiza y separa el residuo N-terminal, lo que permite identificar la naturaleza de los residuos y obtener el siguiente residuo con el grupo amino libre, para continuar con el siguiente ciclo de reacción. Cada residuo es consecutivamente aislado y derivatizado, por reacción con fenilisotiocianato en medio ácido, como la respectiva 3-fenil-2-tiohidantoína (PTH), posteriormente separado por HPLC e identificado por comparación con los patrones estándar.

Figura 9. Secuenciación por degradación de Edman de una unidad de peptidil resina con los grupos protectores de las cadenas laterales

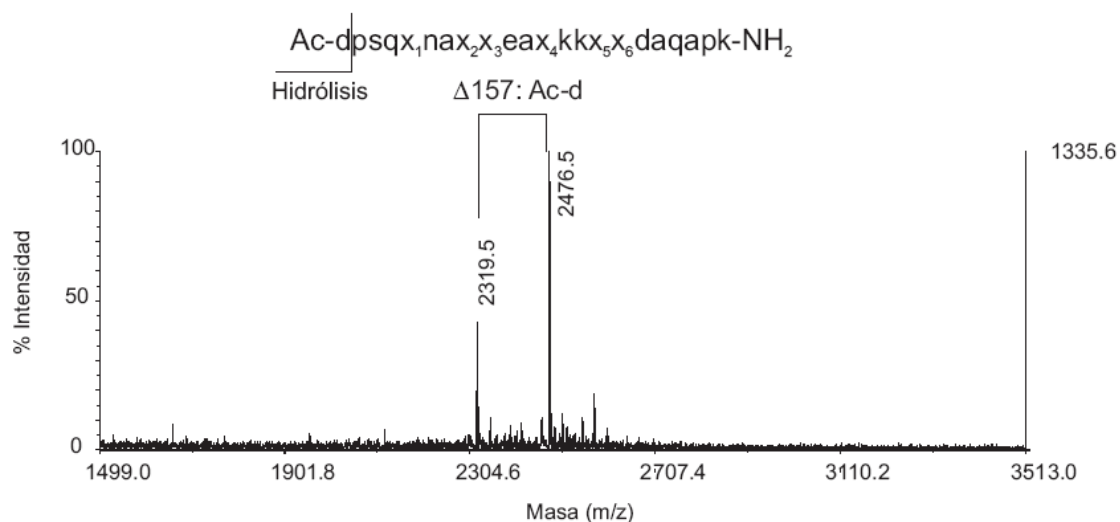


La degradación se realizó directamente sobre la peptidil resina de dos formas diferentes. Por un lado, se obtuvo la secuencia de unidades de resina el grupo amino libre y las cadenas

laterales protegidas, y por otro lado se secuenciaron unidades de peptidil resina libres de grupos protectores en las cadenas laterales.

En el primer caso, una alícuota peptidil resina, con el grupo amino terminal libre, se separó antes de la reacción de acetilación y tras el posterior tratamiento con HF, se determinó la secuencia de los residuos sin cadenas laterales protegidas. La secuencia pudo identificarse parcialmente, observándose la presencia de los residuos no protegidos esperados. Sin embargo, la eficiencia global de la degradación de Edman disminuye en cada ciclo (Figura 9), lo que limitó la identificación exacta de los aminoácidos de los últimos ciclos de degradación.

Figura 10. Hidrólisis del enlace Asp-Pro de péptidos de la químioteca con ácido fórmico al 70% después de 24 horas de reacción



En el segundo caso, unidades de peptidil resina se analizaron tal como iban a ser usadas para su evaluación. El grupo acetilo N-terminal de estas unidades no permitía realizar la secuenciación directa por degradación de Edman. Sin embargo, el enlace Asp-Pro es susceptible a la hidrólisis selectiva en ácido fórmico^{48,49} (Figura 10). Ya que esta secuencia era conocida, se encontraba en extremo N-terminal del péptido y común en todos los péptidos, se aprovechó este hecho para obtener la secuencia de unidades de peptidil resina a partir del residuo de Pro2. Para hidrolizar este enlace las unidades de resina se trataron con una disolución acuosa de ácido fórmico al 70% durante 3 días a temperatura ambiente, bajo estas condiciones se consiguió hidrolizar la mayor cantidad de péptido. Después de este tiempo la resina se lavó abundantemente con agua y se prepararon individualmente para secuenciar el péptido por degradación de Edman. Mediante esta técnica se identificaron 4 secuencias, que concuerdan con secuencias esperadas de la químioteca.

Adicionalmente, en algunas de las unidades de peptidil resina se identificaron residuos de triptófano, a pesar de ser estos susceptibles a la formilación en presencia de ácido fórmico⁵⁰ (Tabla 3).

Esta técnica permitió determinar la secuencia de forma inequívoca de unidades de peptidil resina aisladas hasta 15 ciclos. Sin embargo, el rendimiento global después del residuo 15 se reduce hasta un nivel que dificulta la determinación del último residuo de las posiciones variables de la químiotoca. De forma que esta técnica sólo podría ser usada como alternativa en los casos en los que la secuenciación por espectrometría de masas en tándem no sea posible.

Tabla 3. Secuencias determinadas por degradación de Edman a partir de una unidad de peptidil resina (UR). GP, unidad de resina con grupos protectores en los residuos trifuncionales, sólo se identificaron los residuos que en la síntesis no necesitan grupo protector. La hidrólisis del enlace entre Asp-Pro se realizó con ácido fórmico al 70%. (*) residuo no determinado

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Residuo esperado	d	p	s	q	x	n	a	x	x	e	a	x	k	k	x	x	a	d	q	a	p	k
UR1 (GP)	*	p		q	f	n	a		l	x	a	*	*	*	v	*	a	*	q	a	p	*
UR2 (GP)	*	p	*	q	f	n	a	*	f	*	a	a	*	*	w	*	a	*	q	a	p	*
UR1 (H)	*	p	s	q	l	n	a	w	k	e	a	e	k	k	n	k	a	d	q	a	p	*
UR2 (H)	*	p	s	q	k	n	a	e	k	e	a	w	k	k	w	k	a	d	q	a	p	*
UR3 (H)	*	p	s	q	s	n	a	e	t	e	a	a	k	k	n	k	a	d	q	a	p	*
UR4 (H)	*	p	s	q	k	n	a	e	l	e	a	w	k	k	w	t	a	d	q	a	p	*

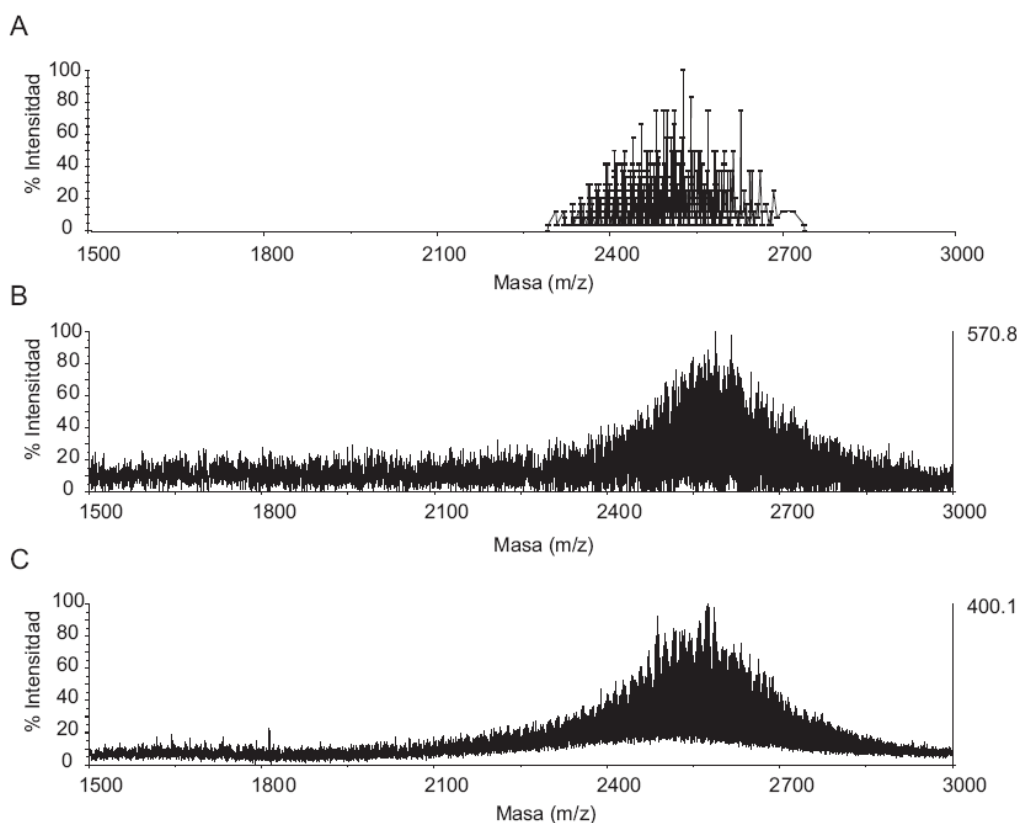
2.3.2.4. Caracterización en conjunto de la químiotoca D4096

La caracterización general de químiotoca se realizó por diferentes técnicas. Los valores de las propiedades a analizar se estimaron o calcularon para la químiotoca, incluyendo todos péptidos esperados, para ser comparados con los resultados analíticos experimentales. Alícuotas de la químiotoca se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF, RP-HPLC/MS y análisis de aminoácidos.

El espectro de masas MALDI-TOF obtenido se encuentra en el rango de masas esperado y tiene forma gaussiana con un máximo alrededor de 2500 m/z. El perfil de la químiotoca antes y después del tratamiento con TFMSA eran muy similares y no permitieron detectar la

diferencia de masas debidas a la presencia del grupo formilo (Figura 11).

Figura 11. Espectro de masas de la químioteca D4096. A. Espectro teórico estimado usando todas las masas moleculares de los péptidos esperados. Espectros de masas de la químioteca D4096 antes (B) y después de eliminar el grupo formilo del triptófano (C)



El perfil obtenido por RP-HPLC es complejo y las diferentes especies abarcan casi todo en cromatograma en un gradiente de 0-70% de acetonitrilo en 30 min. El espectro de masas ESI obtenido mostró, como especies cargadas mayoritarias, los iones $(M+3H)^{3+}$, $(M+4H)^{4+}$ y con muy baja intensidad se observaron los iones $(M+2H)^{2+}$ (Figura 12).

La composición determinada por análisis de aminoácidos, de tres alícuotas de peptidil resina, mostraron un perfil que estuvo de acuerdo con las cantidades esperadas a excepción de la determinación de serina y treonina (Tabla 4). La desviación respecto a lo esperado, de la cuantificación de estos residuos, se debe a que estos aminoácidos se descomponen en las condiciones de hidrólisis.

Figura 12. HPLC-MS de una alícuota de peptidil resina de la químioteca. A. RP-HPLC obtenido con un gradiente de 0-70% de ACN con un 0.07 % de ácido fórmico y agua con un 0.10% de ácido fórmico en 30 min. B. Espectro de masas ESI. C. Espectro de masas ESI calculado de la químioteca para diferentes estados de carga [(M+2H)²⁺, (M+3H)³⁺ y (M+4H)⁴⁺]

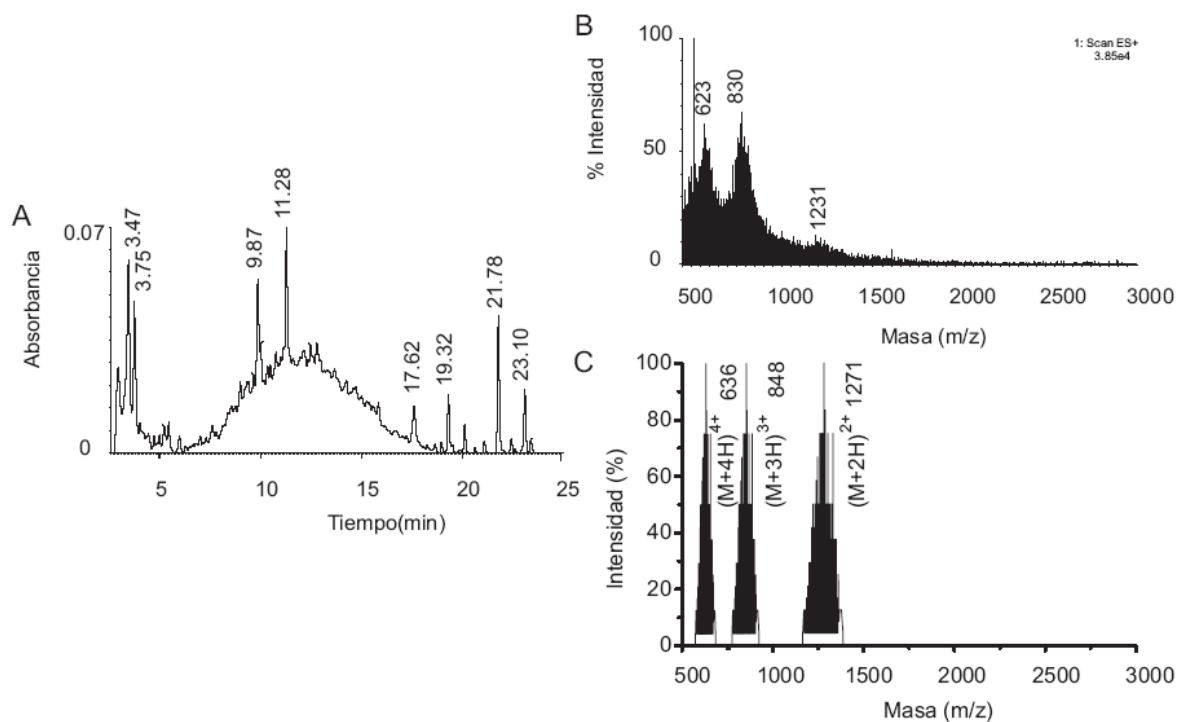


Tabla 4. Análisis de aminoácidos (AAA) promedio de la químioteca D4096 después de la hidrólisis por 48 h a 110C de 2.0 mg de peptidil resina (Promedio de 3 experimentos)

Residuos	AAA Teórico	AAA Promedio	% Desviación
D	3,25	3,38	3,99
T	0,75	0,53	-29,38
S	1,50	1,16	-22,66
E	3,75	3,45	-8,13
P	2,00	2,16	8,09
A	4,25	4,39	3,36
V	0,25	0,24	-4,15
L	1,00	1,02	1,82
F	0,75	0,74	-1,51
K	3,75	4,24	12,95

2.4. Evaluación de la quimioteca

El objetivo de la evaluación de la quimioteca era identificar unidades de peptidil-resina capaces de interactuar con el fragmento N-terminal del dominio B. Para esto se obtuvo el fragmento correspondiente a la H₁₋₂ con biotina unida al grupo amino terminal, bH₁₋₂ (ver 6.8.1). La biotina se une con estreptavidina^b de forma no covalente, generando un complejo altamente estable. Por esta razón, estreptavidina marcada con isocianato de fluoresceína^c (FITC) se usó en la detección del péptido bH₁₋₂ por la fluorescencia generada.

Para realizar este ensayo, una porción de peptidil-resina se solató en medio acuoso e incubó con 1% de BSA en tampón fosfato pH 7.4, para bloquear sitios sobre la superficie de la resina que produjera reacciones inespecíficas. Una vez preparada la peptidil-resina se puso en contacto con una disolución 2 μM de bH₁₋₂ y 8 μM de estreptavidina y se dejó en agitación continua por 2 horas protegida de la luz. A continuación, se eliminó la disolución de bH₁₋₂/estreptavidina y la peptidil resina se lavó con tampón fosfato con 0.05% de tween 20. Inmediatamente después, las unidades de resina se observaron bajo un microscopio estereoscópico de fluorescencia (Figura 13). Paralelamente, el mismo tipo de ensayo se realizó sobre una muestra de resina sin péptido, usado como referencia negativa y en el ajuste de los parámetros de observación y adquisición de imágenes con el estereoscopio.

Previamente a la evaluación de la quimioteca, las condiciones del ensayo tuvieron que ser establecidas, para obtener una óptima detección de unidades positivas al ensayo, evitar interacciones inespecíficas; y por otra parte, obtener un buen contraste entre las unidades de resina positivas y negativas. Los ensayos de optimización se realizaron sobre alícuotas de resina libres de péptido mezcladas con más o menos un 1 % unidades de resina unidas positivas que contenían H_{3n}. Entre los parámetros experimentales estaban: la naturaleza de la disolución usada para bloquear las interacciones inespecíficas con la resina; los tiempos de incubación de la resina con bH₁₋₂/estreptavidina (2 h y 16 h); la relación de concentraciones entre H₁₋₂/estreptavidina ; y el efecto de la reducción de la temperatura. De acuerdo a los resultados en los diferentes ensayos se encontraron las siguientes condiciones para la realización del ensayo: a) Una disolución con %0.1 de BSA en tampón fosfato bloqueaba efectivamente las interacciones inespecíficas sobre la superficie de la resina; b) la relación 4 a 1 entre bH₁₋₂ y estreptavidina era suficiente para detectar todas la

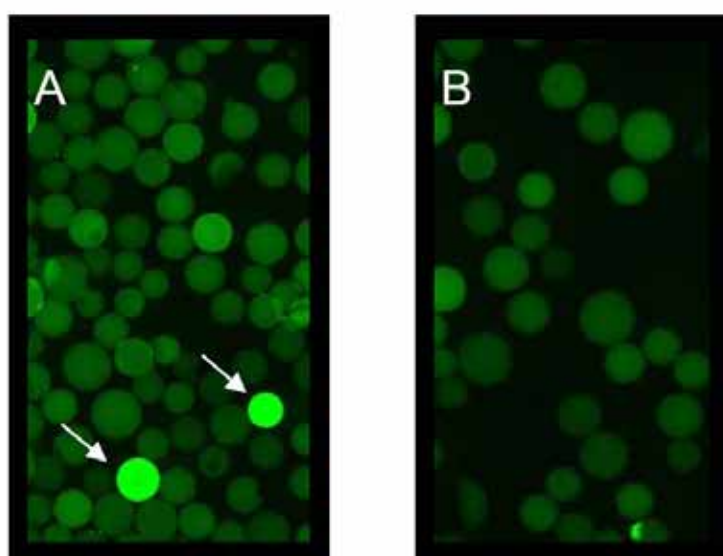
^b Estreptavidina: Proteína de la bacteria *Streptomyces avidinii* que posee una afinidad alta por la biotina. La constante de disociación es del orden de ~10⁻¹⁵ M.

^c Fluoresceína: Fluorocromo cuya excitación tiene lugar a 494 nm y emisión a 521 nm (verde).

unidades de resina positivas; c) el tiempo de incubación de la resina con la disolución con bH_{1-2} necesaria para la detección de todas las unidades de resina fluorescentes era de 2 horas; d) la reducción de la temperatura de 25 °C a 4 °C reducía la afinidad de las unidades de peptidil resina activas por bH_{1-2} , por esta razón se decidió realizar la evaluación de la resina a temperatura ambiente.

Con el protocolo diseñado previamente se evaluaron alrededor de 25000 unidades de resina, divididas en grupos de 7000 unidades⁵¹; de las cuales se encontraron 30 unidades de peptidil-resina fluorescentes. Las unidades resina afines a bH_{1-2} se aislaron manualmente del resto de la químioteca y se volvió a realizar el ensayo para verificar nuevamente su actividad, se encontró que la afinidad de las unidades de químioteca por bH_{1-2} era reproducible. La masa molecular y la secuencia de cada una de las unidades de resina se identificaron por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF estándar y de masas en tándem.

Figura 13. A. Fotografía de la evaluación de químioteca D4096 que muestra un conjunto de unidades de resina de la químioteca con dos unidades de resina fluorescentes indicadas por las flechas, las cuales se detectaron después de ser incubadas durante 2 horas con una disolución de bH_{1-2} /FITC streptavidina (8 μ M y 2 μ M, respectivamente). La peptidil resina se observó con un microscopio estereoscópico de fluorescencia Leica MZ FLIII. **B.** Los parámetros de adquisición de imagen se ajustaron a partir de un blanco de peptidil resina, en ausencia de péptido, realizado al mismo tiempo (Tiempo de exposición 0,69 s).



2.5. Determinación de la secuencia de los péptidos activos por espectrometría de masas en tándem MALDI-TOF

La preparación de la muestra para ser analizada por espectrometría de masas MALDI-TOF es crucial para obtener un espectro de buena calidad. Por esta razón, se establecieron las condiciones de escisión del péptido de la resina que permitieran obtener una cantidad suficiente de compuesto para ser identificado con la menor cantidad de interferencias. Se probaron diferentes condiciones, tales como, el tipo de base usada, el disolvente y la forma de adición de la muestra directamente sobre la placa de MALDI.

El análisis de varias unidades de peptidil resina permitió encontrar las condiciones óptimas para liberar el péptido de la resina. Cada unidad de resina activa se colocó sobre uno de los pozos de un plato de MALDI, previamente lavada con abundante agua para eliminar sales. El plato se introdujo en un recipiente sellado saturado de vapores de morfolina, después de una hora de reacción se abrió el recipiente y se dejó evaporar la pequeña cantidad de morfolina adsorbida sobre la resina. Esta base fue más efectiva que la disolución de carbonato de amonio para escindir el péptido de la resina y obtener el espectro de masas, sólo cuando se aplicaba de esta forma. La adición directa de morfolina sobre la unidad de resina conducía a la obtención de espectros de masas de muy baja intensidad. Para adicionar la matriz, se adicionó 1 μL de 5 mg/mL de CHCA en una mezcla 1:1 de H_2O /Isopropanol sobre cada unidad de resina y se dejó evaporar a temperatura ambiente.

Del grupo de unidades de resina activas aisladas se identificaron 21 secuencias (Tabla 5). La distribución de las frecuencias de los residuos encontrados en las posiciones variables mostró que todos los péptidos tenían en común el motivo D-Trp D-Lys en su secuencia. Este motivo se encontró en una o dos de las tres regiones en las cuales era posible que se encontrara. El 62% de los péptidos activos tenían estos residuos en la mitad de la secuencia.

En cada una de las posiciones variables, de las cuatro posibilidades diferentes, se observó que uno o máximo dos residuos se encontraban con mayor frecuencia en el conjunto de péptidos activos. En el caso de x_1 el residuo preferido era lisina; en x_2 se encontraron principalmente residuos de leucina y triptófano; en x_3 , la lisina era el residuo de mayor frecuencia; en x_4 se identificaron triptófano y serina; en x_5 se encontró principalmente triptófano y asparagina; y en la posición x_6 se encontró exclusivamente lisina (Figura 14).

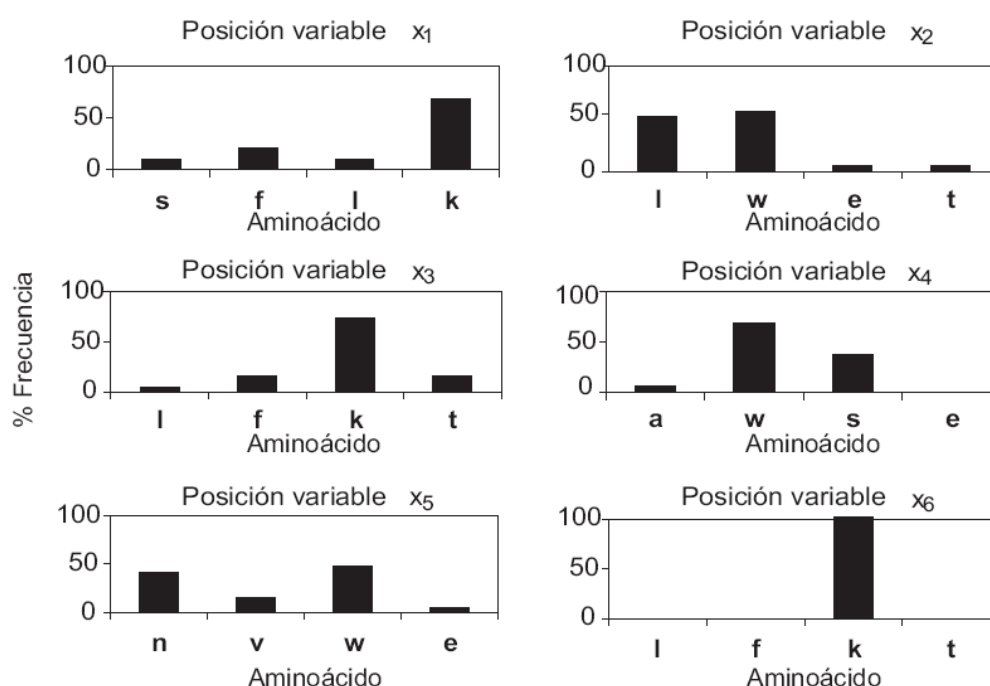
Tabla 5. Secuencias identificadas por espectrometría de masas en tándem de los péptidos todo-D activos de la químioteca D4096.

Péptido	Secuencia	Frecuencia	% Frecuencia	Masa molecular
1D	Ac-dpsqlnawkeawkknkadgapk	4	13	2595
2D	Ac-dpsqknawkeaaakkwkadgapk	3	10	2567
3D	Ac-dpsqknawkeaskknkadgapk	2	7	2511
4D	Ac-dpsqknalkeawkknkadgapk	2	7	2537
5D	Ac-dpsqknalteawkkwkadgapk	2	7	2582
6D	Ac-dpsqknawkeawkknkadgapk	2	7	2610
7D	Ac-dpsqknalfeawkknkadgapk	1	3	2556
8D	Ac-dpsqknawteawkkvkadgapk	1	3	2568
9D	Ac-dpsqknalkeaskknkadgapk	1	3	2438
10D	Ac-dpsqknawteaskkwkadgapk	1	3	2556
11D	Ac-dpsqknawkeawkkkadgapk	1	3	2625
12D	Ac-dpsqfnalkeaskkwkadgapk	1	3	2529
13D	Ac-dpsqknalleawkknkadgapk	1	3	2522
14D	Ac-dpsqsnalkeawkkwkadgapk	1	3	2568
15D	Ac-dpsqknalkeawkkvkadgapk	1	3	2522
16D	Ac-dpsqfnawkeaskkwkadgapk	1	3	2602
17D	Ac-dpsqlnaefeaskkwkadgapk	1	3	2530
18D	Ac-dpsqfnatkeaskkwkadgapk	1	3	2517
19D	Ac-dpsqknalfeawkkvkadgapk	1	3	2541
20D	Ac-dpsqfnawkeawkknkadgapk	1	3	2630
21D	Ac-dpsqsnawkeaskkwkadgapk	1	3	2543
		30	100	

La combinación D-Tryp D-Lys preponderó en todas las secuencias de manera notable. La preferencia por esta combinación de residuos en la evaluación de la químioteca, indica la interacción de los péptido todo-D activos podría estar dirigida por una interacción del tipo catión- π ⁵² con los residuos aromáticos de H₁₋₂. En este tipo de interacción, una cadena

lateral catiónica (Lys, Arg, His) esta cerca de una cadena aromática (Phe, Tyr, Trp, His)^{53,54}. Este tipo de interacción de encuentra involucrada en el control de flujo de iones a través de canales, receptores acoplados a proteína G, catálisis enzimática y reconocimiento proteína-ligando⁵⁵⁻⁵⁷. Por otro lado se ha encontrado que este tipo de interacción no se da en las superficies altamente expuestas de péptidos modelo pero si en las interfases de las superficies parcialmente expuestas de proteínas bien plegadas ya sean naturales o de diseño^{58,59}.

Figura 14. Gráficos de frecuencia de los residuos de cada una de las posiciones variables de los péptidos todo-D activos de la químioteca D4096



2.6. Síntesis de los péptidos

El péptido de 39 residuos correspondiente al fragmento H₁₋₂ se sintetizó por medio de un sintetizador automático por medio de la estrategia Fmoc/tBu. Inicialmente se redujo la funcionalización hasta 0.3 mmol/g de resina para disminuir la dificultad de la síntesis debido a interacciones entre las cadenas en crecimiento⁶⁰⁻⁶². Después de la incorporación del último residuo, la peptidil resina se dividió en partes iguales con el fin de obtener tres análogos con diferentes grupos en el residuo N-terminal. De acuerdo con el tipo de experimento, a realizar posteriormente, se sintetizaron tres modificaciones de H₁₋₂: el péptido acetilado, el péptido con biotina y el péptido con la secuencia Cys-Ahx. El péptido acetilado se empleó en los

estudios de dicroísmo circular. El péptido biotinado se usó acompañado con FTIC-estreptavidina en la evaluación y detección de péptidos activos en la químioteca. Por último, el análogo con cisteína N-terminal se utilizó inmovilizado sobre la superficie de un sensor en los estudios de RPS.

Los péptidos H_{3n} y H_{3a} se sintetizaron como control negativo y positivo de la interacción, respectivamente (Tabla 6). Éstos se sintetizaron sobre resina Rink (0.7 mmol/g, escala de trabajo de 0.1 mmol) por química Fmoc/tBu usando el procedimiento habitual.

Tabla 6. Secuencias de los péptidos seleccionados y sintetizados a escala preparativa.

Péptido	Secuencia
H _{3n}	Ac-DPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK-NH ₂
H _{3a}	Ac-AQKQASPDALKKLNPKADNASL-NH ₂
1D	Ac-dpsqlnawkeawkknkadgapk-NH ₂
2D	Ac-dpsqknawkeaaakkkadgapk-NH ₂
3D	Ac-dpsqknawkeasakkkadgapk-NH ₂
4D	Ac-dpsqknalkeawkknkadgapk-NH ₂
5D	Ac-dpsqknalteawkkkkadgapk-NH ₂
6D	Ac-dpsqknawkeawkknkadgapk-NH ₂
H ₁₋₂	Ac-APKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKD-NH ₂

Seis de los péptidos todo-D activos se escogieron para ser sintetizados a escala preparativa (Tabla 6). Dos factores se tuvieron en cuenta para seleccionar las secuencias; en primer lugar, la misma secuencia debía haberse encontrado en más de una unidad de resina; y en segundo lugar que, el grupo total de péptidos debía incluir las diferentes posibilidades de localización de la secuencia D-Trp D-Lys.

La síntesis se realizó por medio de química Fmoc/tBu a partir de 0.1 mmol de resina funcionalizada con el espaciador Rink (funcionalización 0.2 mmoles/g de resina). Los acoplamientos de los aminoácidos se realizaron en el sintetizador automático usando 0.5 mmoles (5 eq. de exceso) preactivados con el sistema TBTU/HOBt/DIEA en DMF (ver 6.2). Para eliminar el grupo Fmoc después de cada acoplamiento se usó 22% de piperidina en DMF y 0.07% de tritón X-100. Al terminar el último acoplamiento, el grupo amino terminal se acetiló con anhídrido acético. El péptido se escindió de la resina por tratamiento con 94% de TFA, con 4% de agua y 2% de TIS como capturadores de carbocationes. El péptido se separó de la resina por filtración y se precipitó adicionando TBME frío. Finalmente, el

precipitado se disolvió en agua para ser posteriormente liofilizado.

En general se obtuvieron rendimientos de síntesis alrededor del 45 % de péptido crudo que al purificar se redujeron hasta un 9 % (Tabla 7). Sin embargo, en todas las síntesis se obtuvieron productos que mostraban cromatogramas donde el pico principal (>80% de área) poseía la masa molecular esperada. La disminución en el rendimiento posiblemente se debió a interacciones inespecíficas de los grupos básicos de estos péptidos con grupos silanoles libres del soporte sólido de la columna de cromatografía al ser purificados⁶³.

Tabla 7. Rendimiento de los péptidos sintetizados con la masa esperada y masa encontrada. Tiempo de retención (t_r) de cada péptido usando un gradiente lineal de 0-100 % de ACN en 15 min con 0.036% de TFA

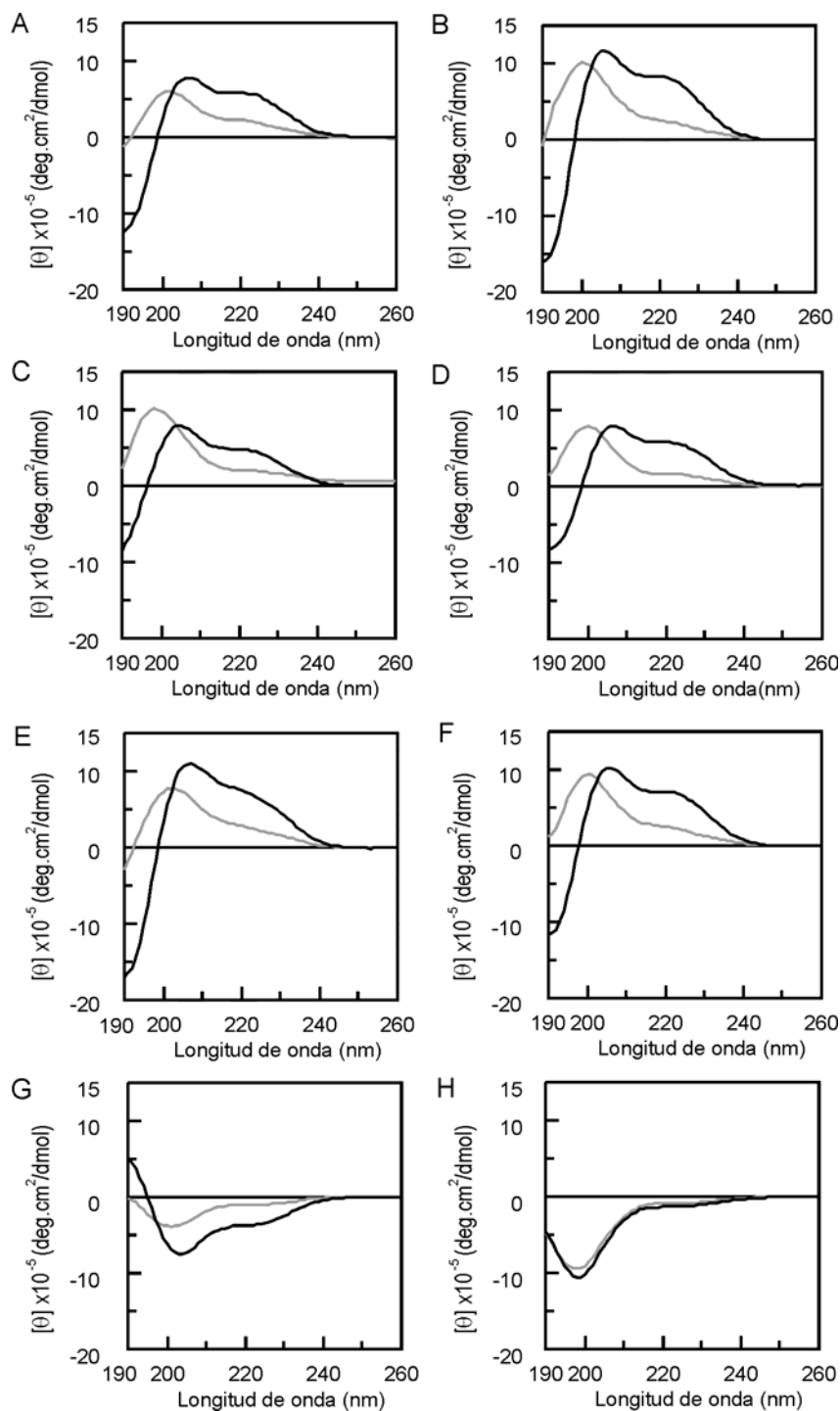
Péptido	%Rendimiento final	t_r (min)	Masa esperada (M+H) ⁺	Masa encontrada (M+H) ⁺
1D	7.7	6.1	2594.3	2594.5
2D	9.2	5.7	2566.4	2566.5
3D	9.2	4.9	2510.3	2510.5
4D	9.5	5.3	2536.4	2536.8
5D	11.6	6.6	2582.9	2581.6
6D	9.5	5.6	2609.4	2609.6
H _{3n}	23	6.2	2350.2	2349.2
H _{3a}	29	5.8	2350.2	2350.4
H ₁₋₂	16	7.0	4642.1	4641.4

2.7. Análisis conformacional por dicroísmo circular

La estructura secundaria de los péptidos se determinó por espectropolarimetría de dicroísmo circular, en tampón acuoso y en presencia de 2,2,2-trifluoroetanol (Figura 15). Las disoluciones de los péptidos en tampón de fosfato salino a pH 7.4 no mostraron una tendencia clara hacia una estructura única. No obstante, la adición de 30 % de TFE generaba la aparición de una banda negativa en 190 nm y dos bandas positivas de 208 y 222 nm, justo el espectro invertido característico de una hélice α dextrógira. Todos los seis

péptidos derivados del análisis de la quimioteca presentaron la misma tendencia conformacional.

Figura 15. Espectros de dicroísmo circular de los péptidos todo-D activos de la quimioteca (A-F) y de los péptidos todo-L, H_{3n} y H_{3a} (G-H). Se emplearon disoluciones 40 µM de péptido en tampón 10 mM de fosfatos, 50 mM de KF, pH 7.4, sin (en gris) y con 30 % de TFE (en negro) a 25°C. 1D (A), 2D (B), 3D (C), 4D (D), 5D (E), 6D (F), H_{3n} (G), H_{3a} (H).



Mezclas equimolares de los péptidos todo-D con H_{1-2} también se analizaron para observar su efecto en el espectro de dicroísmo. El espectro resultante sería la suma de las interacciones con la luz polarizada del péptido todo-D y del todo-L. El hecho que un péptidos todo-D interaccione con la luz circularmente polarizada de forma inversa a la de un péptido todo-L, producen en el espectro la cancelación total o parcial de la señal, esto se observó efectivamente en los espectros obtenidos de las mezclas.

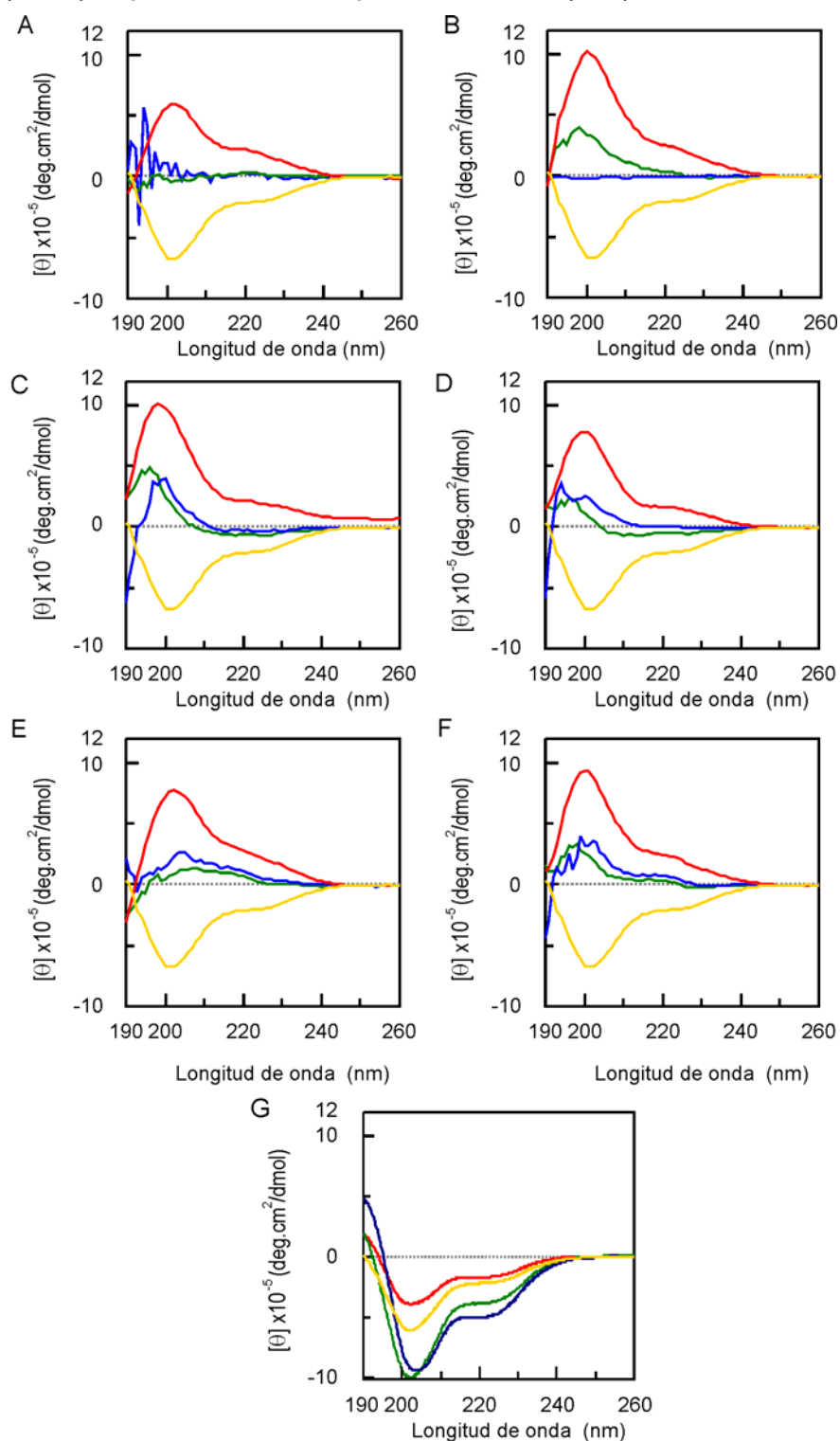
Para observar si la interacción entre los dos péptidos mezclados afectaba el espectro global se calculó el espectro esperado, para la situación en la cual no hay interacción entre los péptidos. Éste se calculó como la suma aritmética de los espectros de las disoluciones individuales de los dos péptidos. En ninguno de los casos los espectros obtenidos experimentalmente se superpusieron exactamente sobre los espectros calculados (Figura 16).

A excepción de las mezcla con el péptido 2D, los espectros obtenidos conservaron el perfil del espectro esperado con un ligero desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una mayor intensidad hacia el lado positivo del espectro. El espectro obtenido de la mezcla con el péptido 2D tenía un perfil lineal sin absorción preferente en el rango de longitudes de onda entre 190 y 260 nm, diferente al espectro calculado, el cual mostraba un máximo positivo cerca de los 200 nm. Por otro lado, en el espectro de la mezcla con el péptido 1D se observó un aumento de ruido a longitudes de onda inferiores a 200 nm que oscilaba entre los lados positivos y negativos del espectro. Estas diferencias entre en los espectros obtenidos y los calculados podrían estar relacionadas con la interacción entre los péptidos todo-D y H_{1-2} , lo que indicaba, aunque a partir de estos datos no se puede extraer información conformacional, que los dos péptidos combinados experimentaron algún tipo cambio estructural al interactuar.

2.8. Estudios de unión entre H_{1-2} y los péptidos todo-D por resonancia de plasmon superficial

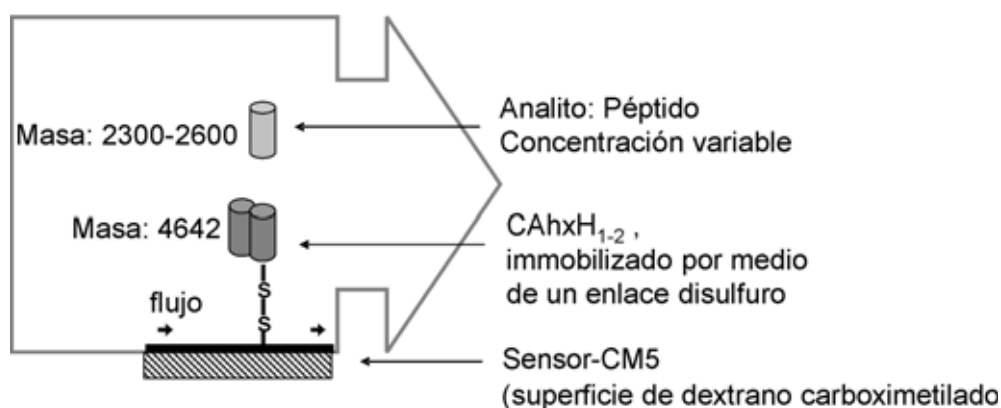
La unión entre los péptidos todo-D y el fragmento H_{1-2} se observó por medio de resonancia de plasmon superficial (RPS). El péptido H_{1-2} se modificó en la región amino terminar por adición de la secuencia cisteína-amino hexanoico, CxH_{1-2} . El residuo de cisteína se introdujo con el fin de inmovilizar quimioselectivamente el ligando a un sensor CM5 a través de un enlace disulfuro^{64,65} y el residuo de Ahx se adicionó como espaciador entre la superficie del sensor y el ligando⁶⁶ (Figura 17).

Figura 16. Espectros de dicroísmo circular de las mezclas equimolares entre los péptidos y el fragmento H₁₋₂. Los espectros se obtuvieron a partir de disoluciones 40 µM de cada uno de los péptidos en tampón 10 mM de fosfatos, 50 mM de KF, pH 7.4 a 25°C. 1D (A), 2D (B), 3D (C), 4D (D), 5D (E), 6D (F), H_{3n} (G). Espectro individual de cada péptido (rojo), espectro de H₁₋₂ (amarillo), espectro calculado correspondiente a la suma aritmética de los espectros individuales (verde), espectro obtenido experimentalmente (azul).



El ligando se inmovilizó sobre la superficie del sensor a través de un enlace disulfuro. A partir de los grupos carboxílicos de la superficie se obtuvieron los ésteres de N-hidroxisuccinimida por tratamiento con NHS/EDC. La superficie del sensor activada se hizo reaccionar con el grupo amino de la 2-(2-piridilditio)etano amina (PDEA), para introducir grupos disulfuro activos. Posteriormente al poner en contacto el péptido con la cisteína N-terminal y la superficie, el enlace disulfuro de la PDEA se intercambi6 para formar un nuevo enlace que une covalentemente el péptido al sensor (Figura 18).

Figura 17. Descripción esquemática del experimento de unión de los péptidos a CxH₁₋₂ inmovilizado sobre un sensor.



En primer lugar, la unión entre CxH₁₋₂ y H_{3n} se analiz6 para ser usada como control positivo de la interacción. Sobre un sensor se prepararon las celdas con CxH₁₋₂ unido con diferentes grados de inmovilización (500 y 906 RU) y la celda de referencia sin péptido unido. Los péptidos se inyectaron en tamp6n HBS-EP pH 7.4 a 25 °C. En todos los casos se observ6 que la respuesta de la superficie inmovilizada era mayor que la obtenida con la superficie de referencia. Sin embargo, el perfil de los sensogramas era rectangular, esto indicaba que las velocidades de asociaci6n y disociaci6n eran muy r6pidas para ser medidas.

Para identificar la uni6n entre el péptido H_{3n} y la superficie con CxH₁₋₂ se hicieron medidas a diferentes concentraciones (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 μM) en las dos superficies simultáneamente. La respuesta relativa de cada concentraci6n se calcul6 a partir de la diferencia entre las respuestas obtenidas de las dos superficies. El aumento de la respuesta relativa al aumentar la concentraci6n de péptido inyectado indicaba la uni6n entre el péptido y CxH₁₋₂. Este comportamiento es particularmente 6til para detectar uni6n, cuando la afinidad entre el ligando de la superficie y el analito es tan baja que se obtienen sensogramas de forma rectangular, como en este caso⁶⁷. En coherencia con esto, en los sensogramas obtenidos al inyectar el péptido H_{3a}, el cual tenía la secuencia de H_{3n} al azar, no se observ6 respuesta al aumentar la concentraci6n de péptido, ya que no hay uni6n entre

estos péptidos (Figura 19). El complejo no covalente formado entre H_{3n} y H₁₋₂, tiene unas cinéticas de asociación y disociación tan altas que dificultó la determinación de la constante de afinidad, a pesar de abarcar un rango amplio de concentraciones (μM- mM) la saturación no pudo ser alcanzada.

Figura 18. Inmovilización de ligandos a un sensor mediante una reacción de intercambio tiol-disulfuro. Sensograma de los ciclos de reacción (A) y secuencia de reacciones (B)

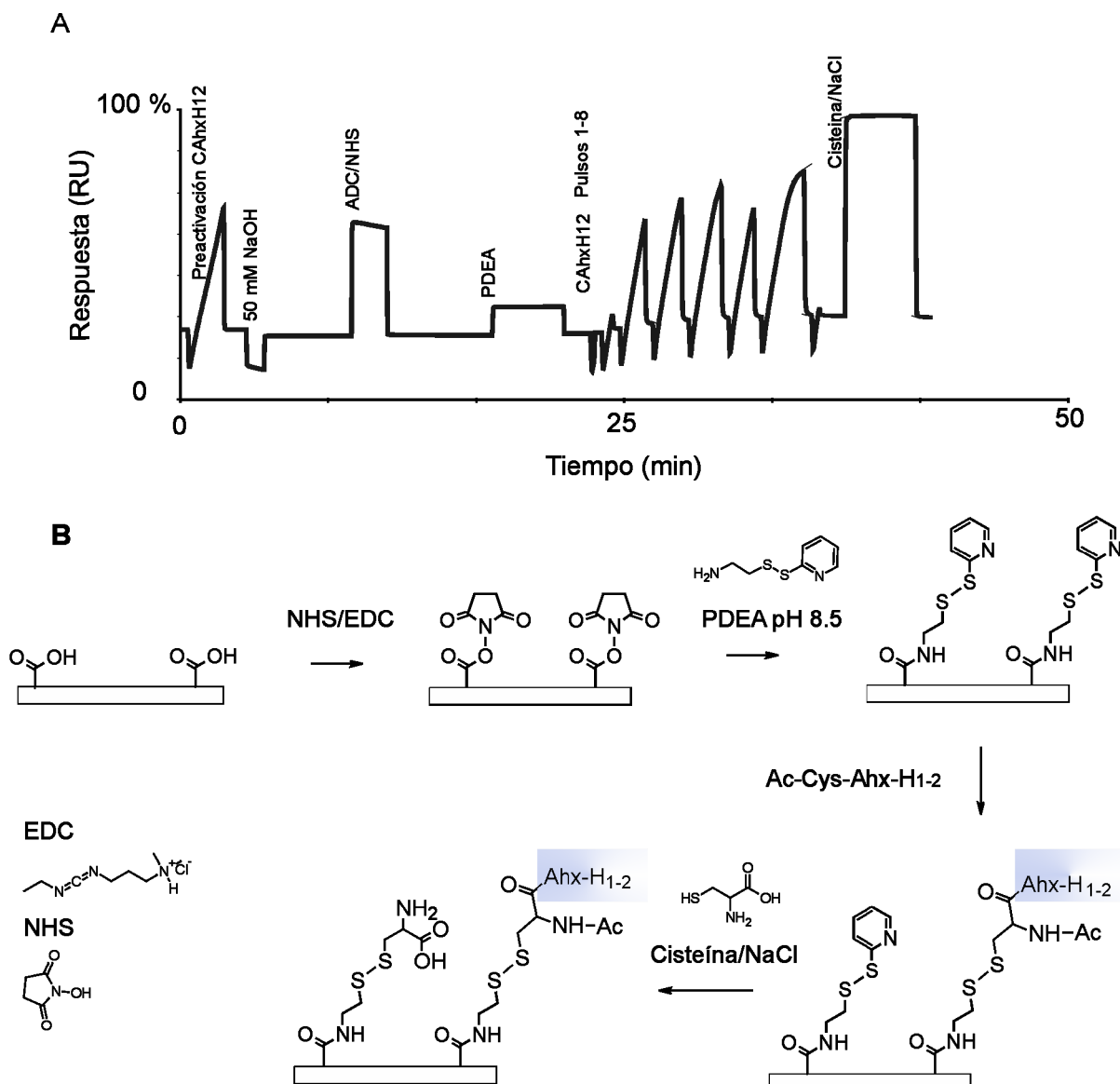
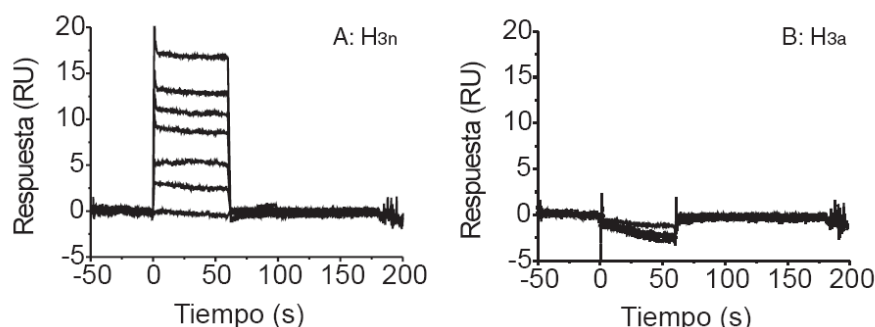
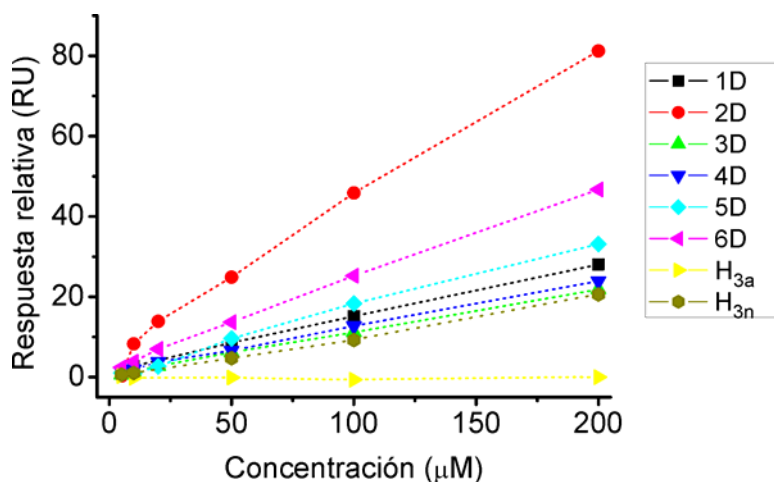


Figura 19. Sensogramas obtenidos al inyectar diferentes concentraciones (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 μM) de H_{3n} (A) y H_{3a} (B) sobre una superficie funcionalizada con 154 RU de CxH_{1-2}



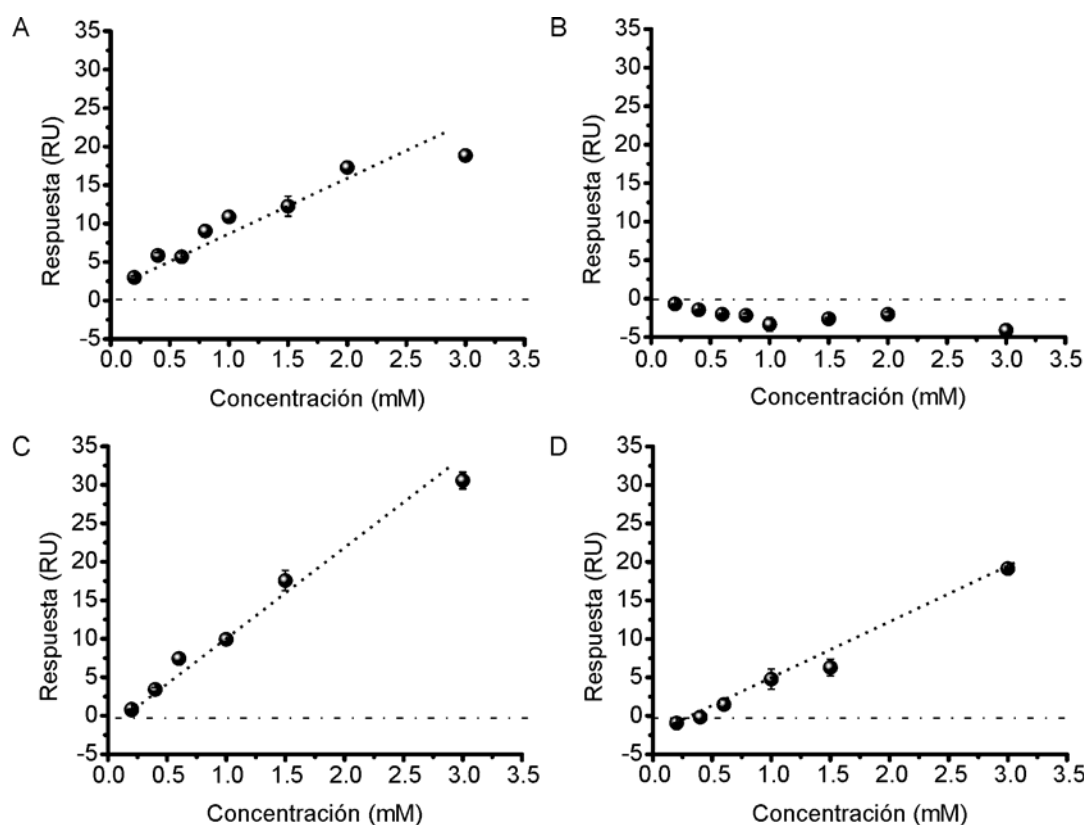
Un comportamiento similar se observó para la unión entre los péptidos todo-D y la superficie con CxH_{1-2} . La unión de los diferentes péptidos se observó a diferentes concentraciones en un rango de 5 μM a 200 μM , en las superficies con altas inmobilizaciones de CxH_{1-2} , (500 y 906 RU). Los péptidos todo-D se unieron a la superficie mostrando sensogramas rectangulares similares a del sistema $\text{H}_{3n}/\text{H}_{1-2}$ y se observó que la respuesta obtenida variaba con el grado de funcionalización de la superficie. Los gráficos de la variación de la respuesta relativa entre dos superficies con diferente grado de inmobilización mostraron que los péptidos se unían a CxH_{1-2} de forma similar a la unión con el péptido natural (Figura 20). A pesar de tener masas moleculares y tamaños similares se observó un incremento en la respuesta relativa obtenida para la unión entre 2D y CxH_{1-2} . Este incremento en la masa de péptido unido a la superficie podría estar asociado a una mayor afinidad con CxH_{1-2} o a la presencia de más de un sitio de unión.

Figura 20. Curvas de unión de los péptidos a CxH_{1-2} . La respuesta relativa se calculó como la diferencia entre las respuestas obtenidas de dos superficies con diferentes grados de inmobilización de H_{1-2} (906 y 500 RU), para eliminar el efecto de interacciones no específicas.



El grado de inmovilización de CxH₁₋₂ se redujo hasta 154 RU para intentar obtener un curva de saturación para la unión entre el sistema natural H_{3n}/ CxH₁₋₂ y la unión entre CxH₁₋₂ con 2D y 6D, con los cuales se había obtenido mayor respuesta en el anterior ensayo de unión. En el sistema natural se observó que había una desviación de la linealidad a concentraciones mayores a 2 mM, pero esta no era suficiente para obtener una curva de saturación que permitiera el cálculo de la constante de disociación. Algo similar se observó para la interacción entre 2D y CxH₁₋₂, igualmente, la saturación no se alcanzó incluso a 3 mM (Figura 21).

Figura 21. Curvas de unión de H_{3n} (A), H_{3a} (B), 2D (C) y 6D (D) obtenidas al inyectar los péptidos en un sensor con CxH₁₋₂ inmovilizado (154 RU).



Estos resultados confirmaron que la afinidad entre H₁₋₂ y los péptidos todo-D estudiados, incluso en el sistema nativo, es baja con una constante de disociación en el rango mM o mayor. A pesar de la baja afinidad entre los péptidos, esta interacción es suficiente para causar los cambios conformacionales observados en los experimentos de dicroísmo circular en el sistema H₁₋₂/ H_{3n}⁶⁸. En el caso de la interacción con los péptidos todo-D el incremento en la respuesta obtenida en el sistema péptido todo-D/H₁₋₂ también se encuentra relacionado con un cambio en el espectro de dicroísmo circular que indica un cambio global en la

estructura del complejo, en especial para el sistema 2D/H₁₋₂.

2.9. Conclusiones

Una químioteca de 4096 péptidos todo-D se ha diseñado y sintetizado usando la estrategia OBOC para obtener un péptido por cada unidad de resina. La secuencia de la hélice C-terminal el dominio B de *Staphylococcus aureus* se tomó como estructura base en el diseño de la químioteca, modificándola de forma que al cambiar la quiralidad de todos los residuos se conservaran, en la medida de lo posible, la distribución topológica de las cadenas laterales.

La síntesis de la químioteca de péptidos de 22 residuos con 6 posiciones variables se realizó en fase sólida usando la metodología de división y mezcla de la resina. Para verificar la integridad de la químioteca se ha desarrollado una metodología que permite la secuenciación de Edman de péptidos acetilados, por hidrólisis selectiva del residuo N-terminal. La hidrólisis del enlace entre los residuos terminales Asp-Pro permitió la identificación de la secuencia por degradación de Edman, como método alternativo a la secuenciación por espectrometría de masas en tándem.

La evaluación de la químioteca dio lugar a la detección de 30 unidades de resina con 21 péptidos todo-D que forman complejos heteroquirales con el fragmento H₁₋₂. Las secuencias de estos péptidos poseen en común el motivo D-Trp D-Lys, lo que parece indicar que la formación del complejo podría estar modulada por una interacción catión- π con los residuos aromáticos de H₁₋₂.

Seis de estos péptidos sintetizados a escala preparativa mostraron una tendencia conformacional a estructurarse como hélice α cuando se encontraban disueltos en tampón acuoso en presencia de 2,2,2-trifluoroetanol. En general, las mezclas equimolares con H₁₋₂ presentaron una ligera alteración del espectro de dicroísmo circular, comparado con el obtenido de la suma aritmética de los espectros de los péptidos individuales. Por otro lado, la unión de los péptidos todo-D a H₁₋₂ es similar a la observada para el sistema natural de acuerdo a lo observado por resonancia de plasmon superficial. De los péptidos estudiados, el péptido 2D presentó propiedades de unión con H₁₋₂ y cambios en el espectro de dicroísmo circular de la mezcla con H₁₋₂ que son prometedores y que requerirán en el futuro una mayor caracterización estructural.

Bibliografía

- (1) van Heijenoort, J. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **2001**, *11*, 25R-36R.
- (2) Fujii, N.; Saito, T. Homochirality and life. *Chem. Rec.* **2004**, *4*, 267-278.
- (3) Yoshimura, T.; Esaki, N. Amino Acid Racemases: Functions and Mechanisms. *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, *96*, 103-109.
- (4) Milton, R. C.; Milton, S. C.; Kent, S. B. Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show reciprocal chiral substrate specificity. *Science* **1992**, *256*, 1445-1448.
- (5) González, M. J. Uso de aminoácidos D en la síntesis de péptidos y proteínas. In *Departamento de Química Orgánica*; Universidad de Barcelona: Barcelona, 1999; pp 170.
- (6) Wadai, H.; Yamaguchi, K.; Takahashi, S.; Kanno, T.; Kawai, T. et al. Stereospecific amyloid-like fibril formation by a peptide fragment of β 2-microglobulin. *Biochemistry* **2005**, *44*, 157-164.
- (7) Wade, D.; Boman, A.; Wahlin, B.; Drain, C.; Andreu, D. et al. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1990**, *87*, 4761-4765.
- (8) Bland, J. M.; De Lucca, A. J.; Jacks, T. J.; Vigo, C. B. All-D-cecropin B: synthesis, conformation, lipopolysaccharide binding, and antibacterial activity. *Mol. Cell. Biochem.* **2001**, *218*, 105-111.
- (9) Xie, C.; Prahl, A.; Ericksen, B.; Wu, Z.; Zeng, P. et al. Reconstruction of the conserved beta-bulge in mammalian defensins using D-amino acids. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32921-32929.
- (10) Merrifield, R. B.; Juvvadi, P.; Andreu, D.; Ubach, J.; Boman, A. et al. Retro and retroenantio analogs of cecropin-melittin hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1995**, *92*, 3449-3453.
- (11) Gerber, D.; Quintana, F. J.; Bloch, I.; Cohen, I. R.; Shai, Y. D-enantiomer peptide of the TCR α transmembrane domain inhibits T-cell activation in vitro and in vivo. *Faseb J.* **2005**, *19*, 1190-1192.
- (12) Sia, S. K.; Kim, P. S. A designed protein with packing between left-handed and right-handed helices. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8981-8989.
- (13) Zheng, D.; Aramini, J. M.; Montelione, G. T. Validation of helical tilt angles in the solution NMR structure of the Z domain of Staphylococcal protein A by combined analysis of residual dipolar coupling and NOE data. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 549-554.
- (14) Fuhrhop, J.-H.; Krull, M.; Büldt, G. Precipitates with β -pleated sheet structure by mixing aqueous solutions of helical poly(D-lysine) and Poly(L-lysine). *Angew. Chem. Int. Ed.* **1987**, *26*, 699-700.
- (15) Dzwolak, W.; Ravindra, R.; Nicolini, C.; Jansen, R.; Winter, R. The diastereomeric assembly of polylysine is the low-volume pathway for preferential formation of beta-sheet aggregates. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3762-3768.
- (16) Peterson, P. K.; Verhoef, J.; Sabath, L. D.; Quie, P. G. Effect of protein A on staphylococcal opsonization. *Infect. Immun.* **1977**, *15*, 760-764.
- (17) Rennermalm, A.; Li, Y. H.; Bohaufs, L.; Jarstrand, C.; Brauner, A. et al. Antibodies against a truncated Staphylococcus aureus fibronectin-binding protein protect against dissemination of infection in the rat. *Vaccine* **2001**, *19*, 3376-3383.
- (18) Hober, S.; Nord, K.; Linhult, M. Protein A chromatography for antibody purification. *Journal of Chromatography B* **2007**, *848*, 40-47.
- (19) Wernerus, H.; Lehtio, J.; Samuelson, P.; Stahl, S. Engineering of staphylococcal surfaces for biotechnological applications. *J. Biotechnol.* **2002**, *96*, 67-78.
- (20) Visuals unlimited, <http://www.visualsunlimited.com/>.

- (21) Abrahmsen, L.; Moks, T.; Nilsson, B.; Hellman, U.; Uhlen, M. Analysis of signals for secretion in the staphylococcal protein A gene. *Embo. J.* **1985**, *4*, 3901-3906.
- (22) Sjobahl, J. Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*. Arrangement of five regions within the protein, four being highly homologous and Fc-binding. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *73*, 343-351.
- (23) Guss, B.; Uhlen, M.; Nilsson, B.; Lindberg, M.; Sjoquist, J. et al. Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 413-420.
- (24) Jendeborg, L.; Nilsson, P.; Larsson, A.; Denker, P.; Uhlen, M. et al. Engineering of Fc(1) and Fc(3) from human immunoglobulin G to analyse subclass specificity for staphylococcal protein A. *J. Immunol. Methods* **1997**, *201*, 25-34.
- (25) Richman, D. D.; Cleveland, P. H.; Oxman, M. N.; Johnson, K. M. The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species. *J. Immunol.* **1982**, *128*, 2300-2305.
- (26) Gouda, H.; Torigoe, H.; Saito, A.; Sato, M.; Arata, Y. et al. Three-dimensional solution structure of the B domain of staphylococcal protein A: Comparison of the solution and crystal structures. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9665-9672.
- (27) Starovasnik, M. A.; Skelton, N. J.; O'Connell, M. P.; Kelley, R. F.; Reilly, D. et al. Solution structure of the E-domain of staphylococcal protein A. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15558-15569.
- (28) Sanchez, Y. M. Sobre la validesa del concepto retro-enatio en pèptids helicodals. In *Departamento de Química Orgánica*; Universidad de Barcelona: Barcelona, 1996; pp 168.
- (29) Pastor, J. J. Una nueva estrategia de química combinatoria para el diseño y modificación de dominios proteicos. In *Departamento de Química Orgánica*; Universidad de Barcelona: Barcelona, 2004; pp 230.
- (30) Furka, A.; Sebestyen, F.; Asgedom, M.; Dibo, G. General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487-493.
- (31) Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E.; Appel, J. R.; Dooley, C. T. et al. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature* **1991**, *354*.
- (32) Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmiersk, W. M. et al. A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* **1991**, *354*, 82 - 84.
- (33) Furka, Á. Combinatorial chemistry: Principles and techniques; <http://www.chem.elte.hu/departments/szerves/szerves/Furka/>; Árpád Furka in electronic form: Budapest, 2007.
- (34) Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchnak, V. The "One-Bead-One-Compound" Combinatorial Library Method. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411-448.
- (35) Houghten, R. A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1985**, *82*, 5131-5135.
- (36) Haack, T.; González, M. J.; Sánchez, Y.; Giralt, E. D-Amino acids in protein de novo design. II. Protein-diastereomerism versus protein-enantiomerism. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **1997**, *4*, 377-386.
- (37) Blondelle, S. E.; Houghten, R. A.; Pérez-Payá, E. All D-amino acid hexapeptide inhibitors of melittin's cytolytic activity derived from synthetic combinatorial libraries. *J. Mol. Recognit.* **1996**, *9*, 163-168.
- (38) Dooley, C. T.; Chung, N. N.; Wilkes, B. C.; Schiller, P. W.; Bidlack, J. M. et al. An all D-amino acid opioid peptide with central analgesic activity from a combinatorial library. *Science* **1994**, *266*, 2019 - 2022.
- (39) Meldal, M.; Svendsen, I.; Juliano, L.; Juliano, M. A.; Del Nery, E. et al. Inhibition of cruzipain visualized in a fluorescence quenched solid-phase inhibitor library assay. D-Amino Acid Inhibitors for cruzipain, cathepsin B and cathepsin L. *Journal of Peptide*

- Science* **1998**, *4*, 83-91.
- (40) Pennington, M. E.; Lam, K. S.; Cress, A. E. The use of a combinatorial library method to isolate human tumor cell adhesion peptides. *Mol. Diversity* **1996**, *2*, 19- 28.
- (41) Aina, O. H.; Liu, R.; Sutcliffe, J. L.; Marik, J.; Pan, C. X. et al. From combinatorial chemistry to cancer-targeting peptides. *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 631-651.
- (42) Richardson, J.; Richardson, D. Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices. *Science* **1988**, 1648-1652.
- (43) Meldal, M. PEGA: a flow stable polyethylene glycol dimethyl acrylamide copolymer for solid phase synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077-3080.
- (44) 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 chemistry. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3831-3833.
- (45) 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.
- (46) Tam, J. P.; Heath, W. F.; Merrifield, R. B. Mechanisms for the removal of benzyl protecting groups in synthetic peptides by trifluoromethanesulfonic acid-trifluoroacetic acid-dimethyl sulfide. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5242-5251.
- (47) Tam, J. P.; Heath, W. F.; Merrifield, R. B. SN2 deprotection of synthetic peptides with a low concentration of HF in dimethyl sulfide: evidence and application in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6442-6455.
- (48) Landon, M. Cleavage at aspartyl-prolyl bonds. *Methods Enzymol.* **1977**, *47*, 145-149.
- (49) Inglis, A. S. Cleavage at aspartic acid. *Methods Enzymol.* **1983**, *91*, 324-332.
- (50) Holmgren, A. Reversible chemical modification of the tryptophan residues of thioredoxin from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **1972**, *26*, 528-534.
- (51) Teixido, J.; Michelotti, E. L.; Tice, C. M. Ruminations Regarding the Design of Small Mixtures for Biological Testing. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 658-674.
- (52) Ma, J. C.; Dougherty, D. A. The cation- π interaction. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303-1324.
- (53) Gallivan, J. P.; Dougherty, D. A. Cation- π interactions in structural biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, *96*, 9459-9464.
- (54) Orner, B. P.; Salvatella, X.; Sánchez Quesada, J.; de Mendoza, J.; Giralt, E. et al. De novo protein surface design: Use of cation- π interactions to enhance binding between an α -helical peptide and a cationic molecule in 50% aqueous solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 117-119.
- (55) Liu, R.; Pidikiti, R.; Ha, C.-E.; Petersen, C. E.; Bhagavan, N. V. et al. The role of electrostatic interactions in human serum albumin binding and stabilization by halothane. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36373-36379.
- (56) Zhou, Z.; Zhen, J.; Karpowich, N. K.; Goetz, R. M.; Law, C. J. et al. LeuT-desipramine structure reveals how antidepressants block neurotransmitter reuptake. *Science* **2007**, *317*, 1390-1393.
- (57) Santarelli, V. P.; Eastwood, A. L.; Dougherty, D. A.; Horn, R.; Ahern, C. A. A cation- π interaction discriminates among sodium channels that are either sensitive or resistant to tetrodotoxin block. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 8044-8051.
- (58) Dai, Q.-H.; Tommos, C.; Fuentes, E. J.; Blomberg, M. R. A.; Dutton, P. L. et al. Structure of a de novo designed protein model of radical enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10952-10953.
- (59) Berry, B. W.; Elvekrog, M. M.; Tommos, C. Environmental modulation of protein cation- π interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5308-5309.
- (60) McNamara, J. F.; Lombardo, H.; Pillai, S. K.; Jensen, I.; Albericio, F. et al. An efficient solid-phase strategy for the construction of chemokines. *J. Peptide Sci.* **2000**, *6*, 512-518.
- (61) Sanclimens, G.; Crespo, L.; Pons, M.; Giralt, E.; Albericio, F. et al. Saturated resins or stress of the resin. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1751-1754.

- (62) Valente, A. P.; Almeida, F. C. L.; Nakaie, C. R.; Schreier, S.; Crusca, E. et al. Study of the effect of the peptide loading and solvent system in SPPS by HRMAS-NMR. *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 556-563.
- (63) Mant, C. T.; Hodges, R. S. Monitoring free silanols on reversed-phase supports with peptide standards. *Chromatographia* **1987**, *24*, 805- 814.
- (64) Sheppard, R. The fluorenylmethoxycarbonyl group in solid phase synthesis. *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 545–552.
- (65) 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.
- (66) Renberg, B.; Shiroyama, I.; Engfeldt, T.; Nygren, P.-Å.; Karlström, A. E. Affibody protein capture microarrays: Synthesis and evaluation of random and directed immobilization of affibody molecules. *Anal. Biochem.* **2005**, *341*.
- (67) Karlsson, R.; Ståhlberg, R. Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities. *Anal. Biochem.* **1995**, *228*, 274-280.
- (68) Pastor, J. J.; Granados, G.; Carulla, N.; Rabanal, F.; Giralt, E. Redesign of protein domains using one-bead-one-compound combinatorial chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, en impresión.

