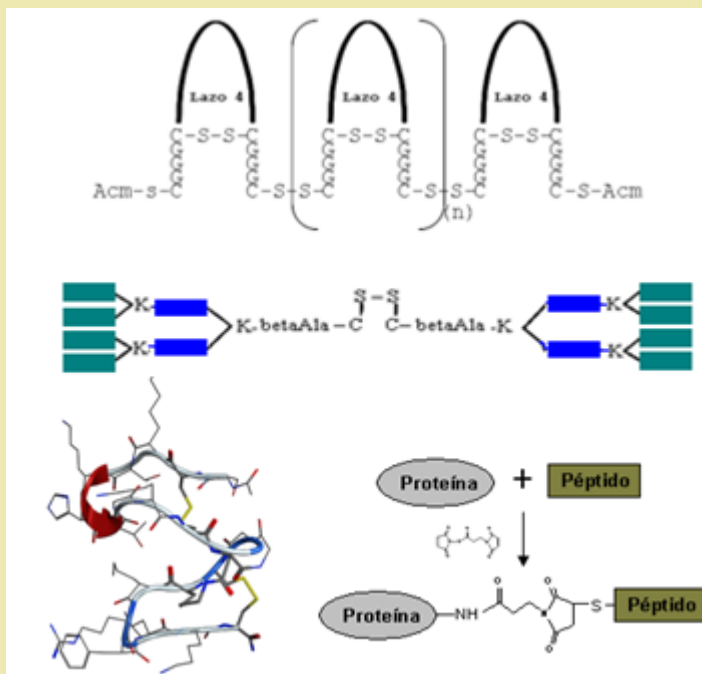


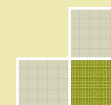


## SÍNTESIS DE PÉPTIDOS MODIFICADOS QUÍMICAMENTE CON POSIBLES APLICACIONES FARMACÉUTICAS



Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias  
Químicas

HILDA ELISA GARAY PÉREZ





**UNIVERSIDAD DE LA HABANA  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**SÍNTESIS DE PÉPTIDOS MODIFICADOS QUÍMICAMENTE CON POSIBLES  
APLICACIONES FARMACÉUTICAS**

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Químicas**

Autora: MSc. Hilda Elisa Garay Pérez

Tutores: Dr. Luis Javier González López

Dr. Fernando Albericio Palomera

Asesor: MSc. Osvaldo Reyes Acosta



**Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología**  
La Habana, 2012

## SÍNTESIS

El desarrollo de las metodologías de síntesis química de péptidos ha acelerado el descubrimiento de nuevos compuestos con posibilidades de convertirse en agentes terapéuticos o vacunas. Los péptidos sintéticos se aplican en el tratamiento de varias patologías autoinmunes, enfermedades infecciosas virales y bacterianas y el cáncer. Sin embargo presentan limitaciones como medicamentos que se pueden solucionar con la introducción de modificaciones químicas. La formación de enlaces intramoleculares o intermoleculares, la conjugación a proteína o polietilenglicol y la multimerización son algunas de las modificaciones que se introducen en los péptidos sintéticos para mejorar sus propiedades en el desarrollo de candidatos terapéuticos y vacunales contra diferentes enfermedades. En este trabajo se aborda la síntesis de dos péptidos con alto grado de restricción conformacional mediante la formación de tres puentes intramoleculares para mimetizar una zona topográfica de una familia de proteínas que puede tener aplicación práctica en la terapia contra la sepsis letal inducida por una infección bacteriana. También se obtienen soportes sólidos compuestos por poliestireno y polietilenglicol que permiten de manera directa la síntesis en fase sólida de péptidos peguilados en el extremo carboxilo. Con estos soportes se obtienen péptidos peguilados con mayor actividad biológica que el péptido sin peguilar con posible aplicación para el tratamiento de la sepsis. Se demuestra que la Cys es determinante en la actividad biológica de un péptido antagonista de la proteína IL-15 y que la dimerización por formación de un enlace disulfuro mejora sus propiedades antagonistas, lo que permite el desarrollo de nuevos productos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. En la búsqueda de vacunas basadas en péptidos sintéticos contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* se demuestra que la polimerización lineal de un péptido cíclico, mediante formación regioselectiva de enlaces disulfuro, aumenta la inmunogenicidad y que la inclusión de un epítipo Th derivado de la proteína P64K en estructuras en forma de péptidos multiantigénicos estimula la respuesta inmune. Por otra parte, se demuestra la importancia de evaluar varias estructuras sintéticas y diferentes metodologías de conjugación de péptidos a proteínas portadoras para aumentar la inmunogenicidad de un péptido simple en el diseño de vacunas peptídicas.

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1.	Estado actual del empleo de péptidos sintéticos como productos farmacéuticos.....	8
2.1.1.	Péptidos sintéticos como productos terapéuticos.....	8
2.1.2.	Péptidos sintéticos como vacunas profilácticas o terapéuticas.....	10
2.2.	Síntesis química de péptidos. Principios generales.....	13
2.2.1.	Metodologías de síntesis de péptidos en fase sólida. Esquemas de protección.....	15
2.2.1.1.	Química Boc/Bzl.....	16
2.2.1.2.	Química Fmoc/tBu.....	17
2.2.2.	El soporte sólido.....	18
2.2.2.1.	Resinas de poliestireno.....	19
2.2.2.2.	Resinas de poliamida.....	19
2.2.2.3.	Resinas de polietilenglicol.....	19
2.2.3.	Ensamblaje de la secuencia peptídica.....	20
2.2.3.1.	Acoplamiento del primer aminoácido al soporte sólido. Espaciadores.....	20
2.2.3.2.	Métodos de acoplamiento.....	21
2.2.3.2.1.	Carbodiimidas.....	21
2.2.3.2.2.	Salas de fosfonio y uronio.....	23
2.3.	Modificaciones químicas de los péptidos sintéticos.....	25
2.3.1.	Constreñimientos conformacionales mediante ciclización.....	25
2.3.1.1.	Formación de enlaces disulfuro.....	25
2.3.1.2.	Formación de lactamas.....	27
2.3.2.	Polimerización lineal.....	28
2.3.3.	Conjugación a polietilenglicol.....	28
2.3.3.1.	Propiedades del polietilenglicol.....	29
2.3.3.2.	Metodologías de peguilaación.....	29
2.3.3.2.1.	Peguilaación en disolución.....	29
2.3.3.2.2.	Peguilaación en fase sólida.....	30
2.3.4.	Péptidos ramificados.....	31
2.3.4.1.	Tipos de péptidos ramificados.....	31
2.3.4.2.	Metodologías de síntesis de los péptidos multiantigénicos.....	32
2.3.5.	Conjugación de péptidos a proteínas portadoras.....	33
2.4.	Caracterización de péptidos sintéticos.....	35
2.5.	Purificación de péptidos sintéticos.....	35
2.6.	Aplicaciones específicas de péptidos sintéticos como agentes terapéuticos o vacunales.....	35
2.6.1.	Búsqueda de candidatos peptídicos para el tratamiento la sepsis inducida por una infección bacteriana.....	35
2.6.2.	Búsqueda de candidatos peptídicos terapéuticos contra enfermedades relacionadas con la expresión aumentada de la proteína IL-15.....	36
2.6.3.	Búsqueda de candidatos vacunales basados en péptidos sintéticos contra el serogrupo B de Neisseria meningitidis.....	37
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1.	Procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida.....	39

3.1.1.	Procedimiento general de SPPS con el empleo de la química Boc/Bzl .....	39
3.1.2.	Procedimiento general de SPPS con el empleo de la química Fmoc/tBu .....	40
3.2.	Seguimiento de las reacciones en fase sólida .....	41
3.3.	Diseño <i>in silico</i> de los péptidos Tri-1 y Tri-2.....	41
3.4.	Síntesis de los péptidos restringidos conformacionalmente (Tri-1 y Tri-2).....	42
3.5.	Obtención de los soportes PEG-PS para la síntesis de péptidos peguilados en el extremo C .....	44
3.6.	Síntesis de péptidos derivados de la proteína IL-15 .....	46
3.7.	Síntesis de péptidos derivados de la proteína PorA de <i>N. meningitidis</i> .....	47
3.8.	Síntesis de estructuras que contienen la secuencia 4L-5 que mimetiza el PSC de MenB.....	49
3.9.	Purificación de péptidos sintéticos por RP-HPLC preparativa .....	51
3.10.	Caracterización de péptidos sintéticos.....	51
3.11.	Ensayos de actividad biológica .....	53
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
4.1.	Obtención de péptidos que contengan tres puentes intramoleculares para mimetizar una región topográfica de la familia de proteínas LBP-BPI .....	57
4.2.	Diseño y obtención de un soporte sólido para la peguilación del extremo C de péptidos sintéticos .....	67
4.3.	Estudio de la relevancia de la cisteína en un péptido antagonista de la IL-15 .....	76
4.4.	Estudios de diferentes formas de presentación al sistema inmune de péptidos derivados del lazo 4 de la proteína PorA de <i>N. meningitidis</i> de la cepa CU385.....	80
4.5.	Estudio de diferentes formas de presentación al sistema inmune de un péptido que mimetiza las propiedades antigénicas e inmunológicas del PSC de MenB .....	90
5.	CONCLUSIONES.....	98
6.	RECOMENDACIONES .....	100
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	101
8.	ANEXOS.....	113

## Lista de abreviaturas por orden alfabético

AAA	Análisis de aminoácidos
Acm	Acetamidometilo
All	Alilo
Alloc	Aliloxicarbonilo
AM	Ácido 4-(2,4-dimetoxibencidril) fenoxiacético
AOP	Hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il-N-oxi-tris(dimetilamino)fosfonio
BAL	del Inglés: <i>Backbone Amide Linker</i>
BHA	Bencidrilamina
Boc	tert-butiloxicarbonilo
Bom	Benciloximetilo
BOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(dimetilamino)fosfonio
BPI	Proteína bactericida que incrementa de la permeabilidad (del Inglés: <i>Bactericidal permeability-increasing protein</i> )
BSA	Albúmina de suero bovino (del Inglés: <i>Bovine serum albumin</i> )
Bzl	Bencilo
cHex	Ciclohexilo
CDI	Carbodiimida
Cl <sub>2</sub> -Bzl	Diclorobencilo
2-Cl-Z	2-Clorobenciloxicarbonilo
COMU	1-[1-(ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminox)dimetilaminomorfolinometileno)]metanaminio
DBU	1,8-diazabicyclo (5.4.0)undec-7-eno
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dnp	2,4-dinitrofenilo
EDC	1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida
ELISA	Ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida (del Inglés: <i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i> )
ESI	Ionización por electronebulización (del Inglés: <i>Electrospray ionization</i> )
FAB	Ionización por bombardeo con átomos rápidos (del Inglés: <i>Fast atom bombardment</i> )
Fm	9-fluorenilmetilo
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
HATU	N-óxido de hexafluorofosfato de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-ilmetileno]-N-metilmetanaminio
HBTU	N-óxido de hexafluorofosfato de <i>N</i> -[1H-benzotriazol-1-il)-(dimetilamino)metileno]-N-metilmetanaminio
HOAt	1-hidroxí-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media (del Inglés: <i>half maximal inhibitory concentration</i> )
IL-15	Interleucina-15
LBP	Proteína que une LPS (del Inglés: <i>Lipopolisaccharide Binding Protein</i> )
LPS	Lipopolisacárido
MALDI	Desorción e ionización por láser asistida por una matriz (del Inglés: <i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i> )

---

MAP(s)	Péptido (s) multiantigénico (s) (del Inglés: <i>Multiple antigenic peptide</i> )
MM	Masa (s) molecular (es)
MBHA	4-metilbencidrilamina
MenB	Meningococo del serogrupo B ( <i>Neisseria meningitidis</i> del serogrupo B)
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (del Inglés: <i>Major histocompatibility complex</i> )
MPS	Éster m-maleimidopropiónico de la N-hidroxisuccinimida
MS	Espectrometría de masas (del Inglés: <i>Mass Spectrometry</i> )
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Npys	3-nitro-2-piridinosulfenilo
Oxyma	Etil-2-ciano-2-(hidroximino)acetato
PAL	Ácido 5-[4-aminometil-3,5-dimetoxifenoxi]-pentanoico
PAM	Ácido p-hidroximetilfenilacético
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo
PBS	Disolución tampón fosfato salina (del Inglés: <i>Phosphate buffered saline</i> )
PDB	Banco de datos de proteínas (del Inglés: <i>Protein data bank</i> )
PEG	Polietilenglicol
Pmc	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo
PME	Proteínas de membrana externa
PorA	Porina A
PS	Poliestireno
PSC	Polisacárido capsular
PyAOP	Hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidino)fosfonio
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidino)fosfonio
PyOxP	Hexafluorofosfato de O-[(1-ciano-2-etoxi-2oxoetiliden)amino]-oxitri(pirrolidin-1-il)fosfonio
PyOxB	Tetrafluorborato de O-[(1-ciano-2-etoxi-2oxoetiliden)amino]-oxitri(pirrolidin-1-il)fosfonio
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	desviación cuadrática media de las distancias (del Inglés: <i>Root mean square deviation</i> )
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (del Inglés: <i>Reversed phase high performance liquid chromatography</i> )
RV	Región variable
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (del Inglés: <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida (del Inglés: <i>Solid phase peptide synthesis</i> )
TATU	N-óxido de tetraborato de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-ilmetileno]-N-metilmetanaminio
TBTU	N-óxido de tetrafluoroborato de N-[1H-benzotriazol-1-il)-(dimetilamino)metileno]-N-metilmetanaminio
tBu	tert-butilo
TFA	Ácido trifluoroacético
Th	T-auxiliadoras (del Inglés: <i>T-helper</i> )
Tmob	2,4,6-trimetoxibencilo
TNF	Factor de Necrosis Tumoral (del Inglés: <i>Tumor necrosis factor</i> )
Tos	Tosilo
Trt	Tritilo
VME	Vesículas de membrana externa

## **1. INTRODUCCIÓN**

El desarrollo de metodologías de síntesis química de péptidos ha acelerado el descubrimiento de nuevos compuestos con posibilidades de convertirse en agentes terapéuticos [1,2] o vacunas [3,4]. Los péptidos sintéticos se han aplicado en el tratamiento de varias patologías como la artritis, la diabetes, enfermedades infecciosas virales y bacterianas y el cáncer [5]. En general, los péptidos empleados como fármacos poseen una elevada actividad biológica y especificidad, presentan baja interacción fármaco-fármaco y una baja toxicidad. Estos ofrecen una gran diversidad química y son de fácil almacenamiento y transportación [3,6]. Los aspectos relacionados con la tecnología de obtención y el alto valor agregado de los péptidos sintéticos, así como el menor tiempo que se requiere para las etapas de investigación-desarrollo influyen favorablemente en la elección de estas biomoléculas como medicamentos.

El desarrollo alcanzado en la última década en el campo de los productos farmacéuticos de origen peptídico estuvo concentrado en las metodologías de síntesis y en el estudio de los mecanismos de acción. La síntesis en fase sólida es la tecnología de elección para la síntesis de péptidos desde la etapa de investigación hasta la industria [2,7]. El desarrollo de nuevos métodos para la síntesis de péptidos modificados químicamente permitirá obtener péptidos bioactivos para el tratamiento de diferentes enfermedades [8].

Los péptidos en disolución generalmente adoptan varias conformaciones, por lo que es necesario introducir constreñimientos a su estructura para que puedan mimetizar una región específica de una proteína [9,10]. Se ha descrito la síntesis de péptidos con puentes intramoleculares que contienen de uno a tres enlaces disulfuro [11-15] o lactama [16-20]. También se han desarrollado metodologías para obtener péptidos que contienen dos ciclos intramoleculares por combinación de enlaces lactama y disulfuro [21] y péptidos con tres ciclos que incluyen dos enlaces disulfuro y una lactama [22]. Sin embargo, no se ha descrito una metodología de síntesis para obtener péptidos restringidos conformacionalmente que contengan tres puentes intramoleculares mediante la formación de dos enlaces lactama en fase sólida y un enlace disulfuro en disolución. El desarrollo de esta metodología pudiera tener aplicación en la búsqueda de péptidos para el tratamiento de diversas enfermedades en las que se requiera mimetizar regiones topográficas de una proteína.



La sepsis es una enfermedad infecciosa severa con alto índice de mortalidad para la que no existe una terapia efectiva [23]. El lipopolisacárido (LPS) es el principal componente de la envoltura externa de las bacterias Gram-negativas y es un potente activador del sistema inmune. La proteína LBP (proteína que une LPS, del Inglés: *lipopolisaccharide binding protein*) presente en el suero humano está involucrada en la activación de la respuesta inmune ante la endotoxina LPS [24]. La presencia de gran cantidad de LPS lleva a una liberación excesiva de citocinas que provoca el síndrome de choque séptico. Se ha descrito que determinados aminoácidos básicos presentes en la región N-terminal de la familia de proteínas LBP-BPI (BPI: proteína bactericida que incrementa la permeabilidad, del Inglés: *bactericidal permeability-increasing protein*), están involucrados en la unión al LPS [25]. Por lo tanto, se pueden diseñar péptidos restringidos conformacionalmente que mimeticen una zona topográfica presente en la región N-terminal de la familia de proteínas LBP-BPI que pudieran interferir en el mecanismo de unión del LPS al LBP y convertirse en posibles candidatos terapéuticos atractivos contra la sepsis.

Una limitación de los péptidos como fármacos es la baja biodisponibilidad y que son propensos a ser metabolizados rápidamente [6]. La baja estabilidad metabólica se ha solucionado con el desarrollo de varias estrategias de modificación química que los hacen menos sensibles a la degradación enzimática en fluidos biológicos. Entre las más utilizadas se encuentran la introducción de D-aminoácidos [1] o  $\beta$ -aminoácidos [26,27], la reducción del enlace amida [2], los constreñimientos conformacionales mediante la ciclización [10,28] o la introducción de aminoácidos impedidos que hacen menos flexible al péptido [29] y la introducción de polietilenglicol (PEG) [30-33].

La modificación química de un péptido con PEG se puede realizar en disolución o en fase sólida [34]. Los problemas de selectividad de la reacción de peguilação en disolución se eliminan si la modificación con PEG se realiza en fase sólida, ya que se emplean grupos protectores adecuados para dirigir la peguilação a sitios específicos [34-37]. Se han desarrollado metodologías para acoplar el PEG en el extremo N y en las cadenas laterales de los aminoácidos durante la síntesis en fase sólida [35,36,38]. La peguilação en el extremo C del péptido se realiza usualmente por la unión al soporte sólido de un aminoácido derivatizado previamente con el PEG [34] o por la introducción de aminoácidos especiales que permitan la peguilação en fase sólida, mediante reacciones químicas

específicas [37]. Se han desarrollado soportes poliméricos PEG-PS (PS: *Poliestireno*) que han tenido un impacto positivo en la síntesis de péptidos y moléculas orgánicas pequeñas, pero no se diseñaron para obtener péptidos con PEG de diferentes tamaños anclados en el extremo carboxilo [39-45]. La resina TentaGel-NH<sub>2</sub> es el único de estos soportes comercialmente disponibles, que se ha aplicado para obtener péptidos peguilados en el extremo C, pero se limita a una masa molecular (MM) de PEG de 3000 Da [36]. Se pudiera desarrollar un soporte sólido PEG-PS para obtener de manera sencilla, péptidos peguilados en el extremo C directamente desde la fase sólida, que permita evaluar PEG de diferentes MM para seleccionar el tamaño óptimo que logre un balance favorable entre la actividad biológica y la farmacocinética del conjugado resultante. El desarrollo de este soporte sólido pudiera tener aplicación en la peguilación de péptidos para el tratamiento de la sepsis inducida por una infección bacteriana. Se ha descrito que el péptido de la región comprendida entre los aminoácidos 86-99 de la proteína LBP, con un cambio puntual de la Lys<sup>95</sup> por el aminoácido Ala, se une con elevada afinidad al LPS [46]. Este péptido contiene sitios sensibles a la degradación proteolítica [2], por lo que la peguilación pudiera convertirlo en un candidato peptídico con propiedades terapéuticas mejoradas.

La presencia de aminoácidos reactivos en la secuencia peptídica es una fuente de inestabilidad molecular. Los péptidos que contienen Cys libre son menos estables químicamente [12,47], al ser administrados pueden modificarse por cisteinilación [48,49] o formar agregados de manera no controlada. Los procesos de síntesis en fase sólida son más engorrosos [12]. Además, puede ser la causa de inconsistencia en las etapas superiores de desarrollo del producto, ya sea en la formulación líquida o liofilizada y en los estudios de estabilidad [47]. En la optimización de un candidato peptídico que contenga Cys libre, este residuo se puede sustituir por otros aminoácidos [2,10] o se puede emplear para obtener el dímero molecular para aumentar la estabilidad química y metabólica y la actividad biológica, particularmente en aquellos péptidos que están involucrados en la unión directa a un receptor [50-52]. La proteína interleucina-15 (IL-15) es una citocina proinflamatoria que juega un papel importante en patologías del sistema inmune como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la sarcoidosis [53-55]. Se ha descrito que el péptido que comprende la región Lys<sup>36</sup>-Leu<sup>45</sup> de la proteína IL-15 es capaz de bloquear la actividad biológica de la proteína en ensayos *in vitro* en líneas celulares dependientes de IL-15 [56]. Este péptido se convierte en un

posible candidato terapéutico contra estas enfermedades. Sin embargo, contiene una Cys libre en su secuencia, lo que hace necesario la introducción de modificaciones químicas para eliminar la reactividad de este residuo [56] y mantener o mejorar su actividad biológica.

Con respecto al uso de los péptidos sintéticos como vacunas, la baja inmunogenicidad y el desafío planteado por la diversidad inmunogenética han sido las limitaciones fundamentales [3]. El desarrollo de estrategias de presentación de péptidos al sistema inmune mediante la multimerización [57-61], la presentación en forma de péptido multiantigénico (MAP, del Inglés: *multiple antigenic peptide*) [62,63] y la conjugación a proteínas portadoras [64-67] son algunas de las estrategias empleadas para solucionar estas limitaciones. Se han descrito metodologías para lograr la multimerización mediante la polimerización lineal de un péptido por formación de enlaces amidas a través de sus extremos N y C [57]. También se ha empleado la polimerización por formación de enlaces disulfuro intermoleculares entre las Cys adicionadas en los extremos N y C del péptido [58,59,61].

Sin embargo, no se ha descrito el empleo de la polimerización lineal a través de Cys de un péptido cíclico como estrategia para aumentar la inmunogenicidad. El desarrollo de una metodología para obtener péptidos cíclicos polimerizados pudiera tener aplicación para aumentar la inmunogenicidad de péptidos en la búsqueda de una vacuna contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* (MenB), la cual es una de las infecciones bacterianas de mayor incidencia en la salud a nivel mundial [68]. Las vacunas que existen actualmente contra MenB, no son de composición definida y se basan en el empleo de vesículas de membrana externa (VME) que están enriquecidas en proteínas de membrana externa (PME). Estas vacunas no son universales ya que se obtienen a partir de una sola cepa, aunque han mostrado eficacia para combatir los brotes epidémicos en las regiones geográficas donde se aplican [69]. Se ha descrito que después de la vacunación con VME o de una infección, se generan anticuerpos con acción bactericida que reconocen específicamente a la proteína de membrana externa porina A (PorA) [70]. Una de las estrategias que se aborda para la búsqueda de una vacuna contra MenB es el empleo de la proteína PorA de varios serosubtipos en una vacuna por subunidades [71]. El empleo de péptidos sintéticos derivados de la proteína PorA como componentes de estas vacunas facilitaría el proceso de obtención, debido a las ventajas productivas

de los péptidos respecto a las proteínas recombinantes, a su elevada especificidad y seguridad [3]. La presentación al sistema inmune del lazo 4 de la proteína PorA en forma de péptido cíclico polimerizado pudiera aumentar la inmunogenicidad respecto al péptido cíclico sin polimerizar. También se pudiera aumentar la inmunogenicidad de un péptido lineal derivado del lazo 4 de la proteína PorA mediante la inmunización con estructuras en forma de MAP que contengan un epitopo de células T auxiliaadoras derivado del mismo patógeno para estimular la respuesta inmune. Por otra parte, en la búsqueda de una vacuna universal contra MenB, sería novedosa la inclusión de varias formas de presentación al sistema inmune de un péptido que mimetiza un determinante exclusivo del polisacárido capsular (PSC) presente en la superficie de la bacteria, para evaluar de forma integral la estrategia más efectiva en el aumento de la inmunogenicidad del péptido.

Sobre la base de los antecedentes descritos anteriormente se planteó la siguiente **Hipótesis:**

**Es posible la introducción de modificaciones químicas para mejorar las propiedades farmacológicas de los péptidos sintéticos en el desarrollo de candidatos terapéuticos para el tratamiento de la sepsis, patologías autoinmunes y para el diseño de una vacuna contra el serogrupo B de *N. meningitidis*.**

Para demostrar o refutar esta hipótesis se proponen los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

Introducir modificaciones químicas en péptidos sintéticos tales como puentes intramoleculares o intermoleculares, cambios de aminoácidos, conjugación a una proteína portadora o polietilenglicol y multimerización para el desarrollo de candidatos terapéuticos y vacunales contra diferentes enfermedades.

### **Objetivos específicos**

1. Obtener péptidos que contengan tres puentes intramoleculares para mimetizar los dos lazos de horquilla beta de la región N-terminal de la familia de proteínas LBP-BPI.
2. Diseñar y obtener un soporte sólido compuesto por PS y PEG para la síntesis de péptidos peguilados en el extremo C con PEG de diferentes masas moleculares.

3. Desarrollar una estrategia para eliminar la reactividad del grupo tiol de la Cys presente en un péptido antagonista de la proteína IL-15 sin disminuir su actividad biológica.
4. Obtener un péptido cíclico polimerizado y péptidos multiantigénicos derivados del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* para evaluar la inmunogenicidad de diferentes formas de presentación al sistema inmune.
5. Obtener péptidos multiantigénicos libres y conjugados a una proteína portadora que contengan una secuencia peptídica que mimetiza las propiedades antigénicas e inmunológicas del PSC de MenB para seleccionar la mejor forma de presentación al sistema inmune.

Este trabajo aporta los siguientes **elementos de novedad científica**

- Se desarrolla una metodología de síntesis que permite introducir tres puentes intramoleculares en un péptido sintético mediante la formación de dos enlaces lactama en fase sólida y un enlace disulfuro en disolución.
- Se sintetizan por primera vez dos péptidos que contienen tres puentes intramoleculares para los que se demostró *in silico* que mimetizan una zona topográfica de la región amino terminal de la familia de proteínas LBP-BPI responsable de su actividad biológica.
- Se obtiene un soporte sólido PEG-PS para la síntesis de péptidos peguilados en el extremo C, directamente desde la fase sólida, con PEG de diferentes tamaños. Este tipo de soporte no había sido descrito anteriormente.
- Se demuestra que la Cys es importante en la actividad biológica de un péptido antagonista de la proteína IL-15 y que la dimerización mediante un enlace disulfuro intermolecular mejora sus propiedades antagonistas. Este trabajo constituye la primera investigación enfocada a la búsqueda de péptidos antagonistas de la proteína IL-15 con aplicación para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.
- Se describe por primera vez el empleo de la polimerización lineal a través de Cys de un péptido cíclico como estrategia para aumentar la inmunogenicidad en el diseño de vacunas peptídicas. Se demuestra que un epítopo Th derivado de la proteína P64K estimula la respuesta inmune de estructuras en forma de MAP.

- Se demuestra que la forma de presentación de péptidos al sistema inmune, basada en diferentes estructuras y metodologías de conjugación, es importante para obtener una respuesta inmune funcional, lo que constituye un aporte al conocimiento en el campo de las inmunizaciones con péptidos sintéticos.

Todas estas metodologías pueden tener aplicación a otros proyectos de investigación encaminados a la búsqueda de candidatos terapéuticos o vacunales basados en péptidos sintéticos.

### **Importancia práctica de la tesis:**

En la tesis se obtienen péptidos modificados químicamente con potencialidad de convertirse en productos terapéuticos contra la sepsis letal inducida por una infección bacteriana, para el tratamiento de patologías autoinmunes como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la sarcoidosis, así como para la obtención de una vacuna peptídica profiláctica contra MenB. Se desarrollan metodologías para introducir un alto grado de restricción conformacional en un péptido sintético mediante la formación de tres enlaces intramoleculares. Se diseña una metodología para obtener soportes sólidos del tipo PEG-PS que permiten de manera directa la síntesis en fase sólida de péptidos peguilados en el extremo carboxilo con PEG de diferentes tamaños, para seleccionar el tamaño óptimo que logre un balance favorable entre la actividad biológica y la farmacocinética del conjugado resultante. En el campo de las inmunizaciones con péptidos sintéticos se demuestra que la polimerización lineal de un péptido cíclico, mediante formación regioselectiva de enlaces disulfuro, aumenta la inmunogenicidad del péptido simple. También se identifica que un epitopo Th derivado de la proteína P64K puede tener aplicación en el diseño de vacunas peptídicas y la importancia de evaluar varias estructuras sintéticas y diferentes metodologías de conjugación para aumentar la inmunogenicidad de un péptido simple.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Estado actual del empleo de péptidos sintéticos como productos farmacéuticos

#### 2.1.1. Péptidos sintéticos como productos terapéuticos.

Los avances recientes en la genómica y la proteómica, así como el desarrollo de metodologías de síntesis química de péptidos han acelerado el descubrimiento de nuevos compuestos peptídicos que se han convertido en agentes terapéuticos [1,2]. La utilización de los péptidos sintéticos en la terapia se clasifica en seis categorías: antibióticos, antivirales, anticancerígenos, inmunomoduladores, para indicaciones cardiovasculares, para el tratamiento de desórdenes neurológicos y para el tratamiento del cáncer [72].

Los péptidos sintéticos presentan determinadas características que aventajan a otros productos terapéuticos [2]. Estos tienen mejor capacidad para penetrar tumores y órganos que las proteínas recombinantes y anticuerpos debido a su menor tamaño [73,74]. También pueden incluir modificaciones químicas [6], son generalmente poco inmunogénicos [2] y sus costos de producción son menores que los de las proteínas recombinantes [2]. Si se comparan con moléculas orgánicas pequeñas que se emplean como medicamentos convencionales, los péptidos generalmente presentan mayor eficacia, selectividad y especificidad (baja unión inespecífica a estructuras moleculares diferentes a sus blancos moleculares), ya que pueden corresponder a una pequeña región funcional de una proteína [28,75]. Los productos de degradación son aminoácidos u otros péptidos más pequeños, por lo que se minimiza el riesgo de toxicidad sistémica por interacción fármaco-fármaco [76]. Además, se acumulan poco en los tejidos y órganos debido a los cortos tiempos de vida media, lo cual evita el riesgo de complicaciones debido a sus metabolitos [2]. La mayoría de los péptidos terapéuticos se derivan de péptidos naturales y son agonistas de receptores [10], por lo que se requiere poca cantidad y menor número de dosis del péptido agonista para activar el receptor de interés [1].

Sin embargo, los péptidos presentan desventajas para su uso como productos terapéuticos [2,6], debido a la baja biodisponibilidad oral, determinada por sus propiedades físico-químicas y la baja estabilidad metabólica, lo que hace necesario su administración parenteral. Estos tienen un tiempo de vida medio corto debido a que son rápidamente degradados por enzimas proteolíticas del sistema

digestivo o del plasma sanguíneo y son rápidamente eliminados por el hígado y los riñones. También presentan poca capacidad para atravesar las barreras fisiológicas debido a su hidrofiliidad y alta flexibilidad conformacional, lo que afecta su actividad biológica *in vivo* [2]. Las compañías farmacéuticas han aceptado el reto de solucionar la baja biodisponibilidad oral de los péptidos, lo cual ha contribuido a revivir el interés en el uso de estas biomoléculas como potenciales candidatos terapéuticos y ha permitido la entrada de éstos en el mercado [2]. El efecto biológico, el perfil farmacocinético y la baja inmunogenicidad son parámetros cruciales para el desarrollo de un péptido como agente terapéutico [2].

Generalmente, es necesario modificar químicamente la estructura del péptido líder para obtener variantes optimizadas con propiedades terapéuticas mejoradas, incluso en una administración parenteral [2]. La estrategia de optimización de un péptido terapéutico se basa en estudios cuantitativos de la relación de estructura-actividad de los péptidos modificados con el objetivo de mejorar su biodisponibilidad, reducir la eliminación por el hígado y los riñones, aumentar la resistencia a la biodegradación e incrementar la selectividad o la afinidad por su receptor o blanco biológico [2]. La baja estabilidad metabólica de los péptidos se ha solucionado con el desarrollo de varias estrategias que los hacen menos sensibles a la degradación enzimática en fluidos biológicos [2]. Entre las estrategias más utilizadas se encuentran la introducción de D-aminoácidos [1] ó  $\beta$ -aminoácidos [26,27], la reducción del enlace amida [2], los constreñimientos conformacionales mediante la ciclización [10,28], la introducción de aminoácidos impedidos estéricamente que hacen menos flexible al péptido [29] y la unión covalente de PEG [30-33]. Los problemas de formulación de los péptidos sintéticos se han solucionado con la introducción de métodos novedosos de liberación, tales como los parches [77] y la electroforesis transdermales [78], la inhalación [79,80] y el desarrollo de las formulaciones orales [1,81]. Hay otros factores, como el menor tiempo de la etapa de investigación-desarrollo, las menores exigencias regulatorias en relación con un producto obtenido por vía recombinante, los aspectos relacionados con las tecnología de obtención y el alto valor agregado, que influyen favorablemente en la elección de los péptidos sintéticos para su uso como medicamento.



En el año 2004 había más de 700 péptidos con aplicaciones terapéuticas como medicamentos o como candidatos a medicamentos [6]. En la actualidad se encuentran en ejecución ensayos preclínicos y clínicos Fase I, II y III con péptidos sintéticos y es notable el número de compañías farmacéuticas que basan sus estrategias en este tipo de compuestos [3,5]. El mercado para los péptidos terapéuticos sintéticos se elevó de \$ 5.3 billones en el 2003 a \$ 8 billones en el año 2005 y se estima que en el año 2013 ascienda a los \$11.5 billones [2].

### **2.1.2. Péptidos sintéticos como vacunas profilácticas o terapéuticas**

Los péptidos sintéticos también se han aplicado en el campo de las vacunas [3,4,82]. La obtención de vacunas profilácticas o terapéuticas efectivas contra muchas enfermedades es aún un reto en nuestros días. Se han diseñado varias estrategias para obtener vacunas efectivas que desarrollen una respuesta inmune profiláctica o terapéutica. Una vacuna basada en péptidos sintéticos debe contener dos tipos de epitopos: (i) un epitopo estimulador de células T auxiliaadoras (Th, del Inglés: *T-helper*) y (ii) un epitopo que estimule una respuesta B específica (mediante un epitopo para células B) o citotóxica específica (mediante un epitopo para células TCD8<sup>+</sup>), de acuerdo al patógeno o a la situación particular de que se trate [3]. Los epitopos que estimulan células B son generalmente péptidos de 13 aminoácidos, que representan la región inmunogénica y/o protectora mínima dentro de un antígeno o son mimotopos de dichos epitopos. Estos últimos pueden no ser de naturaleza proteica [3].

Las vacunas sintéticas basadas en péptidos se caracterizan por su seguridad, ya que a diferencia de las basadas en microorganismos atenuados, no tienen el riesgo de reversión o patogenicidad en individuos inmunocomprometidos. Las vacunas peptídicas también son seguras para los productores ya que no se emplean microorganismos patógenos para su fabricación. Además, son altamente específicas ya que contienen solamente las secuencias de epitopos introducidos en el diseño de la molécula y los anticuerpos que inducen actúan sobre blancos determinados dentro de un antígeno. Esto es de particular importancia cuando el antígeno de interés contiene simultáneamente en su estructura epitopos protectores y epitopos no protectores que pueden ser indeseados. Estas vacunas son muy flexibles en cuanto a su diseño ya que pueden incluir en su estructura varios determinantes antígenicos de diferentes patógenos o múltiples epitopos del mismo patógeno, así como epitopos de

células Th para estimular la respuesta inmunológica. Se les puede incluir lípidos y carbohidratos que permitan incrementar la inmunogenicidad, la solubilidad y la estabilidad. Se pueden diseñar para que interactúen con el sistema inmune en cualquier etapa, ya sea desde la captura del antígeno, el procesamiento o la presentación. Los péptidos son estructuras químicamente definidas que pueden ser fácilmente caracterizadas mediante técnicas analíticas bien establecidas. Su estabilidad a temperatura ambiente en forma de liofilizados evita el uso de cadenas de frío para su almacenamiento, distribución y transporte. La obtención a escala industrial es económicamente viable [3].

Sin embargo, uno de los elementos que restringe el empleo de los péptidos como vacunas es la necesidad de identificar exactamente los epitopos responsables de la respuesta inmune protectora dentro de una proteína. Para ello en la actualidad hay disponibles metodologías de la Química, la Biología Molecular, la Inmunología y la Bioinformática que permiten identificar dichas secuencias y predecir su interacción con el sistema inmune al aislarse de su contexto natural [3]. La baja inmunogenicidad de las estructuras lineales simples es otra de las limitaciones del empleo de los péptidos sintéticos como vacunas. Los péptidos sintéticos que representan epitopos individuales de células B son generalmente secuencias peptídicas cortas que en disolución adoptan muchas conformaciones y puede que no predomine una estructura similar a la que poseen en el antígeno del cual provienen. Esto hace que los anticuerpos que se inducen contra conformaciones irrelevantes no reconozcan al patógeno de interés y por lo tanto hay que modificar químicamente la secuencia peptídica para lograr mimetizar la estructura que tienen en la proteína nativa [3]. Otra desventaja es que estas secuencias cortas generalmente no contienen epitopos capaces de activar la respuesta de células Th para la producción de anticuerpos y la generación de respuesta inmune de memoria [83].

Los problemas que presentan los péptidos sintéticos como vacunas se pueden solucionar con la utilización de sistemas adecuados de presentación al sistema inmune, lo que permite un incremento en los niveles de anticuerpos inducidos y su funcionalidad [3]. Entre las estrategias que mayor éxito han tenido para aumentar la inmunogenicidad de los péptidos sintéticos se encuentran la conjugación a moléculas portadoras que estimulan la ayuda de células T [64,66,67], la presentación repetida de la secuencia antigénica mediante la multimerización por polimerización lineal [57-

59,61] o por la estrategia químicamente definida de conjugación a un oligopéptido secuencial [60], la lipidación [84,85], el uso de adyuvantes más potentes como citocinas recombinantes [86], adyuvantes oleosos que ya han sido aprobados para su uso en humanos [87], polisacáridos [3] y sistemas particulados como liposomas [88]. También se puede aumentar la inmunogenicidad de un péptido mediante cambios de aminoácidos dentro de la secuencia [3] y por la introducción de  $\beta$ -aminoácidos [89] que permitan incrementar su afinidad por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del Inglés: *Major Histocompatibility Complex*).

Una estrategia que ha sido fructífera para incrementar la inmunogenicidad y la estabilidad de los péptidos sintéticos es el uso de estructuras ramificadas como los péptidos multiantigénicos [62,63]. Los MAPs en general son más inmunogénicos que el péptido lineal [90]. Además se pueden conjugar a proteínas portadoras para proporcionar la ayuda de células T [66,91,92]. Una característica importante de los MAPs es la flexibilidad que tienen para incorporar en la misma estructura el epitopo de células B de interés y el epitopo de células Th [93,94]. La diversidad genética humana impone un reto al empleo de dichos epitopos de células Th en las vacunas peptídicas, ya que su uso estaría restringido a individuos con determinados tipos del MHC que sean capaces de unirse con dichos péptidos. En la actualidad se han identificado algunas secuencias con la capacidad de asociarse con las moléculas de MHC de individuos de diferentes haplotipos. Un ejemplo clásico lo ofrece el estudio de la capacidad linfoproliferativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup> ante los péptidos P2, P4 y P30 derivados del toxoide tetánico. Los péptidos P2 y P30 se asociaron con moléculas MHC provenientes de individuos de diferentes haplotipos, para activar células T CD4<sup>+</sup> específicas. Este hallazgo fue promisorio para el desarrollo de vacunas sintéticas, ya que podrían ser activas en un elevado porcentaje de la población [95]. Adicionalmente, los péptidos P2 y P30 también son capaces de activar células T CD4<sup>+</sup> específicas, en asociación con moléculas de MHC de ratones de diferentes haplotipos [96], lo que ofrece la posibilidad de realizar estudios preclínicos en el modelo animal murino con candidatos vacunales de potencial aplicación en humanos.

Aún no se dispone en el mercado de una vacuna peptídica para uso en humanos debido principalmente a los problemas de estabilidad metabólica, a la baja inmunogenicidad y al desafío planteado por la diversidad inmunogenética [3]. En la actualidad se encuentran en ejecución ensayos

preclínicos y clínicos Fase I, II y III con vacunas basadas en péptidos sintéticos, contra afecciones de origen infeccioso, autoinmune y el cáncer y es notable el número creciente de compañías farmacéuticas que basan sus estrategias en este tipo de compuestos. En el campo de las enfermedades infecciosas se encuentra en ensayo clínico Fase II/III una vacuna contra el virus de la inmunodeficiencia humana, en Fase II una contra la hepatitis C, en Fase I una contra el herpes genital que utiliza 32 péptidos sintéticos provenientes del virus Herpes simple 2. También se encuentran en Fase I vacunas contra la malaria, el virus de la inmunodeficiencia humana y la neumonía causada por *Pseudomonas aeruginosa*. Se encontraban en etapa de estudios preclínicos formulaciones contra viruela, citomegalovirus, estreptococos y el virus de la inmunodeficiencia humana [3]. La experiencia acumulada en el campo de los péptidos terapéuticos y su reciente aparición en el escenario farmacéutico puede propiciar que las vacunas basadas en péptidos sintéticos entren en el mercado en un futuro próximo [3].

## **2.2. Síntesis química de péptidos. Principios generales**

Los péptidos se pueden obtener mediante la síntesis química, la tecnología del ácido desoxirribonucleico recombinante, la transgénesis y la síntesis enzimática [2]. Generalmente, el tamaño del péptido determina la tecnología más adecuada para su producción. La síntesis química ofrece mayor diversidad estructural que los métodos biotecnológicos, pues es posible el empleo de aminoácidos no naturales y la gran variedad de modificaciones químicas que se pueden introducir. Esto permite una mayor generación de propiedad intelectual en la obtención de las nuevas moléculas [2].

Actualmente, la tecnología de elección para la obtención de péptidos entre 5 y 50 aminoácidos es la síntesis química [2,6,97], ya sea en fase sólida [98], en disolución [99] o mediante una combinación de las dos tecnologías [6]. La industria farmacéutica ha podido satisfacer la creciente demanda de estas moléculas, gracias al surgimiento de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, del Inglés: *Solid phase peptide synthesis*) [98] y al desarrollo acelerado de los métodos de síntesis química. El empleo de la SPPS es crucial en las etapas tempranas de investigación preclínica y en la producción de ingrediente farmacéutico activo [7]. La producción de toneladas del péptido Fusoén (36 aminoácidos) empleado en el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida humano,

revolucionó la SPPS y la convirtió en la tecnología estándar para la obtención de estos compuestos en las etapas de investigación [2,7]. La SPPS se ha extendido a otras biomoléculas, tales como oligonucleótidos [100], oligosacáridos [101,102] y sentó las bases para el desarrollo de la química combinatoria [103,104].

Antes del surgimiento de la SPPS, los péptidos se sintetizaban por métodos clásicos en disolución, los que permitían la obtención de grandes cantidades de péptidos con alta pureza, pero eran tediosos, lentos, y requerían de una alta especialización. Se necesitaba la purificación y la caracterización de cada intermediario peptídico protegido, lo cual se hacía muy engorroso y difícil debido a la baja solubilidad que presentan estos fragmentos [105]. La introducción de la SPPS en 1963 por *Merrifield B.* [98] revolucionó el campo de la química de péptidos y de sus aplicaciones. Con esta metodología y su automatización, el tiempo requerido para la síntesis de péptidos disminuyó considerablemente. La SPPS consiste en acoplar covalentemente el aminoácido correspondiente al extremo C de la secuencia a un soporte insoluble y alargar la cadena peptídica desde este residuo-soporte por incorporación de los restantes aminoácidos a través de pasos sucesivos de acoplamiento del aminoácido protegido y desprotección del grupo  $\alpha$ -amino. En la Figura 1 se presenta el esquema general empleado para la SPPS. Se utiliza un sistema de protección de los grupos reactivos de los aminoácidos para lograr alta especificidad en la síntesis. Se emplea una protección temporal para el grupo  $\alpha$ -amino, la que se elimina en cada paso de desprotección y una protección permanente para los grupos reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos, la cual se elimina al final de la síntesis. El empleo de un exceso de reactivos garantiza la alta eficiencia de cada reacción, los reactivos no consumidos se eliminan fácilmente mediante procesos de lavados y filtraciones al vacío [106]. Cuando se completa la secuencia peptídica, los grupos protectores de las cadenas laterales se eliminan y el péptido se separa del soporte sólido (proceso de desanclaje). Existen dos métodos generales para la SPPS, la síntesis por pasos (Figura 1) y la síntesis convergente [106]. La síntesis por pasos es el método más eficiente para obtener péptidos que no excedan los 40 residuos. La síntesis convergente se utiliza para obtener péptidos más largos [7,105]. Esta se basa en la obtención de fragmentos peptídicos cortos mediante la síntesis por pasos. Estos fragmentos son purificados y posteriormente enlazados covalentemente con el empleo de los métodos tradicionales de activación del grupo carboxilo (en el caso de los fragmentos protegidos) o con el empleo de reacciones

químicas específicas (en el caso de los fragmentos no protegidos) para formar el péptido con la secuencia deseada [105].

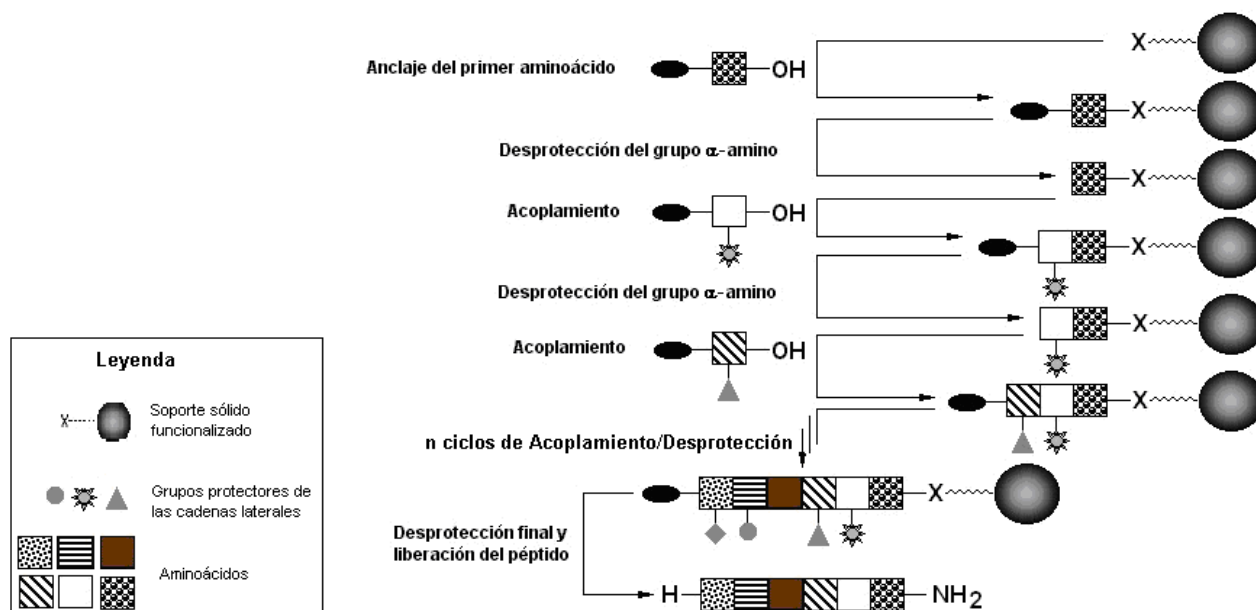


Figura 1. Esquema general de síntesis de péptidos en fase sólida.

### 2.2.1. Metodologías de síntesis de péptidos en fase sólida. Esquemas de protección

La selección del grupo protector del  $\alpha$ -amino de los aminoácidos (protección temporal) dicta la selección de los grupos protectores de las cadenas laterales (protección permanente) así como del espaciador y del enlace a la resina. En la actualidad existen varios grupos  $N^\alpha$ -protectores, los más populares son el grupo tert-butiloxycarbonilo (Boc) que es lábil en medio ácido y el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) que es lábil en medio básico (Figura 2).

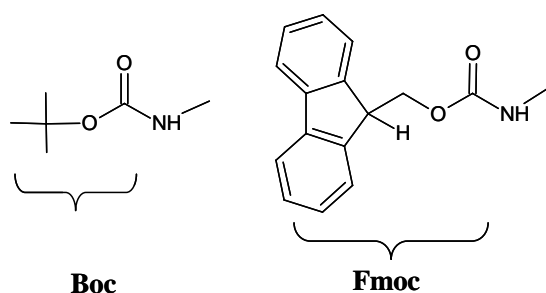
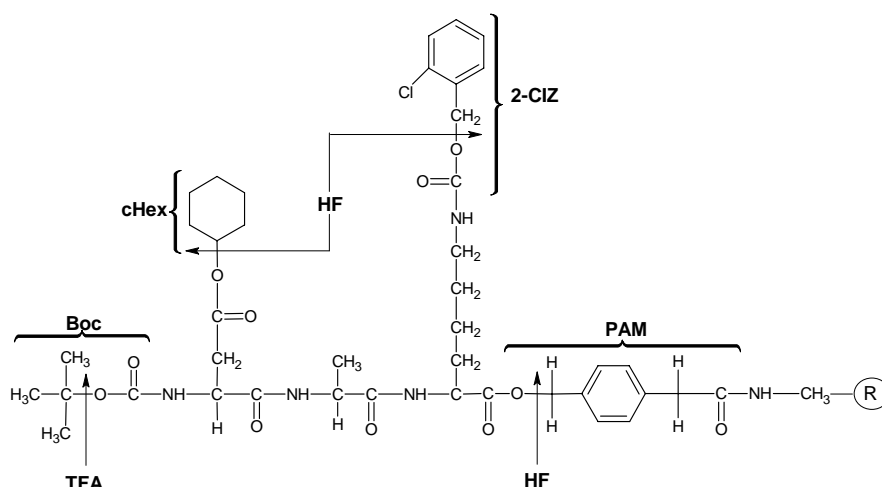


Figura 2. Grupos más utilizados para la protección temporal del grupo  $\alpha$ -amino de los aminoácidos. Boc (grupo tert-butiloxycarbonilo) y Fmoc (grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo).

Existen dos químicas generales de síntesis, la química conocida como Boc-Bencilo (Boc/Bzl) [98,107] y la química Fmoc-tert-butilo (Fmoc/tBu) [108,109].

### 2.2.1.1. Química Boc/Bzl

La química Boc/Bzl, introducida por *Merrifield B.* [107], depende de la labilidad gradual de los grupos protectores a tratamiento ácido (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema representativo de protección para la química Boc/Bzl con el empleo de la resina del ácido p-hidroximetilfenilacético (PAM). Las flechas señalan los sitios de corte de los ácidos TFA y HF para eliminar las protecciones temporales y permanentes, respectivamente introducidas durante la SPPS.

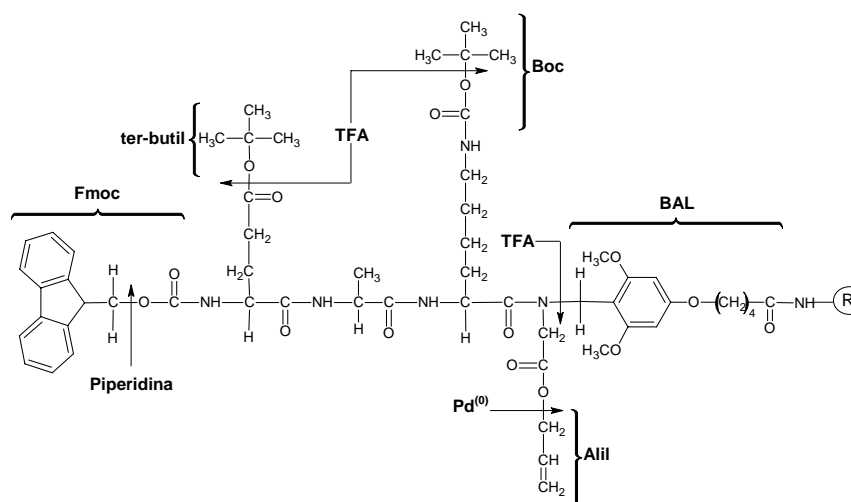
El grupo protector N<sup>α</sup>-Boc se elimina por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA), usualmente a concentraciones entre 25-50 % en diclorometano (DCM). El tratamiento con TFA libera isobutileno y dióxido de carbono. La amina queda protonada y se debe neutralizar antes de la próxima acilación. En la protección permanente de las cadenas laterales de los aminoácidos se utilizan fundamentalmente grupos del tipo bencilo sustituidos (uretanos, éster y éter). También se emplean otros tipos de grupos protectores como el ciclohexilo (cHex) y el p-toluenosulfonilo.

La eliminación de estos grupos protectores se realiza por tratamiento con ácidos más fuertes como el fluoruro de hidrógeno líquido y el ácido trifluorometanosulfónico, en presencia de agentes nucleofílicos adecuados que capturan los carbocationes que se generan [110]. Sin embargo, se emplean otros grupos protectores en combinación con la química Boc, como al acetamidometilo (Acm), el 2,4-dinitrofenilo (Dnp), el formilo y el 3-nitro-2-piridinosulfenilo (Npys), que son estables a ácidos fuertes y pueden ser eliminados antes o después del desanclaje [111]. El Acm se elimina por tratamiento con yodo o con iones metálicos, el Dnp se elimina por tratamiento con base y el Npys se elimina por tratamiento con tioles.

La química Boc/Bzl ha sido fructífera para la síntesis de muchos péptidos, pero hay secuencias peptídicas que no son estables en las condiciones fuertemente ácidas del paso final de desanclaje. Esto propició el surgimiento de la química Fmoc/tBu como un método de síntesis que se basa en una química menos agresiva [106].

### 2.2.1.2. Química Fmoc/tBu

La química Fmoc/tBu emergió como el ejemplo de un esquema de protección ortogonal donde la eliminación de los grupos protectores se logra en orden diferente y por diferentes mecanismos [108]. La química Fmoc estándar es ortogonal en dos dimensiones: eliminación del grupo Fmoc por una base y desprotección de las cadenas laterales/separación del péptido de la resina por acidólisis. La ortogonalidad puede extenderse a tres o cuatro dimensiones (Figura 4), al usar grupos protectores más especializados y espaciadores que se eliminan con el empleo de  $\text{Pd}^0$ , luz ultravioleta, tioles, iones metálicos, hidracina u otros mecanismos [111,112]. Debido a que los esquemas ortogonales permiten la eliminación independiente de los grupos protectores, es posible la síntesis de moléculas más complejas [106]. Los esquemas ortogonales de protección son menos agresivos, ya que basa la desprotección selectiva en mecanismos alternativos, en lugar de velocidades de reacción [106].



**Figura 4. Esquema ortogonal triple representativo para la química Fmoc/tBu con el uso de una resina tipo BAL (del Inglés: Backbone amide linker).** Las flechas señalan los sitios de corte de la piperidina, el TFA y el  $\text{Pd}^0$  para eliminar las protecciones temporales y permanentes introducidas durante la SPPS.

En la química Fmoc/tBu, el grupo protector  $\text{N}^\alpha$ -Fmoc se elimina eficientemente por tratamiento con aminas secundarias, pero también se pueden emplear aminas primarias o terciarias. La más empleada es una disolución entre 20-50 % de piperidina en dimetilformamida (DMF) o una



disolución de 2 % de 1,8-diazabicyclo (5.4.0)undec-7-eno (DBU) en DMF con 2 % de piperidina [109]. En la protección de las cadenas laterales de los aminoácidos se utiliza fundamentalmente grupos del tipo tert-butilo (uretano, éster y éter). También se emplea el grupo tritilo (Trt), el 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc), 2,4,6-trimetoxibencilo (Tmob) y otros grupos protectores específicos [106]. La eliminación de todos estos grupos se realiza con TFA en presencia de agentes nucleofílicos adecuados que capturan los carbocationes que se generan [113]. No es necesario el uso de ácidos fuertes como el HF líquido, ya que el tratamiento con TFA es suficiente para eliminar los grupos protectores y separar el péptido del soporte sólido. Existen otros grupos protectores, como el Acn y el aliloxycarbonilo (Alloc) que son compatibles con la química Fmoc, pero son estables a las condiciones del desanclaje y pueden ser eliminados antes o después del desanclaje [111]. El Alloc se elimina mediante una reacción de transferencia del grupo alilo a un nucleófilo catalizada por Pd (0).

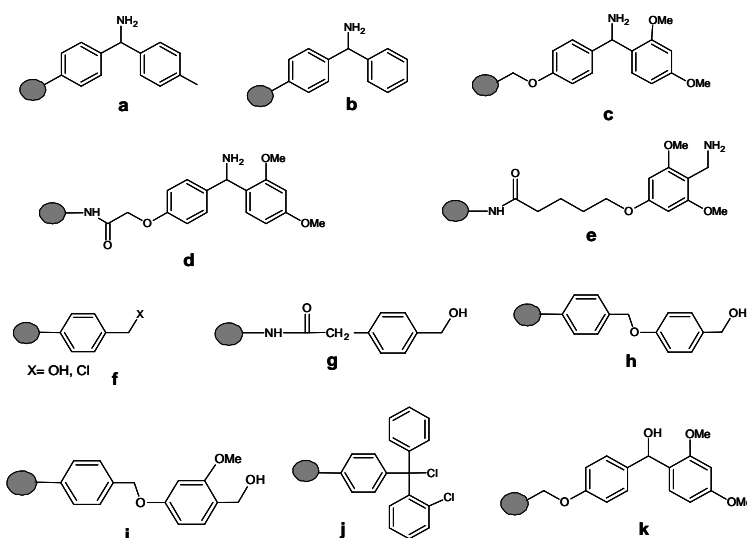
### **2.2.2. El soporte sólido**

Las ventajas fundamentales de la SPPS respecto a la síntesis en disolución están dadas por la presencia de un soporte polimérico insoluble, el cual permite la fácil separación de los solventes y reactivos por simples procesos de filtración o centrifugación. Para que un soporte sólido sea útil en la SPPS debe ser inerte a todos los reactivos y disolventes utilizados en la síntesis, debe tener alta capacidad de hinchamiento, ser altamente poroso y debe ser posible su modificación química, de forma tal que el aminoácido correspondiente al extremo carboxilo del péptido pueda acoplarse al soporte por un enlace covalente [114]. Desde la introducción del soporte de PS entrecruzado con 2 % de divinilbenceno, se han desarrollado una gran variedad de soportes sólidos que han tenido impacto en la síntesis de secuencias peptídicas complejas y en el desarrollo de la química combinatoria y la síntesis orgánica en fase sólida [114]. Los soportes “tipo gel”, tales como las resinas de PS, las resinas de poliacríamida y las resinas basadas en PEG, son los más empleados para la SPPS. Se caracterizan por tener los grupos funcionales uniformemente distribuidos a través de la red polimérica lo cual es importante para la síntesis de péptidos. El nivel de funcionalización del soporte puede ajustarse para lograr buena eficiencia en la síntesis y alto rendimiento final de péptido. La red polimérica es flexible y se puede expandir o contraer y acomodar el péptido en

crecimiento dentro del gel [114]. Se han propuesto y evaluado otros tipos de soportes, tales como fibras de celulosa (algodón y papel), PS altamente poroso, vidrio de poro controlado y sílica [114], pero su aplicación en la SPPS no se ha generalizado.

### 2.2.2.1. Resinas de poliestireno

Los soportes sólidos basados en PS (Figura 5) son los más utilizados en la SPPS [114,115]. Son resinas sintéticas preparadas por copolimerización de estireno con 1-2 % de divinilbenceno. Estas resinas tienen una alta estabilidad mecánica y se hinchan en disolventes no polares como tolueno y DCM. Además, pueden incluir una gran variedad de grupos funcionales. Tienen suficiente estabilidad mecánica para permitir la rápida filtración al vacío [114]. Se pueden obtener con un grado de sustitución de 0,3 a 1,2 mmol de grupos funcionales/g de resina [105].



**Figura 5. Resinas de PS más empleadas en SPPS.** (a) Resina MBHA, (b) Resina BHA, (c, d) Resinas Rink amida, (e) Resina PAL, (f) Resina de Merrifield, (g) Resina PAM, (h, i) Resinas tipo Wang, (j) Resina Cl-Trityl, (k) Resina Rink.

### 2.2.2.2. Resinas de poliamida

Las resinas de poliamida surgen como una alternativa a los soportes de PS [116]. Estas resinas se desarrollaron para eliminar los problemas de hidrofobicidad del soporte de PS [105].

### 2.2.2.3. Resinas de polietilenglicol

Los primeros soportes comerciales basados en PEG fueron desarrollados por *Zalipski y cols.* [39-41]. Estos soportes, llamados PEG-PS, se obtuvieron al enlazar cadenas de PEG a los grupos amino funcionales de la resina de PS, mediante un enlace amida. Se pueden emplear PEG de varios

tamaños, pero los más adecuados son de peso molecular entre 2000 y 3000 Da [105]. Simultáneamente, *Bayer y cols.* obtuvieron la resina conocida como TentaGel mediante copolimerización aniónica de etilenglicol en presencia de perlas de PS [42,43]. Posteriormente, *Hudson y cols.* desarrollaron nuevos soportes PEG-PS, llamados NovaGel Champion I y II, los cuales se obtienen con bloques lineales o cadenas ramificadas de PEG [44]. Estas resinas son mecánicamente estables. Debido a la flexibilidad conformacional del PEG en disolución, estos soportes se hinchan tanto en disolventes polares como no polares [115]. Tienen como característica fundamental que el PEG permite una completa solvatación desde el inicio de la síntesis y hace más fácil las reacciones en la fase heterogénea [114]. Las resinas PEG-PS se pueden obtener con rangos de sustitución entre 0,15 y 0,25 mmol/g o con rangos mayores entre 0,3 y 0,5 mmol/g [41]. Estas resinas se han aplicado con éxito para la síntesis de péptidos con secuencias complejas, péptidos modificados y en la reacción de ciclización en fase sólida para la formación de enlaces lactama o disulfuro [41]. Tienen aplicación en la química orgánica en fase sólida y la uniformidad de las perlas hace esta resina ideal para la síntesis de bibliotecas peptídicas del tipo “una perla-una estructura”. Un inconveniente que presenta este tipo de soporte es la liberación parcial del PEG por tratamiento con TFA o por calentamiento [114]. Las propiedades óptimas de un soporte se logran cuando se emplea el PEG como componente mayoritario de la resina. *Meldal y cols.* [115,117] desarrollaron soportes basados en PEG que contienen una pequeña cantidad de la matriz hidrofóbica. Estos soportes son superiores a los soportes de PS para la SPPS. Los soportes compuestos únicamente por PEG, denominados POEPOC, POEPS y SPOC fueron desarrollados por *Meldal y cols.* a finales de los años 90 [118,119] y recientemente, se introdujo la resina ChemMatrix [120] que ha sido superior a las resinas de PS y PEG-PS para la SPPS en cuanto a eficiencia y rendimiento [121].

### **2.2.3. Ensamblaje de la secuencia peptídica**

#### **2.2.3.1. Acoplamiento del primer aminoácido al soporte sólido. Espaciadores**

La unión entre el péptido y la resina debe ser estable frente a los tratamientos para eliminar el grupo  $N^{\alpha}$ -protector y para acoplar el aminoácido en cada ciclo de síntesis, pero a su vez debe tener una labilidad tal que permita la separación final del péptido sin que se dañe la secuencia aminoacídica [105]. El acoplamiento generalmente se logra mediante un enlace éster o amida entre el aminoácido

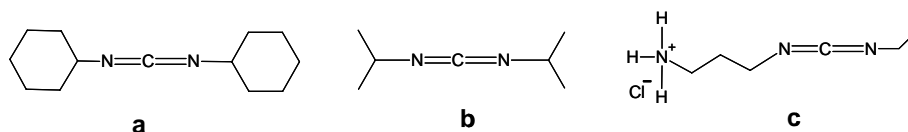
del extremo C de la secuencia y la resina, de manera que permita la liberación del péptido con su extremo C en forma de ácido o de amida. El procedimiento más simple es acoplar el primer aminoácido directamente al soporte sólido funcionalizado o a través de un espaciador. Los espaciadores son compuestos bifuncionales que aportan mayor flexibilidad y amplían el rango de aplicación de las resinas a nuevas reacciones y disolventes. Pueden diseñarse de forma tal que modifiquen las propiedades de la unión péptido-resina, la cual puede hacerse más o menos lábil a los reactivos en dependencia del tipo de síntesis que se va a desarrollar. Entre los espaciadores más utilizados se encuentran los de tipo BAL, el AM [ácido 4-(2,4-dimetoxibencidril) fenoxiacético] y el PAL [ácido 5-(4-aminometil-3,5-dimetoxifenoxi) pentanoico] [105].

### 2.2.3.2. Métodos de acoplamiento

Los métodos de acoplamiento han tenido un desarrollo acelerado debido a la necesidad de preparar secuencias largas o incorporar aminoácidos no-naturales impedidos estéricamente [105,111,122]. Las técnicas de acoplamiento deben ser eficientes y confiables. Se debe mantener la integridad conformacional cuando el componente carboxílico contenga un centro quiral en la posición alfa. Existen dos clases de técnicas de acoplamientos, una que requiere de la activación *in situ* del ácido carboxílico y la que emplea una especie activada que ha sido previamente preparada, aislada, purificada y caracterizada [123].

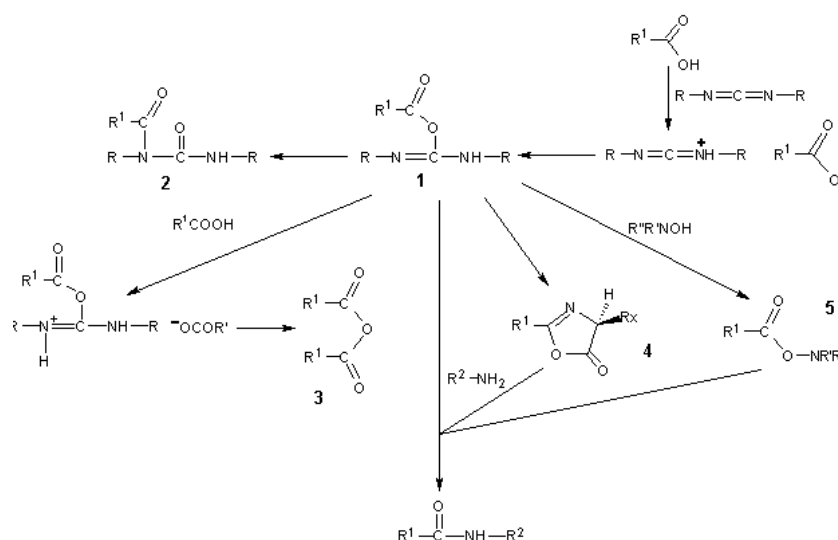
#### 2.2.3.2.1. Carbodiimidas

Las carbodiimidas (Figura 6) fueron los reactivos de acoplamiento más utilizados hasta mediados de los años 80. La *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (Figura 6a) se emplea principalmente en la química Boc/Bzl. La *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) (Figura 6b) se utiliza tanto en la química Boc/Bzl como Fmoc/tBu. Para la síntesis en disolución se emplea la carbodiimida soluble 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (Figura 6c) cuya urea es soluble en mezclas de disolventes acuosos [123].



**Figura 6. Estructuras de las carbodiimidas más utilizadas en síntesis de péptidos.** (a) *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), (b) *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), (c) 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).

El mecanismo de activación con carbodiimida es complejo y extremadamente dependiente del disolvente empleado (Figura 7). El primer paso consiste en la transferencia de un protón, seguido por la adición del ácido carboxílico para formar la *O*-acilisourea (Figura 7, 1). Este es un intermediario muy reactivo que ataca al grupo amino del aminoácido para formar la amida correspondiente [123]. Además, puede experimentar un reordenamiento para dar la *N*-acilurea (Figura 7, 2), la cual es inactiva, o atacar a otro ácido carboxílico para formar el anhídrido simétrico (Figura 7, 3). La *O*-acilisourea reactiva puede enolizarse o puede formar la 5(4H)-oxazolona por una ciclización intramolecular (Figura 7, 4), lo que provoca la pérdida de quiralidad. La 5(4H)-oxazolona solo se forma si existe un enlace amida vecino al grupo carboxílico activado.

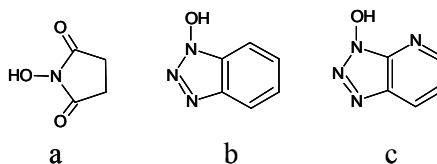


**Figura 7. Mecanismo de formación del enlace amida mediante la activación por carbodiimidas.** (1) *O*-acilisourea, (2) *N*-acilurea, (3) anhídrido simétrico, (4) 5(4H)-oxazolona, (5) éster activo.

Muchas de las reacciones colaterales que ocurren cuando la activación se realiza solamente con carbodiimidas se pueden evitar con la introducción de derivados de la hidroxilamina ( $R''R'NOH$ ) en la mezcla de reacción. Estos compuestos interceptan los intermediarios muy reactivos de *O*-acilisourea, formando un agente acilante menos reactivo y más estable (Figura 7, 5), pero que es suficientemente potente para permitir la rápida formación del enlace amida [105].

La *N*-hidroxisuccinimida (Figura 8a) fue el primer derivado de hidroxilamina que se empleó en la síntesis de péptidos. El 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (Figura 8b) ha sido el más utilizado de los derivados de la hidroxilamina [105]. El 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) (Figura 8c), ha sido

superior al HOBt ya que incrementa la velocidad de acoplamiento y reduce el riesgo de racemización [123].



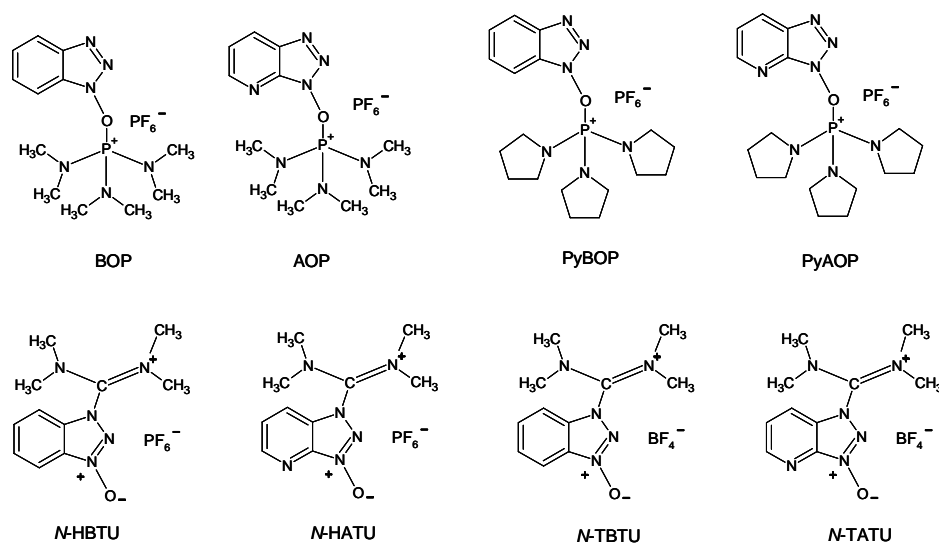
**Figura 8. Derivados de hidroxilamina empleados en la formación del enlace amida mediante activación con carbodiimidas.** (a) N-hidroxisuccinimida, (b) HOBt y (c) HOAt.

Recientemente se introdujo un nuevo reactivo de acoplamiento, el etil-2-ciano-2-(hidroximino)acetato (Oxyma), que se emplea como aditivo sustituto del HOBt y HOAt en la reacción de activación por carbodiimida [124].

#### 2.2.3.2.2. Sales de fosfonio y uronio

Las sales de fosfonio y aminio/uronio derivadas del HOBt y del HOAt (Figura 9) se han empleado con éxito en la química de péptidos, principalmente para el acoplamiento de aminoácidos estéricamente impedidos y para la síntesis automatizada [125]. El hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(dimetilamino)fosfonio (BOP) fue uno de los primeros reactivos comerciales, pero forma como subproducto la triamida hexametilfosfórica que es un compuesto cancerígeno [126]. Más tarde fue descrito el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidino)fosfonio (PyBOP) [127], el cual aventaja al BOP, pues no forma el producto cancerígeno. Las sales de fosfonio derivadas del HOAt, hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il-N-oxi-tris(dimetilamino)fosfonio (AOP) y hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidino)fosfonio (PyAOP), también han sido preparadas y son por lo general más eficientes que el BOP y el PyBOP [128-130]. Recientemente se desarrollaron las sales de fosfonio derivadas de la oxyma, hexafluorofosfato de O-[(ciano-(etoxicarbonil)metiliden)-amino]-iloxitripirrolidinofosfonio (PyOxP) y tetrafluorborato de O-[(ciano-(etoxicarbonil)metiliden)-amino]-iloxitripirrolidinofosfonio (PyOxB), que exhiben mayor capacidad de suprimir racemización en el ensamblaje de péptidos impedidos estructuralmente, mayor rendimiento en la reacción de ciclización y mayor solubilidad en DMF y DCM respecto a los derivados de benzotriazol [131].

Las sales de aminio/uronio que más aceptación han tenido en la SPPS han sido el N-óxido de hexafluorofosfato de N-[1H-benzotriazol-1-il)-(dimetilamino)metileno]-N-metilmetanaminio (HBTU) y el N-óxido de tetrafluoroborato de N-[1H-benzotriazol-1-il)-(dimetilamino)metileno]-N-metilmetanaminio (TBTU) que son derivadas del HOBt. También se han empleado con éxito las sales derivadas del HOAt, como el N-óxido de hexafluorofosfato de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-ilmetileno]-N-metilmetanaminio (HATU) y el N-óxido de tetraborato de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-ilmetileno]-N-metilmetanaminio (TATU) [123]. Recientemente se desarrolló la sal de uronio derivada de la Oxyma, el hexafluorofosfato de 1-[1-(ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi)dimetilaminomorfolinometileno)]metanaminio (COMU) [132,133]. Este reactivo es superior al HOBt y similar al HOAt en cuanto a suprimir la racemización y en la eficiencia de la reacción de acoplamiento. En términos de seguridad tiene menor riesgo de explosión que los derivados de benzotriazol [124,132].



**Figura 9. Representación de sales de fosfonio y aminio/uronio derivadas del HOBt y del HOAt.**

Las sales de aminio/uronio, a diferencia de las carbodiimidas y las sales de fosfonio, reaccionan durante el acoplamiento con los grupos amino formando un derivado de guanidinio que los bloquea [130,134]. Esta reacción colateral no ocurre durante el acoplamiento de aminoácidos sencillos, pero puede ocurrir durante la activación de aminoácidos impedidos estéricamente, segmentos de péptidos protegidos y en los procesos de formación de lactamas [123].

## 2.3. Modificaciones químicas de los péptidos sintéticos

### 2.3.1. Constreñimientos conformacionales mediante ciclización

La introducción de constreñimientos conformacionales en un péptido sintético es una de las modificaciones que se han empleado para mejorar las propiedades terapéuticas de estas biomoléculas [10]. También se han aplicado para mimetizar la estructura que estos tienen en una proteína nativa para el diseño de vacunas peptídicas [3]. La ciclización puede disminuir la flexibilidad conformacional del péptido lineal, mejorar su permeabilidad a través de la membrana y aumentar la estabilidad a la proteólisis por endo y exopeptidasas. La ciclización se puede lograr por formación de enlaces disulfuro, amida cíclica (lactama), éster, dicarba e hidrazina [2,135,136].

El método más aceptado para lograr especificidad en la formación de puentes intramoleculares es el empleo de un sistema ortogonal de protección para los aminoácidos que forman los ciclos [11,12,16,137-140]. Se han desarrollado diferentes grupos protectores que permiten obtener de manera selectiva enlaces disulfuro o enlaces lactama en un péptido sintético, por combinación de la reacción de ciclización en fase sólida y en disolución [11,12,16,137]. Se ha descrito la síntesis de péptidos con uno o varios enlaces intramoleculares que contienen hasta tres enlaces disulfuro [11-15] o hasta tres enlaces lactama [16-20]. Además se han desarrollado metodologías que permiten combinar enlaces disulfuro y lactama en el mismo péptido [21,22].

#### 2.3.1.1. Formación de enlaces disulfuro

El enlace disulfuro se forma entre los grupos tiol de dos residuos de Cys (Figura 10). La formación de un enlace disulfuro generalmente se realiza a partir del péptido con los grupos tiol libres. También se puede realizar por el método de desprotección/oxidación a partir del péptido con los grupos tiol protegidos [12].

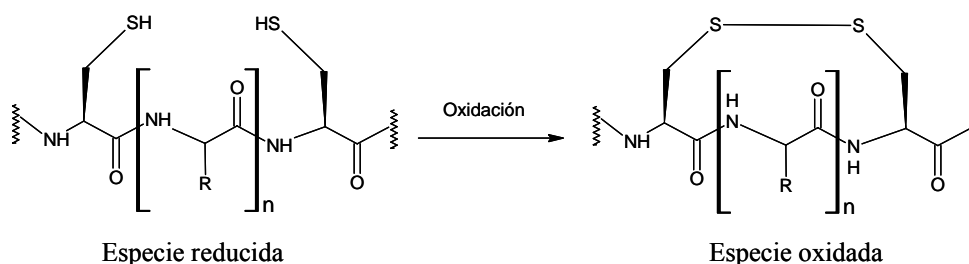


Figura 10. Esquema de la reacción de formación del enlace disulfuro en un péptido.



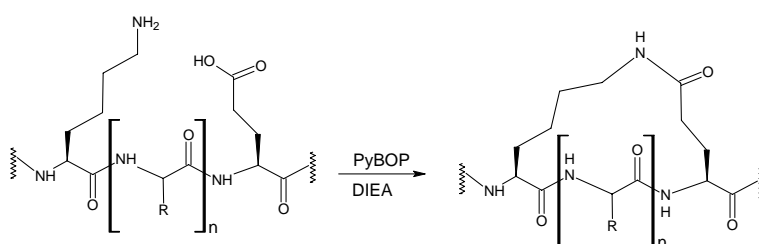
La formación de varios enlaces disulfuro puede lograrse por el método de formación aleatoria de los enlaces disulfuro en disolución [141], por el método de formación regioselectiva [12,138] o por la combinación de los dos métodos [142]. Con el empleo del método de formación aleatoria de los enlaces disulfuro se obtienen múltiples variantes donde priman aquellas que termodinámicamente son más estables, pero que pueden no ser la conformación deseada. Para la formación regioselectiva de varios enlaces disulfuro se utilizan grupos protectores diferentes para proteger de manera diferencial los pares de cisteínas que se enlazan entre sí [9,11,12,139]. Este es el método de elección para asegurar la formación deseada de los enlaces disulfuro, ya que se puede realizar un control analítico de la oxidación de las cisteínas al formarse gradualmente los enlaces disulfuro [143,144]. La formación de los enlaces disulfuro se puede realizar tanto en disolución como en fase sólida [12]. Para la obtención de los puentes intramoleculares en disolución se emplean disoluciones diluidas del péptido de interés y para obtener dímeros u oligómeros, se realiza la oxidación en disoluciones concentradas [12]. Cuando la ciclización se realiza en fase sólida se deben emplear resinas con bajo grado de sustitución para favorecer la reacción intramolecular por el fenómeno conocido como “pseudodilución” y no el entrecruzamiento entre las moléculas [12].

El método más común de oxidación de las Cys libres es mediante el oxígeno disuelto en una disolución acuosa a pH básico. Este método es muy simple, pero puede demorar varios días. La velocidad de reacción y los rendimientos se pueden mejorar si se adicionan sustancias de bajo peso molecular que contengan un enlace disulfuro o un tiol libre, como son una mezcla de glutatión oxidado y reducido, Cys, cisteamida y 2-mercaptoetanol [12]. Se han desarrollado otros métodos que emplean oxidantes como el ferrocianuro de potasio y el dimetilsulfóxido (DMSO) que han mostrado ser más eficientes [9,12]. El DMSO es miscible en agua hasta un 20 % (v/v), la oxidación ocurre en un amplio rango de pH (de 3,0 a 8,0), en el cual no se observa la oxidación de aminoácidos sensibles como Met, Trp y Tyr [12]. El  $K_3Fe(CN)_6$  se ha empleado como oxidante para formar el enlace disulfuro, pero es sensible a la luz y puede oxidar al Trp y la Met presentes en el péptido [12]. La formación del enlace disulfuro a partir del péptido con las Cys protegidas evita la formación de enlaces disulfuro no deseados. Las cisteínas que forman el enlace disulfuro deben estar protegidas con el mismo tipo de grupo protector. Los reactivos de oxidación que se emplean en este caso son yodo, trifluoroacetato de talio (III) y sulfóxidos de alquiltriclorsilanos.

La formación de los enlaces disulfuro se puede verificar por el ensayo colorimétrico de Ellman (para la oxidación a partir de grupos tiol libres) [145], por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC, del Inglés: *Reversed phase high-performance liquid chromatography*) [146] y por espectrometría de masas [147]. La caracterización por RP-HPLC se basa en el cambio del tiempo de retención de la especie oxidada respecto a su precursor. La caracterización por espectrometría de masas se basa en la diferencia de masas que existe entre la especie oxidada y su precursor. La formación del enlace disulfuro a partir de los grupos tiol libres se verifica por espectrometría de masas debido a la pérdida de 2 Da al oxidarse las Cys (Figura 10).

### 2.3.1.2. Formación de lactamas

La lactama es una amida cíclica que se forma entre los grupos amino y carboxilo (Figura 11). El enlace amida se puede formar entre el grupo amino y el grupo carboxilo de los extremos N y C del péptido (tipo cabeza-cola) o entre el grupo  $\epsilon$ -amino de la Lys y el grupo COOH de la cadena lateral del Asp o Glu (tipo cadena lateral-cadena lateral). También se pueden formar entre el grupo N-terminal y el COOH de la cadena lateral del Asp o Glu o entre el extremo C y el grupo  $\epsilon$ -amino de la Lys [137].



**Figura 11. Esquema de la reacción de formación de la lactama (tipo cadena lateral-cadena lateral).**

Los enlaces lactama en un péptido se pueden obtener en fase sólida o por síntesis convergente en disolución a partir de fragmentos protegidos [16]. Para la obtención de la lactama en fase sólida se requiere del empleo de grupos protectores permanentes para proteger los grupos funcionales en Lys, Asp y Glu que no forman parte de la lactama y de grupos protectores temporales para los pares Lys-Asp o Lys-Glu que forman el ciclo. En la química Boc/Bzl se emplean grupos del tipo bencilo como protectores permanentes y grupos lábiles a base, Fmoc y Fm (9-fluorenilmetilo), como protecciones temporales [148]. En la química Fmoc/tBu se emplean grupos del tipo tert-butilo como protectores permanentes y el grupo alilo como protección temporal [17]. Para lograr selectividad en la

formación de varios enlaces lactama se emplean diferentes grupos que protegen cada par de Lys-Asp involucrado en la lactama [16,137,149]. Si los enlaces lactama se encuentran separados en la secuencia peptídica, se puede emplear un mismo sistema de grupos protectores para obtener dos ciclos de lactama [148,150]. Se emplean las sales de fosfonio para formar el enlace amida en fase sólida. Se evita el uso de las sales de uronio debido a la reacción colateral de formación del guanidinio con el grupo amino [134]. La formación del enlace lactama se puede verificar por espectrometría de masas debido a la pérdida de 18 Da al formarse el enlace amida (Figura 11).

### 2.3.2. Polimerización lineal

La polimerización lineal es una de las estrategias que se emplean para aumentar la inmunogenicidad del péptido simple en el diseño de vacunas sintéticas [57-59,61]. *Borras-Cuesta y cols.* desarrollaron una metodología para la homopolimerización lineal del péptido a través de sus extremos N y C mediante la polimerización del péptido protegido con el empleo de DCC y HOBt [57]. Por otra parte, *Patarroyo y cols.* emplearon la polimerización por formación de enlaces disulfuro intermoleculares entre las Cys adicionadas en los extremos N y C del péptido, lo que constituyó la primera vacuna peptídica contra la malaria que se empleó en ensayos clínicos en humanos [58]. En la búsqueda de nuevos candidatos vacunales peptídicos contra la malaria, *Moreno y cols.* desarrollaron una estrategia similar a la desarrollada por *Patarroyo y cols.* para obtener polímeros por formación de enlaces disulfuro intermoleculares, de una quimera peptídica que contiene epitopos de células T y B, a la que le adicionan una Cys en cada extremo del péptido [59,61].

El aumento de la inmunogenicidad del péptido polimerizado puede deberse a que al aumentar el tamaño del antígeno, aumenta la posibilidad de que sea capturado por fagocitosis, o por la generación de mayor diversidad de fragmentos inmunogénicos que contienen los epitopos B y T en el procesamiento por la célula presentadora de antígeno.

### 2.3.3. Conjugación a polietilenglicol

La peguillación es una tecnología bien establecida para transformar proteínas, péptidos, oligonucleótidos y moléculas más pequeñas en compuestos con propiedades farmacológicas mejoradas respecto a la molécula sin modificar. La peguillación es un proceso por el cual una o más moléculas de PEG activado reaccionan químicamente con una biomolécula, para producir una nueva

entidad molecular con mejoradas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas [31]. Las biomoléculas modificadas con PEG muestran un incremento de la estabilidad y solubilidad, reducida eliminación renal, mayor tiempo de vida medio en sangre, mayor resistencia a la degradación proteolítica y un decrecimiento de la inmunogenicidad y antigenicidad, lo que permite el mejoramiento de las propiedades terapéuticas [31]. La peguilaación puede disminuir la actividad biológica de la molécula medida en ensayos *in vitro* [31]. Sin embargo, incrementan la efectividad en los ensayos *in vivo*, con respecto a la molécula sin modificar.

### **2.3.3.1. Propiedades del polietilenglicol**

El PEG es un polímero sintético polidisperso, cuya unidad monomérica lo constituye el óxido de etileno (MM de 44 Da). Está compuesto por moléculas que tienen diferente número de monómeros, lo que produce una distribución gaussiana de la MM. Contiene dos grupos terminales hidroxilos que pueden ser químicamente activados o uno de ellos ser bloqueado con un grupo metóxido para obtener el PEG monofuncional. El PEG es soluble en disolventes acuosos y orgánicos, es inerte, no tóxico y no inmunogénico, la velocidad de excreción del organismo es dependiente de la talla y fue aprobado para uso en humanos [31].

Una limitación que ha presentado el PEG es que su polidispersión hace que se obtengan poblaciones de conjugados con propiedades biológicas diferentes, que incide principalmente en el tiempo de vida medio [151]. Además hace más compleja la caracterización del conjugado y el control de calidad necesario para aplicaciones clínicas. En la actualidad se han desarrollado metodologías para la obtención de PEG monodisperso, que permiten solucionar los problemas asociados al empleo de PEG polidisperso en la obtención de conjugados [152,153], pero solo se han obtenido PEG con MM de hasta aproximadamente 4000 Da.

### **2.3.3.2. Metodologías de peguilaación**

#### **2.3.3.2.1. Peguilaación en disolución**

Los grupos funcionales que más se emplean en los péptidos y proteínas para acoplar el PEG, son los grupos amino primarios (extremo N y  $\epsilon$ -amino de la Lys), el grupo tiol de la Cys y los grupos ácido del Asp, Glu y extremo C [30,31,154]. El PEG activado puede ser lineal o ramificado, de tamaño y estructura variable y puede ser monofuncional, bifuncional o polifuncional [31]. La modificación

con PEG puede ser permanente o hidrolizable y puede dirigirse a un sitio específico en la secuencia aminoacídica o ser aleatoria.

En los últimos años se han desarrollado varias metodologías químicas para la peguilaación de los péptidos y proteínas en disolución [154-156]. El procedimiento más común es la reacción de un PEG electrofílicamente activado con los grupos amino primarios (generalmente el grupo  $\epsilon$ -amino de la Lys) presentes en el péptido o la proteína para formar un enlace amida, alquilo, carbamato, urea o una base de Schiff. Los derivados de PEG más empleados son PEG-succinimidil succinato, PEG-succinimidil propionato o butirato, PEG-carbonil imidazol, PEG-tresilato, PEG-succinimidil carbonato, PEG-aldehído y PEG-isocianato [31]. Esta metodología de peguilaación produce conjugados heterogéneos (isómeros de posición) debido a la introducción del PEG de manera aleatoria en múltiples sitios. Esta heterogeneidad se puede disminuir o eliminar con el empleo de otros derivados de PEG que permitan dirigir la peguilaación al grupo N-terminal y al SH libre. Los reactivos que mayor aplicación han tenido son el PEG-maleimido, PEG-vinil sulfona, PEG-iodoacetamida, PEG-ortopiridil disulfuro y PEG-aldehído [31]. La peguilaación en disolución tiene como ventaja fundamental la alta eficiencia y rendimiento de la reacción, pero tiene como inconveniente la poca selectividad, lo cual lleva a la obtención de varias especies con diferente grado de peguilaación, que muchas veces son difíciles de caracterizar y de purificar.

#### **2.3.3.2.2. Peguilaación en fase sólida**

La química para la peguilaación de los péptidos también tiene la ventaja adicional que se puede realizar en fase sólida durante la propia síntesis del péptido, con el empleo de un esquema ortogonal de protección apropiado para que la introducción del PEG sea selectiva. La unión del PEG a los grupos amino primarios (extremo N y  $\epsilon$ -amino de la Lys) de los péptidos con el empleo de las metodologías de síntesis en fase sólida, ha sido anteriormente descrito [35,36,38]. La peguilaación en el extremo C del péptido se realiza usualmente por la unión al soporte sólido de un aminoácido derivatizado previamente con el PEG [34] o por la introducción de aminoácidos especiales que permitan la introducción del PEG en fase sólida, mediante reacciones químicas específicas [37].

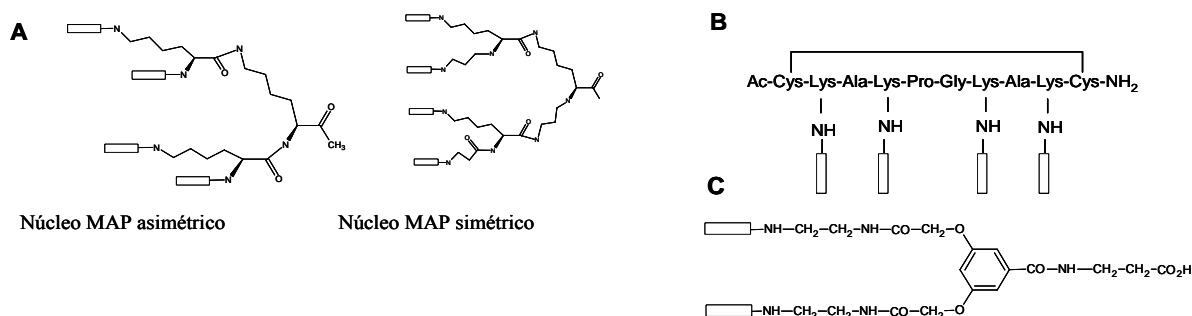
*Hellerman y cols.*, desarrollaron un soporte PEG-PS para obtener péptidos peguilados en el extremo C con PEG de MM hasta 400 Da, con el objetivo de mejorar la solubilidad del péptido [157]. La

resina TentaGel-NH<sub>2</sub> es el único de estos soportes que se ha aplicado para obtener péptidos peguilados en el grupo C-terminal, pero se limita a una MM de PEG de 3000 Da [36]. La peguilación en fase sólida se caracteriza por una elevada selectividad debido al uso de sistemas ortogonales de protección, pero los rendimientos de las reacciones son menores que los obtenidos en disolución.

## 2.3.4. Péptidos ramificados

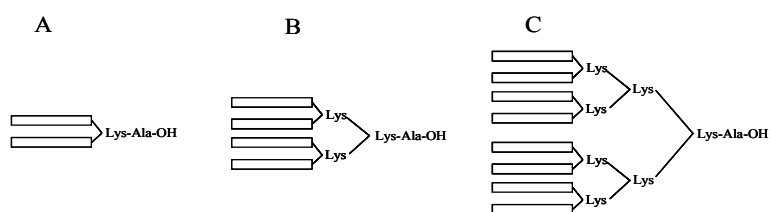
### 2.3.4.1. Tipos de péptidos ramificados

Todos los péptidos ramificados comparten un diseño similar de ramificación con una matriz central que les confiere diferentes arquitecturas y carácter dendrímérico [158]. El diseño de la matriz central determina que la estructura ramificada sea del tipo cascada, bandera o radial (Figura 12). *Tam y cols.* desarrollaron los péptidos multiantigénicos tipo cascada, cuya matriz central contiene varios niveles secuenciales de un aminoácido trifuncional [62,94]. El aminoácido más utilizado es la Lys, ya que tiene dos grupos amino terminales disponibles para la ramificación.



**Figura 12. Representación esquemática de péptidos ramificados.** (A) MAP tipo cascada. (B) Estructura ramificada tipo bandera, (C) Estructura ramificada tipo radial. Los rectángulos representan las secuencias peptídicas.

La matriz central es asimétrica si se emplea la Lys para su construcción y simétrica si se utiliza betaAla-Lys. En dependencia de la cantidad de Lys que se acoplen se obtendrá un MAP dimérico, tetramérico u octamérico (Figura 13).



**Figura 13. Representación esquemática de las estructuras de MAP del tipo cascada.** A-MAP dimérico, B- MAP tetramérico, C- MAP Octamérico.

#### 2.3.4.2. Metodologías de síntesis de los péptidos multiantigénicos

Un método común para la obtención de los MAPs es la síntesis en fase sólida paso a paso. Se acopla a la resina un derivado de Lys que tenga el mismo grupo protector para los grupos  $\alpha$ - y  $\varepsilon$ -amino, Boc-Lys(Boc)OH o la Fmoc-Lys(Fmoc)OH [62,94]. Se acoplan consecutivamente tantos residuos de Lys como nivel de ramificación se desee. Seguidamente, se sintetiza el péptido sobre el esqueleto de Lys en la orientación  $C \rightarrow N$ . Los epitopos B y T se pueden sintetizar uno a continuación del otro en la forma (B + T) o (T + B).

También se pueden sintetizar de manera independiente en las ramificaciones del esqueleto central, para lo cual se emplean derivados de Lys con grupos protectores diferentes en el grupo  $\alpha$ - y  $\varepsilon$ -amino o se pueden obtener por síntesis convergente de fragmentos protegidos, pero esta alternativa tiene el inconveniente de la limitada solubilidad de los fragmentos hidrofóbicos protegidos y la baja eficiencia del acoplamiento de los fragmentos [158]. *Tam y cols.* desarrollaron la estrategia ortogonal quimioselectiva para el acoplamiento de los segmentos peptídicos no protegidos a la matriz central de Lys [159], con lo cual se solucionan los inconvenientes de la síntesis convergente de fragmentos protegidos y ofrece la ventaja adicional de que permite la orientación del péptido en las dos direcciones  $C \rightarrow N$  y  $N \rightarrow C$ .

Se puede obtener la molécula dimérica si se agrega una Cys en el extremo C del MAP, con lo cual se duplica el número de copias del péptido y la MM de los productos a menudo excede los 15 000 Da [158]. A diferencia de la polimerización lineal, la cual conduce a polímeros de un amplio rango de MM, los MAPs presentan el péptido ramificado en una estructura químicamente definida [158]. La principal ventaja de los MAPs es que pueden incluir simultáneamente en su estructura epitopos B de interés y epitopos Th [93].

Los MAPs han mostrado también mayor estabilidad a la degradación proteolítica [160] y se han empleado para aumentar la inmunogenicidad del péptido simple en el diseño de vacunas peptídicas [161] y en inmunoensayos [158].

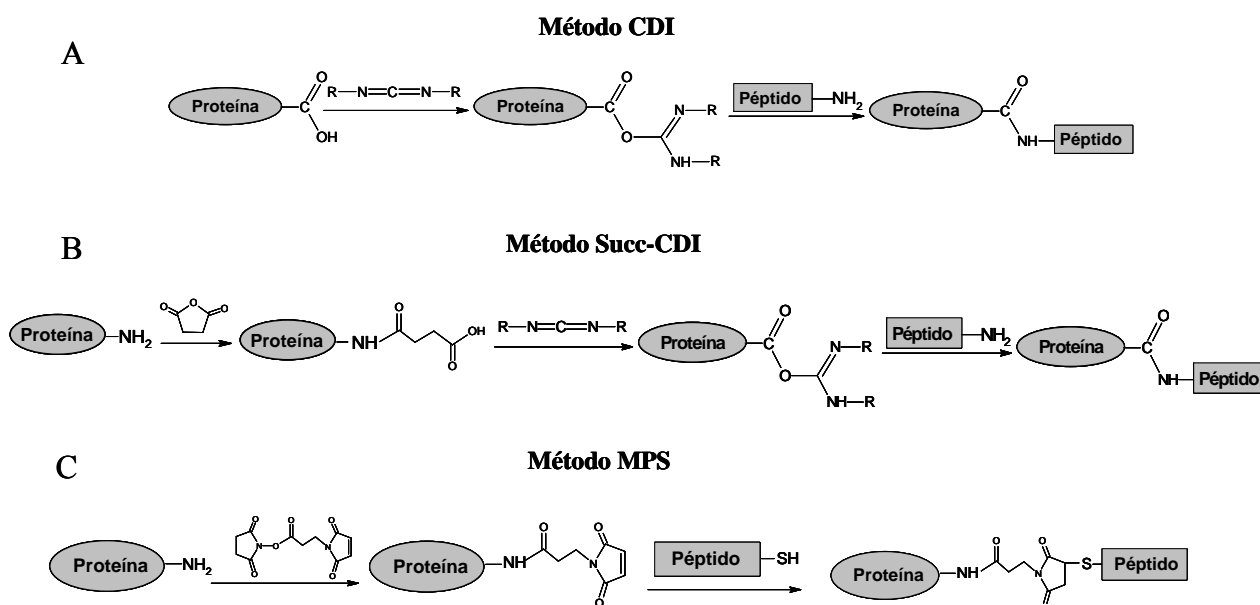
### 2.3.5. Conjugación de péptidos a proteínas portadoras

La conjugación de péptidos a proteínas portadoras es una de las metodologías que se emplean para aumentar la inmunogenicidad del péptido simple en el diseño de vacunas peptídicas [67]. Las técnicas de conjugación dependen de los grupos activos presentes en los reactivos derivatizantes o de entrecruzamiento y de los grupos funcionales presentes en el péptido. Los aminoácidos que contienen cadenas laterales ionizables, Asp, Glu, Lys, Arg, Cys, His y Tyr, son los que están involucrados en los procesos de conjugación. El método de la carbodiimida (método-CDI) es uno de los más empleados para la conjugación de péptidos a proteínas. La carbodiimida soluble EDC reacciona con los grupos carboxílicos (Asp, Glu y extremo C) para formar la O-acilisourea, que reacciona posteriormente con los grupos amino primarios (N-terminal y  $\epsilon$ -amino de la Lys) para formar un enlace amida (Figura 14A). La EDC es un reactivo de acoplamiento de tipo “cero-longitud” ya que no introduce espaciador entre el péptido y la proteína. La conjugación se puede realizar en un solo paso, pero es recomendable realizarla en dos pasos para eliminar el exceso de EDC libre que puede provocar la polimerización del péptido [67].

También se ha desarrollado un método de conjugación que emplea carbodiimida, denominado método-Succ-CDI, en el que previamente se convierten los grupos amino de la proteína en grupos ácidos por tratamiento con anhídrido succínico (Figura 14B), con lo que se incrementan los posibles sitios de unión del péptido.

Se han empleado reactivos homobifuncionales como el glutaraldehído, pero estos tienen el inconveniente de que la reacción de conjugación es difícil de controlar y se forma una gama heterogénea de conjugados [67]. Los reactivos heterobifuncionales son los que mayor aceptación han tenido ya que se puede lograr mayor control de la reacción de conjugación. El éster *m*-maleimidopropiónico de la *N*-hidroxisuccinimida (MPS) es uno de los reactivos heterobifuncionales más empleados (método-MPS). Este reactivo de acoplamiento contiene por un lado el éster de *N*-hidroxisuccinimida que reacciona con los grupos amino primarios y por el otro lado tiene un grupo maleimido que reacciona selectivamente con los grupos tiol (Figura 14C). La conjugación con este tipo de reactivo se realiza en dos o tres pasos, con lo cual se elimina la polimerización que se obtiene con el empleo de los reactivos homobifuncionales [67].





**Figura 14. Metodologías de conjugación de péptidos a proteínas portadoras. A-Método de la carbodiimida (método-CDI), B- Método del Succínico-carbodiimida (método-Succ-CDI), C-Método del éster m-maleimidopropiónico de la N-hidroxisuccinimida (método-MPS).**

La selección de la proteína portadora es también importante para lograr la funcionalidad del conjugado. Debe ser una proteína altamente inmunogénica y soluble. Las proteínas más empleadas han sido la hemocianina de lapa, la albúmina de suero bovino (BSA, del Inglés: *Bovine serum albumin*), la ovoalbúmina, el toxoide tetánico y diftérico [67]. *González y cols.*, emplearon la proteína P64K de *N. meningitidis* como proteína portadora que aporta los epitopos T necesarios para aumentar la inmunogenicidad de antígenos poco inmunogénicos, como péptidos y polisacáridos [162].

Los conjugados de péptidos a proteínas se pueden caracterizar por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, del Inglés: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) y por espectrometría de masas de desorción e ionización por láser asistida por una matriz (MALDI, del Inglés: *matrix-assisted laser desorption ionization*) [163].

La relación péptido-proteína se determina por análisis de aminoácidos (AAA), por MALDI-MS, o mediante la cuantificación de grupos reactivos en la proteína portadora antes y después de la conjugación [9].

## 2.4. Caracterización de péptidos sintéticos

La metodología más empleada para determinar la pureza de los péptidos sintéticos es RP-HPLC en columnas con matriz de fase reversa C18, aunque también se pueden emplear la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de exclusión molecular y la electroforesis capilar [146,147].

La identidad de los péptidos sintéticos se determina por espectrometría de masas (MS, del Inglés: *Mass spectrometry*) [147]. Los métodos de ionización que más se han empleado para la caracterización de los péptidos sintéticos son la ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB, del Inglés: *Fast atom bombardment*), la ionización por electronebulización (ESI, del Inglés: *Electrospray ionization*) y el MALDI. El empleo de la MS permite además la identificación de las impurezas peptídicas que se generan durante la síntesis, ya sea la presencia de péptidos truncados, péptidos de delección a los que les falta uno o varios aminoácidos, péptidos protegidos que se obtienen por un proceso ineficiente de desanclaje y las modificaciones debidas a reacciones colaterales. Esta técnica es imprescindible para corroborar la ocurrencia de las modificaciones que se introducen de manera intencional en un péptido sintético con el objetivo de mejorar sus propiedades biológicas.

## 2.5. Purificación de péptidos sintéticos

La metodología generalizada para la purificación de los péptidos sintéticos es RP-HPLC en columnas con matriz de fase reversa C8 y C18 [164]. En el proceso de purificación se emplean gradientes ascendentes del disolvente orgánico (acetonitrilo o isopropanol) en la fase móvil, lo que permite una eficiente separación del péptido y sus impurezas. Se emplean ácidos como formadores de pares iónicos, como el TFA, el ácido heptafluorbutírico y el ácido acético, cuya principal función es formar un par iónico con los grupos amino del péptido lo que mejora la resolución y evita la interacción inespecífica con los grupos silanoles de la matriz cromatográfica.

## 2.6. Aplicaciones específicas de péptidos sintéticos como agentes terapéuticos o vacunales

### 2.6.1. Búsqueda de candidatos peptídicos para el tratamiento la sepsis inducida por una infección bacteriana

La sepsis es una enfermedad infecciosa severa con índice de mortalidad de 50 % para la que no existe una terapia efectiva [23]. El LPS es el principal componente de la envoltura externa de las

bacterias Gram-negativas y es un potente activador del sistema inmune. La proteína LBP presente en el suero humano está involucrada en la activación de la respuesta inmune ante el LPS. El complejo LPS-LBP se une al receptor CD14 presente en los monocitos y macrófagos y estimula la producción de citocinas [24]. La presencia de gran cantidad de LPS lleva a una liberación excesiva de estas citocinas provocando el síndrome de choque séptico. Estudios recientes demuestran el potencial que tienen los péptidos catiónicos para el desarrollo de medicamentos contra esta enfermedad [23]. Se han investigado péptidos sintéticos catiónicos basados en el dominio de unión a endotoxinas [23,24,165,166]. Se ha descrito que determinados aminoácidos básicos presentes en la región N-terminal de la familia de proteínas LBP-BPI están involucrados en la unión al LPS [25]. Esta región es altamente catiónica debido a la presencia de aminoácidos básicos, principalmente Lys, que interaccionan electrostáticamente con las cargas negativas del LPS [25]. La obtención de péptidos restringidos conformacionalmente que mimeticen las dos horquillas beta que conforman la región N-terminal de la familia de proteínas LBP-BPI, pudiera tener mayor afinidad por el LPS que los péptidos reportados hasta el momento y convertirse en un candidato terapéutico atractivo para el tratamiento de la sepsis.

*Reyes y cols.* describieron en el año 2002 [46] que el péptido LBPK95A derivado de la región comprendida entre los aminoácidos 86-99 de la proteína LBP, pero con un cambio puntual de la Lys95 por el aminoácido Ala mostró mayor afinidad por el LPS que el péptido precursor LBP<sub>86-99</sub> descrito por *Araña y cols.* [165,167]. La capacidad de este péptido de unirse al LPS puede también tener aplicación para combatir la infección bacteriana post-quemaduras de origen térmico [168] y en la protección contra la hepatotoxicidad inducida por acetaminofeno [169]. Estos antecedentes convierten al péptido LBPK95A en un candidato terapéutico atractivo contra la sepsis y otras patologías asociadas al LPS.

#### **2.6.2. Búsqueda de candidatos peptídicos terapéuticos contra enfermedades relacionadas con la expresión aumentada de la proteína IL-15**

La proteína IL-15 es una citocina proinflamatoria poco abundante en suero, que juega un papel importante en patologías del sistema inmune como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la sarcoidosis. Estas patologías están asociadas con una expresión aumentada de la proteína IL-15, por

lo que la neutralización de esta proteína se ha propuesto como terapia contra estas enfermedades [53-55]. Santos y cols. realizaron un estudio para determinar la región de la proteína IL-15 que era reconocida por su receptor (IL-15R $\alpha$ ). Con el empleo de la síntesis sobre membranas de celulosa desarrollada por Frank R. [170], sintetizaron un panel de 22 péptidos de 10 aminoácidos, superpuestos en 5 residuos, que cubrían toda la secuencia de la proteína IL-15. De los 22 péptidos, solo el péptido P8 que comprende la región Lys<sup>36</sup>-Leu<sup>45</sup> (KVTAMKCFL) fue reconocido por el receptor IL-15R $\alpha$ . Estudios posteriores demostraron que este péptido era capaz de bloquear la actividad biológica de la proteína IL-15 en ensayos *in vitro* en líneas celulares dependientes de IL-15 [56]. Este constituye el primer informe de un péptido antagonista de la proteína IL-15 que puede ser un potencial agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la expresión aumentada de esta citocina.

### **2.6.3. Búsqueda de candidatos vacunales basados en péptidos sintéticos contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis***

La enfermedad meningocócica es una de las infecciones bacterianas de mayor impacto en la salud a nivel mundial [68]. Esta enfermedad tiene un alto índice de mortalidad y puede provocar epidemias [171,172]. Los serogrupos A, B, C, Y y W135 son los responsables de la mayoría de los casos de meningitis bacteriana que se reportan [172]. Actualmente existen vacunas universales contra *N. meningitidis* de los serogrupos A, C, Y y W135 basadas en el PSC, que se han empleado para prevenir la enfermedad invasiva y controlar los brotes epidémicos. Sin embargo, no existe una vacuna universal contra *N. meningitidis* serogrupo B, la principal causa de una enfermedad meningocócica invasiva y la muerte principalmente en infantes [68,172].

Las vacunas que existen actualmente contra MenB no son de composición definida y se basan en el empleo de VME que están enriquecidas en PME. Estas vacunas no son universales ya que se obtienen a partir de una sola cepa circulante, aunque han mostrado eficacia para combatir los brotes epidémicos en las regiones geográficas donde se aplican [69]. Los antígenos que constituyen estas VME son fundamentalmente las PME de la bacteria, así como trazas de LPS. Se ha descrito que después de la vacunación con VME o de una infección, se obtienen anticuerpos específicos contra la proteína PorA con actividad bactericida contra el meningococo que juegan un papel importante en la

protección contra la enfermedad meningocócica [70]. Una de las estrategias que se aborda para la búsqueda de una vacuna contra MenB es el empleo de la proteína PorA de varios serosubtipos en una vacuna por subunidades [71]. Estas vacunas, al igual que las de VME, no son universales, pero pueden ser aplicadas para controlar los brotes epidémicos en determinadas regiones geográficas [173]. La proteína PorA presenta ocho lazos expuestos en la superficie de la bacteria [174]. Los lazos 1 y 4 contienen las regiones variables (RV) 1 y 2, respectivamente, que son blancos de la respuesta de anticuerpos protectora contra PorA [175]. Los estudios previos de inmunización con péptidos cíclicos derivados de la RV2 (lazo 4) de PorA conjugados a proteínas portadoras mostraron que los anticuerpos antipéptido obtenidos fueron capaces de reconocer a la proteína PorA nativa en la superficie de la bacteria [64,176-178], además los anticuerpos mostraron actividad funcional contra el meningococo [177,178]. *Cristodoulides y cols.* realizaron un esquema de inmunización con MAPs que contenían un péptido derivado del lazo 4 de la PorA subtipo P1.16b y un epitopo T auxiliador derivado del toxoide tetánico. Los sueros antipéptido reconocieron a la PorA en la superficie de la bacteria y mostraron actividad bactericida [176]. El empleo de péptidos sintéticos derivados de PorA, en lugar de proteínas recombinantes, sería ventajoso en el diseño de una vacuna por subunidades contra MenB, debido a las ventajas productivas de los péptidos sintéticos, a su alta especificidad y seguridad [3]. El PSC de MenB no se ha podido emplear como candidato vacunal contra este patógeno ya que, además de los determinantes antigénicos de interés, presenta otros con reactividad cruzada con carbohidratos presentes en el tejido neural humano [179]. Esto hace que sea poco inmunogénico y su empleo directo como vacuna genera inquietudes, por la posibilidad teórica de inducción de patologías autoinmunes [180]. La identificación de péptidos que mimeticen un determinante antigénico específico del PSC de MenB es una de las estrategias encaminadas a la búsqueda de una vacuna universal que proteja contra todas los aislamientos de MenB [181,182]. Varios autores informaron el aislamiento de mimotopos del PSC-B a partir de la pesquisa de bibliotecas de péptidos expuestos en fagos con anticuerpos monoclonales específicos contra PSC de MenB [181,183-185]. Los trabajos realizados demuestran la aplicación de péptidos miméticos del PSC de MenB como posibles candidatos vacunales contra este patógeno.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los derivados de aminoácidos, los reactivos de acoplamiento y los disolventes que se emplearon en la SPPS fueron de calidad “para síntesis”. Los reactivos de acoplamiento empleados en la conjugación de los péptidos a proteína fueron de calidad “para análisis”. Todos fueron suministrados por firmas certificadas. El anticuerpo monoclonal 13D9, lo donó gentilmente el Dr. H. Jennings del Consejo Nacional de Investigaciones (Ottawa, Canadá). La proteína recombinante P64K se obtuvo bajo condiciones de buenas prácticas de producción en la Unidad de Producción del CIGB.

#### 3.1. Procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida

En la Figura 1 (epígrafe 2.2) se presenta el esquema general para la síntesis de péptidos en fase sólida mediante la química Boc/Bzl [98] y Fmoc/tBu [109]. El aminoácido correspondiente al extremo C del péptido se acopla al soporte sólido funcionalizado. Los restantes aminoácidos se ensamblan mediante ciclos de acoplamiento y desprotección hasta completar la secuencia peptídica. Posteriormente se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales y se separa el péptido de la resina.

Las secuencias de los péptidos se incluyen en cada acápite donde se describe la síntesis y además en el capítulo de Resultados y discusión. En el anexo 1 se presentan las estructuras de los aminoácidos proteogénicos y los códigos de una y tres letras. En la síntesis se emplearon L-aminoácidos.

##### 3.1.1. Procedimiento general de SPPS con el empleo de la química Boc/Bzl

Como soporte sólido se empleó la resina MBHA (sustitución de 0,38 mmol/g) y como grupos protectores de las cadenas laterales: 4-metoxibencilo (Mob) para la Cys; el Bzl para la Ser, Asp, Thr; el tosilo (Tos) para la Arg; Dnp y benciloximetil (Bom) para la His, diclorobencilo (Cl<sub>2</sub>-Bzl) para la Tyr; 2-clorobenciloxycarbonilo (2-Cl-Z) para la Lys. El grupo Boc que protege el grupo N<sup>α</sup>-amino se eliminó por tratamiento con una disolución de TFA al 37,5 % en DCM durante 30 minutos. El grupo amino protonado se neutralizó por tratamiento con una disolución de 5 % de *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) en diclorometano (DCM) (3 × 2 min). El acoplamiento de cada aminoácido se realizó durante una hora con DIC como agente de activación y DCM como disolvente. Se utilizaron cuatro equivalentes de los reactivos. El completamiento de la reacción de

acoplamiento fue verificado por el ensayo de ninhidrina [186], se empleó el ensayo de p-cloranilo (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona) [187] para verificar los acoplamientos sobre Pro. La desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos (excepto el grupo Acn de la Cys) y la separación del péptido de la resina se realizó por el procedimiento “low-high HF” [110]. Primeramente, se hizo un tratamiento con HF/DMS/p-cresol (25:65:10) (v:v) durante dos horas a 0 °C y posteriormente, se trató con HF/DMS/anisol/tiocresol (79,8:10:10:0,2) (v:v) durante una hora a 0 °C. El péptido se extrajo con una disolución de ácido acético al 30 % en agua, se congeló con nitrógeno líquido y se secó en una liofilizadora (LABCONCO, EUA).

### 3.1.2. Procedimiento general de SPPS con el empleo de la química Fmoc/tBu

Como soporte sólido se empleó la resina MBHA (sustitución de 0,54 mmol/g) o la resina PEG-PS (sustitución de 0,18 mmol/g) y como espaciador el Fmoc-AM-OH. Se emplearon como grupos protectores de las cadenas laterales: Acn y Trt para Cys; 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo (Pbf) para Arg; Trt para Gln y His; Boc para Lys y Trp; tBu para Ser, Thr, Asp, Glu y Tyr. El grupo Fmoc que protege el grupo N<sup>α</sup>-amino se eliminó mediante el tratamiento con una disolución de piperidina al 20% en DMF (2 × 10 min). El acoplamiento de cada aminoácido y del espaciador se realizó mediante el método de activación con DIC/HOBt, se utilizaron cuatro equivalentes de los reactivos y DMF como disolvente. El completamiento de la reacción de acoplamiento se verificó por el método de ninhidrina [186]. Todos los lavados y las reacciones se realizaron con agitación mecánica y los disolventes o reactivos se eliminaron por filtración al vacío. La desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos (excepto el grupo Acn de la Cys) y la separación del péptido de la resina se realizaron por tratamiento con una disolución de TFA/H<sub>2</sub>O/triisopropilsilano (95/2,5/2,5) o TFA/H<sub>2</sub>O/etanoditiol/triisopropilsilano (94/2,5/2,5/1) (para los péptidos que contienen Cys), durante dos horas a 25 °C. El péptido se precipitó en éter enfriado a -20 °C, se redisolvió en una disolución de acetonitrilo al 40 % en agua y se secó en una liofilizadora (LABCONCO, EUA).

### 3.2. Seguimiento de las reacciones en fase sólida

#### 3.2.1. Método de ninhidrina

En un tubo de ensayo se adicionaron unas perlas de resina y se lavó varias veces con metanol. Se le adicionan 20  $\mu$ L de la disolución de fenol a 4 g/mL en etanol, 20  $\mu$ L de la disolución de ninhidrina a 50 mg/mL en etanol y 20  $\mu$ L de la disolución de KCN a 13  $\mu$ g/mL en 2 % de agua en piridina. Se calentó a 110 °C durante 3 min [186]. La ninhidrina reacciona con los grupos amino primarios para dar el color conocido como púrpura de Ruhemann.

#### 3.2.2. Método del p-cloroanilo

En un tubo de ensayo se adicionaron unas perlas de resina y se lavó varias veces con metanol. Se adicionaron 200  $\mu$ L de acetona y 50  $\mu$ L de la disolución de p-cloroanilo (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona) a 20 g/L en DMF. Se agitó durante 5 min a 25 °C [187]. El p-cloroanilo reacciona con aminas secundarias para dar un derivado verde-azul.

#### 3.2.3. Método de verde de malaquita

En un tubo de polipropileno se adicionaron unas perlas de resina, se lavó varias veces con metanol. Se adicionó 1 mL de una disolución de verde de malaquita oxalato al 0,25 % en etanol absoluto, se adicionó una gota de trietilamina pura. Se agitó durante 2 min, se decantó la disolución y se lavó varias veces con metanol [188]. El verde de malaquita reacciona con los grupos ácido para dar un color verde.

### 3.3. Diseño *in silico* de los péptidos Tri-1 y Tri-2

Los péptidos Tri-1 y Tri-2 se diseñaron basados en la estructura cristalográfica de la proteína BPI a partir del fichero de coordenadas (1BP1) del banco de datos de proteínas (PDB, del Inglés: *Protein data bank*). Los péptidos incluyen los dos lazos de horquilla beta comprendidos por los residuos de los segmentos 40-50 y 94-100 de la secuencia de la proteína BPI y se les adicionó un segmento conector de tres residuos diseñado *in silico*. El conector fue diseñado con el empleo del algoritmo DGINS del menú DGLOOP del paquete de programas Whatif [189]: se tamizó la base de datos de estructura de proteínas mediante la detección de fragmentos de siete residuos cuyos dos residuos iniciales y los dos finales tuvieran una estructura similar a los residuos 49-50 y 94-95



respectivamente de 1BP1. Se escogió un fragmento que no tuviera impedimentos estéricos con los segmentos 40-50 y 94-100 de la proteína y se construyó el molde inicial del péptido cuya estructura incluyó los lazos de horquilla beta de 1BP1 y el conector de estructura idéntica a los tres residuos centrales del fragmento. A partir de las distancias interatómicas entre los carbonos alfa de los residuos, se seleccionaron posiciones adyacentes en las hebras beta favorables para la introducción de residuos enlazados covalentemente por las cadenas laterales. Dichos residuos y los respectivos enlaces covalentes entre las cadenas laterales se modelaron con el empleo de la opción de mutación y el menú de construcción del programa MOE (Chemical Computing Group, Canadá). La geometría de los modelos de los péptidos y la proteína BPI fue optimizada al vacío utilizando el campo de fuerza AMBER99 [190] con valor de gradiente de desviación cuadrática media de 0,05 y parámetros por defecto según implementación del protocolo de minimización de energía en el paquete de programas MOE (Chemical Computing Group, Canadá). Los valores de la desviación cuadrática media de las distancias (RMSD, del Inglés: *Root mean square deviation*) fueron calculados con el paquete de programas Whatif [189]. Los diseños se realizaron en el grupo de bioinformática del CIGB.

### 3.4. Síntesis de los péptidos restringidos conformacionalmente (Tri-1 y Tri-2)

Los péptidos Tri-1 y Tri-2 se sintetizaron en fase sólida con el empleo de la química Boc/Bzl [98] y Fmoc/tBu [109]. La síntesis se realizó en jeringuillas de polipropileno.

Secuencias de los péptidos:

Secuencias: Péptido Tri-1 Ciclos( $D^2-K^{10}$ ), ( $C^{11}-C^{15}$ ), ( $D^{14}-K^{21}$ ) Ac-SDKTKHTGKKCGDCKRFLKK-NH<sub>2</sub>  
 Péptido Tri-2 Ciclos( $C^2-C^{10}$ ), ( $D^{11}-K^{15}$ ), ( $C^{14}-C^{21}$ ) Ac-SCKTKHTGKCDGGCKKRFLKC-NH<sub>2</sub>

Ac: Acetilación del grupo amino en el extremo N.

#### 3.4.1. Síntesis mediante la química Boc/Bzl

La síntesis de los péptidos Tri-1 y Tri-2 se realizó según el procedimiento descrito en el acápite 3.1.1. Se emplearon 4 excesos molares de los aminoácidos y activadores. Se emplearon 300 mg de la resina MBHA (escala: 0,114 mmol). La Lys y Asp que formaron los enlaces lactama se protegieron con los grupos Fmoc y Fm, respectivamente. Para la protección selectiva de las dos Cys que forman el segundo enlace disulfuro en el péptido Tri-2 se empleó el grupo Ac. La secuencia del péptido Tri-1 se ensambló hasta completar el par K-D involucrado en el primer ciclo de lactama

y se mantuvo la protección con Boc en el grupo alfa amino. A continuación, se eliminaron los grupos Fmoc y Fm que protegen las cadenas laterales de estos aminoácidos mediante el tratamiento con una disolución de piperidina al 20 % en DMF ( $2 \times 10$  min). El enlace lactama se formó por tratamiento con seis equivalentes de PyBOP (0,35 g) y nueve equivalentes de DIEA (175  $\mu$ L) en DMF. La secuencia se completó y se formó el segundo ciclo de lactama siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. El enlace lactama en el péptido Tri-2 se formó después de ensamblada la secuencia completa, siguiendo este mismo procedimiento.

### 3.4.2. Síntesis mediante la química Fmoc/tBu

La síntesis de los péptidos Tri-1 y Tri-2 se realizó según el procedimiento descrito en el acápite 3.1.2. Se emplearon 4 excesos de los aminoácidos y activadores. Se emplearon 500 mg de la resina PEG-PS (escala: 0,09 mmol). El espaciador Fmoc-AM-OH (0,128 g) se acopló con DIC (37  $\mu$ L) y HOBt (0,032 g) en DMF. La Lys y Asp que formaron los enlaces lactama se protegieron con los grupos Alloc y All (alilo) respectivamente. Para la protección selectiva de las dos Cys que forman el segundo enlace disulfuro en el péptido Tri-2 se empleó el grupo Acm. La secuencia del péptido Tri-1 se ensambló hasta completar el par K-D involucrado en el primer ciclo de lactama y se mantuvo la protección con Fmoc en el grupo alfa amino. A continuación, se eliminaron los grupos Alloc y All que protegen las cadenas laterales de estos aminoácidos mediante el tratamiento con 0,1 equivalentes de tetrakis(trifenilfosfina)-paladio(0) ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ) (10 mg) y 10 equivalentes de trihidrofenilsilano ( $\text{PhSiH}_3$ ) (110  $\mu$ L) en DCM anhidro y atmósfera de argón ( $3 \times 5$  min). El enlace lactama se formó por tratamiento con cuatro equivalentes de PyBOP (0,19 g) y seis equivalentes de DIEA (92  $\mu$ L) en DMF. La secuencia se completó y se empleó el mismo procedimiento para formar el segundo ciclo de lactama. El enlace lactama en el péptido Tri-2 se formó después de ensamblada la secuencia completa.

### 3.4.3. Formación del enlace disulfuro en el péptido Tri-1

El enlace disulfuro se obtuvo por oxidación de las dos Cys libres con DMSO al 20 % en agua [9]. El péptido crudo se disolvió en una disolución de ácido acético al 5 % en agua, para obtener una concentración final de 0,2 mmol/L. El pH se ajustó a 6,0 con una disolución de hidróxido de amonio al 25 % en agua. El DMSO se adicionó hasta lograr una concentración final de 20 %. La reacción se

mantuvo en agitación a 25 °C, hasta la desaparición de la especie reducida. El completamiento de la oxidación de los grupos tiol libres se verificó por RP-HPLC y MS. La disolución del péptido crudo cíclico se aplicó en una columna de RP de poro ancho (63  $\mu$ m). El péptido se eluyó con una disolución de acetonitrilo al 40 % en agua que contenía 1 % de TFA y se secó en una liofilizadora (LABCONCO, EUA). El péptido se purificó por RP-HPLC preparativo y se caracterizó por RP-HPLC analítico y MS.

#### **3.4.4. Formación selectiva de dos enlaces disulfuro en el péptido Tri-2**

El primer enlace disulfuro se obtuvo por oxidación de las dos Cys libres con DMSO al 20 % en agua [9] según se describe en el acápite 3.4.3. El segundo enlace disulfuro se formó mediante la desprotección/oxidación con yodo de las dos Cys protegidas con Acm [9]. El péptido cíclico protegido con Acm, purificado y liofilizado, se disolvió en una disolución de ácido acético al 80 % en agua, a una concentración de 1 mmol/L. Se adicionaron 10 equivalentes de yodo disuelto en metanol. La reacción se mantuvo en agitación durante una hora a 25 °C. La oxidación se detuvo mediante la adición de una disolución de 10 equivalentes de ácido ascórbico en agua. La disolución del péptido se aplicó en una columna de RP de poro ancho (63  $\mu$ m), se eluyó con una disolución de acetonitrilo al 40 % en agua que contenía 1 % de TFA y se secó en una liofilizadora (LABCONCO, EUA). El péptido se purificó por RP-HPLC preparativo y se caracterizó por RP-HPLC y MS.

### **3.5. Obtención de los soportes PEG-PS para la síntesis de péptidos peguilados en el extremo C**

#### **3.5.1. Obtención del soporte PEG<sub>2000</sub>-PS mediante (metodología 1)**

**Obtención del PEG<sub>2000</sub>-diácido:** Se emplearon 8 equivalentes de PEG<sub>2000</sub>-diamino por equivalente de amino en la resina MBHA. Para convertir el PEG-diamino en PEG-diácido, se emplearon 0,75 equivalentes de anhídrido succínico por equivalente de amino en el PEG. El O,O'-Bis-(2-aminopropil)-polipropilenglicol-polietilenglicol-polipropilenglicol-1900 (PEG<sub>2000</sub>-diamino) (22,4 g) se disolvió en 45 mL de DMF. Se adicionó el anhídrido succínico (1,68 g) y DIEA (2,93 mL). La reacción se mantuvo en agitación durante 18 horas a 25 °C.

**Obtención de la resina  $NH_2$ -Gly-AM-MBHA:** Se partió de 2 g de resina MBHA con una sustitución de 0,7 mmol/g (escala: 1,4 mmol). Se hicieron lavados con DCM ( $3 \times 2$  min), TFA al 40 % en DCM ( $1 \times 10$  min), DCM ( $2 \times 2$  min), metanol ( $2 \times 2$  min), DCM ( $2 \times 2$  min), DIEA al 5 % en DCM ( $3 \times 2$  min), DCM ( $2 \times 2$  min) y DMF ( $2 \times 2$  min). El espaciador Fmoc-AM-OH (2,26 g) se acopló en DMF, con el empleo de DIC (653  $\mu$ L) y HOBt (0,57 g) durante 18 horas. El grupo Fmoc se eliminó por tratamiento con una disolución de piperidina al 20 % en DMF ( $2 \times 10$  min) y se lavó con DMF. El Fmoc-Gly-OH (1,6 g) se acopló con el empleo de DIC (870  $\mu$ L) y HOBt (0,76 g) y se eliminó el grupo Fmoc.

**Obtención del soporte PEG<sub>2000</sub>-PS:** El PEG<sub>2000</sub>-diácido se adicionó a la resina  $NH_2$ -Gly-AM-MBHA. Se adicionó PyBOP (8,74 g) y DIEA (5,85 mL). La reacción se mantuvo en agitación durante 4 horas y se lavó con DMF ( $2 \times 2$  min), metanol ( $2 \times 2$  min), DCM ( $2 \times 2$  min) y DMF ( $2 \times 2$  min). La completa incorporación del PEG-diácido fue corroborada por los ensayos de ninhidrina [186] y verde de malaquita [188]. Posteriormente, se acopló la etilendiamina (936  $\mu$ L) con PyBOP (7,28 g) y DIEA (4,9 mL) durante 6 horas. El completamiento de la reacción fue corroborado por los ensayos de ninhidrina [186] y verde de malaquita [188].

### 3.5.2. Obtención de los soportes PEG<sub>1500</sub>-PS y PEG<sub>2000</sub>-PS (metodología 2)

En ambos casos se partió de 1 g de resina MBHA (0,54 mmol/g) la cual se lavó con DCM ( $3 \times 2$  min), TFA al 40% en DCM ( $1 \times 10$  min), DCM ( $2 \times 2$  min), metanol ( $2 \times 2$  min), DCM ( $2 \times 2$  min), DIEA al 5 % en DCM ( $3 \times 2$  min), DCM ( $2 \times 2$  min) y DMF ( $2 \times 2$  min). Se acopló el espaciador Fmoc-AM-OH (0,58 g) en DMF, con el empleo de DIC (168  $\mu$ L) y HOBt (0,14 g) durante 18 horas. El grupo Fmoc se eliminó por tratamiento con una disolución de piperidina al 20 % en DMF ( $2 \times 10$  min) y se lavó con DMF. Se acopló el Fmoc-betaAla-OH (0,67 g, 2,16 mmol) con DIC (336  $\mu$ L) y HOBt (0,29 g). El grupo Fmoc se eliminó y se adicionó anhídrido succínico (0,22 g) y DIEA (371  $\mu$ L). Se acoplaron el O,O'-Bis-(3-aminopropil)-polietilenglicol-1500 (PEG<sub>1500</sub>-diamino) (3,24 g) y el O,O'-Bis-(2-aminopropil)-polipropilenglicol-polietilenglicol-polipropilenglicol-1900 (PEG<sub>2000</sub>-diamino) (4,32 g) a cada gramo de resina, con el empleo de PyBOP (1,12 g) y DIEA (753  $\mu$ L mmol) durante 24 horas. Se lavaron con DMF, metanol y éter dietílico.

### 3.5.3. Determinación del grado de sustitución de las resinas PEG<sub>1500</sub>-PS y PEG<sub>2000</sub>-PS

A 100 mg de las resinas PEG<sub>1500</sub>-PS y PEG<sub>2000</sub>-PS se les acopló Fmoc-Gly-OH, se lavaron con DMF, metanol y éter dietílico y se secaron al vacío durante 24 horas. En tres viales se pesaron 10 mg de dicha resina, se adicionaron 1,25 mL de una disolución de piperidina al 20 % en DMF y se agitaron durante 30 min. Las disoluciones se filtraron hacia volumétricos de 50 mL, se enrasaron con metanol y se midió la absorbancia a 301 nm [41].

### 3.5.4. Síntesis de los péptidos F1-1PEG<sub>1500</sub> y F1-1PEG<sub>2000</sub> peguilados en el extremo C

Los péptidos F1-1PEG<sub>1500</sub> y F1-1PEG<sub>2000</sub> fueron sintetizados en fase sólida a partir de 150 mg de las resinas PEG<sub>1500</sub>-PS y PEG<sub>2000</sub>-PS con el empleo de la química Fmoc/tBu [109] según se describe en el acápite 3.1.2. La disolución final de desanclaje se filtró por una frita de polipropileno y se secó mediante evaporación rotatoria hasta obtener un aceite, el cual se disolvió en 15 mL de una disolución de acetonitrilo al 50 % en agua y se secó en una liofilizadora (LABCONCO, EUA). Los péptidos fueron purificados por RP-HPLC preparativo y caracterizados por RP-HPLC analítico, MS y resonancia magnética nuclear (RMN)-<sup>1</sup>H.

Secuencia del péptido LBPk95A: RVQGRWKVRASFFK-NH<sub>2</sub>

### 3.6. Síntesis de péptidos derivados de la proteína IL-15

Los péptidos se sintetizaron en fase sólida a partir de 200 mg de la resina MBHA (0,54 mmol/g, escala: 0,108 mmol) con el empleo de la química Fmoc/tBu [109] según se describe en el acápite 3.1.2.

Secuencias de los péptidos:

Péptido	Secuencia
G06P58	KVTAMKCFLN-NH <sub>2</sub>
A06P19	KVTAMKAFLL-NH <sub>2</sub>
G06P55	KVTAMKSFLN-NH <sub>2</sub>
G06P56	KVTAMTCFLN-NH <sub>2</sub>

#### 3.6.1. Dimerización de los péptidos P8 y P56

El péptido se disolvió en agua para obtener una concentración final de 4 mg/mL. Se ajustó el pH a 6,0 con una disolución de hidróxido de amonio al 25 % en agua. Se adicionó el DMSO hasta lograr una concentración final de 20 % [9]. La reacción se mantuvo en agitación a 25 °C durante 24 horas.

La formación del dímero se verificó por RP-HPLC y MS. El péptido se purificó por RP-HPLC preparativo y se caracterizó por RP-HPLC analítico.

### 3.7. Síntesis de péptidos derivados de la proteína PorA de *N. meningitidis*

Los péptidos C9-1 y C9-2 se sintetizaron en fase sólida a partir de 300 mg de la resina MBHA (0,38 mmol/g, 0,114 mmol) con el empleo de la química Boc/Bzl [98] según se describe en el acápite 3.1.1. La síntesis se realizó en bolsas de polipropileno. Se empleó el grupo Acn para la protección de las Cys situadas en los extremos de la secuencia C9-1, las cuales se emplearon para formar los enlaces disulfuro intermoleculares.

Secuencias de los péptidos:

Péptido	Modificación	Secuencia
C9-1	Ciclo(C <sup>5</sup> -C <sup>43</sup> )	C(Acn)GGGCPIQNSKSAYTPAHYTRQNNADVFPVAVVGKPGSCGGGC(Acn)-NH <sub>2</sub>
C9-2	Ciclo(C <sup>1</sup> -C <sup>35</sup> )	Ac-CPIQNSKSAYTPAHYTRQNNADVFPVAVVGKPGSC-NH <sub>2</sub>

Ac: Acetilado en el extremo N.

#### 3.7.1. Formación del enlace disulfuro intramolecular en los péptidos C9-1 y C9-2

El péptido fue primeramente reducido por tratamiento con ditioneitol a 100 mmol/L en una disolución desnaturante de hidrocloreto de guanidina 6 mol/L, 100 mM de Tris a pH 8,0 durante dos horas a 37 °C. La disolución del péptido se aplicó en una columna de fase reversa de poro ancho (63 µm), se eluyó con una disolución de acetonitrilo al 40 % en agua que contenía 1 % de TFA y se secó en una liofilizadora (LABCONCO, EUA). El enlace disulfuro se obtuvo por oxidación de las dos Cys libres con DMSO al 20 % en agua [9] según se describe en el acápite 3.4.3. El avance de la reacción fue verificado por el ensayo de Ellman [145].

#### 3.7.2. Polimerización del péptido C9-1 por formación de enlaces disulfuro intermoleculares

El péptido C9-1 fue polimerizado por un proceso simultáneo de desprotección/oxidación con yodo de las cisteínas protegidas con Acn [9]. El péptido cíclico protegido con Acn, purificado y liofilizado, se disolvió en una disolución de ácido acético al 80 % en agua, a una concentración de 32 mmol/L. Se adicionaron 10 equivalentes de yodo disuelto en metanol y tres equivalentes de HCl. La reacción se mantuvo en agitación durante 15 minutos a 25 °C. Se detuvo la oxidación mediante la adición de una disolución de 10 equivalentes de ácido ascórbico en agua. La mezcla se purificó

por filtración en gel en una columna PD10 (GE Healthcare, EUA). El péptido cíclico polimerizado se caracterizó por electroforesis de tris-tricina en gel de poliacrilamida [191]. Se empleó como gel separador 10 % T, 3 % C y como gel concentrador 4 % T, 3 % C. Los patrones de pesos moleculares se incubaron en una disolución de muestra reductora. Las muestras del péptido cíclico y péptido cíclico polimerizado se incubaron en condiciones no reductoras durante 30 minutos a 40 °C.

### 3.7.3. Síntesis del péptido P21 y los péptidos multiantigénicos MAP21, MAP21-T1 y MAP21-T2

El péptido P21 se sintetizó en fase sólida a partir de 200 mg de la resina MBHA (0,54 mmol/g, escala: 0,108 mmol) con el empleo de la química Fmoc/tBu [109] según se describe en el acápite 3.1.2. Los MAP21, MAP21-T1 y MAP21-T2 se sintetizaron en fase sólida a partir de 400 mg de la resina MBHA (escala: 0,54 mmol/g) con el empleo de la química Fmoc/tBu [109] según se describe en el acápite 3.1.2. Se disminuyó la sustitución de la resina a 0,2 mmol/g mediante el acoplamiento de Fmoc-Cys(Trt)OH (47 mg) con HOBt (13 mg) y DIC (13 µL) durante 18 horas. Los grupos amino remanentes se bloquearon durante 30 min, por tratamiento con una disolución de anhídrido acético al 20 % en DMF que contiene DIEA al 2 %. La lisina responsable de la ramificación se introdujo como Fmoc-Lys(Fmoc)OH mediante la activación con DIC y HOBt. Después de acoplados la Cys y la betaAla, se introdujo el primer nivel de ramificación en las tres estructuras. En el MAP21, se introdujo el segundo nivel de ramificación a continuación del primero y se ensamblaron las cuatro copias del péptido P21. En los MAP21-T1 y MAP21-T2, se ensamblaron dos copias de los epitopos Th correspondientes sobre el primer nivel de ramificación. A continuación, se introdujo el segundo nivel de ramificación y se ensamblaron las cuatro copias del péptido P21. El proceso de desanclaje se realizó según el procedimiento descrito en el acápite 3.1.2 para péptidos con Cys en la secuencia. El péptido y los MAPs fueron purificados por RP-HPLC preparativo y caracterizados por RP-HPLC analítico y MS.

Secuencias de los péptidos:

Péptido	Secuencia
MAP21	(HYTRQNNADVFPVAVVG) <sub>4</sub> -K-betaAla-C-NH <sub>2</sub>
MAP21-T1	(HYTRQNNADVFPVAVVG) <sub>4</sub> -K <sub>2</sub> -(IPGVAYTSPEVAWVG) <sub>2</sub> -K-betaAla-C-NH <sub>2</sub>
MAP21-T2	(HYTRQNNADVFPVAVVG) <sub>4</sub> -K <sub>2</sub> -(QYIKANSKFIGITEL) <sub>2</sub> -K(betaAla-C-NH <sub>2</sub>
P21	HYTRQNNADVFPVAVVGC-NH <sub>2</sub>

### 3.7.4. Dimerización del MAP21, MAP21-T1 y MAP21-T2

El MAP monomérico se disolvió en agua a una concentración de 4 mg/mL, se ajustó el pH entre 8,0 y 9,0 con una disolución de hidróxido de amonio al 25 % en agua [9]. La reacción se mantuvo en agitación a 25°C durante 48 horas. El avance de la reacción de oxidación de los grupos tiol libres se siguió por el ensayo de Ellman [145]. La dimerización se confirmó por RP-HPLC y MS. El dímero fue repurificado por RP-HPLC preparativo.

### 3.8. Síntesis de estructuras que contienen la secuencia 4L-5 que mimetiza el PSC de MenB

Las síntesis se realizaron con el empleo de la química Boc/Bzl [98] según se describe en el acápite 3.1.1. El péptido L/4L-5 se sintetizó en fase sólida a partir de 200 mg de la resina MBHA (0,38 mmol/g, escala: 0,076 mmol). Los MAP<sub>4L-5</sub> y MAP<sub>4L-5</sub>-TT se sintetizaron en fase sólida a partir de 250 mg de la resina MBHA (0,38 mmol/g, escala: 0,095 mmol) con el empleo de la química Boc/Bzl [98] según se describe en el acápite 3.1.1. Se disminuyó la sustitución de la resina a 0,2 mmol/g (escala: 0,05 mmol) mediante el acoplamiento de Boc-Cys(Mob)OH (17 mg) con HOBt (6,8 mg), TBTU (16 mg), DIEA (18 µL) durante 6 horas. Los grupos amino remanentes se bloquearon por tratamiento con una disolución de anhídrido acético al 20 % en DMF y DIEA al 2 % durante 30 min. La Lys responsable de la ramificación se introdujo como Boc-Lys(Boc)OH mediante la activación con HOBt, TBTU y DIEA. En la síntesis del MAP<sub>4L-5</sub>, después de acoplados la Cys y la betaAla, se introdujeron los dos niveles de ramificación y se ensamblaron las 4 copias de la secuencia 4L-5. Para la síntesis del MAP<sub>4L-5</sub>-TT, después de acoplados la Cys y la betaAla, se ensambló una copia del epitopo T auxiliador. Posteriormente, se introdujo la Lys para la ramificación y se ensamblaron las dos copias de la secuencia 4L-5. El proceso de desanclaje se realizó según el protocolo descrito en el acápite 3.1.1 para péptidos con Cys en la secuencia. El péptido y los MAPs fueron purificados por RP-HPLC preparativo y caracterizados por RP-HPLC analítico y MS.

Secuencias de los péptidos:

Péptido	Secuencia
MAP <sub>4L-5</sub>	(RGDKSRPPVWYVEGE) <sub>4</sub> -K <sub>2</sub> -K-betaAla-C-NH <sub>2</sub>
MAP <sub>4L-5</sub> -TT	(RGDKSRPPVWYVEGE) <sub>2</sub> -K-GQYIKANSKFIGITEL-betaAla-C-NH <sub>2</sub>
L/4L-5	RGDKSRPPVWYVEGE-NH <sub>2</sub>



### 3.8.1. Dimerización de los MAP<sub>4L-5</sub> y MAP<sub>4L-5</sub>-TT

Los MAPs se dimerizaron según el procedimiento descrito en el acápite 3.7.4.

### 3.8.2. Conjugación del péptido L/4L-5 y los MAP<sub>4L-5</sub> y D/MAP<sub>4L-5</sub>

El MAP<sub>4L-5</sub> se conjugó a la proteína P64K con el empleo de tres métodos de conjugación según se describe en los acápites 3.8.2.1 al 3.8.2.3. El péptido L/4L-5 y el D/MAP<sub>4L-5</sub> se conjugaron a la proteína P64K con el empleo del método descrito en el acápite 3.8.2.1.

#### 3.8.2.1. Método de la carbodiimida

La conjugación con el empleo del método-CDI se realizó según describe *Carter, J. M* [192]. La proteína P64K (5 mg) [64,162] se disolvió en 1 mL de la disolución tampón fosfato salina (PBS, del Inglés: *Phosphate buffered saline*) pH 7,2. El pH se ajustó a 5,0 con una disolución de HCl a 0,1 mol/L en agua. Se añadieron 10 mg de EDC y la reacción se agitó 30 min a 4 °C. La EDC libre se separó de la P64K activada mediante filtración en gel con el empleo de una columna PD10 (GE Healthcare, EUA) equilibrada con PBS pH 7,2. Se añadieron 5 mg del péptido disuelto en PBS pH 7,2 y la reacción se agitó durante tres horas a 25 °C. El péptido libre se eliminó por diálisis contra PBS pH 7,2 a 4 °C durante 72 horas, con el empleo de membranas de tamaño de poro de 12-14 kDa.

#### 3.8.2.2. Método del anhídrido succínico-carbodiimida

La conjugación con el empleo del método del anhídrido succínico-carbodiimida se realizó según describe *Hermanson, G. T* [67]. La proteína P64K (5 mg) [64,162] se disolvió en 1 mL de disolución tampón fosfato a 0,1 mol/L, pH 8,0. Se añadieron 0,5 mg de anhídrido succínico y se agitó durante 30 min a 25 °C. El anhídrido succínico libre se eliminó por filtración en gel, con el empleo de una columna PD10 (GE Healthcare, EUA) equilibrada con una disolución de PBS a la que se le ajustó el pH a 5,0. Se añadieron 10 mg de EDC a la proteína modificada y la reacción continuó como se describe en el acápite 3.8.2.1.

#### 3.8.2.3. Método del éster m-maleimidopropiónico de la N-hidroxisuccinimida

La conjugación con el empleo del éster m-maleimidopropiónico de la N-hidroxisuccinimida se realizó según describe *Carter, J. M* [192]. Se disolvieron 5 mg de la proteína P64K [64,162] en 0,5 mL de una disolución tampón fosfato 0,1 mol/L, pH 6,0. Se añadió 0,1 mL de una disolución de

MPS a 10 mg/mL en DMF. La reacción se agitó durante 30 min a 25 °C. El MPS libre se eliminó por filtración en gel con el empleo de una columna PD10 (GE Healthcare, EUA) equilibrada con una disolución tampón fosfato a 0,1 mol/L, pH 6,0. A la proteína activada se le añadieron 5 mg del péptido disuelto en la disolución tampón fosfato a 0,1 mol/L, pH 6,0. La reacción se agitó durante tres horas a 25 °C. El péptido libre se eliminó por diálisis contra PBS pH 7,2 a 4 °C durante 72 horas, con el empleo de membranas de tamaño de poro de 12-14 kDa.

### **3.9. Purificación de péptidos sintéticos por RP-HPLC preparativa**

La purificación por RP-HPLC preparativa se realizó en un equipo LabChrom (Merck Hitachi, Alemania), con el empleo de una columna de RP-C18 (Vydac, 25 × 250 mm, 25 µm) y un gradiente lineal de 15 a 45 % de la disolución B durante 50 min, a un flujo de 5 mL/min. Como fase móvil se emplearon la disolución A: 0,1 % de TFA en agua y la disolución B: 0,05 % de TFA en acetonitrilo. Los cromatogramas se adquirieron a una longitud de onda de 226 nm.

### **3.10. Caracterización de péptidos sintéticos**

#### **3.10.1. Determinación de la pureza de péptidos por RP-HPLC analítica**

La determinación del grado de pureza de los péptidos se realizó por RP-HPLC analítica en los equipos de HPLC AKTA 100 (GE Healthcare, EUA) o Pharmacia-LKB (Suecia), con el empleo de los programas *Unicorn* versión 4.11 (GE Healthcare, EUA) y *Biocrom* (CIGB, Cuba) para el procesamiento de los cromatogramas, respectivamente. Se empleó una columna de RP-C18 (Vydac, 4,6 x 150 mm, 5 µm) y un gradiente lineal de 5 a 60 % de B durante 35 min, a un flujo de 0,8 mL/min. Como fase móvil se emplearon la disolución A: 0,1 % de TFA en agua y la disolución B: 0,05 % de TFA en acetonitrilo. Los cromatogramas se adquirieron a una longitud de onda de 226 nm.

#### **3.10.2. Determinación de la masa molecular de péptidos por espectrometría de masas**

Los espectros FAB se obtuvieron con un espectrómetro de doble sector JMS HX-110HF (JEOL, Japón) equipado con un cañón FAB, una celda de colisión y un sistema de análisis de datos JEOL DMA-5000. El procesamiento de la muestra se realizó según describen *González, L. J y cols.* [193]. El error aceptado para la determinación de la MM experimental fue de 0,5 Da. Los espectros

MALDI-MS se obtuvieron con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Voyager Elite XL equipado con un reflectron y un sistema de extracción retardado (PerSeptive Biosystems, Japón). Se empleó el ácido dihidrobenzoico como matriz para la preparación de la muestra. La muestra se ionizó con un láser de nitrógeno (337 nm) y los iones positivos fueron acelerados a -20 kV. Se empleó para la medición una extracción retardada de 100 ns. Se utilizó una mezcla de angiotensina-I e insulina para la calibración del espectrómetro. Se empleó el programa Data Explorer (Applied Biosystems, EUA) para el procesamiento de los espectros de masas. El error aceptado para la determinación de la MM experimental fue de 0,1 % de la MM teórica. Los espectros ESI-MS se obtuvieron en espectrómetros de configuración híbrida ortogonal Q-ToF 1 o Q-ToF 2 (Micromass, Inglaterra) con fuente de ionización nanospray. Los voltajes del capilar de borosilicato y el cono de entrada fueron fijados a 900 y 35 Volts respectivamente. Se utilizó una disolución de yoduro de sodio y cesio como referencia para la calibración del espectrómetro. Se empleó el programa *Masslynx* versión 3.5 (Micromass, Inglaterra) para el procesamiento de los espectros de masas. El error aceptado para la determinación de la MM experimental fue de 0,01 % de la MM teórica. El valor de MM experimental se muestra en la esquina superior derecha de cada espectro.

### 3.10.3. Caracterización por RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en fase gel

Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H se obtuvieron en un equipo Bruker a 300 MHz y como disolvente se empleó D<sub>2</sub>O. Los espectros RMN-<sup>13</sup>C en fase gel se obtuvieron en un equipo Bruker a 50 MHz, la resina se hinchó previamente en MeOD. Se empleó el programa *MestRe-C* versión 2.3a (Magnetic Resonance Companion, España) para el procesamiento de los espectros.

### 3.10.4. Análisis de aminoácidos

El análisis de aminoácidos se realizó según describe Allen, G [194]. Las muestras se hidrolizaron en ampullas selladas al vacío, durante una hora a 155 °C, con una disolución de HCl a 6 mol/L que contenía 0,1 % de fenol y 0,1 % de 2-mercaptoetanol. La mezcla de hidrólisis se evaporó a vacío y los aminoácidos libres se redisolviaron en la disolución tampón de aplicación al analizador. Para la separación cromatográfica del hidrolizado se empleó un analizador automático de aminoácidos Beckman 6300 (Beckman Instruments Inc., EUA). Para la detección se empleó la derivatización post-columna con ninhidrina. En el procesamiento de los datos se empleó el programa GWbasic

(Universidad de Barcelona, España). Para el cálculo de la relación péptido/proteína en los conjugados se seleccionó un aminoácido presente en la proteína y ausente en la composición del péptido, lo que permitió cuantificar la cantidad de proteína en el conjugado. Para el cálculo de la cantidad de péptido anclado a la proteína, se seleccionaron aquellos aminoácidos presentes en el péptido que no se degradan durante la hidrólisis ácida y cuyo error entre el valor teórico, determinado a partir de la secuencia del péptido, y el valor experimental fue menor del 15 %.

### **3.10.5. Ensayo de Ellman**

El ensayo de Ellman se realizó según describe *Ellman, G. L* [145]. Se disolvieron 50 µg de péptido en 50 µL de tampón fosfato pH 8,0. A esta disolución se le adicionaron 50 µl de una disolución de Ellman (2 mg de 5,5'-ditio-bis(2-ácido nitrobenzoico) (3,3'-6) en 500 µl de tampón fosfato pH 8,0).

## **3.11. Ensayos de actividad biológica**

### **3.11.1. Ensayo para la cuantificación de TNF $\alpha$ humano en sangre total humana**

Los ensayos de actividad biológica se realizaron en el Departamento de Farmacéuticos del CIGB. La inducción de citocinas por LPS en sangre total humana se realizó según describen *Warren, H. S y cols.* [195]. La cuantificación del factor de necrosis tumoral (TNF) $\alpha$  humano se realizó en un ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida (ELISA, del Inglés: *Enzyme linked immuno sorbent assay*) según describen *Dentener, M. A y cols.* [196]. Las placas de 96 pozos (Costar, EUA) se recubrieron con un anticuerpo monoclonal específico para TNF $\alpha$  (2,5 µg/mL) diluido en PBS y se incubaron durante 16 horas a 4 °C. Se decantó, se adicionaron 125 µL/pozo de albúmina de suero bovino al 1% en PBS y se incubó una hora a 25 °C. Se decantó, se adicionaron las muestras de péptido F1-1, F1-1PEG<sub>1500</sub> y F1-1PEG<sub>2000</sub> y la curva patrón de TNF $\alpha$  humano (desde 5 pg/mL hasta 10 ng/mL) y se incubó durante una hora a 25 °C. Se decantó, se adicionó un anticuerpo policlonal de conejo anti-TNF $\alpha$  diluido 1:1000 y se incubó durante una hora a 25 °C. Se decantó, se adicionaron 100 µL de anti-conejo peroxidasa diluido 1: 2000 y se incubó durante una hora a 25 °C. Se decantó y se lavó con tween 20 al 0,1 % en agua. Se adicionaron 100 µL por pozo de la disolución de sustrato (fosfato disódico 0,05 mol/L pH 5,0, ácido cítrico 0,05 mol/L, perborato sódico 0,03 % y 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina), se incubó 15 min a 25 °C y la reacción se detuvo con una disolución

de ácido sulfúrico a 1 mol/L (100 µL por pozo). La absorbancia se determinó en un lector de placas a 450 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición, que corresponde a: % de inhibición:  $(1 - ((\text{TNF}\alpha_{\text{muestra}} - \text{TNF}\alpha_{\text{mínimo}}) / (\text{TNF}\alpha_{\text{máximo}} - \text{TNF}\alpha_{\text{mínimo}}))) \times 100$ , donde:  $\text{TNF}\alpha_{\text{muestra}}$  es la concentración de  $\text{TNF}\alpha$  en el sobrenadante del cultivo en presencia de LPS y los péptidos,  $\text{TNF}\alpha_{\text{mínimo}}$  es la concentración de  $\text{TNF}\alpha$  en el sobrenadante del cultivo en ausencia de LPS y  $\text{TNF}\alpha_{\text{máximo}}$  es la concentración de  $\text{TNF}\alpha$  en el sobrenadante del cultivo en presencia de LPS.

### 3.11.2. Determinación de la actividad biológica de los péptidos derivados de la proteína IL-15

Los ensayos de actividad biológica se realizaron en el Departamento de Farmacéuticos del CIGB. La actividad biológica de los péptidos se evaluó por la capacidad de inhibir la proliferación de la línea celular CTLL-2 dependiente de IL-15. Para evaluar la capacidad neutralizante, se hicieron diluciones seriadas de los péptidos en 25 µL de medio RPMI (Gibco, EUA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco, EUA), en placas de 96 pozos (Costar, EUA). Las células CTLL-2, lavadas tres veces con medio RPMI, se adicionaron a una relación de  $5 \times 10^3$  células por pozo en 50 µL y se incubó a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 30 min. Seguidamente, se adicionaron 25 µL/pozo de una dilución de la proteína IL-15 para una concentración final de 300 pg/mL y se incubó a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 72 horas. Para la medición de la proliferación celular, se empleó el ensayo de tinción mitocondrial con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) [197].

### 3.11.3. Inmunizaciones con péptidos sintéticos

Los esquemas de inmunización se realizaron en el Departamento de Vacunas del CIGB.

#### **Inmunización con péptidos cíclicos derivados del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis*.**

Se realizó la inmunización en cuatro líneas de ratones (BALB/c (H-2d), CBA/J (H-2k), C57BL/6 (H-2b) y DBA/2 (H-2d)). Se incluyeron dos grupos, cada uno de cinco animales por cada línea de ratón. Se administraron en cada inoculación 20 µg del péptido cíclico C9-2 y el péptido cíclico C9-1 polimerizado, adsorbidos en hidróxido de aluminio, en tres dosis espaciadas cada dos semanas. Se hizo una extracción antes de cada inoculación y 10 días después de la última. Los sueros antipéptido se evaluaron mediante ELISA contra el péptido cíclico C9-2.

**Inmunización con un péptido lineal y MAPs derivados del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis*.** Se realizó la inmunización en ratones BALB/c (H-2d). Se emplearon cuatro grupos de ocho animales cada uno, a los que se administraron en cada inoculación 50 µg de cada uno de los siguientes antígenos: P21, MAP21, MAP21-T1, MAP21-T2, emulsificados en adyuvante de Freund, en tres dosis espaciadas cada dos semanas. Se hizo una extracción antes de cada inoculación y 15 días después de la última. Los sueros antipéptido se evaluaron mediante ELISA contra el péptido C9-2 conjugado a la proteína BSA y contra las VME de *N. meningitidis* cepa CU385.

**Inmunización con varias presentaciones de un péptido que mimetiza las propiedades antigénicas e inmunológicas del PSC de MenB.** Se realizó la inmunización en ratones BALB/c (H-2d). Se emplearon 10 grupos de seis animales cada uno, a los que se administraron en cada inoculación 50 µg de cada uno de los siguientes antígenos: P64K (control negativo), L/4L-5/L, L/4L-5-P64K-CDI, MAP<sub>4L-5</sub>, MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-CDI, MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-Succ-CDI, MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-MPS, D/MAP<sub>4L-5</sub>, D/MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-CDI, MAP<sub>4L-5</sub>-TT, emulsificados en adyuvante de Freund, en cuatro dosis espaciadas cada dos semanas. Se hizo una extracción antes de cada inoculación y siete días después de la última. Se evaluó el reconocimiento de los antígenos por el anticuerpo monoclonal 13D9 mediante ELISA. Los sueros antipéptido se evaluaron mediante ELISA contra el MAP<sub>4L-5</sub> dimerizado (D/ MAP<sub>4L-5</sub>).

#### 3.11.4. Análisis estadísticos

Para la comparación entre diferentes grupos de las diferencias en el porcentaje de inhibición de la producción de TNF $\alpha$  se empleó la prueba de  $\chi^2$  de comparación de porcentajes seguida de la prueba de Fisher.

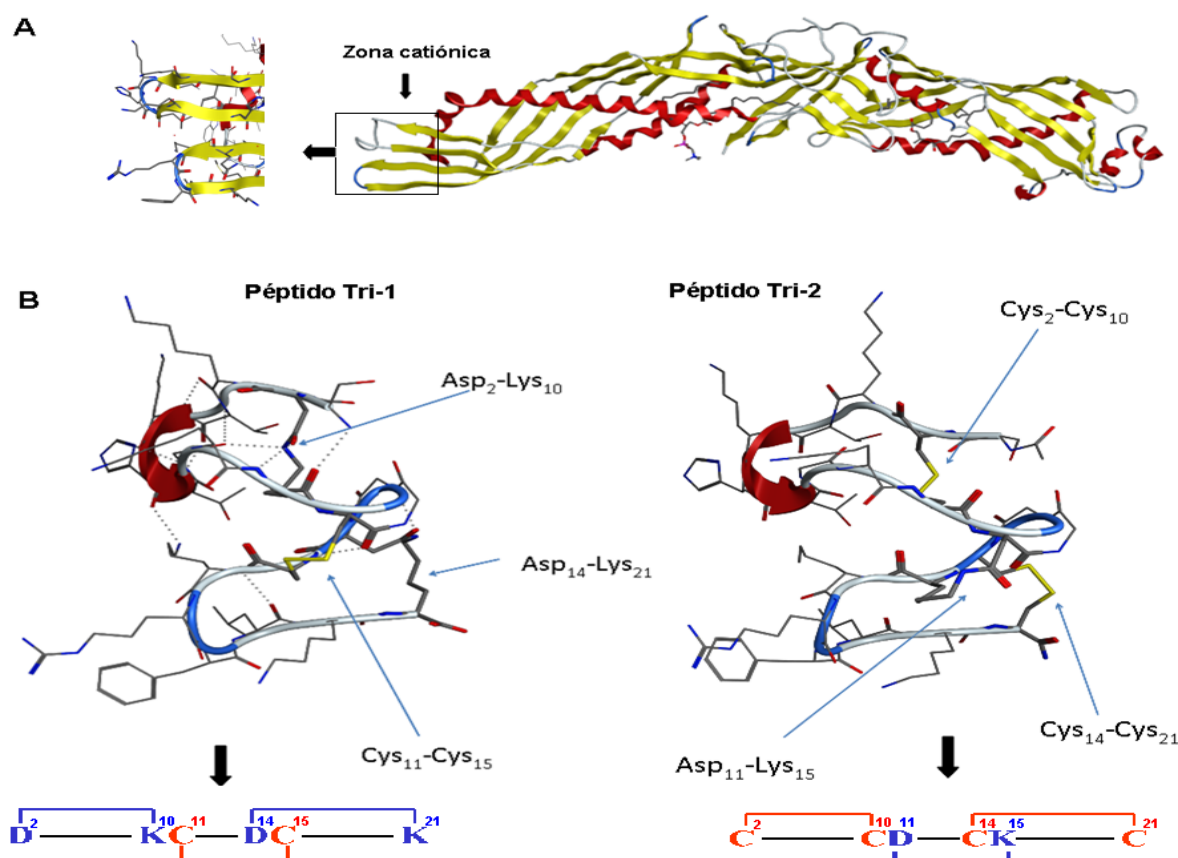
Para la comparación entre diferentes grupos de las diferencias en los niveles de anticuerpos IgG, los datos transformados (Log<sub>10</sub>) que pasaron la prueba de normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección del valor de p de Dallal-Wilkinson Lillie) y mostraron homogeneidad de varianzas (Prueba de Bartlett) se analizaron con la prueba paramétrica de análisis de varianzas (ANOVA). Cuando se detectaron diferencias generales entre los grupos analizados, se pasó a comparar las medias de los niveles de IgG entre grupos con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas si  $p < 0,05$  y muy significativas para  $p < 0,01$ . El programa GraphPad Prism versión 5 (San Diego, CA, EUA) (<http://www.graphpad.com>) se empleó para el procesamiento de los datos, los análisis estadísticos y la obtención de los gráficos.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Obtención de péptidos que contengan tres puentes intramoleculares para mimetizar una región topográfica de la familia de proteínas LBP-BPI

En el grupo de bioinformática del CIGB, se diseñaron dos péptidos (Tri-1 y Tri-2) que contienen tres puentes intramoleculares para mimetizar la región topográfica definida por los dos lazos de horquilla beta comprendidos por los residuos de los segmentos 40-50 y 94-100 de la secuencia de la proteína BPI (Anexo 2A). Los diseños se realizaron a partir de la estructura cristalográfica 1BP1 de la proteína BPI (Figura 15A) depositada en el PDB.



**Figura 15.** A) Figura de la estructura cristalográfica de la proteína BPI humana obtenida del PDB (archivo de coordenadas 1BP1). B) Péptidos constreñidos Tri-1 y Tri-2 que mimetizan los dos lazos de horquilla beta de la zona catiónica del dominio amino terminal de la familia de proteínas LBP-BPI. i) Péptido Tri-1 que contiene dos enlaces lactama y un enlace disulfuro, ii) Péptido Tri-2 que contiene dos enlaces disulfuro y un enlace lactama.

Esta zona constituye una región topográfica debido a que dichos lazos son adyacentes en la estructura tridimensional, pero lejanos en la secuencia aminoacídica de la proteína. La topología de la hoja beta formada por las cuatro hebras (Figura 15A), permite el diseño de un péptido que



contenga ambos lazos conectados por un segmento corto. Esto es posible ya que los residuos 50 y 94 son adyacentes y ocupan posiciones de la hoja beta enlazados por puentes de hidrógeno. El segmento conector puede constar de dos o tres residuos, de manera similar a los residuos centrales de los giros beta más comunes en estructuras de proteínas. En los péptidos diseñados se introdujo como conector la secuencia Gly-Gly-X, donde X es Asp o Cys en los péptidos Tri-1 y Tri-2, respectivamente. Se seleccionó la diglicina debido a su flexibilidad y para evitar la introducción de impedimentos estéricos que pueden aportar residuos de mayor volumen.

Para formar los tres lazos que componen la estructura deseada (los dos lazos de horquilla beta nativos y el lazo definido por el segmento conector introducido) se introducen constreñimientos conformacionales mediante la formación de enlaces amida entre las cadenas laterales de los aminoácidos Asp y Lys y por enlaces disulfuro entre las cadenas laterales de las Cys. Se escogieron tres pares de posiciones adyacentes en la estructura tridimensional de la proteína BPI para la sustitución por nuevas cadenas laterales: residuos 41 y 49, 50 y 94, 93 y 100, que se corresponden respectivamente con los aminoácidos 2 y 10, 11 y 15, 14 y 21 de la secuencia de los péptidos. El residuo 93 de la proteína BPI ocupa una posición espacial equivalente al tercer residuo del lazo conector. Los péptidos diseñados (Figura 15B) contienen: i) dos enlaces lactama y un enlace disulfuro (Tri-1), ii) dos enlaces disulfuro y un enlace lactama (Tri-2). En el diseño del péptido Tri-1 se introdujeron los residuos de Asp, Lys y Cys en las posiciones D<sup>2</sup>-K<sup>10</sup>, C<sup>11</sup>-C<sup>15</sup>, D<sup>14</sup>-K<sup>21</sup> y en péptido Tri-2 se introdujeron estos residuos en las posiciones C<sup>2</sup>-C<sup>10</sup>, D<sup>11</sup>-K<sup>15</sup>, C<sup>14</sup>-C<sup>21</sup>. Además, se cambiaron los residuos Ile<sup>43</sup> y Leu<sup>46</sup> por Thr para disminuir la hidrofobicidad de la cara opuesta del péptido. En la Tabla 1 se presentan las secuencias de aminoácidos de los péptidos Tri-1 y Tri-2. Estos péptidos, además de ser diseñados para mimetizar la estructura de una región específica de la familia de proteínas LBP-BPI, pueden presentar mayor estabilidad ante la degradación proteolítica debido al alto grado de constreñimiento conformacional [10,28] y mejorar sus propiedades farmacológicas.

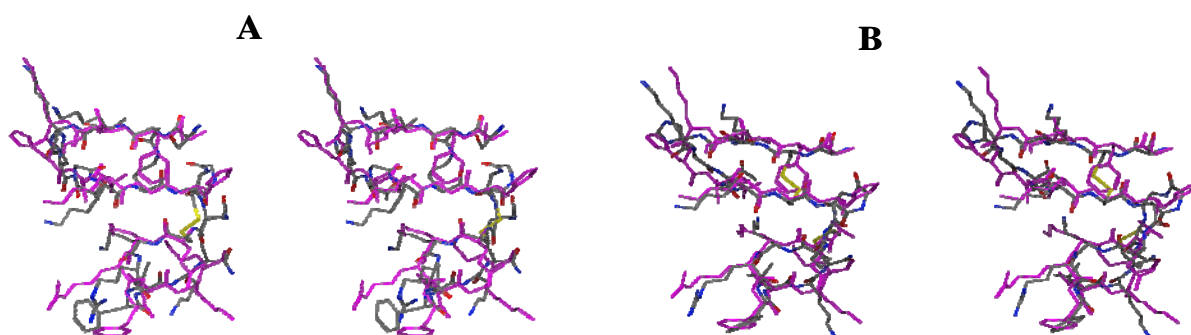
**Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de los péptidos Tri-1 y Tri-2**

Secuencias	Péptido Tri-1	Ciclos (D <sup>2</sup> -K <sup>10</sup> ), (C <sup>11</sup> -C <sup>15</sup> ), (D <sup>14</sup> -K <sup>21</sup> )Ac-SDKTKHTGKKCGGDCKRFLKK-NH <sub>2</sub>
	Péptido Tri-2	Ciclos (C <sup>2</sup> -C <sup>10</sup> ), (D <sup>11</sup> -K <sup>15</sup> ), (C <sup>14</sup> -C <sup>21</sup> )Ac-SCKTKHTGKCDGGCKKRFLKC-NH <sub>2</sub>

Ac: Acetilación del grupo amino en el extremo N.

Para corroborar que el lazo conector y los enlaces de cadenas laterales introducidos en los péptidos Tri-1 y Tri-2 son compatibles estereoquímicamente con la estructura deseada, se modeló la estructura tridimensional de los péptidos a partir de la estructura cristalográfica 1BP1 de la proteína

BPI. Los modelos obtenidos tienen buena calidad estereoquímica ya que no presentan violaciones importantes de parámetros geométricos tales como: distancias y ángulos de enlaces, ángulos diedros, impedimentos estéricos y ángulos de torsión de la cadena principal. Además, los modelos de los péptidos presentan una estructura similar a la región de la proteína BPI que se desea mimetizar (Figura 16) con un valor de RMSD de todos los átomos de 1,9 y 1,6 Å para los péptidos Tri-1 y Tri-2, respectivamente (Tabla 2). Las diferencias observadas en la cadena principal son pequeñas con un valor de RMSD de 1,1 y 1,2 Å para los péptidos Tri-1 y Tri-2, respectivamente. Las variaciones fundamentales se observan en las cadenas laterales (2,5 Å), lo que es esperado debido a que el péptido posee un alto contenido de cadenas alifáticas largas de lisinas y argininas que son flexibles.



**Figura 16.** Imágenes estereoscópicas de la superposición de los modelos de la estructura tridimensional de los péptidos Tri-1 (A) y Tri-2 (B) y la región N-terminal correspondiente de la proteína BPI (1BP1). En violeta la estructura de BPI y en coloreado por tipo de átomos la estructura de los péptidos.

Los resultados mostrados indican que la estructura química de los péptidos diseñados es compatible con la adopción de conformaciones similares a la proteína nativa. La introducción de los grupos químicos adicionales (conector) y los residuos enlazados covalentemente por sus cadenas laterales no introducen impedimentos estructurales incompatibles con la estructura deseada. Sin embargo, para determinar efectivamente el grado de mimetismo estructural de estos péptidos es necesario el estudio por métodos espectroscópicos como RMN (estructura tridimensional), dicroísmo circular y FT-IR (elementos de estructura secundaria).

**Tabla 2.** Comparación estructural de los modelos tridimensionales de los péptidos y la proteína BPI.

Modelo de estructura tridimensional	RMSD* (Å)				
	Todos los átomos	Centroide	Cadena principal	Cadena Lateral	Carbono alfa
Modelo péptido Tri-1	1,9	1,4	1,1	2,5	1,1
Modelo péptido Tri-2	1,6	1,2	1,2	2,0	1,0
1BP1 minimizado	1,4	1,0	0,7	1,8	0,7

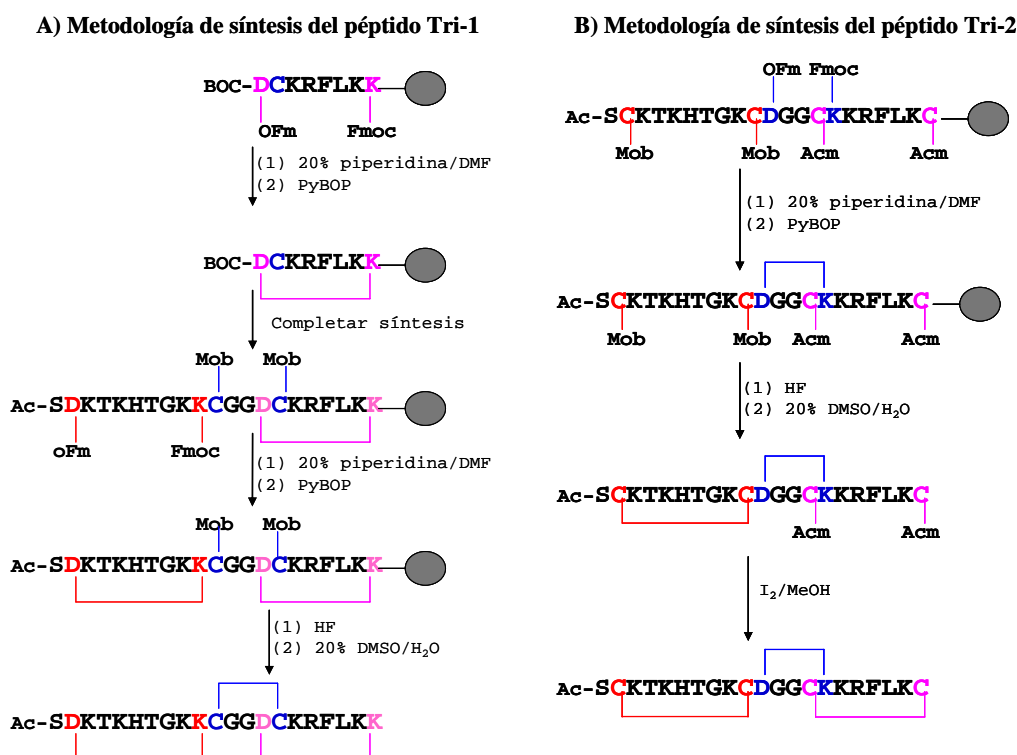
\*RMSD: Desviación cuadrática media de las distancias determinadas entre los átomos de cada modelo y los átomos correspondientes a ellos en la estructura cristalográfica de BPI (1BP1).

Para obtener el péptido Tri-1 se diseñó una metodología de síntesis en la que se forman los dos enlaces lactama en fase sólida y el enlace disulfuro en disolución. Empleamos un único sistema de protección del par Lys-Asp para formar selectivamente los dos ciclos de lactama en la fase sólida, ya que los ciclos de lactama no se entrelazan en la secuencia peptídica. No se exploró la formación de los tres puentes en fase sólida, debido a los posibles impedimentos estéricos que puedan generarse [16].

Se desarrolló una metodología para la obtención del péptido Tri-2 mediante la formación del enlace lactama en fase sólida y los dos enlaces disulfuro en disolución. Se seleccionó el método de formación regioselectiva de enlaces disulfuro para garantizar la topología adecuada en la obtención de los dos enlaces disulfuro [139,144].

En la Figura 17 se presentan las estrategias de protección diseñadas para obtener los péptidos Tri-1 y Tri-2, mediante la química de síntesis Boc/Bzl. Se empleó la resina MBHA con baja sustitución (0,38 mmol/g) con el fin de reducir la formación de enlaces intermoleculares en fase sólida según el efecto de pseudodilución [137]. En la protección de las cadenas laterales de los aminoácidos que forman la lactama se utilizaron grupos que son sensibles al tratamiento con piperidina. Estos fueron Fmoc para el grupo  $\epsilon$ -amino de la Lys y Fm para el grupo  $\gamma$ -carboxilo del Asp [148]. Para la síntesis del péptido que contiene dos ciclos de lactama (Tri-1) se utilizó el mismo sistema de grupos protectores para los dos pares de Lys-Asp que forman los puentes. Se ensambló el péptido hasta tener en la secuencia el primer par Lys-Asp. Posteriormente, mediante el tratamiento con piperidina, se eliminaron los grupos Fmoc y Fm que protegen las cadenas laterales de estos aminoácidos y se formó el primer ciclo de lactama. Se completó la secuencia peptídica, se eliminaron las protecciones del segundo par Lys-Asp y se formó el segundo ciclo de lactama, igualmente en fase sólida (Figura 17A).

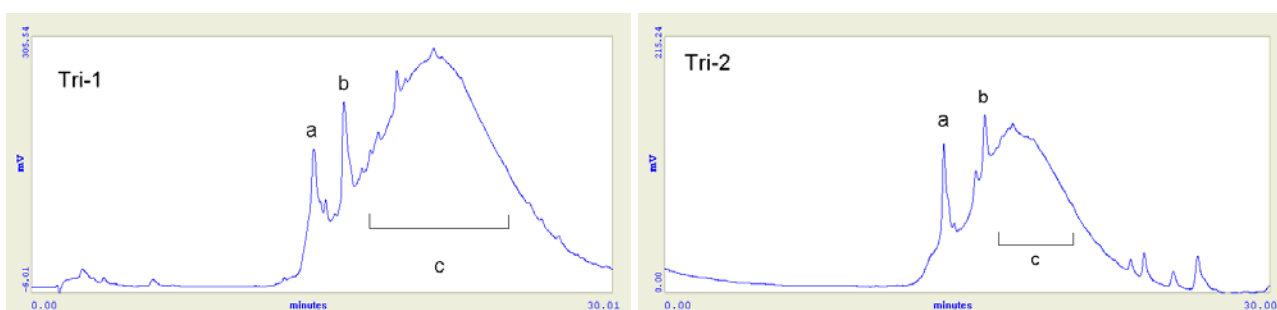
Para la protección de la histidina se empleó el derivado Boc-His(Bom)OH en lugar del Boc-His(Dnp)OH, pues se ha descrito que el grupo dinitrofenilo (Dnp) no es estable al tratamiento con piperidina que se realiza para eliminar selectivamente los grupos Fmoc y Fm [198].



**Figura 17:** Diseño de la metodología de síntesis para la obtención de los péptidos Tri-1 y Tri-2 con el empleo de la química Boc/Bzl y la resina MBHA. A) Péptido Tri-1 que contiene en su estructura dos ciclos de lactama y un enlace disulfuro. B) Péptido Tri-2 que contiene en su estructura dos enlaces disulfuro y un ciclo de lactama.

El agente de acoplamiento utilizado para el ensamblaje de la secuencia peptídica fue CDI/HOBt y la formación de los enlaces lactama se realizaron por activación con PyBOP. Se seleccionó una sal de fosfonio como activador para formar las lactamas, ya que a diferencia de las sales de uronio, las de fosfonio no reaccionan con los grupos amino lo cual afectaría la formación de la lactama [130]. Para la formación selectiva de los dos enlaces disulfuro en el péptido Tri-2 se emplearon los grupos Mob y Acn para proteger los pares de cisteínas que forman cada ciclo (Figura 17B). Los grupos tiol que estaban protegidos con Mob se obtuvieron en forma de tiol libre cuando el péptido se separó de la resina. En cambio, los grupos tiol protegidos con Acn se mantienen bloqueados debido a que el Acn es resistente a las condiciones ácidas empleadas en la química Boc/Bzl [12]. Después de formado el primer enlace disulfuro por oxidación de los grupos tiol libres con DMSO, se eliminan los grupos Acn por tratamiento con yodo y se forma directamente el segundo enlace disulfuro en disolución.

En la Figura 18 se muestran los cromatogramas de RP-HPLC de los péptidos crudos Tri-1 y Tri-2 obtenidos después del desanclaje y con el empleo de la química Boc/Bzl.



**Figura 18. Cromatograma de RP-HPLC de los péptidos crudos Tri-1 y Tri-2 obtenidos mediante la química Boc/Bzl.** Columna RP C18 (Vydac, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m). Gradiente: 5-60 % de B en 35 min. Disolución A: 0,1 % TFA/agua, Disolución B: 0,05% de TFA/acetonitrilo. Detección a  $\lambda$ : 226 nm.

El pico **a** en cada cromatograma se corresponde con el péptido con la MM deseada (Tabla 3 y Anexo 2B). El pico **b** del cromatograma del péptido Tri-1, se corresponde con una impureza peptídica de mayor masa. Los perfiles cromatográficos de RP-HPLC muestran que los dos péptidos crudos no se obtuvieron con buena pureza. Se observa un pico **c** que abarca un amplio intervalo de tiempos de retención lo cual es típico de especies poliméricas y de la presencia de impurezas debido a reacciones colaterales.

**Tabla 3. Resultados de la determinación de la MM de los péptidos Tri-1 y Tri-2 en las diferentes etapas de la síntesis según las metodologías diseñadas.**

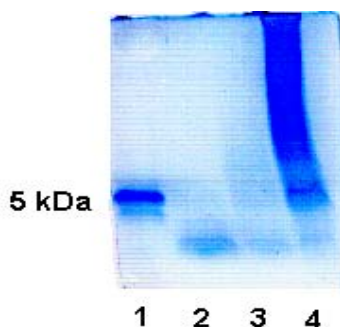
Péptido	Estructura	Composición elemental	MM teórica (Da) promedio <sup>o</sup> /monoisotópica <sup>§</sup>	MM experimental (Da)	
				Boc/Bzl	Fmoc/tBu
Tri-1	Dos enlaces lactama y dos cisteínas libres	C <sub>102</sub> H <sub>172</sub> N <sub>34</sub> O <sub>27</sub> S <sub>2</sub>	(M+H) <sup>+</sup> : 2371,83/2370,25	(M+H) <sup>+</sup> : 2371,40 <sup>o</sup>	(M+H) <sup>+</sup> : 2370,33 <sup>o§</sup>
	Dos enlaces lactama y un enlace disulfuro	C <sub>102</sub> H <sub>170</sub> N <sub>34</sub> O <sub>27</sub> S <sub>2</sub>	M: 2368,81/2367,24	-	M: 2367,26 <sup>A§</sup>
Tri-2	Un enlace lactama, dos cisteínas libres y dos protegidas con Acn	C <sub>104</sub> H <sub>177</sub> N <sub>35</sub> O <sub>28</sub> S <sub>4</sub>	(M+H) <sup>+</sup> : 2495,03/2493,23	(M+H) <sup>+</sup> : 2495,00 <sup>o</sup>	(M+H) <sup>+</sup> : 2493,34 <sup>o§</sup>
	Un enlace lactama, un enlace disulfuro y dos cisteínas protegidas con Acn	C <sub>104</sub> H <sub>175</sub> N <sub>35</sub> O <sub>28</sub> S <sub>4</sub>	M: 2492,01/2490,22	-	M: 2490,17 <sup>A§</sup>
	Un enlace lactama y dos enlaces disulfuro	C <sub>98</sub> H <sub>163</sub> N <sub>33</sub> O <sub>26</sub> S <sub>4</sub>	M: 2347,84/2346,13	-	M: 2346,08 <sup>A§</sup>

\* Espectro obtenido por FAB-MS, <sup>o</sup> Espectro obtenido por MALDI-MS, <sup>A</sup> Espectro obtenido por ESI-MS. <sup>§</sup>MM monoisotópica, <sup>o</sup> MM promedio

A pesar de haber utilizado una resina con baja funcionalización (0,38 mmol/g) se favoreció la polimerización intermolecular en fase sólida durante la formación del enlace lactama. Esto se corroboró mediante Tris-Tricina-SDS-PAGE. Los picos **a**, **b** y **c** del cromatograma de RP-HPLC del péptido Tri-1 (Figura 18) se colectaron y aplicaron en la electroforesis (Figura 19). Los picos **a** (carrilera 2) y **b** (carrilera 3) se corresponden con especies monoméricas y en el pico **c** (carrilera 4) se observa la presencia de especies poliméricas. La reacción indeseada de polimerización en fase

sólida se favoreció en el péptido Tri-1 (Figura 18), debido posiblemente a la presencia de dos ciclos de lactama.

Por otra parte, se ha descrito [9] que durante el tratamiento con HF para el desanclaje de péptidos que contienen cisteínas se pueden formar oligómeros por enlaces disulfuro intermoleculares los cuales son de difícil reversión por tratamiento con agentes reductores como el ditioneitol o el 2-mercaptoetanol, lo cual también puede ser la causa de la presencia de polímeros.



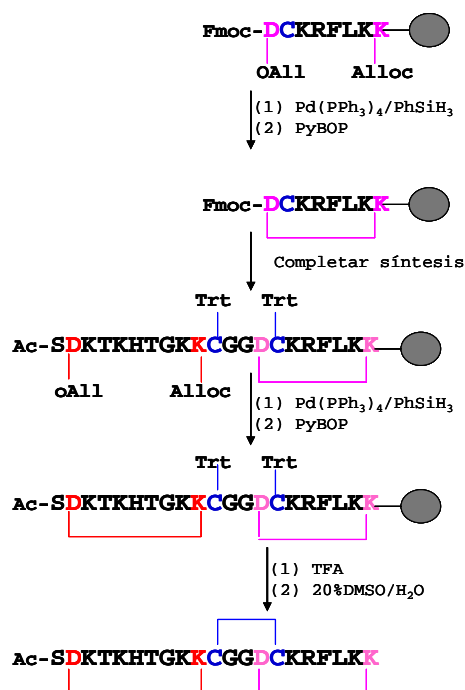
**Figura 19.** Tris-Tricina-SDS-PAGE del los picos del cromatograma de RP-HPLC del péptido Tri-1. Gel de separación (10 % T, 3 % C). Carrilera 1: patrón de peso molecular, carrilera 2: pico *a* del cromatograma, carrilera 3: pico *b* del cromatograma, carrilera 4: pico *c* del cromatograma. Las muestras fueron visualizadas mediante tinción con Coomassie.

Debido a la baja pureza de los péptidos crudos Tri-1 y Tri-2 obtenidos mediante la síntesis con la química Boc/Bzl, no se continuó con la formación de los enlaces disulfuro en disolución y se evaluó su síntesis con la química Fmoc/tBu. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la resina MBHA, se seleccionó como soporte sólido la resina PEG-PS que permite una mejor eficiencia de las reacciones en fase sólida [41]. Además, esta resina tiene una funcionalización más baja (0,18 mmol/g), lo que puede contribuir a reducir la formación de enlaces amida intermolecular.

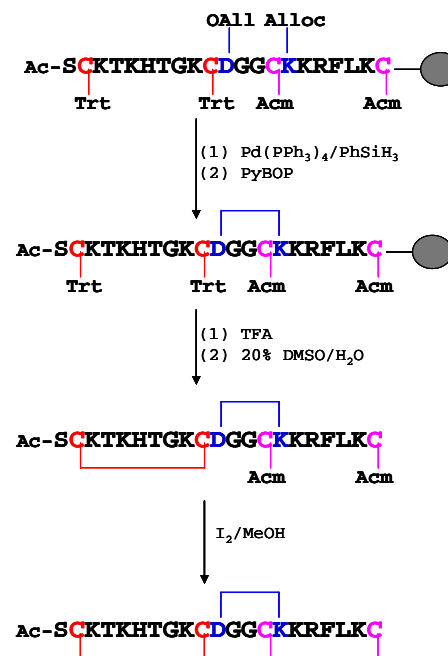
En la Figura 20 se presentan las estrategias de protección diseñadas para obtener los péptidos Tri-1 y Tri-2 mediante la química Fmoc/tBu. En la protección de las cadenas laterales de los aminoácidos que forman la lactama se utilizaron grupos del tipo alilo que son eliminados selectivamente mediante una reacción de transferencia del grupo alilo a  $\text{PhSiH}_3$  catalizada por Pd (0), estos fueron Alloc para el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina y All para el grupo  $\gamma$ -carboxilo del ácido aspártico [199]. Para la formación selectiva de los dos enlaces disulfuro en el péptido Tri-2 se emplearon los grupos Trt y el Acn para proteger los pares de cisteínas que forman cada ciclo. El grupo Acn también es estable en las condiciones básicas empleadas en la química Fmoc/tBu [12] y a la reacción de

transferencia del grupo alilo a  $\text{PhSiH}_3$  catalizada por  $\text{Pd}(0)$ , que se emplea para la eliminación del grupo Alloc y All en la formación de la lactama [200].

#### A) Metodología de síntesis del péptido Tri-1

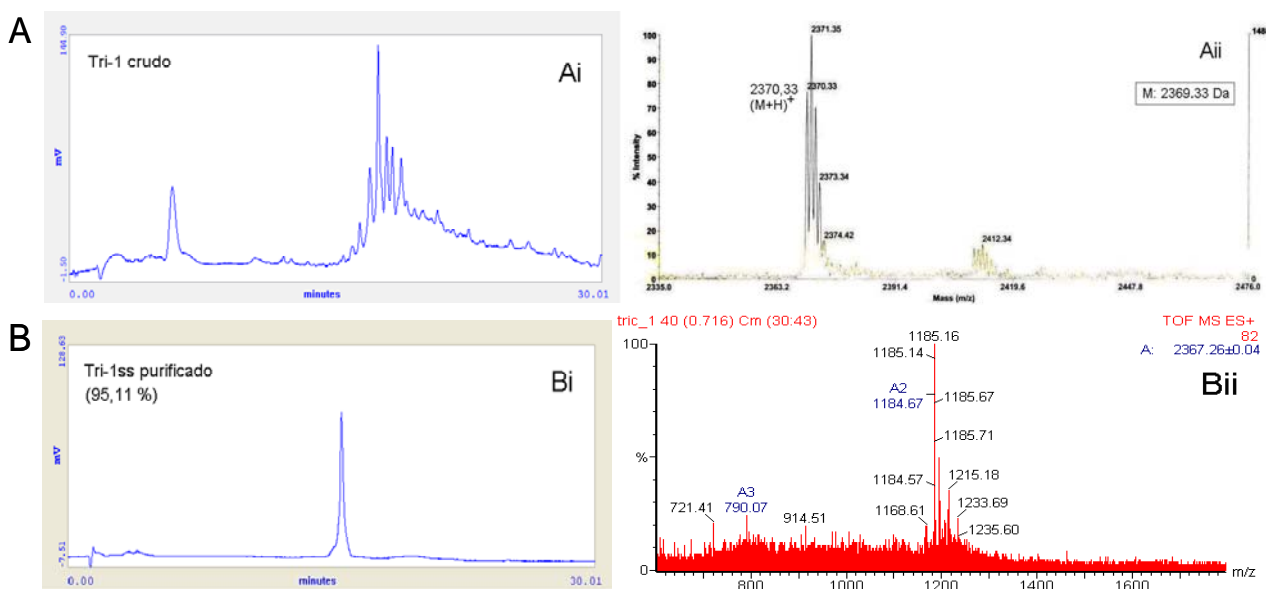


#### B) Metodología de síntesis del péptido Tri-2



**Figura 20:** Diseño de la metodología de síntesis para la obtención de los péptidos Tri-1 y Tri-2 con el empleo de la química Fmoc/tBu y la resina PEG-PS. A) Péptido Tri-1 que contiene en su estructura dos ciclos de lactama y un enlace disulfuro. B) Péptido Tri-2 que contiene en su estructura dos enlaces disulfuro y un ciclo de lactama.

En la Figura 21 se presentan los cromatogramas de RP-HPLC y los espectros de masas de las diferentes etapas de síntesis del péptido Tri-1 obtenido con el empleo de la química Fmoc/tBu. La pureza del péptido crudo (Figura 21Ai) fue superior a la obtenida mediante la química Boc/Bzl (Figura 18). El espectro MALDI-MS confirmó la formación de los dos ciclos de lactama en la fase sólida (Figura 21Aii y Tabla 3), existió correspondencia entre la MM teórica  $(M+H)^+$  para el péptido con los dos ciclos incluidos (2370,25 Da) y la MM experimental  $(M+H)^+$  obtenida (2370,33 Da). La formación del enlace disulfuro se realizó en disolución por oxidación de las cisteínas libres con DMSO. En la Figura 21Bi se presenta el perfil cromatográfico del péptido Tri-1 después de purificado, el cual se obtuvo con 95,11 % de pureza. El espectro de masas (Figura 21Bii) muestra la pérdida de 2 Da correspondiente a la oxidación de los grupos tiol de las cisteínas debido a la formación del enlace disulfuro.

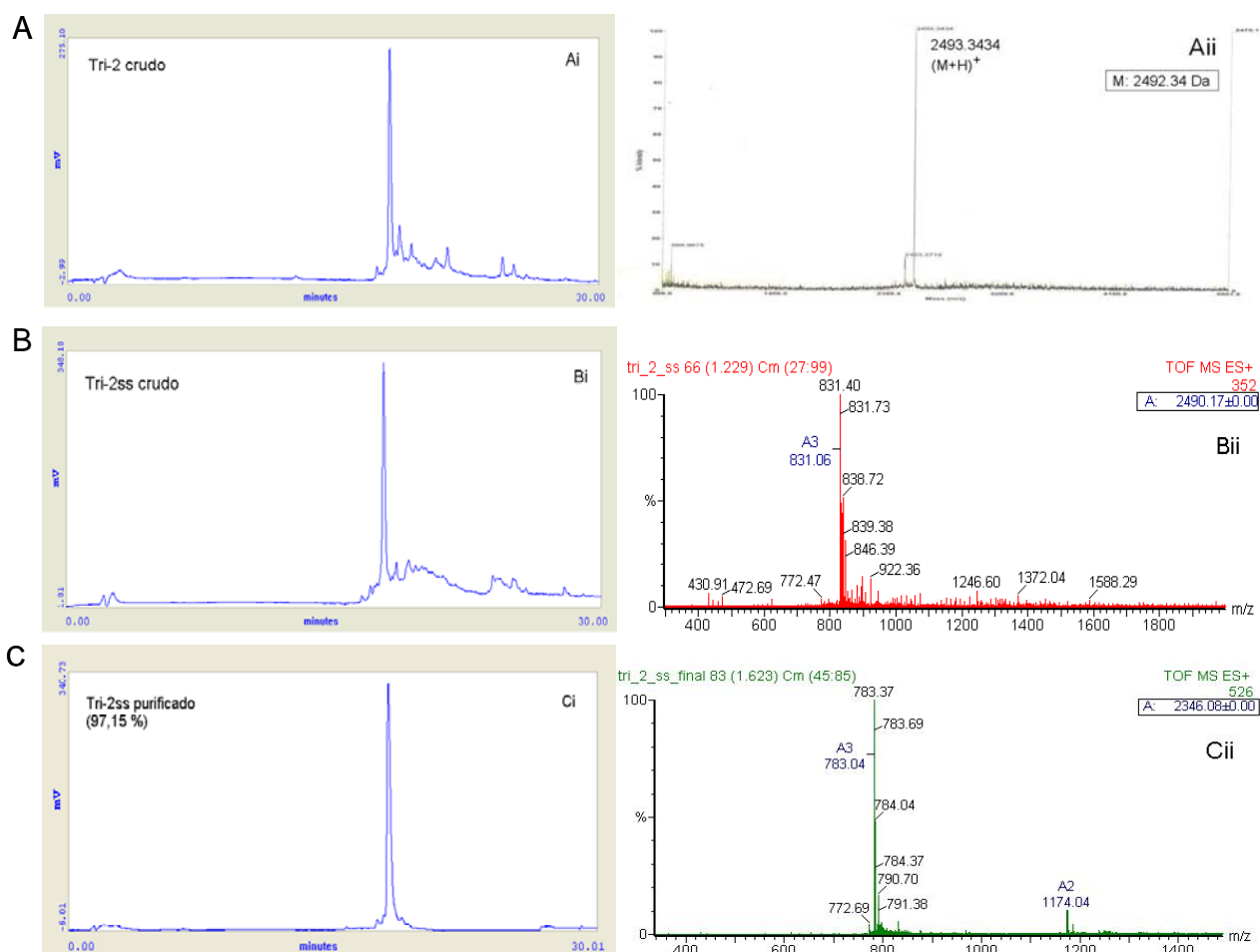


**Figura 21: Cromatogramas de RP-HPLC y espectros de masas del péptido Tri-1 obtenido mediante la química Fmoc/tBu.** (A) Péptido crudo con dos enlaces lactama y dos cisteínas libres, (Ai) Cromatograma de RP-HPLC, (Aii) Espectro MALDI-MS, (M+H)<sup>+</sup> teórica: 2370,25 Da. (B) Péptido con dos enlaces lactama y un enlace disulfuro purificado. (Bi) Cromatograma de RP-HPLC, (Bii) Espectro ESI-MS, MM teórica: 2367,24 Da. Columna RP-C18 (Vydac, 4,6 x 150 mm, 5 μm). Gradiente: 5-60 % de B en 35 min. Disolución A: 0,1 % TFA/agua, Disolución B: 0,05 % de TFA/acetonitrilo. Detección a λ: 226 nm.

En la Figura 22 se presentan los cromatogramas de RP-HPLC y los espectros de masas de las diferentes etapas de síntesis del péptido Tri-2 obtenido con el empleo de la química Fmoc/tBu. La calidad del péptido crudo (Figura 22Ai) fue muy superior a la obtenida mediante la química Boc/Bzl (Figura 18). El espectro de masas confirmó la formación del ciclo de lactama en fase sólida, la presencia de dos cisteínas protegidas con el grupo Acn y dos cisteínas con el grupo tiol libre (Figura 22Aii).

Para la formación selectiva de los dos enlaces disulfuro, primeramente se oxidaron las cisteínas libres con DMSO y posteriormente se formó el segundo enlace disulfuro por una reacción de desprotección/oxidación con yodo. En el perfil cromatográfico del péptido después de formado el primer enlace disulfuro (Figura 22Bi) se observa un ligero incremento de las especies poliméricas después del proceso de oxidación de las cisteínas libres, lo que indica que a pesar de utilizar una disolución diluida para favorecer la reacción intramolecular no se logra eliminar completamente la reacción intermolecular que lleva a la formación de multímeros entre las Cys<sup>2</sup> y Cys<sup>10</sup>.





**Figura 22: Cromatogramas de RP-HPLC y espectros de masas del péptido Tri-2 obtenido mediante la química Fmoc/tBu.** (A) Péptido con un enlace lactama, dos cisteínas libres y dos protegidas con Acm. (Ai) Cromatograma de RP-HPLC de péptido crudo, (Aii) Espectro MALDI-MS, (M+H)<sup>+</sup> teórica: 2493,23 Da. (B) Péptido con un enlace lactama, un enlace disulfuro y dos cisteínas protegidas con Acm. Bi) Cromatograma de RP-HPLC de péptido crudo, (Bii) Espectro ESI-MS, MM teórica: 2490,22 Da. (C) Péptido con un enlace lactama y dos enlaces disulfuro. Ci) Cromatograma de RP-HPLC de péptido purificado, (Cii) Espectro ESI-MS, MM teórica: 2346,13 Da. Columna RP C18 (Vydac, 4,6 x 150 mm, 5 µm). Gradiente: 5-60 % de B en 35 min. Disolución A: 0,1 % TFA/agua, Disolución B: 0,05% de TFA/acetonitrilo. Detección a λ: 226 nm.

La diferencia de 2 Da encontrada en el espectro de masas (Figura 22Bii) evidencia la formación del primer enlace disulfuro. La pérdida posterior de 144 Da por tratamiento con yodo demuestra la formación del segundo enlace disulfuro debido a la eliminación del grupo Acm y formación del enlace disulfuro (Figura 22Cii). En la Figura 22Ci se presenta el perfil cromatográfico del péptido Tri-2 después de purificado, se obtuvo con una pureza de 97,15 %.

Con la química Fmoc/tBu y el soporte PEG-PS se obtuvieron los mejores resultados debido posiblemente a las condiciones menos agresivas que se emplean en esta química [109], a la

presencia del PEG en el soporte sólido y a la menor sustitución empleada. La presencia de PEG en el soporte sólido permite una mayor eficiencia de la reacción de acoplamiento de los aminoácidos durante la síntesis y de la reacción de formación de la lactama en fase sólida [105]. Además, la menor sustitución de la resina hace que hayan menos impedimentos estéricos durante el ensamblaje de la secuencia, lo que incide positivamente en una mejor pureza del crudo y favorece la reacción intramolecular de formación de lactama por el fenómeno de “pseudodilución”. Esta resina fue diseñada para las síntesis de péptidos con impedimentos estéricos [41], lo cual incide positivamente en la mejor pureza del crudo. Para obtener el péptido crudo Tri-1 con mayor pureza que la obtenida con la resina PEG-PS, sería recomendable el empleo de una resina como la “ChemMatrix” que no presenta PS en su estructura. Contiene solamente cadenas de PEG y ha sido superior a las resinas PEG-PS para la síntesis de péptidos complejos [120]. Por otra parte, aunque el PyBOP demostró ser adecuado para obtener los ciclos de lactama en este péptido, se deben evaluar otros reactivos de acoplamiento de nueva generación, que han sido desarrollados recientemente, como PyOxP y PyOxB, que han mostrado mayor efectividad para las reacciones de ciclización por formación de lactama en fase sólida [131]. En este trabajo se evaluaron alternativas de síntesis que permitieron la selección de la metodología adecuada para la obtención de péptidos restringidos conformacionalmente para mimetizar una zona topográfica del dominio N-terminal de la familia de proteínas LBP-BPI. Las metodologías desarrolladas permitieron la obtención de moléculas peptídicas complejas, con una pureza superior a 95 %, que contienen tres puentes intramoleculares en una secuencia de solo 21 aminoácidos. Disponer de metodologías de síntesis efectiva para obtener estas moléculas con alto grado de restricción conformacional es un aspecto novedoso que aporta este trabajo para la búsqueda de péptidos bioactivos y en particular para el tratamiento de la sepsis.

#### **4.2. Diseño y obtención de un soporte sólido para la peguilación del extremo C de péptidos sintéticos**

La peguilación es una de las modificaciones químicas que se emplean para aumentar la estabilidad de un péptido terapéutico y mejorar sus propiedades farmacológicas [31,201]. En la búsqueda de medicamentos para el tratamiento de la sepsis, se ha descrito que el péptido de la región comprendida entre los aminoácidos 86-99 de la proteína LBP (Anexo 2A), con un cambio puntual de la Lys<sup>95</sup> por el aminoácido Ala, se une con elevada afinidad al LPS [46]. Si bien el péptido

LBPK95A puede ser más estable a la degradación proteolítica que su precursor LBP<sub>86-99</sub> debido al cambio de la Lys<sup>95</sup> por Ala, aún contiene otros aminoácidos básicos que lo hacen sensible a la degradación enzimática [2]. Por lo que la peguilación pudiera convertirlo en un candidato peptídico con propiedades terapéuticas mejoradas. El aumento del tiempo de vida medio del péptido LBPK95A en sangre debido a la modificación con el PEG puede aumentar su eficacia terapéutica, ya que la actividad de esta molécula después de una administración sistémica está asociada con la unión al LPS que se encuentra circulando en la sangre durante una infección bacteriana. La peguilación en el extremo N del péptido LBPK95A se descartó, ya que los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio en la búsqueda de análogos con mayor estabilidad metabólica demostraron que la protección del grupo amino terminal con un grupo acetilo, afectaba la actividad del péptido, por lo que dirigimos la peguilación hacia el extremo C.

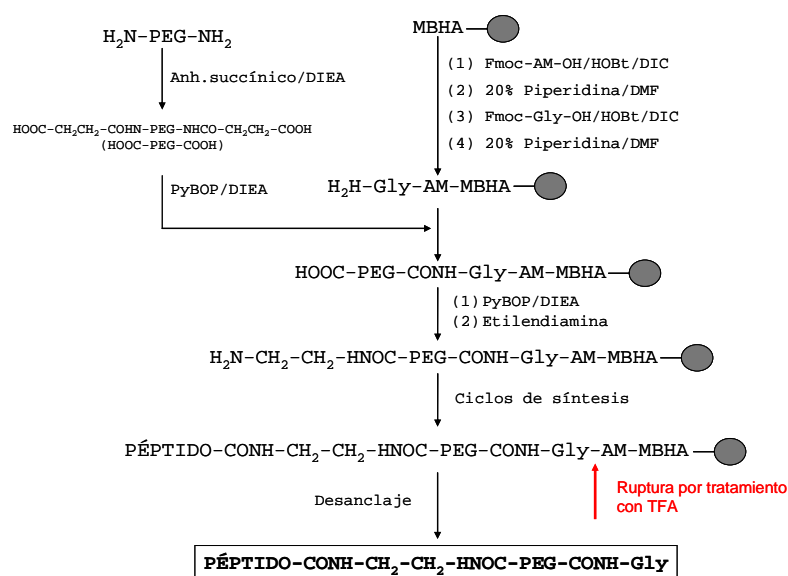
Por otra parte, es importante evaluar PEG de diferentes masas moleculares, ya que el aumento de la masa, incrementa la estabilidad metabólica al reducir la proteólisis y el aclaramiento renal, pero puede interferir con la actividad biológica del péptido [202]. Por lo tanto, se debe seleccionar un tamaño de PEG óptimo que permita obtener un balance favorable entre la actividad biológica y la farmacocinética.

*Hellerman y col.* desarrollaron un soporte PEG-PS para obtener péptidos peguilados en el extremo C con PEG de MM hasta 400 Da para mejorar la solubilidad del péptido [157]. Posteriormente, se han desarrollado otros soportes poliméricos PEG-PS que han sido muy eficientes para la síntesis de péptidos con secuencias complejas, péptidos cíclicos y péptidos multiantigénicos [39-45]. La resina TentaGel-NH<sub>2</sub> es el único de estos soportes comercialmente disponibles, que se ha aplicado para obtener péptidos peguilados en el extremo C pero se limita a una MM de PEG de 3000 Da [36]. Todas estas resinas han tenido un impacto en la síntesis de péptidos y moléculas orgánicas pequeñas, pero no se diseñaron para obtener péptidos con PEG de diferentes tamaños anclado en el extremo carboxilo.

Teniendo en cuenta los antecedentes del desarrollo de soportes PEG-PS y la necesidad de disponer de un soporte sólido que permita obtener péptidos peguilados directamente desde la fase sólida y que permita evaluar PEG de diferente tamaño, se diseñó una metodología para obtener un nuevo

soporte del tipo PEG-PS que brinde las propiedades físico-químicas necesarias para la síntesis en fase sólida y la MM óptima de PEG para el mejoramiento de las propiedades terapéuticas de un conjugado péptido-PEG. Este soporte sólido se empleó para la síntesis del péptido LBPk95A (RVQGRWKVRASFFK) peguilado en el extremo C con un PEG de MM 1500 y 2000 Da.

*Kates y cols.* en el año 1998 describieron una metodología novedosa para la síntesis de soportes PEG-PS [41]. En esta metodología se parte del PEG-diamino, el cual se convierte en PEG-diácido por tratamiento en disolución con anhídrido succínico y después se hace reaccionar con los grupos amino de la resina. Los grupos ácido que quedan libres se activan con PyBOP en condiciones básicas y posteriormente se convierten en grupos amino por reacción con etilendiamina. En este trabajo se diseñó una metodología similar a la desarrollada por *Kates y cols.* para obtener un soporte del tipo PEG-PS (metodología 1, Figura 23), pero se cambió la posición del espaciador AM respecto al PEG, con lo cual se localiza el sitio de corte para liberar el péptido en una posición que permite que el PEG quede enlazado en el extremo C del péptido y no en el soporte de PS después del desanclaje (Figura 23).

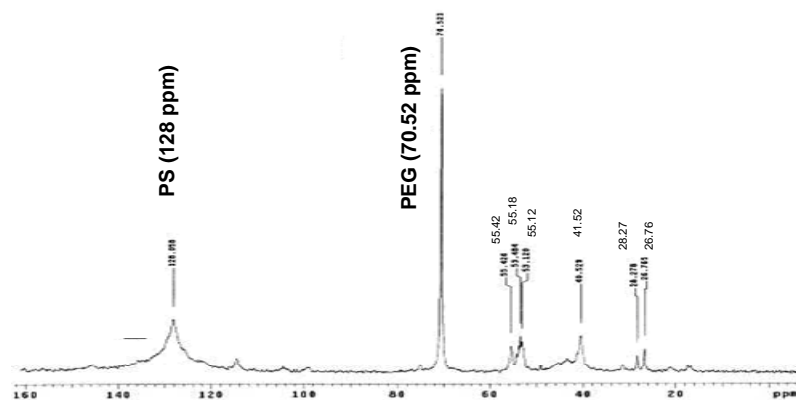


**Figura 23.** Diseño de la metodología 1 para la obtención de una resina PEG-PS para sintetizar péptidos peguilados en el extremo C.

Se partió de 2 g de resina MBHA con una funcionalización de 0,7 mmol/g y se empleó  $\text{PEG}_{2000}$ -diamino. Se obtuvieron 3,26 g de la resina  $\text{PEG}_{2000}$ -PS con una funcionalización de 0,14 mmol/g. La sustitución obtenida fue menor que la que tenía la resina MBHA de partida, pero similar a lo informado en la literatura (de 0,15 a 0,25 mmol/g) para las resinas PEG-PS comerciales [105]. La

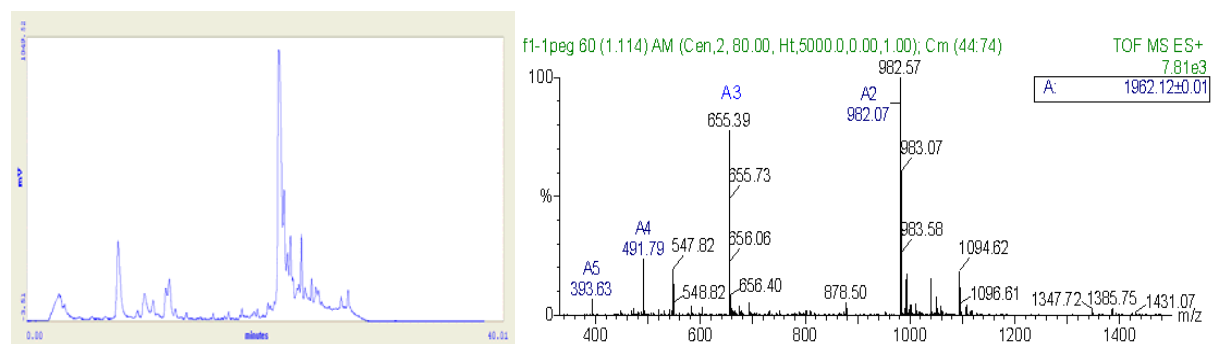
cantidad de resina obtenida fue menor que la esperada (4,8 g). Una posible explicación es que, como se utiliza PEG-diácido, parte del PEG que ya está enlazado puede unirse a la resina por el otro extremo ácido e inactivarse con la consecuente disminución de los grupos funcionales.

La resina PEG<sub>2000</sub>-PS fue caracterizada por RMN-<sup>13</sup>C en fase gel (Figura 24). La señal que se obtiene a los 128 ppm se corresponde con los carbonos aromáticos de PS y la que se obtiene a 70,5 ppm se corresponde con los carbonos de los grupos metileno del PEG.



**Figura 24. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C en fase gel de la resina PEG<sub>2000</sub>-PS.**

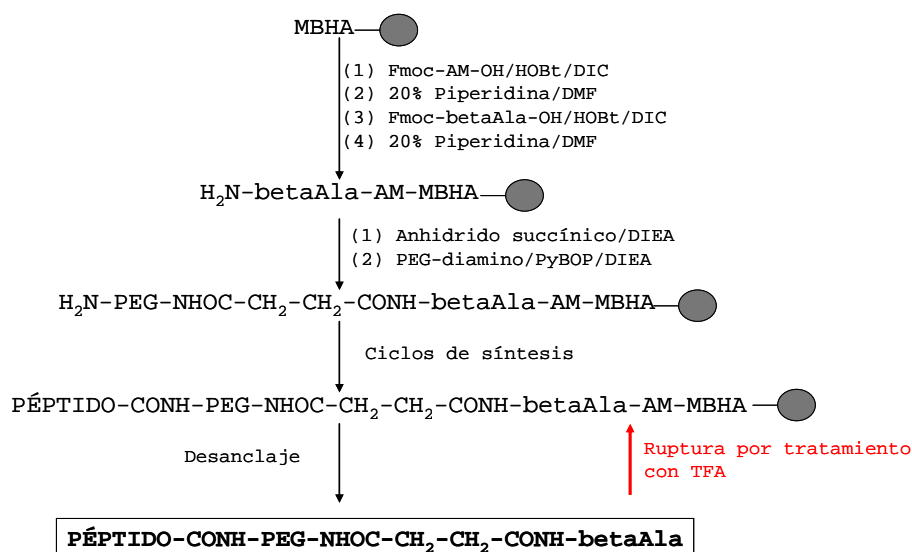
El soporte PEG<sub>2000</sub>-PS se empleó para la síntesis del péptido LBPK95A (F1-1), pero no se logró obtener el péptido peguilado como especie más abundante. En el perfil cromatográfico de RP-HPLC se obtuvo un pico fino mayoritario, lo cual no es típico de péptidos peguilados. Los resultados de espectrometría de masas demostraron que el péptido tenía acoplado en el extremo C los derivados de ácido succínico y etilendiamina y un residuo de Gly (MM teórica: 1962,12 Da), pero no contenía PEG (Figura 25).



**Figura 25. Cromatograma de RP-HPLC del péptido crudo F1-1PEG<sub>2000</sub> obtenido mediante la metodología 1 (Figura 23) y espectro ESI-MS del pico mayoritario.** Columna RP C18 (Vydac, 4,6 x 150 mm, 5 µm). Gradiente: 5-60 % de B en 35 min. Disolución A: 0,1 % TFA/agua, Disolución B: 0,05 % de TFA/acetonitrilo. Detección a λ: 226 nm. MM teórica (péptido F1-1 + derivados de ácido succínico y etilendiamina + Gly): 1962,12 Da.

Esto se debe a que, a pesar de haber utilizado un defecto molar de anhídrido succínico respecto al PEG-diamino en la reacción de conversión del PEG-diamino en PEG-diácido, quedó anhídrido succínico libre que posteriormente compitió con el PEG-diácido por los grupos amino de la resina. Los grupos ácidos provenientes del anhídrido succínico reaccionaron con la etilendiamina aportando los grupos funcionales sobre los que se ensambló el péptido.

Con estos resultados, se rediseñó la metodología de síntesis del soporte PEG-PS (metodología 2, Figura 26). Se partió de la resina MBHA y se derivatizó con el espaciador AM. Seguidamente se agregó la betaAla para distanciar el sitio de unión del PEG al PS, teniendo en cuenta que esta puede emplearse como separador al igual que la Gly [203]. El anhídrido succínico se acopló a la betaAla para convertir los grupos amino en grupos ácido y permitir la posterior reacción con el PEG-diamino. Seguidamente se introdujo el PEG en la resina, el cual aportó los grupos amino sobre los cuales creció el péptido.



**Figura 26.** Diseño de la metodología 2 para la obtención de una resina PEG-PS para sintetizar péptidos peguilados en el extremo C.

Con esta nueva metodología (Figura 26), al acoplar el anhídrido succínico directamente sobre la resina y eliminar el reactivo no consumido mediante filtración, se evitó el problema encontrado en la metodología 1 (Figura 23). Los grupos amino sobre los cuales crece el péptido son aportados por el PEG, el cual queda acoplado en el extremo C del péptido después de separarlo de la resina. Se utilizó el PyBOP para acoplar el PEG-diamino a los grupos ácido de la resina ya que es un activador muy eficiente. No se emplearon sales de uronio para evitar la reacción del agente de acoplamiento

con los grupos amino de la resina lo cual incidiría en una pérdida de funcionalización [130]. Con esta metodología se obtuvieron dos resinas, una que contiene PEG de MM 1500 Da y otra con PEG de 2000 Da.

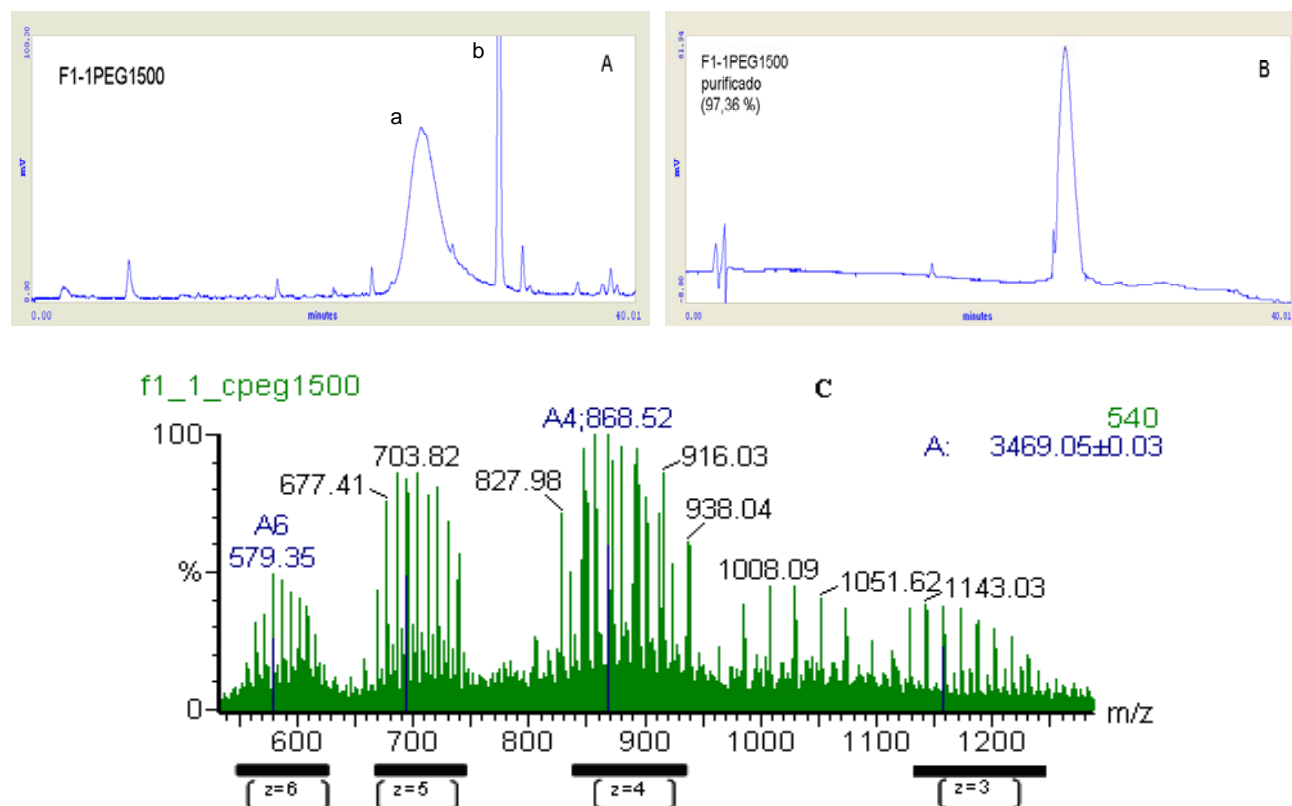
Para obtener las resinas PEG-PS se partió de 1 g de resina MBHA con una funcionalización de 0,54 mmol/g y se obtuvieron 1,49 g de la resina PEG<sub>1500</sub>-PS con 0,12 mmol/g y 1,66 g de la resina PEG<sub>2000</sub>-PS con 0,11 mmol/g. La sustitución obtenida para cada resina PEG-PS fue menor que la que tenía la resina MBHA de partida y las cantidades obtenidas de las resinas PEG-PS también fueron menores que lo esperado (1,81 g para PEG<sub>1500</sub>-PS y 2,08 g para PEG<sub>2000</sub>-PS). De manera similar a lo sucedido en la metodología 1, una parte del PEG-diamino que está enlazado puede unirse a la resina por el otro extremo amino y disminuir los grupos funcionales que aporta el PEG para crecer el péptido, lo cual disminuye la sustitución y el peso final de la resina. El problema de la baja sustitución se puede resolver con el empleo de un PEG protegido en uno de sus grupos amino como el Fmoc-PEG-NH<sub>2</sub>. Se han desarrollado metodologías para obtener PEG monodispersos de hasta 5000 Da [152], pero aun no están disponibles como productos comerciales.

***Aplicación del soporte diseñado para la obtención del péptido LBPK95A peguilado en el extremo carboxilo.***

Las resinas PEG<sub>1500</sub>-PS y PEG<sub>2000</sub>-PS se utilizaron para la síntesis del péptido LBPK95A (F1-1) peguilado en el extremo C con PEG de MM 1500 y 2000 Da, respectivamente. Para ensamblar la secuencia se utilizó el método de activación con DIC/HOBt y no fue necesario más de una hora de acoplamiento, esto se debe a que la presencia del PEG hace más eficientes las reacciones en fase sólida [41]. En las Figuras 27 y 28 se presentan los perfiles cromatográficos de los péptidos crudos y purificados F1-1PEG<sub>1500</sub> y F1-1PEG<sub>2000</sub>, respectivamente. El pico ancho **a** en cada cromatograma se corresponde con el péptido peguilado y su forma es debido a la polidispersidad del PEG.

En los cromatogramas de RP-HPLC de los péptidos crudos (Figuras 27A y 28A) aparece un pico fino intenso a mayores tiempos de retención (pico **b**) que no pertenece al péptido peguilado. Esta especie, al igual que algunas impurezas minoritarias que salen en los primeros minutos del gradiente, son aductos de la reacción de desanclaje. Estas impurezas normalmente son eliminadas por lavados con éter dietílico y precipitación del péptido en el desanclaje, pero en el caso de los

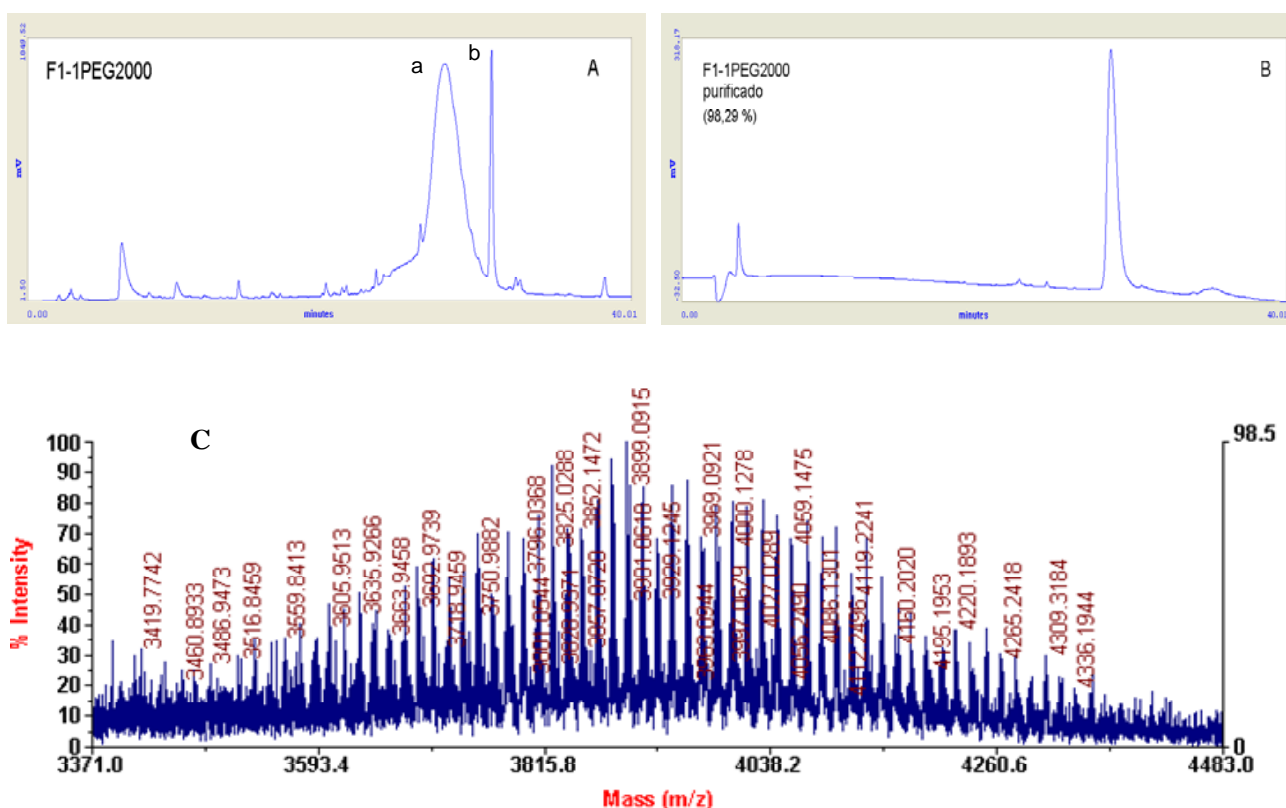
péptidos peguilados, no se pudo realizar este procedimiento ya que la presencia del PEG hace que el péptido no precipite en éter.



**Figura 27. Cromatogramas de RP-HPLC del péptido F1-1PEG<sub>1500</sub> crudo (A) y purificado (B) y espectro ESI-MS (C) del péptido purificado.** Columna RP C18 (Vydac, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m). Gradiente: 5-60 % de B en 35 min. Disolución A: 0,1 % TFA/agua, Disolución B: 0,05% de TFA/acetonitrilo. Detección a  $\lambda$ : 226 nm.

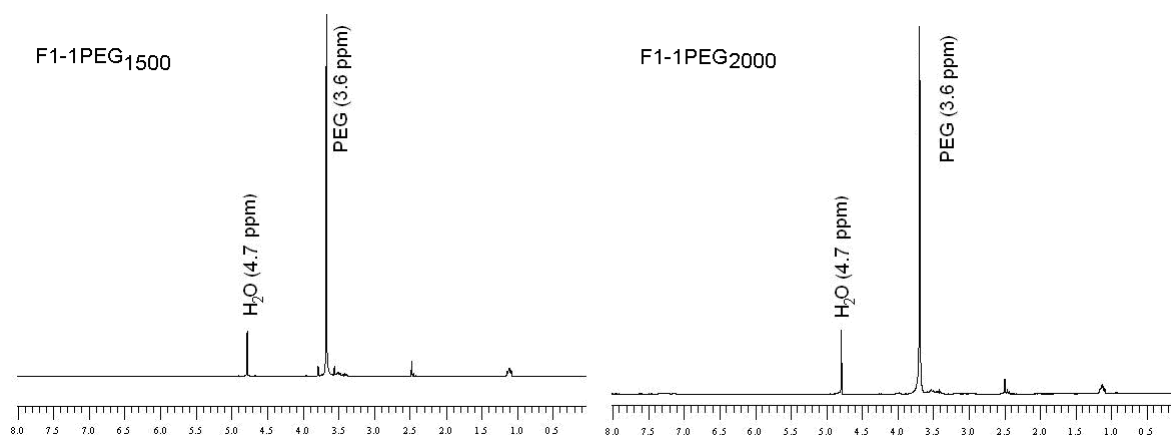
Los espectros de masas del péptido F1-1PEG<sub>1500</sub> (Figura 27C) y F1-1PEG<sub>2000</sub> (Figura 28C) confirman que ambos péptidos contienen el PEG (los espectros de masas de los PEG de partida se muestran en los anexos 3B y 3C). En el espectro ESI-MS del péptido F1-1PEG<sub>1500</sub> (Figura 27C) se observan diferentes especies multicargadas ( $z = 3, 4, 5$  y  $6$ ) correspondientes a la masa del péptido peguilado, aparecen señales separadas por  $44/z$  unidades de masa debidas a la polidispersidad del PEG. Junto a las señales correspondientes a las especies con cuatro cargas ( $z = 4$ ), aparecen otras señales que corresponden al PEG libre (Anexo 3D). En el espectro MALDI-MS del péptido F1-1PEG<sub>2000</sub> (Figura 28C), además de las señales correspondientes al péptido peguilado, también se observan las señales correspondientes al PEG<sub>2000</sub> libre (Anexo 3E). Esto indica que el PEG que se entrecruza en la resina durante el proceso de obtención del soporte sólido, después en el desanclaje se obtiene como PEG libre que coeluye con el péptido peguilado en la purificación.





**Figura 28.** Cromatogramas de RP-HPLC del péptido F1-1PEG<sub>2000</sub> crudo (A) y purificado (B) espectro MALDI-MS (C) del péptido purificado. Columna RP C18 (Vydac, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m). Gradiente: 5-60 % de B en 35 min. Disolución A: 0,1 % TFA/agua, Disolución B: 0,05% de TFA/acetonitrilo. Detección a  $\lambda$ : 226 nm.

Los péptidos purificados F1-1PEG<sub>1500</sub> y F1-1PEG<sub>2000</sub> fueron además caracterizados por RMN-<sup>1</sup>H para confirmar la presencia del PEG (Figura 29). En los dos casos se obtiene la señal a 3,6 ppm correspondiente a los protones de los grupos metileno del PEG. En el anexo 3A se presenta el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del PEG<sub>2000</sub>-diamino de partida.

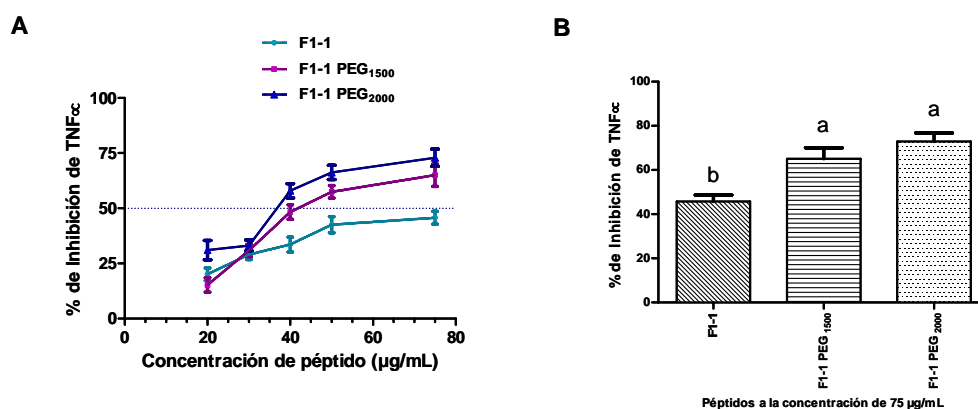


**Figura 29.** Espectros RMN-<sup>1</sup>H de los péptidos F1-1PEG<sub>1500</sub> y F1-1PEG<sub>2000</sub>. La señal a 4,7 ppm se corresponde a los protones del H<sub>2</sub>O presente en el disolvente (D<sub>2</sub>O).

Un inconveniente que tiene el uso de estas resinas para obtener péptidos peguilados con aplicaciones terapéuticas es que junto con el péptido deseado también pueden coeluir impurezas debidas a péptidos truncados o péptidos protegidos que tengan un tiempo de retención similar al péptido deseado y que no se pueden eliminar debido al ancho del pico en RP-HPLC. Este problema se puede solucionar con el empleo de PEG monodisperso que permite la obtención de picos finos separados en RP-HPLC. La metodología diseñada para obtener los soportes PEG-PS también puede ser útil para la obtención de soportes con PEG monodispersos, lo cual permitiría la obtención de péptidos peguilados con una MM definida.

### ***Evaluación de la actividad biológica de los péptidos peguilados***

El péptido LBPK95A (F1-1) se une al LPS con alta afinidad [46,165]. El efecto biológico de esta unión implica la inhibición de la cascada inflamatoria que se activa al interactuar el lipopolisacárido bacteriano con la proteína LBP presente en el suero humano [23,24]. Para evaluar la influencia de la peguilación de los péptidos F1-1PEG<sub>1500</sub> y F1-1PEG<sub>2000</sub> en la inhibición de la cascada inflamatoria, se evaluó la producción de TNF $\alpha$ , una citocina proinflamatoria inducida por LPS. Como se observa en la Figura 30A, los péptidos F1-1PEG<sub>1500</sub> y F1-1PEG<sub>2000</sub> inhibieron la producción de TNF $\alpha$  con un patrón dosis-dependiente.



**Figura 30. Inhibición de la producción de TNF $\alpha$  inducida por LPS en cultivos de sangre total humana por variantes peguiladas del péptido LBPK95A (F1-1).** (A) Evaluación de los péptidos F1-1PEG<sub>1500</sub>, F1-1PEG<sub>2000</sub> y F1-1 a concentraciones de 20, 30, 40, 50 y 75  $\mu$ g/mL. Se muestran las medias y las desviaciones estándar del porcentaje de inhibición de TNF $\alpha$  de tres experimentos independientes. (B) Evaluación de los péptidos F1-1PEG<sub>1500</sub>, F1-1PEG<sub>2000</sub> y F1-1 a 75  $\mu$ g/mL. Las barras representan la media y el error en las barras la desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) se indican con letras diferentes.

Ambos péptidos peguilados superaron la capacidad de inhibir la producción de TNF $\alpha$  respecto al péptido LBPK95A (F1-1) no modificado ( $p < 0,05$ ) a la dosis de 75  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 30B). Se ha descrito que la modificación con PEG puede disminuir la actividad biológica de las moléculas blancas en ensayos *in vitro* [31,204]. En este caso, la actividad de los péptidos peguilados aumenta respecto al péptido sin modificar debido posiblemente a que la modificación con PEG no afecta el sitio de unión al LPS. Reyes y cols. describieron que los aminoácidos Trp<sup>91</sup> y Lys<sup>92</sup> son indispensables para la unión del péptido LBPK95A al LPS e inhibir la interacción LBP-LPS [46]. Estos aminoácidos están alejados del extremo C que es el lugar por donde se enlaza selectivamente el PEG, por lo que es probable que no interfiera con el sitio de unión al LPS. Por otra parte, la presencia del PEG aumenta el tiempo de vida medio en sangre, al proteger al péptido de la degradación proteolítica. Esto tiene mayor repercusión en el caso del péptido LBPK95A ya que su secuencia es altamente catiónica y por tanto más sensible a la degradación por las serinoproteasas. Por lo tanto, el aumento de la actividad biológica de las variantes peguiladas también puede deberse a que como su acción depende de la interacción con el LPS en sangre, al aumentar la estabilidad proteolítica del péptido se neutraliza más tiempo el LPS, lo que provoca un mayor nivel de inhibición de la producción de TNF $\alpha$ . Los resultados justifican futuras investigaciones sobre la posible aplicación de estos péptidos modificados con PEG, para el tratamiento de la sepsis producida por una infección con bacterias Gram-negativas.

#### **4.3. Estudio de la relevancia de la cisteína en un péptido antagonista de la IL-15**

La proteína IL-15 es una citocina proinflamatoria que juega un rol importante en patologías del sistema inmune como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la sarcoidosis [53-55]. Santos y cols. describieron el primer péptido antagonista de la proteína IL-15 que puede ser un potencial agente terapéutico para el tratamiento de estas enfermedades. Este péptido, denominado P8, contiene en su secuencia una cisteína libre, la cual es una fuente de inestabilidad química en la molécula [12]. Pueden presentar inestabilidad al ser administrados y modificarse por cisteinilación [48,49]. Los procesos de síntesis de péptidos con cisteína son más engorrosos [12]. Además, debido a su reactividad, en particular su capacidad de oxidarse [12], puede ser la causa de inconsistencia en las etapas superiores de desarrollo del producto, ya sea en la formulación líquida o liofilizada y en los

estudios de estabilidad [47]. Además, favorece la disminución de la pureza del ingrediente farmacéutico activo y del producto terminado con el tiempo de almacenamiento.

Teniendo en cuenta los inconvenientes potenciales de la presencia de una cisteína libre en el péptido, se estudió la relevancia de este residuo en la actividad biológica, para evaluar la posibilidad de modificar este aminoácido sin afectar las propiedades antagonistas del péptido P8. Se sintetizaron dos variantes del péptido, en una se sustituyó la Cys por Ala (péptido A09P19), con lo cual se elimina el grupo tiol y se introduce una cadena lateral alifática no reactiva. El cambio de aminoácidos en la secuencia peptídica por Ala es una de las estrategias que se ha empleado para estudiar la importancia de cada aminoácido en la actividad biológica de péptidos [10]. Este cambio no altera significativamente la conformación de la cadena principal y no impone un efecto estérico o electrostático extremo [205]. En la otra variante se sustituyó la Cys por Ser (péptido G06P55), ya que la Ser simula la estructura de la Cys en el péptido, pero se elimina la reactividad del grupo tiol al cambiarlo por un grupo hidroxilo. La formación del dímero molecular es otra de las alternativas para eliminar la reactividad del grupo tiol. Además, le confiere al péptido mayor estabilidad química y metabólica y aumenta la actividad biológica, particularmente en aquellos péptidos que están involucrados en la unión directa a un receptor [50-52].

Todos los péptidos, P8 y sus análogos, se sintetizaron en fase sólida con el empleo de la química Fmoc/tBu en la resina MBHA. En la Tabla 4 se resumen los resultados de la caracterización por RP-HPLC y ESI-MS del péptido P8 y sus análogos purificados. La pureza determinada por RP-HPLC fue superior al 95 % en todos los casos y los espectros ESI-MS muestran concordancia entre los valores de MM teóricos y las MM experimentales obtenidas. Los cromatogramas de RP-HPLC y los espectros ESI-MS de cada péptido se presentan en el Anexo 4.

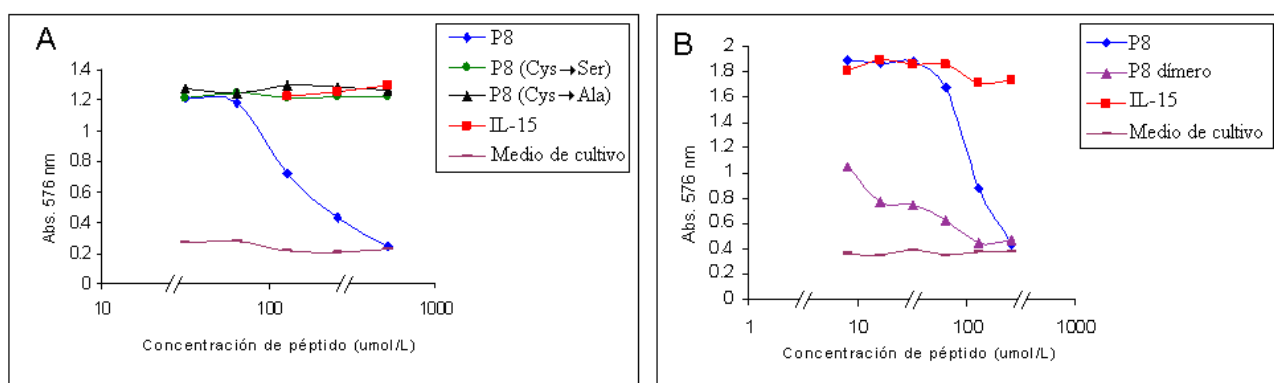
**Tabla 4. Caracterización por RP-HPLC y ESI-MS del péptido P8 y sus análogos.**

Péptido	Secuencia	Composición elemental	Pureza (%) (RP-HPLC) (lío-filizado)	Identidad por ESI-MS	
				MM teórica monoisotópica (Da)	MM Experimental (Da)
G06P58 (P8)	KVTAMKCFLL-NH <sub>2</sub>	C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> S <sub>2</sub>	96,87	1151,64	1151,64
G06P58 dímero (C <sup>1</sup> -C <sup>7</sup> )	KVTAMKCFLL-NH <sub>2</sub>	C <sub>106</sub> H <sub>184</sub> N <sub>26</sub> O <sub>22</sub> S <sub>4</sub>	97,45	2301,28	2301,27
A06P19 (Cys→Ala)	KVTAMK <b>A</b> FLL-NH <sub>2</sub>	C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> S <sub>1</sub>	98,63	1119,68	1119,68
G06P55 (Cys→Ser)	KVTAMK <b>S</b> FLL-NH <sub>2</sub>	C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> S <sub>1</sub>	99,47	1135,68	1135,65

El péptido P8 monomérico se dimerizó por oxidación de los grupos tiol con DMSO y se purificó por RP-HPLC. Se obtuvo con una pureza mayor al 95 % determinada por RP-HPLC y la obtención del dímero fue corroborada por ESI-MS (Tabla 4 y Anexo 4).

### Actividad biológica de los péptidos derivados de la proteína IL-15

La actividad biológica de los péptidos se evaluó por la capacidad de inhibir la proliferación de la línea celular CTLL-2 dependiente de IL-15. Como se observa en la Figura 31A, la sustitución de la Cys por Ala o Ser provocó la pérdida total de la capacidad inhibitoria del péptido P8. Por el contrario, el dímero de P8 mostró mayor actividad inhibitoria que el monómero (Figura 31B) con una disminución de la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ), medida en ensayos *in vitro*, de 130 a 24  $\mu\text{mol/L}$ . Estos resultados demostraron que la Cys es importante en la actividad biológica del péptido P8 y que la dimerización del péptido aumenta sus propiedades antagonistas. Debido a que el péptido P8 tiene una  $IC_{50}$  (130  $\mu\text{mol/L}$ ), aún elevada para un candidato terapéutico, en la división de Farmacéuticos del CIGB, se hizo un estudio de optimización de la secuencia del péptido P8 mediante un barrido de Ala y posteriormente cambios de polaridad en determinados aminoácidos. Como resultado se obtuvo un péptido con mejores propiedades antagonistas en el que se cambia la Lys<sup>6</sup> por Thr (KVTAMTCFLL), denominado G06P56 (P56), con una  $IC_{50}$  de 24  $\mu\text{mol/L}$ .



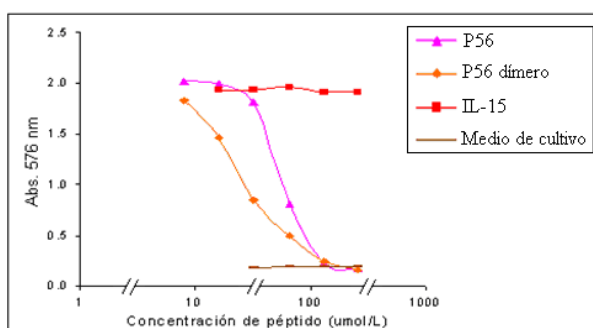
**Figura 31. Relevancia de la cisteína del péptido P8 en la actividad proliferativa de las células CTLL-2 mediada por IL-15.** A) Efecto de la sustitución de Cys por Ala y Ser en el péptido P8. B) Efecto de la dimerización por la cisteína en el péptido P8. Las células CTLL-2 se incubaron en la presencia de 300 pg/mL de IL-15 (■) y concentraciones crecientes de las variantes peptídicas, péptido P8 (◆), mutante Cys→Ser (●), mutante Cys→Ala (▲), dímero de P8 (▲). Medio de cultivo (—) (control negativo de proliferación celular). La proliferación celular se midió por tinción mitocondrial con MTT a 576 nm.

El péptido P56, al igual que P8, contiene una Cys libre. Teniendo en cuenta que la dimerización del péptido P8 permitió obtener una molécula con mejores propiedades antagonistas, se obtuvo el dímero del péptido P56 y se evaluó su capacidad inhibitoria. El péptido P56 se sintetizó en fase sólida con el empleo de la química Fmoc/tBu en la resina MBHA. Se dimerizó por oxidación de los grupos tiol con DMSO. En la Tabla 5 se resumen los resultados de la caracterización por RP-HPLC y ESI-MS del monómero y del dímero purificados.

**Tabla 5. Caracterización por RP-HPLC y ESI-MS del péptido P56 y su dímero.**

Péptido	Secuencia	Composición elemental	Pureza (%) (RP-HPLC) (lío-filizado)	Identidad por ESI-MS	
				MM teórica monoisotópica (Da)	MM Experimental (Da)
G06P56 (P56)	KVTAMTCFLL-NH <sub>2</sub>	C <sub>51</sub> H <sub>88</sub> N <sub>12</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub>	97,98	1124,61	1124,59
G06P56 dímero (C <sup>7</sup> -C <sup>7</sup> )	KVTAMTCFLL-NH <sub>2</sub>	C <sub>102</sub> H <sub>174</sub> N <sub>24</sub> O <sub>24</sub> S <sub>4</sub>	98,29	2247,20	2247,18

Para las dos especies, la pureza determinada por RP-HPLC fue superior al 95 % y los espectros ESI-MS muestran concordancia entre los valores de MM teóricos y las MM experimentales obtenidas. Los cromatogramas de RP-HPLC y los espectros ESI-MS se presentan en el Anexo 4. Como se observa en la Figura 32, el dímero del péptido P56 mostró mayor capacidad de inhibición de la proliferación celular en la línea CTLL-2 dependiente de IL-15 que la mostrada por el monómero P56. Se obtuvo una IC<sub>50</sub> de 8 µmol/L, lo cual convierte a este péptido en un candidato terapéutico atractivo para el tratamiento de enfermedades relacionadas con una expresión aumentada de IL-15.



**Figura 32. Evaluación de la dimerización del péptido P56 en la actividad proliferativa de las células CTLL-2 mediada por IL-15.** Las células CTLL-2 se incubaron en la presencia de 300 pg/mL de IL-15 (■) y concentraciones crecientes de las variantes peptídicas, péptido P56 (▲) y dímero de P56 (◆). Medio de cultivo (—) (control negativo de proliferación celular). La proliferación celular se midió por tinción mitocondrial con MTT a 576 nm.

Los resultados demuestran que la dimerización por formación de un enlace disulfuro mejora las propiedades antagonistas de los péptidos P8 y P56 derivados de la IL-15, debido posiblemente a que

se favorece la interacción con el receptor soluble IL-15R $\alpha$  o a que pueden unirse a dos moléculas del receptor y aumentar la capacidad antagonista [50].

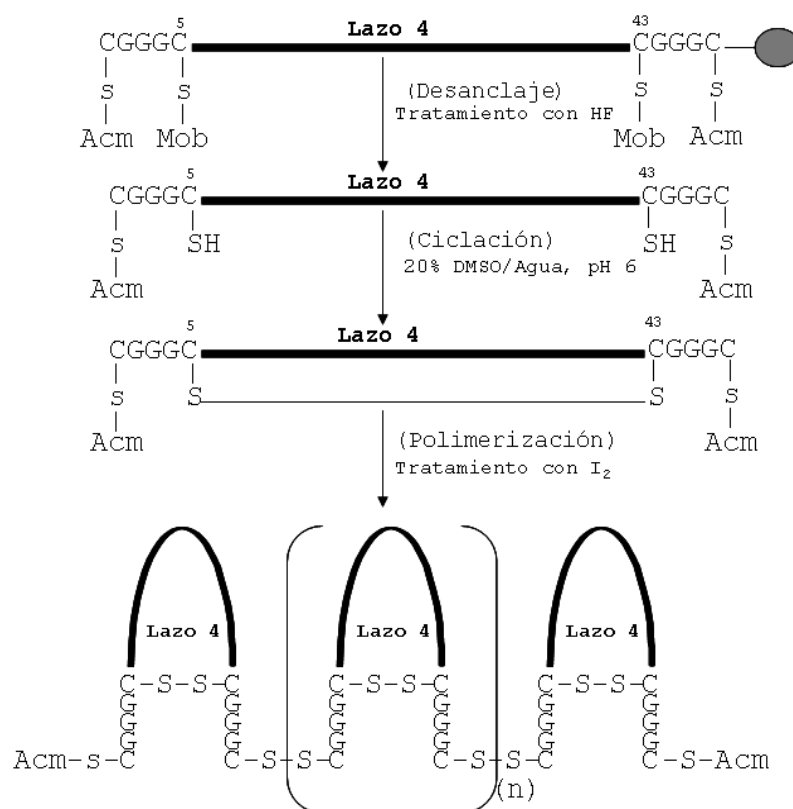
#### **4.4. Estudios de diferentes formas de presentación al sistema inmune de péptidos derivados del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* de la cepa CU385**

Las vacunas basadas en péptidos sintéticos presentan limitaciones asociadas principalmente a la baja inmunogenicidad y a la necesidad de estimulación de células T auxiliaadoras para lograr una respuesta inmune protectora [3]. El desarrollo de formas de presentación de péptidos al sistema inmune para aumentar la inmunogenicidad sienta las bases para la búsqueda de vacunas peptídicas contra diferentes enfermedades [3]. Un ejemplo lo constituye la enfermedad meningocócica, la cual es una de las infecciones bacterianas de mayor impacto en la salud a nivel mundial [68]. En este trabajo se estudiaron diferentes formas de presentación al sistema inmune de péptidos derivados del lazo 4 de la proteína PorA, provenientes de la cepa cubana CU385, para aumentar su inmunogenicidad en el diseño de una vacuna peptídica. Las formas de presentación estudiadas fueron: i) Presentación del péptido cíclico que comprende el lazo 4 en forma polimérica, ii) Presentación de un péptido lineal derivado del lazo 4 en forma de MAPs.

##### **4.4.1. Obtención de un péptido cíclico polimerizado que contiene el lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* cepa CU385**

Se han descrito metodologías para lograr la multimerización mediante la polimerización lineal de un péptido por formación de enlaces amida a través de sus extremos N y C [57]. También se ha empleado la polimerización por formación de enlaces disulfuro intermoleculares entre las Cys adicionadas en los extremos N y C del péptido [58,59,61]. Sin embargo, no se ha descrito el empleo de la polimerización lineal a través de Cys de un péptido cíclico como estrategia para aumentar la inmunogenicidad. En este trabajo se diseñó una metodología para obtener el lazo 4 en forma de péptido cíclico polimerizado, como forma novedosa de presentación de un péptido cíclico al sistema inmune.

En la Figura 33 se presenta la metodología de síntesis seguida para obtener el péptido cíclico polimerizado.



**Figura 33. Metodología de síntesis del péptido cíclico C9-1 polimerizado que comprende el lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* de la cepa CU385.**

En ambos extremos de la secuencia que comprende el lazo 4 se agregó una Cys, para poder constreñir el péptido mediante la formación de un enlace disulfuro intramolecular, que permita mimetizar el lazo 4 de la proteína PorA. Se adicionaron tres Gly como espaciador y otra Cys que se empleó para obtener el polímero del péptido cíclico. Se empleó el método de formación regioselectiva de enlaces disulfuro [12,144] para dirigir la formación del ciclo intramolecular en la secuencia que contiene el lazo 4 y posteriormente formar los polímeros.

El péptido, codificado como C9-1 (Tabla 6), se sintetizó en fase sólida con el empleo de la química Boc/Bzl y la resina MBHA. Además se sintetizó un péptido codificado como C9-2 (Tabla 6), que comprende solamente el lazo 4 con las dos cisteínas en los extremos para formar el ciclo. En la Tabla 7 se resumen los resultados de la caracterización por RP-HPLC y MS de los péptidos C9-1 y C9-2 cíclicos purificados.

**Tabla 6. Péptidos derivados del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* cepa CU385.**

Péptido	Modificación	Secuencia
C9-1	Ciclo(C <sup>5</sup> -C <sup>43</sup> )	C (Acm) GGGCPIQNSKSAYTPAHYTRQNNADVFPVAVVGKPGSCGGGC (Acm) -NH <sub>2</sub>
C9-2	Ciclo(C <sup>1</sup> -C <sup>35</sup> )	Ac-CPIQNSKSAYTPAHYTRQNNADVFPVAVVGKPGSC-NH <sub>2</sub>

Ac: Acetilado en el extremo N.



En el Anexo 5 se presentan los cromatogramas de RP-HPLC y espectros de masas de los péptidos C9-1 y C9-2 lineales crudos y cíclicos purificados. En los perfiles cromatográficos de los péptidos crudos (Anexo 5) se observan picos anchos a mayores tiempos de retención que el péptido deseado, que se corresponden con poblaciones de polímeros, formados por enlaces disulfuro intermoleculares no deseados durante la etapa de desanclaje, por lo que fue necesario un tratamiento previo con ditioneitol antes de la reacción de ciclización. El enlace disulfuro intramolecular se formó en disolución, a partir de los péptidos lineales purificados, por oxidación de las cisteínas libres con DMSO en agua a una concentración de 0,2 mmol/L. El avance de la reacción de ciclización se siguió por la determinación cualitativa de Ellman [145]. La formación del ciclo fue corroborada por MS, la MM obtenida experimentalmente coincide con la MM teórica para ambos péptidos y la pureza determinada por RP-HPLC fue superior al 90 % (Tabla 7, Anexo 5).

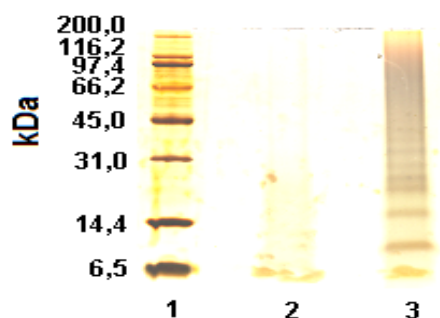
**Tabla 7. Caracterización por RP-HPLC y MS de los péptidos cíclicos derivados del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* de la cepa CU385.**

Péptido	Pureza (%) (RP-HPLC)	Composición elemental	Identidad por MS	
			MM promedio teórica (Da)	MM Experimental (Da)
C9-1	98,72	C <sub>186</sub> H <sub>288</sub> N <sub>58</sub> O <sub>59</sub> S <sub>4</sub>	(M+H) <sup>+</sup> : 4409,9	(M+H) <sup>+</sup> : 4410,3*
C9-2	91,56	C <sub>164</sub> H <sub>252</sub> N <sub>48</sub> O <sub>50</sub> S <sub>2</sub>	(M+H) <sup>+</sup> : 3761,2	(M+H) <sup>+</sup> : 3761,0 <sup>+</sup>

(\*) Determinado por MALDI-MS, (+) Determinado por FAB-MS.

Después de purificado el péptido cíclico C9-1, se realizó la polimerización mediante la reacción simultánea de eliminación del grupo Acm y la formación de los enlaces disulfuro intermoleculares con yodo a una concentración de 32 mmol/L. La reacción de polimerización se mantuvo en agitación durante 15 min a 25 °C y se detuvo por la adición de cantidades equimolares de ácido ascórbico con respecto al yodo añadido.

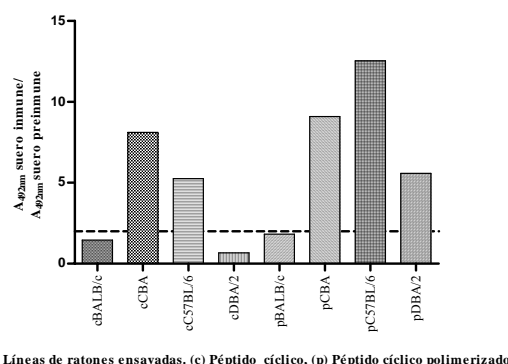
En la Figura 34 se presenta la electroforesis de Tris-Tricina-SDS del péptido C9-1 polimerizado. En la carrilera 2 se observa una banda por debajo de 6,5 kDa que corresponde al péptido cíclico C9-1 cuya MM teórica es de aproximadamente 4,4 kDa. En la carrilera 3 se observa la presencia de bandas con pesos moleculares superiores a 100 kDa, se obtienen polímeros de varios tamaños lo que confirma que la reacción de polimerización ocurrió eficientemente.



**Figura 34. Electroforesis de Tris-Tricina-SDS del péptido C9-1 polimerizado. Gel separador (10 % T, 3% C).** Carrilera 1: patrones de pesos moleculares incubados en la disolución tampón de muestra reductora. Carrilera 2: péptido cíclico C9-1 y Carrilera 3: péptido cíclico C9-1 polimerizado incubados en la disolución tampón de muestra no reductora. Las muestras fueron visualizadas mediante tinción con plata.

### Evaluación de la inmunogenicidad de los péptidos C9-1 y C9-2

El péptido cíclico C9-2 y el péptido cíclico C9-1 polimerizado se emplearon en un esquema de inmunización en cuatro líneas de ratones (BALB/c (H-2d), CBA/J (H-2k), C57BL/6 (H-2b) y DBA/2 (H-2d)). Se incluyeron cinco ratones por grupo y se inocularon 20 µg del inmunógeno absorbidos en hidróxido de aluminio, en tres dosis espaciadas cada dos semanas. Los sueros antipéptido se evaluaron mediante ELISA contra el péptido cíclico C9-2 (Figura 35).



**Figura 35. Niveles de anticuerpos antipéptido, medidos por ELISA, obtenidos por la inmunización de diferentes líneas de ratones con el péptido cíclico (c) y péptido cíclico polimerizado (p) que contienen el lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* cepa CU385.** Las placas se recubrieron con un péptido cíclico C9-2. Los sueros se diluyeron 1/800. La línea discontinua representa el criterio de seroconversión ( $A_{492nm}$  suero inmune/ $A_{492nm}$  suero pre-inmune  $\geq 2$ ).

El péptido cíclico C9-2 fue inmunogénico en las líneas de ratón CBA y C57BL/6 y el péptido cíclico C9-1 polimerizado fue inmunogénico en las líneas de ratón CBA, C57BL/6 y DBA/2. Hay una

tendencia al aumento de los niveles de anticuerpos antipéptido obtenidos con el péptido cíclico C9-1 polimerizado, respecto al péptido cíclico C9-2, principalmente en las líneas C57BL/6 y DBA/2.

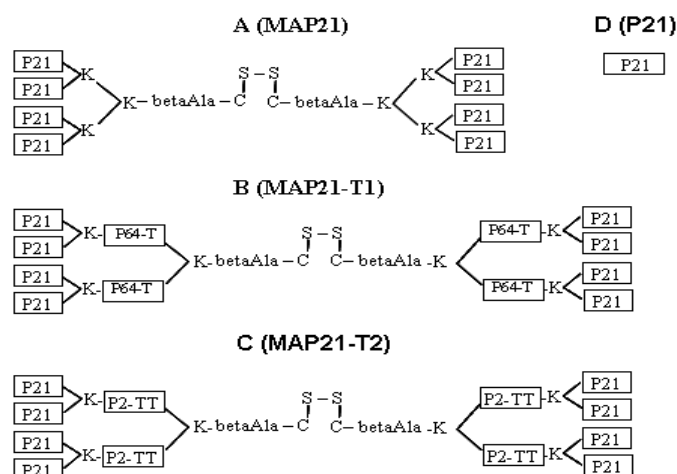
Los resultados obtenidos en la inmunización con el polímero del péptido cíclico derivado del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* demostraron que la presentación de este péptido cíclico en forma polimérica mejora la respuesta inmune respecto al péptido cíclico simple. El aumento de la inmunogenicidad del péptido polimerizado puede deberse a que al aumentar de tamaño es mejor reconocido por el sistema inmune. Por otra parte, el procesamiento del polímero por la célula presentadora de antígeno puede generar fragmentos con diferente posición relativa de los epitopos B y T, o presentar el epitopo B en diferentes conformaciones que son más cercanas a la conformación del epitopo B en la proteína natural. También se pueden generar nuevos epitopos T, que estimulan más eficientemente la producción de anticuerpos [57]. Este resultado constituye la primera investigación del empleo de un péptido cíclico polimerizado, como alternativa para aumentar la inmunogenicidad en el diseño de vacunas basadas en péptidos sintéticos. La metodología desarrollada se puede aplicar al estudio de sistemas de presentación de péptidos cíclicos derivados de otros patógenos.

#### **4.4.2. Diseño y síntesis de MAPs que contienen en su estructura un péptido derivado del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* cepa CU385**

*Cristodoulides* y *cols.* realizaron un esquema de inmunización con un MAP que contenían un péptido derivado del lazo 4 de la PorA subtipo P1.16b y un epitopo de células Th derivado del toxoide tetánico. Los sueros antipéptido reconocieron a la PorA en la superficie de la bacteria y mostraron actividad bactericida [176]. Se realizaron trabajos previos de caracterización de la respuesta de anticuerpos contra la proteína PorA subtipo (B4:P1.19,15) y sus regiones variables, en sueros de individuos vacunados con la vacuna cubana VA-MENGOC-BC®. Con el empleo de la síntesis sobre membranas de celulosa desarrollada por *Frank, R.* [170], se sintetizó un panel de 43 péptidos superpuestos en 8 aminoácidos, que cubren toda la secuencia aminoacídica de la proteína PorA. Los 12 sueros que mostraron mayores niveles de anticuerpos contra la PorA se hicieron reaccionar con los péptidos anclados sobre la membrana. El mapeo peptídico reveló que la respuesta de anticuerpos de los sueros de los vacunados con la vacuna cubana VA-MENGOC-BC® se dirigió

hacia péptidos de las regiones variables RV1 y RV2, principalmente hacia el péptido (HYTRQNNADVFPVAVVG) de la RV2 (lazo 4), el cual se denominó P21. Si se tiene en cuenta que la respuesta de anticuerpos se dirige fundamentalmente hacia esta secuencia de la proteína PorA, es posible que el péptido sintético P21 sea capaz de inducir una respuesta inmune similar a la obtenida por la proteína PorA en el contexto de la vacuna VA-MENGOC-BC®.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó la presentación del péptido P21 en forma de MAP, lo cual puede tener aplicación en el diseño de una vacuna peptídica contra MenB. Para evaluar la relevancia de la presentación multiantigénica con respecto al péptido simple, se incluyó en el estudio el péptido lineal P21. Se diseñó un MAP que tuviese el péptido P21 y dos MAPs, que tuviesen el péptido P21 y un epitopo T-auxiliador para garantizar una respuesta inmune efectiva. En la Figura 36 se muestra la representación gráfica de las estructuras diseñadas: i) MAP que contiene ocho copias del péptido P21, denominado MAP21 (Figura 36A), ii) MAP que contiene ocho copias del péptido P21 y cuatro copias de un epitopo T derivado de la proteína P64K (P64-T), denominado MAP21-T1 (Figura 36B), iii) MAP que contiene ocho copias del péptido P21 y cuatro copias de un epitopo T derivado del toxoide tetánico (P2-TT), denominado MAP21-T2 (Figura 36C) y iv) péptido lineal P21, denominado P21 (Figura 36D).



**Figura 36. Esquema gráfico de las estructuras de los péptidos derivados del lazo 4 de la proteína PorA.** A) MAP que contiene ocho copias del péptido 21 (denominado MAP21). B) MAP que contiene ocho copias del péptido 21 y cuatro copias del epitopo T (P64-T) derivado de la proteína P64K (denominado MAP21-T1). C) MAP que contiene ocho copias del péptido 21 y cuatro copias del epitopo T (P2-TT) derivado del toxoide tetánico (denominado MAP21-T2). D) Péptido lineal P21. Secuencia P21: HYTRQNNADVFPVAVVG, P64-T: IPGVAYTSPEVAWVG, P2-TT: QYIKANSKFIGITEL

En el diseño (ii) se empleó como epitopo T auxiliador la secuencia (IPGVAYTSPEVAWVG) comprendida entre los aminoácidos 470-484 de la proteína P64K [206]. En el diseño (iii) se seleccionó como epitopo T, la secuencia (QYIKANSKFIGITEL) comprendida entre los aminoácidos 830-844 del toxoide tetánico [95]. Este es un epitopo que se puede emplear en modelos murinos y no se restringe a un simple haplotipo de MHC humano.

Se agregó una Cys en el extremo C de los MAPs monoméricos para obtener el dímero en disolución y disponer del doble de epitopos por cada molécula de MAP sintetizado. La síntesis se realizó en fase sólida con el empleo de la química Fmoc/tBu y la resina MBHA. El dímero se obtuvo por formación de un enlace disulfuro intermolecular mediante la oxidación de los grupos tiol libres por el oxígeno disuelto en el agua, a pH entre 8,0 y 9,0 y a una concentración de 4 mg/mL.

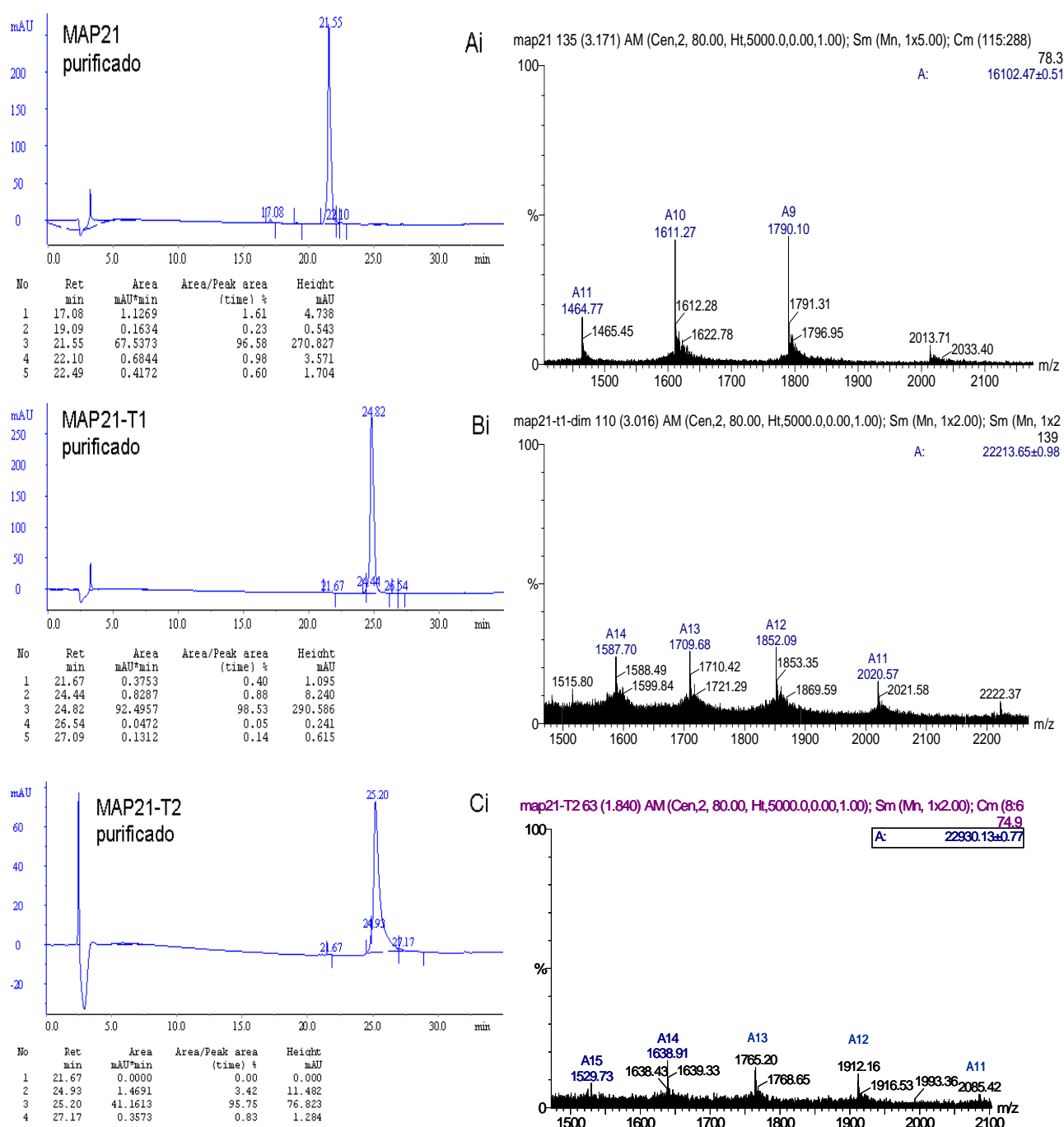
En la Tabla 8 se presentan los resultados de la caracterización por RP-HPLC y ESI-MS de las estructuras sintéticas que contienen la secuencia lineal derivada del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis*. En la Figura 37 se muestran los cromatogramas de RP-HPLC y los espectros ESI-MS del MAP21, MAP21-T1 y MAP21-T2. Los cromatogramas de RP-HPLC y los espectros ESI-MS del MAP21, MAP21-T1 y MAP21-T2 monoméricos crudos y purificados y del péptido P21 purificado se muestran en el Anexo 6.

Todos los MAPs se obtuvieron con más de 95 % de pureza y la MM experimental determinada por ESI-MS coincidió con la MM teórica para cada estructura con una diferencia en masa menor o igual a 0,8 Da.

**Tabla 8. Caracterización por RP-HPLC y ESI-MS de las estructuras sintéticas que contienen la secuencia lineal derivada del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* de la cepa cubana CU385.**

MAP	Pureza (%) (RP <sub>C18</sub> -HPLC)	Composición elemental	Identidad por ESI-MS		
			MM promedio teórica (Da)	MM promedio Experimental (Da)	MM (Teórica – experimental) (Da)×
MAP21 (monómero)	96,20	C <sub>360</sub> H <sub>549</sub> N <sub>109</sub> O <sub>101</sub> S	8052,1	8052,2	0,1
MAP21	96,58	C <sub>720</sub> H <sub>1096</sub> N <sub>218</sub> O <sub>202</sub> S <sub>2</sub>	16102,1	16102,5	0,4
MAP21-T1 (monómero)	99,54	C <sub>506</sub> H <sub>761</sub> N <sub>141</sub> O <sub>141</sub> S	11107,5	11106,7	0,8
MAP21-T1	98,53	C <sub>1012</sub> H <sub>1520</sub> N <sub>282</sub> O <sub>282</sub> S <sub>2</sub>	22213,1	22213,6	0,5
MAP21-T2 (monómero)	99,49	C <sub>520</sub> H <sub>803</sub> N <sub>147</sub> O <sub>145</sub> S	11466,1	11466,4	0,3
MAP21-T2	95,75	C <sub>1040</sub> H <sub>1604</sub> N <sub>294</sub> O <sub>290</sub> S <sub>2</sub>	22930,1	22930,1	0
P21	99,26	C <sub>87</sub> H <sub>133</sub> N <sub>27</sub> O <sub>25</sub> S	1987,97*	1987,94	0,03

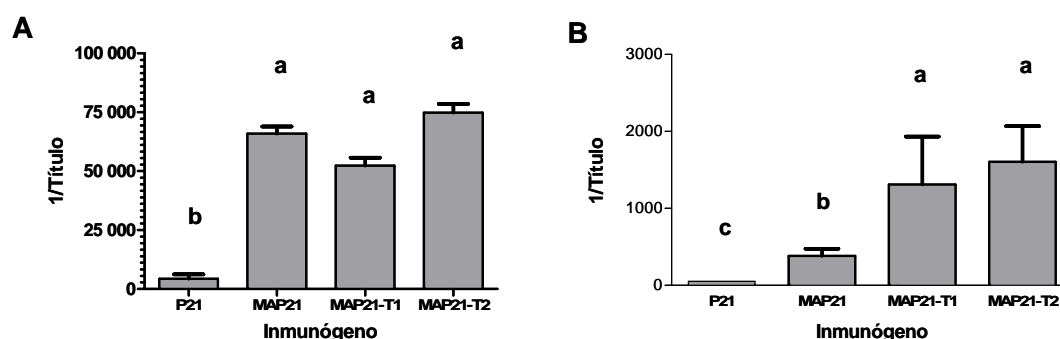
\* Se corresponde con la MM monoisotópica teórica, × valor absoluto.



**Figura 37. Cromatogramas de RP-HPLC y espectros ESI-MS de los MAPs derivados del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* de la cepa cubana CU385.** Columna RP C18 (Vydac, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m). Gradiente: 5-60 % de B en 35 min. Disolución A: 0,1 % TFA/agua, Disolución B: 0,05% de TFA/acetonitrilo. Detección a  $\lambda$ : 226 nm. MM promedio teórica del MAP21: 16102,1 Da. MM promedio teórica del MAP21-T1: 22213,1 Da. MM promedio teórica del MAP21-T2: 22930,1 Da.

### Evaluación inmunológica de los MAPs derivados del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* cepa CU385

Se realizó un esquema de inmunización con el MAP21, MAP21-T1, MAP21-T2 y el péptido P21 en ratones BALB/c (n=8). Se inocularon 50 µg del inmunógeno emulsificados en adyuvante de Freund, en tres dosis espaciadas cada dos semanas. Los sueros antipéptido se evaluaron mediante ELISA contra el péptido C9-2 conjugado a la proteína BSA (Figura 38A). También se evaluaron contra las VME de *N. meningitidis* cepa CU385 para determinar la capacidad de los sueros de reconocer la PorA (Figura 38B).



**Figura 38. Reconocimiento mediante ELISA de los sueros murinos obtenidos en la inmunización con estructuras sintéticas que contienen una secuencia derivada del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* cepa CU385.** A) Niveles de anticuerpos antipéptido, las placas se cubrieron con el conjugado del péptido C9-2 a la proteína BSA. B) Niveles de anticuerpos anti-VME. Las barras representan la media y el error en las barras la desviación estándar. Los datos transformados ( $\log_{10}$ ) se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) se indican con letras diferentes.

Como se observa en la Figura 38A, todas las estructuras sintéticas fueron capaces de producir anticuerpos antipéptido. Se obtuvo una potente respuesta antipéptido con las tres estructuras en forma de MAP (MAP21, MAP21-T1 y MAP21-T2), con títulos superiores a 1/50 000 y los niveles de anticuerpos obtenidos difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) de los obtenidos con el péptido simple P21. Estos resultados están en correspondencia con los resultados previos en la literatura, donde describen que la inmunización con MAP aumenta la inmunogenicidad respecto al péptido simple [90]. El MAP21 fue inmunogénico, aún en ausencia de un epítipo T auxiliador, lo que sugiere la presencia de epítopos B y T dentro la secuencia P21 (Figura 38A). La Figura 38B muestra que se detectaron anticuerpos que reconocen específicamente a las VME de la cepa CU385, en los grupos inmunizados con los MAP21, MAP21-T1 y MAP21-T2. Los títulos de anticuerpos contra las VME

obtenidos con las tres estructuras en forma de MAP difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ) de los obtenidos con el péptido lineal P21. Sin embargo, los mayores niveles de anticuerpos se obtuvieron con las estructuras que contienen un epitopo T auxiliador exógeno (MAP21-T1 y MAP21-T2) (Figura 38B). No se observan diferencias significativas en el nivel de respuesta de anticuerpos contra PorA en los sueros murinos obtenidos con el MAP21-T1 y MAP21-T2.

Estos resultados demostraron que se puede obtener una respuesta de anticuerpos mediante la inmunización con MAPs, que contengan la secuencia derivada del lazo 4 obtenida del mapeo peptídico de la proteína PorA con sueros de individuos vacunados con la vacuna VA-MENGOC-BC®. Además, es necesaria la inclusión en el MAP de un epitopo T auxiliador para que la respuesta de anticuerpos sea efectiva contra la proteína PorA nativa. Por otra parte, los resultados demostraron que el epitopo T auxiliador derivado de la proteína P64K estimula la producción de anticuerpos de forma similar a como lo hace el epitopo T derivado del toxoide tetánico.

En este trabajo se obtuvieron estructuras en forma de MAPs, cuyas MM superan los 8000 Da, con una pureza superior al 95 %. Además, constituyó la primera investigación del empleo de un epitopo T auxiliador derivado de la proteína P64K en el diseño de una vacuna basada en péptidos sintéticos.

La presencia de epitopos T auxiliares derivados del mismo patógeno tiene la ventaja de que puede sensibilizar al hospedero para una respuesta de células T de memoria específica contra el meningococo [64]. Por otra parte, la proteína P64K se emplea como proteína portadora que aporta los epitopos T necesarios para aumentar la inmunogenicidad de antígenos poco inmunogénicos [162]. Por lo tanto, disponer que un epitopo T auxiliador potente derivado de la P64K que se pueda incluir en una estructura completamente sintética, constituye una alternativa a la conjugación con la proteína P64K.

La presentación al sistema inmune de péptidos derivados del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* cepa CU385, en forma de péptido cíclico polimerizado o como MAP aumentó la inmunogenicidad respecto al péptido simple por lo que pudieran emplearse ambas variantes en el diseño de vacunas peptídicas contra MenB.



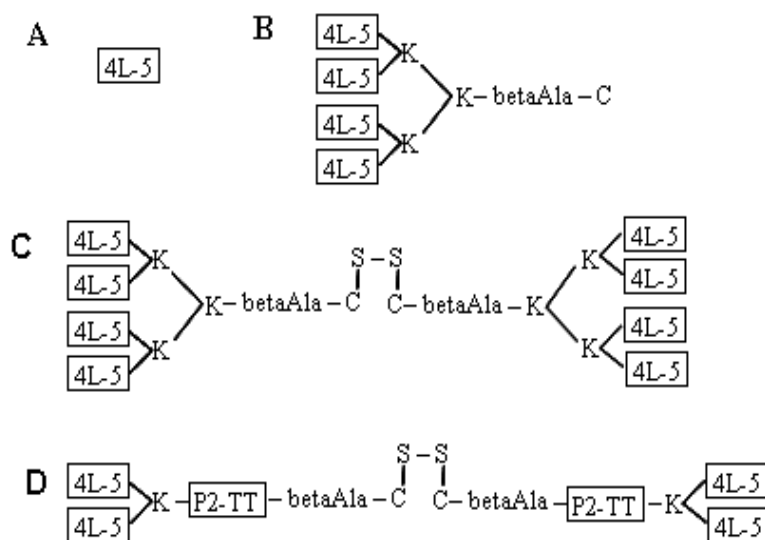
#### **4.5. Estudio de diferentes formas de presentación al sistema inmune de un péptido que mimetiza las propiedades antigénicas e inmunológicas del PSC de MenB**

El PSC de MenB presenta, además de los determinantes antigénicos de interés, otros que son reactivos contra carbohidratos presentes en el tejido neural humano [179,207]. Esto hace que sea poco inmunogénico y su empleo directo como vacuna genera inquietudes, por la posibilidad teórica de inducir patologías autoinmunes [180]. La identificación de péptidos que mimeticen un determinante antigénico específico del PSC de MenB es una de las estrategias encaminadas a la búsqueda de una vacuna que proteja contra todos los aislamientos de MenB [179]. En la división de vacunas del CIGB se identificó una secuencia peptídica (RGDKSRPPVWYVEGE) llamada 4L-5 que mimetiza un determinante exclusivo del PSC de MenB [185]. La secuencia se identificó mediante la pesquisa de una biblioteca de  $10^9$  péptidos lineales de 15 aminoácidos expuestos en fagos filamentosos, con el anticuerpo monoclonal 13D9, el cual es bactericida y protector contra MenB. Este anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante exclusivo del PSC que no presenta reactividad cruzada con células del tejido neural humano [208].

En este trabajo se estudiaron varias formas de presentación del péptido 4L-5 al sistema inmune, para el desarrollo de una vacuna universal contra MenB. La comparación de varias formas de presentación de péptidos sintéticos al sistema inmune, en el mismo esquema de inmunización, es una estrategia novedosa que se desarrolla en este trabajo y que puede tener aplicación metodológica en futuras investigaciones en el campo de las vacunas basadas en péptidos sintéticos.

La Figura 39 muestra una representación esquemática de las estructuras sintéticas diseñadas para estudiar diferentes formas de presentación del péptido 4L-5. Se diseñaron 3 estructuras: i) el péptido lineal 4L-5, denominado L/4L-5 (Figura 39A); ii) MAP que contiene cuatro copias de la secuencia 4L-5, denominado MAP<sub>4L-5</sub> (Figura 39B), el cual fue dimerizado y codificado como D/MAP<sub>4L-5</sub> (Figura 39C); iii) MAP que contiene dos copias del péptido 4L-5 y una copia de una secuencia T auxiliadora derivada del toxoide tetánico, el cual fue dimerizado y denominado como MAP<sub>4L-5</sub>-TT (Figura 39D). Como epitopo de células Th se seleccionó la secuencia (P2-TT) comprendida entre los aminoácidos 830-844 (QYIKANSKFIGITEL) del toxoide tetánico [95]. Se adicionó una Cys en el extremo C de las estructuras en forma de MAP, para formar la molécula dimérica y presentar al

sistema inmune un mayor número de copias del péptido 4L-5. En el caso del MAP<sub>4L-5</sub>, la cisteína también se emplea en la reacción selectiva de conjugación a la molécula portadora. Además, se incluyó una betaAla para distanciar del soporte sólido el núcleo de Lys sobre el cual se ramifica la secuencia, lo cual hace más eficiente la síntesis en fase sólida. Este espaciador también ayuda a separar la estructura ramificada del sitio de dimerización o conjugación, lo cual mejora la eficiencia de estas reacciones.

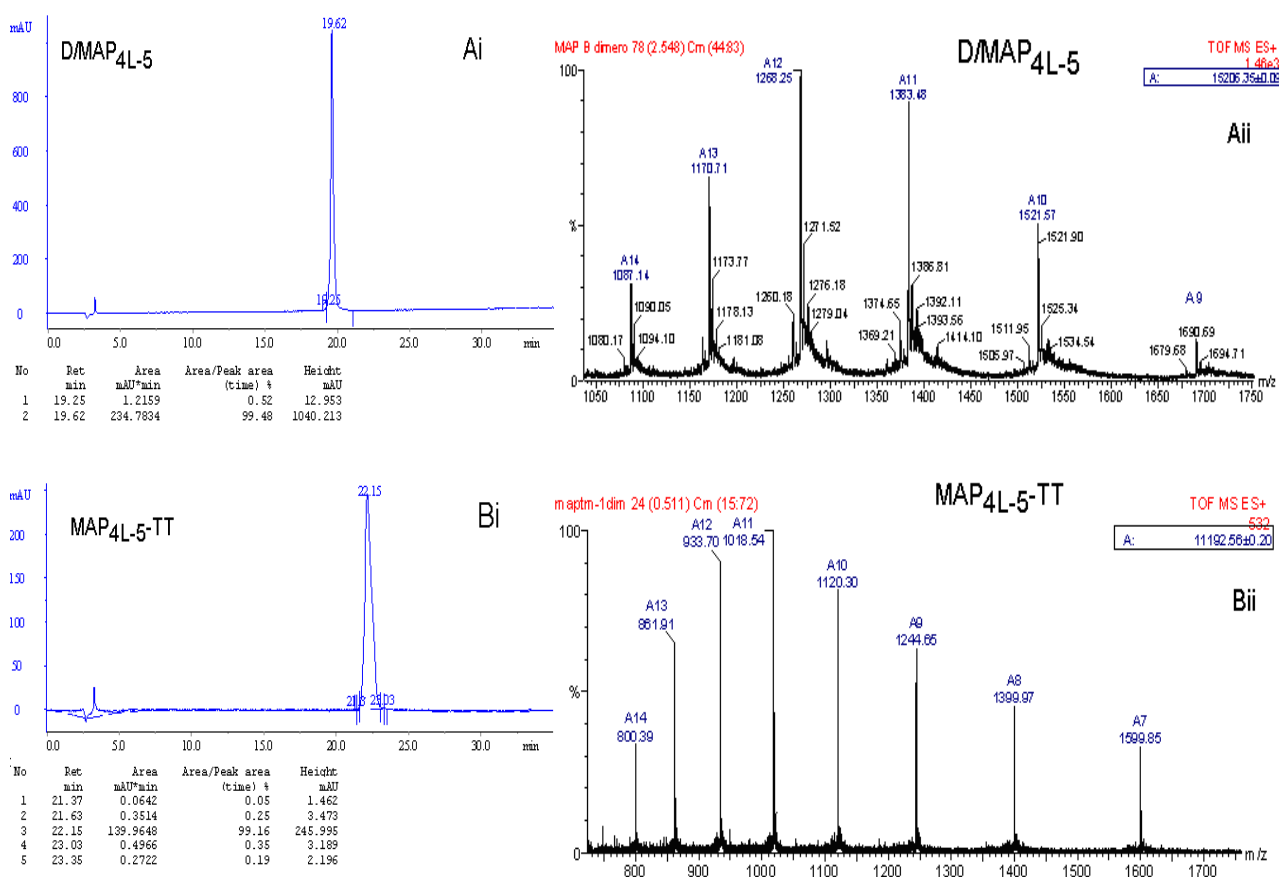


**Figura 39. Representación esquemática de las estructuras sintéticas diseñadas para estudiar diferentes formas de presentación del péptido 4L-5 mimético del PSC de MenB.** A) Péptido lineal con la secuencia 4L-5 (L/4L-5); B) MAP con cuatro copias de la secuencia 4L-5 (MAP<sub>4L-5</sub>); C) D/MAP<sub>4L-5</sub>: Dímero del MAP<sub>4L-5</sub>; D) Dímero de un MAP que contiene dos copias de la secuencia 4L-5 y una copia de la secuencia (P2-TT) estimuladora de células T del toxoide tetánico (MAP<sub>4L-5</sub>-TT). Secuencia 4L-5: RGDKSRPPVWYVEGE, P2-TT: QYIKANSKFIGITEL

El péptido 4L-5 y los MAP<sub>4L-5</sub> y MAP<sub>4L-5</sub>-TT se sintetizaron en fase sólida con el empleo de la química Boc/Bzl en la resina MBHA. Se purificaron por RP-HPLC preparativa en una columna C18.

En la Figura 40 se muestran los cromatogramas de RP-HPLC y los espectros ESI-MS del D/MAP<sub>4L-5</sub> y MAP<sub>4L-5</sub>-TT purificados. En el Anexo 7 se muestran los cromatogramas de RP-HPLC del péptido 4L-5, MAP<sub>4L-5</sub> monómero y MAP<sub>4L-5</sub>-TT monómero crudo y purificado y los espectros ESI-MS. En la Tabla 9 se resumen los resultados obtenidos en la caracterización por RP-HPLC y ESI-MS de las estructuras sintéticas que contienen la secuencia 4L-5. La dimerización de los MAPs se realizó a partir de la especie monomérica purificada por formación de un enlace disulfuro intermolecular mediante la oxidación de las Cys libres, con el oxígeno disuelto en el agua, a pH

entre 8,0 y 9,0 y una concentración de 4 mg/mL. En ambos casos (D/MAP<sub>4L-5</sub> y MAP<sub>4L-5</sub>-TT) se observó un cambio en el tiempo de retención de la especie oxidada, respecto a la reducida (Anexo 7 y Figura 40). La formación del dímero fue corroborada por MS (Figura 40).



**Figura 40. Cromatogramas de RP-HPLC y espectros ESI-MS de las estructuras sintéticas D/MAP<sub>4L-5</sub> y MAP<sub>4L-5</sub>-TT.** Columna RP C18 (Vydac, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m). Gradiente: 5-60 % de B en 35 min. Disolución A: 0,1 % de TFA/Agua, Disolución B: 0,05% de TFA/Acetonitrilo. Detección a  $\lambda$ : 226 nm. MM promedio teórica del D/MAP<sub>4L-5</sub>: 15205,1 Da. MM promedio teórica del MAP<sub>4L-5</sub>-TT: 11192,7 Da.

**Tabla 9. Caracterización por RP-HPLC y ESI-MS de las estructuras sintéticas que contienen la secuencia 4L-5 y la concentración del péptido 4L-5 en cada inmunógeno.**

Péptido	Pureza (%) (RP-HPLC)	Composición elemental	Identidad por ESI-MS			Concentración del péptido 4L-5 en el inmunógeno (mol/L)
			MM teórica (Da)	MM Experimental (Da)	MM (Teórica – experimental) (Da)×	
4L-5	96,16	C <sub>79</sub> H <sub>120</sub> N <sub>24</sub> O <sub>23</sub>	1772,90 <sup>§</sup>	1772,87 <sup>§</sup>	0,03	1,41 x 10 <sup>-4</sup>
MAP <sub>4L-5</sub>	97,88	C <sub>340</sub> H <sub>517</sub> N <sub>101</sub> O <sub>97</sub> S	7603,5 <sup>°</sup>	7603,9 <sup>°</sup>	0,4	1,32 x 10 <sup>-4</sup>
D/MAP <sub>4L-5</sub>	99,48	C <sub>680</sub> H <sub>1032</sub> N <sub>202</sub> O <sub>194</sub> S <sub>2</sub>	15205,1 <sup>°</sup>	15206,3 <sup>°</sup>	1,2	1,32 x 10 <sup>-4</sup>
MAP <sub>4L-5</sub> - TT (monómero)	95,69	C <sub>252</sub> H <sub>389</sub> N <sub>71</sub> O <sub>72</sub> S	5593,9 <sup>§</sup>	5593,9 <sup>§</sup>	0	-----
MAP <sub>4L-5</sub> - TT	99,16	C <sub>504</sub> H <sub>776</sub> N <sub>142</sub> O <sub>144</sub> S <sub>2</sub>	11192,7 <sup>°</sup>	11192,6 <sup>°</sup>	0,1	8,93 x 10 <sup>-5</sup>

----- No se calcula la concentración ya que no se emplea como inmunógeno. <sup>§</sup> MM monoisotópica, <sup>°</sup> MM promedio, × valor absoluto.

La pureza de los MAPs determinada mediante RP-HPLC fue superior al 95 % y la MM experimental determinada por ESI-MS coincidió con la MM teórica, con una diferencia en masa menor o igual a 1,2 Da. (Tabla 9, Figura 40 y Anexo 7).

Los péptidos L/4L-5, el MAP<sub>4L-5</sub> y el D/MAP<sub>4L-5</sub> se conjugaron a la proteína portadora P64K para proveerles de la ayuda de células T y evaluar otra forma de presentación al sistema inmune. Se seleccionó la proteína P64K, ya que ha demostrado que aporta los epitopos T necesarios para aumentar la inmunogenicidad de antígenos poco inmunogénicos, como péptidos y polisacáridos [162]. Además, en este caso, tiene la ventaja adicional de que al ser una proteína derivada del mismo patógeno, puede sensibilizar al hospedero para una respuesta de células T de memoria específica contra el meningococo [64]. Se empleó el método-CDI para la conjugación [192]. Teniendo en cuenta que el método de conjugación puede influir en los títulos, la afinidad y la especificidad de los anticuerpos contra el péptido [67], se conjugó el MAP<sub>4L-5</sub> con el empleo del método-MPS [192] y con el método-Succ-CDI [91].

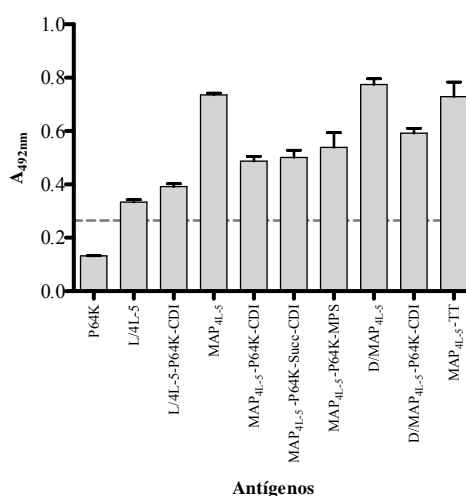
En la Tabla 10 se presentan los resultados de la relación molar péptido/proteína para cada conjugado determinada mediante AAA y la concentración molar del péptido 4L-5 en la formulación final de cada inmunógeno.

**Tabla 10. Descripción de los conjugados que contienen la secuencia peptídica 4L-5.**

Codificación del conjugado	Descripción	Relación péptido/proteína*	Concentración del péptido 4L-5 en el inmunógeno (mol/L)
L/4L-5-P64K-CDI	Péptido L/4L-5 conjugado a la proteína P64K con el empleo de CDI (método-CDI)	1,92	$7,12 \times 10^{-6}$
MAP <sub>4L-5</sub> -P64K-CDI	MAP <sub>4L-5</sub> conjugado a la proteína P64K con el empleo de CDI (método-CDI)	1,64	$2,14 \times 10^{-5}$
MAP <sub>4L-5</sub> -P64K-Succ-CDI	MAP <sub>4L-5</sub> conjugado a la proteína P64K, previamente tratada con anhídrido succínico, con el empleo de la CDI ((método-Succ-CDI)	5,12	$4,97 \times 10^{-5}$
MAP <sub>4L-5</sub> -P64K-MPS	MAP <sub>4L-5</sub> conjugado a la proteína P64K con el empleo de MPS (método-MPS)	4,58	$4,63 \times 10^{-5}$
D/MAP <sub>4L-5</sub> -P64K-CDI	D/MAP <sub>4L-5</sub> conjugado a la proteína P64K con el empleo de CDI (método-CDI)	0,99	$2,50 \times 10^{-5}$

\* Determinado por AAA.

Los péptidos libres y conjugados fueron reconocidos por el anticuerpo monoclonal 13D9 en un ensayo de tipo ELISA (Figura 41) y las señales obtenidas fueron mayores que el doble de la señal obtenida para la proteína P64K.



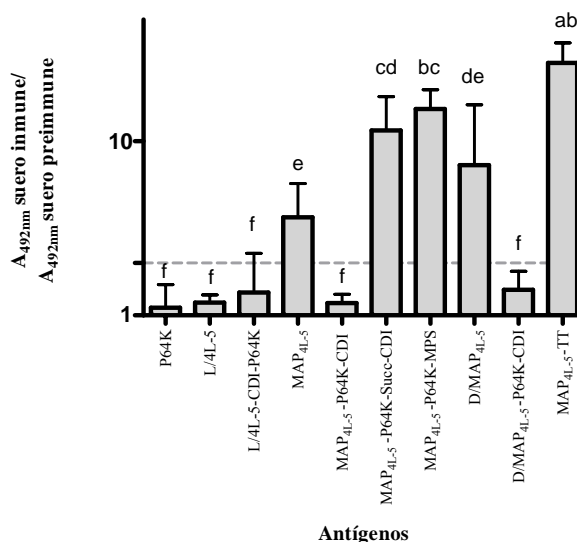
**Figura 41. ELISA de reconocimiento por el anticuerpo monoclonal 13D9 de las estructuras sintéticas que contienen la secuencia 4L-5.** Se muestra la media y la desviación estándar de la señal ( $A_{492nm}$ ) obtenida en dos réplicas de cada evaluación. La línea discontinua representa el criterio de positividad y su valor es el doble de la señal obtenida para la proteína portadora P64K asumida como control negativo.

Los resultados obtenidos mediante el AAA y el ELISA confirmaron que ocurrió el proceso de conjugación en cada caso. El ensayo de ELISA mostró además que el proceso de conjugación no afectó la unión del anticuerpo monoclonal 13D9 a la secuencia 4L-5, lo cual puede incidir favorablemente en una mejor respuesta de anticuerpos.

### **Evaluación de la respuesta inmune en varias formas de presentación de la secuencia 4L-5**

Se realizó un esquema de inmunización en ratones BALB/c ( $n=6$ ). Se inocularon 50  $\mu$ g de las estructuras descritas en las Tablas 9 y 10 adjuvadas en adyuvante de Freud, en cuatro dosis, espaciadas semanalmente. Se incluyó la proteína P64K como control negativo. La concentración molar del péptido 4L-5 en la formulación final de cada inmunógeno se muestra en las Tablas 9 y 10. Los sueros murinos obtenidos al inmunizar con MAP<sub>4L-5</sub>, D/MAP<sub>4L-5</sub>, MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-Succ-CDI, MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-MPS y MAP<sub>4L-5</sub>-TT contienen anticuerpos antipéptido (Figura 42). Los niveles de anticuerpos obtenidos en estos grupos fueron significativamente diferentes ( $p<0,01$ ) a los obtenidos con la P64K y los grupos inmunizados con las variantes L/4L-5, L/4L-5-P64K-CDI, MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-CDI y D/MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-CDI. Los niveles de anticuerpos obtenidos en los grupos L/4L-5, L/4L-5-P64K-CDI, MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-CDI y D/MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-CDI no difieren estadísticamente ( $p>0,05$ ) de los obtenidos en el grupo control inmunizado con la P64K. La inmunogenicidad de las estructuras

en orden decreciente fue: MAP<sub>4L-5</sub>-TT, MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-MPS, MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-Succ-CDI, D/MAP<sub>4L-5</sub> y MAP<sub>4L-5</sub>. La estructura MAP<sub>4L-5</sub>-TT sintética fue la que mostró mayor inmunogenicidad. Los MAP<sub>4L-5</sub> y D/MAP<sub>4L-5</sub> indujeron la producción de anticuerpos específicos antipéptido, lo cual no se logró con el péptido lineal 4L-5. Estos resultados están en correspondencia con estudios previos realizados con otros péptidos, en los que la presentación en forma de MAP aumenta los títulos de anticuerpos, respecto al péptido lineal [90].



**Figura 42. Niveles de anticuerpos antipéptido 4L-5, medidos por ELISA, obtenidos en la inmunización de ratones con las estructuras sintéticas que contienen el péptido 4L-5.** Las placas se recubrieron con el D/MAP. Los sueros se diluyeron 1/200. Las barras representan la media y el error en las barras la desviación estándar. Los datos transformados ( $\log_{10}$ ) se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) se indican con letras diferentes. La línea discontinua representa el criterio de seroconversión ( $A_{492nm}$  suero inmune/ $A_{492nm}$  suero preinmune  $\geq 2$ ).

La inmunogenicidad de la estructura en forma de MAP, en ausencia de una fuente exógena de epítopos T auxiliares, puede indicar la presencia de epítopos B y T en la secuencia 4L-5, que presentados en forma multimérica puede justificar la diferencia de inmunogenicidad respecto al péptido lineal L/4L-5. La conjugación del MAP<sub>4L-5</sub> a la proteína P64K con el empleo del método de la Succ-CDI y del MPS, mejoró la inmunogenicidad del MAP<sub>4L-5</sub> sin conjugar, lo cual se puede explicar debido a un incremento de la ayuda T por medio de la conjugación a la proteína P64K. Se ha descrito que la conjugación de un péptido lineal o en forma de MAP generalmente aumenta la inmunogenicidad respecto a la estructura sintética [92,162], como sucedió con los conjugados

MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-Succ-CDI y MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-MPS. Sin embargo, la respuesta inmune contra el péptido lineal L/4L-5 no se incrementó por la conjugación a la P64K y la conjugación de MAP<sub>4L-5</sub> y de D/MAP<sub>4L-5</sub> a la proteína P64K mediante el método de la CDI inhibió la respuesta que mostraron estas estructuras sintéticas sin conjugar.

Una característica común de los tres conjugados que no mostraron niveles de anticuerpos contra la secuencia 4L-5 (L/4L-5-P64K-CDI, MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-CDI, D/MAP<sub>4L-5</sub>-P64K-CDI), fue el empleo del método-CDI para la conjugación. Los resultados obtenidos mediante el AAA (Tabla 10) confirmaron que ocurrió el proceso de conjugación y el ensayo de ELISA (Figura 41) mostró además que el proceso de conjugación no afectó la unión del anticuerpo monoclonal 13D9 a la secuencia 4L-5. Sin embargo, estos conjugados mostraron los menores valores de relación péptido/proteína (Tabla 10). En el método-CDI, la carbodiimida primeramente activa los grupos ácidos disponibles de la proteína portadora, los que posteriormente reaccionan con los grupos amino primarios presentes en el péptido para formar el enlace amida [67]. La proteína P64K presenta suficientes grupos ácidos para una conjugación eficiente [209]. Sin embargo, con el método-CDI puede ocurrir el entrecruzamiento de la proteína después de la activación con EDC, lo cual puede comprometer algunos sitios para la conjugación del péptido. Por otra parte, como la CDI es un reactivo del tipo “cero longitud” pueden existir impedimentos estéricos en el proceso de conjugación al no introducir un espaciador entre el péptido y la proteína portadora [67]. Estos dos factores pueden ser la causa de la baja relación péptido/proteína obtenida (Tabla 10). Con el empleo del método-Succ-CDI y del método-MPS se obtuvieron los mejores valores de relación péptido/proteína (Tabla 10), debido a que en la conjugación con el método-Succ-CDI los grupos amino primarios de la proteínas se convierten en grupos ácido por tratamiento con anhídrido succínico a pH básico [67], lo que puede incrementar el número de sitios disponibles para la conjugación del péptido. Además, la succinilación introduce un espaciador en la proteína portadora que extiende el grupo reactivo fuera de la superficie de la proteína, disminuyendo el impedimento estérico en la reacción de conjugación. El empleo del reactivo heterobifuncional MPS también aporta un espaciador entre el péptido y la proteína lo que favorece la reacción de conjugación.

Las diferencias de inmunogenicidad de los conjugados encontradas en este trabajo se pueden atribuir en parte a las diferencias en la cantidad efectiva de la secuencia 4L-5 presentada al sistema inmune

debido a las diferencias en la relación péptido/proteína obtenidas para los conjugados. Es bien conocido que la dosis de antígeno administrada es uno de los elementos claves para la producción de la respuesta inmune o la inducción de tolerancia [210]. Por lo tanto, se deben investigar varias relaciones péptido-proteína y diversos métodos de conjugación para encontrar las condiciones óptimas que permitan obtener una respuesta inmune adecuada con un conjugado péptido-proteína [211,212].

En este trabajo se obtuvieron estructuras en forma de MAPs, cuyas MM superan los 5000 Da, con una pureza superior al 95 %. Los resultados de esta investigación permitieron la selección de una estructura en forma de péptido multiantigénico (MAP<sub>4L-5</sub>-TT) con posibilidad de aplicación en humanos en una vacuna universal contra el PSC de serogrupo B de *N. meningitidis*.



## 5. CONCLUSIONES

1. El alto grado de restricción conformacional en péptidos diseñados para mimetizar una zona topográfica de la región amino terminal de la familia de proteínas LBP-BPI se logra mediante la formación de dos enlaces lactama en fase sólida con el empleo de la química Fmoc/tBu y un puente disulfuro en disolución, o por la formación regioselectiva en disolución de dos enlaces disulfuro y un enlace lactama formado en fase sólida.
2. Los soportes compuestos por poliestireno y polietilenglicol que se diseñan y obtienen con el sitio de corte entre el PEG y PS permiten de manera directa la síntesis en fase sólida de péptidos modificados en el extremo carboxilo con PEG de diferentes tamaños.
3. Los péptidos F1-1PEG<sub>1500</sub> y F1-1PEG<sub>2000</sub>, peguilados en el extremo carboxilo mediante síntesis directa en fase sólida, presentan mayor capacidad de inhibir la producción de TNF $\alpha$  que el péptido no peguilado a la concentración de 75  $\mu$ g/mL.
4. La Cys presente en el péptido P8, cuya secuencia comprende la región Lys<sup>36</sup>-Leu<sup>45</sup> de la proteína IL-15, se identifica como determinante en la capacidad del péptido de bloquear la actividad biológica de la proteína IL-15 y la dimerización por formación de un enlace disulfuro mejora las propiedades antagonistas del péptido P8 y de su análogo P56, ya que incrementa la capacidad de inhibir la proliferación celular de la línea CTLL-2 dependiente de la proteína IL-15.
5. La obtención del péptido cíclico polimerizado que comprende el lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* se logra mediante la formación regioselectiva de enlaces disulfuro intra e intermoleculares. La polimerización del péptido cíclico aumenta la inmunogenicidad en ratones respecto al péptido cíclico.
6. Las estructuras diseñadas y sintetizadas en forma de MAPs que contienen un péptido lineal derivado del lazo 4 de la proteína PorA de *N. meningitidis* son más inmunogénicas en ratones que el péptido simple. El epítipo de células Th derivado de la proteína P64K estimula la respuesta de anticuerpos contra el péptido de manera similar al epítipo de células Th derivado del toxoide tetánico.

7. Las estructuras diseñadas y sintetizadas en forma de MAPs que contienen el péptido 4L-5 que mimetiza un determinante exclusivo del polisacárido capsular del serogrupo B de *N. meningitidis* son más inmunogénicas en ratones que el péptido simple. El método empleado para la conjugación del péptido 4L-5, en forma simple o multiantigénica, a la proteína P64K influye en la inmunogenicidad del conjugado. La estructura sin conjugar MAP<sub>4L-5</sub>-TT es la forma de presentación más adecuada para la búsqueda de una vacuna peptídica contra MenB.

## **6. RECOMENDACIONES**

1. Emplear una resina basada solamente en PEG, como la “Chematrix” para la síntesis del péptido Tri-1 que contiene dos enlaces lactama y un enlace disulfuro.
2. Evaluar la actividad biológica de los péptidos Tri-1 y Tri-2 mediante un ensayo de unión a LPS o por la capacidad de inhibir la producción de  $\text{TNF}\alpha$ .
3. Emplear un PEG monodisperso para la obtención de los soportes sólidos compuestos por poliestireno y polietilenglicol, para la síntesis de péptidos peguilados en el extremo C. Obtener soportes con PEG de tamaño mayor que 2000 Da.
4. Realizar ensayos de estabilidad química y metabólica de los péptidos F1-1PEG<sub>1500</sub> y F1-1PEG<sub>2000</sub> para evaluar el impacto de la peguilación en el mejoramiento de sus propiedades terapéuticas.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Lien, S. y Lowman, H. B. (2003). Therapeutic peptides. *Trends Biotechnol.* 21, 556-562.
- 2 Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J. y Khrestchatsky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov. Today* 15, 40-56.
- 3 Purcell, A. W., McCluskey, J. y Rossjohn, J. (2007). More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 404-414.
- 4 Dudek, N. L., Perlmutter, P., Aguilar, M. I., Croft, N. P. y Purcell, A. W. (2010). Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *Curr. Pharm. Des* 16, 3149-3157.
- 5 Stevenson, C. L. (2009). Advances in peptide pharmaceuticals. *Curr Pharm Biotechnol* 10, 122-137.
- 6 Ayoub, M. y Sheidegger, D. (2006). Peptide drugs, overcoming the challenges, a growing business. *Chim. Oggi / Chem. Today* 24, 46-48.
- 7 Bruckdorfer, T., Marder, O. y Albericio, F. (2004). From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. *Curr Pharm Biotechnol* 5, 29-43.
- 8 Gracia, S. R., Gaus, K. y Sewald, N. (2009). Synthesis of chemically modified bioactive peptides: recent advances, challenges and developments for medicinal chemistry. *Future. Med. Chem.* 1, 1289-1310.
- 9 Andreu, D., Albericio, F., Sole, N. A., Munson, M. C., Ferrer, M. y Barany, G. (1994). Formation of disulfide bonds in synthetic peptide and proteins. *En Peptide Synthesis Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. Capítulo 7, 91-169.
- 10 Hruby, V. J. (2002). Designing peptide receptor agonists and antagonists. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 847-858.
- 11 Andreu, D. y Nicolas, E. (2000). Disulfide Formation in Synthetic Peptide and Proteins: The State of Art. *En Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide*. Marcel Dekker, Inc, New York. Capítulo 8, 365-375.
- 12 Albericio, F., Annis, I., Royo, M. y Barany, G. (2000). Preparation and handling of Peptides containing methionine and Cysteine . *En Fmoc solid phase peptide synthesis. A Practical Approach* . Oxford University Press Inc, New York. Capítulo 4, 77-114.
- 13 Monincova, L., Slaninova, J., Fucik, V., Hovorka, O., Voburka, Z., Bednarova, L., Malon, P., Stokrova, J. y Ceroovsky, V. (2011). Lasiocepsin, a novel cyclic antimicrobial peptide from the venom of eusocial bee *Lasioglossum laticeps* (Hymenoptera: Halictidae). *Amino. Acids* 1-11.
- 14 Galanis, A. S., Albericio, F. y Grotli, M. (2009). Enhanced microwave-assisted method for on-bead disulfide bond formation: synthesis of alpha-conotoxin MII. *Biopolymers* 92, 23-34.
- 15 Galande, A. K., Weissleder, R. y Tung, C. H. (2005). An effective method of on-resin disulfide bond formation in peptides. *J. Comb. Chem.* 7, 174-177.
- 16 Taylor, J. W. (2002). The synthesis and study of side-chain lactam-bridged peptides. *Biopolymers* 66, 49-75.
- 17 Rijkers, D. T., den Hartog, J. A. y Liskamp, R. M. (2002). An optimized solid phase synthesis strategy--including on-resin lactamization--of astressin, its retro-, inverso-, and retro-inverso isomers as corticotropin releasing factor antagonists. *Biopolymers* 63, 141-149.
- 18 Murage, E. N., Gao, G., Bisello, A. y Ahn, J. M. (2010). Development of potent glucagon-like peptide-1 agonists with high enzyme stability via introduction of multiple lactam bridges. *J. Med. Chem.* 53, 6412-6420.
- 19 Miranda, L. P., Winters, K. A., Gegg, C. V., Patel, A., Aral, J., Long, J., Zhang, J., Diamond, S., Guido, M., Stanislaus, S., Ma, M., Li, H., Rose, M. J., Poppe, L. y Veniant, M. M. (2008).

- Design and synthesis of conformationally constrained glucagon-like peptide-1 derivatives with increased plasma stability and prolonged in vivo activity. *J. Med. Chem.* 51, 2758-2765.
- 20 Murage, E. N., Schroeder, J. C., Beinborn, M. y Ahn, J. M. (2008). Search for alpha-helical propensity in the receptor-bound conformation of glucagon-like peptide-1. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 10106-10112.
- 21 Bayo-Puxan, N., Fernandez, A., Tulla-Puche, J., Riego, E., Cuevas, C., Alvarez, M. y Albericio, F. (2006). Total solid-phase synthesis of the azathiocoraline class of symmetric bicyclic peptides. *Chemistry* 12, 9001-9009.
- 22 Frechet, D., Guitton, J. D., Herman, F., Faucher, D., Helynck, G., Monegier du, S. B., Ridoux, J. P., James-Surcouf, E. y Vuilhorgne, M. (1994). Solution structure of RP 71955, a new 21 amino acid tricyclic peptide active against HIV-1 virus. *Biochemistry* 33, 42-50.
- 23 Brandenburg, K., Andra, J., Garidel, P. y Gutschmann, T. (2011). Peptide-based treatment of sepsis. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 90, 799-808.
- 24 Andra, J., Gutschmann, T., Garidel, P. y Brandenburg, K. (2006). Mechanisms of endotoxin neutralization by synthetic cationic compounds. *J. Endotoxin. Res.* 12, 261-277.
- 25 Beamer, L. J., Carroll, S. F. y Eisenberg, D. (1998). The BPI/LBP family of proteins: a structural analysis of conserved regions. *Protein Sci.* 7, 906-914.
- 26 Steer, D. L., Lew, R. A., Perlmutter, P., Smith, A. I. y Aguilar, M. I. (2002). Beta-amino acids: versatile peptidomimetics. *Curr Med. Chem.* 9, 811-822.
- 27 Aguilar, M. I., Purcell, A. W., Devi, R., Lew, R., Rossjohn, J., Smith, A. I. y Perlmutter, P. (2007). Beta-amino acid-containing hybrid peptides--new opportunities in peptidomimetics. *Org Biomol. Chem.* 5, 2884-2890.
- 28 Hummel, G., Reineke, U. y Reimer, U. (2006). Translating peptides into small molecules. *Mol. Biosyst.* 2, 499-508.
- 29 Reissmann, S. y Imhof, D. (2004). Development of conformationally restricted analogues of bradykinin and somatostatin using constrained amino acids and different types of cyclization. *Curr Med. Chem.* 11, 2823-2844.
- 30 Jain, A. y Jain, S. K. (2008). PEGylation: an approach for drug delivery. A review. *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 25, 403-447.
- 31 Bailon, P. y Won, C. Y. (2009). PEG-modified biopharmaceuticals. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 6, 1-16.
- 32 Pasut, G. y Veronese, F. M. (2009). PEGylation for improving the effectiveness of therapeutic biomolecules. *Drugs Today (Barc)* 45, 687-695.
- 33 Mero, A., Clementi, C., Veronese, F. M. y Pasut, G. (2011). Covalent conjugation of poly(ethylene glycol) to proteins and peptides: strategies and methods. *Methods Mol. Biol.* 751, 95-129.
- 34 Lu, Y. A. y Felix, A. M. (1994). Pegylated peptides. II. Solid-phase synthesis of amino-, carboxy- and side-chain pegylated peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.* 43, 127-138.
- 35 Felix, A. M., Lu, Y. A. y Campbell, R. M. (1995). Pegylated peptides. IV. Enhanced biological activity of site-directed pegylated GRF analogs. *Int. J. Pept. Protein Res.* 46, 253-264.
- 36 Maeda, M., Kamada, H., Hojo, K., Yamamoto, Y., Nakagawa, S., Smith, T. J., Mayumi, T. y Kawasa, K. (2001). Amino acids and peptides. XXXVIII. Facile synthesis of laminin-related peptide-poly(ethylene glycol) hybrids by the solid phase method. *Chem. Pharm Bull. (Tokyo)* 49, 488-491.
- 37 Jolck, R. I., Berg, R. H. y Andresen, T. L. (2010). Solid-phase synthesis of PEGylated lipopeptides using click chemistry. *Bioconjugate Chem.* 21, 807-810.
- 38 Lu, Y. A. y Felix, A. M. (1993). Pegylated peptides I: Solid-phase synthesis of N alpha-pegylated peptides using Fmoc strategy. *Pept. Res.* 6, 140-146.

- 39 Zalipsky, S., Albericio, F. y Barany, G. (1986). Peptide 1985. *En* Proceeding of the Ninth American Peptide Symposium. Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois. 257-260.
- 40 Zalipsky, S., Chang, J. L., Albericio, F. y Barany, G. (1994). Preparation and applications of polyethylene glycol-polystyrene graft resin supports for solid-phase peptide synthesis. *React. Polym.* 22, 243-258.
- 41 Kates, S. A., McGuinness, B. F., Blackburn, C., Griffin, G. W., Sole, N. A., Barany, G. y Albericio, F. (1998). "High-load" polyethylene glycol-polystyrene (PEG-PS) graft supports for solid-phase synthesis. *Biopolymers* 47, 365-380.
- 42 Bayer, E., Hemmasi, B., Albert, K., Rapp, W. y Dengler, M. (1983). Peptide 1983. *En* Proceeding of the Eighth American Peptide Symposium. Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois. 87-90.
- 43 Rapp, W. (1996). PEG grafted polystyrene tentacle polymers: Physico-chemical properties and application in chemical synthesis. *En* Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries: A Handbook. Willey-VCH, Weinheim, Germany. 425-464.
- 44 Adams, J. H., Cook, R. M., Hudson, D., Jammalamadaka, V., Lyttle, M. H. y Songster, M. F. (1998). A Reinvestigation of the Preparation, Properties, and Applications of Aminomethyl and 4-Methylbenzhydramine Polystyrene Resins1. *J. Org. Chem.* 63, 3706-3716.
- 45 Kates, S. A. y Albericio, F. (2000). Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide. Marcel Dekker, Inc., New York.
- 46 Reyes, O., Vallespi, M. G., Garay, H. E., Cruz, L. J., Gonzalez, L. J., Chinae, G., Buurman, W. y Arana, M. J. (2002). Identification of single amino acid residues essential for the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein (LBP) residues 86-99 by using an Ala-scanning library. *J. Pept. Sci.* 8, 144-150.
- 47 Frokjaer, S. y Hovgaard, L. (2000). Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins. Taylor & Francis.
- 48 Hochgrafe, F., Mostertz, J., Pother, D. C., Becher, D., Helmann, J. D. y Hecker, M. (2007). S-cysteinylation is a general mechanism for thiol protection of *Bacillus subtilis* proteins after oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 282, 25981-25985.
- 49 Seward, R. J., Drouin, E. E., Steere, A. C. y Costello, C. E. (2011). Peptides presented by HLA-DR molecules in synovia of patients with rheumatoid arthritis or antibiotic-refractory Lyme arthritis. *Mol. Cell Proteomics.* 10, M110.002477-1-M110.002477-14.
- 50 England, B. P., Balasubramanian, P., Uings, I., Bethell, S., Chen, M. J., Schatz, P. J., Yin, Q., Chen, Y. F., Whitehorn, E. A., Tsavaler, A., Martens, C. L., Barrett, R. W. y McKinnon, M. (2000). A potent dimeric peptide antagonist of interleukin-5 that binds two interleukin-5 receptor alpha chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 6862-6867.
- 51 Mezo, A. R., Sridhar, V., Badger, J., Sakorafas, P. y Nienaber, V. (2010). X-ray crystal structures of monomeric and dimeric peptide inhibitors in complex with the human neonatal Fc receptor, FcRn. *J. Biol. Chem.* 285, 27694-27701.
- 52 McDonnell, K. A., Low, S. C., Hoehn, T., Donnelly, R., Palmieri, H., Fraley, C., Sakorafas, P. y Mezo, A. R. (2010). Synthesis and structure-activity relationships of dimeric peptide antagonists of the human immunoglobulin G-human neonatal Fc receptor (IgG-FcRn) interaction. *J. Med. Chem.* 53, 1587-1596.
- 53 McInnes, I. B., Leung, B. P., Sturrock, R. D., Field, M. y Liew, F. Y. (1997). Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 3, 189-195.
- 54 Agostini, C., Trentin, L., Facco, M., Sancetta, R., Cerutti, A., Tassinari, C., Cimarosto, L., Adami, F., Cipriani, A., Zambello, R. y Semenzato, G. (1996). Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol.* 157, 910-918.

- 55 Kivisakk, P., Matusevicius, D., He, B., Soderstrom, M., Fredrikson, S. y Link, H. (1998). IL-15 mRNA expression is up-regulated in blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in multiple sclerosis (MS). *Clin. Exp. Immunol.* 111, 193-197.
- 56 Santos, A., Cabrales, A., Reyes, O., Geronimo, G., Arrieta, C. y Perea, S. 2004. Interleukin-15 Antagonist Peptide. CU 2004-0198 ed. Cuba.
- 57 Borrás-Cuesta, F., Fedon, Y. y Petit-Camurdan, A. (1988). Enhancement of peptide immunogenicity by linear polymerization. *Eur. J. Immunol.* 18, 199-202.
- 58 Patarroyo, M. E., Amador, R., Clavijo, P., Moreno, A., Guzman, F., Romero, P., Tascon, R., Franco, A., Murillo, L. A. y Ponton, G. (1988). A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 332, 158-161.
- 59 Caro-Aguilar, I., Lapp, S., Pohl, J., Galinski, M. R. y Moreno, A. (2005). Chimeric epitopes delivered by polymeric synthetic linear peptides induce protective immunity to malaria. *Microbes. Infect.* 7, 1324-1337.
- 60 Alexopoulos, C., Krikorian, D., Panou-Pomonis, E., Sakarellos-Daitsiotis, M. y Sakarellos, C. (2005). Innovative, multifunctional sequential oligopeptide carriers Soc(n)-I and SOC(n)-II: functions-technology-perspectives. *Protein Pept. Lett.* 12, 601-607.
- 61 Silva-Flannery, L. M., Cabrera-Mora, M., Dickherber, M. y Moreno, A. (2009). Polymeric linear Peptide chimeric vaccine-induced antimalaria immunity is associated with enhanced in vitro antigen loading. *Infect. Immun.* 77, 1798-1806.
- 62 Tam, J. P. (1988). Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 5409-5413.
- 63 Kowalczyk, W., Monso, M., de la Torre, B. G. y Andreu, D. (2011). Synthesis of multiple antigenic peptides (MAPs)-strategies and limitations. *J. Pept. Sci.* 17, 247-251.
- 64 Sardinas, G., Gonzalez, S., Garay, H. E., Nazabal, C., Reyes, O. y Silva, R. (2000). Anti-PorA antibodies elicited by immunization with peptides conjugated to P64k. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 51-54.
- 65 Cruz, L. J., Iglesias, E., Aguilar, J. C., Quintana, D., Garay, H. E., Duarte, C. y Reyes, O. (2001). Study of different coupling agents in the conjugation of a V3-based synthetic MAP to carrier proteins. *J. Pept. Sci.* 7, 511-518.
- 66 Iglesias, E., Aguilar, J. C., Cruz, L. J. y Reyes, O. (2005). Broader cross-reactivity after conjugation of V3 based multiple antigen peptides to HBsAg. *Mol. Immunol.* 42, 99-104.
- 67 Hermanson, G. T. (2008). Bioconjugate Techniques. Academic Press, London.
- 68 Granoff, D. M. (2010). Review of meningococcal group B vaccines. *Clin. Infect. Dis.* 50 Suppl 2, S54-S65.
- 69 Sotolongo, F., Campa, C., Casanueva, V., Fajardo, E. M., Cuevas, I. E. y Gonzalez, N. (2007). Cuban Meningococcal BC Vaccine: Experiences & Contributions from 20 Years of Application. *MEDICC. Rev.* 9, 16-22.
- 70 Idanpaan-Heikkila, I., Hoiby, E. A., Chattopadhyay, P., Airaksinen, U., Michaelsen, T. M. y Wedege, E. (1995). Antibodies to meningococcal class 1 outer-membrane protein and its variable regions in patients with systemic meningococcal disease. *J. Med. Microbiol.* 43, 335-343.
- 71 Humphries, H. E., Williams, J. N., Blackstone, R., Jolley, K. A., Yuen, H. M., Christodoulides, M. y Heckels, J. E. (2006). Multivalent liposome-based vaccines containing different serosubtypes of PorA protein induce cross-protective bactericidal immune responses against *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 24, 36-44.
- 72 Latham, P. W. (1999). Therapeutic peptides revisited. *Nat. Biotechnol.* 17, 755-757.
- 73 McGregor, D. P. (2008). Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Curr Opin. Pharmacol.* 8, 616-619.

- 74 Ladner, R. C., Sato, A. K., Gorzelany, J. y de Souza M. (2004). Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov. Today* 9, 525-529.
- 75 Marx, V. (2005). Watching Peptide Drugs Grow Up. *Chem. Eng. News* 83, 17-24.
- 76 Loffet, A. (2002). Peptides as drugs: is there a market? *J. Pept. Sci.* 8, 1-7.
- 77 Henry, S., McAllister, D. V., Allen, M. G. y Prausnitz, M. R. (1998). Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery. *J. Pharm Sci.* 87, 922-925.
- 78 Kanikkannan, N. (2002). Iontophoresis-based transdermal delivery systems. *BioDrugs*. 16, 339-347.
- 79 Hirst, P. H., Pitcairn, G. R., Weers, J. G., Tarara, T. E., Clark, A. R., Dellamary, L. A., Hall, G., Shorr, J. y Newman, S. P. (2002). In vivo lung deposition of hollow porous particles from a pressurized metered dose inhaler. *Pharm Res.* 19, 258-264.
- 80 Codrons, V., Vanderbist, F., Ucar, B., Preat, V. y Vanbever, R. (2004). Impact of formulation and methods of pulmonary delivery on absorption of parathyroid hormone (1-34) from rat lungs. *J. Pharm Sci.* 93, 1241-1252.
- 81 Gordon, S. J. (2002). Development of oral insulin: progress and current status. *Diabetes Metab Res. Rev.* 18 Suppl 1, S29-S37.
- 82 Meloen, R. H., Casal, J. I., Dalsgaard, K. y Langeveld, J. P. (1995). Synthetic peptide vaccines: success at last. *Vaccine* 13, 885-886.
- 83 Olive, C., Toth, I. y Jackson, D. (2001). Technological advances in antigen delivery and synthetic peptide vaccine developmental strategies. *Mini. Rev. Med. Chem.* 1, 429-438.
- 84 BenMohamed, L., Wechsler, S. L. y Nesburn, A. B. (2002). Lipopeptide vaccines--yesterday, today, and tomorrow. *Lancet Infect. Dis.* 2, 425-431.
- 85 De, O. E., Villen, J., Giralt, E. y Andreu, D. (2003). Synthetic approaches to multivalent lipopeptide dendrimers containing cyclic disulfide epitopes of foot-and-mouth disease virus. *Bioconjug. Chem.* 14, 144-152.
- 86 Aguilar, J. C. y Rodriguez, E. G. (2007). Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 25, 3752-3762.
- 87 Chianese-Bullock, K. A., Pressley, J., Garbee, C., Hibbitts, S., Murphy, C., Yamshchikov, G., Petroni, G. R., Bissonette, E. A., Neese, P. Y., Grosh, W. W., Merrill, P., Fink, R., Woodson, E. M., Wiernasz, C. J., Patterson, J. W. y Slingluff, C. L., Jr. (2005). MAGE-A1-, MAGE-A10-, and gp100-derived peptides are immunogenic when combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and montanide ISA-51 adjuvant and administered as part of a multi-peptide vaccine for melanoma. *J. Immunol.* 174, 3080-3086.
- 88 Nagata, T., Toyota, T., Ishigaki, H., Ichihashi, T., Kajino, K., Kashima, Y., Itoh, Y., Mori, M., Oda, H., Yamamura, H., Taneichi, M., Uchida, T. y Ogasawara, K. (2007). Peptides coupled to the surface of a kind of liposome protect infection of influenza viruses. *Vaccine* 25, 4914-4921.
- 89 Tangri, S., Ishioka, G. Y., Huang, X., Sidney, J., Southwood, S., Fikes, J. y Sette, A. (2001). Structural features of peptide analogs of human histocompatibility leukocyte antigen class I epitopes that are more potent and immunogenic than wild-type peptide. *J. Exp. Med.* 194, 833-846.
- 90 Del, G. G., Tougne, C., Louis, J. A., Lambert, P. H., Bianchi, E., Bonelli, F., Chiappinelli, L. y Pessi, A. (1990). A multiple antigen peptide from the repetitive sequence of the Plasmodium malariae circumsporozoite protein induces a specific antibody response in mice of various H-2 haplotypes. *Eur. J. Immunol.* 20, 1619-1622.
- 91 Cruz, L. J., Iglesias, E., Aguilar, J. C., Cabrales, A., Reyes, O. y Andreu, D. (2004). Different immune response of mice immunized with conjugates containing multiple copies of either consensus or mixotope versions of the V3 loop peptide from human immunodeficiency virus type 1. *Bioconjug. Chem.* 15, 1110-1117.



- 92 Cruz, L. J., Cabrales, A., Iglesias, E., Aguilar, J. C., Gonzalez, L. J. y Reyes, O. (2009). Enhanced immunogenicity and cross-reactivity of HIV-1 V3-peptide and multiple antigen peptides conjugated to distinct carrier proteins. *Int. Immunopharmacol.* 9, 1452-1459.
- 93 Tam, J. P., Clavijo, P., Lu, Y. A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R. y Zavala, F. (1990). Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. *J. Exp. Med.* 171, 299-306.
- 94 Tam, J. P. y Lu, Y. A. (1989). Vaccine engineering: enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T- and B-cell epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 9084-9088.
- 95 Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G. y Lanzavecchia, A. (1989). Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur. J. Immunol.* 19, 2237-2242.
- 96 Valmori, D., Pessi, A., Bianchi, E. y Corradin, G. (1992). Use of human universally antigenic tetanus toxin T cell epitopes as carriers for human vaccination. *J. Immunol.* 149, 717-721.
- 97 Amblard, M., Fehrentz, J. A., Martinez, J. y Subra, G. (2006). Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis. *Mol. Biotechnol* 33, 239-254.
- 98 Merrifield, B. (1986). Solid phase synthesis. *Science* 232, 341-347.
- 99 Okada, Y. (2001). Synthesis of Peptides by Solution Methods. *Curr. Org. Chem.* 5, 1-43.
- 100 Yagodkin, A., Weisel, J. y Azhayeve, A. (2011). Versatile solid supports for oligonucleotide synthesis that incorporate urea bridge. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 30, 475-489.
- 101 Kanemitsu, T. y Kanie, O. (2002). Recent developments in oligosaccharide synthesis: tactics, solid-phase synthesis and library synthesis. *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* 5, 339-360.
- 102 Weishaupt, M., Eller, S. y Seeberger, P. H. (2010). Solid phase synthesis of oligosaccharides. *Methods Enzymol.* 478, 463-484.
- 103 Liu, R., Enstrom, A. M. y Lam, K. S. (2003). Combinatorial peptide library methods for immunobiology research. *Exp. Hematol.* 31, 11-30.
- 104 Shin, D. S., Kim, D. H., Chung, W. J. y Lee, Y. S. (2005). Combinatorial solid phase peptide synthesis and bioassays. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 517-525.
- 105 Lloyd-Williams P, Albericio F y Giralt E (1997). Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins.
- 106 Barany, G. y Yokum, T. S. (2000). Strategy in Solid-Phase Peptide. *En Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide.* Marcel Dekker, Inc., New York. 79-102.
- 107 Merrifield, B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154.
- 108 Atherton, E., Fox, H., Harkiss, D., Logan, C. J., Sheppard, R. C. y Williams, B. J. (1978). A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylaminoacids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 537-539.
- 109 Fields, G. B. y Noble, R. L. (1990). Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 35, 161-214.
- 110 Pennington, M. W. (1994). HF Cleavage and Deprotection Procedures for Peptide Synthesized Using a Boc/Bzl Strategy. *En Peptide Synthesis Protocols.* Humana Press, Totowa, NJ. Capítulo 4, 41-62.
- 111 Fields, G. B., Tian, Z. y Barany, G. (1992). Principles and practice of solid phase peptide synthesis. *En Synthetic peptides: A User's Guide.* H.F. Freeman, New York. 77-183.
- 112 Jensen, K. J., Alsina, J., Songster, M. F. V. J., Albericio, F. y Barany, G. (1998). Backbone Amide Linker (BAL) Strategy for Solid-Phase Synthesis of C-Terminal-Modified and Cyclic Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 5441-5452.

- 113 Dick, F. (1994). Acid Cleavage/Deprotection in Fmoc/tBu Solid Phase Synthesis. *En Peptide Synthesis Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. Capítulo 5, 63-72.
- 114 Forns, P. y Fields, G. B. (2000). The Solid Support. *En Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide*. 1 ed. Marcel Dekker, Inc, New York. Capítulo 1, 1-77.
- 115 Meldal, M. (1997). Methods in Enzymology, Solid Phase-Peptide Synthesis. Academic Press, Orlando, Florida. Capítulo 289, 83-104.
- 116 Arshady, R., Atherton, E., Clive, D. L. J. y Sheppard, R. C. (1981). Peptide synthesis. Part 1. Preparation and use of polar supports based on poly(dimethylacrylamide). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 529-537.
- 117 Meldal, M. (1992). Pega: a flow stable polyethylene glycol dimethyl acrylamide copolymer for solid phase synthesis. *Tetrahedron Lett.* 33, 3077-3080.
- 118 Renil, M. y Meldal, M. (1996). POEPOP and POEPS: Inert polyethylene glycol crosslinked polymeric supports for solid synthesis. *Tetrahedron Lett.* 37, 6185-6188.
- 119 Rademann, J., Gloti, M., Meldal, M. y Bock, K. (1999). SPOCC: A Resin for Solid-Phase Organic Chemistry and Enzymatic Reactions on Solid Phase. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 5459-5466.
- 120 Garcia-Ramos, Y., Paradis-Bas, M., Tulla-Puche, J. y Albericio, F. (2010). ChemMatrix((R)) for complex peptides and combinatorial chemistry. *J. Pept. Sci.* 16, 675-678.
- 121 de la Torre, B. G., Jakab, A. y Andreu, D. (2007). Polyethyleneglycol-Based Resins as Solid Supports for the Synthesis of Difficult or Long Peptides. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 13, 265-270.
- 122 Fields, G. B. (1997). Methods in Enzymology, Solid Phase-Peptide Synthesis. Academic Press, Orlando, Florida.
- 123 Albericio, F. y Kates, A. S. (2000). Coupling Methods: Solid-Phase Formation of Amide and Ester Bonds. *En Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide*. 01 ed. Marcel Dekker, Inc, New York. Capítulo 6, 275-330.
- 124 Subiros-Funosas, R., Prohens, R., Barbas, R., El-Faham, A. y Albericio, F. (2009). Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chemistry* 15, 9394-9403.
- 125 El-Faham, A. y Albericio, F. (2011). Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* 111, 6557-6602.
- 126 Castro, B., Dormoy, J. R., Evin, G. y Selve, C. (1975). Reactifs de couplage peptidique I (1) - l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylamino phosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Lett.* 16, 1219-1222.
- 127 Coste, J., Le-Nguyen, D. y Castro, B. (1990). PyBOP: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Letters* 31, 205-208.
- 128 Carpino, L. A., El-Faham, A., Minor, C. A. y Albericio, F. (1994). Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 201-203.
- 129 Albericio, F., Cases, M., Alsina, J., Triolo, S. A., Carpino, L. A. y Kates, S. A. (1997). On the use of PyAOP, a phosphonium salt derived from HOAt, in solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 38, 4853-4856.
- 130 Albericio, F., Bofill, J. M., El-Faham, A. y Kates, S. A. (1998). Use of Onium Salt-Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis. *J. Org. Chem.* 63, 9678-9683.
- 131 Subiros-Funosas, R., El-Faham, A. y Albericio, F. (2010). PyOxP and PyOxB: the Oxyma-based novel family of phosphonium salts. *Org. Biomol. Chem.* 8, 3665-3673.
- 132 El-Faham, A., Subiros, F. R., Prohens, R. y Albericio, F. (2009). COMU: a safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents. *Chem. Eur. J* 15, 9404-9416.

- 133 El-Faham, A. y Albericio, F. (2010). COMU: a third generation of uronium-type coupling reagents. *J. Pept. Sci.* 16, 6-9.
- 134 Story, S. C. y Aldrich, J. V. (1994). Side-product formation during cyclization with HBTU on a solid support. *Int. J. Pept. Protein Res.* 43, 292.
- 135 Robinson, A. J., van Lierop, B. J., Garland, R. D., Teoh, E., Elaridi, J., Illesinghe, J. P. y Jackson, W. R. (2009). Regioselective formation of interlocked dicarba bridges in naturally occurring cyclic peptide toxins using olefin metathesis. *Chem. Commun.* 4293-4295.
- 136 Pattabiraman, V. R., Stymiest, J. L., Derksen, D. J., Martin, N. I. y Vederas, J. C. (2007). Multiple on-resin olefin metathesis to form ring-expanded analogues of the lantibiotic peptide, lactacin 3147 A2. *Org Lett.* 9, 699-702.
- 137 Rovero, P. (2000). Homodetic Cyclic Peptide. *En Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide.* Marcel Dekker, Inc, New York. Capítulo 7, 331-364.
- 138 Bathgate, R. A., Lin, F., Hanson, N. F., Otvos, L., Jr., Guidolin, A., Giannakis, C., Bastiras, S., Layfield, S. L., Ferraro, T., Ma, S., Zhao, C., Gundlach, A. L., Samuel, C. S., Tregear, G. W. y Wade, J. D. (2006). Relaxin-3: improved synthesis strategy and demonstration of its high-affinity interaction with the relaxin receptor LGR7 both in vitro and in vivo. *Biochemistry* 45, 1043-1053.
- 139 Hossain, M. A., Lin, F., Zhang, S., Tregear, G. W. y Wade, J. D. (2006). Regioselective Disulfide Solid Phase Synthesis, Chemical Characterization and In Vitro Receptor Binding Activity of Equine Relaxin. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 12, 211-215.
- 140 Hossain, M. A., Belgi, A., Lin, F., Zhang, S., Shabanpoor, F., Chan, L., Belyea, C., Truong, H. T., Blair, A. R., Andrikopoulos, S., Tregear, G. W. y Wade, J. D. (2009). Use of a temporary "solubilizing" peptide tag for the Fmoc solid-phase synthesis of human insulin glargine via use of regioselective disulfide bond formation. *Bioconjug. Chem.* 20, 1390-1396.
- 141 Tang, J. G., Wang, Z. H., Tregear, G. W. y Wade, J. D. (2003). Human gene 2 relaxin chain combination and folding. *Biochemistry* 42, 2731-2739.
- 142 Gongora-Benitez, M., Tulla-Puche, J., Paradis-Bas, M., Werbitzky, O., Giraud, M. y Albericio, F. (2011). Optimized Fmoc solid-phase synthesis of the cysteine-rich peptide linacotide. *Biopolymers* 96, 69-80.
- 143 Moroder, L., Besse, D., Musiol, H. J., Rudolph-Bohner, S. y Siedler, F. (1996). Oxidative folding of cystine-rich peptides vs regioselective cysteine pairing strategies. *Biopolymers* 40, 207-234.
- 144 Moroder, L., Musiol, H. J., Gotz, M. y Renner, C. (2005). Synthesis of single- and multiple-stranded cystine-rich peptides. *Biopolymers* 80, 85-97.
- 145 Ellman, G. L. (1958). A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 443-450.
- 146 Aguilar, M. I. y Hearn, M. T. (1996). High-resolution reversed-phase high-performance liquid chromatography of peptides and proteins. *Methods Enzymol.* 270, 3-26.
- 147 Ambulos, N. P., Bibbs, L., Bonewald, L. F., Kates, A. S., Khatri, A. y Weintraub, S. T. (2000). Analysis of Synthetic Peptide. *En Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide.* 01 ed. Marcel Dekker, Inc, New York. Capítulo 19, 751-789.
- 148 Felix, A. M., Heimer, E. P., Wang, C. T., Lambros, T. J., Fournier, A., Mowles, T. F., Maines, S., Campbell, R. M., Wegrzynski, B. B. y Toome, V. (1988). Synthesis, biological activity and conformational analysis of cyclic GRF analogs. *Int. J. Pept. Protein Res.* 32, 441-454.
- 149 Kates, S. A., Sole, N. A., Johnston, C. R., Hudson, D., Barany, G. y Albericio, F. (1993). A novel, convenient, three-dimensional orthogonal strategy for solid-phase synthesis of cyclic peptides. *Tetrahedron Lett.* 34, 1549-1552.
- 150 Campbell, R. M., Bongers, J. y Felix, A. M. (1995). Rational design, synthesis, and biological evaluation of novel growth hormone releasing factor analogues. *Biopolymers* 37, 67-88.

- 151 Veronese, F. M. y Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov. Today* 10, 1451-1458.
- 152 Berna, M., Dalzoppo, D., Pasut, G., Manunta, M., Izzo, L., Jones, A. T., Duncan, R. y Veronese, F. M. (2006). Novel monodisperse PEG-dendrons as new tools for targeted drug delivery: synthesis, characterization and cellular uptake. *Biomacromolecules*. 7, 146-153.
- 153 Niculescu-Duvaz, D., Getaz, J. y Springer, C. J. (2008). Long functionalized poly(ethylene glycol)s of defined molecular weight: synthesis and application in solid-phase synthesis of conjugates. *Bioconjug. Chem.* 19, 973-981.
- 154 Roberts, M. J., Bentley, M. D. y Harris, J. M. (2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 459-476.
- 155 Zalipsky, S. (1995). Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates. *Bioconjug. Chem.* 6, 150-165.
- 156 Morpurgo, M. y Veronese, F. M. (2004). Conjugates of peptides and proteins to polyethylene glycols. *Methods Mol. Biol.* 283, 45-70.
- 157 Hellermann, H., Heinz-Werner, L., Jürgen, M., Rajasekharan, P. V. N. y Mutter, M. (1983). Poly(ethylene glycol)s grafted onto crosslinked polystyrenes. Multidetachably anchored polymer systems for the synthesis of solubilized peptides. *Die Makromol. Chem.* 184, 2603-2617.
- 158 Tam, J. P. (1995). Synthesis and Applications of Branched Peptides in Immunological Methods and Vaccine. *En PEPTIDES. Synthesis, Structures and Applications*. 01 ed. Academic Press, Inc., San Diego, California. Capítulo 12, 455-500.
- 159 Liu, C. F. y Tam, J. P. (1994). Peptide segment ligation strategy without use of protecting groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6584-6588.
- 160 Pini, A., Falciani, C. y Bracci, L. (2008). Branched peptides as therapeutics. *Curr Protein Pept. Sci.* 9, 468-477.
- 161 Tam, J. P. y Spetzler, J. C. (1997). Multiple antigen peptide system. *Methods Enzymol.* 289, 612-637.
- 162 Gonzalez, S., Alvarez, A., Caballero, E., Vina, L., Guillen, G. y Silva, R. (2000). P64k meningococcal protein as immunological carrier for weak immunogens. *Scand. J. Immunol.* 52, 113-116.
- 163 Adamczyk, M., Gebler, J. C. y Mattingly, P. G. (1996). Characterization of Protein-Hapten Conjugates. 2. Electrospray Mass Spectrometry of Bovine Serum Albumin-Hapten Conjugates. *Bioconjugate Chem.* 7, 475-481.
- 164 McMurray, J. S. (2000). The Purification of Synthetic Peptide. *En Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide*. 01 ed. Capítulo 18, 735-749.
- 165 Arana, M. J., Vallespi, M. G., China, G., Vallespi, G. V., Rodriguez-Alonso, I., Garay, H. E., Buurman, W. A. y Reyes, O. (2003). Inhibition of LPS-responses by synthetic peptides derived from LBP associates with the ability of the peptides to block LBP-LPS interaction. *J. Endotoxin. Res.* 9, 281-291.
- 166 Gutschmann, T., Razquin-Olazarán, I., Kowalski, I., Kaonis, Y., Howe, J., Bartels, R., Hornef, M., Schurholz, T., Rossle, M., Sanchez-Gomez, S., Moriyon, I., Martinez de, T. G. y Brandenburg, K. (2010). New antiseptic peptides to protect against endotoxin-mediated shock. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3817-3824.
- 167 Arana, M. J., Santiago-Vispo, N. F., China, G., Torres, B., Pons, T., Vallespi, G. V., Callejo, M., Garay, H. y Reyes, O. (1995). Molecules modulating immune- inflammatory responses, design and development of potential therapeutics. *Biotec. Aplic.* 12, 101-102.
- 168 Niederbichler, A. D., Hoesel, L. M., Ipaktchi, K., Olivarez, L., Erdmann, M., Vogt, P. M., Su, G. L., Arbabi, S., Westfall, M. V., Wang, S. C. y Hemmila, M. R. (2011). Burn-induced heart

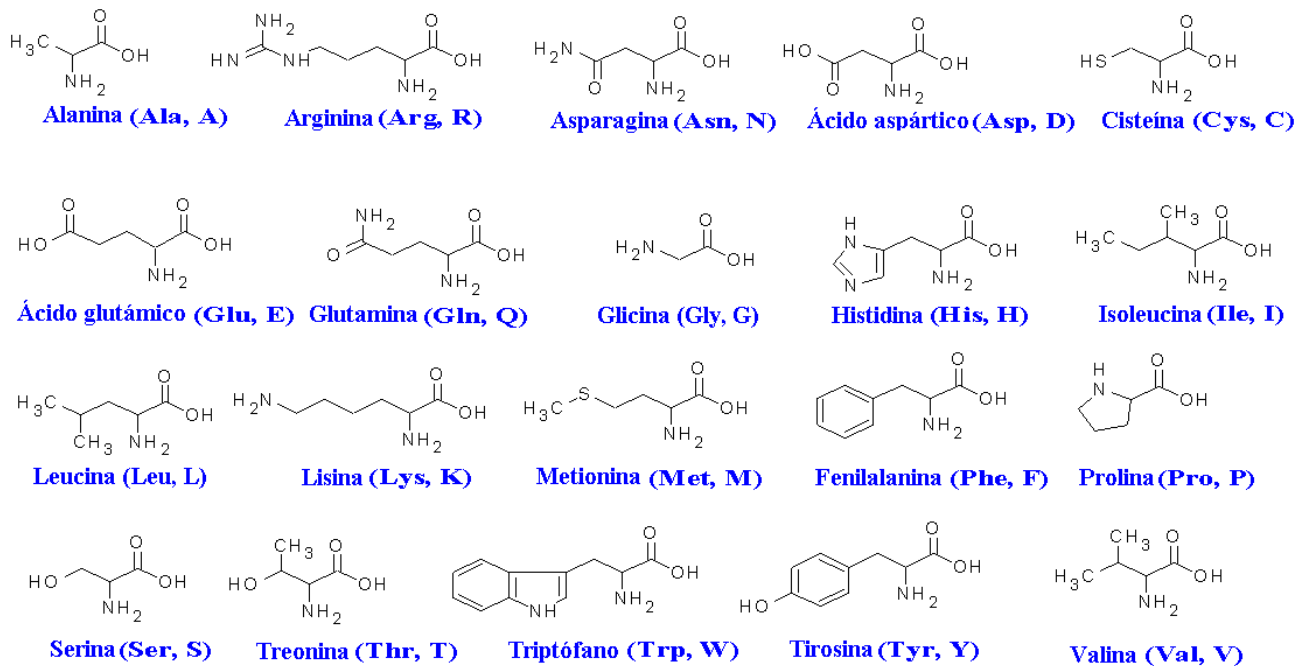
- failure: lipopolysaccharide binding protein improves burn and endotoxin-induced cardiac contractility deficits. *J. Surg. Res.* 165, 128-135.
- 169 Su, G. L., Hoesel, L. M., Bayliss, J., Hemmila, M. R. y Wang, S. C. (2010). Lipopolysaccharide binding protein inhibitory peptide protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 299, G1319-G1325.
  - 170 Frank, R. (2002). The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J. Immunol. Methods* 267, 13-26.
  - 171 Pollard, A. J. (2004). Global epidemiology of meningococcal disease and vaccine efficacy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23, S274-S279.
  - 172 Broker, M. y Fantoni, S. (2007). Meningococcal disease: a review on available vaccines and vaccines in development. *Minerva Med.* 98, 575-589.
  - 173 Holst, J., Martin, D., Arnold, R., Huergo, C. C., Oster, P., O'Hallahan, J. y Rosenqvist, E. (2009). Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 27 Suppl 2, B3-12.
  - 174 van der Ley, P., Heckels, J. E., Virji, M., Hoogerhout, P. y Poolman, J. T. (1991). Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp. *Infect. Immun.* 59, 2963-2971.
  - 175 McGuinness, B., Barlow, A. K., Clarke, I. N., Farley, J. E., Anilionis, A., Poolman, J. T. y Heckels, J. E. (1990). Deduced amino acid sequences of class 1 protein (PorA) from three strains of *Neisseria meningitidis*. Synthetic peptides define the epitopes responsible for serosubtype specificity. *J. Exp. Med.* 171, 1871-1882.
  - 176 Christodoulides, M. y Heckels, J. E. (1994). Immunization with a multiple antigen peptide containing defined B- and T-cell epitopes: production of bactericidal antibodies against group B *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* 140 ( Pt 11), 2951-2960.
  - 177 Hoogerhout, P., Donders, E. M., van Gaans-van den Brink JA, Kuipers, B., Brugghe, H. F., van Unen, L. M., Timmermans, H. A., ten Hove, G. J., de Jong, A. P. y Peeters, C. C. (1995). Conjugates of synthetic cyclic peptides elicit bactericidal antibodies against a conformational epitope on a class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 63, 3473-3478.
  - 178 Menendez, T., De, H., I, Delgado, M., Garay, H., Martin, A. y Vispo, N. S. (2001). Immunisation with phage-displayed variable region 2 from meningococcal PorA outer membrane protein induces bactericidal antibodies against *Neisseria meningitidis*. *Immunol. Lett.* 78, 143-148.
  - 179 Granoff, D. M., Bartoloni, A., Ricci, S., Gallo, E., Rosa, D., Ravenscroft, N., Guarnieri, V., Seid, R. C., Shan, A., Usinger, W. R., Tan, S., McHugh, Y. E. y Moe, G. R. (1998). Bactericidal monoclonal antibodies that define unique meningococcal B polysaccharide epitopes that do not cross-react with human polysialic acid. *J. Immunol.* 160, 5028-5036.
  - 180 Khatami, A. y Pollard, A. J. (2010). The epidemiology of meningococcal disease and the impact of vaccines. *Expert. Rev. Vaccines.* 9, 285-298.
  - 181 Moe, G. R., Tan, S. y Granoff, D. M. (1999). Molecular mimetics of polysaccharide epitopes as vaccine candidates for prevention of *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26, 209-226.
  - 182 Moe, G. R. y Granoff, D. M. (2001). Molecular mimetics of *Neisseria meningitidis* serogroup B polysaccharide. *Int Rev. Immunol.* 20, 201-220.
  - 183 Shin, J. S., Lin, J. S., Anderson, P. W., Insel, R. A. y Nahm, M. H. (2001). Monoclonal antibodies specific for *Neisseria meningitidis* group B polysaccharide and their peptide mimotopes. *Infect. Immun.* 69, 3335-3342.
  - 184 Park, I., Choi, I. H., Kim, S. J. y Shin, J. S. (2004). Peptide mimotopes of *Neisseria meningitidis* group B capsular polysaccharide. *Yonsei Med. J.* 45, 755-758.

- 185 Menendez, T., Santiago-Vispo, N. F., Cruz-Leal, Y., Coizeau, E., Garay, H., Reyes, O., Batista, Y., Cobas, K., Carmenate, T., Chinae, G. y Guillen, G. (2011). Identification and characterization of phage-displayed peptide mimetics of *Neisseria meningitidis* serogroup B capsular polysaccharide. *Int J. Med. Microbiol.* 301, 16-25.
- 186 Kaiser, E., Collescott, R. L., Bossinger, C. D. y Cook, P. I. (1970). Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* 34, 595-598.
- 187 Christensen, T. (1979). A Qualitative Test for Monitoring Coupling Completeness in Solid Phase Peptide Synthesis Using Chloranil. *Acta Chem. Scand.* 33B, 763-766.
- 188 Attardi, M. E., Porcu, G. y Taddei, M. (2000). Malachite green, a valuable reagent to monitor the presence of free COOH on the solid-phase. *Tetrahedron Lett.* 41, 7391-7394.
- 189 Vriend, G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 8, 52-6, 29.
- 190 Wang, J., Cieplak, P. y Kollman, P. A. (2000). How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* 21, 1049-1074.
- 191 Schagger, H. y von, J. G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- 192 Carter, M. J. (1994). Techniques for conjugation of synthetic peptides to carrier molecules. *En Peptide analysis protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ. Capítulo 10, 155-191.
- 193 Gonzalez, L. J., Besada, V., Garay, H., Reyes, O., Padron, G., Tambara, Y. y Shimonishi, Y. (1996). Effect of the position of a basic amino acid on C-terminal rearrangement of protonated peptides upon collision-induced dissociation. *J. Mass. Spec.* 31, 150-158.
- 194 Allen, G. (1989). Amino Acid Analysis. *En Sequencing of Proteins and Peptides*. Elsevier, Amsterdam. 35-55.
- 195 Warren, H. S., Amato, S. F., Fitting, C., Black, K. M., Loiselle, P. M., Pasternack, M. S. y Cavaillon, J. M. (1993). Assessment of ability of murine and human anti-lipid A monoclonal antibodies to bind and neutralize lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177, 89-97.
- 196 Dentener, M. A., Bazil, V., Von Asmuth, E. J., Ceska, M. y Buurman, W. A. (1993). Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol.* 150, 2885-2891.
- 197 Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- 198 Garay, H. E., González, L. J., Cruz, L. J., Estrada, R. C. y Reyes, O. (1997). Cleavage of dinitrophenyl side chain protecting group of histidine under Fmoc- deprotection conditions during the synthesis of the peptide GLY-HIS-ALA-LEU-GLY. *Biotec. Aplic.* 14, 193-195.
- 199 Grieco, P., Gitu, P. M. y Hruby, V. J. (2001). Preparation of 'side-chain-to-side-chain' cyclic peptides by Allyl and Alloc strategy: potential for library synthesis. *J. Pept. Res.* 57, 250-256.
- 200 Gomez-Martinez, P., Guibé, F. y Albericio, F. (2000). Allylic protection of thiols and cysteine. III. Use of Fmoc-Cys(Fsam)-OH for solid-phase peptide synthesis. *Lett. Pept. Sci.* 7, 187-194.
- 201 Veronese, F. M. (2009). PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications. Birkhäuser, Basel - Boston - Berlin.
- 202 Youn, Y. S., Kwon, M. J., Na, D. H., Chae, S. Y., Lee, S. y Lee, K. C. (2008). Improved intrapulmonary delivery of site-specific PEGylated salmon calcitonin: optimization by PEG size selection. *J. Control Release* 125, 68-75.
- 203 Tam, J. P. (1989). Multiple antigenic peptide system: A novel design for synthetic peptide vaccines and immunoassay. *En Synthetic Peptides: Approaches to Biological Problems*. Alan R. Liss, Inc., New York. 3-18.

- 
- 204 Harris, J. M. y Chess, R. B. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 214-221.
- 205 Raffa, R. B. (2002). Harmonic mean relationship between affinity for wild-type receptors and alanine-scan mutants. *J. Theor. Biol.* 218, 207-214.
- 206 Gonzalez, S., Nazabal, C., Rao, K. V., Reyes, O., Garay, H. E., Caballero, E., Alvarez-Obregon, J. C., Sardinas, G. y Silva, R. (2004). Cell mediated immune response elicited in mice after immunization with the P64k meningococcal protein: epitope mapping. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 42, 233-239.
- 207 Jennings, H. J., Gamian, A. y Ashton, F. E. (1987). N-propionylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique epitope on group B *Neisseria meningitidis*. *J. Exp. Med.* 165, 1207-1211.
- 208 Pon, R. A., Lussier, M., Yang, Q. L. y Jennings, H. J. (1997). N-Propionylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique bactericidal capsular epitope in group B *Neisseria meningitidis*. *J. Exp. Med.* 185, 1929-1938.
- 209 Guillen, G., Alvarez, A., Silva, R., Morera, V., Gonzalez, S., Musacchio, A., Besada, V., Coizeau, E., Caballero, E., Nazabal, C., Carmenate, T., Gonzalez, L. J., Estrada, R., Tambara, Y., Padron, G., Herrera, L., Eynon, E. E. y Parker, D. C. (1998). Expression in *Escherichia coli* of the *lpdA* gene, protein sequence analysis and immunological characterization of the P64k protein from *Neisseria meningitidis*. *Biotechnol Appl. Biochem.* 27 ( Pt 3), 189-196.
- 210 Eynon, E. E. y Parker, D. C. (1992). Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. *J. Exp. Med.* 175, 131-138.
- 211 Aoki, T., Iskandar, S., Yoshida, T., Takahashi, K. y Hattori, M. (2006). Reduced immunogenicity of beta-lactoglobulin by conjugating with chitosan. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 70, 2349-2356.
- 212 Pedersen, M. K., Sorensen, N. S., Heegaard, P. M., Beyer, N. H. y Bruun, L. (2006). Effect of different hapten-carrier conjugation ratios and molecular orientations on antibody affinity against a peptide antigen. *J. Immunol. Methods* 311, 198-206.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Estructura de los aminoácidos proteogénicos. Códigos de una letra y de tres letras.

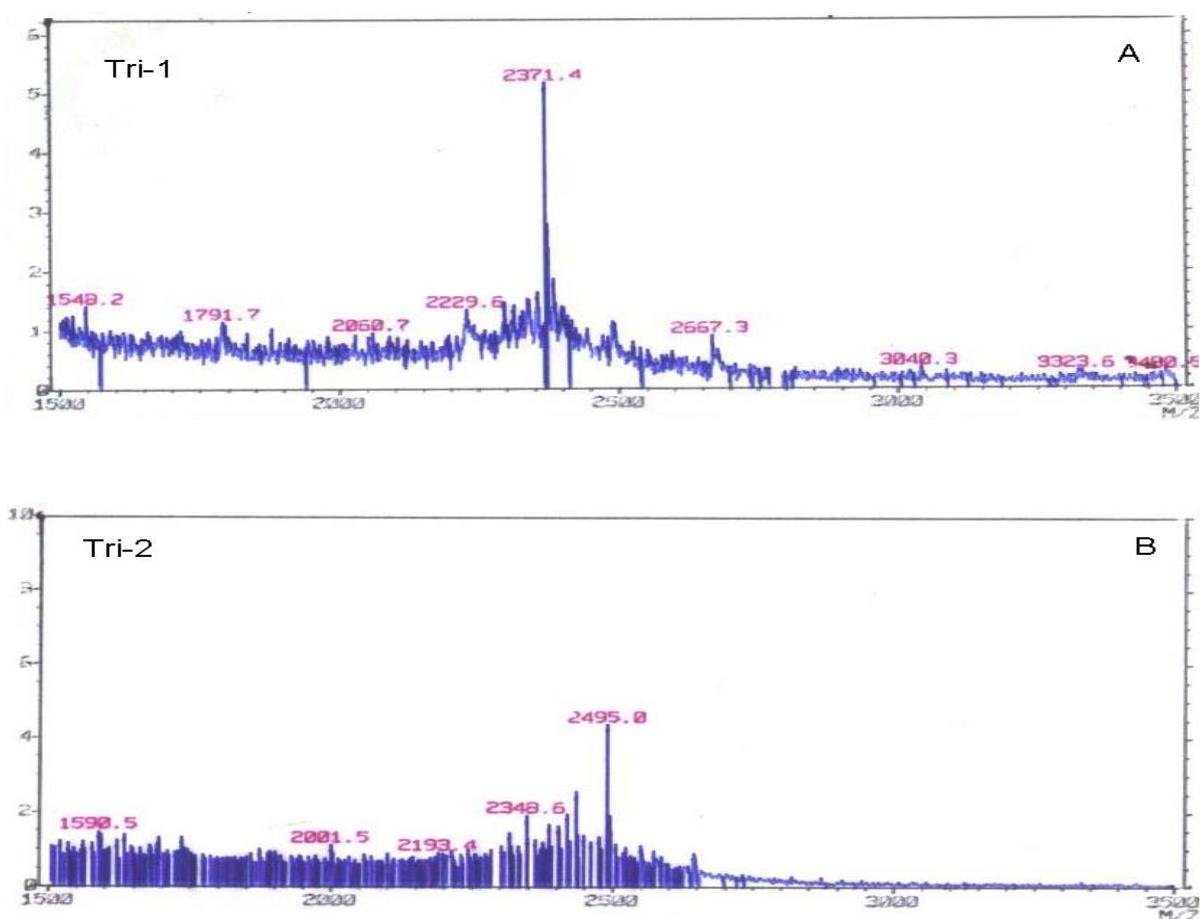




## Anexo 2A. Secuencia aminoacídica de una región del dominio amino terminal de la familia de proteínas LBP-BPI y de péptidos derivados de esta región.

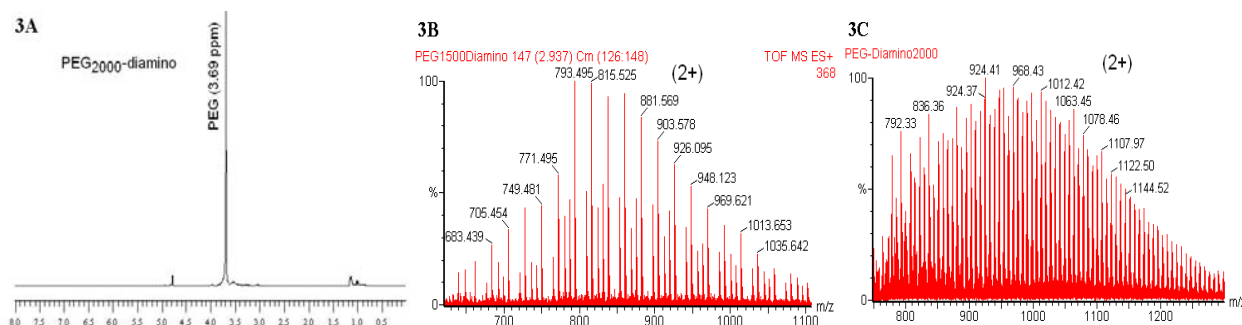
Proteína/Péptido	40	50	90	100
BPI_HUMANA	DYSDSFKIKHLGKGHYSFYS.....	IKISGKWKAQKRFLKMSGNFDLS		
LBP_HUMANA	DFTGDLRIPHVGRGRYEFHS.....	IRVQGRWKVRKSFFKLQGSFDVS		
Péptido LBP (aminoácidos 86-99 de LBP)			RVQGRWKVRKSFFK	
Péptido LBPK95A (aminoácidos 86-99 de LBP)			RVQGRWKVRASFFK	

**Anexo 2B. Caracterización por FAB-MS de los péptidos restringidos conformacionalmente obtenidos después del proceso de desanclaje y con el empleo de la química Boc/Bzl.** A) péptido Tri-1 que contiene en su estructura dos ciclos de lactama y dos cisteínas libres, (M+H)<sup>+</sup> teórico: 2371,83 Da. B) péptido Tri-2 que contiene en su estructura un enlace lactama, dos cisteínas libres y dos protegidas con Acm, (M+H)<sup>+</sup> teórico: 2495,03 Da.

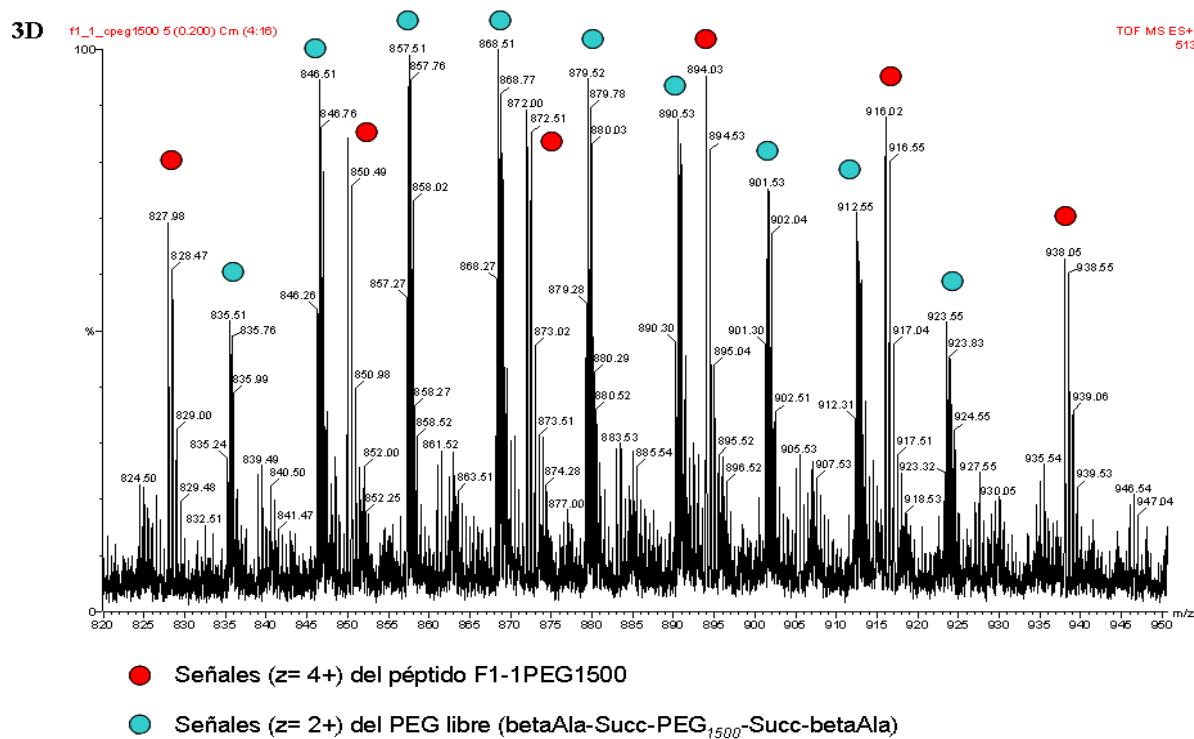


**Anexo 3. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del PEG<sub>2000</sub>-diamino (3A). Espectros de masas del PEG<sub>1500</sub>-diamino (3B) y PEG<sub>2000</sub>-diamino (3C) y de los péptidos F1-1PEG<sub>1500</sub> (3D) y F1-1PEG<sub>2000</sub> (3E).**

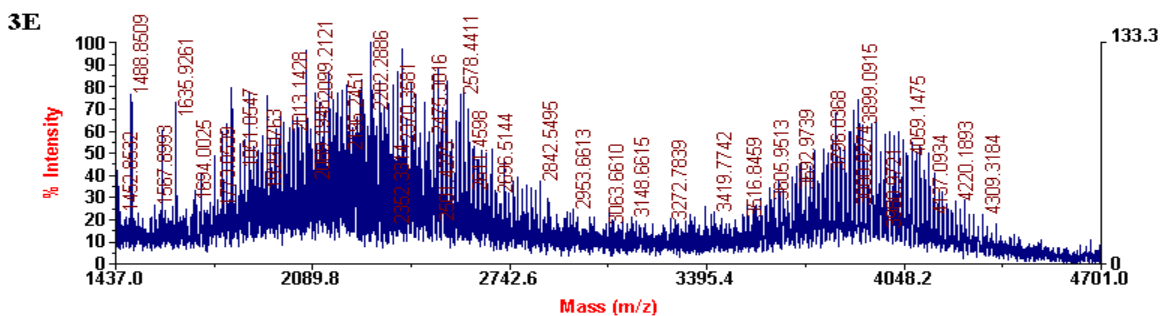
*Espectro ESI-MS del PEG<sub>1500</sub>-diamino y PEG<sub>2000</sub>-diamino*



*Espectro ESI-MS del péptido F1-1PEG<sub>1500</sub> ampliado en la zona de las señales con cuatro cargas*

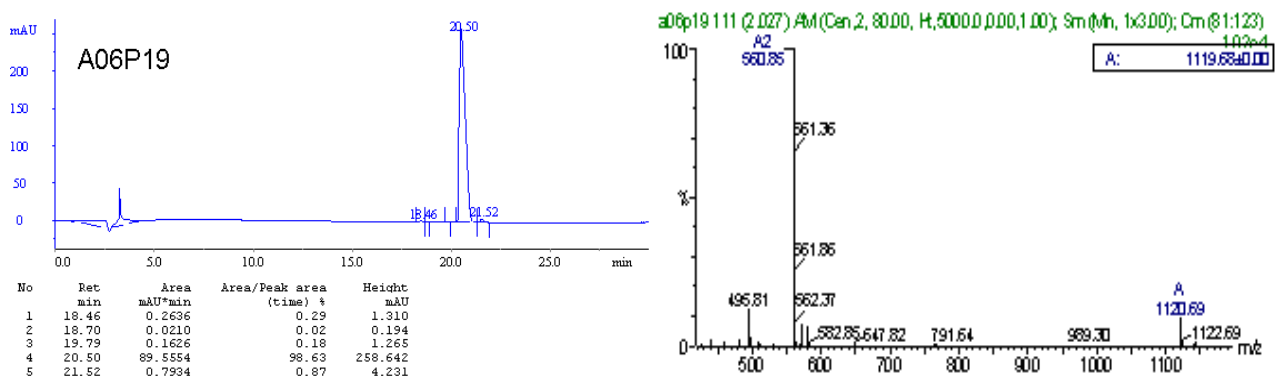
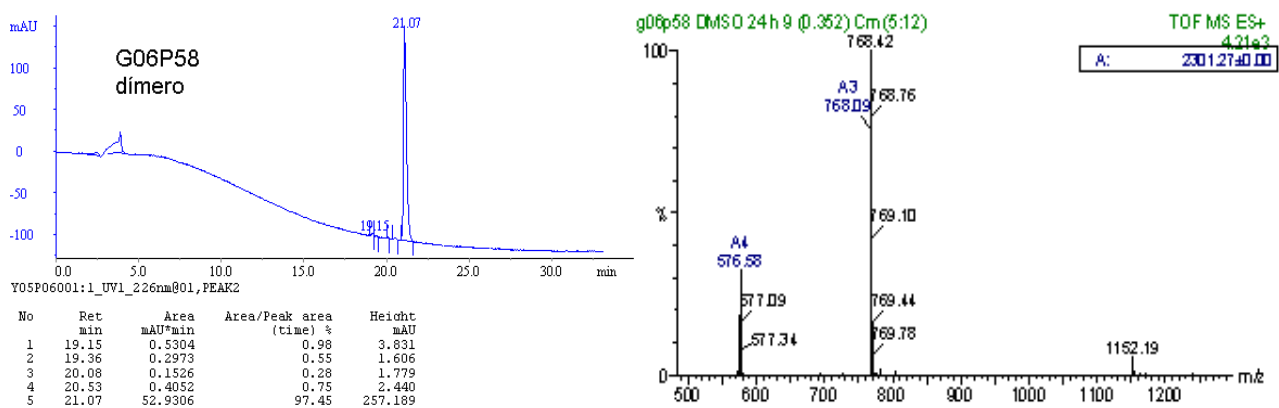
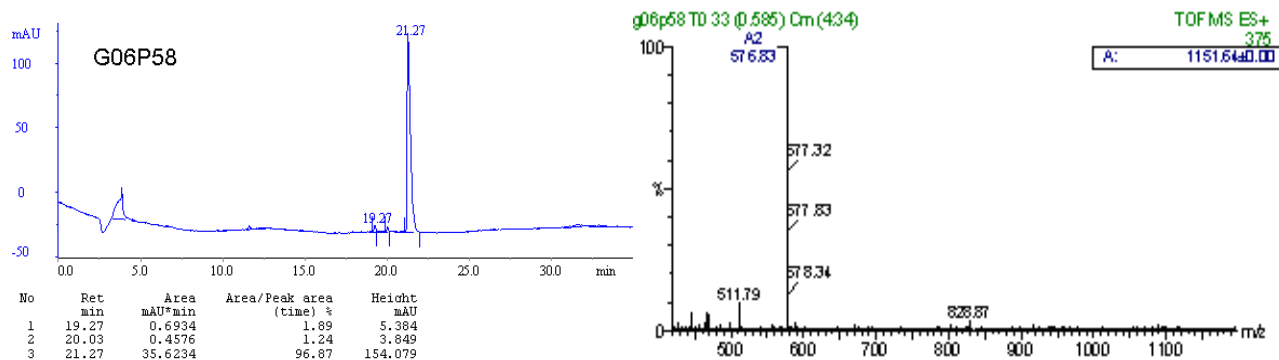


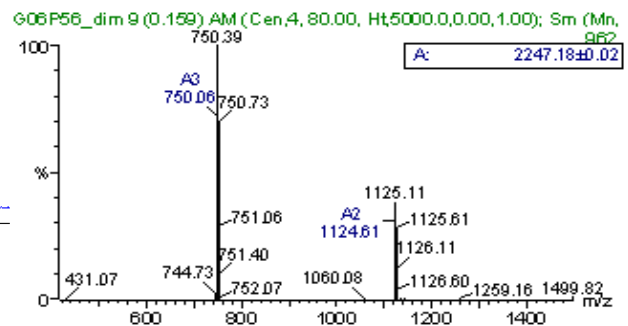
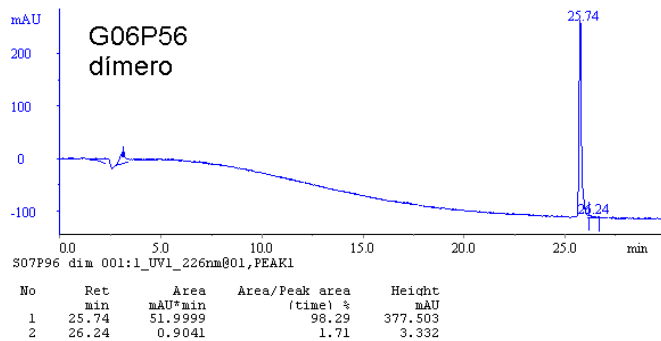
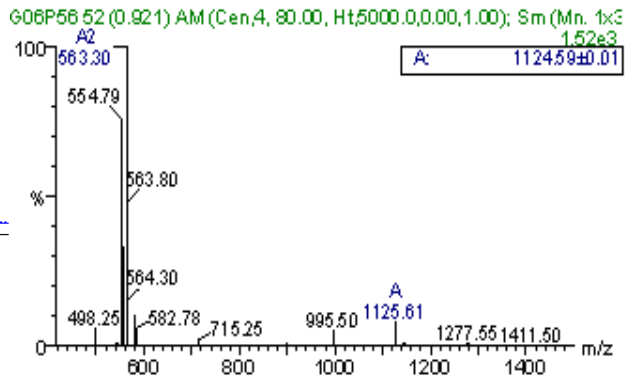
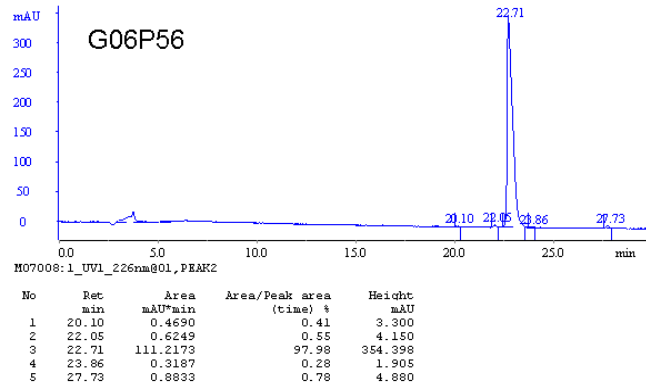
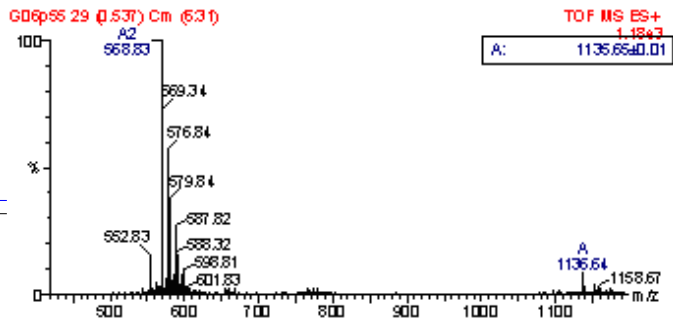
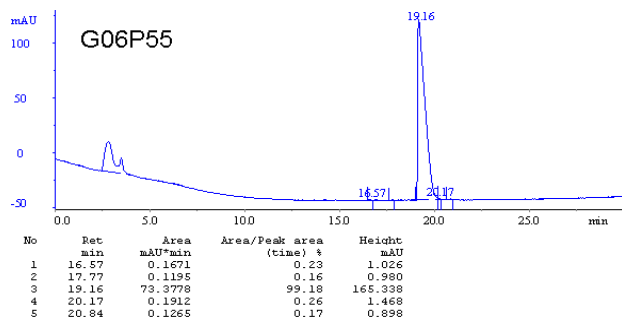
*Espectro MALDI-MS del péptido F1-1PEG<sub>2000</sub>*



**Anexo 4. Caracterización por RP-HPLC y ESI-MS de los péptidos derivados de la proteína IL-15.**

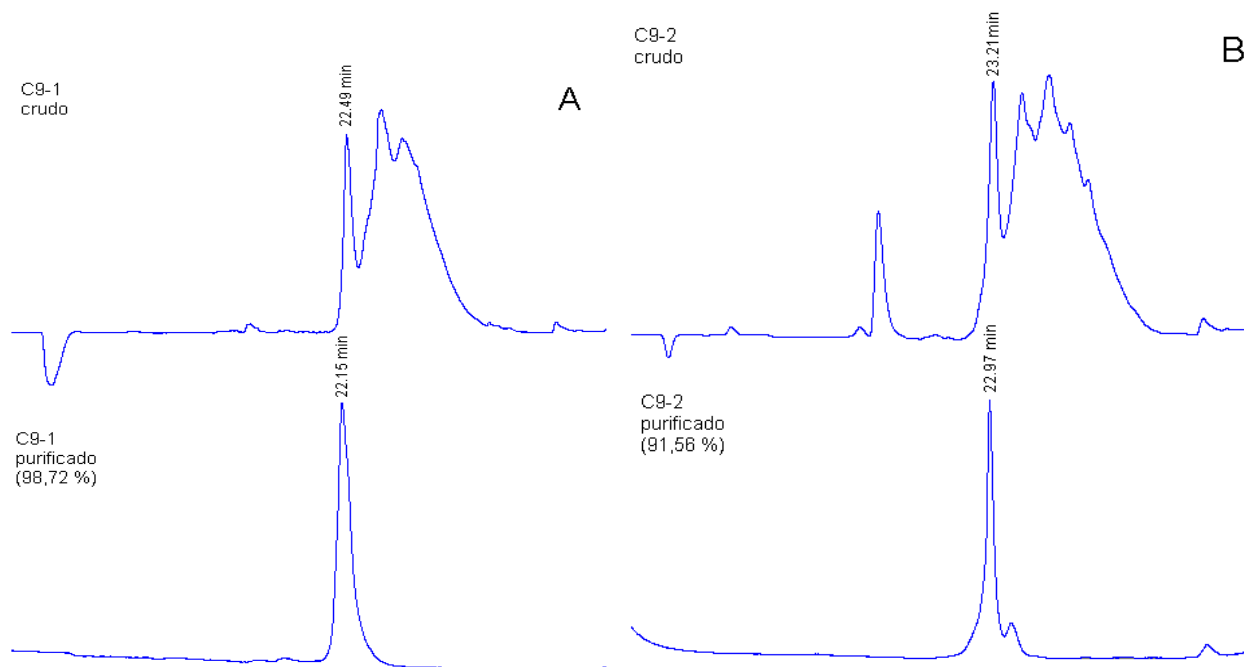
Columna RP C18 (Vydac, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m). Gradiente: 5-60 % de B en 35 min. Buffer A: 0,1 % TFA/Agua, Buffer B: 0,05 % de TFA/Acetonitrilo. Detección a  $\lambda$ : 226 nm. MM teórica G06P58: 1151,64 Da. MM teórica G06P58 dímero: 2301,28 Da. MM teórica A06P19: 1119,68 Da. MM teórica G06P55: 1136,68 Da. MM teórica G06P56: 1124,61 Da. MM teórica G06P56 dímero: 2247,20 Da.



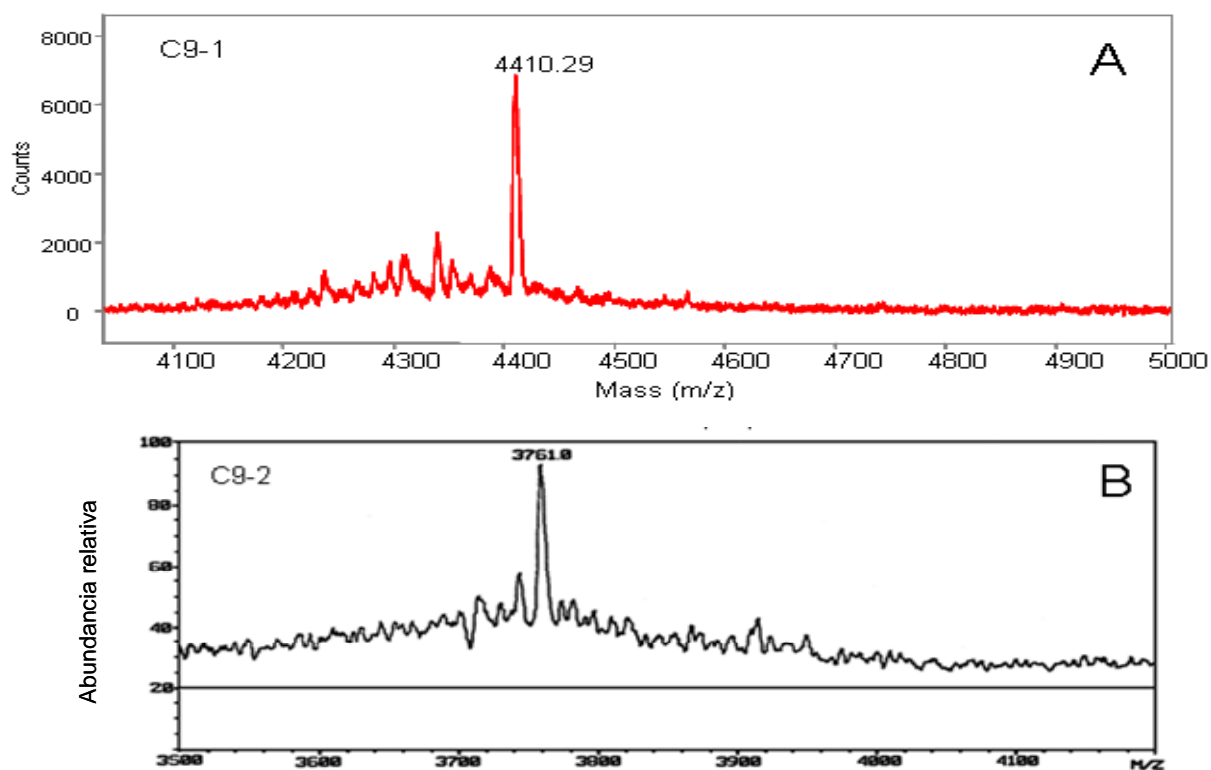


**Anexo 5. Cromatogramas de RP-HPLC y espectros de masas de los péptidos derivados del lazo 4 de la PorA de *N. meningitidis*.** Columna RP C18 (Vydac, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m). Gradiente: 5-60 % de B en 35 min. Disolución A: 0,1 % TFA/Agua, Disolución B: 0,05% de TFA/Acetonitrilo. Detección a  $\lambda$ : 226 nm.  $(M+H)^+$  promedio teórica C9-1: 4409,9 Da, C9-2: 3761,2 Da.

*Cromatogramas de RP-HPLC de los péptidos C9-1 y C9-2 crudos y cíclicos purificados.*

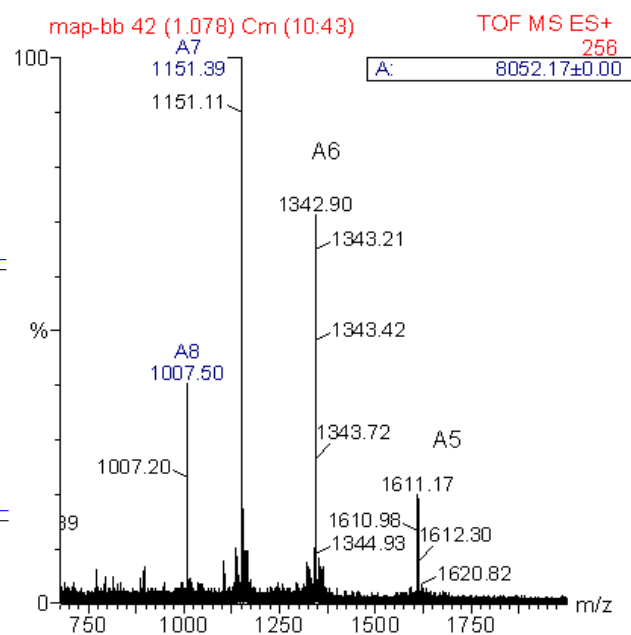
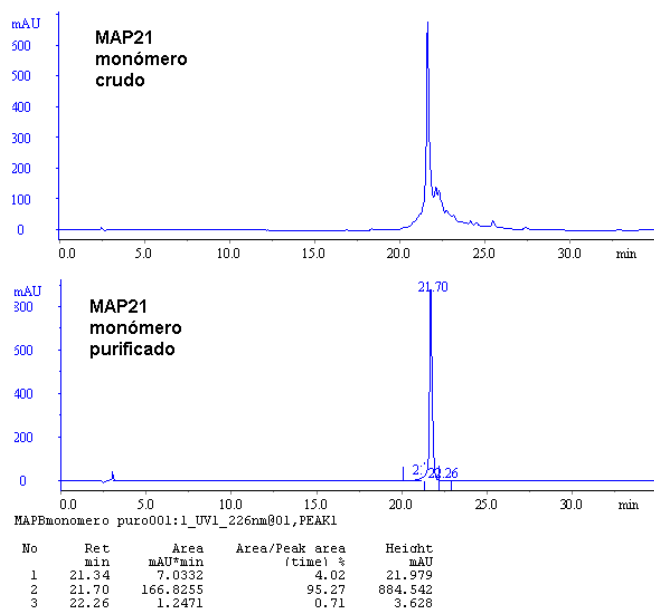
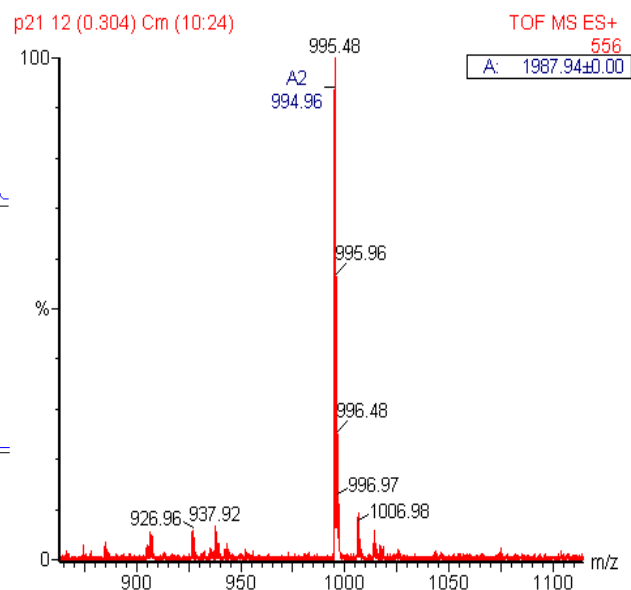
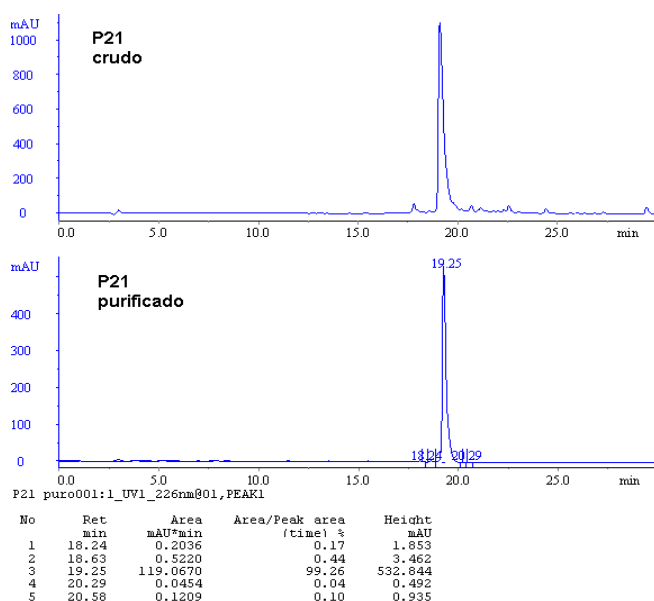


*Espectros MALDI-MS del péptido cíclico C9-1 y FAB-MS del péptido cíclico C9-2.*

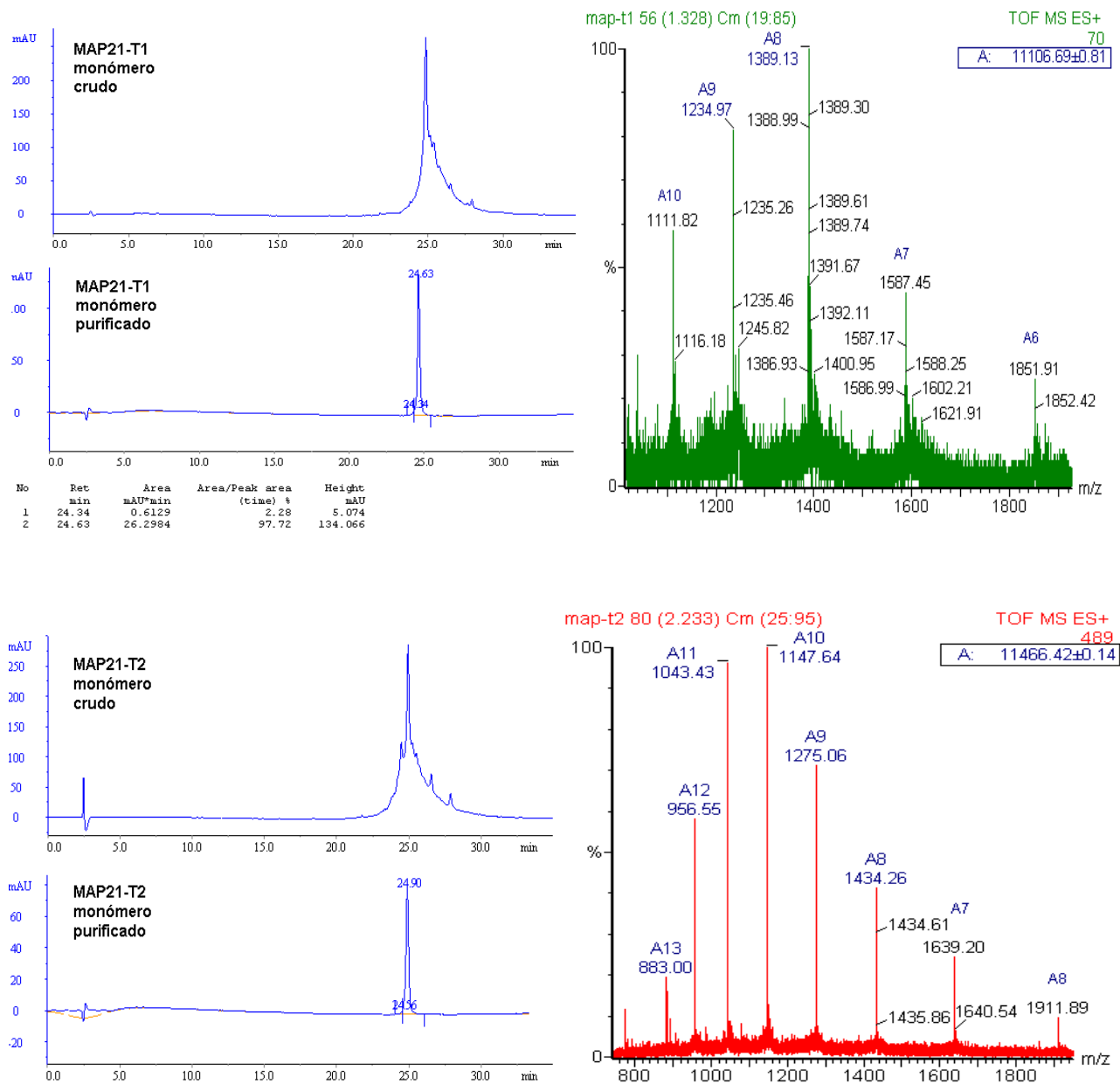


**Anexo 6. Cromatograma de RP-HPLC y espectros de masas ESI-MS de los péptidos derivados del lazo 4 de la proteína PorA de MenB (péptido P21, MAP21-T1 monómero y MAP21-T2 monómero).** Columna RP C18 (Vydac, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m). Gradiente: 5-60 % de B en 35 min. Disolución A: 0,1 % TFA/Agua, Disolución B: 0,05 % de TFA/Acetonitrilo. Detección a  $\lambda$ : 226 nm. MM monoisotópica teórica del péptido P21: 1987,97 Da. MM promedio teórica del MAP21 monómero: 8052,1 Da. MM promedio teórica del MAP21-T1 monómero: 11107,5 Da. MM promedio teórica del MAP21-T2 monómero: 11466,1 Da.

*Cromatogramas de RP-HPLC y EM del Péptido P21, MAP21, MAP21-T1 y MAP21-T2*

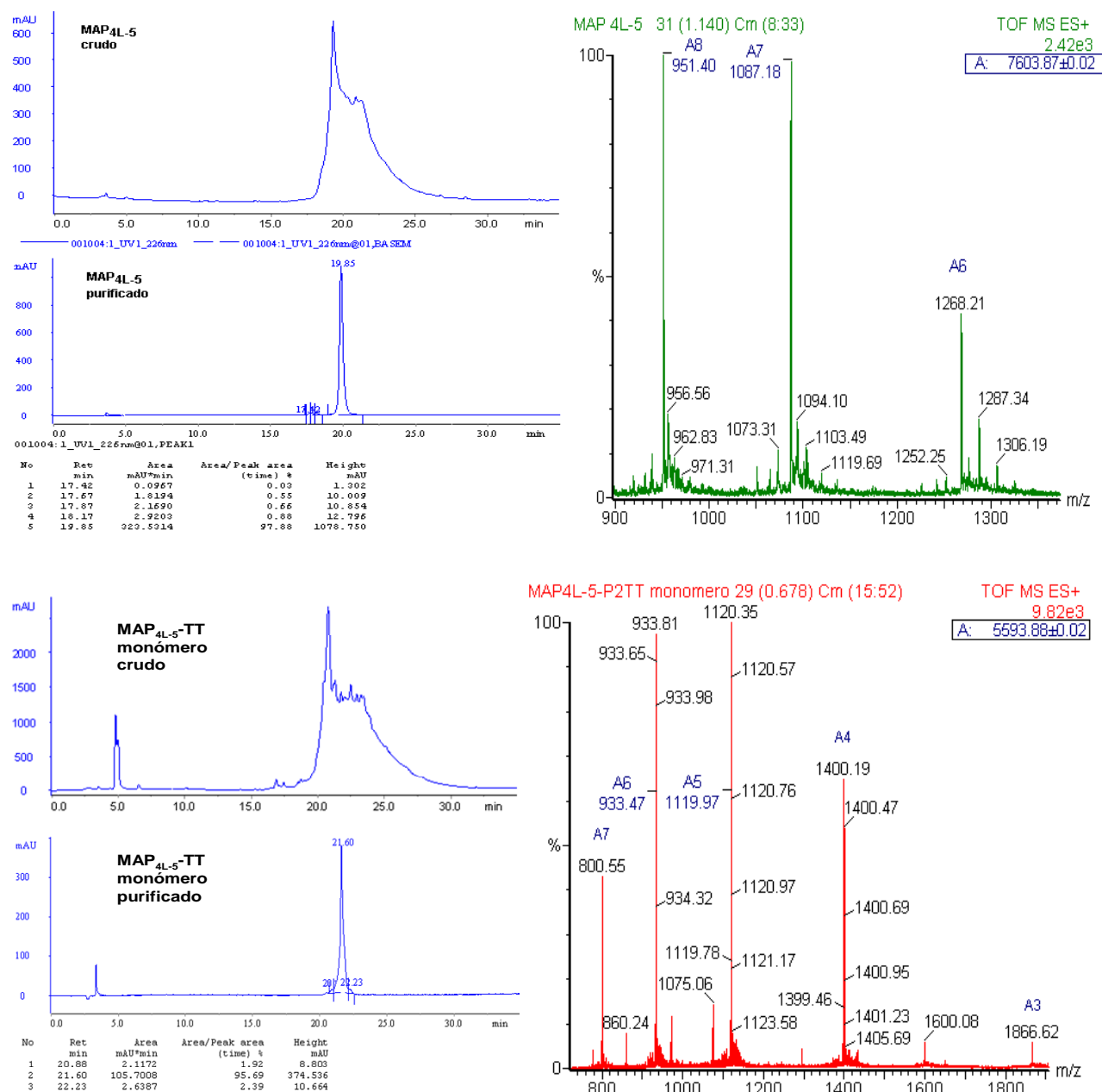


## Anexo 6 (continuación)



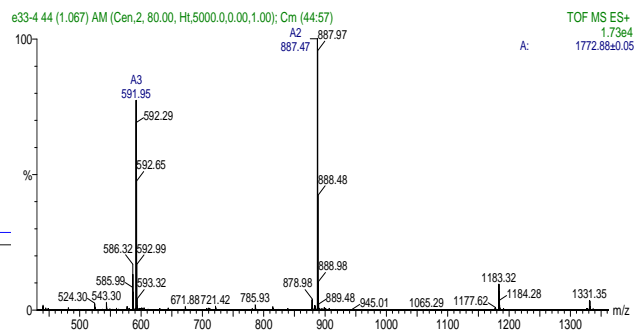
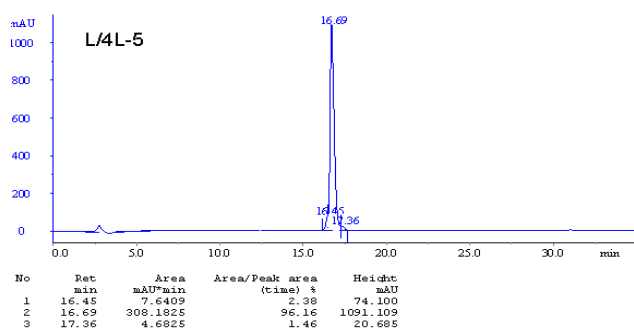
**Anexo 7. Cromatograma de RP-HPLC y espectros de masas ESI-MS de los péptidos que contienen la secuencia 4L-5 mimética del PSC de MenB (MAP<sub>4L-5</sub>, MAP<sub>4L-5</sub>-TT monómero y péptido L/4L-5).** Columna RP C18 (Vydac, 4,6 x 150 mm, 5 µm). Gradiente: 5-60 % de B en 35 min. Disolución A: 0,1 % TFA/Agua, Disolución B: 0,05% de TFA/Acetonitrilo. Detección a λ: 226 nm. MM teórica del MAP<sub>4L-5</sub>: 7603,53 Da. MM teórica del monómero de MAP<sub>4L-5</sub>-TT: 5593,86 Da. MM monoisotópica teórica del péptido L/4L-5: 1772,90 Da.

*Cromatogramas de RP-HPLC y espectros ESI-MS del MAP<sub>4L-5</sub>, MAP<sub>4L-5</sub>-TT monómero y el péptido 4L-5*





## Anexo 7 (continuación)



**BIBLIOGRAFÍA PRINCIPAL DE LA TESIS****Publicaciones**

1. Santos, A., Reyes, O., Gerónimo, H., Rodríguez, Y., Cabrales, A., **Garay, H.**, Ojeda, M., Arrieta, C., Estevez, M., Guillen, G. Enhancement of the inhibitory effect of an IL-15 antagonist peptide by alanine scanning. *Journal of Peptide Science*. **2012**, 18: 25-29.
2. **Garay, H.**, Menéndez, T., Cruz-Leal, Y., Coizeau, E., Noda, J., Morera, V., Guillén, G., Albericio, F., Reyes, O.. Study of various presentation forms for a peptide mimetic of Neisseria meningitidis serogroup B capsular polysaccharide. *Bioconjugate Chemistry*. **2011**; 22: 33-41.
3. Santos, A., Cabrales, A., Reyes, O., Gerónimo, H., Rodríguez, R., **Garay, H.**, Arrieta, C., Silva, R., Guillén, G. Identification of an interleukin-15 antagonist peptide that binds to IL-15R $\alpha$ . *Biotecnología Aplicada*. **2008**; 25: 320-324.
4. **Garay, H.**, Niebla, O., González, L., Menéndez, T., Cruz, L., Reyes, O. Disulfide bond polymerization of a cyclic peptide derived from the surface loop 4 of OMP of Neisseria meningitidis. *Letters in Peptide Science*. **2000**; 7, 97-105.

**Patentes**

1. Péptidos miméticos de carbohidratos y su empleo en formulaciones farmacéuticas.  
Tamara Menéndez Medina; Yoelys Cruz Leal; Osvaldo Reyes Acosta; Hilda Elisa Garay Pérez; Gerardo Enrique Guillén Nieto; Edelgis Coizeau Rodríguez; Nelson Francisco Santiago Vispo; Glay Chinae Santiago. CU-2005-0283. **2005**
2. Péptido antagonista de la actividad de la IL-15. CU-2008-0184. **2008**

Los resultados obtenidos en este trabajo se han presentado en 10 eventos científicos, en 3 de ellos como presentaciones orales. Forman parte de una tesis de diploma del INSTEC; de cuatro Logros Científicos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y de dos Premios Anuales de la Academia de Ciencias de Cuba (años 2009 y 2010).