

**DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTRUCTURA
DE DOMINIOS HELICOIDALES.
INFLUENCIA DE LA INTRODUCCIÓN
DE AMINOÁCIDOS D**

Carmen Giovana Granados Ramírez



U
UNIVERSITAT DE BARCELONA
B

2007

Tesis Doctoral

DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTRUCTURA DE DOMINIOS
HELICOIDALES
INFLUENCIA DE LA INTRODUCCIÓN DE AMINOÁCIDOS D

Carmen Giovana Granados Ramírez



Departamento de Química Orgánica
Facultad de Química
Universidad de Barcelona
Barcelona, 2007

Memoria presentada por

Carmen Giovana Granados Ramírez

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Programa de doctorado: Química Orgánica

Bienio: 2002-2004

Dirigida por:

Dr. Ernest Giralt Lledó

Dr. Francesc Rabanal Anglada

En esta página me gustaría agradecer a todas las personas que de una u otra forma me inspiraron y ayudaron en la realización de este trabajo, que aun cuando no sean nombradas tendrán por siempre mi reconocimiento y agradecimiento. En primer lugar, les agradezco a los directores de tesis, a Ernest Giralt, por el apoyo que siempre me ha ofrecido desde la madrugada de enero en la que llegué a Barcelona, y a Francesc Rabanal por sus consejos y críticas que me han ayudado a encontrar otros caminos. A Elmostafa Bahraoui por sus disertaciones claras y amenas acerca de la biología del VIH. A Fabrice Gaston, por su valiosa colaboración en el proyecto de VIH. A Natalia Carulla y Marga Gairí por su ayuda y discusiones alrededor de la RMN. A Sergio Madurga por las interesantes controversias acerca del modelaje molecular de péptidos. A Alberto Adeva, siempre listo a resolver mis dudas con el sintetizador. A Lia y Marta por compartir sin egoísmo su conocimiento sobre los caprichos de la espectrometría de masas. A Jaume y Ricard por su apoyo con la resonancia de plasmon superficial. A Eva Poca con su mirada siempre comprensiva, su disposición para ayudar, sin sus gestiones el laboratorio no sería el mismo.

A todos los compañeros del laboratorio por su inestimable ayuda en todo momento. A los que están o han estado en el "laboratorio de 300", a los del "laboratorio de 100", a los de UQC, a los de del laboratorio de "pharmamar": Albert, Angela, Birgit, Carles, Delia, Dolors, Edu, Eli, Fayna, Jan, Jesús, Jimena, Laia, Leti, Lorena, Natxo, Nessim, Martas, Marcelo, Miriam, Oscar, Pili, Rosa, Roger, Silvia, Susana, Tere, Yesica, por su calidez humana y los buenos momentos que hemos compartido dentro y fuera del PCB. En especial, a Martina compañera de piso, de laboratorio y amiga, por sopórtame lo cual no debe ser nada fácil, y a su lado Marc con su constante buen animo.

Un agradecimiento eterno a todas las personas que en los primeros años de mi desarrollo profesional me influyeron y despertaron en mí el interés por "los péptidos". Debo recordar mis comienzos en síntesis en fase sólida en el Instituto de Inmunología de Colombia, los buenos momentos, las hazañas y las aventuras de aquellos tiempos en que trabajé con el grupo de síntesis de péptidos, el jefe Manuel E. Patarroyo y las jefazas, Zuly Rivera y Fanny Guzmán.

Por supuesto, agradezco a mi familia el apoyo brindado en TODO momento, que me ha llevado a concebir sueños y a trazar metas.



Un instante más y Alicia había pasado a través del espejo y saltaba con ligereza dentro del cuarto del espejo. Lo primero que hizo fue ver si había un fuego encendido en su chimenea y con gran satisfacción comprobó que, efectivamente, había allí uno, ardiendo tan brillantemente como el que había dejado tras de sí ... Entonces empezó a mirar atentamente a su alrededor y se percató de que todo lo que podía verse desde el antiguo salón era bastante corriente y de poco interés, pero que todo lo demás era sumamente distinto...

Lewis Carroll. En: Al otro lado del espejo

Progress in scientific research rarely follows a straight path. Generally, it entails many unexpected meanderings, with a mix of good and bad ideas, good and bad luck.

*Robert C. Gallo and Luc Montagnier, M.D.
En: The Discovery of HIV as the Cause of AIDS
N. Engl. J. Med. 2003, 349, 2283-2285.*

Abreviaturas

ABREVIATURAS

A

ACN Acetonitrilo

B

Boc *tert*-Butoxicarbonilo

Bom Benciloximetilo

2-Br-Z 2-Bromobenciloxycarbonilo

Bzl Bencilo

C

C34 Péptido de 34 residuos de la región C-terminal de la gp41 de VIH-1 (628-661)

CHCA* Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

cHx Ciclohexilo

2-Cl-Z 2-clorobenciloxycarbonilo

D

DCM Diclorometano

DIEA Diisopropiletilamina

DIC *N,N'*-diisopropilcarbodiimida

DMAP *N,N*-dimetil-4-aminopiridina

DMF Dimetilformamida

DQF-COSY* Espectroscopia de correlación con filtro de doble cuanto

DSS Ácido 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfónico

DTT Ditiotreitól

E

EDC 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida

EDTA* Ácido etilendiaminotetraacético

eq equivalentes

ESI* Ionización por electro-spray

Et₂O Éter dietílico

EP surfactante P20

F

Fc Fragmento cristizable de inmunoglobulina G

BSA Albúmina sérica bovina

FMOC 9-fluorenilmetoxicarbonilo

FITC Isotiocianato de fluoresceína

For Formilo

G

gp41 Glicoproteína 41 de VIH-1

gp120 Glicoproteína 120 de VIH-1

H

H₁ Hélice 1

H₂ Hélice 2

H₁₋₂ Péptido que incluye la región de las hélices 1 y 2 del dominio B

H_{3a} Péptido con la secuencia aleatoria de H_{3n} del dominio B (control negativo)

H_{3n} Hélice 3 natural del dominio B

H_{3x} Hélice 3 y análogos

HBS Solución tampón de HEPES

HEPES* Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico

HOBt 1-hidroxibenzotriazol

HMFS Ácido N-[(9-hidroximetil)-2-fluorenil]succinámico

HPLC* Cromatografía líquida de alta resolución

HPLC-MS Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de espectrometría de masas

I

IgG Inmunoglobulina G

K

k_{as} Constante de asociación / $M^{-1}s^{-1}$

K_A Constante de afinidad (asociación)/ M^{-1}

k_{dis} Constante de disociación / s^{-1}

K_D Constante de afinidad (disociación) / M

k_s Constante global / $M^{-1}s^{-1}$

M

MALDI-TOF* Ionización asistida por una matriz por desorción con láser y análisis por tiempo de vuelo

MeOH Metanol

MS* Espectrometría de masas

MS/MS* Espectrometría de masas en modo tándem

N

N36 Péptido de 36 residuos de la región N-terminal de la gp41 de VIH-1 (546-581)

ND No determinado

NOESY* Espectroscopia de efecto nuclear Overhauser

NHS N-hidroxisucínimida

NMP N-metilpirrolidona

MBHA *p*-metilbenzidrilamina

O

OBOC* Un compuesto por unidad de resina (One Bead One Compound)

P

Pbf 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo

H_{3FANK} Análogo de H_3 [Phe⁴⁴,Lys⁴⁷]

H_{3FANV} Análogo de H_3 [Phe⁴⁴,Val⁴⁷]

P20 Surfactante P20

PDEA 2-(2-piridinilditio)etanoamina

ppm Partes por millon

PEGA* Copolimero de bisacrilamidopoli(etilenglicol), N,N-dimetilacrilamida y monoacrilamino poli(etilenglicol)

R

Rink Ácido *p*-[(R,S)-a-[1-(9H-Fluoren-9-il)-metoxiformamido]-2,4-dimetoxibencil]-fenoxiacético

RMN Resonancia magnética nuclear

RP* Fase reversa

RPS Resonancia de plasmon superficial

RU* Unidades de respuesta de resonancia de plasmon superficial

S

SDS Dodecilsulfato de sodio

T

TBME *Tert*-butilmetil éter

TBTU* Tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-tetrametiluronio

tBu *tert*-butilo

TFA* Ácido trifluoroacético

TFE 2,2,2-trifluoroetanol

TFMSA Ácido trifluorometansulfónico

TIS Triisopropilsilano

Tos Tosilo

TOCSY* Espectroscopia de correlación escalar total

Trt Tritilo

V

VIH-1 Virus de inmunodeficiencia humana

tipo1

δ desplazamiento químico

$\Delta\delta$ Desviación del desplazamiento químico

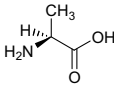
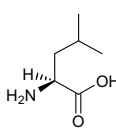
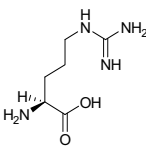
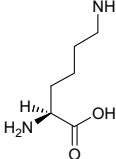
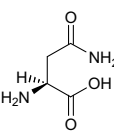
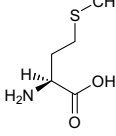
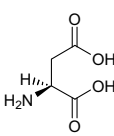
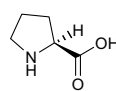
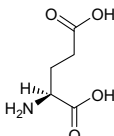
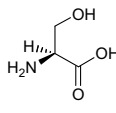
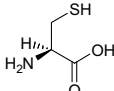
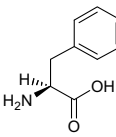
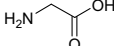
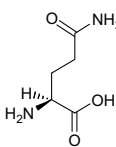
θ Elipticidad

$[\theta]$ Elipticidad Molar

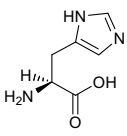
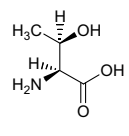
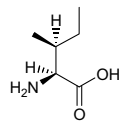
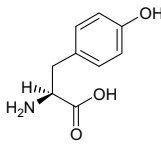
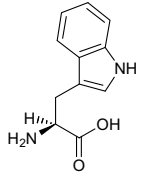
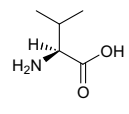
* Iniciales en ingles

Anexos


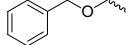
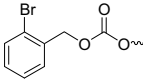
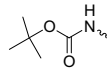


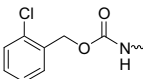
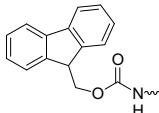
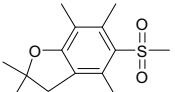
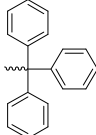
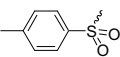
AMINOÁCIDOS (AA)*

L-Alanina	Ala	A		L-Leucina	Leu	L	
L-Arginina	Arg	R		L-Lisina	Lys	K	
L-Asparagina	Asn	N		L-Metionina	Met	M	
L-Ácido aspártico	Asp	D		L-Prolina	Pro	P	
L-Ácido glutámico	Glu	E		L-Serina	Ser	S	
L-Cisteína	Cys	C		L-Fenilalanina	Phe	F	
Glicina	Gly	G		L-Glutamina	Gln	Q	

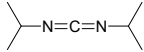
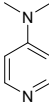
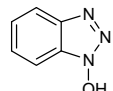
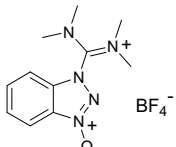
* Las abreviaturas de los AA siguen la regla de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB: *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 12-14 y *Eur. J. Biochem.*, **1984**, 138, 9-37. Letras minúsculas serán usadas para diferenciar a los aminoácidos D en el código de una letra.

L-Histidina	His	H		L-Treonina	Thr	T	
L-Isoleucina	Ile	I		L-Tirosina	Tyr	Y	
L-Triptófano	Trp	W		L-Valina	Val	V	

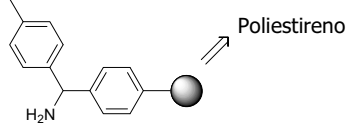
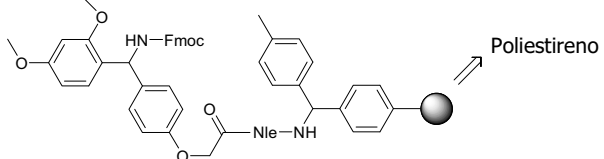
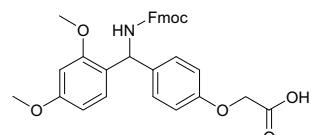
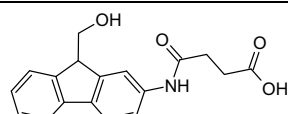
GRUPOS PROTECTORES

Estructura	Nombre	Abreviatura
	Bencilo	Bn
	π -benciloximetilo	Bom
	2-bromobenciloxicarbonilo	BrZ
	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo	Boc
	<i>tert</i> -Butil	tBu
	Ciclohexil	cHex
	2-clorobenciloxicarbonilo	ClZ
	9-fluorenilmetoxicarbonilo	Fmoc
	2,2,5,7,8-Pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo	Pbf
	Tritilo	Trt
	Tosilo	Tos

ADITIVOS Y AGENTES DE ACOPLAMIENTO

DIC	
DMAP	
HOBt	
TBTU	

SOPORTES SÓLIDOS Y ESPACIADORES BIFUNCIONALES

Resina MBHA	
Resina Rink amida MBHA	
Espaciador Rink	
Espaciador HMFS	

SECUENCIAS^bGp41 VIH-1^c

Péptido	Secuencia
C34L	Ac-WMEWDREINNYTSLIHSLEIESQNQQEKNEQELL-NH ₂
C34L*	WMEWDREINNYTSLIHSLEIESQNQQEKNEQELL-NH ₂
C34D	Ac-wmewdreinnytslihsleiesqnqqekneqell-NH ₂
C34D*	wmewdreinnytslihsleiesqnqqekneqell-NH ₂
RC34L(Retro-C34)	Ac-LLEQENKEQQNQSEEILSHILSTYNNIERDWEMW-NH ₂
RC34D (Retroantio-C34)	Ac-lleqenkeqqnqseeilshilstynnierdwemw-NH ₂
M ₁ C34L	Ac-WEDMWRNNVTEYLSSILEHVEQQSNKQEEQENLL-NH ₂
M ₁ C34D	Ac-wedmwrnnvteylssilehveqqsnkqeeqenll-NH ₂
M ₂ C34	Ac-WMEWDREINNYTSLIHSLEIESQNQQeKNEkELL-NH ₂
M ₃ C34	Ac-WeEWD RKINNYTSLIHSLEIESQNQQeKNEkELL-NH ₂
N36	Ac-SGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL-NH ₂
Glioxilil-N36	OHCCO-GIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL-NH ₂

*Grupo amino terminal libre

Péptidos derivados del dominio B la proteína A de *Staphylococcus aureus*^d

Péptido	Secuencia
H _{3n}	Ac-DPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK-NH ₂
H _{3a}	Ac-AQKQASPDALeKNLPKADNASL-NH ₂
1D	Ac-dpsqlnawkeawknkadqapk-NH ₂
2D	Ac-dpsqknawkeakkkwadqapk-NH ₂
3D	Ac-dpsqknawkeaskknkadqapk-NH ₂
4D	Ac-dpsqknalkeawknkadqapk-NH ₂
5D	Ac-dpsqknalteawkkwadqapk-NH ₂
6D	Ac-dpsqknawkeawknkadqapk-NH ₂
H ₁₋₂	Ac-APKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKD-NH ₂

^b Las letras minúsculas se utilizaron para diferenciar los aminoácidos D de los aminoácidos L

^c VIH-1, Grupo M, subtipo B, aislado Lai (IIIB)

^d Secuencia común en las cepas JH9, COL, Newman, MRSA252, MW2, NCTC 8325, Cowan 1 (NCTC 8530)

Péptidos derivados del dominio B de la proteína A de *Staphylococcus aureus*

Péptido	Secuencia
H _{3n}	Ac-D ⁴⁰ PSQS ⁴⁴ ANL ⁴⁷ LAEAKKLNDAQAPK ⁶¹ -NH ₂
H _{3FANK}	Ac-D ⁴⁰ PSQF ⁴⁴ ANK ⁴⁷ LAEAKKLNDAQAPK ⁶¹ -NH ₂
H _{3FANV}	Ac-D ⁴⁰ PSQF ⁴⁴ ANV ⁴⁷ LAEAKKLNDAQAPK ⁶¹ -NH ₂
H _{3a}	Ac-A ⁴⁰ QKQA ⁴⁴ SPD ⁴⁷ ALEKNLPKADNASL ⁶¹ -NH ₂
H ₁₋₂	Ac-A ¹ PKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKD ³⁹ -NH ₂
CAhxH ₁₋₂	Ac-CAhxA ¹ PKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKD ³⁹ -NH ₂
Proteína	Secuencia
Dominio B	Ac-A ¹ PKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQS ⁴⁴ ANL ⁴⁷ LAEAKKLNDAQAPK ⁶¹ -NH ₂
Dominio FANK	Ac-A ¹ PKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQF ⁴⁴ ANK ⁴⁷ LAEAKKLNDAQAPK ⁶¹ -NH ₂
Dominio FANV	Ac-A ¹ PKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQF ⁴⁴ ANV ⁴⁷ LAEAKKLNDAQAPK ⁶¹ -NH ₂

Índice

Índice

	Página
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	
Introducción	3
Objetivos	6
Bibliografía	7
1. CAPÍTULO 1	11
Diseño, síntesis y caracterización de inhibidores de la fusión de VIH-1 análogos del péptido C34 de gp41 con aminoácidos D	
1.1. Introducción	11
1.1.1. Tipos de medicamentos anti-VIH	12
1.1.1.1. Inhibidores de la transcriptasa inversa	13
1.1.1.2. Inhibidores de la integrasa	13
1.1.1.3. Inhibidores de la proteasa viral	13
1.1.1.4. Inhibidores de la entrada del virus	14
1.1.1.5. Inhibidores de fusión	14
1.1.1.6. Combinación de medicamentos	14
1.1.2. Entrada y fusión del virus	14
1.1.3. Inhibición de la entrada y fusión del virus	19
1.1.4. Péptidos que inhiben la fusión	21
1.1.5. Objetivos	23
1.2. Diseño de péptidos análogos de C34 con sustituciones parciales por aminoácidos D.	24
1.3. Síntesis y purificación de C34 y análogos	28
1.4. Síntesis y purificación de N36	30
1.5. Ensayos de Inhibición de la fusión	31
1.5.1. Ensayo de Inhibición de la replicación de VIH-1	32
1.5.2. Ensayo de Inhibición de formación de sincitios	34
1.6. Determinación de la solubilidad de C34L, C34L*, M₂C34 y M₃C34	36
1.7. Análisis conformacional de los péptidos por dicroísmo circular	38
1.7.1. Dicroísmo circular	38
1.7.2. Curvas de fusión	42
1.8. Degradación enzimática con tripsina	46
1.9. Unión entre N36 y los péptidos análogos de C34 por resonancia de plasmon superficial	50
1.9.1. Inmovilización de N36	51
1.9.2. Interacción entre N36 y los péptidos análogos de C34	51
1.10. Conclusiones	54
Bibliografía	55
2. CAPÍTULO 2	63
Identificación de complejos heteroquirales entre péptidos todo-D y el fragmento N-terminal del dominio de B de la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>	
2.1. Introducción	63
2.1.1. Dominio B de la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>	66
2.1.2. Química combinatoria. Químicas OBOC	67
2.1.3. Objetivos	69

2.2.	Diseño de la químioteca D4096	70
2.3.	Síntesis y caracterización de la químioteca D4096	72
2.3.1.	Síntesis de la químioteca D4096	72
2.3.2.	Caracterización de la químioteca	75
2.3.2.1.	Identificación de subproductos de la síntesis	75
2.3.2.2.	Eliminación de los subproductos de la síntesis	77
2.3.2.3.	Degradación de Edman de unidades de peptidil resina	78
2.3.2.4.	Caracterización en conjunto de la químioteca D4096	80
2.4.	Evaluación de la químioteca	83
2.5.	Determinación de la secuencia de los péptidos activos por espectrometría de masas en tándem MALDI-TOF	85
2.6.	Síntesis de los péptidos	87
2.7.	Análisis conformacional por dicroísmo circular	89
2.8.	Estudios de unión entre H₁₋₂ y los péptidos todo-D por resonancia de plasmon superficial	91
2.9.	Conclusiones	97
	Bibliografía	98
3.	CAPÍTULO 3	105
	Síntesis, caracterización estructural y evaluación de la interacción con inmunoglobulina G de nuevos análogos del dominio B de la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>	
3.1.	Introducción	105
3.2.	Síntesis de los péptidos H_{3n}, H_{3a}, H_{3FANK}, H_{3FANV} y H₁₋₂	107
3.3.	Síntesis del dominio natural y sus dominios análogos	109
3.3.1.	Síntesis por química Boc del dominio B natural	109
3.3.2.	Síntesis por química Fmoc del dominio B natural	111
3.3.3.	Síntesis de los dominios análogos	112
3.4.	Dominios no covalentes	113
3.4.1.	Análisis conformacional por dicroísmo circular	113
3.4.2.	Estudios de interacción por resonancia de plasmon superficial	116
3.4.2.1.	Interacción entre H ₁₋₂ y los péptidos	116
3.4.2.2.	Interacción de los complejos H ₁₋₂ /péptido con IgG	118
3.5.	Dominios natural y análogos	123
3.5.1.	Análisis conformacional por dicroísmo circular	123
3.5.2.	Resonancia de plasmon superficial	126
3.5.2.1.	Unión de IgG al dominio B y análogos	126
3.5.2.2.	Unión de Fc humano al dominio B y análogos	129
3.6.	Determinación de la estructura secundaria de los dominios por resonancia magnética nuclear	131
3.6.1.	Estudio por RMN del dominio B	133
3.6.2.	Asignación de los espectros de los dominios B, FANV y FANK	136
3.6.3.	Desviación del desplazamiento químico	141
3.6.4.	Intercambio hidrógeno/deuterio	142
3.7.	Conclusiones	146
	Bibliografía	147
4.	CONCLUSIONES	155
5.	MATERIALES Y EQUIPOS	159
5.1.	Generales	159
5.1.1.	Reactivos y disolventes	159
5.1.1.1.	Resinas y amino ácidos protegidos:	159
5.1.1.2.	Derivados de aminoácidos para síntesis Boc	159

5.1.1.3.	Derivados de aminoácidos para síntesis Fmoc	160
5.1.1.4.	Disolventes	160
5.1.1.5.	Reactivos	161
5.2.	Instrumentación general	163
6.	PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	167
6.1.	Métodos analíticos	167
6.1.1.	Ensayo de ninhidrina cualitativa	167
6.1.2.	Ensayo cualitativo para la detección de alcoholes	167
6.1.3.	Ensayo cualitativo de cloranilo para la detección de aminas secundarias	168
6.1.4.	Hidrólisis y análisis de aminoácidos	168
6.1.4.1.	Hidrólisis	168
6.1.4.2.	Análisis por HPLC del hidrolizado	169
6.2.	Síntesis automática de los péptidos por la estrategia Fmoc	169
6.2.1.	Reducción de la funcionalización de la resina	169
6.2.2.	Incorporación automática de los aminoácidos	170
6.2.3.	Acetilación del grupo amino terminal	171
6.2.4.	Desprotección de las cadenas laterales y liberación del péptido	171
6.3.	Síntesis automática de los péptidos por la estrategia Boc/Bzl	171
6.3.1.	Incorporación automática de los aminoácidos	171
6.3.2.	Desprotección de las cadenas laterales y liberación del péptido	172
6.4.	Cromatografía	172
6.4.1.	Cromatografía líquida de alta resolución analítica	172
6.4.2.	HPLC-MS analítico	173
6.4.3.	HPLC semipreparativo	173
6.5.	Espectrometría de masas MALDI-TOF	173
6.6.	Procedimientos experimentales del capítulo 1	175
6.6.1.	Síntesis de los péptidos	175
6.6.2.	Ensayos de Inhibición de la fusión	179
6.6.2.1.	Ensayo de Inhibición de la replicación de VIH-1	179
6.6.2.2.	Ensayo de Inhibición de formación de sincitios	180
6.6.3.	Dicroísmo circular de los péptido y los complejos no covalentes	180
6.6.4.	Digestión con tripsina de los péptidos C34, M ₂ C34, M ₃ C34	181
6.6.5.	Determinación de la solubilidad en agua de los péptidos	182
6.6.6.	Resonancia de plasmon superficial	182
6.6.6.1.	Generalidades	183
6.6.6.2.	Interacción entre N36 y los péptidos	184
6.7.	Procedimientos experimentales del capítulo 2	186
6.7.1.	Síntesis de la quimioteca	186
6.7.1.1.	Cálculos previos a la síntesis de la quimioteca "one-bead-one-compound" (OBOC)	186
6.7.1.2.	Acondicionamiento de resina y reducción de la funcionalización	188
6.7.1.3.	Incorporación del espaciador bifuncional HMFS	189
6.7.1.4.	Acoplamiento del primer aminoácido	189
6.7.1.5.	Desprotección de grupo Boc	190
6.7.1.6.	Incorporación de los aminoácidos	190
6.7.1.7.	Desprotección de las cadenas laterales	191
6.7.1.8.	Liberación del péptido de la resina	191
6.7.2.	Secuenciación de péptidos por degradación de Edman	192
6.7.3.	Identificación de los péptidos de la quimioteca afines a H ₁₋₂	192
6.7.4.	Espectros de masas MALDI TOF/TOF de los iones precursores de los péptidos todo-D activos de la quimioteca y asignación de las señales	194
6.7.5.	Síntesis de los péptidos:	200
6.8.	Procedimientos experimentales del capítulo 3	202
6.8.1.	Síntesis de los péptidos H _{3n} , H _{3a} , H _{3FANV} , H _{3FANK} y H ₁₋₂	202

6.8.2.	Síntesis de los dominios covalentes	204
6.8.3.	Dicroísmo circular de los complejos no covalentes	206
6.8.4.	Dicroísmo circular de de el dominio B y análogos	207
6.8.5.	Resonancia magnética nuclear de el dominio B y análogos	208
6.8.5.1.	Asignación	208
6.8.5.2.	Intercambio Hidrogeno/Deuterio	213
6.8.6.	Resonancia de plasmon superficial	213
6.8.6.1.	Generalidades	213
6.8.6.2.	Interacción de los péptidos con H ₁₋₂	214
6.8.6.3.	Interacción de los complejos péptido/H ₁₋₂ con IgG	215
6.8.6.4.	Interacción del dominio B y análogos con IgG	216
6.8.6.5.	Interacción del fragmento Fc con el dominio B y análogos	217
	Bibliografía	217