CAPÍTOL 4

OPTIMITZACIÓ DEL LLIGAND

En els capítols 2 i 3, s'ha descrit el procediment seguit per trobar un pèptid, el Candidat 4, capaç d'interaccionar amb la superfície del domini de tetrameització de la p53, així com la metodologia desenvolupada per poder estudiar aquesta interacció. Un cop assolits aquests dos objectius, el següent ha estat intentar millorar l'afinitat del pèptid Candidat 4 mitjançant eines de química combinatòria. L'objectiu d'aquesta optimització ha estat doble, ja que per una banda s'ha buscat un lligand amb una afinitat més elevada, i per l'altra s'ha intentat entendre quins són els factors que realment afecten, des d'un punt de vista general, a l'afinitat de lligands peptídics per a superfícies proteiques com la del domini de tetrameització de la p53.

4.1 PREPARACIÓ DE LA QUIMIOTECA

Com a base per a la construcció de la quimioteca s'ha utilitzat el Candidat 4. Veient els resultats obtinguts en la caracterització de la interacció entre el Candidat 4 i la p53_tetS, també es podria

plantejar la preparació d'una quimioteca basada en, per exemple, pèptids amb més de quatre arginines. En fer-ho, però, és probable que hi haguessin més dificultats per entendre globalment quin són els factors que afecten el reconeixement de motius tetraaniònics com el proposat en aquest estudi.

4.1.1 DISSENY

4.1.1.1 Estratègia

Des d'un punt de vista molt general, hi ha dues opcions per dur a terme la preparació en fase sòlida d'una quimioteca de pèptids basada en el Candidat 4: l'estratègia de síntesi en paral·lel i l'estratègia de "one bead-one compound"[152].

Tal i com diu el nom, en l'estratègia "one bead-one compound" (també anomenada "split and mix") en cada bola de resina s'hi obté un producte diferent. Així, mitjançant aquesta metodologia s'obtenen mescles de productes els quals s'avaluen en solució o en alguns casos, units a la resina. La gran avantatge és que permet sintetizar un nombre de productes elevadíssim en comparació amb la síntesi en paral·lel. Així es pot tenir una diversitat més gran, i en conseqüència, una major probabilitat de trobar un pèptid millor que el Candidat 4. Per contra, la quantitat que s'obté de cada producte no en permet fer un estudi detallat i es necessita desenvolupar alguna metodologia fiable d'avaluació de mescles de productes en solució o d'avaluació en fase sòlida. A més a més, posteriorment es necessita alguna metodologia per deconvolucionar i identificar els productes positius.

En l'estratègia de síntesi en paral·lel se sintetitzen per separat els diferents pèptids buscant una optimització dels recursos en cadascun dels passos comuns de la síntesi. Un dels exemples més il·lustratius d'aquesta estratègia és la utilització de "tea-bags"[153]. En aquest exemple les boles de resina es posen dintre bosses de polipropilé amb petits orificis que permeten el pas dels eluents i reactius. Les etapes de desprotecció i rentat es realitzen amb totes les bosses juntes i en els acoblaments les bosses se separen en funció del residu que s'hi ha d'incorporar. Mitjançant estratègies com aquesta, el nombre de pèptids que es poden sintetitzar és molt més petit, de manera que la diversitat que es pot explorar és molt més baixa, i per tant hi ha menys probabilitat de trobar un pèptid millor al Candidat 4. La gran avantatge que té aquesta estratègia, però, és que permet obtenir grans quantitats de cada producte (uns quants mil·ligrams).

En el grup s'ha posat a punt un estratègia de síntesi de pèptids "one bead-one compound" en la qual s'avaluen els pèptids encara units a la resina, se seleccionen els positius i posteriorment s'identifiquen

---

[152] Terret, N.K., "Combinatorial Chemistry", Ed. Oxford Chemistry Masters, 1998, pp. 7-32

[153] Houghten, R.A., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1985), **82**, 5131-5135

mitjançant seqüenciació per espectrometria de masses[154]. Tot i això, en aquest treball s'ha preferit utilitzar una estratègia de síntesi en paral·lel en fase sòlida, ja que tenint en compte les dificultats que s'han trobat per estudiar la interacció entre el Candidat 4 i la p53_tetS, sembla més convenient utilitzar una estratègia que permeti disposar de la suficient quantitat de producte per a poder utilitzar varies tècniques. A més a més, l'avaluació individual i detallada de cada producte, a part de permetre trobar un lligand millor al Candidat 4 pot ajudar a entendre quins són els factors que milloren i quin són els factors que empitjoren l'afinitat. Aquests coneixements poden ser útils en el disseny de lligands per a altres superfícies proteiques. Per últim, considerant la diversitat que es vol introduir, és força probable que alguna de les síntesis tingui un rendiment molt baix. Mentre que en una estratègia de síntesi en paral·lel això no és un problema greu perquè sempre es pot purificar el cru de síntesi, en una estratègia de "one bead-one compound" és molt important que l'eficiència de la síntesi sigui molt elevada.

Seguint la filosofia de la síntesi en paral·lel d'optimització de recursos, s'ha decidit utilitzar com a pèptid base la seqüència inversa del Candidat 4. En l'extrem C-terminal del retro-Candidat 4 hi queda una part comuna en tots els pèptids de la quimioteca (tronc comú) que es pot sintetitzar conjuntament per a tots els pèptids (figura 4.1).

Candidat 4

Ac – A – G – A – A – G – **W** – A – **R** – G – **R** – A – **R** – S – **R** – NH_2

retro-Candidat 4

Ac – **R** – S – **R** – A – **R** – G – **R** – A – **W** – G – A – A – G – A - NH_2

Tronc comú

Figura 4.1 Seqüència del retro-Candidat 4, pèptid en el qual es basa la quimioteca

4.1.1.2 Punts de diversitat

El disseny del Candidat 4, bàsicament es basa en la utilització d'un pèptid que interaccioni amb la p53_tetS a través dels grups guanidini de les 4 arginines que conté. Així, la resta de la seqüència està pensada perquè no dificulti la interacció i afavoreixi una confomació estesa del pèptid. Tenint en compte aquest fet, s'ha decidit preparar una quimioteca principalment basada en la substitució de cadascuna de les arginines per residus amb diferents grups funcionals en les cadenes laterals i/o residus amb diferent longitud de la cadena lateral. Com que s'ha escollit una estratègia de síntesi en paral·lel no es poden sintetitzar totes les possibles combinacions entre les arginines i les substitucions. Així, per a cada tipus

[154] Pastor, J., Fernàndez, I., Rabanal, F. & Giralt, E., *Organic Lett.*, (2002), **4**, 3831-3833

de substitució, només s'han sintetitzat les corresponents combinacions amb arginina. A més a més, per a cada tipus de substitució només s'han sintetitzat alguna de les possibles combinacions (figura 4.2).

retro-Candidat 4

Ac – **R** – S – **R** – A – **R** – G – **R** – A – **W** – G – A – A – G – A - NH_2

	Nomenclatura
R / R / R / R	RRRR
X / R / R / R	XR3
X / X / R / R	X2R2
X / X / X / R	X3R
X / X / X / X	X4 ò XXXX
R / X / R / R	RXRR
X / R / X / R	XRXR
X / R / R / X	XRRX
X / X / R / X	XXRX

Figura 4.2 Representació de les substitucions realitzades en la quimioteca i la nomenclatura corresponent en funció de la substitució. (X = codi del nou residu introduït).

També es podria pensar en la síntesi de només la part del pèptid corresponent a la regió on hi ha les quatre arginines. Tot i això, no coneixem quin és l'efecte real de la cua de residus que s'ha introduït en l'extrem N-terminal, i per això s'ha decidit mantenir-la en tots els pèptids de la quimioteca. A més a més, la presència del Trp és necessària per poder dur a terme els estudis de fluorescència.

Finalment, per no excloure l'efecte de la resta de l'esquelet, també s'han preparat alguns pèptids basats en la substitució de la resta de residus.

Així doncs, s'ha decidit preparar una quimioteca amb les següents diversitats:

Diversitat de grup funcional

En les interaccions proteïna-proteïna, és força freqüent trobar contactes entre residus àcids i arginines[155]. Això és així, perquè la interacció guanidini-carboxilat és molt favorable, ja que té una contribució electrostàtica, una contribució d'enllaços d'hidrogen i un efecte quelant. Per efecte quelant, s'entén la possibilitat que té el grup guanidini de formar enllaços d'hidrogen amb el carboxilat simultàniament amb dos grups donadors de protons (figura 4.3).

[155] Wigley, D.B., Lyall, A., Hart, K.W. & Holbrook, J.J., *Biochem. Bioph. Res. Co*., (1987),**149**, 927-929

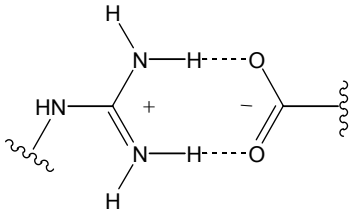
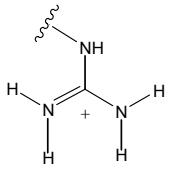
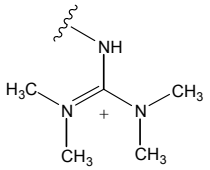
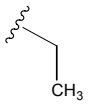


Figura 4.3 Representació de les diferents contribucions que intervenen en la interacció carboxilat-guanidini.

Per tal de jugar amb aquestes contribucions i entendre quines d'elles estan realment condicionant la interacció entre el pèptid Candidat 4 i la p53_tetS, s'han substituït les arginines per residus amb diferents grups funcionals en les corresponents cadenes laterals (taula 4.1).

Grup funcional	Possibles contribucions	Residu corresponent	Codi (X)[a]
	• Electrostàtica • Enllaç d'hidrogen • Efecte quelant	Arginina	R
	• Electrostàtica • Enllaç d'hidrogen	Lisina	K
	• Electrostàtica	Ornitina guanidilada	h
	• Enllaç d'hidrogen	Serina	S
		Norvalina	Nva

Taula 4.1 Representació de les diferents contribucions possibles en funció del residu utilitzat per introduir diversitat en el grup funcional.

a- Codi utilitzat per a cadascuna de les substitucions en la nomenclatura dels pèptids de la quimioteca. Aquest codi s'ha escollit de forma arbitrària.

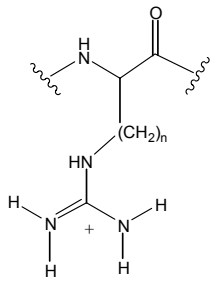
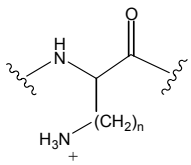
Diversitat de longitud de cadena

Si es considera una interacció des del punt de vista termodinàmic, aquesta es pot separar en dos components, un entàlpic i un entròpic [1].

$$[1] \qquad \Delta G^o = \Delta H^o - T\Delta S^o$$

La utilització de, per exemple, anàlegs d'arginina de cadena lateral més curta, és possible que millori el component entròpic sense que s'afecti el component entàlpic. Si això fos així, mitjançant la substitució de les arginines per anàlegs més curts es podrien obtenir lligands amb una major afinitat.

Per tal d'explorar aquesta possibilitat, en la quimioteca s'hi han inclòs residus anàlegs d'arginina però de diferent longitud de cadena lateral. La lisina, gràcies a les possibles contribucions del grup amoni, és també una opció interessant a explorar, i per això en la quimioteca també s'hi han inclòs residus anàlegs de lisina però de diferent longitud de cadena lateral (taula 4.2).

Grup funcional	Longitud	Residu corresponent	Codi (X)
	n = 2	Diaminobutíric guanidilat	Rab
	n = 4[a]	Lisina guanidilada	Rys
	n = 1	Diaminopropiònic	Dapa
	n = 2	Diaminobutíric	Dab
	n = 3[b]	Ornitina	Orn

Taula 4.2 Representació de les diferents residus utilitzats per introduir diversitat en la longitud de la cadena lateral.

a- Per n = 3, correspon a arginina.

b- Per n = 4, correspon a lisina.

Diversitat d'esquelet.

Per tal d'avaluar l'efecte de la resta de residus de l'esquelet, s'han introduït en la quimioteca alguns pèptids amb substitucions en les posicions intermèdies a les arginines mantenint sempre les quatre arginines. S'ha buscat cobrir el més ampli ventall de variacions possibles amb el mínim de pèptids (taula 4.3).

Seqüència	Nom
Ac – R – S – R – A – R – G – R **–** A– G – A – A – G – A – NH_2	NoW
Ac – R – **s** – R – **a** – R – G – R – **a** – W – G – A – A – G – A – NH_2	Daa
Ac – R – **S – S** – R – **A – A** – R – **G – G** – R – A – W – G – A – A – G – A – NH_2	2xaa
Ac – R **–** R **–** R **–** R – A – W – G – A – A – G – A – NH_2	0xaa
Ac – R – **L** – R – **A** – R – **N** – R – A – W – G – A – A – G – A – NH_2	Aleatori
Ac – R – **A** – R – **S** – R – **G** – R – A – W – G – A – A – G – A – NH_2	ASG

Taula 4.3 Representació dels pèptids utilitzats per introduir diversitat en l'esquelet.

El pèptid NoW s'ha escollit per avaluar l'efecte del Trp en el procés de reconeixement. El Daa, s'ha escollit per avaluar l'efecte de tenir aminoàcids D en l'entorn de les arginines. En canvi, els pèptids 2xaa i 0xaa s'han escollit per avaluar l'efecte de la separació entre els residus d'arginina. Per acabar, el pèptid Aleatori s'ha escollit mitjançant una elecció a l'atzar del 20 aminoàcids naturals per a les tres posicions situades entre arginines (excloent Arg, Glu i Asp), i el pèptid ASG s'ha escollit mitjançant una ordenació a l'atzar dels residus Ser, Ala i Gly que hi ha entre les posicions d'arginines en el Candidat 4.

En resum, s'ha decidit preparar una quimioteca de 44 pèptids seguint una estratègia de síntesi en paral·lel (taula 4.4).

		X			
Substitució	Nom	K	h	S	Nva
X / R / R / R	XR3	√	√	√	√
X / X / R / R	X2R2	√	√	√	√
X / X / X / R	X3R	√		√	√
X / X / X / X	XXXX ò X4	√	√	√	√
R / X / R / R	RXRR	√			
X / R / X / R	XRXR	√			
X / R / R / X	XRRX	√			
X / X / R / X	XXRX	√			

		X		
Substitució	Nom	Dapa	Dab	Orn
X / R / R / R	XR3	√	√	√
X / X / R / R	X2R2	√	√	√
X / X / X / R	X3R	√	√	√
X / X / X / X	XXXX ò X4	√	√	√

		X	
		Rab	**Rys**
Substitució	Nom		
X / R / R / R	XR3	√	√
X / X / R / R	X2R2	√	√
X / X / X / R	X3R		
X / X / X / X	XXXX ò X4	√	√

Altres pèptids:	RRRR[a]	NoW	Daa	2xaa	0xaa	Aleatori	ASG

Taula 4.4 – Pèptids de la quimioteca sintetitzats.
a- Correspon al retro-Candidat4.

4.1.2 SÍNTESI

La síntesi de la quimioteca s'ha dut a terme en quatre generacions. Primerament s'ha realitzat la síntesi del Tronc comú i la peptidil-resina s'ha aliquotat per a sintetitzar les generacions 1 i 2. Per a fer la generació 3, s'ha sintetitzat novament més tronc comú (figura 4.4). Per aquestes tres generacions, la síntesi s'ha dut a terme manualment seguint una estratègia Fmoc/^{t}Bu.

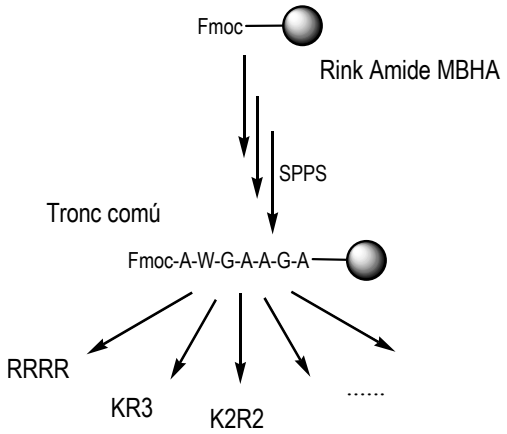


Figura 4.4 – Esquema general de síntesi utilitzat en la preparació de la quimioteca.

Pel que fa a la generació 4, aquesta s'ha sintetitzat mitjançant síntesi automàtica en paral·lel seguint també una estratègia Fmoc/^{t}Bu.

En l'etapa d'escissió del pèptid de la resina s'ha utilitzat el còctel K, el qual bàsicament està format per TFA, aigua i diversos "scavangers". En la síntesi dels pèptids de la quimioteca, ha estat especialment important l'elecció dels grups protectors de les cadenes laterals d'arginina i triptòfan, així com les condicions d'escissió. Per a l'arginina, s'han utilitzat els grups protectors Pmc i Pbf, els quals ofereixen una millor cinètica de desprotecció. El problema que presenten, però, és que durant l'etapa d'escissió de la resina i desprotecció de les cadenes laterals, aquests grups protectors poden provocar una sulfonació del triptòfan. Aquest fenomen, és especialment perillós quan hi ha més d'un residu d'arginina. Mitjançant la utilització del còctel K en la etapa d'escissió/desprotecció i la utilització de triptòfan amb l'anell d'indol protegit amb el grup Boc, s'evita en gran mesura aquesta possibiltat gràcies d'una banda a l'elevat nombre de "scavengers" presents en el medi i de l'altra al mecanisme de desprotecció de la cadena lateral del triptòfan (figura 4.5). En presència de TFA el grup *t*-butil s'allibera ràpidament i el nitrogen de l'anell queda protegit amb un grup carboxilat, el qual evita que s'hi pugui donar alguna reacció secundària. En el tractament posterior del pèptid, el carboxilat s'allibera en el medi àcid aquós mitjançant l'alliberament de CO_2[156].

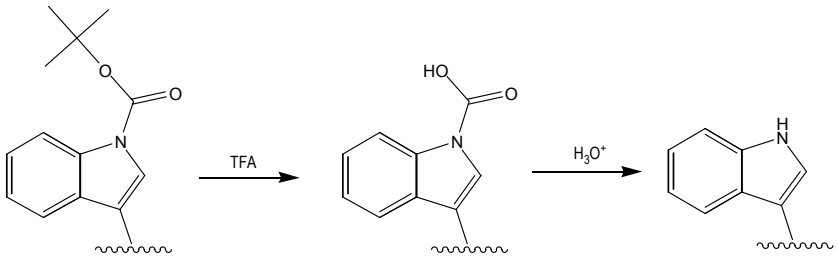


Figura 4.5 – Mecanisme de desprotecció del Trp(Boc).

Tot i el fet d'utilitzar Arg(Pbf) o Arg(Pmc) els temps necessaris per assolir la desprotecció completa de la cadena lateral són més elevats del normal si es comparen amb la resta de residus. Aquest fet, és més notori quan hi ha més d'una arginina en la seqüència. Així, el tractament de la peptidil-resina amb el còctel K s'ha dut a terme durant temps d'entre 1 i 4 hores en funció del número d'arginines presents en la seqüència.

[156] Franzen H., Grehn, L. & Ragnarsson, U., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, (1984), **24**, 1699-1700

4.1.2.1 Generació 1

En aquesta primera generació, s'ha preparat el pèptid RRRR i els que contenen substitucions de K, S i Nva (total: 17 pèptids).

Per a la preparació dels pèptids d'aquesta generació, s'ha utilitzat una resina Rink Amide MBHA de funcionalització 0,73 mmol/g. La síntesi del Tronc comú, s'ha dut a terme mitjançant acoblaments de 4 equivalents d'aminoàcid i TBTU com a agent acoblant. La síntesi ha transcorregut sense problemes i s'ha pogut obtenir el Tronc comú amb un rendiment de síntesi del 96% segons l'anàlisi d'aminoàcids i amb un 94% de puresa segons HPLC.

Un cop sintetitzat el Tronc comú, la resina s'ha secat mitjançant rentats amb MeOH i Et_2O i s'ha separat per pesada en alíquotes de 0,066 mmol per tal de dur a terme la síntesi de cadascun dels pèptids de les generacions 1 i 2 (prèviament a l'acoblament del Trp, s'ha separat una alíquota de també 0,066 mmol per poder sintetitzar el pèptid NoW).

A partir d'aquest punt la síntesi de la generació 1 s'ha complicat moltíssim. De fet, en l'acoblament de la primera arginina han fet falta fins a 5 reacoblaments, i fins i tot així no s'ha aconseguit un acoblament del 100% de manera que ha estat necessari acetilar abans de continuar amb la síntesi. En el transcurs de tota la síntesi de la generació 1 els acoblaments d'arginina han estat molt difícils. S'han provat diversos agents acoblants (TBTU, DIPCDI, PyBOP, PyAOP, HATU) i dissolvents (DMF, mescles DMF:DCM, NMP), però no s'ha trobat una metodologia que permetés acoblar l'arginina al 100%.

Pel que fa als acoblaments de lisina (K), serina (S) i norvalina (Nva) si es comparen amb la síntesi del tronc comú també han estat molt més complicats, però en la majoria dels casos s'ha aconseguit una acoblament quantitatiu. Pels acoblaments de glicina i alanina, s'han pogut obtenir bons rendiments mitjançant la utilització de l'anhídrid simètric.

De fet, durant la síntesi ha quedat clar que la dificultat d'introducció de cada aminoàcid és proporcional a la seva mida, essent l'arginina l'aminoàcid que més problemes ha donat seguit de la lisina. En l'anàlisi dels crus de síntesi, es pot veure clarament que en funció del nombre d'arginines de la seqüència, la qualitat del cru ha estat més baixa. La principal impuresa que s'ha detectat han estat restes acetilades del tronc comú (Ac-TrC), presents en un 5-30% (figura 4.6).

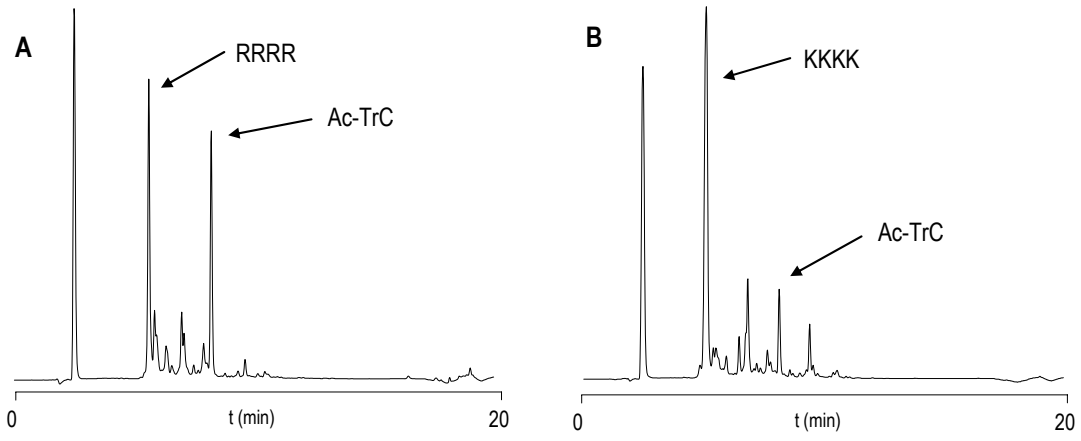


Figura 4.6 HPLC d'alguns crus representatius de la generació 1 (gradient: 5-50% B en 15min.).
A – cru RRRR. **B** – cru KKKK.

Finalment, tot i els problemes trobats durant la síntesi s'han pogut sintetitzar tots els pèptids amb un rendiment d'entre el 40 i el 60%.

Està clar que durant la síntesi s'ha produït un col·lapse de resina que ha provocat una notable disminució dels rendiments de síntesi. Per col·lapse de resina, s'entén l'agregació que es produeix entre el pèptid que està creixent i els altres pèptids creixents o el suport polimèric. L'agregació de la peptidil-resina, disminueix molt l'eficiència de les diferents etapes de la síntesi, ja que alguns dels pèptids creixents passen a ser inaccessibles per als reactius i alguna de les etapes no es pot completar al 100%[157]. Lògicament, aquest fet és més notori quan l'aminoàcid entrant és molt voluminós com és el cas de l'arginina. Aquest fenomen, quan es produeix, normalment es dóna a partir de la incorporació del cinquè o sisè aminoàcid, i és especialment freqüent en pèptids rics en Ala, Val, Ile, Asn o Gln en l'extrem C-terminal[158].

En el cas del tronc comú, de set residus que conté, més de la meitat són alanines. A més a més, l'efecte s'ha vist clarament agreujat pel fet d'haver assecat la resina, ja que a l'eliminació del solvent afavoreix que les cadenes peptídiques agreguin entre sí.

4.1.2.2 Generació 2

En aquest punt s'ha plantejat un dilema, ja que veient les dificultats ocasionades pel col·lapse de resina, agreujades pel fet d'haver-la assecat, podria semblar més convenient començar una nova síntesi

---

[157] Lloyd-Williams, P., Albericio, F. & Giralt, E., "Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins", CRC Press, Boca Raton, 1997, pp. 65-67

[158] J.Bedford, Hyde, C.,Johnson, T., Jun, W., Owen, D., Quibell, M. & Sheppard, R.C., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, (1992), **40**, 300-307

de tronc comú que utilitzar la mateixa preparació que en la generació 1. Per evitar llençar quasi 2g de peptidil-resina, s'ha intentat buscar alguna metodologia per contrarestar l'efecte de l'assecat.

En alguns casos, s'ha vist que la utilització de DMSO pot ser força útil per millorar la solvatació de seqüències propenses a patir fenòmens d'agregació durant la síntesi[159]. Per comprovar aquest fet, s'han realitzat diferents tractaments a petites alíquotes de la peptidil-resina amb Tronc comú prèviament secada. Els tractaments han estat basats en la utilització de diferents combinacions de DMF i DMSO a diferents temperatures durant 2h. Prèviament, totes les alíquotes s'han tractat amb DCM durant uns 30min i amb DMF durant 1h aproximadament. L'eficiència del tractament, s'ha avaluat de dues maneres: primer, visualment s'ha comprovat l'inflament de resina, i segon, després del tractament s'ha intentat acoblar arginina i s'ha avaluat el resultat mitjançant el test de Kaiser (taula 4.5).

	Tractament			**Acoblament posterior**[a]	
	Medi	Temperatura (ºC)	Avaluació visual	Agents acoblants	Resultat test
1	DMF	60	No varia	PyBOP/HOBt	Positiu clar
2	DMF amb 20% DMSO	60	S'encongeix	PyBOP/HOBt	Positiu clar
3	DMF amb 20% DMSO	60	S'encongeix	PyAOP/HOAt	Positiu clar
4	DMSO	60	S'infla	PyBOP/HOBt	Entre positiu i negatiu
5	DMF	25	No varia	PyBOP/HOBt	Positiu clar
6	DMF amb 20% DMSO	25	S'encongeix	PyBOP/HOBt	Positiu clar

Taula 4.5 – Resum dels tractaments provats per recuperar la peptidil-resina.
a - En tots el casos l'acoblament s'ha realitzat amb 5 equivalents d'arginina.

El millor resultat s'ha obtingut mitjançant el tractament en DMSO a 60ºC. Això es deu al propi DMSO però també a l'efecte de la temperatura, que probablement ajuda a trencar els agregats. Davant aquest resultat, s'ha comprovat l'efecte de fer directament l'acoblament en DMSO. Per comprovar-ho, s'ha comparat l'eficiència d'un acoblament en DMSO a temperatura ambient amb un acoblament en DMSO a 60ºC, utilitzant PyBOP/HOBt com a agent acoblant. En el cas de l'acoblament a 60ºC, el resultat ha estat molt dolent, i l'explicació més probable és que a 60ºC es degrada el PyBOP. En canvi a temperatura ambient el resultat ha estat força bo.

[159] Oliveira, E., Miranda, A., Albericio, F., Andreu, D., Paiva, A.C.M., Nakaie, C.R. & Tominaga, M., *J. Pept. Res.*, (1997), **49**, 300-307

Veient aquest resultat s'ha decidit tirar endavant la síntesi de la generació 2 a partir de la mateixa preparació de Tronc comú que la utilitzada en la generació 1. Per compensar l'efecte negatiu de l'assecat de la resina, s'han tractat les diferents alíquotes en DMSO a 60ºC durant 2h.

En aquesta generació, s'han sintetitzat els pèptids que contenen substitucions de Dapa, Dab, Orn (total 12 pèptids).

En les primeres etapes de síntesi, s'han realitzat els acoblaments en DMSO i amb PyBOP/HOBt com a agents acoblants. Els rendiments dels acoblaments però, tampoc han estat gaire alts. Això probablement es deu a l'elevada viscositat del DMSO, la qual dificulta el repartiment homogeni dels reactius, reduint així l'eficiència de l'acoblament. A més a més, en el transcurs de la síntesi la peptidil-resina ha tornat a col·lapsar progressivament.

Per aquesta raó, s'ha repetit el tractament en DMSO a 60ºC durant 2h, però posteriorment s'ha continuat la síntesi utilitzant com agents acoblants DIPCDI/HOBt en DMF:DCM (1:1) durant temps llargs. Mitjançant la utilització d'una carbodiimida, s'obtenen espècies que no són tan reactives com les que s'obtenen amb agents acoblants basats en sals d'uroni o fosfoni. Aquestes espècies però, en general són més estables i són molt útils en casos com aquest, en els quals degut al col·lapse de la resina els reactius tenen dificultats per accedir a les cadenes peptídiques creixents i s'han d'utilitzar temps d'acoblament molt elevats. La combinació de solvents s'ha escollit perquè s'hi ha observat una bona solvatació un cop la resina s'ha tornat a inflar mitjançant el tractament en DMSO a 60ºC. En aquestes condicions, la síntesi ha funcionat molt bé, tot i que per evitar possibles pèptids de delació, després de cada incorporació d'arginina s'ha dut a terme un tractament d'acetilació.

Durant tota la síntesi, per dur a terme les desproteccions del grup Fmoc, s'ha utilitzat la mescla DBU/piperidina/toluè/DMF (5:5:20:70). Aquestes condicions són més dràstiques que les clàssiques utilitzades en química Fmoc (20% piperidina en DMF). La DBU és una amina terciària que augmenta notablement la velocitat de desprotecció i disminueix la enantiomerització[160]. En aquestes condicions, també s'hi afegeix piperidina per segrestar el dibenzofulvè que es forma en la β-eliminació del grup Fmoc, i així evitar una possible N-alquilació de la cadena peptídica. A més a més, el toluè també solvata molt bé la resina, de manera que s'assegura que aquesta estigui ben inflada durant tota la síntesi.

Finalment, gràcies al tractament en DMSO i a les condicions de síntesi s'ha aconseguit millorar molt l'eficiència del procés, obtenint-se rendiments de síntesi d'entre el 60 i el 80%. A més a més, pràcticament no s'ha detectat la presència de restes de Tronc comú acetilat (figura 4.7).

---

[160] Wade, J.D., Bedford, J., Sheppard, R.C. & Tregear, G.W., *Pept. Res*, (1991), **4**, 194-199

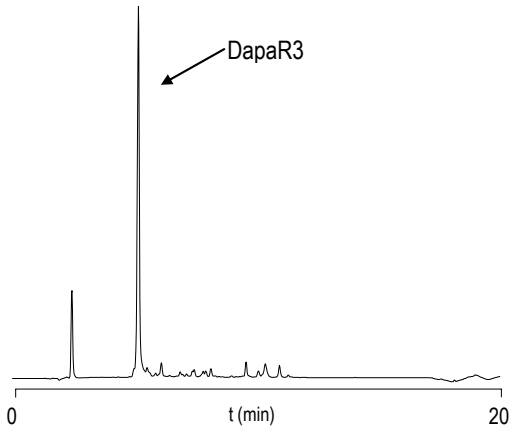


Figura 4.7 HPLC d'un cru representatiu de la generació 2 (gradient: 5-50%B en 15min.).

Així doncs, es pot concloure que s'ha posat a punt un mètode eficaç per a recuperar la peptidil-resina i poder tirar endavant la síntesi amb uns rendiments força bons. En resum, les condicions són:

1- Tractament en DMSO a 60ºC durant 2h.

2- Acoblaments amb DIPCDI/HOBt en DMF:DCM (1:1) durant > 5h.

3- Desproteccions en DBU/piperidina/toluè/DMF (5:5:20:70).

S'ha aplicat també aquesta metodologia en la síntesi del pèptid NoW, obtenint-se un bon resultat[161].

4.1.2.3 Generació 3

En aquesta tercera generació, s'han preparat els pèptids amb substitucions basades en la utilització de residus amb grups guanidinis en les cadenes laterals. Així, s'han preparat els pèptids amb substitucions de h, Rab i Rys (total = 9 pèptids).

Si es fa una anàlisi retrosintètica dels residus h, Rab i Rys, es veu que corresponen a versions guanidilades dels aminoàcids ornitina, diaminobutíric i lisina respectivament (figura 4.8). En un primer moment es va plantejar la possibilitat de preparar els aminoàcids h, Rab i Rys en solució i utilitzar-los posteriorment en la síntesi en fase sòlida. Malgrat això, en la bibliografia es poden trobar exemples de la seva preparació directament en fase sòlida i per això s'ha optat per fer tota la síntesi de la generació 3 en fase sòlida.

[161] Síntesi realitzada per Sílvia Pujals durant una estada en el laboratori.

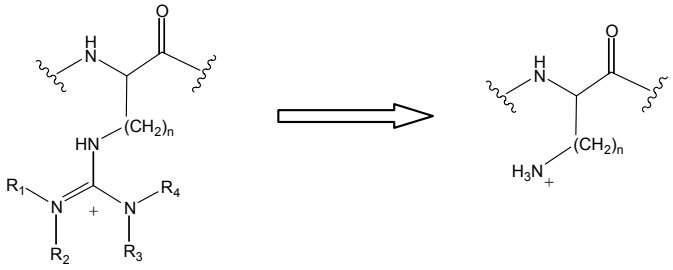


Figura 4.8 Anàlisi retrosintètica dels residus h, Rab i Rys

Quan a les reaccions de guanidilació, l'estratègia sintètica utilitzada s'ha escollit en funció del tipus de guanidilació a realitzar. En tots els casos, però, aquesta s'ha basat en la guanidilació d'amines primàries amb diferents reactius. Com a estratègia sintètica, primer s'ha preparat el pèptid lineal mitjançant química Fmoc/tBu amb les amines a guanidilar protegides amb el grup Alloc. Un cop acabada la síntesi del pèptid lineal, s'ha desprotegit el grup Alloc i s'ha dut a terme la reacció de guanidilació (figura 4.7).

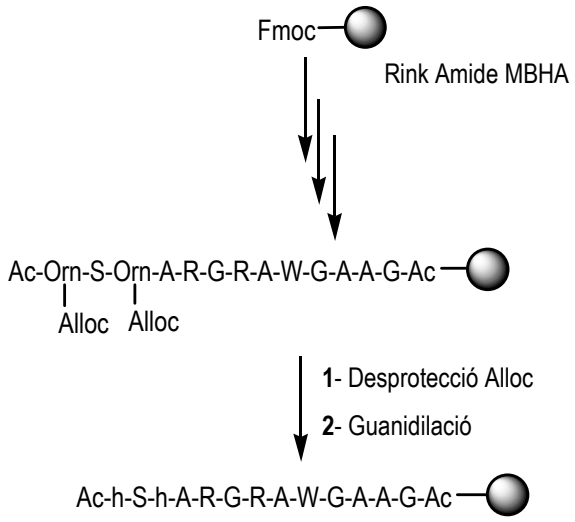


Figura 4.9 – Estratègia de síntesi utilitzada pel pèptid h2R2, exemple de la generació 3.

Com a alternativa, es podria plantejar la desprotecció i guanidilació de cada amina abans de continuar la síntesi lineal, ja que és raonable pensar que sigui difícil guanidilar simultàniament fins a quatre posicions alternades en la seqüència. Malgrat això, s'ha preferit dur a terme la síntesi lineal completa, perquè en el grup s'ha vist que en alguns casos la desprotecció de les amines de la cadena lateral pot provocar la desprotecció del grup Fmoc de l'esquelet.

Per dur a terme la síntesi d'aquesta generació s'ha fet una nova preparació del Tronc comú. En la síntesi de les generacions 1 i 2, s'ha vist que aquesta és una seqüència difícil i amb propensitat a

fenòmens d'agregació al llarg de la síntesi. Per aquesta raó, en la síntesi d'aquesta nova generació, s'han pres les següents mesures:

1- S'ha utilitzat la mateixa resina que en les generacions 1 i 2, però s'ha disminuït la funcionalització de la resina fins a 0,40 mmol/g.

2- Durant la síntesi s'ha evitat deixar seca la peptidil-resina. Així, les aliquotacions s'han realitzat mitjançant separació en volums iguals de suspensions en DMF i durant les nits o caps de setmana la peptidil-resina s'ha deixat en DCM.

La síntesi s'ha realitzat mitjançant la utilització de PyBOP/HOBt com a agents acoblants en DMF i les desproteccions s'han realitzat amb piperidina 20% en DMF. La síntesi lineal ha transcorregut sense problemes i en general no ha estat necessari realitzar cap reacoblament. L'únic problema, ha aparegut en l'etapa de desprotecció dels grups Alloc amb pal·ladi, ja que ha estat necessari repetir el tractament fins a 5 vegades. Això pot ser degut tant a l'elevat nombre de residus que s'han de desprotegir (fins a quatre en alguns casos) com a la possibilitat que el reactiu de pal·ladi no estigui en bon estat.

La sorpresa ha estat en el moment d'analitzar els crus de síntesi dels pèptids. Al contrari del que es podia esperar tenint en compte com havia transcorregut la síntesi, els HPLC dels crus han estat de molt baixa qualitat essent els pèptids desitjats els pics de menor proporció. En l'anàlisi per espectrometria de masses, es pot veure clarament com a mesura que la cadena peptídica ha anat creixent s'han anat obtenint pèptids acetilats més curts. En una anàlisi més detallada, es pot veure que cadascuna de les versions acetilades més curtes, correspon a un pèptid en el qual en lloc de haver-s'hi incorporat l'arginina corresponent s'ha acetilat, bloquejant així el posterior creixement de la cadena peptídica (figura 4.10). Aquest fet és força sorprenent, ja que en el transcurs de la síntesi no s'ha dut a terme cap etapa d'acetilació fins al final de tot.

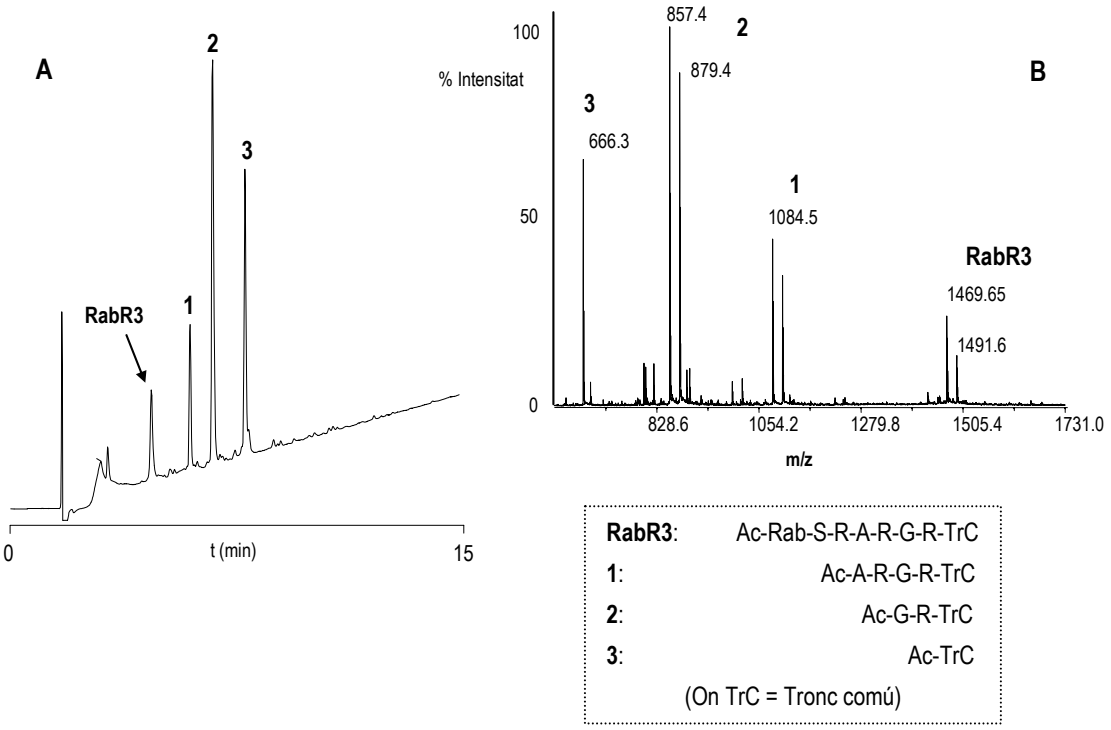


Figura 4.10 Cru del RabR3. **A** - HPLC (gradient 0-50%B en 15min.) **B** – MALDI

Aquest patró d'acetilacions ha fet sospitar que el problema hagi estat l'arginina utilitzada en aquesta generació. Una anàlisi més meticulosa d'altres síntesis realitzades al laboratori ha mostrat també la presència d'impureses corresponents a acetilacions parcials de la cadena peptídica en les etapes d'incorporació d'arginina. En l'anàlisi del lot d'arginina utilitzat s'ha detectat un lleuger olor d'àcid acètic. Així, la raó més probable és que durant el procés de fabricació d'aquest lot d'arginina en algun punt s'hagi utilitzat àcid acètic que posteriorment no s'ha eliminat convenientment. En dur a terme l'acoblament de l'arginina en presència de restes d'àcid acètic, amb els agents acoblants lògicament també es produeix una activació de l'acètic i aquest s'uneix a l'amino lliure de la peptidil-resina. Tenint en compte que es treballa amb un gran excés (5 eq.), encara que la proporció d'acètic sigui petita, aquest efecte és molt notori ja que és una molècula molt més petita que l'arginina i reacciona molt més ràpidament.

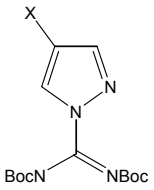
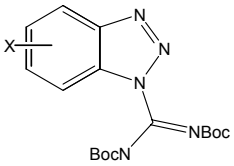
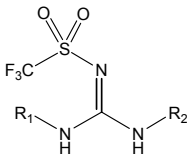
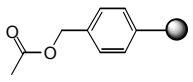
S'ha de dir que en les altres síntesis on s'ha detectat aquesta impuresa, la fracció acetilada és menor que en el cas dels pèptids de la generació 3. Una possible explicació d'aquest fet, es pot deure a la dificultat de la síntesi. Així, qualsevol "competidor" de l'arginina per unir-se a la cadena peptídica creixent, tindrà més efectivitat com més dificultats tingui la pròpia arginina per unir-s'hi. Aquest mateix fet es pot veure en la síntesi de cadascun dels pèptids de la generació 3, ja que en el primer acoblament d'arginina només s'acetila el 30% de la cadena peptídica, però en els posteriors acoblaments les fraccions acetilades són de més del 60%.

Finalment, s'han obtingut uns rendiments de síntesi menors al 10% pels pèptids RabR3, RysR3 i hR3 i al voltant del 20% pels pèptids Rab2R2, Rys2R2 i h2R2. Pels pèptids sense arginines (Rab4, Rys4 i hhhh) el rendiment de síntesi del pèptid lineal ha estat força bo i el rendiment global bàsicament només s'ha vist condicionat per l'eficiència del procés de guanidiliació.

Pel que fa a les etapes de guanidilació, s'han dut a terme de la següent manera:

1- Obtenció dels pèptids amb Rab i Rys

Tal i com s'ha mencionat anteriorment les arginines sovint tenen un paper crucial en processos de reconeixement entre pèptids i proteïnes. D'altra banda, el grup guanidini és molt freqüent tant en un gran nombre de metabolits com en un gran nombre de fàrmacs. Per aquesta raó, en la bibliografia, hi ha descrits diversos reactius útils per a l'obtenció de grups guanidini a partir d'amines (taula 4.7).

		
1a X = H	**2a** X = H	**3a** R1 = R2 = Boc
1b X = NO_2	**2b** X = 5-Cl	**3b** R1 = Boc
	2c X = 6-NO_2	R2 = 

Taula 4.7 – Agents guanidiliants descrits en la bibliografia.

Malgrat que la utilització dels reactius **1a** i **1b** és de les més comunes i s'ha utilitzat per obtenir pèptids petits amb un residu de lisina guanidiliat[162], s'ha vist que en casos amb elevat impediment estèric o amb més d'una posició a guanidilar no són suficientment potents per poder completar la reacció. En casos amb elevat impediment estèric s'ha vist que la utilització de **2a,** o versions més reactives gràcies a la presència de grups atraients d'electrons (**2b i 2c**), pot produir rendiments força més alts[163]. Mitjançant la utilització del reactiu **3a**, també s'han obtingut bons resultats i a més a més ha demostrat ser eficaç per a la síntesi de pèptids amb dos grups amino per guanidiliar alternats en la seqüència[164]. El reactiu **3b**, és molt útil quan es vol guanidiliar un grup amino d'una molècula en solució.

---

[162] Yong, Y.F., Kowalski, J.A., Thoen, J.C. & Lipton, M.A., *Tetrahedron Lett*., (1999), **40**, 53-56

[163] Musiol, H. & Moroder, L., *Organic Lett*., (2001), **3**, 3859-3861

[164] Feichtinger, K., Sings, H.L., Baker, T.J., Matthews, K. & Goodman, M., *J. Org. Chem*., (1998), **63**, 8432-8439

Amb aquest reactiu es guanidila la molècula i aquesta queda ancorada a la fase sòlida, de manera que al final és necessari un tractament amb TFA per alliberar-la. Aquest reactiu ha donat molt bons resultats per a monoguanidilacions, però el fet que la molècula quedi ancorada a la resina fa que sigui poc útil quan hi ha varies posicions a guanidilar en la mateixa molècula.

Així doncs, tenint en compte els exemples descrits en la bibliografia, per dur a terme la reacció de guanidilació s'ha escollit el reactiu **3a.** La reacció s'ha realitzat mitjançant la utilització de 5 equivalents de **3a** per grup amino juntament amb 5 equivalents de trietilamina en DCM. La reacció transcorre bastant lentament, de manera que s'ha deixat reaccionar força temps. Pel cas del RabR3 i el RysR3 ha estat suficient un sol tractament, però per a tots els altres pèptids ha estat necessari repetir el tractament.

En l'anàlisi dels crus, es pot veure que en els pèptids amb combinacions de arginina i Rys o Rab l'etapa de guanidilació ha estat pràcticament quantitativa. S'ha de tenir en compte, però, que degut a les impureses d'acètic en el lot d'ariginina utilitzat la quantitat real d'equivalents d'agent guanidilant utilitzat és molt més gran de la que es creia. Tot i això, en la síntesi dels pèptids Rab4 i Rys4 com que no s'ha utilitzat arginina, sí es poden treure més conclusions de l'etapa de guanidilació. Per aquests pèptids, tot i observar-se una petita fracció a la que li falta un dels quatre grups guanidini, l'etapa de guanidilació ha funcionat molt bé i el rendiment global de síntesi ha estat força bo (figura 4.11). Aquest fet, valida la utilització del reactiu **3a** per a guanidilar en múltiples posicions pèpitds amb impediments estèrics. D'altra banda, en l'anàlisi per espectrometria de masses no s'han observat pics corresponents a una possible reacció secundària amb el triptòfan.

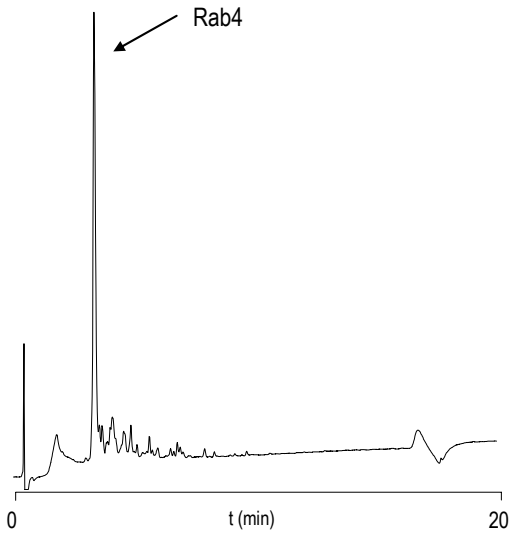


Figura 4.11 – HPLC del cru del pèptid Rab4 (gradient 5-50%B en 15min).

2- Obtenció dels pèptids amb grups guanidini N-substituïts (h)

En el nostre grup, s'ha explorat la utilització d'agents acoblants basats en sals d'uroni com és l'HATU per a la conversió d'amines en grups guanidini pentasubstituïts[165]. En aquesta metodologia s'aprofita una reacció secundària que es pot donar en la síntesi de pèptids quan s'utilitzen aquests agents acoblants. Aquests reactius normalment activen el carboxilat de l'aminoàcid que es vol acoblar, però en situacions en les que hi ha un excés d'aquest reactiu o en les que l'activació es dóna lentament l'agent acoblant pot reaccionar directament amb el grup amino de la cadena peptídica, provocant-ne així la guanidilació (figura 4.12)

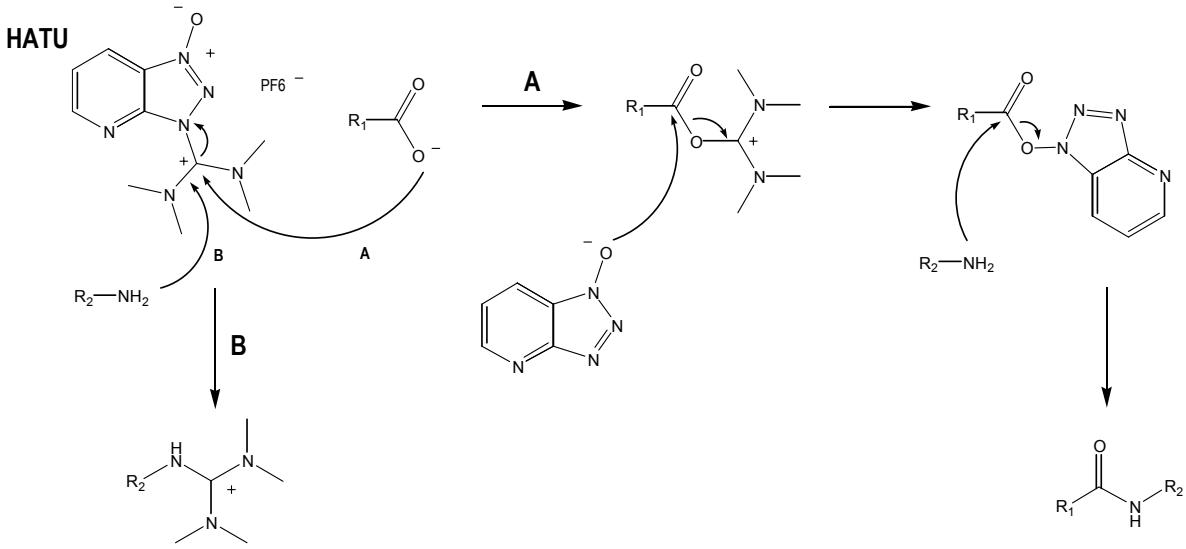


Figura 4.12 A – Mecanisme de reacció quan l'HATU actua com a agent acoblant.
B – Reacció secundària de guanidilació.

Per dur a terme la síntesi dels pèptids amb h s'ha aprofitat aquesta reacció secundària. La reacció s'ha dut a terme amb 3 equivalents d'HATU i 6 equivalents de DIEA durant una nit. Segons el test de Kaiser, pels pèptids hR3 i h2R2 aquest únic tractament ha estat suficient per guanidiliar totes les amines lliures. En canvi, pel pèptid hhhh ha estat necessari repetir el tractament. Tot i així, la reacció no ha estat quantitativa i s'ha decidit acetilar les amines restants. Aquesta etapa d'acetilació s'ha realitzat per facilitar la purificació posterior, ja que així, els pèptids que no s'hagin guanidiliat completament tindran una càrrega inferior.

En l'anàlisi dels crus es pot veure que pels pèptids hR3 i h2R2 la reacció ha anat força bé, tot i que en el h2R2 s'han detectat algunes restes de pèptid només monoguanidilades. En el cas del pèptid hhhh, el rendiment de la reacció de guanidilació ha estat baixíssim (figura 4.13). De fet, en l'anàlisi per

[165] Fresno, M. del, El-Faham, A., Carpino, L.A., Royo, M. & Albericio, F., *Organic Lett.*, (2000), **2**, 3539-3542

espectrometria de masses s'han observat múltiples pics que no s'han pogut assignar. Això, d'una banda suggereix que la reacció ha estat incompleta i de l'altre la possibilitat de que s'hagi donat alguna mena de reacció secundària amb el triptòfan. S'ha de tenir en compte que la quantitat d'agent guanidilant respecte el triptòfan utilitzada pel pèptid hhhh és força més gran que en el cas del hR3 i h2R2.

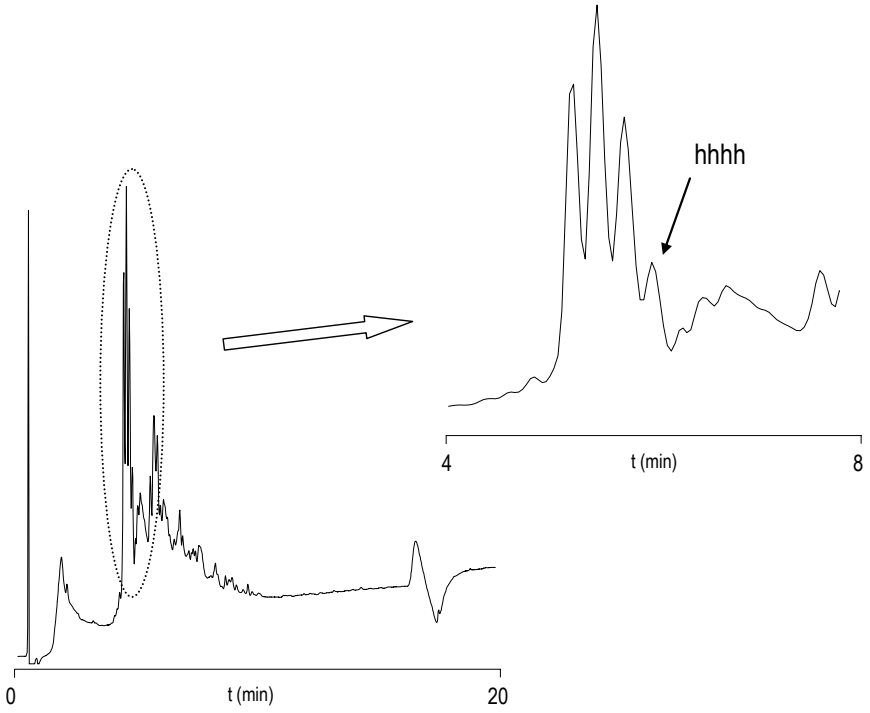


Figura 4.13 – HPLC del cru del pèptid hhhh (gradient 0-50%B en 15min.).

Així doncs, de la síntesi de la generació 3 es pot concloure que s'ha posat a punt un mètode de síntesi de pèptids basats en la seqüència del retro-Candidat 4, els quals s'ha vist que sintèticament són força complicats degut a fenòmens d'agregació al llarg de la síntesi. Així mateix, tot i la utilització d'un lot d'arginina en mal estat que ha fet disminuir moltíssim el rendiment, s'han pogut sintetitzar tots els pèptids desitjats, essent destacable la síntesi de tres pèptids amb guandiliació de quatre posicions alternades.

4.1.2.4 Generació 4

En aquesta última generació s'han sintetitzat els pèptids dissenyats per introduir diversitat en l'esquelet excepte el NoW (total = 5 pèptids).

La síntesi s'ha realitzat mitjançant síntesi automàtica en paral·lel seguint una estratègia Fmoc/tBu i utilitzant TBTU/HOBt com agents acoblants. En una primera síntesi, s'han obtinguts uns crus de baixíssima qualitat com a conseqüència de la utilització de l'arginina impurificada d'acètic. Degut a la presència de fins a quatre arginines, en aquest cas el rendiment ha estat tan baix que s'ha preferit

repetir la síntesi utilitzant un nou lot d'arginina. Tot i això, és de destacar que per al pèptid Daa, el qual té aminoàcids D en les posicions que envolten les arginines, el rendiment de la síntesi utilitzant l'arginina en mal estat ha estat molt més alt que per tots els altres pèptids (figura 4.14).

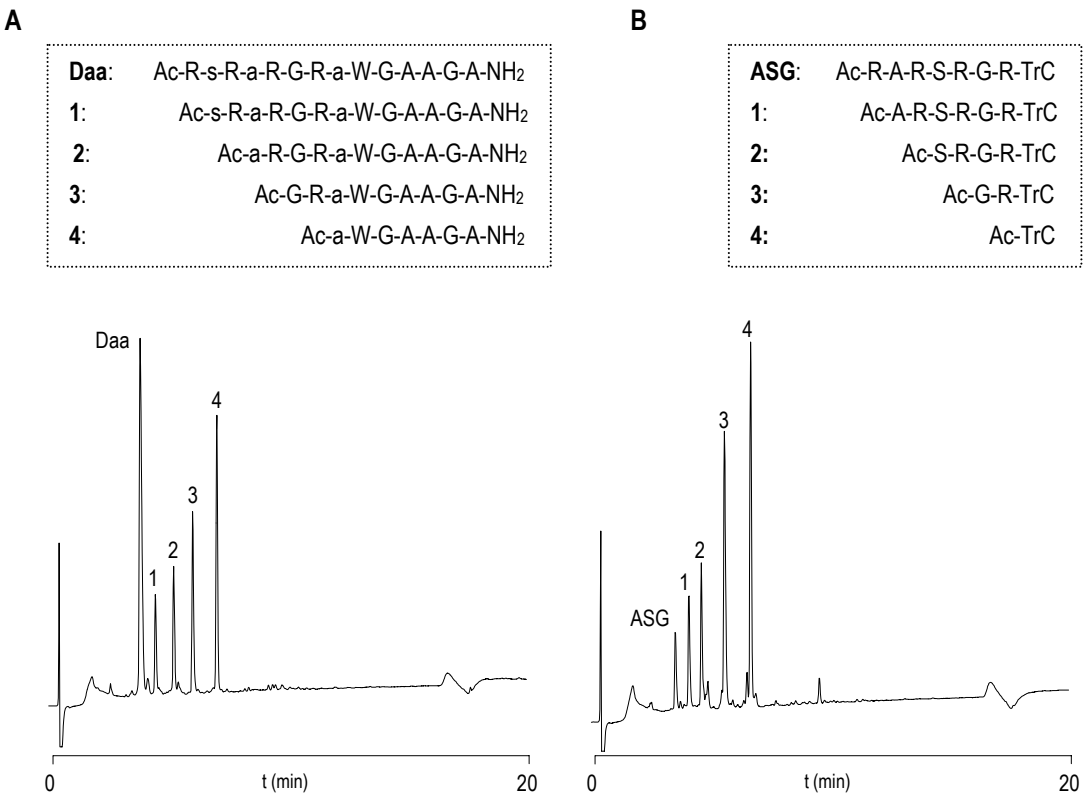


Figura 4.14 Comparació entre els HPLC dels crus de Daa i ASG obtinguts en la síntesi amb arginina impurificada d'àcid acètic (gradient 0-50%B en 15min). **A** – Daa. **B** - ASG

Una possible hipòtesi per explicar aquesta notable diferència, podria ser que durant la síntesi el pèptid agrega o adopta alguna estructura secundària que dificulta molt l'acoblament dels nous aminoàcids , sobretot dels més voluminosos. L'alternança dels aminoàcids D amb les L-arginines, és possible que eviti la formació d'aquesta estructura secundària i/o agregats. Això, pot afavorir l'acoblament dels nous aminoàcids, de manera que l'efecte de la presència d'un "competidor" com són les restes d'acètic té un impacte menor. En una anàlisi més detallada es pot veure que per al pèptid Daa, en cada acoblament d'arginina s'acetila entre el 20 i el 35%, en canvi, per al pèptid ASG el qual té una seqüència molt similar, en el primer acoblament hi ha una acetilació del 35% i en els posteriors al voltant del 60%. Aquest fet, reafirma la idea que aquesta és una seqüència peculiarment complicada.

La síntesi s'ha repetit per a tots els pèptids excepte el Daa. En la repetició però, el rendiment de la síntesi tampoc ha estat massa bo i s'han trobat múltiples pèptids de deleció (figura 4.15). Així, s'han obtingut rendiments de síntesi d'entre el 15 i el 30%. Una possible explicació és que a diferència de la generació 3, en aquest cas no s'ha disminuït la funcionalització inicial de la resina. De tota manera, la

funcionalització és la mateixa que la utilitzada en les generacions 1 i 2, i per tant, l'explicació més plausible la trobem en el fet que aquesta és una seqüència difícil que en les condicions utilitzades en el sintetitzador automàtic dóna uns rendiments molt baixos.

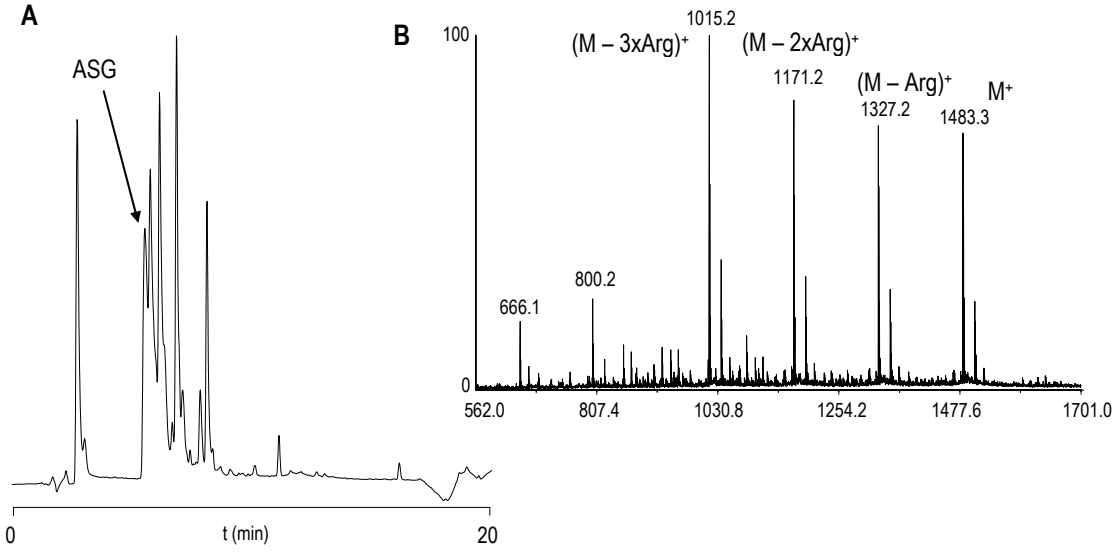


Figura 4.15 Exemple representatiu de la nova síntesi de la generació 4.
A – HPLC cru ASG (gradient 5-50%B). **B** – MALDI cru ASG.

4.1.3 PURIFICACIÓ

4.1.3.1 Elecció de la columna

En l'anàlisi dels crus que s'han obtingut al llarg de la síntesi s'han pogut observar perfils d'elució molt diferents en funció de la columna utilitzada. Així, s'ha pogut veure que si es comparen els perfils d'elució utilitzant una columna Symmetry300™ C_{18} i una columna Symmetry® C_{18}[166], amb la primera s'obté una resolució molt millor (figura 4.16).

[166] Columnes de la casa comercial Waters

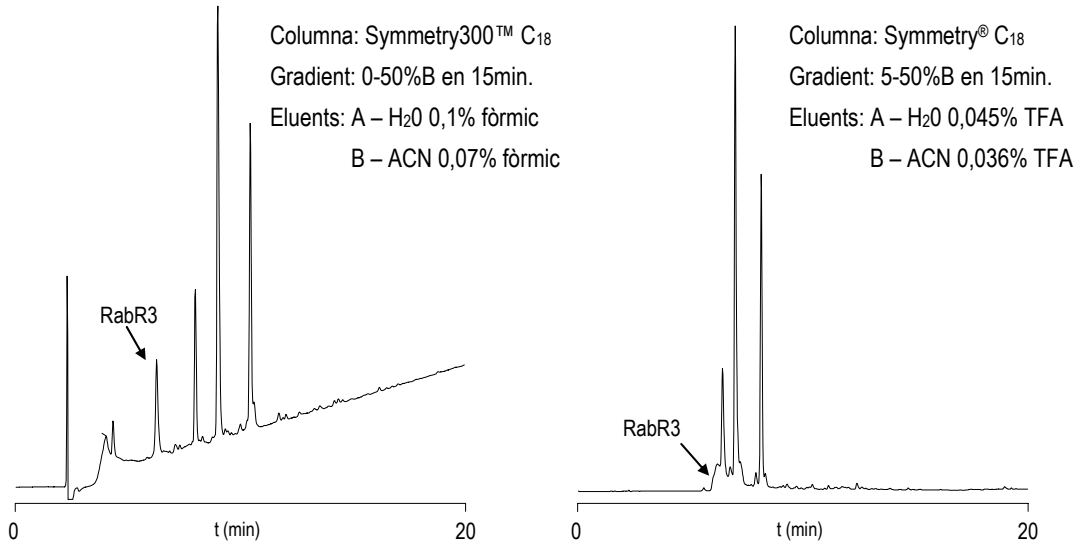


Figura 4.16 Comparació del perfil d'elució del cru del pèptid RabR3 en funció de la columna utilitzada.

Entre els dos tipus d'elució, hi trobem dues diferències que poden condicionar la resolució. Primerament, el fet d'utilitzar TFA o fòrmic en la fase mòbil pot afectar però difícilment serà l'única causa d'un efecte tan dramàtic com l'observat per als pèptids de la quimioteca. En segon lloc, entre aquestes dues columnes hi ha petites diferències que per a un cert tipus de molècules poden resultar fonamentals. Aquestes diferències són[167]:

1- En la Symmetry300™, el tamany de porus de les partícules és de 300Å, mentre que en la Symmetry® és només de 100Å.

2- En les columnes Symmetry300™, hi ha una menor densitat de silanols.

El rebliment d'aquestes columnes, està format per partícules esfèriques de sílica porosa la qual s'ha derivatitzat amb clorosilans alifàtics C_{18} (figura 4.17). En ambdós casos el tamany d'aquestes partícules és de 5μm. Quan es derivatitza la sílica, poden quedar grups silanol sense reaccionar, els quals poden interaccionar amb analits polars provocant un eixamplament dels pics corresponents. Aquest fenomen és especialment notori quan els analits són bàsics, ja que en les condicions d'elució àcides, aquests estan carregats positivament i a part de la retenció en funció del caràcter hidrofòbic de l'analit es pot produir una forta interacció polar que encara eixampla més els pics.

[167] "Chromatography columns and supplies catalog", Waters corporation, 2003-2004

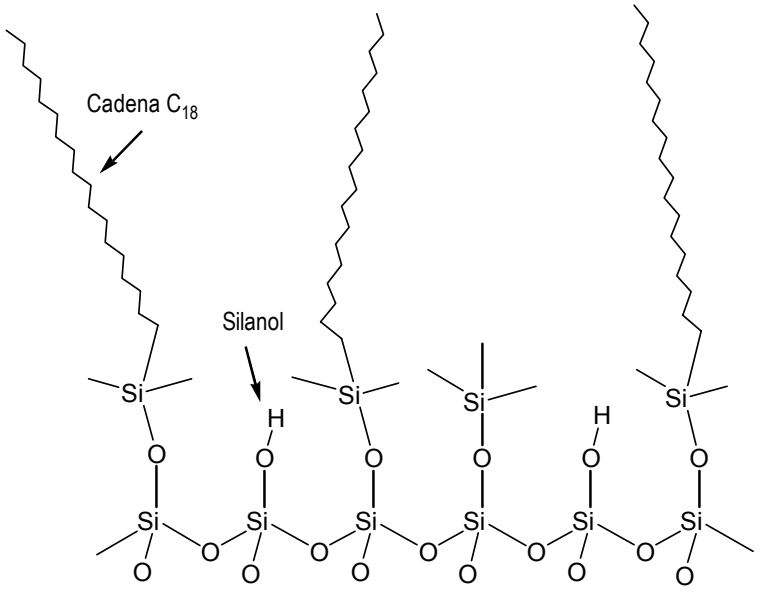


Figura 4.17 – Estructura del rebliment de les columnes Symmetry en general.

La quantitat de silanols lliures, en certa mesura, depèn de la qualitat dels reactius utlitzats en la preparació industrial de les columnes. Per a aquestes columnes en ambdós casos es realitza un tractament amb trimetilclorosilà, per tal d'eliminar els silanols que queden per reaccionar. Tot i això aquest tractament no és suficient i poden quedar alguns silanols lliures. En la preparació de les columnes Symmetry300™, gràcies a la utilització de reactius ultrapurs, s'obté una menor de densitat de silanols.

Tenint en compte l'elevada densitat de residus bàsics que contenen els pèptids, la causa més probable d'aquesta diferència en els perfils d'elució és la diferent quantitat de silanols lliures que queden en un i altre rebliment. A més a més, tenint en compte el tamany dels pèptids sintetitzats, és poc probable que la diferència en el perfil d'elució es degui al diferent tamany de porus.

Així doncs, considerant els resultats obtinguts a escala analítica, s'ha decidit realitzar la purificació dels pèptids de la quimioteca amb una columna preparativa Symmetry300™ C_{18}.

Per tal de purificar pèptids rics amb grups bàsics, hi ha dues alternatives més basades en la utilització de diferents rebliments. D'una banda es podria utilitzar una columna SymmetryShield™ la qual incorpora en la cadena alifàtica de C_{18} un grup polar el qual apantalla l'efecte dels silanols lliures. De l'altra, es podria utilitzar una columna XTerra® en la qual s'utilitza un procés de preparació que permet obtenir la sílica amb un cert grau de metilsilà. Així es disminueix la quantitat de silanols i a més a més, s'augmenta la resistència del rebliment a la hidròlisi fet que permet treballar a pH bàsic (figura 4.18).

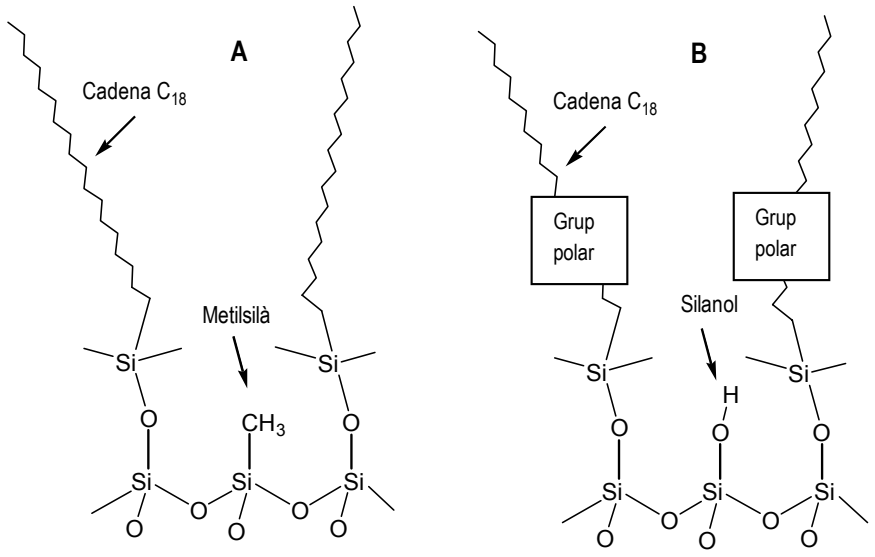


Figura 4.18 A – Esquema del rebliment d'una columna X-Terra®. **B** – Esquema del rebliment d'una columna SymmetryShield™.

4.1.3.2 Purificació de la quimioteca

La purificació dels pèptids de la quimioteca s'ha realitzat mitjançant una HPLC-MS preparatiu. Per tal d'obtenir una millor resolució s'ha utilitzat un columna Symmetry300™ C_{18} preparativa. Tot i això, alguns pèptids s'han provat de purificar amb una columna Symmetry® C_{18} preparativa, obtenint-se uns rendiments molt més baixos.

En aquesta etapa de purificació, s'ha buscat obtenir els pèptids amb un nivell de puresa suficient per poder-ne fer una avaluació preliminar de la seva interacció amb la p53_tetS. Per això, en la majoria dels casos només s'ha dut a terme una purificació de tot el cru de síntesi a la vegada. Amb alguns quants pèptids amb perfils d'elució i temps de retenció diferents s'han posat a punt diferents gradients mitjançant proves amb injeccions de petites quantitats. Posteriorment aquests gradients s'han utilitzat directament en els pèptids amb perfils d'elució similars.

En general tots els pèptids s'han purificat utilitzant gradients d'aigua i acetonitril amb TFA en la fase mòbil. Amb alguns pèptids, però, s'ha vist que la utilització de fòrmic o TFA també n'afecta el seu perfil d'elució, de manera que s'han purificat utilitzant fòrmic en la fase mòbil.

Els graus de puresa i rendiments obtinguts han estat en funció dels crus de partida, obtenint-se uns graus de puresa més elevat per als pèptids en els que la síntesi havia funcionat millor (figura 4.19). La purificació, ha estat especialment difícil per als pèptids de la generació 3, ja que a part de tenir uns rendiments de síntesi molt baixos algunes de les impureses elueixen de forma molt similar als pèptids desitjats.

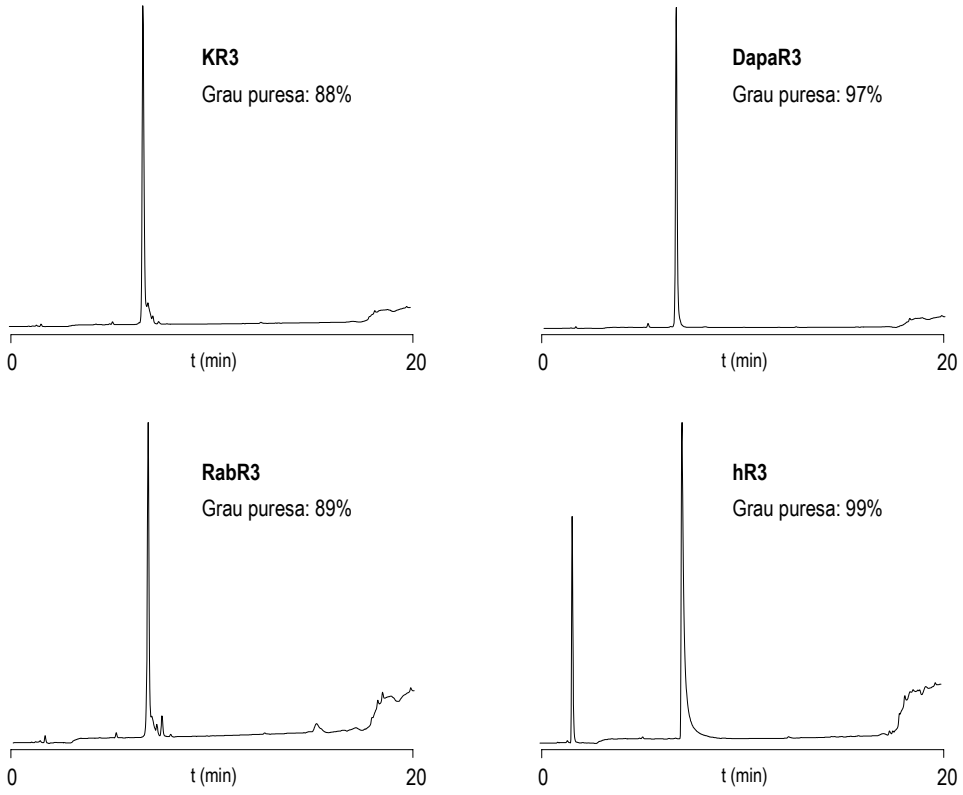


Figura 4.19 – Perfils d'elució d'alguns exemples representatius dels pèptids purificats (gradient: 0-50%B en 15min)

Finalment, doncs, s'han pogut purificar tots els pèptids de la quimioteca excepte els pèptids SSSS, Nva2R2, Nva3R i Nva4, els quals han donat molts problemes de solubilitat i s'ha decidit purificar-los en un futur si sembla interessant.

4.1.4 QUANTIFICACIÓ

En tots els pèptids de la quimioteca (excepte el NoW) hi ha un residu de triptòfan el qual absorbeix a 280nm, i per això s'ha decidit quantificar la quimioteca mitjançant espectroscòpia d'UV-Vis. Tenint en compte que la resta de residus no absorbeixen a aquesta longitud d'ona, s'ha considerat que tots els pèptids tenen el mateix coeficient d'extinció molar.

Per obtenir el coeficient d'extinció molar a 280nm en aigua, primerament s'ha quantificat el pèptid KKKK mitjançant anàlisi d'aminoàcids per triplicat. Posteriorment se n'han preparat quatre alíquotes en aigua de concentracions d'entre 80 i 10μM, i a partir de la regressió lineal de les seves absorbàncies

s'ha obtingut ε_{280nm} = 5,68 $M^{-1}cm^{-1}$ (figura 4.20). Aquest valor, està en consonància amb el valor teòric del coeficient d'extinció molar d'un residu de triptòfan el qual és de 5,69 $M^{-1}cm^{-1}$.[168]

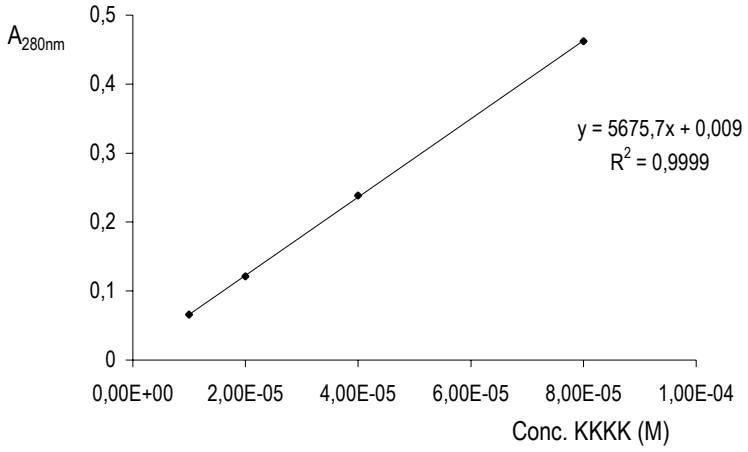


Figura 4.20 Determinació del coeficient d'extinció molar dels pèptids de la quimioteca a 280nm en aigua.

Per quantificar cadascun dels pèptids s'ha utilitzat l'absorbància a 280nm d'una dilució en aigua. Per tal d'assegurar la màxima precisió, s'han utilitzat alíquotes amb absorbàncies d'entre 0,1 i 1, ja que en aquest interval l'aparell té una bona precisió i a més a més s'hi manté la llei de Lambert-Beer.

Pel cas del pèptid NoW, la quantificació, s'ha dut a terme mitjançant anàlisi d'aminoàcids.

4.1.5 CONCLUSIÓ

Així doncs, tot i els problemes sintètics i de purificació que s'han trobat al llarg de la preparació de la quimioteca s'han pogut obtenir tots els 44 pèptids. De tota manera n'hi ha quatre que han quedat per purificar. En la taula 4.8, hi ha un resum de la preparació de la quimioteca amb la puresa del cru de síntesi, la puresa final i el rendiment global per a cadascun dels pèptids.

[168] Fersht, A., "Structure and mechanism in protein science", Ed. Freeman, New York, 2002, p 214

Generació 1

Pèptid	% Puresa cru	% Puresa final	% Rendiment global	Pèptid	% Puresa cru	% Puresa final	% Rendiment global
RRRR	35	78	10	**NvaR3**	46	96	12
KR3	49	88	22	**Nva2R2***			
K2R2	47	87	18	**Nva3R***			
K3R	57	89	24	**Nva4***			
KKKK	70	92	36	**SR3**	51	97	17
RKRR	42	92	22	**S2R2**	45	96	20
KRKR	54	88	24	**S3R**	47	90	10
KRRK	56	91	33	**SSSS***			
KKRK	68	89	29				

* Degut a la poca solubilitat la integració dels cromatogrames no és fiable.

Generació 2

Pèptid	% Puresa cru	% Puresa final	% Rendiment global	Pèptid	% Puresa cru	% Puresa final	% Rendiment global
DapaR3	60	97	27	**OrnR3**	66	97	23
Dapa2R2	75	97	32	**Orn2R2**	74	97	33
Dapa3R	78	99	38	**Orn3R**	80	97	35
Dapa4	83	98	40	**Orn4**	81	97	30
DabR3	63	96	30	**NoW**	70	98	31
Dab2R2	74	96	25				
Dab3R	75	96	36				
Dab4	72	95	48				

Generació 3[a]

Pèptid	% Puresa cru	% Puresa final	% Rendiment global	Pèptid	% Puresa cru	% Puresa final	% Rendiment global
hR3	6	99	1	**RysR3**	7	63 / 69	1 / 1
h2R2	24	78 / 97	2 / 2	**Rys2R2**	19	75 / 93	3 / 2
hhhh	4	69	0,3	**Rys4**	47	80	12
RabR3	9	89	3				
Rab2R2	23	71	12				
Rab4	60	75	14				

a- Degut a la baixa qualitat dels crus en alguns casos s'ha fet alguna re-purificació, obtenint-se dues fraccions separades per "/".

Generació 4

Pèptid	% Puresa cru	% Puresa final	% Rendiment global	Pèptid	% Puresa cru	% Puresa final	% Rendiment global
Daa	34	80	8	**Aleatori**	14	84	8
2xaa	15	87	8	**ASG**	20	84	10
0xaa	33	66	16				

Taula 4.8 – Taula resum de la preparació de la quimioteca.

4.2 AVALUACIÓ DE LA QUIMIOTECA

Tal i com s'ha esmentat en el capítol anterior, la tècnica escollida per dur a terme l'avaluació de la quimioteca ha estat l'espectroscòpia de fluorescència. Així doncs, a partir de les variacions observades en la fluorescència dels pèptids en addicionar-hi p53_tetS, s'ha pogut determinar la constant d'afinitat de cadascun dels pèptids de la quimioteca.

4.2.1 METODOLOGIA

Per tal de mantenir les condicions de les anàlisis amb els diferents pèptids el més reproduïbles possible, l'avaluació s'ha realitzat a 3μM de pèptid i en tampó fosfat 5mM, NaCl 1mM a pH 7. Aquesta concentració de fosfat, és prou baixa per no afectar excessivament a l'afinitat, però prou alta per assegurar que en tots els casos el pH serà el mateix i es mantindrà constant.

En proves preliminars s'ha pogut veure que en aquest tampó, si s'utilitza una longitud d'ona d'excitació de 295nm, en condicions d'elevat excés de p53_tetS la intensitat de fluorescència deguda a les seves tirosines és força important. Per aquesta, raó ha estat necessari realitzar un blanc per tal de restar-ne els seus valors.

La fluorescència és una tècnica molt sensible a tota mena de factors, i en valor absolut pot canviar bastant d'un dia per l'altre. En aquest sentit, el millor seria tenir un blanc de p53_tetS diari, però fins i tot així, és possible que un blanc realitzat al matí a la mateixa tarda ja no sigui vàlid. A més a més, per qüestions de temps i de quantitat de mostra, aquesta és una opció poc pràctica. En casos com aquest, la millor manera per poder comparar dades és mitjançant la utilització d'un patró intern, ja que així es poden corregir totes i cadascuna de les dades amb la màxima fiabilitat.

Si s'analitza com varien els espectres d'emissió dels pèptids a mesura que s'hi addiciona p53_tetS, es pot comprovar que un cop restat el blanc, a 350nm hi ha una clara disminució de la intensitat, mentre

que a 310nm pràcticament la variació és nul·la. Per contra, en el blanc es pot veure que hi ha un clar increment de fluorescència tant a 310 com a 350nm (figura 4.21).

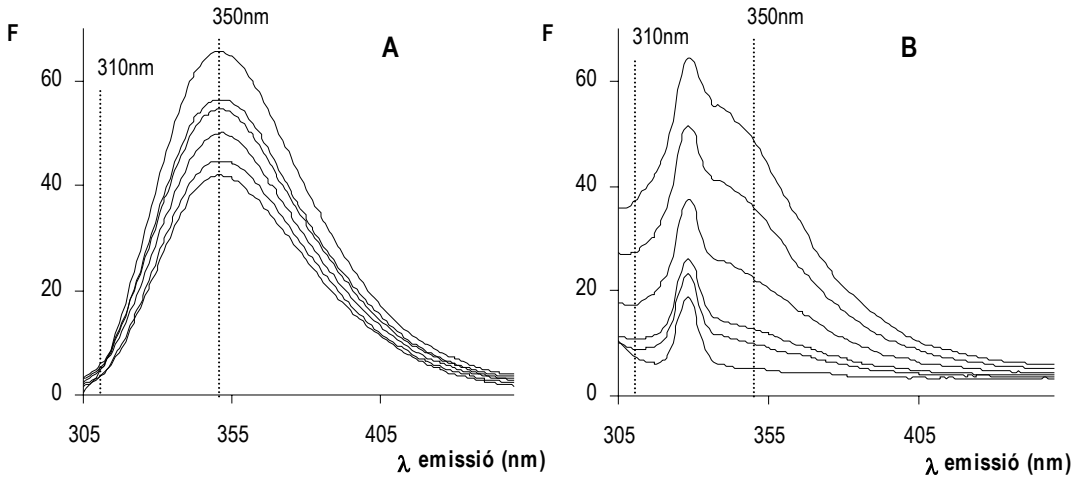


Figura 4.21 A - Variació de l'espectre d'emissió d'un pèptid representatiu de la quimioteca amb quantitats creixents de p53_tetS, un cop restats els espectres del blanc. **B** - Blanc de p53_tetS.

A més a més, en el blanc es pot veure que hi ha una relació lineal entre la F_{310nm} i la F_{350nm} (figura 4.22). Tot i que en valor absolut, els valors del blanc varien d'un dia per l'altre, s'ha pogut comprovar, que per a un mateix estoc de proteïna, aquesta relació es manté constant independentment del dia.

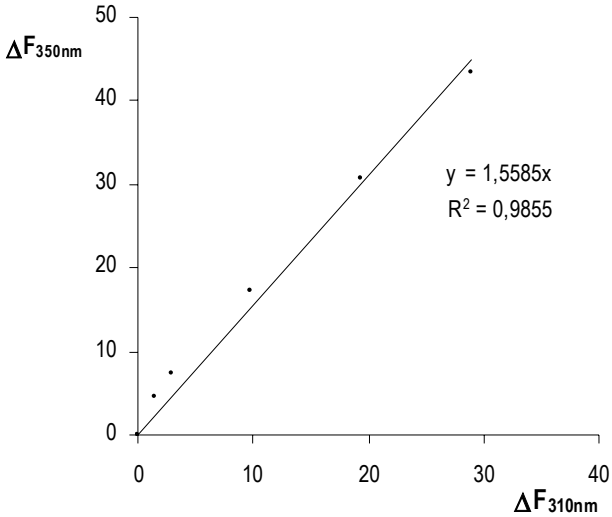


Figura 4.22 Relació lineal entre la F_{310nm} i la F_{350nm} del blanc de p53_tetS.

Mitjançant aquesta relació, a partir de l'increment de fluorescència a 310nm es pot saber quin és l'increment de fluorescència a 350nm degut a la contribució de les tirosines de la p53_tetS. Aquest valor, s'ha restat de cadascun dels espectres d'emissió i així s'ha pogut obtenir una variació de la intensitat de la fluorescència corregida. Així doncs, s'ha utilitzat la F_{310nm} com a patró intern.

Finalment, per a cadascun dels pèptids de la quimioteca s'han enregistrat espectres de fluorescència amb concentracions creixents de p53_tetS. Per a cada pèptid, s'han enregistrat uns 6 espectres i s'ha arribat a entre 6 i 8 equivalents de p53_tetS.

Les corbes s'han ajustat al mateix model utilitzat en l'avaluació de la interacció del Candidat 4 amb la p53_tetS, eliminant els punts clarament artefactuals. A partir dels resultats obtinguts en el capítol 3, ha semblat més convenient ajustar les dades suposant la formació d'un complex pèptid:proteïna 2:1. És per això que en l'ajust s'ha utilitzat la concentració de dímer en lloc de la de tetràmer.

4.2.2 RESULTAT

En la taula 4.9 hi ha un resum amb totes les constants d'afinitat obtingudes per a cadascun dels pèptids.

Pèptid	K_A (M^{-1})	K_D (μM)	Chi^2	Pèptid	K_A (M^{-1})	K_D (μM)	Chi^2
Candidat 4	(1,45±1,24)*10^5	6,90	0,65	Dab3R	(2,63±2,15)*10^4	38,0	0,45
RRRR	(1,60±0,5)*10^5	6,25	0,13	Dab4	(3,88±2,75)*10^4	25,8	0,53
KR3	(4,22±6,80)*10^4	23,7	0,38	OrnR3	(1,76±1,84)*10^5	5,68	2,24
K2R2	(1,60±1,08)*10^5	6,25	1,28	Orn2R2	(1,70±3,45)*10^5	5,88	0,46
K3R	(1,95±1,38)*10^5	5,13	0,92	Orn3R	(7,96±4,96)*10^4	12,6	0,53
KKKK	(8,18±5,47)*10^4	12,2	0,88	Orn4	(1,38±1,75)*10^5	7,25	0,28
RKRR	(1,51±1,21)*10^5	6,62	1,51	Daa	(5,97±5,60)*10^4	16,7	2,85
KRKR	(8,31±2,99)*10^4	12,0	0,29	2xaa	(6,84±4,32)*10^4	14,6	1,91
KRRK	(1,19±2,12)*10^4	84,0	0,47	0xaa	(2,98±1,51)*10^4	33,6	1,59
KKRK	(1,44±1,42)*10^5	6,94	1,68	Aleatori	(2,53±0,72)*10^4	39,5	0,18
NvaR3	(5,92±4,30)*10^4	16,9	1,39	ASG	(1,04±0,73)*10^5	9,62	1,20
SR3	(2,40±2,53)*10^4	41,7	2,92	hR3	(1,01±0,15)*10^5	9,90	0,15
S2R2	(1,77±1,30)*10^4	56,4	2,92	h2R2	(4,17±1,65)*10^5	2,40	0,29
S3R	(1,91±3,36)*10^3	524	0,14	hhhh	(3,65±1,01)*10^5	2,74	0,08
DapaR3	(6,23±5,07)*10^4	16,0	0,14	RabR3	(8,79±4,56)*10^4	11,4	1,69
Dapa2R2	(3,10±1,87)*10^4	32,2	0,16	Rab2R2	(5,70±4,13)*10^4	17,5	0,91
Dapa3R	(3,36±2,42)*10^4	29,8	0,32	Rab4	(1,19±0,42)*10^6	0,84	0,17
Dapa4	(2,16±2,59)*10^3	463	0,02	RysR3	(1,48±0,74)*10^5	6,76	1,43
DabR3	(8,61±6,24)*10^4	11,6	0,70	Rys2R2	(4,82±1,07)*10^5	2,07	0,15
Dab2R2	(1,17±3,44)*10^4	85,4	0,15	Rys4	(1,04±0,61)*10^5	9,62	0,17

Taula 4.9 Resum de les constants d'afinitat obtingudes per a cadascun dels pèptids de la quimioteca.

S'ha de tenir en compte, que cadascuna d'aquestes constants d'afinitat s'ha obtingut a partir de corbes d'uns 6 punts, i per això, en alguns casos l'error en la constant és força elevat. Aquest problema s'accentua en la determinació de constants del rang mil·limolar, ja que en aquests casos la formació de complex és mínima. De tota manera, la qualitat de l'ajust per constants d'afinitat similar o superiors a les del Candidat 4 és suficientment bo per dur a terme una primera avaluació de la quimioteca i per diferenciar entre afinitats similars, superiors o inferiors a les del Candidat 4 (figura 4.23).

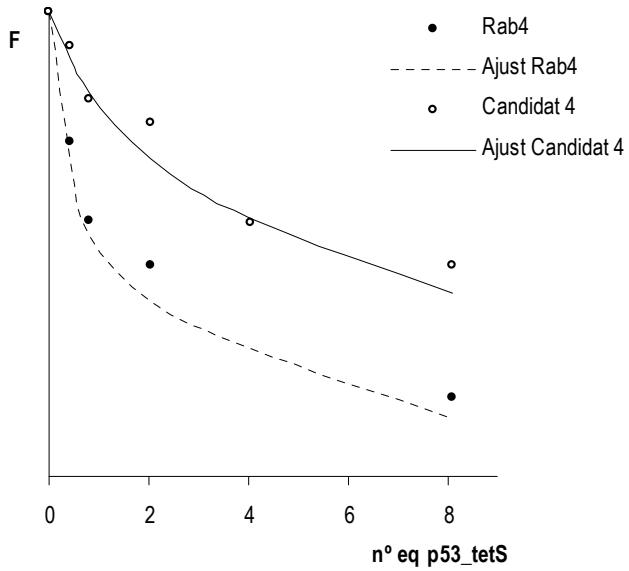


Figura 4.23 Comparació dels punts experimentals i de l'ajust obtingut per al pèptid Candidat 4 i el millor pèptid de la quimioteca.

Tenint en compte l'error obtingut en la determinació de les constants d'afinitat, com a criteri s'ha considerat que els pèptids amb una afinitat superior a dues vegades la del pèptid Candidat 4, són lligands més afins. Per contra, els pèptids amb una afinitat inferior a la meitat de la del Candidat 4, s'han considerat lligands menys afins. La resta de pèptids, s'ha considerat que tenen una afinitat similar a la del Candidat 4.

Seguint aquest criteri es pot concloure que els pèptids h2R2, hhhh, Rys2R2 i Rab4, tenen una afinitat per la p53_tetS superior a la del Candidat 4. A més a més, s'han obtingut 17 pèptids amb una afinitat similar a la del Candidat 4.

Pel que fa al pèptid NoW, s'ha fet un experiment preliminar de competició com el realitzat amb el compost tetraguanidínic **1** (apartat 3.3.2), podent-se concloure que el pèptid NoW té una afinitat inferior a la del Candidat 4.

4.2.3 DISCUSSIÓ

Un dels principals objectius de la preparació de la quimioteca, efectivament ha estat trobar un lligand amb una afinitat superior a la del Candidat 4. D'altra banda, però amb aquesta quimioteca també s'ha volgut entendre una mica més quins són els factors que controlen el procés de reconeixement entre el Candidat 4 i la p53_tetS.

Donada la qualitat de les constants d'afinitat que s'han obtingut, és perillós intentar treure conclusions respecte quins són els canvis que poden provocar variacions subtils en l'afinitat del pèptid, però sí que se'n poden extreure algunes conclusions més globals:

Candidat 4 vs. retro-Candidat 4

De la comparació del Candidat 4 amb el RRRR, se'n pot concloure que el fet de sintetitzar la seqüència inversa no n'afecta l'afinitat (figura 4.24).

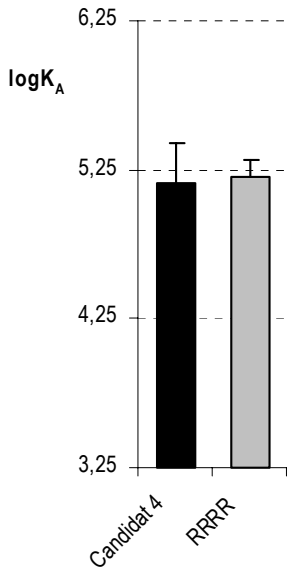


Figura 4.24 Comparació de l'afinitat dels pèptids Candidat 4 i RRRR.

Arginina vs. lisina

En general, la substitució de l'arginina per lisina provoca una lleugera pèrdua d'afinitat, tot i que en la majoria dels casos s'obtenen afinitats similars a les dels Candidat 4 (figura 4.25).

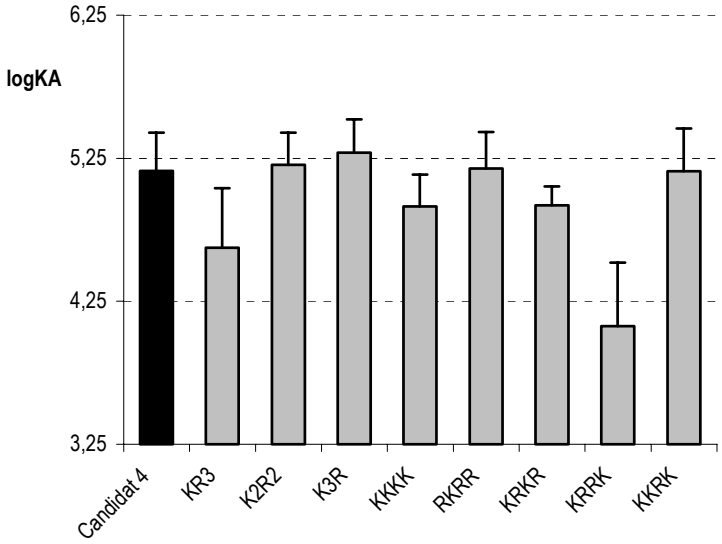


Figura 4.25 Comparació de l'afinitat dels pèptids que contenen lisina.

Entre l'arginina i la lisina, la principal diferència que hi ha és que l'arginina té dos grups donadors de protons que poden formar enllaços d'hidrogen simultàniament amb els dos oxígens dels carboxilats. Tot i que no hi ha una diferència d'afinitats dramàtica, aquest resultat fa pensar que és possible que aquest efecte quelant sigui el causant d'aquest plus d'afinitat del pèptid amb quatre arginines respecte els que contenen lisines.

Un altre factor que s'ha de tenir en compte a l'hora d'interpretar la diferent afinitat entre lligands poliguanidínics i lligands poliamònics, són els efectes deguts a la proximitat de càrregues. Si es considera com a exemple un lligand amb dos grups amoni molt propers, es troba que per tal d'evitar la repulsió entre les càrregues, es produeix una lleu disminució del pKa d'un dels dos grups amoni de manera que aquest queda neutre a pH 7. En el cas d'un lligand amb dos grups guanidini, aquesta situació no es pot donar perquè el pKa d'aquest grup és massa elevat, i la solució per tal d'evitar la repulsió, passa per la complexació amb algun anió, que en el cas estudiat tant podrien ser els fosfats del medi com els carboxilats de la superfície de la p53_tetS[169] (figura 4.26).

[169] Sakai, N. & Matile, S., *J. Am. Chem. Soc.*, (2003), **125**, 14348-14356

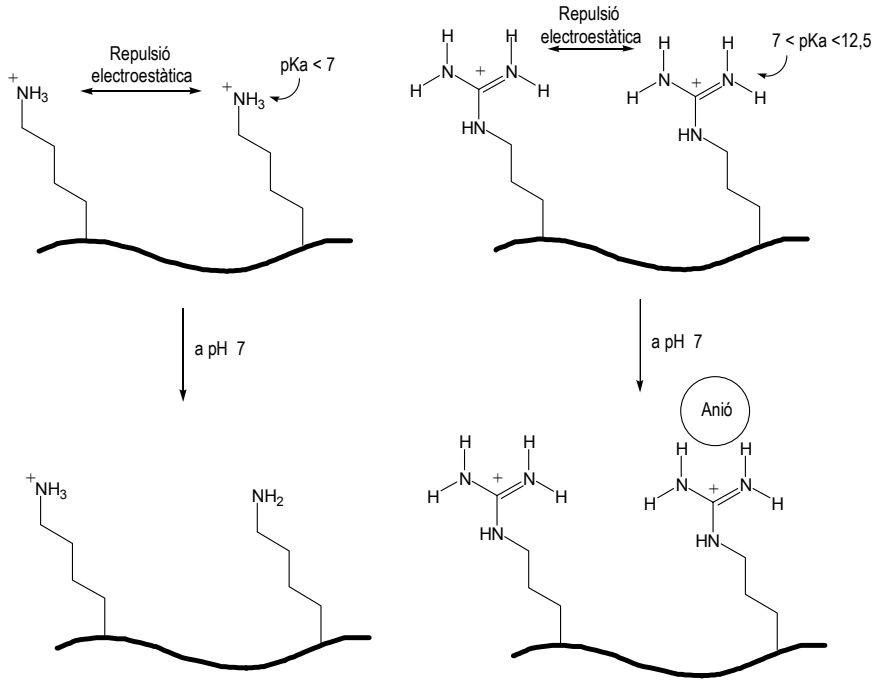


Figura 4.26 Comparació de l'efecte de proximitat de càrrega que es produeix per a un lligand poliamònic i per a un lligand poliguanidínic a pH 7.

Així doncs, sembla ser que la substitució de les arginines per lisines produeix una disminució de l'afinitat tant pels efectes deguts a la proximitat de càrregues com per la diferent naturalesa del grup amoni respecte el grup guanidini.

Arginina vs. grups guanidini N-substituïts

Mitjançant la utilització de grups guanidini tetrasubstituïts amb grups metil, es poden obtenir pèptids amb una afinitat quasi tres vegades superior a la del Candidat 4 (figura 4.26).

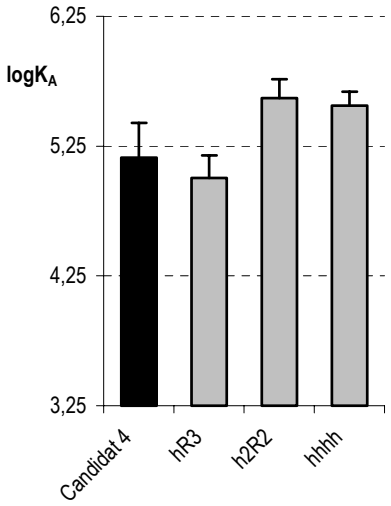


Figura 4.26 Comparació de l'afinitat dels pèptids amb residus amb grups guanidini *N*-substituïts.

D'entrada, es podria pensar que mitjançant la utilització de grups guanidini *N*-substituïts s'haurien d'obtenir pèptids de menor afinitat que el Candidat 4, ja que aquests grups guanidini no poden formar enllaços d'hidrogen amb els carboxilats.

Aquest resultat però, contradiu aquesta presumpció ja que tot i la pèrdua de la possibilitat de formar enllaços d'hidrogen, s'obtenen lligands amb una afinitat superior a la del Candidat 4. L'explicació més probable la trobem en el fet que precisament els grups metil són els que fan que augmenti l'afinitat gràcies a algun tipus d'interacció hidrofòbica amb alguna part de la superfície de la p53_tetS. És probable, però, que s'obtingués un millor resultat mitjançant la utilització de grups guanidini parcialment substituïts els quals poguessin formar també alguns enllaços d'hidrogen amb els carboxilats de la p53_tetS.

Càrrega positiva

La disminució dels grups carregats positivament està clar que produeix una disminució molt substancial de l'afinitat, arribant a ser pràcticament nul·la en el cas del pèptid S3R, el qual només conté un residu amb càrrega positiva (figura 4.27).

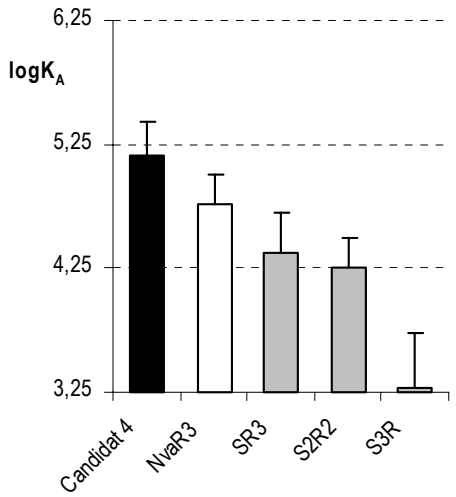


Figura 4.27 Comparació de l'afinitat dels pèptids amb norvalina i serina.

És interessant el fet que en el cas del pèptid SR3 la pèrdua d'afinitat sigui força més accentuada que en el cas del pèptid NvaR3. Aquest fet, podria indicar el mateix que es pot observar en el cas dels pèptids amb grups guanidini *N*-substituïts, i és que un cert component hidrofòbic pot fer augmentar l'afinitat. En el cas del NvaR3, la presència d'un residu de norvalina en la posició d'una de les arginines pot contribuir a afavorir en certa manera aquesta contribució hidrofòbica, però a diferència del que passa amb els pèptids h2R2 i hhhh, aquest augment d'afinitat queda contrarestat per la forta disminució que provoca la pèrdua d'una càrrega positiva.

D'altra banda, el fet que l'afinitat disminueixi progressivament a mesura que es van eliminant les càrregues del pèptid és un bon control per confirmar que efectivament la interacció entre el Candidat 4 i la p53_tetS és bàsicament de caràcter electrostàtic.

Longitud de la cadena lateral

La utilització d'anàlegs d'arginina amb diferent longitud de la cadena lateral, ofereix uns resultats aparentment contradictoris, ja que s'obtenen pèptids amb una afinitat clarament superior tant en el cas de la utilització d'un anàleg de cadena lateral més curta (Rab) com en el cas de la utilització d'un anàleg de cadena lateral més llarga (Rys) (figura 4.28)

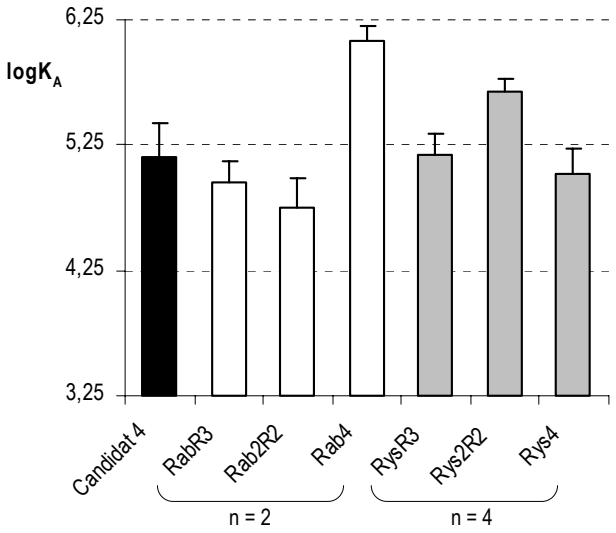


Figura 4.28 Comparació de l'afinitat dels pèptids amb residus anàlegs d'arginina de diferent longitud de cadena lateral.

De tota manera, aquests resultats es poden interpretar en base a les següents consideracions: en primer lloc, l'increment en quasi un ordre de magnitud de l'afinitat del pèptid Rab4 respecte la del pèptid Candidat 4, es pot justificar tenint en compte que la disminució dels graus de llibertat disminueix el cost entròpic que suposa l'orientació correcte de les cadenes laterals. En segon lloc, en el cas del Rys2R2, la presència de dos anàlegs d'arginina de cadena lateral més llarga augmenta en cert grau la flexibilitat del pèptid, de manera que en facilita l'adaptació sobre la superfície de la p53.

La resta de pèptids es poden considerar com a situacions intermèdies. Així, en el cas del Rys4, tot i que té una flexibilitat encara major que la del Rys2R2, també té una penalització entròpica més gran i tots dos factors es contraresten. En el cas dels pèptids RabR3 i Rab2R2, la disminució del cost entròpic no és suficient per compensar la pèrdua de flexibilitat.

A partir d'aquest resultat, es podria pensar que residus anàlegs d'arginina encara més curts donarien fins i tot una afinitat superior. De tota manera, aquest fet no és tan evident, ja que és probable que si s'utilitzessin residus amb la cadena lateral encara més curta, per tal d'aconseguir la orientació correcte dels diferents grups guanidini seria necessari un grau d'ordenació de tot el pèptid molt més gran i això introduiria un penalització entròpica més gran[170].

Tots aquests casos es podrien considerar com un exemple de com es pot aconseguir el mateix efecte (augment de l'afinitat) mitjançant camins totalment oposats, com són l'augment i la reducció de la llibertat conformacional. Anant una mica més enllà, fins i tot es podria interpretar que en aquest sentit l'aminoàcid natural (arginina) representa un bon compromís, ja que maximitza la flexibilitat sense introduir una penalització entròpica massa gran.

Pel que fa als anàlegs de lisina, no s'observen diferències d'afinitat importants entre els pèptids que contenen lisina i els pèptids que contenen ornitina. Per als anàlegs mes curts, però, sí s'observa una clara disminució de l'afinitat a mesura que es redueix la longitud de la cadena lateral (figura 4.29).

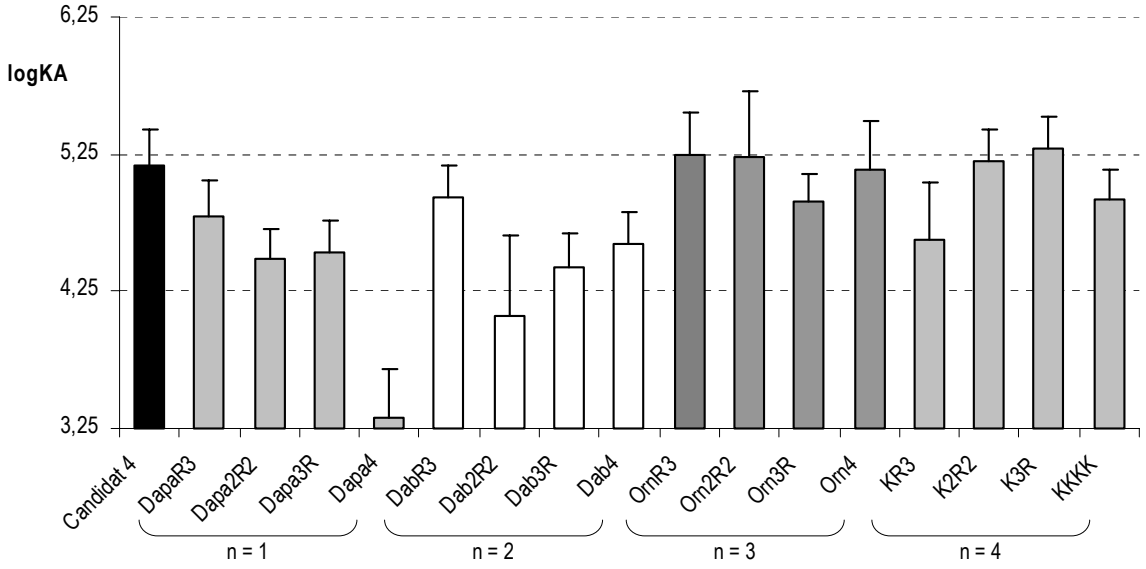


Figura 4.29 Comparació de l'afinitat dels pèptids amb anàlegs de lisina de cadena lateral més curta.

En el disseny de lligands dirigits als centres actius dels enzims, a partir de l'anàlisi de la interacció de diferents lligands es poden descriure un conjunt de grups funcionals els quals adequadament orientats *a priori* haurien de formar un lligand d'elevada afinitat. Aquest conjunt de grups funcionals s'anomena farmacòfor. Així, en el disseny de nous lligands una possibilitat és la d'utilitzar molècules petites amb

[170] Salvatella, X., Peczuh, M.W., Gairí, M., Jain, R.K., Sánchez-Quesada, J., de Mendoza, J., Hamilton, A.D. & Giralt, E., *ChemComm*., (2000), 1399-1400

poca llibertat conformacional i els diferents grups funcionals orientats en l'espai segons aquest farmacòfor.

A partir dels resultats obtinguts en aquest treball, sembla ser que aquesta aproximació no és vàlida en el disseny de lligands per a superfícies proteiques. En aquests casos, tot sembla indicar que és millor utilitzar lligands amb un cert grau de llibertat conformacional que es puguin adaptar sobre zones d'elevada plasticitat i mobilitat com són les superfícies de les proteïnes.

Conjuntament, aquests resultats posen de manifest que en el reconeixement de superfícies proteïques es necessiten lligands en els quals hi hagi un compromís entre flexibilitat i ordenació en l'espai dels diferents grups funcionals.

Esquelet

En el cas dels pèptids amb modificacions en l'esquelet en la majoria de casos hi ha una disminució de l'afinitat (figura 4.30).

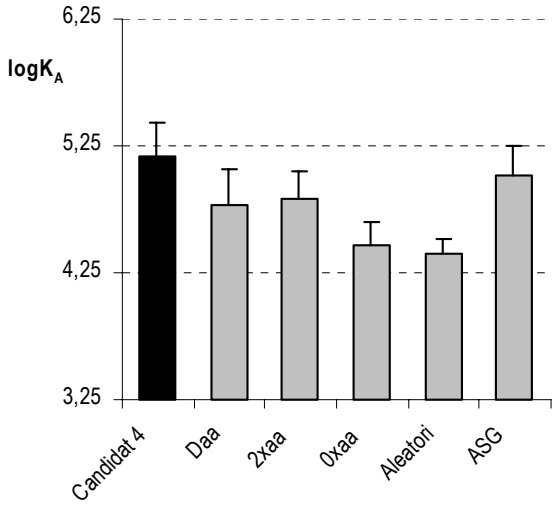


Figura 4.30 Comparació de l'afinitat dels pèptids amb modificacions en l'esquelet.

Aquest resultat, de fet, valida les consideracions que s'han tingut en compte a l'hora de dissenyar el Candidat 4. Primerament es confirma que la millor situació és aquella en la qual les arginines estan situades en una periodicitat de i / i+2, ja que tant en el cas de i / i+3 (2xaa) com en el cas de i / i+1 (0xaa) l'afinitat disminueix. En el cas del pèptid Aleatori, també es produeix una notable disminució de l'afinitat. Respecte el Candidat 4, l'única diferència és que en el pèptid Aleatori els residus situats entre les posicions de les arginines són força més voluminosos. Així doncs, aquesta disminució de l'afinitat confirma la idea plantejada en el disseny d'utilitzar residus poc voluminosos. En aquest mateix sentit, es pot veure que quan es mantenen els mateixos residus del Candidat 4 però canviats d'ordre (ASG), l'afinitat pràcticament no es veu afectada. Pel que fa a la disminució de l'afinitat observada en el pèptid

Daa, el qual conté aminòacids D en l'entorn de les arginines, probablement es deu a que les cadenes laterals queden orientades de manera que dificulten la interacció del pèptid amb la p53_tetS.

Per últim, la menor afinitat del pèptid NoW, suggereix que el triptòfan té un paper important en el reconeixement. Aquest fet, pot corroborar el que ja s'ha apuntat en l'anàlisi de la interacció dels pèptids amb grups guanidini *N*-substituïts, i és que en la interacció entre el pèptid Candidat 4 i la p53_tetS també hi ha una component hidrofòbica. Tampoc s'ha d'oblidar, però, que el triptòfan és un residu força particular, ja que és capaç de produir un elevat nombre de interaccions de caràcter diferent (enllaços d'hidrogen, interaccions hidrofòbiques, $\pi-\pi$ i $\pi-$catió). De fet, tenint en compte l'elevat nombre d'arginines presents en la superfície de la p53_tetS, és possible que la interacció fonamental sigui la π-catió, la qual en el reconeixement de pèptids model s'ha vist que pot ser molt important[171].

Tant la disminució d'afinitat observada en el pèptid NoW com l'augment d'afinitat observat en els pèptids amb un increment del caràcter hidrofòbic, indiquen que per tal d'aconseguir un lligand d'elevada afinitat per la superfície de la p53_tetS no és suficient utilitzar un lligand ric en grups guanidini. Així, sembla ser que potenciant conjuntament interaccions de diferent caràcter es poden obtenir lligands amb una afinitat superior. De cara al reconeixement en general de motius polars en la superfície d'una proteïna, aquest resultat suggereix que pot ser força productiu fixar-se també en els residus més hidrofòbics que envolten el motiu polar corresponent. Així, en el disseny dels lligands és molt interessant incloure-hi parts hidrofòbiques convenientment situades perquè puguin interaccionar amb aquests residus.

[171] Orner. B.P., Salvatella, X., Sánchez-Quesada, J., de Mendoza, J., Giralt, E. & Hamilton, A.D., *Angew. Chem. Int. Ed*, (2002), **41**, 117-119