

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS EN BIOTECNOLOGÍA



# SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

**Presenta:**

Erandi Lira Navarrete

**Coordinador del curso:**

Dr. Roberto P. Stock Silberman

Cuernavaca, Morelos. Junio de 2007.

---

## ÍNDICE

### CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	1
CONCEPTOS GENERALES	2
Aminoácidos.	2
Enlace peptídico.	4
Racemización.	4

### CAPÍTULO II

GRUPOS PROTECTORES	5
Grupos protectores del $\alpha$ -amino.	5
Grupos protectores del $\alpha$ -carboxilo.	10
Protección de las cadenas laterales.	12

### CAPÍTULO III

FORMACIÓN DEL ENLACE PEPTÍDICO	16
Activación y acoplamiento.	16
Racemización.	20

### CAPÍTULO IV

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN SOLUCIÓN	23
Ejemplos de péptidos sintetizados en solución.	24

### CAPÍTULO V

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA	27
La técnica de Merrifield.	27
La técnica de Sheppard.	29
El soporte sólido.	31
Agentes espaciadores del péptido y la resina.	33
Instrumentación.	36

### CAPÍTULO VI

CASOS ESPECIALES DE SÍNTESIS	38
Síntesis de péptidos cíclicos.	38
Síntesis de glicopéptidos.	42
Síntesis de péptidos fosforilados.	43
Bibliotecas de péptidos sintéticos.	44

### CAPÍTULO VII

PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS	48
Cromatografía de alta resolución (HPLC).	48

**CAPÍTULO VII**

HERRAMIENTAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS	50
Análisis de aminoácidos.	50
Degradación de Edman.	51
Electroforesis capilar.	52
Espectrometría de masas.	52
BIBLIOGRAFÍA	54

**Índice de tablas**

Tabla 1. Estructura de los 20 aminoácidos encontrados en las proteínas.	3
Tabla 2. Aminoácidos 1-5	25
Tabla 3. Aminoácidos 6-13	25
Tabla 4. Aminoácidos 14-17	26

**Índice de figuras**

Figura 1. Uretano o carbamato.	6
Figura 2. Protección de un aminoácido por cloruro de carbobenzóxilo.	6
Figura 3. Desprotección de un Z-aminoácido con HBr en ácido acético frío.	6
Figura 4. Desprotección de un Z-aminoácido por hidrogenación catalítica.	7
Figura 5. Los Boc-aminoácidos se obtienen a partir del anhídrido terbutílico	7
Figura 6. Desprotección de un Boc-aminoácido con TFA.	8
Figura 7. Grupo protector Bpoc.	8
Figura 8. Grupo protector Fmoc.	8
Figura 9. Desprotección de un Fmoc-aminoácido con piperidina.	9
Figura 10. Obtención de un Trt-aminoácido.	9
Figura 11. Desprotección de un Trt-aminoácido con ácido acético.	10
Figura 12. Preparación de un t-butil éster a partir de un Z-aminoácido.	11
Figura 13. Protección selectiva del $\alpha$ -amino mediante el bloqueo del $\epsilon$ -amino con benzaldheído.	13
Figura 14. Protección selectiva del $\epsilon$ -amino mediante la formación de un quelato.	13
Figura 15. Protección selectiva de los grupos carboxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos ácidos.	14
Figura 16. Ejemplos de grupos protectores usados para la cadena lateral del aminoácido	14

---

cisteína.	
Figura 17. La racemización no se evitará si el grupo protector está en el N <sup>o</sup> .	15
Figura 18. Generación del enlace peptídico por aminólisis.	16
Figura 19. Formación del enlace peptídico por acil azidas.	17
Figura 20. Aminólisis de anhídridos mixtos.	17
Figura 21. Anhídrido derivado del ácido piváltico.	18
Figura 22. Formación del enlace peptídico por un anhídrido carboxílico-carbónico intermediario.	18
Figura 23. Generación del enlace peptídico po un anhídrido intermediario formado a partir de un aminoácido con ácido difenilfosfinico.	19
Figura 24. Formación de O-acilurea.	19
Figura 25. Formación del enlace peptídico usando BOP como reactivo activador.	20
Figura 26. Racemización por enolización directa.	21
Figura 27. Racemización por formación de una oxazolona.	22
Figura 28. Estrategias para la síntesis de un péptido.	24
Figura 29. Esquema de la SPPS, empleando la técnica de Merrifield.	28
Figura 30. Esquema de la SPPS, empleando la técnica de Sheppard.	30
Figura 31. Esquema del uso del espaciador en SPPS.	33
Figura 32. Ácido 4-hidroximetilbenzoico.	34
Figura 33. Ácido metoxi-4-hidroximetilbenzoico.	34
Figura 34. Ácido 1,3 dimetoxi-4-hidroximetilbenzoico.	35
Figura 35. Bencihidrilamina.	35
Figura 36. Esquema de un sistema manual de flujo discontinuo para SPPS.	36
Figura 37. Equipos automáticos para SPPS.	37
Figura 38. Opciones para la formación de péptidos cíclicos por enlace amida.	39
Figura 39. Formación del puente disulfuro correcto mediante la protección de las cisteínas no participantes, con grupos protectores distintos a los usados para las cisteínas participantes.	42
Figura 40. Síntesis de bibliotecas peptídicas en multipines.	44
Figura 41. Esquema general de la síntesis de bibliotecas peptídicas por la técnica de las bolsas de té.	45
Figura 42. Síntesis de una biblioteca de péptidos sobre una membrana de celulosa.	46

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN.

La palabra proteína proviene del vocablo griego *proteion*, que significa primero. Este nombre fue dado a tales macromoléculas para enfatizar el rango de importancia que tienen en un sistema viviente. Si bien es difícil decidir cuál de las biomoléculas es la de mayor importancia, es innegable que las proteínas son los materiales que desempeñan el mayor número de funciones en las células de todos los seres vivos, las cuales van desde formar parte de la organización estructural básica de la célula, hasta funciones metabólicas y reguladoras. Toda esta variedad de actividades bioquímicas son las que definirán la identidad de un ser vivo. En consecuencia, han sido el foco de atención de los científicos a través del tiempo. En el afán de comprenderlas mejor, se ha intentado sintetizarlas en el laboratorio llegando a desarrollar la técnica de síntesis de péptidos, que aunque menos complejos que las proteínas, han brindado información importante al poseer características de las proteínas naturales (por constituirse de la misma manera). Además, los péptidos por sí mismos tienen roles significativos en la biología como hormonas, factores de crecimiento, antibióticos, toxinas y neuropéptidos. Entre las aplicaciones de la síntesis de péptidos se encuentran la de desarrollar péptidos de importancia médica como lo son hormonas y vacunas, también pueden sintetizarse péptidos para producir anticuerpos contra porciones específicas de proteínas o para modificar algunos péptidos naturales con el fin de hacerlos más estables, entre otras.

## ANTECEDENTES.

La historia de la síntesis de péptidos comienza con Emil Fisher, quien al establecer la química de las proteínas obtuvo la síntesis del dipéptido glicil-glicina en 1901, comprobando de esta manera su hipótesis de que los aminoácidos estaban unidos entre sí mediante el enlace peptídico. A partir de ahí continuó sintetizando tripéptidos, tetrapéptidos, etc., hasta finalmente alcanzar la síntesis un polipéptido de 18 residuos aminoácidos. Después de esto, la evolución de la técnica fue lenta, los primeros polipéptidos sintetizados fueron homopolímeros ya que se presentaba un problema al momento de combinar aminoácidos: debía protegerse el grupo amino de un tipo para evitar que se uniera con un aminoácido de su misma especie e impedir contaminaciones de péptidos distintos. Encontrar un compuesto químico capaz de bloquear el grupo amino, pero que además fuera removido fácilmente después de la formación del enlace peptídico deseado, no fue logrado hasta 1932 por Max Bergmann y Leonidas Zervas, el grupo

carbобенzoilo. A partir de esto los grupos protectores fueron perfeccionándose y en 1953 Vincent du Vigneaud fue capaz de sintetizar el primer polipéptido funcional, la hormona oxitocina, lo que le llevó a ganar el premio Nobel de química en 1955. Sin embargo, aislar y purificar un nuevo péptido significaba invertir muchísimo tiempo para obtener una cantidad ínfima de producto, por lo que Bruce Merrifield pensó que el método podía mejorarse. En 1963 dio a conocer la síntesis del tetrapéptido leucilalanilglicilalanina y en 1969 Merrifield anunció la síntesis de la enzima ribonucleasa pancreática bovina A de 124 residuos en 6 semanas, mediante la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, de sus siglas en inglés), técnica por la que recibió el premio Nobel de química en 1984.

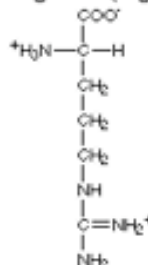
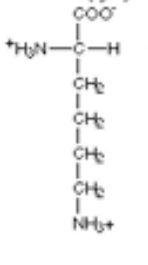
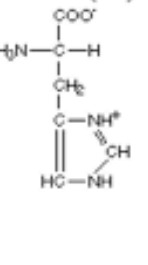

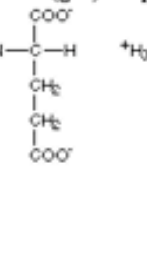
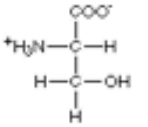
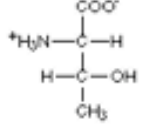
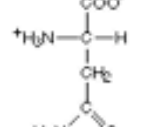
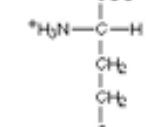
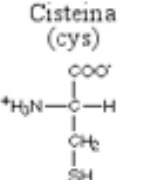
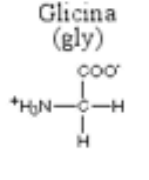
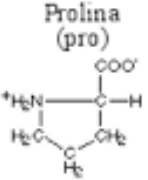
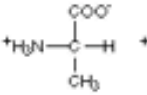
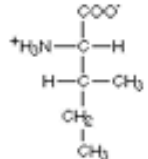
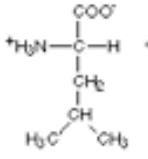
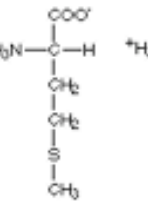
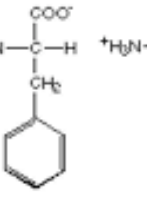
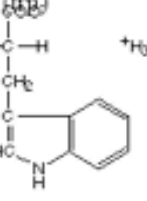
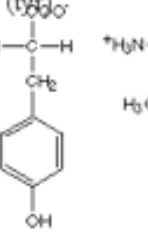
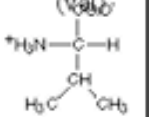
## CONCEPTOS GENERALES.

### **Aminoácidos.**

Químicamente las proteínas son polímeros de elevado peso molecular compuestos por unidades monoméricas llamadas aminoácidos, los cuales se unen entre sí mediante un enlace amídico, mejor conocido como enlace peptídico. Los aminoácidos son sólidos cristalinos no volátiles que se funden con descomposición a temperaturas relativamente elevadas, son insolubles en disolventes no polares, pero apreciablemente solubles en agua. Existen 20 clases diferentes de aminoácidos que forman a las proteínas, todos ellos coinciden estructuralmente en que llevan unido un grupo carboxílico (-COOH) y un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) al mismo átomo de carbono tetraédrico denominado carbono  $\alpha$ , al cual también está unido un átomo de hidrógeno y una cadena lateral (R), Es precisamente esta cadena lateral la que los identifica y le confiere propiedades químicas diferentes a cada aminoácido.

Las estructuras presentadas en la tabla 1, muestran que todos los aminoácidos contienen al menos un centro quiral (con excepción de glicina), debido a esto podemos encontrar dos estereoisómeros de cada aminoácido, específicamente enantiómeros, es decir, imágenes especulares que no pueden superponerse una a la otra las cuales tienen propiedades físicas idénticas exceptuando la dirección en que desvían el plano de la luz polarizada. Si la rotación del plano es a la derecha se les denomina dextrógiros (D) y si es a la izquierda levógiros (L). Los L-aminoácidos son los que forman a la gran mayoría de las proteínas. Ésta característica de los aminoácidos es importante recordarla para la síntesis de péptidos.

Tabla 1. Estructura de los 20 aminoácidos encontrados en las proteínas.

Aminoácidos con cadenas cargadas eléctricamente							
Positivo				Negativo			
Arginina (arg)	Lisina (lys)	Histidina (his)	Glutámico (glu)	Aspartico (asp)			
							
Aminoácidos con cadenas polares no cargadas							
Serina (ser)	Treonina (thr)	Asparagina (asn)	Glutamina (gln)				
							
Casos Especiales							
Cisteína (cys)	Glicina (gly)	Prolina (pro)					
							
Aminoácidos con cadenas hidrofóbicas							
Alanina (ala)	Isoleucina (ile)	Leucina (leu)	Metionina (met)	Fenilalanina (phe)	Triptófano (trp)	Tirosina (tyr)	Valina (val)
							

**Enlace Peptídico.**

La unión entre dos aminoácidos se lleva a cabo por la reacción que se presenta entre el grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de otro formando una amida mediante la pérdida de una molécula de agua. Esta unión covalente es a lo que se denomina enlace peptídico, el cual tiene una geometría planar y características de doble enlace, debido a la resonancia existente.

**Racemización.**

El término racemización se refiere a la conversión de un enantiómero en su imagen especular, y una mezcla de partes iguales de enantiómeros se denomina modificación racémica, la cual es ópticamente inactiva, ya que cuando se hace incidir un haz de luz polarizada sobre la mezcla la rotación generada por un enantiómero es cancelada por la misma rotación que produce en sentido opuesto el otro. Una mezcla racémica no puede ser separada por métodos ordinarios, por lo que se tiene que recurrir al uso de reactivos ópticamente activos, en donde se observan propiedades físicas diferentes para cada enantiómero.

---

## CAPÍTULO II

### GRUPOS PROTECTORES.

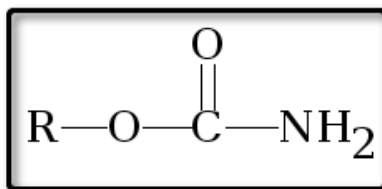
Uno de los principales pasos para la síntesis de péptidos es la protección de los grupos funcionales de los aminoácidos, éstos deben protegerse para evitar la formación de un enlace peptídico no deseado, es decir, impedir que el grupo carboxilo de un aminoácido reaccione con el grupo amino de uno de sus análogos. Así mismo, al proteger las cadenas laterales de los aminoácidos también se está evitando que estos reaccionen con los grupos amino o carboxilo de otros aminoácidos, o que den lugar a reacciones secundarias. Los grupos protectores también protegen el carbono alfa de ser susceptible a racemización.

Entre las características que debe tener un grupo protector se encuentran, la de ser químicamente estable en las condiciones en las que se da la síntesis peptídica, y la de ser fácilmente removibles en condiciones suaves que no alteren la formación del enlace peptídico al final o en fases intermediarias de la síntesis. En este sentido, se pueden clasificar a los grupos protectores como permanentes, los cuales son retenidos hasta que el péptido ha sido completado, o temporales, los cuales se eliminan al final de cada etapa de síntesis.

#### **Grupos protectores del $\alpha$ -amino.**

El objetivo fundamental que se debe cubrir al proteger al grupo amino es el de suprimir su reactividad nucleofílica, para tal efecto existen una gran variedad de grupos protectores, el problema es encontrar uno que pueda ser removido fácilmente sin afectar la integridad del enlace peptídico formado o sin que el carbono  $\alpha$  corra riesgo de racemización.

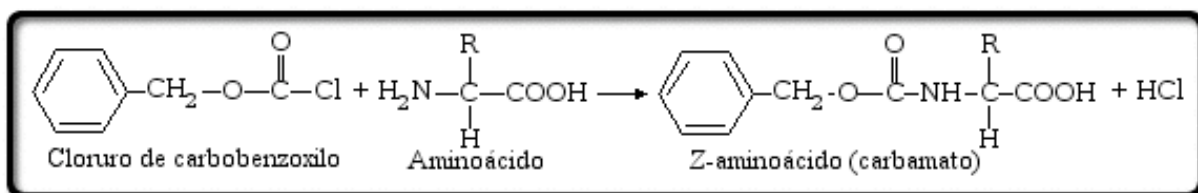
Los primeros grupos protectores presentaban estos problemas, ya que se fundamentaban en la formación de una amida al unirse al grupo amino. El gran avance se dio cuando Bergman y Zervas observaron que los derivados de uretano (figura 1) eran particularmente adecuados para la protección del  $\alpha$ -amino. Un factor importante que los ha favorecido para ser ampliamente utilizados es su alto grado de estabilidad óptica, es decir, inhiben la racemización de los centros quirales adyacentes a estos grupos protectores.



**Figura 1. Uretano o carbamato:** En la fórmula puede observarse que estos compuestos son tanto amidas ( $\text{CO-NH}_2$ ) como ésteres ( $\text{R-COO-R'}$ )

Entre los grupos derivados de uretano más usados se encuentran los siguientes:

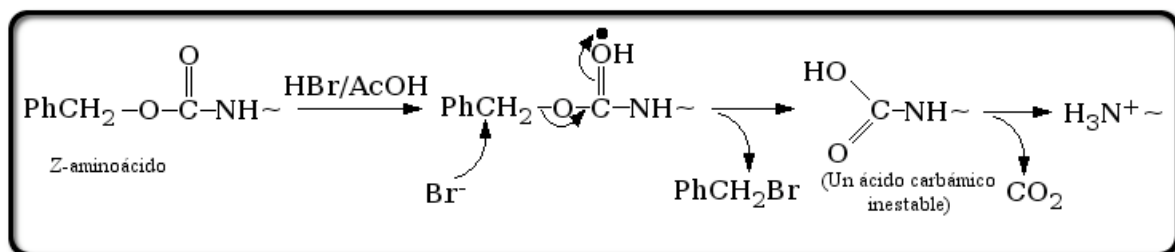
➔ **Benciloxicarbonil.** También asignado con la abreviación Z, este método de protección es el desarrollado por Bergmann y Zervas. Se basa en la acilación de una amina con cloruro de Carbobenzoxilo para dar una amida (figura 2).



**Figura 2.** Protección de un aminoácido por cloruro de carbobenzoxilo.

Estas amidas, a diferencia de las amidas comunes, pueden degradarse por métodos que dejan intacto el enlace peptídico. El rompimiento puede darse por hidrogenación catalítica o por hidrólisis con HBr en ácido acético frío.

La reacción que por que se lleva a cabo el rompimiento con HBr/AcOH se muestra en la figura 3.



**Figura 3.** Desprotección de un Z-aminoácido con HBr en ácido acético frío

Este procedimiento es muy conveniente realizarlo, ya que la mayoría de los péptidos protegidos son solubles en ácido acético, especialmente cuando hay una alta concentración de HBr, además, el producto desprotegido puede ser precipitado como una sal de

hidrobromuro cuando se le agrega éter. Por otra parte, la integridad de algunos péptidos sintetizados puede verse dañada, especialmente si entre los aminoácidos que conforman al producto se encuentran algunos con cadenas laterales susceptibles, como es el caso de triptófano, tirosina y metionina.

La hidrogenación catalítica (figura 4), usualmente es llevada a cabo con 80% de ácido acético y 10% de paladio a presión y temperatura ambiente. Es un método bastante confiable ya que sólo presenta una limitación: el catalizador puede ser degradado por la existencia de azufre, el cual puede encontrarse si en la secuencia peptídica se encuentran aminoácidos como cisteína o metionina. Algunos procesos que implican el uso de amonio como solvente o un exceso del catalizador en ácido acético llevan a cabo esta reacción sin importar si hay azufre presente, no obstante, estas condiciones no se han tratado adecuadamente.

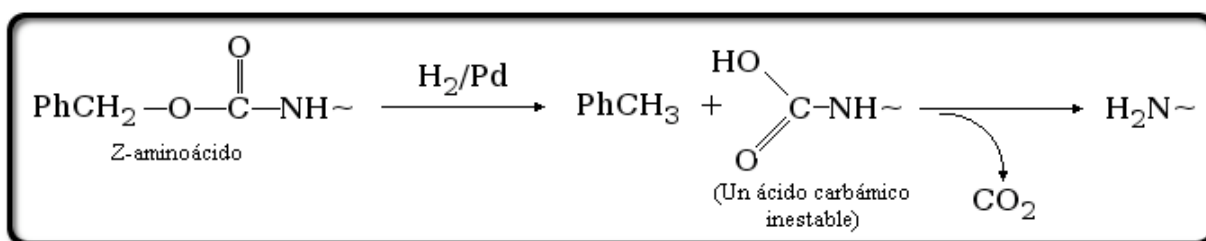


Figura 4. Desprotección de un Z-aminoácido por hidrogenación catalítica

➔ **t- Butoxicarbonil (Boc).** Un aminoácido Boc es actualmente obtenido del anhídrido correspondiente al grupo protector (figura 5).

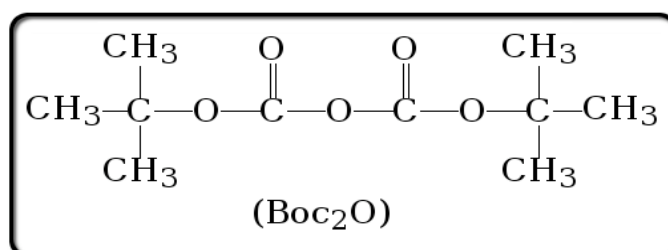


Figura 5. Los Boc-aminoácidos se obtienen a partir del anhídrido tertbutílico

El grupo Boc es completamente estable a la hidrogenación catalítica, por lo que en la síntesis peptídica puede utilizarse un grupo protector Z como temporal y un Boc como permanente, o viceversa. La forma común de desproteger un aminoácido Boc, la cual es prácticamente inerte para un grupo Z, es mediante una dilución de ácido trifluoroacético (TFA) a temperatura ambiente (figura 6).

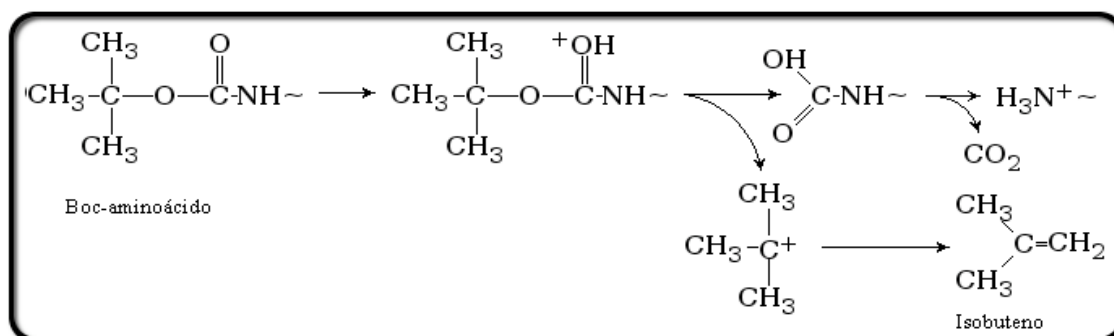


Figura 6. Desprotección de un Boc-aminoácido con TFA

➔ **2-(4-bifenilil)-isopropoxicarbonil (Bpoc).** El grupo Bpoc (figura 7) es más lábil que el Boc. Puede ser removido por un tratamiento breve de una mezcla de ácido cloroacético y diclorometano, condiciones que no afectan ni al grupo Boc ni al Z; por otro lado, el grupo Bpoc es susceptible a hidrogenación catalítica.

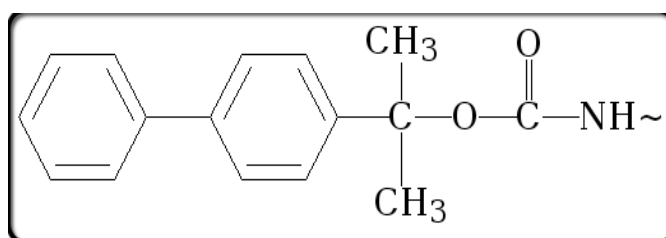


Figura 7. Grupo protector Bpoc

➔ **Fluorenil-9-metoxicarbonil (Fmoc).** Los aminoácidos Fmoc (figura 8) se obtienen a partir de su respectivo cloruro de acilo o alternativamente utilizando un éster de succinimida.

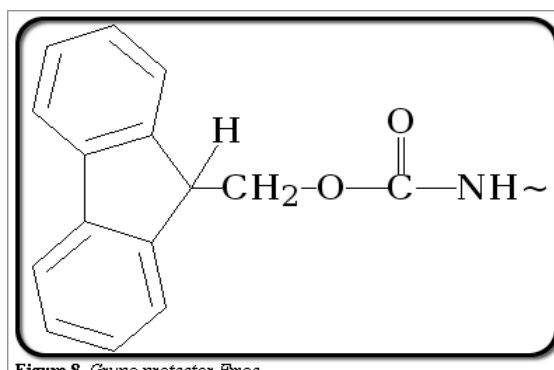
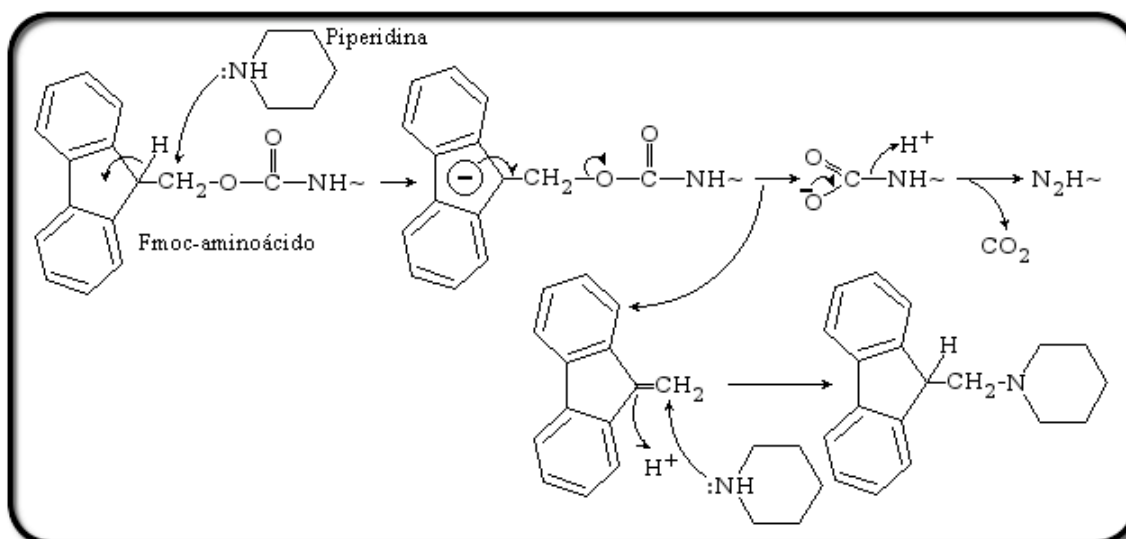


Figura 8. Grupo protector Fmoc

El grupo Fmoc es muy estable en presencia de agentes ácidos, pero puede removerse fácilmente en ciertas condiciones básicas, usualmente se utiliza 20% de Piperidina en dimetilformamida (DMF) para desprotección de los aminoácidos Fmoc, mecanismo que es

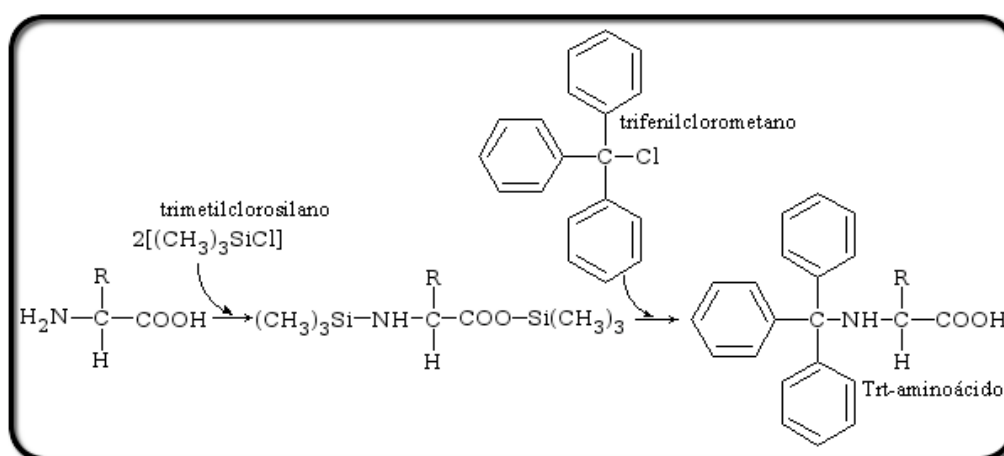
muy rápido a temperatura ambiente (figura 9). Este procedimiento no afecta a la mayoría de los grupos protectores, incluidos los grupos Z o Boc.



**Figura 9.** Desprotección de un Fmoc aminoácido con piperidina, dando como co-producto al aducto de la piperidina y el flourenil meteno

Existen otros grupos protectores que no son derivados de los uretanos, estos grupos protectores también impiden la racemización y son aplicados en ciertas estrategias de síntesis, entre ellos se encuentran el trifenilmetil, el 2-nitrofenilsulfonyl y el ditiosuccinil

➔ **Trifenilmetil (trityl, Trt).** El trifenilmetil es un radical libre muy estable. La producción de los Trt-aminoácidos mediante trifenilclorometano es muy pobre en condiciones básicas, por lo que se requiere de un intermediario, el cual se obtiene al hacer reaccionar el  $\alpha$ -aminoácido, con trimetilclorosilano.



**Figura 10.** Obtención de un Trt-aminoácido.

El grupo trityl no sobrevive a las condiciones de hidrogenación catalítica, es muy estable a las bases, y tan lábil frente a los ácidos, que para desproteger un Trt-aminoácido, sólo basta tener un pH de 4, usualmente se utiliza ácido acético. (figura 11)

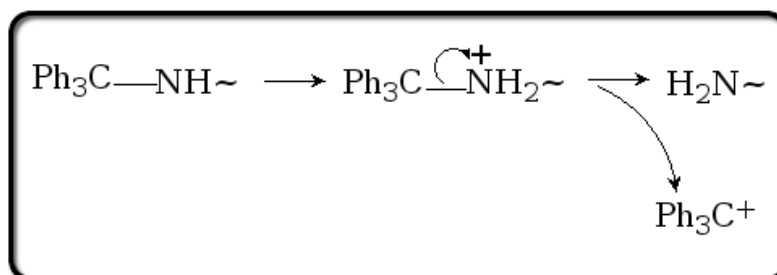


Figura 11. Desprotección de un Trt-aminoácido con ácido acético

No es un grupo protector frecuentemente usado, ya que el impedimento estérico de esta molécula tan grande dificulta la formación del enlace peptídico, sin embargo se han reportado casos exitosos de péptidos sintetizados utilizando este grupo protector.

➔ **2-Nitrofenilsulfonil (Nps).** Los Nps-aminoácidos se obtienen a partir de la reacción de los aminoácidos con NpsCl en condiciones básicas. No son muy estables en estado libre, se almacenan como sales de dicitlohexilamonio, de donde son liberados por acidificación con ácido sulfúrico. El grupo Nps es estable a las bases, no lo es a condiciones ácidas o a hidrogenación catalítica. La forma de desprotección más simple es por tratamiento con dos equivalentes de cloruro de hidrógeno anhidro, sin embargo pueden producirse reacciones secundarias, sobre todo en presencia de triptófano.

➔ **Ditiosuccinil.** La química de este grupo protector es muy complicada y no muy limpia, no es muy utilizado, pero posee la ventaja de que puede ser fácilmente removido por un tiol y una base débil como trietilamina.

### Grupos protectores del $\alpha$ -carboxilo.

La protección del grupo carboxilo no es tan necesaria como la del amino, ya que es menos nucleofílico. No obstante, es conveniente protegerlo, en especial para aumentar la solubilidad del péptido formado en solventes orgánicos. También es importante tener bloqueado el grupo carboxilo que en ese momento no formará parte del enlace peptídico, mientras que el que participará en el enlace se encuentra desprotegido listo para ser activado. Los métodos más comunes para proteger el grupo  $\alpha$ -carboxilo es mediante esterificación,. La liberación del aminoácido de este grupo

protector es de manera similar a la aquella vista para los derivados del uretano, después de todo, son ésteres de un tipo especial.

➔ **Metil éster (-COO-CH<sub>3</sub>) y Etil éster (-COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).** Fueron los primeros grupos utilizados para enmascarar el α-carboxilo. No hay una distinción importante entre estos dos, por lo que se les trata como un mismo grupo protector. Pueden obtenerse haciendo reaccionar al aminoácido con el alcohol correspondiente directamente o por medio de un halogenuro de acilo intermediario. No se ven afectados a temperatura ambiente por HBr/AcOH, TFA, hidrogenación catalítica, tioles o aminas en solventes orgánicos, de esta manera puede combinárseles con cualquier grupo amino protector. Uno de los problemas de estos grupos protectores se presenta cuando se está protegiendo a un dipéptido ya que tienden a ciclarse formando dicetopiperacinas. Son demasiado estables, debido a esto las condiciones de desprotección exigen un tratamiento vigoroso; en ocasiones la saponificación es confiable, pero se corre el riesgo de que la base utilizada pueda causar racemización.

➔ **Bencil éster (-COO-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).** Obtenido a partir de la esterificación del alcohol bencílico, este grupo protector se popularizó por presentar menos problemas para la desprotección que el metil o etil éster, aunque al igual que estos últimos, tienden a formar dicetopiperacinas. Pueden ser eliminados por saponificación, pero también por HBr/AcOH e hidrogenación catalítica, pero no por TFA (al igual que el grupo protector Z para el α-amino), por esta razón se les usa en combinación con un grupo amino protector distinto al Z durante la etapa de síntesis.

➔ **t-Butil éster (-COO-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).** Estos pueden ser preparados directamente de los aminoácidos pero el procedimiento estándar es indirecto (figura 12). A diferencia de los grupos anteriores, los dipéptidos de los t-Butil ésteres no forman dicetopiperacinas con facilidad. La estabilidad y labilidad de este grupo es semejante a la del grupo Boc, aunque son menos sensibles a acidólisis, por lo que es posible diferenciar entre el rompimiento de un grupo Boc y un t-Butil éster. Sin embargo, se recomienda utilizarlo en combinación con un grupo protector diferente al Boc.

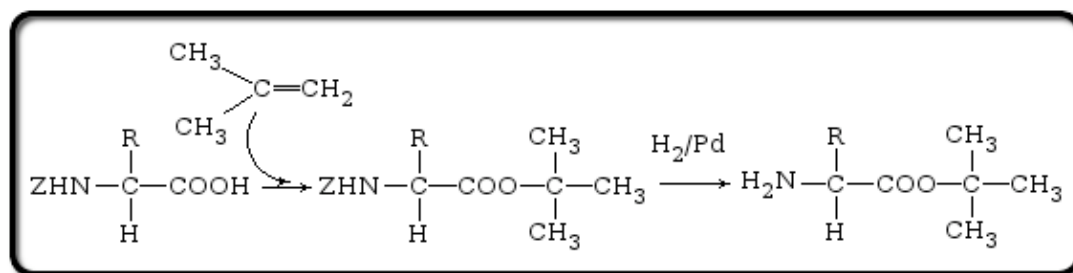


Figura 12. Preparación de un t-butil éster a partir de un Z-aminoácido

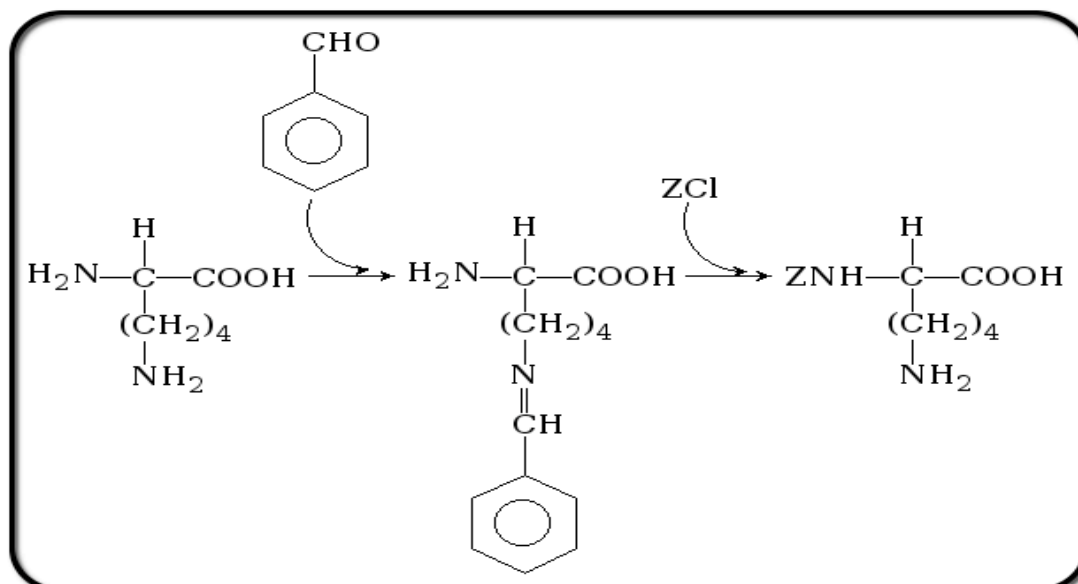
➔ **Fenil éster (-COO-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).** Este grupo es completamente estable en medio ácido y en condiciones de hidrogenación catalítica. El rompimiento por acción de un álcali es mucho más rápido que el del metil éster. Para efectuar la desprotección de este grupo se utiliza un tratamiento de peróxido de hidrógeno en DMF a un pH de 10.5 por 15 minutos, esto debido a la susceptibilidad que tienen los fenil ésteres al ataque del ión peróxido. Cadenas laterales sensibles al peróxido (Met, Trp, Cys), aparentemente no representan un gran problema si la desprotección se lleva a cabo con un exceso de dimetil sulfuro.

### **Protección de las cadenas laterales.**

Las cadenas laterales de cada aminoácido les confieren propiedades únicas, y aunque no todas son igualmente reactivas, es importante estar consciente de las consecuencias que puede ocasionar a la síntesis peptídica el no protegerlas. A continuación se mencionan los aminoácidos que contienen cadenas laterales que afectan mayormente a la química de la síntesis de péptidos.

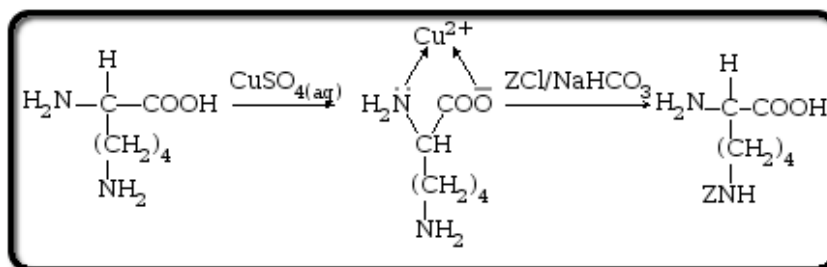
➔ **Lisina.** La necesidad de proteger al grupo ε-amino de la lisina se debe a que este grupo amino es más básico y nucleofílico que el grupo α-amino, y por consecuencia, se generarían péptidos ramificados en esta posición, aunque en ocasiones, estas ramificaciones pueden ser deseadas (como en el caso de péptidos cíclicos, cuando se quiere adjuntar otra secuencia peptídica o la conjugación de un carbohidrato). En cualquier caso, para la protección de este aminoácido deben seleccionarse grupos protectores amino ortogonales. Puede escogerse cualquier combinación en base a lo mencionado con anterioridad, pero los grupos protectores principales para el grupo ε-amino son los grupos Z y Boc. Ahora bien, para poder dirigir cada grupo protector al amino que hemos decidido pueden seguirse dos estrategias:

Puede aprovecharse el carácter más básico y nucleofílico del grupo ε-amino para hacerlo reaccionar con benzaldehído y así formar una base de schiff, para proceder a la protección del α-amino:



**Figura 13.** Protección selectiva del  $\alpha$ -amino mediante el bloqueo del  $\epsilon$ -amino con benzaldeído. La protección se lleva a cabo con cloruro de carbobenzoilo en NaOH y THF a  $10^{\circ}\text{C}$  pH 8.8, posteriormente un breve tratamiento con HCl.

O bien, mediante la formación de un quelato coordinado por el grupo  $\alpha$ -amino y el  $\alpha$ -carboxilo:

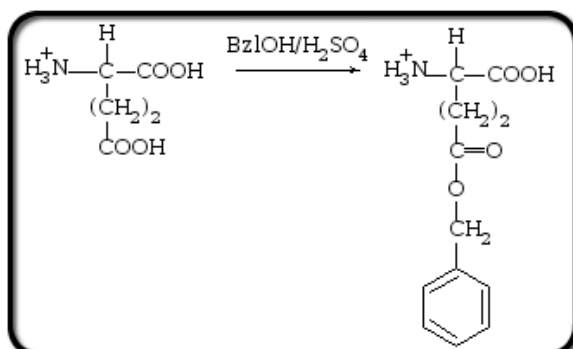


**Figura 14.** Protección selectiva del  $\epsilon$ -amino mediante la formación de un quelato

➔ **Arginina.** El grupo guanidino de la arginina permanece protonado bajo las condiciones dadas en la protección de los grupos  $\alpha$ , en la formación del enlace peptídico y en la desprotección, por lo que podría no protegerse. Sin embargo, es recomendable hacerlo debido a que pueden presentarse problemas de solubilidad. Para protegerlo suele usarse nitración que es resistente a HBr/AcOH, y la desprotección para recuperar el grupo guanidino puede hacerse por tratamiento por HF líquido, reducción con zinc en ácido acético o hidrogenación catalítica.

➔ **Ácidos glutámico y aspártico.** Como sucede con la lisina, a estos aminoácidos debe protegerse los grupos carboxilo de la cadena lateral para que no interfieran en la formación del enlace peptídico. Para esta protección son usualmente utilizados el bencil o el

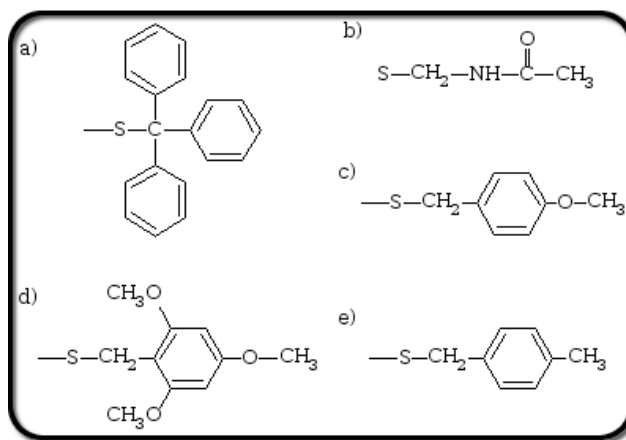
*t*-butil éster. La diferenciación de los grupos carboxilo puede hacerse como se muestra en la figura 15 (aunque podrían existir otras alternativas).



**Figura 15.** Protección selectiva de los grupos carboxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos ácidos. Aunque en la figura se muestra al protección para Glu, el mismo caso aplica para Asp. Bzl se refiere al grupo bencilo

El hecho de tener el  $\alpha$ -carboxilo cerca al grupo amino protonado le da preferencia al otro carboxilo de ser esterificado.

➔ **Cisteína.** El grupo tiol de las cisteínas es de gran importancia, sobretodo si el péptido sintetizado contempla la formación de un puente disulfuro, por lo que debe protegerse para guiar la formación del mismo (ver más adelante). La protección también debe llevarse a cabo toda vez que este grupo puede interferir con muchas operaciones de rutina. Existen muchos grupos protectores para este aminoácido, pero usualmente se protegen con bencil éster, aunque este requiere condiciones vigorosas para su rompimiento (reducción por sodio en amoniaco líquido o con ácido fluorhídrico líquido). También puede protegerse con *t*-butil éster, cuyo rompimiento se realiza con el ión mercúrico. Otros ejemplos de grupos protectores de la cisteína es el Trt, Acm, Mob, TMob y Meb (figura 16).



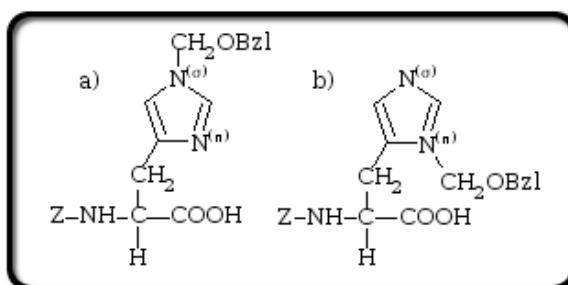
**Figura 16.** Ejemplos de grupos protectores usados para las cadena lateral aminoácido cisteína. a) *S*-Trt, b) *S*-Amb, c) *S*-Mob, d) *S*-TMob y e) *S*-Meb

➔ **Metionina.** Aunque generalmente representa problemas debido al tioéster que se encuentra en su cadena lateral (como la interferencia en la hidrogenación catalítica o el ser susceptible al ataque de reactivos electrofílicos debido a la desprotección por ácidos), no es muy recomendable pretegerlo, por lo que se usualmente se maneja así, cuidando otros aspectos para disminuir su interferencia.

➔ **Serina, treonina y tirosina.** Los grupos hidroxilo de estos aminoácidos, en especial el de la tirosina, son capaces de reaccionar con reactivos acilados. No obstante, pueden dejarse sin protección si las condiciones para proteger el grupo  $\alpha$ -carboxilo son suaves. En caso de protegerse estos aminoácidos, puede hacerse con la formación de bencil éter o un *t*-butil éter. El rompimiento para cada caso, es similar que el usado para los ésteres correspondientes.

➔ **Triptófano.** El anillo indólico del triptófano no interviene en la formación del enlace peptídico, pero es capaz de atrapar reactivos electrofílicos con gran facilidad, por lo que debe protegerse. Los grupos protectores usualmente utilizados para el nitrógeno del anillo indólico son el grupo formilo (For) y el Boc.

➔ **Histidina.** Este aminoácido es uno de los más problemáticos por lo que es de primordial importancia protegerlo. El anillo imidazol es fácilmente acilado y una vez así es capaz de intercambiar grupos acilo de formas no deseadas. Un problema más serio es que la basicidad del anillo cataliza la racemización de los carbonos  $\alpha$ , en especial el de la propia histidina. Para suprimir estos efectos no deseados debe protegerse el nitrógeno  $\pi$ , que es el que se encuentra más cercano al carbono  $\alpha$  (figura 17b). Usualmente se utiliza la protección Bom (benciloximetil), el cual puede removerse por HF o por HBr/AcOH.



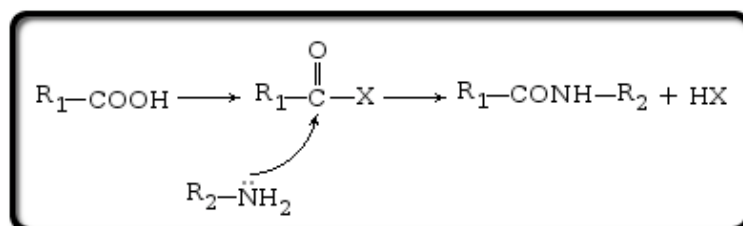
**Fig 17.** La racemización no se evitará si el grupo protector está como en el nitrógeno  $\alpha$  (a), dado que la protección debe estar en el nitrógeno  $\pi$  (b)

## CAPÍTULO III

### FORMACIÓN DEL ENLACE PEPTÍDICO.

#### Activación y Acoplamiento.

La formación del enlace peptídico es una reacción endergónica, una simple adición de un ácido carboxílico con una amina dará como resultado la obtención de la sal orgánica correspondiente, por lo que, si lo que buscamos es la formación de una amida, el grupo carboxilo debe ser activado. El mecanismo que se sigue para el acoplamiento de dos aminoácidos es aminólisis y se resume en la figura 18. En donde X es cualquier agente activante de naturaleza electrofílica, el cual debe ser minuciosamente escogido, ya que una mala elección puede llevarnos a racemización.



**Figura 18.** Generación del enlace peptídico por aminólisis. R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> hacen referencia al resto de la fórmula del aminoácido.

➔ **Cloruros y fluoruros de acilo.** EL primer método usado para la activación en la síntesis de péptidos, consistía en la conversión de un acil aminoácido en el correspondiente cloruro de acilo, utilizando reactivos como el cloruro de tionilo o el pentacloruro de fósforo. Posteriormente se les hacía reaccionar con el aminoácido correspondiente para la formación del enlace peptídico. Sin embargo, existían ciertas limitaciones usando esta técnica, debido a la facilidad de eliminación del ion cloruro, el carbonilo es propenso al ataque de incluso nucleófilos débiles, por otro lado los más simples cloruros de aminoácidos ciclan espontáneamente, formando oxazolonas y, por lo tanto, péptidos racémicos. Lo anterior aunado con el desarrollo de metodologías más adecuadas para la activación del grupo carboxilo tuvo como consecuencia que los cloruros de acilo dejaran de ser utilizados, hasta la aparición de los cloruros y fluoruros de Fmoc aminoácidos, los cuales son fáciles de obtener y tienen intermediarios más estables. Los fluoruros de acilo son más estables que el correspondiente cloruro de acilo a bases ternarias y frente al agua, y muestra similar reactividad frente a grupos amino.

➔ **Acil azidas.** Se trata de otro de los procedimientos para la formación del enlace peptídico utilizados en los inicios de la síntesis de péptidos. Las acil azidas se obtienen por

hidrazinolisis de un aminoácido protegido el cual posteriormente debe hacerse reaccionar con el aminoácido correspondiente, como se muestra en la figura 19.

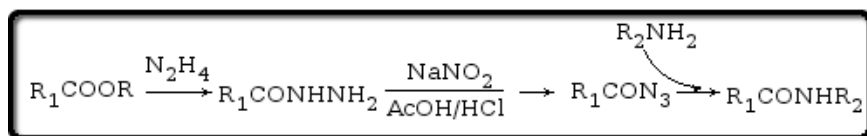


Fig 19. Formación del enlace peptídico por acil azidas

Las reacciones secundarias que puede dar este método es una de sus limitaciones, entre la que destaca la transposición de Curtius, obteniendo o bien una amina o un isocianato antes que se dé la formación del enlace peptídico. Fueron muy usadas antes de los años cincuenta, debido a que no presentaban racemización.

➔ **Anhídridos.** La formación de anhídridos surgió de la necesidad que tiene la síntesis de péptidos de la activación del grupo carboxilo sin que haya liberación de reacciones secundarias, ya que los productos obtenidos son difíciles de purificar.

Los *anhídridos simétricos* pueden obtenerse a partir del correspondiente acil aminoácido mediante el uso de una variedad de reactivos, entre los que se encuentran la dicilohexilcarbodiimida. Los anhídridos simétricos de los aminoácidos Boc, Z y Fmoc, son generalmente sustancias cristalinas estables. La aminólisis de los anhídridos simétricos no es ambigua, siempre obtendremos la amida deseada pero sólo la mitad del componente será incorporado al producto final.

En la síntesis de péptidos se hace uso de distintos tipos de *anhídridos mixtos*, el primer tipo es el obtenido a partir de un acil aminoácido (o un acil péptido) y un ácido carboxílico. La aminólisis de este tipo de anhídridos a diferencia de los simétricos es un tanto ambigua, pudiendo obtener distintos productos cuando se forma el enlace peptídico (figura 20).

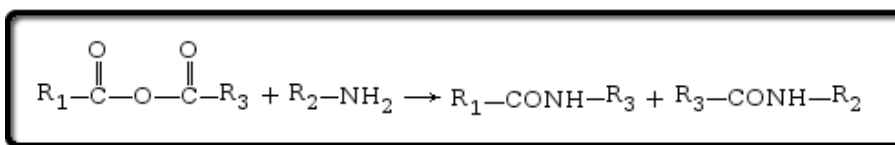
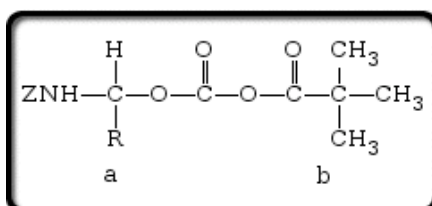


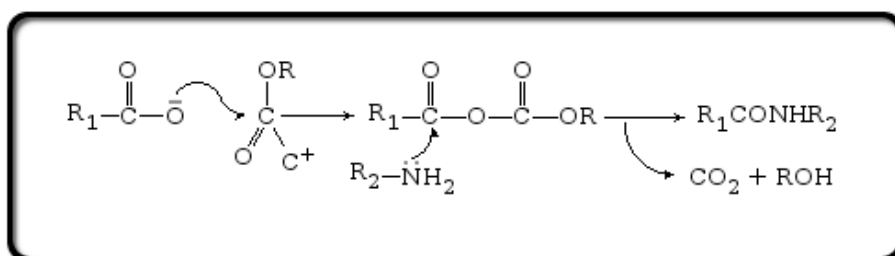
Figura 20. Aminólisis de anhídridos mixtos. Donde R1 es el resto de la fórmula del aminoácido que es parte del anhídrido, R2 es el resto de la fórmula del aminoácido que formará el enlace peptídico y R3 es la parte del anhídrido que proviene del ácido carboxílico.

Puede forzarse la reacción para que nos de el producto deseado, mediante la introducción de impedimento estérico en la parte del anhídrido que proviene del ácido carboxílico, como es el caso del anhídrido mixto proveniente del ácido piválico (figura 21), en este caso, el reactivo nucleofílico (el grupo amino del aminoácido que ataca este anhídrido por aminólisis) preferirá actuar sobre a, debido a que el carbonilo se encuentra más expuesto que en b (ver figura).



**Figura 21.** Anhídrido derivado del ácido piválico  $(\text{CH}_3)_3\text{CCO}_2\text{H}$

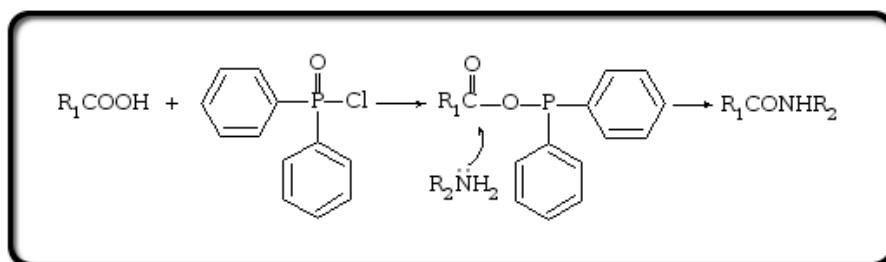
El método de anhídridos mixtos más utilizado en la síntesis de péptidos es el que implica la generación y aminólisis de un anhídrido carboxílico-carbónico, como se ve en la figura 22. El ataque nucleofílico va directamente hacia el grupo carboxilo original, gracias a que el carbonilo proveniente del derivado de ácido carbónico se encuentra flanqueado por dos átomos de oxígeno que disminuyen su reactividad.



**Figura 22.** Formación del enlace peptídico por un anhídrido carboxílico carbónico intermediario

El etilcloroformato es el reactivo mayormente utilizado, pero también puede usarse isobutilcloroformato. Una debilidad de los anhídridos formados, es que no son estables por largos periodos, su tiempo de vida media es de apenas unas horas, por lo que no pueden ser almacenados.

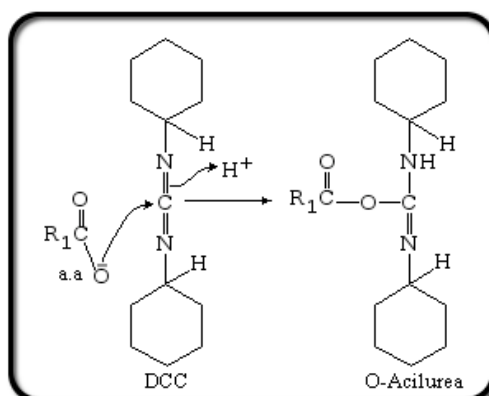
Otro anhídrido mixto muy apropiado para la formación del enlace peptídico muy limpio, dado que la aminólisis ocurre directamente sobre el carbonilo del acil-aminoácido sin importar si sobre este hay un gran impedimento estérico, es el obtenido a partir del ácido difenilfosfinico (figura 23).



**Figura 23.** Generación del enlace peptídico por un anhidrido intermediario formado a partir de un aminoácido con ac difenilfosfínico.

➔ **Ésteres activados.** En los comienzos de la síntesis de péptidos se intentó el uso de ésteres para la activación de los acil-aminoácidos, pero la aminólisis de los ésteres alquílicos es demasiado lenta para las necesidades de un síntesis peptídica. A principios de los años cincuenta se observó que la reacción puede ser favorecida con el uso de ésteres de fenilo, los cuales son más reactivos, y en presencia de sustituyentes electrofílicos en el anillo aromático, la aminólisis alcanza velocidades semejantes a las de los anhidridos. Su uso ha ido en ascenso debido a que son fáciles de preparar, son muy estables y el riesgo de racemización es muy bajo.

➔ **Carbodiimidas.** La dicitclohexilcarbodiimida (DCC) fue introducida por primera vez en la síntesis de péptidos en 1955 por Sheehan y Hess, y ha sido el reactivo más importante para la activación y acoplamiento desde entonces. Reacciona con los acil aminoácidos para dar anhidridos simétricos, ésteres activados o actuar directamente como un agente acoplante. En cualquier caso el primer evento de la activación es la formación de una *O*-acilurea (figura 24).



**Figura 24.** Formación de *O*-acilurea

En presencia de un exceso de carboxilato, por ejemplo cuando un equivalente de DCC es agregado a dos equivalentes de un acil aminoácido, la *O*-acilurea es atacada por el anión

carboxilato para formar el anhídrido, mientras que en presencia de fenoles u otros compuestos hidroxilo forma los ésteres derivados. La DCC da un coproducto, dicitclohexilurea, el cual es muy poco soluble en la mayoría de los solventes, por lo que la separación de éste del péptido sintetizado es muy fácil en síntesis de péptidos en solución (por diferencia de solubilidades), y es lo suficientemente soluble como para removerlo mediante lavados en la síntesis de péptidos en fase sólida. Por otro lado, en ausencia del reactivo nucleofílico, la *O*-acilurea se rearregla lentamente en *N*-acilurea, la cual no sólo reduce la producción, sino que también da problemas de purificación, esto puede prevenirse agregando el reactivo nucleofílico adecuado, antes que las reacciones secundarias se den.

➔ **Sales de fosfonio.** Estas sales son utilizadas especialmente para acoplamiento de aminoácidos de péptidos fosforilados, ya que el uso de otros agentes como DCC, pueden generar reacciones secundarias con el aminoácido fosforilado. El reactivo de este tipo más utilizado es el BOP (benzotriazoliloxi-tris-[dimetilamino] fosfonio hexafluorofosfato). La vía de activación es presentada en la siguiente figura:

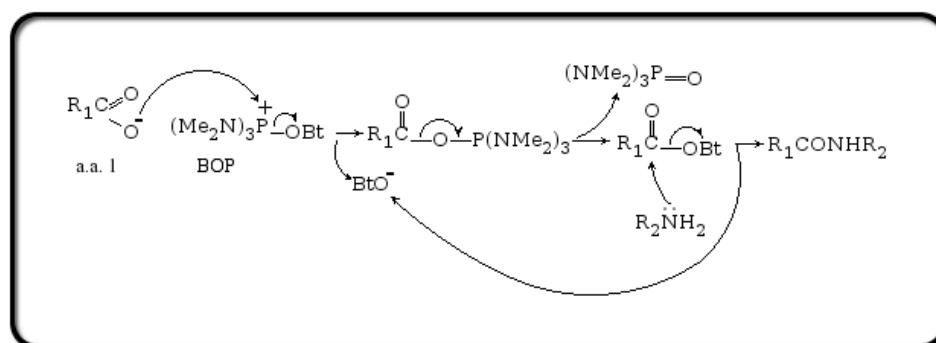


Figura 25. Formación del enlace peptídico usando BOP como reactivo activador.

Mediante este agente acoplante se obtienen altos rendimientos con pocas reacciones secundarias y todos los coproductos son fácilmente removibles. Presenta riesgo de racemización y el coproducto hexametilfosforoamida es altamente tóxico.

### Racemización.

Como se mencionó anteriormente, racemización es el término dado a la conversión que tiene un enantiómero en otro, y ha sido profundamente estudiada en la síntesis de péptidos, dado que 19 de los 20 aminoácidos utilizados en proteínas son compuestos óptimamente activos, susceptibles a ella, y la conservación de la configuración L en los péptidos y proteínas es esencial para que preserven sus propiedades biológicas. Por lo anterior, es trascendental impedir que este

fenómeno ocurra, ya que si tenemos una mínima tasa de racemización en cada residuo añadido, podemos obtener muchos productos distintos con aminoácidos D, y purificar el péptido correcto representa un serio problema.

La etapa de la síntesis en la que se presenta el riesgo de racemización, dado que esta reacción es casi exclusivamente inducida por una base, es en la de activación y acoplamiento. Los dos mecanismos por los que puede ocurrir son los siguientes:

➔ **Enolización directa.** Puede presentarse cuando se prepara un aminoácido para activación, el carbanión intermediario puede volver a protonarse en cualquier lado de la molécula (figura 26). Ya que el carbanión es un ion plano, y dependiendo de cuál cara elija el protón, nos dará un enantiómero o el otro.

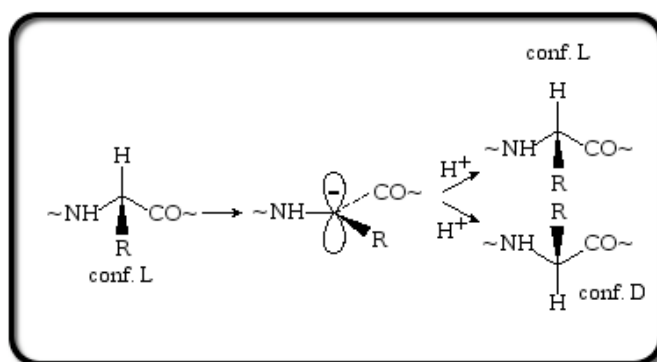


Figura 26. Racemización por enolización directa

En la práctica, no es una fuente importante de racemización, puesto que los factores de los que depende, como la base que cataliza y el solvente pueden ser controlados. Así mismo, la velocidad de acoplamiento juega un papel importante, y este mecanismo se presenta en acoplamientos que son extremadamente lentos, cosa que no es muy común en la síntesis de péptidos.

➔ **Mecanismo de oxazolona.** Con excepción de prolina, los acil aminoácidos activados y los péptidos acilados pueden dar un compuesto heterocíclico bajo la influencia de una base. Las oxazolonas formadas son activadas a través de la aminólisis y la reacción con un grupo amino llevará eventualmente a la formación de péptidos. Sin embargo, la velocidad de racemización es mayor a la de la formación del enlace peptídico, por lo que los péptidos producidos se encontrarán racemizados .

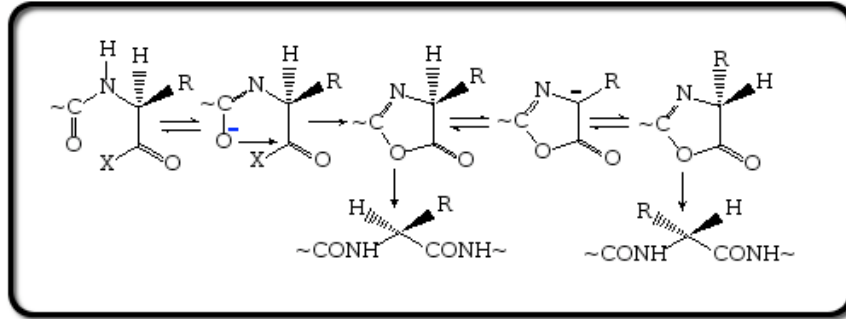


Figura 27. Racemización por formación de una oxazolona

La síntesis de péptidos a partir del amino terminal (como son sintetizadas naturalmente las proteínas en las células), provee una oportunidad mayor para la formación de una oxazolona, por esta razón la síntesis de péptidos se lleva a cabo usualmente en el sentido contrario, del grupo carboxilo hacia el amino. El riesgo de que se forme una oxazolona se reduce cuando el aminoácido está protegido por un derivado de uretano, y en el caso de que se formara, ésta sería más resistente a racemización; de ahí que el uso de grupos protectores derivados de uretano sea muy popular en la síntesis de péptidos.

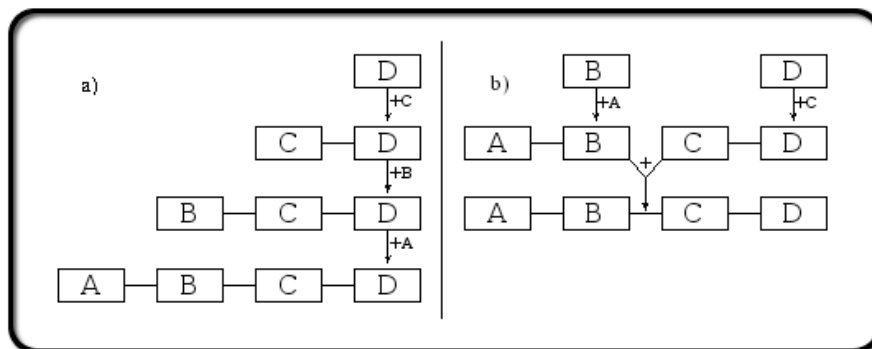
---

## CAPÍTULO IV

### SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN SOLUCIÓN.

La síntesis de péptidos en solución, también conocida como el método clásico, fue la técnica utilizada para elaborar péptidos hasta la aparición de la síntesis de péptidos en fase sólida (ver más adelante), la cual ha venido a sustituir al método clásico en casi todos los laboratorios, esto debido a que en cada ciclo de la síntesis en solución debía aislarse y purificarse el péptido obtenido, por lo que el tiempo que consume es enorme y los rendimientos muy bajos. No obstante, aún es utilizada para la producción a gran escala en la mayoría de las aplicaciones industriales. Se lleva a cabo en distintos solventes orgánicos, pero para prevenir formación de oxazolonas se recomienda el uso de acetato de etilo, tetrahidrofurano, t-butanol, y acetonitrilo.

La elongación del péptido por el método clásico puede llevarse a cabo de dos formas, por “elongación gradual” (figura 28a) o por “condensación fragmentada” (figura 28b), la elección dependerá de las necesidades de cada péptido. El primer factor a considerar, es que un péptido puede sintetizarse a partir del amino terminal o del carboxilo terminal, pero como ya se mencionó en el apartado anterior, es preferible hacerlo a partir del carboxilo terminal para reducir el riesgo de racemización. Para comprender mejor las estrategias de elongación, supongamos que tenemos un tetrapéptido a sintetizar ABCD, si se sigue la elongación gradual, se pondrían a reaccionar el aminoácido D con el C, se purifica el producto, posteriormente se le agregaría el aminoácido B, ahora purificaríamos BCD para finalmente adicionar el aminoácido A. En la condensación fragmentada se sintetizarían el dipéptido AB y el CD por separado, y los productos purificados se harían reaccionar para de esta manera tener el producto esperado. Si suponemos un rendimiento del 80% en cada etapa de purificación, al final de la síntesis por elongación gradual tendríamos un rendimiento del 51.2%, mientras que por el método de condensación fragmentada el rendimiento total sería del 64%.



**Figura 28.** Estrategias para la síntesis de un péptido. a) Elongación Gradual, b) Condensación Fragmentada.

Conforme aumenta el número de aminoácidos, el rendimiento total para la fragmentación condensada será mejor que el obtenido para la elongación gradual, así mismo, el tiempo que consume es menor si más de una persona trabaja en la obtención del producto. Por otro lado, también existen contras en la fragmentación condensada, es desarrollada mejor en unas posiciones que en otras, por lo que es más complicado sintetizar a partir del grupo carboxilo que en la elongación gradual. La elección sobre qué estrategia utilizar dependerá de todas las variables involucradas en la síntesis, como la composición y el tamaño del péptido. Es posible hacer combinaciones de las estrategias, generalmente si existe en la secuencia un puente disulfuro, la síntesis girará en torno a éste. Por otro lado, si nos encontramos aminoácidos que causen problemas (como la metionina, cuya cadena lateral usualmente se deja sin protección) estos pueden dejarse fuera de la región central. Así pues, volviendo a nuestro ejemplo anterior, se podría sintetizar  $[(A+B)+(C+D)]$ , como ya se había planteado, o bien,  $\{[A+(B+C)]+D\}$ ,  $\{A+[(B+C)]+D\}$ ,  $\{[(A+B)+C]+D\}$  o cualquier combinación posible según el número de aminoácidos implicados.

Es importante recordar, sea cual sea la estrategia seleccionada, que deben escogerse los grupos protectores correspondientes a cada grupo funcional, siendo cautelosos en que los permanentes y los temporales deben ser ortogonales entre sí.

### Ejemplos de péptidos sintetizados en solución.

Muchos fueron los péptidos y proteínas sintetizados mediante el método clásico, a continuación se mencionan dos ejemplos para demostrar que las posibilidades de sintetizar un péptido son varias.

➔ **Oxitocina (CYIQNCPLG).** Sintetizada por du Vigneaud y sus colaboradores en 1953, esta hormona está involucrada en el control de las contracciones uterinas durante el parto, y de la liberación de la leche después de éste. La estrategia que siguieron fue elongación gradual

a partir del carboxilo terminal, cuyo grupo protector permanente era un etil éster, otros grupos permanentes utilizados fueron bencil éter para la tirosina y bencil éster para las cisteínas. El grupo temporal del amino utilizado fue el benciloxicarbonil, el cual fue removido por HBr/AcOH (figura 3).

➔ **Gastrina porcina (QGPWMEEEEEAYGWMDF)**. Considerada como el más potente estimulante de la secreción ácida del estómago, esta hormona se encuentra en los mamíferos por lo menos en tres formas, Su síntesis fue llevada a cabo mediante fragmentación condensada en grupos que excluyeran metionina del fragmento central, y de esta manera emplear hidrogenación catalítica en cada preparación. Los péptidos intermediarios fueron distribuidos de la siguiente manera:

**Tabla 2. Aminoácidos 1-5**

Estrategia	Condensación Fragmentada
Grupo protector permanente de C Terminal	Metil éster
Grupo protector Temporal del amino	Boc
Grupo protector Temporal del carboxilo	Bencil éster
Cadenas laterales protegidas	Ninguna

**Tabla 3. Aminoácidos 6-13**

Estrategia	Elongación gradual
Grupo protector permanente de C Terminal	Metil éster
Grupo protector Temporal del amino	benciloxicarbonil
Grupo protector Temporal del carboxilo	Ninguno
Cadenas laterales protegidas	El carboxilo de los glutamatos con t-butil éster

**Tabla 4. Aminoácidos 14-17**

Estrategia	Condensación fragmentada
Grupo protector permanente de C Terminal	Metil éster
Grupo protector permanente de C Terminal	Boc
Grupo protector Temporal del amino	Benciloxycarbonil
Grupo protector Temporal del carboxilo	Metil éster*
Cadenas laterales protegidas	El carboxilo de los glutamatos con t-butil éster

\*Cuando se sintetizó 14 y 15 estuvo presente el grupo temporal del carboxilo, y no había dicho grupo durante la síntesis de 16 y 17, por lo que no había por qué preocuparse de que fuese ortogonal.

Finalmente se condensaron todos los fragmentos sintetizados previamente, DCC fue el activador en todos los casos, excepto en la etapa final, en donde se utilizó un anhídrido mixto.

---

## CAPÍTULO V

### SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA.

#### **La técnica de Merrifield.**

Cuando Bruce Merrifield incursionó en el área de síntesis de péptidos se dio cuenta de lo extenuante y largo que significaba obtener el producto deseado, por lo que imaginó que el proceso podía simplificarse. Su idea básicamente consistía en ensamblar en un soporte sólido insoluble el residuo C-terminal del péptido a sintetizar, con lo cual la cadena de aminoácidos iría creciendo anclada al soporte sólido mediante una estrategia de elongación gradual. Finalmente, el producto deseado es desprendido del soporte, y su purificación y caracterización se llevan a cabo en solución. Lo anterior permite que haya una rápida filtración y lavados para deshacerse de reactivos y productos secundarios después de cada etapa de la síntesis, en consecuencia, no habrá que purificar cada péptido intermediario, lo que se traducirá en una reducción de tiempo y un aumento en la producción.

Su idea fue llevada a la realidad, y en 1963 reportó la obtención del tetrapéptido leucilalanilglicilvalina mediante la adición de Z-aminoácidos a una resina de poliestireno. Sin embargo, parecía que esta técnica no prometía mucho para la construcción de péptidos más grandes, las reacciones de desprotección y/o acoplamiento no llegaban a completarse y el tetrapéptido estaba contaminado con fragmentos más pequeños. Entonces Merrifield realizó importantes cambios para la síntesis del nonapéptido bradiquinina, sustituyó los Z-aminoácidos por Boc-aminoácidos y en 1964 reportó la obtención de un producto más puro.

Aunque las reacciones se llevan a cabo en solventes orgánicos, como en el método clásico, el nombre de síntesis de péptidos en fase sólida, fue dado por el hecho de que el péptido va creciendo anclado a un soporte, un esquema detallado puede observarse en la siguiente figura:

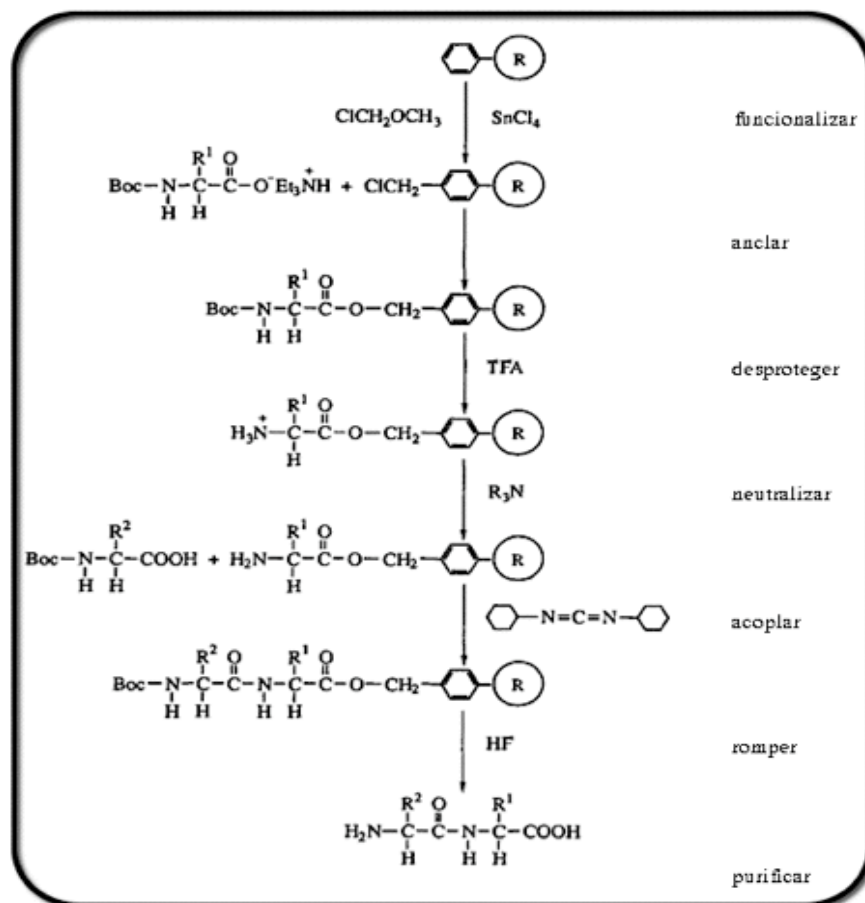


Figura 29. Esquema de la SPFS, empleando la técnica de Merrifield (19)

Una de las características particulares de la técnica de Merrifield es el uso *t*-butoxicarbonil como grupo protector temporal del  $\alpha$ -amino, y como permanentes grupos bencil éster (o los relacionados a éste). El soporte sólido comúnmente utilizado en la técnica de Merrifield es una resina de poliestireno clorometilada entrecruzada por la incorporación con una pequeña cantidad de divinilbenceno. El primer aminoácido es adherido a la resina a través de la sustitución del cloro por ayuda de una amina terciaria del Boc-aminoácido, generando el equivalente de un bencil éster. La desprotección es llevada a cabo con una solución de ácido trifluoroacético en diclorometano, le sigue una neutralización para que el siguiente residuo pueda ser acoplado por medio de DCC. Las etapas de desprotección, neutralización y acoplamiento son repetidas con los Boc-aminoácidos apropiados hasta que la secuencia ha sido completada. Al final de cada etapa el conjugado insoluble polímero-péptido es lavado exhaustivamente para remover el exceso de reactivos y coproductos. Finalmente, tratamiento con ácidos fuertes, usualmente HF, remueve todos los grupos protectores permanentes de las cadenas laterales y el producto formado es liberado de la resina.

Existe un problema que es importante tener en cuenta cuando se lleva a cabo esta técnica, si cualquier residuo N-terminal de una de las muchas cadenas polipeptídicas en crecimiento adheridas a la resina permanece sin acilar después de la etapa de acoplamiento, esto llevará a que el producto final esté contaminado por secuencias incompletas mediante dos eventos: a) El residuo puede ser exitosamente acoplado en el siguiente ciclo, resultando en un péptido suprimido, o b) El residuo puede no ser acoplado subsecuentemente, lo que daría un péptido truncado. Al aplicar matemáticas a esto, nos damos cuenta del grave problema que representa, si suponemos un 99% de reacciones llevadas a término en la etapa de acoplamiento, al final de 10 ciclos tendremos un 90% del producto puro y un 10 % de secuencias incompletas contaminantes. Entre más ciclos existan, obviamente el rendimiento será menor. Este problema puede solucionarse forzando a que la etapa de acoplamiento se lleve a cabo en un 100%. Puede usarse un exceso del agente acilado o incluso repetir esta etapa más de una vez. Puede monitorearse si la etapa no se ha completado mediante la prueba de Kaiser, la cual es una prueba basada en el cambio de color de la resina, si la resina no cambia de color, nos indicaría que la etapa de acoplamiento se ha completado, si el color de la resina cambia a azul es indicativo de que aún hay algunos grupos amino libres (este cambio de color es el resultado de la reacción entre la ninhidrina utilizada en la prueba y los grupos amino libres). El acoplamiento también puede ser monitoreado por la prueba de azul de bromofenol, el cual en presencia de grupos amino libres da una coloración azul, y en ausencia de éstos una coloración amarillo verdosa. Este procedimiento puede hacerse de manera continua agregando el azul de bromofenol al agente acilante, o de manera discontinua tomando una muestra de la resina y tratarla con el reactivo.

### **La técnica de Sheppard.**

El modelo propuesto por Merrifield no fue del agrado de muchos químicos de la época, les preocupaba sobretodo la debilidad que presentaba y que no pudieran revisar el producto en cada etapa sino tener que esperar hasta el final. Aunque ya se ha comentado en la sección anterior posibles soluciones al problema de contaminación por péptidos truncados, las vigorosas condiciones en las que se llevaba a cabo la técnica de Merrifield no terminaban de convencerlos acerca de obtener un 100% de acoplamiento. Por lo que, en 1971 Sheppard y colaboradores estudiaron de nuevo el modelo de Merrifield para optimizarlo.

Sheppard argumentaba que sería deseable que el acarreador polimérico fuera químicamente similar a la cadena polipeptídica creciente, de esta manera, ambos podían ser solvatados por disolventes polares apróticos, lo que permitiría crear un sistema en el que hubiera acceso libre a las sustancias participantes a los sitios reactivos en cada etapa de la síntesis. Esto no sucedía con el soporte de poliestireno utilizado por Merrifield, el cual impedía la adecuada

solvatación del péptido en crecimiento, lo que reducía la disponibilidad de los sitios reactivos. La propuesta de Sheppard era la introducción de soportes de poliamida en sustitución del poliestireno. Otra característica importante de esta técnica, debido a la factibilidad de cambiar del solvente, es el uso de Fmoc-aminoácidos en lugar de los Boc utilizados por Merrifield, de ahí que a la técnica de Sheppard también se le conozca como “síntesis Fmoc-poliámida”, la cual se resume en la figura 30.

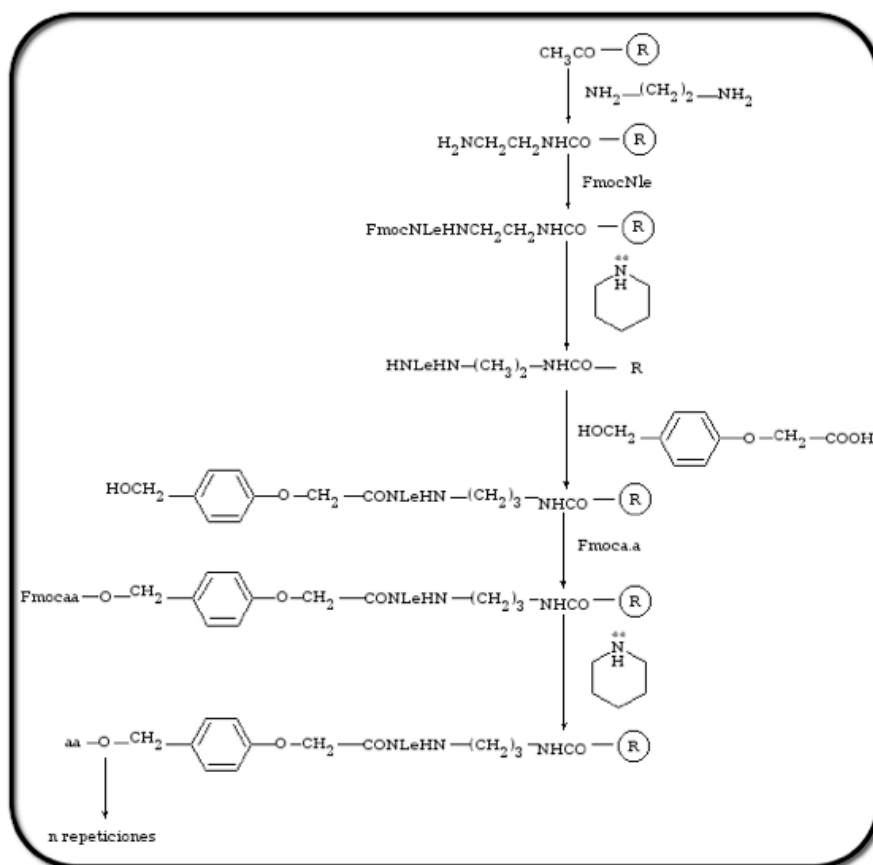


Figura 30. Esquema de la SPPS, empleando la técnica de Sheppard.

En esta técnica se usa preferentemente dimetilformamida como solvente, dado que provee condiciones más adecuadas para llevar a cabo la reacción de acoplamiento. A partir de ahí, surgió la idea del cambio de resina, dado que para que el péptido formado fuera completamente solvatado necesitaba de un acarreador que fuera de naturaleza polar, y aunque la poliacrilamida comercial parecía no ser la adecuada para este propósito, sí lo fue un derivado de ésta, un soporte de polidimetilacrilamida. Un brazo espaciador separa a el primer aminoácido de la resina, e incrustado en éste se encuentra un aminoácido de referencia, usualmente Norleucina. La desprotección de Boc-aminoácidos en la técnica de Merrifield conlleva a una exposición prolongada al ácido, ya que no hay una purificación intermedia, y estas son precisamente las condiciones vigorosas que se mencionaban anteriormente. Por esta razón, se dio la sustitución de los Boc-aminoácidos por los

Fmoc-aminoácidos en la técnica de Sheppard, como grupos protectores permanentes se utilizan los grupos *t*-butil.

Para comprobar que la etapa de acoplamiento se ha llevado a cabo también se usa la prueba de Kaiser, además que puede aprovecharse el hecho de que el grupo protector Fmoc es un cromóforo, el flujo que pasa por la resina puede hacerse pasar a través de un detector de rayos u.v.

### **El soporte sólido.**

Dadas las características de la síntesis de péptidos las resinas deben tener una serie de requerimientos que imponen algunas de restricciones para el diseño adecuado de una resina. Merrifield y Ericksson enlistaron algunas de ellas cuando se empezaba el desarrollo de la síntesis de péptidos en fase sólida: “Un soporte útil debe contener sitios reactivos en los cuales la cadena polipeptídica pueda ser adjuntada y removida posteriormente, y debe ser estable a las condiciones físicas y químicas de la síntesis. El soporte debe permitir un contacto rápido entre el péptido creciente y los reactivos. Debe proveer suficientes puntos de adherencia para obtener una buena producción por unidad de volumen y debe minimizar las interacciones entre las cadenas peptídicas unidas”.

No todos estos requerimientos son fáciles de cumplir, y algunos de ellos pueden ocasionar conflictos al momento de seleccionar la mejor resina. A continuación se mencionan los soportes que han sido usados en SPPS :

➔ **Soportes de tipo gel.** Son los soportes más usados debido a la igual distribución de los grupos funcionales a través de la red polimérica altamente solvatada e inerte, la cual es ideal para el ensamblaje de los péptidos. La red polimérica es flexible y la resina puede expandirse para acomodar a la molécula creciente dentro del gel. Para la síntesis de péptidos se han desarrollado 4 tipos de resinas de gel:

1. La resina hidrofóbica de poliestireno, que fue la desarrollada por Merrifield. Originalmente era una resina con un 2% de entrecruzamiento por la incorporación de divinilbenceno clorometilado (fue modificada a un 1% de entrecruzamiento debido a los problemas que presentaba para la síntesis de péptidos más complejos), esta resina es muy estable en todo el rango de pH y a la temperatura.

El tamaño de las perlas de esta resina es de 10 a 200  $\mu\text{m}$ , la solvatación de estas perlas no es muy eficiente, y los péptidos solvatados pueden cambiar las propiedades de

hinchamiento (“swelling”) de la resina, esto sumado al carácter frágil de la resina a lo largo de la síntesis, la hacen inútil para un flujo continuo.

2. Las resinas de poliacrilamida desarrolladas por Sheppard como una alternativa hidrofílica para las resinas de poliestireno, son obtenidas mediante el entrecruzamiento de poly-N,N-dimetilacrilamida con 5% de bis-N,N'-acriloletilendiamina y como grupos funcionales N-acrilolsarcosina metil éster. Es una resina mucho más flexible que la anterior, por lo que permite un mayor entrecruzamiento. Las resinas de poliacilamida se hinchan mejor con solventes polares y tiene mejores propiedades que las de poliestireno bajo condiciones polares de síntesis. Su carácter frágil no las hace adecuadas para un flujo continuo.

3. Las resinas con polietilenglicol (PEG) incrustado fueron desarrolladas para la obtención de una resina más estable. Estas resinas también mejoran la síntesis de péptidos difíciles. Se obtienen por la reacción de oligoxietilenos con perlas de poliestireno aminometilado. Estas perlas ahora tienen la propiedad de hincharse con solventes no polares y polares, exceptuando el agua, por lo que pueden utilizarse indistintamente Boc-aminoácidos o F-moc aminoácidos. Su grado de hinchazón no cambia durante toda la síntesis, lo que las hace más estables al flujo.

4. Las resinas basadas en PEG, las cuales están compuestas exclusivamente de una red de Polietilenglicol/polipropilenglicol (PPG) o por una combinación de PEG con una pequeña cantidad de poliamida o poliestireno. Estas resinas confieren propiedades óptimas para el soporte, debido a los arreglos presentados por los enlaces entre en carbono y el oxígeno a lo largo de la cadena asumiendo 3 tipos de estructuras helicoidales. La primera esconde los átomos de oxígeno, convirtiéndola en una estructura hidrofóbica, la segunda de polaridad intermedia, y la tercera con los átomos de oxígeno expuestos por lo que es una estructura hidrofílica. Lo anterior permite que este tipo de resina sea compatible con solventes tanto polares como no polares. Las moléculas de PEG son altamente dinámicas, lo que permite que las reacciones de acoplamiento se lleven a cabo rápidamente. El carácter anfipático del PEG también impide que los péptidos se agreguen.

➔ **Soportes de superficie.** Existen muchos materiales que se utilizan para este tipo de soporte durante la síntesis de péptidos, entre los que se encuentran fibras de celulosa, poliestireno o polimetacrilato poroso altamente entrecruzado, vidrio de poro controlado, y sílices.

➔ **Geles soportados.** Surgieron debido a que los geles de poliestireno y poliamida no eran estables en las condiciones del flujo. Para incrementar su estabilidad mecánica los geles fueron apoyados en matrices rígidas, el primer ejemplo utilizado fue la diatomita, polymerizando la solución de poliamida después de la absorción dentro de los gránulos de la matriz inorgánica. Posteriormente la diatomita fue sustituida por una esponja de poliestireno entrecruzado en cuyo interior se encontraba la poliamida incrustada mediante un enlace covalente.

➔ **Cepillos poliméricos.** Son un tipo especial de polímero donde un componente lineal, como poliestireno, es incrustado en otro, por ejemplo un filme o un tubo de polietileno.

### Agentes espaciadores del péptido y la resina.

El anclaje a la resina y el posterior desprendimiento del péptido de la misma, se logra a través del uso de moléculas bifuncionales, las cuales se adhieren de manera permanente a la resina por un extremo, usualmente mediante un enlace amida, y por el otro se unen temporalmente al aminoácido que dará inicio al péptido a sintetizar mediante la formación habitual de un éster (figura 31).

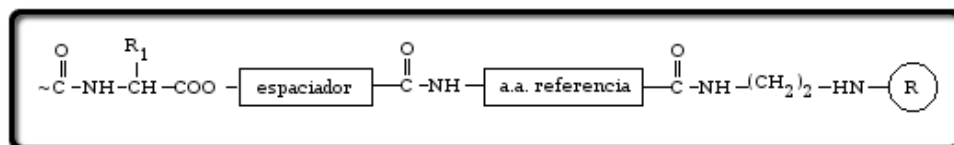
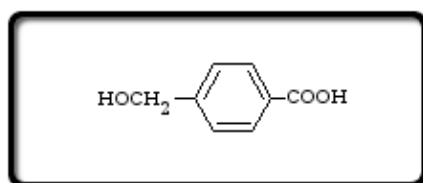


Figura 31. Esquema del uso del espaciador en SPPS

El espaciador debe formarse fácilmente, ser lo suficientemente estable a los continuas reacciones de desprotección y acoplamiento, y al mismo tiempo permitir la liberación del péptido recién formado sin dañar ninguno de sus enlaces peptídicos. Existen varios espaciadores que son usados en combinación con los Fmoc-aminoácidos de los cuales sólo se mencionarán algunos con fines ilustrativos, para más información se recomienda al lector consultar la referencia 21.

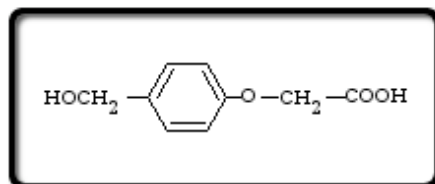
El ácido 4-hidroximetilbenzoico (figura 32), forma un éster con el primer aminoácido que es estable a ácidos anhídridos. Sobrevive tratamiento prolongado con ácidos fuertes como HF, el enlace puede romperse con reactivos nucleofílicos, como amoníaco e hidracina, lo que lo hace útil

para péptidos que tienen una amida en el C-terminal. El hecho de que sean estables a ácidos permite la desprotección de grupos protegidos “permanentemente” sin liberar el péptido de la resina, esto no sucedía en la técnica de Merrifield, donde la desprotección de los grupos permanentes y la liberación del péptido de la resina se daba en un solo paso. Aminólisis intramolecular, que conlleva a la liberación del péptido de la resina, es una posible reacción secundaria en cualquier péptido, pero especialmente con este agente espaciador cuando se forma el dipéptido, esto sucede porque la desprotección de un Fmoc-aminoácido no libera el amino terminal en su forma protonada, contrario a lo que sucede con la desprotección de los Boc-aminoácidos (figuras 9 y 6, respectivamente). Razón por la que, como regla general, la desprotección no se lleva a cabo a menos que la reacción de acoplamiento sea realizada inmediatamente.



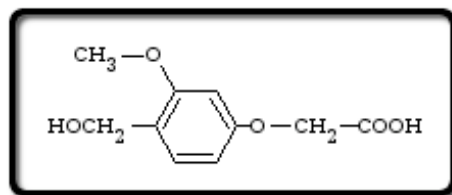
**Figura 32.** *Ácido 4-hidroximetilbenzoico*

Ácido metoxi-4-hidroximetilbenzoico (figura 33), es el espaciador más usado en la técnica de Sheppard, el grupo metoxi incrementa su labilidad, dando una reactividad comparable a los derivados del terbutilo. Los péptidos ligados a la resina por este reactivo, pueden ser liberados por TFA, de esta manera se desprotegerían los grupos permanentes a la vez que es desprendido el producto final de la resina.



**Figura 33.** *Ácido metoxi-4-hidroximetilbenzoico*

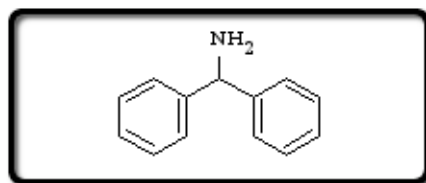
El éster que se forma entre el primer aminoácido y el ácido 1,3 dimetoxi-4-hidroximetilbenzoico, (figura 34), es mucho más lábil al ácido debido al segundo grupo alcoxi introducido, no tiene muchas aplicaciones dado a las propiedades no favorables de solubilidad que confiere a los péptidos protegidos.



**Figura 34.** *Ácido 1,3 dimetoxi-4-hidroximetilbenzoico*

La esterificación del primer aminoácido con el grupo hidroxilo del agente espaciador, es más benéfica si se hace antes de que éste sea unido a la resina, aunque esto no es fácil de lograr. Una manera de hacerlo, es mediante la conversión del grupo carboxilo del agente espaciador en un éster activado moderadamente reactivo, como el triclorofenil éster, el cual es lo suficientemente estable para no interferir con la esterificación del grupo hidroxilo al primer aminoácido, y son lo suficientemente reactivos, para posteriormente poder acilar la resina. Aunque usualmente, el espaciador es unido primero a la resina.

Existen casos especiales de péptidos en los que el extremo C-terminal contiene un grupo amida al final, para estos casos puede romperse el enlace éster formado mediante aminólisis, como se mencionó en el ejemplo del ácido 4-hidroximetilbenzoico, pero también, pueden utilizarse espaciadores que contengan un grupo amino para la formación del enlace amida con el primer aminoácido anclado a la resina, lo cual es más recomendado. Un ejemplo de estos espaciadores es la bencihidrilamina (BHA) que se muestra en la figura 35.



**Figura 35.** *Bencihidrilamina*

**Instrumentación.**

La síntesis de péptidos en fase sólida puede llevarse a cabo manualmente o de forma automática mediante el uso de equipos comerciales. El sistema más simple y menos costoso se trata de un contenedor cilíndrico en donde se encuentra la resina, todos los reactivos son adicionados manualmente y drenados de la resina mediante vacío.

Otro sistema consiste de un contenedor de la resina conectado a dos válvulas, la válvula A llena el contenedor de la resina con el líquido correspondiente que es elegido mediante la válvula B y entra al contenedor mediante presión controlada por nitrógeno, o por vacío. Dado la simplicidad del sistema, la válvula B sólo elige entre solvente para la reacción de acoplamiento, y el reactivo para la desprotección temporal de los aminoácidos (en la figura 36 se muestra piperidina, que sería utilizada en caso del uso de Fmoc aminoácidos). Cada etapa de la síntesis es llevada a cabo con agitación, una vez terminada la reacción se vacía el contenedor de la resina con la válvula A.

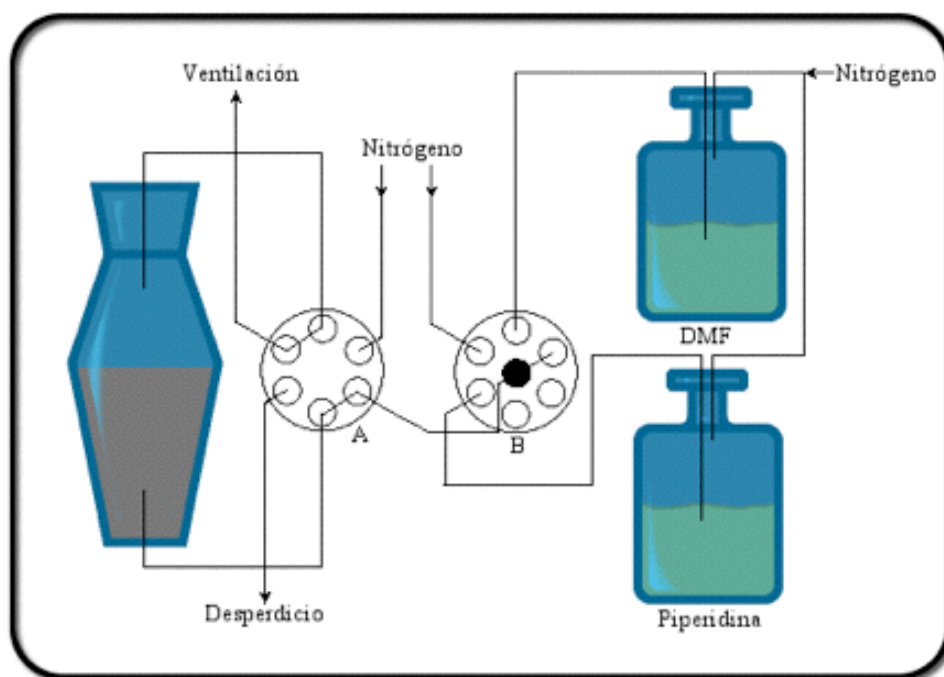
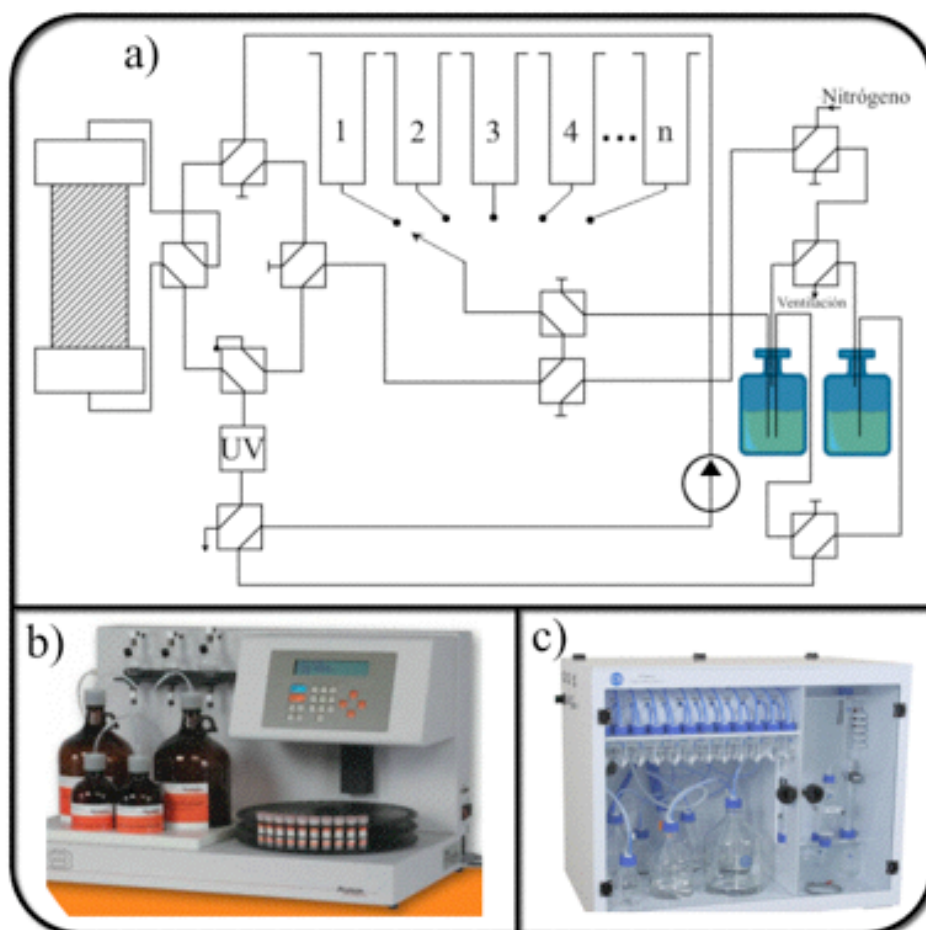


Figura 36. Esquema de un sistema manual de flujo discontinuo para SPPS (16).

La automatización de los sintetizadores de péptidos ha ido evolucionando hasta tener los modernos aparatos con los que se cuenta ahora. En un inicio eran semiautomáticos, ya que a pesar de ser de flujo continuo, requerían que los aminoácidos fueran introducidos en cada ronda. Los sintetizadores actuales son completamente automáticos, son sistemas complejos de válvulas que seleccionan el flujo que será bombeado hacia la resina dependiendo de la reacción que deba ser

llevada a cabo (figura 37a), controlados y monitoreados por una computadora externa. La computadora está provista de un software que le permite controlar las velocidades de flujo, la cantidad de aminoácidos, los tiempos de desprotección y acoplamiento de los mismos, los lavados y si alguna de las etapas de la síntesis debe ser repetida. Algunos también cuentan con un espectrofotómetro el cual monitorea la concentración de los reactivos en la corriente de salida. Las botellas con los reactivos son presurizadas con nitrógeno sólo para una purga inicial de los reactivos para que éstos no tapen la bomba.



**Figura 37.** Equipos automáticos para SPPS. a) Esquema de flujo del primer sistema automatizado (16), b) Sintetizador de péptidos Ps-3 con computadora integrada ([www.pti-instruments.com/images/PTI\\_PS-3.pdf](http://www.pti-instruments.com/images/PTI_PS-3.pdf)), c) Sintetizador de péptidos a baja escala CS136XT (<http://www.csbio.com/cs136xt.html>).

---

## CAPÍTULO VI

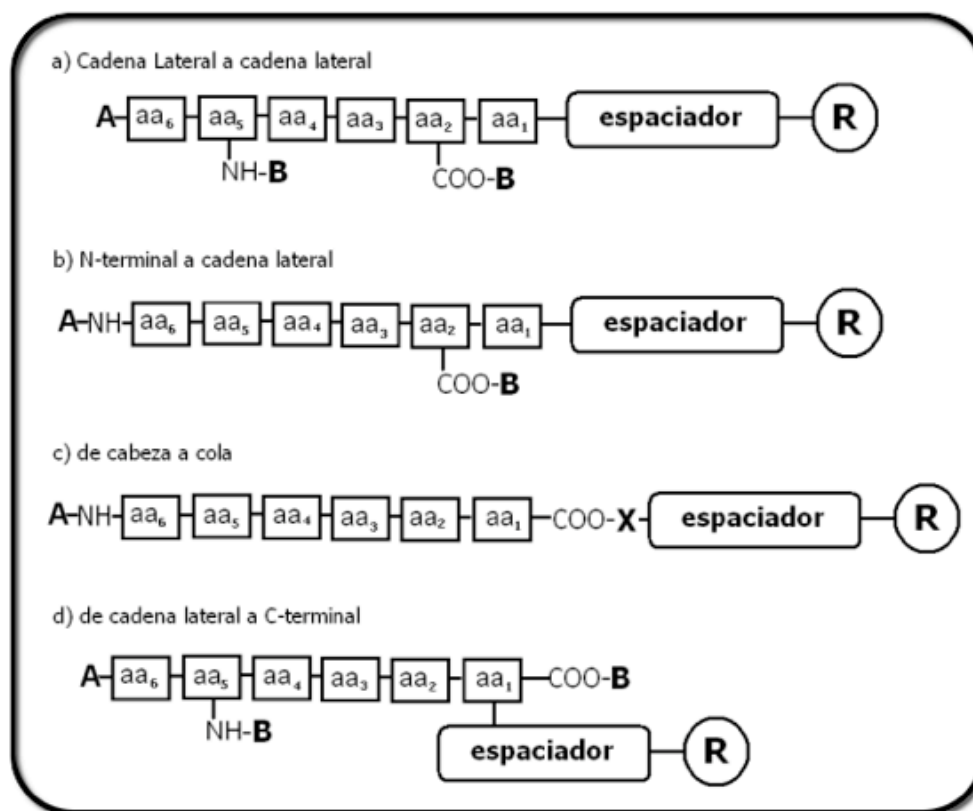
### CASOS ESPECIALES DE SÍNTESIS.

#### Síntesis de péptidos cíclicos.

Existen dos clases de péptidos cíclicos, a continuación se da una explicación más detallada de lo que son y cómo se sintetizan.

➔ **Péptidos cíclicos por un enlace entre un grupo amino y un carboxilo.** Dada la enorme variedad de péptidos naturales que presentan secuencias de aminoácidos cíclicas, como antibióticos y toxinas, surgió el interés por sintetizarlos de esta forma para obtenerlos funcionales. Durante la era de la síntesis de péptidos en solución, la ciclación era llevada a cabo al final de la síntesis, más tarde, con el surgimiento de la SPPS, los péptidos eran sintetizados linealmente en la resina, para su posterior ciclación en solución, sin embargo hacerlo en solución tiene grandes desventajas, ya que pueden obtenerse dímeros u oligómeros del péptido a ciclar, para evitarlo, usualmente se realiza en condiciones en las cuales el péptido se encuentra muy diluido. Posteriormente se observó que esto no ocurría si el péptido estaba anclado a la resina, ya que las interacciones intramoleculares se ven favorecidas sobre las intermoleculares, debido a la distancia entre las cadenas. Otra de las ventajas observadas es que las reacciones pueden llevarse a cabo hasta ser completadas por el uso de un exceso de reactivos y ser simplemente removidos en los lavados subsecuentes.

La formación del anillo a través de un enlace amida entre un grupo amino y un grupo carboxilo, puede ser de 4 tipos: (1) *de cabeza a cola*, que se da mediante la unión del amino terminal con el carboxilo terminal, (2) *de cadena lateral a cadena lateral*, mediante la unión de un grupo amino de una cadena lateral de lisina con el grupo carboxilo de la cadena lateral de un ácido aspártico o glutámico, (3) *de amino terminal a cadena lateral*, entre el amino terminal y carboxilo de la cadena lateral de los ácidos aspártico o glutámico y finalmente (4) *de cadena lateral a carboxilo terminal*, que se da entre el  $\epsilon$ -amino de la lisina y el carboxilo terminal.



**Figura 38.** Opciones para la formación de péptidos cíclicos. Donde A es el grupo temporal usado comúnmente en SPPS, B es un grupo semipermanente que guiará la formación del enlace amídico entre los aminoácidos correspondientes, y X es el grupo permanente que une al primer aminoácido con la resina.

En la figura 38 se observan las distintas estrategias para la síntesis de un péptido cíclico en fase sólida, la resina que es usada con preferencia es la de poliestireno con PEG incrustado, aunque también se ha utilizado con éxito las de poliamida que tengan una matriz de soporte. La elección del agente espaciador debe hacerse con cuidado, principalmente si se necesita adjuntar el primer aminoácido a través de su cadena lateral (figura 38 d), y en la literatura se encuentran varios ejemplos. Pero el aspecto más importante que hay que cuidar cuando se va sintetizar un péptido cíclico, es la elección de la combinación de los grupos protectores a utilizar. En este caso, no sólo necesitaremos el grupo protector temporal del  $\alpha$ -amino, y los permanentes del carboxilo unido a la resina y las cadenas laterales, sino que además necesitaremos un tercer grupo protector semipermanente (cuando la formación del anillo no se dé entre el amino terminal y el carboxilo terminal), que sea ortogonal a los otros dos, el cual va a estar unido a los grupos que formarán parte de enlace que generará el anillo al final de la síntesis. Un ejemplo de esto puede ser la elección de los derivados del grupo bencil como permanentes, el grupo F-moc como semipermanente y el Boc como grupo temporal. Es importante tener en cuenta, que de la combinación de

grupos protectores que se haga, dependerá también la elección de la resina, pues no todas son compatibles con los solventes utilizados en la desprotección temporal, aunque las de poliestireno con PEG incrustado pueden ser usadas independientemente si el grupo protector temporal es Boc o Fmoc. Finalmente, la formación del enlace amida se da con la ayuda de un reactivo activador, como para la formación del enlace peptídico, usualmente su ocupa DCC.

➔ **Péptidos cíclicos por puentes disulfuro.** Los puentes disulfuro juegan un papel importante en el plegamiento y la estabilidad de algunas proteínas, entre las que se incluyen hormonas, enzimas, factores de crecimiento, toxinas, entre otras. Por lo tanto, la introducción artificial de este tipo de enlace a péptidos o proteínas pequeñas sintetizadas en el laboratorio, servirá para mejorar sus actividades biológicas, así como su especificidad y estabilidad.

Los puentes disulfuro intramoleculares unen porciones de la cadena polipeptídica que se encuentran muy lejanas la una de la otra, estos pueden formarse en solución o mientras el péptido se encuentra adherido a la resina, pero al igual que en los péptidos cíclicos de la sección anterior, cuando la formación del enlace se da en solución, ésta debe estar altamente diluida para evitar la formación de puentes disulfuro intermoleculares y por consecuencia, evitar formación de dímeros u oligómeros.

Para la formación de los puentes disulfuro, pueden tomarse dos caminos. El primero de ellos es la oxidación de los grupos tiol de las cisteínas libres, es decir, al finalizar la síntesis del precursor lineal, se realiza la desprotección de todos los grupos protectores permanentes, incluidos los de las cisteínas presentes, posteriormente el péptido es sometido a diferentes condiciones para lograr la formación del puente disulfuro, entre las cuales destacan:

1. Por oxidación con aire, que es la más fácil de realizar, pues sólo necesita el oxígeno presente en la atmósfera. Generalmente se realiza bajo condiciones levemente alcalinas. Entre las desventajas que presenta se encuentran: la cantidad de tiempo que necesita el proceso para completar la reacción (más de cinco días), la inadecuada solubilidad de algunos péptidos a pH básico y acumulación de productos secundarios debido a que también pueden oxidarse residuos de metionina.
2. Por oxidación en presencia de amortiguadores Redox, la cual aumenta la velocidad y la producción de la reacción, con respecto a la oxidación con aire.
3. Por oxidación mediada por ferricianida de potasio, que es un reactivo oxidante muy suave usado ampliamente. Es sensible a la luz, por lo que se logran mejores

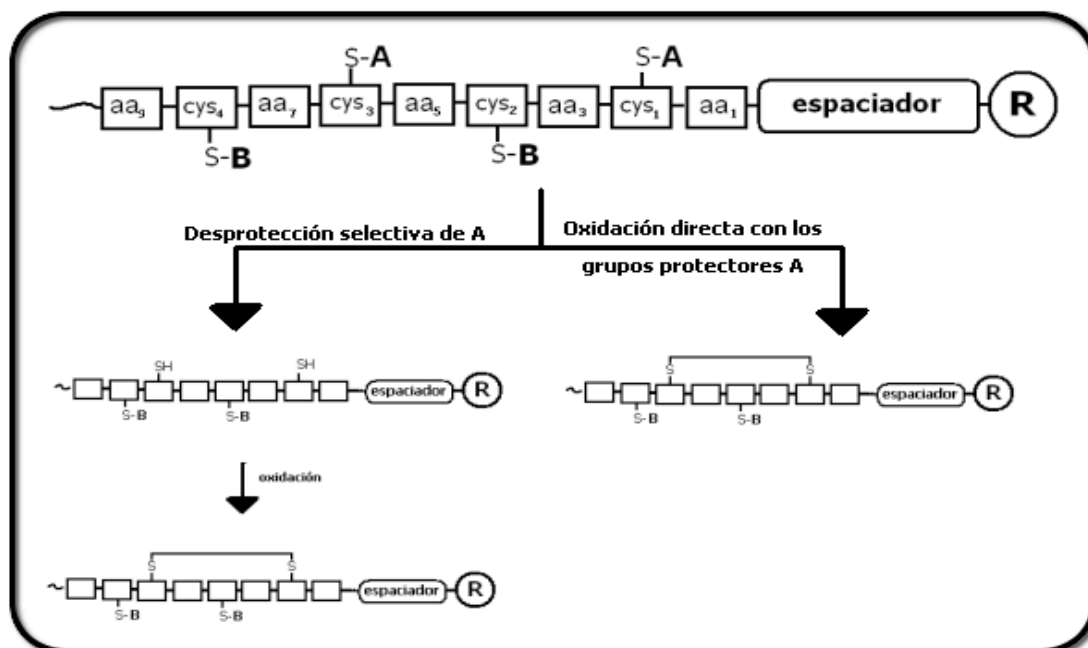
resultados si la reacción se lleva a cabo en la oscuridad. Puede oxidar otras cadenas laterales como la de metionina o triptófano.

4. Por oxidación con dimetilsulfóxido (DMSO), que puede ser llevada a cabo en un rango de pH más amplio (3-8) que el que se requiere para la oxidación por aire. Pueden usarse grandes concentraciones para acelerar la reacción, pues no se ha observado que afecte a las cadenas laterales nucleofílicas como metionina, tirosina o triptófano, sin embargo, puede ser problemático deshacerse de él en el producto final

La segunda opción para formar el puente disulfuro, es oxidando directamente las cisteínas protegidas:

1. Oxidación por el ion yoduro. Los reactivos utilizados como fuente del ion son N-iodosuccinimida y el yoduro de cianógeno. Los grupos protectores utilizados para esta técnica usualmente son el S-Trt y el S-Acm (uno por cisteína participante en el enlace). Puede oxidar otros aminoácidos como Tirosina, metionina y triptófano, lo cual puede evitarse utilizando el solvente adecuado y controlando el pH.
2. Trifluoracetato de talio (III). Puede usarse en sustitución al anterior, dando incluso mejores resultados en la producción y pureza de los puentes disulfuro formados. Sin embargo, es altamente tóxico. No afecta aminoácidos como histidina o tirosina, pero sí a metionina y a triptófano por lo que éstos deben estar protegidos si se utiliza esta técnica. Funciona si ambas cisteínas tienen el grupo protector Acm o Tmob, pero no si tienen Trt. El talio es difícilmente removible de el producto final.
3. Oxidación por sulfóxido y clorosilano. Una mezcla de estos dos reactivos pueden desproteger y formar puentes disulfuro a partir de varios grupos protectores del grupo tiol, como Acm, terbutilo, Mob, Meb, etc. La mezcla para la formación óptima del puente disulfuro, depende del grupo protector. El único aminoácido que puede verse afectado usando esta técnica es el triptófano, por lo que debe permanecer protegido cuando se lleve a cabo.

Si en la secuencia del péptido existen más de dos cisteínas debe cuidarse de que se forme el puente disulfuro correcto (figura 39). Para el caso en que más de un puente disulfuro deba formarse, debe plantearse una estrategia para lograr formar las combinaciones correctas, por lo que se usan grupos protectores ortogonales. Debe formarse un puente disulfuro a la vez, ya sea por oxidación directa de los grupos tiol, o por oxidación en presencia de los grupos protectores. La elección de la técnica para la formación de cada puente disulfuro, dependerá de las necesidades que presente cada caso.



**Figura 39.** Formación del puente disulfuro correcto mediante la protección de las cisteínas no participantes, con grupos protectores distintos a los usados para las cisteínas participantes.

### Síntesis de glicopéptidos.

Se han hecho muchos esfuerzos para la síntesis de glicopéptidos dada la importancia biológica de estos junto a las glicoproteínas. En un inicio, la glicosilación era añadida después de terminada la síntesis del péptido, y aunque esto podía ser logrado con los N-glicopéptidos, era muy difícil lograrlo para los O-glicopéptidos. Afortunadamente, se han desarrollado métodos eficientes para la obtención de aminoácidos glicosilados, de esta manera, pueden incorporarse mediante elongación gradual a la cadena polipeptídica creciente sin temor al que el impedimento estérico inhiba el acoplamiento, pues incluso se han acoplado aminoácidos con heptasacáridos con resultados positivos.

Los grupos protectores de los aminoácidos glicosilados deben ser escogidos considerando que los enlaces glicosídicos son muy lábiles a ácidos, y que péptidos glicosilados en serina y treonina pueden perder la glicosilación, mediante eliminación  $\beta$ . El grupo amino protector más utilizado para la incorporación de aminoácidos glicosilados, es el grupo Fmoc. El riesgo que corren los aminoácidos glicosilados serina y treonina a perder el azúcar debido a que la desprotección del grupo Fmoc se lleva a cabo con piperidina, puede reducirse con el uso de morfolina, sin embargo, es menos eficiente para la desprotección que la piperidina, y algunos expertos en el tema consideran que el temor a que suceda la eliminación  $\beta$  usando piperidina es exagerado. Por otro lado, los grupos hidroxilo del carbohidrato pueden protegerse con cualquier grupo acilo,

preferentemente un bencil éter, o con un grupo silil o isopropilideno, aunque pudieran incluso dejarse sin protección.

### **Síntesis de péptidos fosforilados.**

Este tipo de péptidos pueden obtenerse acoplado los aminoácidos Tyr, Thr o Ser previamente fosforilados, los cuales se encuentran comercialmente disponibles tanto para la síntesis de Boc aminoácidos, como para los Fmoc aminoácidos, aunque también pueden ser sintetizados en el laboratorio (ver referencia 26).

➔ **Síntesis en fase sólida para péptidos con fosfotirosina.** Las tirosinas empleadas en la síntesis de Sheppard son de la forma Fmoc-Tyr( $\text{PO}_3\text{R}_2$ )-OH, donde R puede ser un grupo metilo, bencilo o terbutilo, y para ser acoplados requieren el uso de sales de fosfonio, siendo BOP el reactivo preferencial. En el caso de las Boc tirosinas, R sólo puede corresponder al grupo metilo, toda vez que los otros dos grupos son utilizados para protección temporal y permanente en otras etapas de la síntesis, Boc-Tyr( $\text{PO}_3\text{Me}_2$ )-OH son compatibles con cualquier agente acoplante. La liberación de los grupos R de las tirosinas fosforiladas se da al final de la síntesis, de manera análoga a la que se da para desproteger otros grupos que contienen protección metilo, bencilo y terbutilo y que han sido previamente explicadas, de ahí que en caso de la síntesis de Sheppard y utilizando Fmoc-Tyr( $\text{PO}_3\text{tBu}_2$ )-OH, el rompimiento del péptido de la resina y la liberación del grupo terbutilo de la tirosina fosforilada se den al mismo tiempo debido al tratamiento con TFA.

➔ **Síntesis en fase sólida para péptidos con fosfoserina y fosfotreonina.** Los aminoácidos utilizados la síntesis Boc para el acoplamiento de fosfoserina o fosfotreonina son del tipo Boc-Ser( $\text{PO}_3\text{R}_2$ )-OH, donde R puede ser un grupo metilo o un grupo arilo. El acoplamiento puede ser llevado a cabo usando tanto DCC como BOP, la desprotección de los grupos permanentes utilizando HF puede ocasionar desfosforilación cuando R es un grupo arilo, aunque puede ser utilizado teniendo en cuenta que el rendimiento no será muy alto. Para la síntesis de Sheppard, los grupos R son H o bencilo y el acoplamiento es llevado a cabo con una sal de fosfonio.

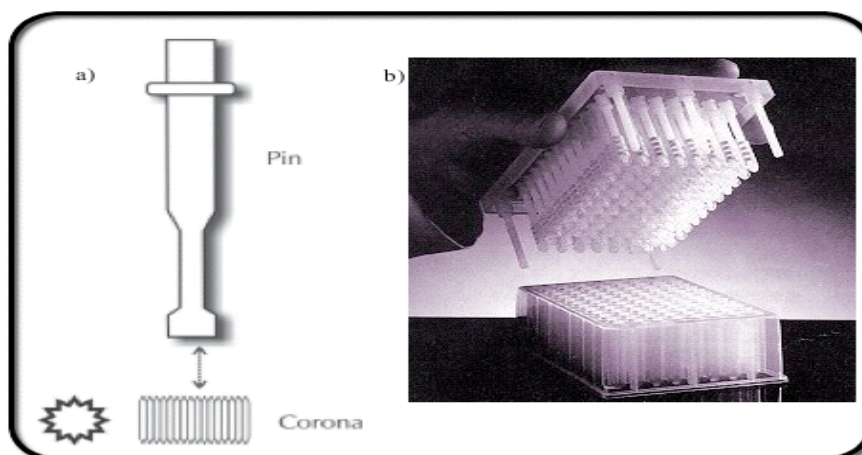
Otra alternativa de obtener péptidos fosforilados, cuyo uso ha sido limitado, es fosforilando posterior a la síntesis del péptido. Esto se logra con el uso de dialquil N,N dietilfosforamiditas después de haber secado la resina por vacío (dado que el reactivo fosforilante puede reaccionar con agua), utilizando DMF como solvente. Se ha encontrado especial aplicación para fosforilar de esta forma péptidos que contienen tirosinas, ya que éstas se fosforilan rápidamente.

### Bibliotecas de péptidos sintéticos.

Las bibliotecas de péptidos sintéticos tienen múltiples aplicaciones como lo son la identificación de ligandos, identificación de epítopos de unión a anticuerpos, desarrollo de vacunas y medicamentos, etc. Las bibliotecas pueden ser obtenidas mediante SPPS, por lo que se toman en cuenta los mismos parámetros que para la síntesis de un único péptido. Entre los soportes sólidos más utilizados se encuentra el soporte de polidimetilacrilamida con una incrustación de poliestireno (Tentagel), el de poliestireno entrecruzado con divinilbenceno (soporte de Merrifield), celulosa, e incluso vidrio. Los grupos protectores que se usan habitualmente son aquellos utilizados en la síntesis de Sheppard (Fmoc/*t*-butil), aunque dependiendo de la técnica que se lleve a cabo para la construcción de la biblioteca los grupos protectores pueden variar.

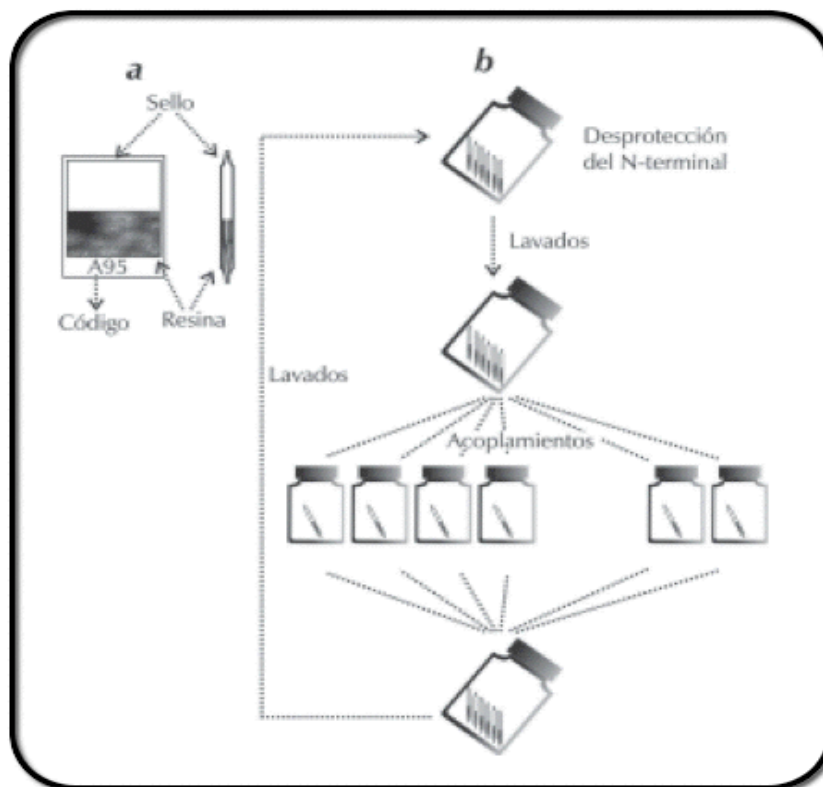
A continuación se mencionan algunas de las técnicas utilizadas para obtención de la síntesis de péptidos múltiple:

➔ **Síntesis en multipines.** Fue el primer método desarrollado para la síntesis de péptidos múltiple, ya que pueden sintetizarse hasta 96 péptidos a la vez. Consiste en el ensamblaje del cuerpo de plástico de los pines con una matriz polimérica (de poliestireno o poli(acrilamida)), llamada corona, sobre la cual irá adherido el aminoácido que iniciará la síntesis peptídica. Posteriormente cada “pin” será sumergido en un pozo distinto con un aminoácido diferente, el cual será acoplado (figura 40). Y así consecutivamente hasta llegar el número de aminoácidos que se desee. Cada uno de los pines tendrá un péptido de secuencia conocida y pueden llevarse a cabo ensayos de unión mientras el péptido siga unido al “pin” o liberándolos en solución.



**Figura 40.** Síntesis de bibliotecas peptídicas en multipines.  
 a) Imagen de uno de los “pines” sobre los que se realiza la síntesis multi-peptídica (27).  
 b) Imagen de la placa y los 96 multipines  
 (<http://www.kriect.re.kr/~shhwang/combimd.html>).

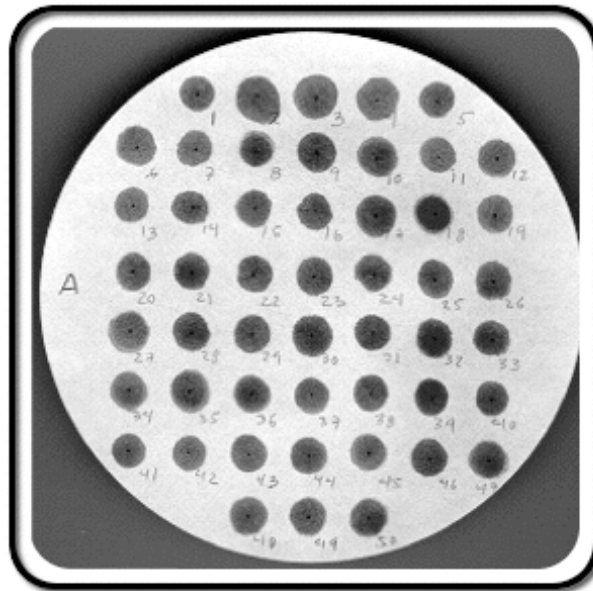
➔ **Síntesis en bolsas de polipropileno.** Fue desarrollada por Richard A. Houghten y se conoce popularmente como síntesis en bolsas de té, dada la semejanza que presentan con las bolsas de polipropileno que son utilizadas para realizar esta técnica. Consiste en poner dentro de las bolsas una resina que usualmente es de 4-metilbencilhidrilamina (MBHA), cada bolsa se etiqueta para identificar el péptido que se va a sintetizar dentro de ella. Las etapas de desprotección y los lavados se realizan en un contenedor con todas las bolsas juntas. Para el acoplamiento se separa cada bolsa para unir el aminoácido respectivo, y así sucesivamente hasta completar la secuencia (figura 41).



**Figura 41.** Esquema general de la síntesis de bibliotecas peptídicas por la técnica de las bolsas de té (27).

➔ **Síntesis sobre membranas de celulosa.** Esta técnica desarrollada por Ronald Frank, consiste en la utilización de la superficie de una membrana de celulosa como soporte sólido para la síntesis de los distintos péptidos. Para la funcionalización de la superficie de la membrana se fija Fmoc-β alanina, usualmente por esterificación del aminoácido con los grupos hidroxilo de la celulosa, de esta manera puede procederse ahora al ensamblaje de las secuencias peptídicas. Las partes de la membrana en las que no se unió este aminoácido, quedan inactivadas por acetilación. La membrana de celulosa es ahora marcada con un lápiz para la identificación de cada uno de los péptidos. Cada aminoácido protegido se

disuelve en dimetilformamida o dimetilacetamida y es colocado sobre la marca correspondiente. Esta mezcla va difundiendo sobre la membrana creando un círculo de diámetro proporcional al volumen que dispersa. Los lavados y la etapa de desprotección se llevan a cabo sobre toda la membrana. La etapa de acoplamiento se va repitiendo para cada aminoácido sobre el punto que le corresponde y puede ser monitoreada con azul de bromofenol. Esto se repite hasta tener las secuencias deseadas. (figura 42)



**Figura 42.** Síntesis de una biblioteca de péptidos sobre una membrana de celulosa (27).

➔ **Síntesis por fotolitografía.** Esta tecnología para la producción de chips para computadoras es utilizada para la producción de bibliotecas peptídicas. La superficie de un vidrio es funcionalizada con aminopropiltrietoxisilano, posteriormente se hace reaccionar la superficie con el ácido Nvoc-N-amino-hexanoico. Se empieza el acoplamiento del respectivo aminoácido, los cuales deben estar forzosamente protegidos con el grupo Nvoc (nitroveratrilo-carbonilo), pues la desprotección se realiza irradiando con luz ultravioleta de 365 nm a través de una pantalla litográfica, y este grupo protector se elimina fácilmente mediante este procedimiento. Posteriormente, la superficie es lavada y se hace reaccionar con el siguiente aminoácido.

➔ **Síntesis por el método “una perla, un componente”.** A diferencia de las técnicas anteriores, utilizando este método se desconocen las secuencias de los distintos péptidos que se están sintetizando. Esta técnica se basa en el hecho de que cada perla de una resina sólo encontrará un aminoácido para reaccionar. La resina más utilizada es TentaGel,

aunque en general cualquier resina compatible con solventes orgánicos puede ser utilizada. La resina entonces es dividida en 19 alícuotas, las cuales serán contenidas en frascos de polipropileno, y se agrega a cada frasco un aminoácido presente en las proteínas (con excepción de cisteína). Las alícuotas entonces se juntan y se lleva a cabo la desprotección de los aminoácidos, vuelven a separarse 19 alícuotas y se les hacen pasar 1 de los 19 aminoácidos. El proceso se repite juntando las alícuotas para llevar a cabo la etapa de desprotección, y separándolas para el acoplamiento.

---

## CAPÍTULO VII

### PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS.

#### **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).**

Esta herramienta ha sido muy útil para la purificación y caracterización de péptidos. Es capaz de separar el péptido de interés de una mezcla formada durante la SPPS, incluso si el producto esperado se encuentra contaminado con un péptido al que sólo le hace falta un aminoácido. Los tipos principales de HPLC utilizados para la separación de péptidos son:

➔ **Cromatografía por exclusión de tamaño.** Este tipo de cromatografía también conocida como filtración en gel, no es una técnica muy efectiva para separar péptidos contaminantes del péptido de interés, a menos que haya una diferencia importante en el tamaño (aunque ya se han diseñado columnas que pueden separar péptidos con masas moleculares del rango de 100-7000 Da). Pese a ser la menos efectiva de las cromatografías utilizadas, puede ser implementada en las primeras etapas del proceso de purificación, sobretodo si lo que se desea es deshacerse de otro tipo de contaminantes como los grupos protectores o agentes acoplantes.

➔ **Cromatografía de intercambio iónico.** Es muy útil para separar mezclas de péptidos, particularmente cuando especies cargadas han sido removidas de la secuencias esperada. Puede ser capaz de separar especies cargadas que difieren por sólo una carga neta. Para purificación de péptidos sintéticos es usada con mayor frecuencia una columna de intercambio catiónico.

➔ **Cromatografía de fase reversa.** Es el método más utilizado para separar péptidos debido a que es generalmente superior a los otros dos en velocidad y eficiencia. Ofrece un amplio rango de manipulación de las características de la fases móvil y estacionaria para mejorar las separaciones peptídicas entre los que se encuentran:

1. Variación de los grupos funcionales de la fase estacionaria. Los ligandos funcionales que usualmente se encuentran en la fase estacionaria de RP-HPLC con cadenas hidrocarbonadas de 8 o 18 carbonos; sin embargo, algunos contaminantes como grupos protectores, agentes acoplantes no son exitosamente separados. Péptidos muy hidrofóbicos también presentan problemas para purificarse, ya que las interacciones con los compuestos acoplados a la fase estacionaria son muy fuertes. Para solucionar ambos

problemas mencionados, se ha optado por sustituir los hidrocarburos de 8 átomos de carbono por cianopropil, el cual ha resultado muy eficiente para la purificación de los casos expuestos.

2. Efecto de las sales en la fase móvil. La adición de sales a la fase móvil, generalmente de 50 a 100 mM, en un rango de pH aproximado de 4-7, es tradicionalmente utilizado para suprimir las interacciones de grupos silanol libres con solutos positivamente cargados.
3. Efecto de la elevación de la temperatura en la purificación. Los tiempos de retención del péptido en la columna cromatográfica decrecen cuando se incrementa la temperatura, mejorando la resolución del péptido. Aumentar la temperatura previene posibles agregados del péptido y lo hace más soluble, lo que facilita su elución, especialmente si el péptido a purificar es altamente hidrofóbico. Una desventaja del incremento de la temperatura es que reduce el tiempo de vida de la columna.

Combinaciones entre las cromatografías antes descritas, pueden ofrecer una purificación más eficiente.

---

## CAPÍTULO VIII

### HERRAMIENTAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS.

#### **Análisis de aminoácidos.**

Es el método más antiguo para la caracterizar péptidos, el cual aún es comúnmente utilizado para determinar el estado de la síntesis antes de que ésta llegue a término, y en caso de que se presente algún error detener la síntesis y volver a fabricar el péptido. El análisis de aminoácidos comprende tres etapas:

➔ **Preparación de la muestra e hidrólisis.** Cuando se desea conocer el contenido absoluto del péptido, la muestra debe ser secada y pesada dentro de un tubo para hidrólisis. Si sólo desea conocer la composición, entonces solamente se requiere un estimado inicial de la cantidad de péptido. Las condiciones estándar para la hidrólisis del péptido son 6N de HCl a 110° C por 24 horas tanto en fase líquida como en fase gaseosa. Si lo que se va a analizar es un péptido aún unido a la resina, se utiliza una mezcla 1:1 de HCl/ácido propiónico 12 N a 150° C, reduciendo el tiempo a sólo 90 minutos. No todos los aminoácidos pueden ser recuperados por las condiciones estándares de hidrólisis, cisteína y triptófano son totalmente destruidos. En caso de tener estos aminoácidos en la secuencia es recomendable utilizar otros métodos de hidrólisis.

➔ **Separación y derivatización.** En la metodología original, comúnmente denominada química postcolumna, los aminoácidos son separados por cromatografía de intercambio iónico y su visualización es llevada a cabo por la reacción con un cromóforo. En la química precolumna, los aminoácidos son derivatizados directamente en el hidrolizado y la separación es llevada a cabo mediante RP-HPLC.

➔ **Análisis de los datos e interpretación.** El reporte de los datos de un análisis típico de aminoácidos, arroja los aminoácidos en el orden en que se eluyeron, e indica la cantidad que estaba presente en la alícuota, si de ésta eran 50 µl el resultado se dará en nanomoles/50 µl. Estos datos deben entonces ser comparados con la composición teórica de la muestra. Si se requiere cuantificación absoluta, los datos del análisis deben ser corregidos para la cantidad de muestra que fue analizada, las cantidades de cada aminoácido tienen que ser

convertidas a pesos para la comparación con el peso original de la muestra. Durante el análisis podemos obtener información acerca de la cantidad de norleucina, de donde podemos conocer el porcentaje de resina analizado y nos proporciona un control para conocer que porcentaje de la resina está siendo utilizado para la producción del péptido,

### **Degradación de Edman.**

Este método para determinar la secuencia de aminoácidos en un péptido o proteína, puede ser utilizado para analizar un péptido sintético incluso si este aun se encuentra adherido a la resina. Sin embargo, no produce datos útiles en la región C-terminal. Consiste en la degradación repetitiva de los péptidos a partir de una reacción con el grupo amino terminal libre y con fenil isotiocianato (PITC) en condiciones alcalinas suaves formando feniltiocarbamilo, el producto es entonces tratado con ácido fluorhídrico para liberar el aminoácido que ha reaccionado del resto de la cadena peptídica mediante la formación de un derivado de tiazolinona, el cual es convertido a un derivado más estable (un aminoácido PHT) por la adición de TFA. Como consecuencia el péptido tiene ahora un nuevo residuo amino terminal listo para repetir el ciclo. La identificación de los PHT-aminoácidos es usualmente llevada a cabo por RP-HPLC.

Los péptidos que ya han sido liberados de la columna y que son analizados por esta metodología no presentan ninguna consideración especial, no así cuando el péptido analizado aun se encuentra adherido a la columna. Debido a que este método requiere del grupo amino libre, los grupos protectores utilizados en la síntesis para proteger al  $\alpha$ -amino deben ser removidos o de otra forma no será posible analizar el péptido sintetizado mediante la degradación de Edman. Con respecto a los grupos protectores de las cadenas laterales, éstas sólo tendrán un efecto durante la identificación del aminoácido, ya que los grupos protectores tienden a hacer las cadenas laterales más hidrofóbicas; por la tanto el gradiente utilizado para eluir los PTH-aminoácidos en RP-HPLC deben extenderse, aunque esto no sucede si tales grupos protectores son derivados de Boc, pues los aminoácidos serán desprotegidos por el uso de TFA durante la fase final.

Los residuos de cisteína no pueden ser detectados por este método a menos que sean modificados, usualmente se utiliza acrilamida o bromopropilamina para derivatizarlos. Cuando el análisis es hecho en la resina, estos residuos pueden ser muy problemáticos, pues muchos de los grupos protectores utilizados para cisteína durante la síntesis no son estables a la química de Edman. La glutamina se cicla en condiciones ácidas para formar una estructura de piroglutamato, lo que hace que el péptido sea bloqueado y el análisis de la secuencia no pueda llevarse a cabo.

**Electroforesis capilar.**

Esta técnica analítica basada en la separación de moléculas debido a su carga, y en menor medida en su tamaño, es ampliamente utilizada para la caracterización de péptidos, sobre todo cuando es aplicada en combinación con espectrometría de masas, HPLC y análisis de aminoácidos. Gracias a los fenómenos de migración electroforética y el flujo electroosmótico que interactúan, y a que pueden aplicarse altos voltajes (dado a la capacidad que tiene el capilar para disipar calor), hacen de ésta, una técnica muy versátil, rápida, eficiente y con una alta capacidad de resolución. En la síntesis de péptidos se utiliza para analizar si el producto final no presenta contaminantes como péptidos con supresiones, o truncados. De igual manera, es utilizada para monitorear remoción de los grupos protectores, esto es posible debido a que las separaciones en la electroforesis capilar son llevadas a cabo en condiciones de pH bajo (usualmente un pH entre 2 y 3) y mientras el péptido está protegido la carga neta del mismo difiere de cuando no lo está. También es aplicada para observar la formación o rompimiento de un puente disulfuro, por un cambio en la forma (ciclación) del péptido.

**Espectrometría de masas.**

La espectrometría de masas es una herramienta muy apreciada para el análisis de péptidos sintéticos, dada su sensibilidad, velocidad y alto grado de especificidad molecular. Las técnicas de ionización utilizadas para el análisis de péptidos son el bombardeo rápido de átomos (FAB por sus siglas en inglés), electrospray (ESI) y desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI).

➔ **FAB.** Fue la primera técnica de ionización utilizada para la caracterización de péptidos sintéticos. La muestra es ionizada debido al impacto que recibe por un rápido haz de partículas de xenón. La elección de la matriz es determinante para el evento de ionización, toda vez que sirve de mediador de la transferencia de energía hacia el analito y reduce el daño por radiación que sufriría irremediablemente el analito en ausencia de la matriz, las matrices comúnmente utilizadas en FAB para el análisis de péptidos sintéticos son glicerol, tioglicerol y alcohol nitrobenzilico.

➔ **ESI.** Para que los iones sean producidos mediante esta técnica, se induce a la formación de gotas al hacer pasar las moléculas en solución por una boquilla en presencia de un campo eléctrico. Dado que el analito se encuentra disuelto en una sustancia muy volátil, los iones se forman cuando el solvente se ha evaporado. Ha sido particularmente utilizada para caracterizar bibliotecas de péptidos.

➔ **MALDI.** En esta técnica de ionización, los analitos son cocrystalizados, por lo general, con una matriz aromática. Los iones se forman al irradiar un láser de nitrógeno de 337 nm sobre la muestra. La matriz actúa como intermediaria para transferir energía del láser al analito, además juega un papel fundamental en ceder protones al mismo. Las matrices más utilizadas son la matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, para péptidos pequeños y para péptidos más grandes la matriz de ácido 2-(4-hidroxifenilazol) benzoico.

Todas estas técnicas de ionización son utilizadas para determinar el peso molecular del péptido sintetizado con gran precisión. Es recomendable determinar el peso molecular del producto antes de la purificación, de esta manera, es posible conocer el estado de pureza del producto, si no existen mezclas de péptidos truncados contaminantes, o si la desprotección del péptido ha sido satisfactoria (analizando el producto final, o monitoreando etapas intermedias de la síntesis). En caso contrario, este análisis previo por espectrometría de masas, puede dar información para volver a sintetizar el péptido, cambiando las condiciones de desprotección y/o acoplamiento. Para tener una mejor caracterización del péptido sintetizado, una vez determinado el peso molecular del producto en crudo, se purifica y se vuelve a determinarse el peso molecular. Además, gracias a la espectrometría de masas se puede monitorear la ciclación de los péptidos por un puente disulfuro, pues es factible observar la pérdida de dos unidades de masa debido a la formación de este tipo de enlace.

También es posible determinar la secuencia del péptido sintetizado, esto se lleva a cabo mediante la espectrometría de masas en tándem, en donde un ión producido previamente por una de las técnicas antes mencionadas, es disociado por colisiones con un gas. Los iones fragmentados son obtenidos a partir del rompimiento de los enlaces de la cadena peptídica, generando iones con el N-terminal y con el C-terminal, y a partir de una serie completa de los iones fragmentados la secuencia de aminoácidos puede ser deducida.

---

## BIBLIOGRAFÍA.

### CAPÍTULO I

1. MERRIFIELD Bruce. **Concept and early development of solid-phase peptide synthesis.** . (1997). Methods in Enzymology. 289:3-13.
2. MORRISON Robert y Neilson Boyd. **Química Orgánica.** 5ta Edición. Addison Wesley Longman. México. 1998. pp. 123-137,1323-1334, 1339-1341.
3. The Nobel Foundation. **Emil Fischer Biography:The Nobel Prize in Chemistry 1902.** [en línea] [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1902/fischer-bio.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1902/fischer-bio.html)
4. The Nobel Foundation. **Bruce Merrifield Biography:The Nobel Prize in Chemistry 1984.** [en línea] [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1984/merrifield-bio.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1984/merrifield-bio.html)
5. VOET Donald and Judith Voet. **Biochemistry.** 2nd Edition. John Willey & Sons, Inc. United States of América. (1995). pp, 107-109, 134-136.

### CAPÍTULO II

6. ATHERTON E. and R.C. Sheppard. **Solid Phase Peptide Synthesis: a practical approach.** IRL Press: Oxford University Press. pp. 4-8.
7. ANNIS Ioana, Hargittai Balazs, Barany George. **Disulfide bond formation in peptides.** Methods in Enzymology. (1997). 289:198-221.
8. JONES John. **Aminoacids and Peptide Synthesis.** 2nd Edition.Oxford Science Publications. Great Britain. 2002. pp. 13-24,43-52.
9. MORRISON Robert y Neilson Boyd. **Química Orgánica.** 5ta Edición. Addison Wesley Longman. México. 1998. pp.542-544,842-874,1340-1341.

### CAPÍTULO III

10. ALBERCIO Fernando, Carpino Louis. **Coupling reagents and activation.** Methods in Enzymology. (1997). 289:104-126.

11. ATHERTON E. and R.C. Sheppard. ***Solid Phase Peptide Synthesis: a practical approach***. IRL Press: Oxford University Press. pp. 8-12.
12. JONES John. ***Aminoacids and Peptide Synthesis***. 2nd Edition. Oxford Science Publications. Great Britain. 2002. pp. 25-41.
13. MORRISON Robert y Neilson Boyd. ***Química Orgánica***. 5ta Edición. Addison Wesley Longman. México. 1998. pp. 195-197,842-874,927-930,1084.

#### CAPÍTULO IV

14. ATHERTON E. and R.C. Sheppard. ***Solid Phase Peptide Synthesis: a practical approach***. IRL Press: Oxford University Press. pp. 1-3.
15. JONES John. ***Aminoacids and Peptide Synthesis***. 2nd Edition. Oxford Science Publications. Great Britain. 2002. pp. 53-62.

#### CAPÍTULO V

16. ATHERTON E. and R.C. Sheppard. ***Solid Phase Peptide Synthesis: a practical approach***. IRL Press: Oxford University Press. pp. 13-33,63-66,87-105
17. JONES John. ***Aminoacids and Peptide Synthesis***. 2nd Edition. Oxford Science Publications. Great Britain. 2002. pp.67-78
18. MELDAN Morten. ***Properties of solid supports***. Methods in Enzymology. (1997). 289:83-104.
19. MERRIFIELD Bruce. ***Concept and early development of solid-phase peptide synthesis***. . (1997). Methods in Enzymology. 289:3-13.
20. MERRIFIELD Bruce. ***Solid Phase Peptide Synthesis***. Nobel lecture, 8 December, 1984. From Nobel Lectures, Chemistry 1981-1990, Editor-in-Charge Tore Frängsmyr, Editor Bo G. Malmström, World Scientific Publishing Co., Singapore, 1992.
21. SONGSTER Michael, Barany George. ***Handles for solid-phase peptide synthesis***. Methods in Enzymology. (1997). 289:126-174

---

**CAPÍTULO VI**

22. ANNIS Ioana, Hargittai Balazs, Barany George. **Disulfide bond formation in peptides.** Methods in Enzymology. (1997). 289:198-221.
23. BLACKBURN Christopher, Kates Steven. **Solid-phase synthesis of cyclic homodetic peptides.** Methods in Enzymology. (1997). 289:175-198.
24. KIHLEBERG Jan, Elofsson Mikael, Salvador Lourdes. **Direct synthesis of glycosylated amino acids from carbohydrate peracetates and Fmoc amino acids: Solid-phase synthesis of biomedically interesting glycopeptides.** Methods in Enzymology. (1997). 289:221-245.
25. LEBI Michal, Krchnák. Viktor. **Synthetic peptide libraries.** Methods in Enzymology. (1997). 289:336-392.
26. PERIC John. **Synthesis of phosphopeptides using modern chemical approaches.** Methods in Enzymology. (1997). 289:245-266.
27. REYES O, GARAY H. **Bibliotecas de Péptidos Sintéticos.** [en línea] [gndp.cigb.edu.cu/Combinatoria%20Molecular/PDF/chapter02.pdf](http://gndp.cigb.edu.cu/Combinatoria%20Molecular/PDF/chapter02.pdf)

**CAPÍTULO VII**

28. MANT Colin T., Kondejewski Leslie H., Cachia Paul J., Monera Oscar D., Hodges Robert S. **Analysis of synthetic peptides by high-performance liquid chromatography.** Methods in Enzymology. (1997). 289:426-469

**CAPÍTULO VII**

29. BERANOVÁ-GIORGIANNI Sárka, Desiderio Dominic M. **Fast atom bombardment mass spectrometry of synthetic peptides.** Methods in Enzymology. (1997). 289:478-499.
30. BURDICK Daniel J., Stults John T. **Analysis of peptide synthesis products by electrospray ionization mass spectrometry.** Methods in Enzymology. (1997). 289:499-514.
31. GRANT Gregory A., Crankshaw Mark W., Gorke John. **Edman sequencing as tool for characterization of synthetic peptides.** Methods in Enzymology. (1997). 289:395-414

32. MOORE William T. **Laser desorption mass spectrometry**. Methods in Enzymology. (1997). 289:520-542.
33. SÁNCHEZ Agustín, Smith Alan J. **Capillary electrophoresis**. Methods in Enzymology. (1997). 289:469-478.
34. SMITH Alan J. **Amino acid analysis** . Methods in Enzymology. (1997). 289:419-426.
35. VOET Donald and Judith Voet. **Biochemistry**. 2nd Edition. John Willey & Sons, Inc. United States of América. (1995). pp, 107-109.