



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# OBTENCIÓN DE UN PÉPTIDO QUIMÉRICO DE ALTO PESO MOLECULAR DERIVADO DE PROTEÍNAS DE *Plasmodium* *falciparum*

**Yahson Fernando Varela Quitián**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Bogotá D.C., Colombia  
2016





UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# OBTENCIÓN DE UN PÉPTIDO QUIMÉRICO DE ALTO PESO MOLECULAR DERIVADO DE PROTEÍNAS DE *Plasmodium falciparum*

**Yahson Fernando Varela Quitián**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias-Química**

Director

**José Manuel Lozano Moreno Dr. Sc.**

Profesor Asociado

Departamento de Farmacia

Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación

Síntesis de Macromoléculas

**Universidad Nacional de Colombia**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Química**

**Bogotá D.C., Colombia**

**2016**



*Dedico este trabajo a mis padres Frin y  
Nidia por darme su inmenso amor, a mi tía  
Clara por ser mi segunda Madre, a mis  
hermanos, a Michell mi sobrina preferida;  
a Milena... Gracias a todos por enriquecer  
mi vida.*



# Agradecimientos

A mi director de tesis, José Manuel Lozano Moreno por su constante apoyo, corrección y acompañamiento en este trabajo de tesis; además de contribuir en mi formación profesional y personal.

A la Dr. Magnolia Vanegas Murcia jefe de la sección de Síntesis Química de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), por su ayuda y apoyo permanente en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Manuel Elkin Patarroyo Murillo Director científico de la FIDIC, por su ayuda y apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Al grupo de investigación de Mimetismo Molecular de Agentes Infecciosos de la Universidad Nacional en cabeza del Dr. José Manuel Lozano Moreno, Yuli Andrea Guerrero, Laura Katherine Guasca Pineda y Karen Julieth Ardila Pérez, a todos ellos gracias por su colaboración en los ensayos biológicos.

A la Dr. Yolanda Silva del grupo funcional de inmunoquímica de la FIDIC por su apoyo en la lectura de los ELISA y los IFA derivados de los ensayos biológicos.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) por financiar la totalidad de este proyecto.

A mis amigos y compañeros del grupo de investigación de síntesis química y de resonancia magnética nuclear de la FIDIC: Jorge Rodríguez, Deisy Rodríguez, Laura Pabón, Rocío Rojas, Adriana Bermúdez y Patricia Alba.

A la Universidad Nacional de Colombia, donde he realizado la totalidad de mi formación.

A mis Padres, Erlin Varela Parra y Nidia Sofía Quitián Peña, a mi tía Clara Quitián, a mis hermanos Nin, Nina, Jhon, Richard, Jimmy, Edwin y Ruby, a mi sobrina Michell Tatiana Taborda Quitián, a mis abuelos maternos Pedro Eudaldo Quitián Delgado y Sixta Tulia Peña Aldana, y a todos familiares, por su apoyo y comprensión.

A Milena Gómez por su apoyo en esta importante etapa IYI.

A Dios por todo.





## Resumen

Se realizó la síntesis de un péptido quimérico de 82 residuos derivado de cuatro proteínas del *Plasmodium falciparum* mediante la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) utilizando química Fmoc y se evaluó tres estrategias sintéticas para optimizar la síntesis de este. Dos de las variaciones sintéticas realizadas presentaron un aumento moderado en la eficiencia sintética de esta quimera peptídica. Además, se evaluó la actividad biológica de este péptido.

Inicialmente, se evaluó el efecto del calentamiento asistido por radiación microondas a la síntesis encontrando que el principal efecto del calentamiento fue la reducción de los tiempos de síntesis y la disminución de los acoples empleados para la formación del péptido quimérico, además, del aumento del rendimiento; se prosiguió a evaluar sustituciones de resina menores (0.15 meq/g, 0.10 meq/g y 0.08 meq/g) a la inicialmente evaluada de 0.20 meq/g para determinar si estas tenían un efecto positivo en la síntesis del péptido, es decir, un aumento en el rendimiento, el efecto de la sustitución de la resina fue moderado puesto que se observó varias especies delecionadas presentes en el transcurso de la síntesis, y se determinó que estas sustituciones de resina muestran cromatogramas con perfiles similares, sin embargo, la resina de sustitución de 0.15 meq/g presenta un mejor perfil cromatográfico y mayor porcentaje de recuperación, aun así la ineficiencia persiste y esta es marcada desde el acople 23, por esta razón se centró la atención en superar esta dificultad inicial pues esta repercute de manera significativa en la síntesis del péptido quimérico. En el siguiente paso se utilizó Cloruro de litio (LiCl) como agente caotrópico el cual está documentado como desestabilizador de estructuras secundarias tipo hojas beta y agregados, puesto que, este tipo de interacciones unos de los principales causantes de la ineficiencia sintética en péptidos de difícil obtención y de gran número de aminoácidos; sin embargo, su utilización no disminuyó la ineficiencia que se observa en el residuo 23.

El péptido sintetizado asistido por radiación microondas en la resina de 0.15 meq/g fue purificado y evaluado funcionalmente presentando altos títulos de anticuerpos en comparación a los péptidos componentes de la quimera, además, presentó un control moderado de la parasitemia cuando se evaluó en modelo murino (BALB/c) contra dos cepas de malaria murina *Plasmodium berghei* y *Plasmodium yoelii*.

**Palabras clave:** Síntesis de péptidos en fase sólida, péptido quimérico, acople, radiación microondas, sustitución de la resina, agente caotrópico y péptido de alto peso molecular.



## Abstract

A chimeric 82-residue peptide containing four *Plasmodium falciparum* protein antigen fragments strategically placed into the chimera was synthesized by three different strategies for solid phase peptide synthesis (SPPS) in order to optimize optimal conditions for its production. In addition, the biological and immunological activity of the chimeric molecule was evaluated.

Initially, the effect of synthesis methodologies assisted by microwave radiation on amino acid coupling to the growing peptide-chain showed that the main effect of microwave heating was the reduction of amino acid coupling time on the synthesis of the chimera. Smaller degrees of resin substitution were tested (0.15 meq/g, 0.10 meq/g y 0.08 meq/g) regarding the initial 0.20 meq/g resin-substitution, in order to assess a possible constructive effect that enhance the peptide overall yield production. Thus, the effect of resin substitution was moderated since several deleted species were present as observed during the course of the process, finding that these substitutions resin allow obtaining peptide products show chromatograms with similar profiles, however, the resin substitution 0.15 meq / g had a better chromatographic profile and purity, even so, the synthetic inefficiency persisted and this is marked from the 23<sup>rd</sup> coupling in ahead. For this reason attention was set on overcoming this initial synthetic difficulty because this would significantly affect the total synthesis of the chimeric peptide. Following synthetic tests included chaotropic agents such as lithium chloride (LiCl) which is a well-known as a secondary structure elements disruptor specially those consisted in beta-sheets and other more complex aggregates, being this type of molecular interactions responsibly of a number of synthetic hindrances for peptides harboring “difficult sequences” characterized by a large number of residues; however its use in this work was not useful for diminishing synthetic inefficiencies which became evident starting the 23<sup>rd</sup> coupling.

Due to its characteristics and yield, the chimeric peptide of 82 residues synthesized assisted by microwave radiation on a 0.15 meq / g resin, was purified and subsequently evaluated by its functional properties in in vitro and in vivo assays. Antigenicity studies demonstrated that the 82-mer chimeric peptide stimulated high antibody titers regarding each of its peptide components, besides being non-toxic and non-hemolytic of eukaryotic cells. Remarkably the chimeric 82-residue peptide was able to control parasitemia levels of vaccinated groups of BALB/c mice which were later challenged with two different rodent malaria species, being *P. berghei* and *P. yoelii*.

**Keywords:** Solid phase peptide synthesis, chimeric 82-amino acid peptide, coupling, microwave radiation, resin replacement, chaotropic agent, high molecular weight peptide, *Plasmodium falciparum*.



# Contenido

## Pág.

Resumen .....	I
Abstract .....	III
Lista de Esquemas.....	VII
Lista de Figuras.....	IX
Lista de Tablas .....	XI
Lista de símbolos y abreviaturas .....	XIII
Introducción .....	XVII
Problema de investigación.....	XXI
Justificación.....	XXIII
Objetivos.....	XXV
1. Marco Teórico.....	1
1.1 Síntesis de péptidos en fase sólida .....	1
1.1.1 Soporte sólido .....	3
1.1.2 Brazo Espaciador .....	4
1.1.3 Reactivos de acople .....	5
1.2 Estrategias sintéticas para la obtención de péptidos de secuencia difícil .....	8
1.2.1 Agentes Caotrópicos.....	9
1.2.2 Dipéptidos de Pseudoprolinas .....	10
1.2.3 Radiación Microondas .....	11
2. Metodología .....	13
2.1 Selección y diseño sintético del péptido quimérico .....	13
2.2 Síntesis química en fase sólida del péptido quimérico .....	14
2.3 Síntesis de péptidos en fase sólida en Condición Estándar .....	15
2.4 Síntesis de péptidos en fase sólida asistida por radiación microondas .....	16
2.5 Caracterización por RP-HPLC y MADI-TOF .....	17
2.6 Purificación de la quimera peptídica.....	17
3. Resultados y discusión .....	19

<b>3.1. Aspectos sintéticos.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.1 Efecto de la Radiación Microondas en la síntesis del péptido quimérico.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2 Efecto de la sustitución de la resina en la síntesis del péptido quimérico .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.3 Efecto del agente caotrópico Cloruro de litio en la síntesis del péptido quimérico</b>	<b>51</b>
<b>3.2. Actividad funcional .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.1 Análisis de los elementos de estructura secundaria por dicroísmo circular... 53</b>	<b>53</b>
<b>3.2.2.2 Determinación de la Antigenicidad por medio del ensayo de ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>) .....</b>	<b>56</b>
<b>3.2.2.3 Reactividad de anticuerpos por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.2.3.1 La determinación de la reactividad en el estadio merozoito .....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.2.3.2 La determinación de la reactividad en el estadio esporozoito .....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.4 Resultados y discusión de la actividad funcional.....</b>	<b>58</b>
<b>3.2.4.1 Antigenicidad, reconocimiento y protección de los péptidos poliméricos y la quimera.....</b>	<b>58</b>
<b>4. Conclusiones.....</b>	<b>63</b>
<b>5. Perspectivas .....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo 1. Peso molecular calculado para del péptido quimérico en diferentes puntos de síntesis. ....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo 2: Pesos moleculares de los residuos de aminoácidos y del número de terbutilaciones.....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo 3: Perfil sintético en la evaluación de las dos condiciones de reacción: Estándar y Asistida por Radiación Microondas .....</b>	<b>69</b>
<b>Anexo 4: Resumen de los cromatogramas y valores de m/z de los espectros de masas en la evaluación de la síntesis del péptido quimérico en las dos condiciones de reacción: Estándar y Asistida por Radiación Microondas .....</b>	<b>70</b>
<b>Anexo 5: Resumen de los cromatogramas y valores de m/z de los espectros de masas en la evaluación de la síntesis del péptido quimérico con las tres sustituciones de resina evaluadas: 0.15, 0.10 y 0.08 meq/g .....</b>	<b>71</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>75</b>

## Lista de Esquemas

<i>Esquema 1. Pasos generales en la síntesis de péptidos en fase sólida en dirección C a N-terminal.</i>	2
<i>Esquema 2. Desprotección del grupo t-Boc de un aminoácido por el ácido trifluoroacético.</i>	3
<i>Esquema 3. Desprotección del grupo Fmoc de un aminoácido por la piperidina como base y escavenger.</i>	3
<i>Esquema 4. Productos de la activación de un grupo ácido por una carbodiimida.</i>	6
<i>Esquema 5. Mecanismos de racemización de un aminoácido catalizado por una base cuando el grupo carboxilo es activado.</i>	7
<i>a) Vía oxazolonas y b) Vía enol.</i>	7
<i>Esquema 6. Mecanismo de Activación del aminoácido con la carbodiimida y HOBt para la formación del enlace amida.</i>	7
<i>Esquema 7. Estructuras de reactivos de acople derivados del HOBt (izquierda), imonio/uronio centro y sales de HOBt; DIPC (diisopropilcarbodiimida), HBTU, HATU, HOAt, BOP, PyBOP, COMU.</i>	8
<i>Esquema 8. Dipéptido de Pseudoprolina. Para la Serina R1=H y X=O, Treonina R1= CH<sub>3</sub> y X=O, R2 es la cadena lateral del aminoácido que conforma el dipéptido de Pseudoprolina, para la cisteína R1=H y X=S. Para todos casos R2 corresponde a la cadena lateral del aminoácido que precede a la pseudoprolina de dichos aminoácidos.</i>	10





## Lista de Figuras

<i>Figura 1. Caracterización del control de síntesis del residuo 11 (teórico 1228.53 Da) del péptido quimérico sintetizado en dos condiciones.....</i>	20
<i>Figura 2. Caracterización del control de síntesis del residuo 22 (PM Teórico 2628.16 Da) del péptido quimérico sintetizado en dos condiciones.....</i>	21
<i>Figura 3. Caracterización del control de síntesis del residuo 33 (PM Teórico 3887.86 Da) del péptido quimérico sintetizado en dos condiciones.....</i>	23
<i>Figura 4. Caracterización del control de síntesis del residuo 44 (PM Teórico 5065.51 Da) del péptido quimérico sintetizado en dos condiciones.....</i>	25
<i>Figura 5. Caracterización del control de síntesis del residuo 55 (PM Teórico 6348.07 Da) del péptido quimérico sintetizado en dos condiciones.....</i>	27
<i>Figura 6. Caracterización del control de síntesis del residuo 66 (PM Teórico 7467.68 Da) del péptido quimérico sintetizado en dos condiciones.....</i>	28
<i>Figura 7. Caracterización del control de síntesis del residuo 82 (PM Teórico 9051.42 Da) del péptido quimérico crudo sintetizado en dos condiciones.....</i>	30
<i>Figura 8. Caracterización del péptido quimérico de 82 residuos (PM Teórico 9051.42 Da) purificado y previamente sintetizado en dos condiciones.....</i>	30
<i>Figura 9. Caracterización del control de síntesis del residuo 11 (PM Teórico 1228.53 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución.....</i>	33
<i>Figura 10. Caracterización del control de síntesis del residuo 22 (PM Teórico 2628.16 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución.....</i>	33
<i>Figura 11. Caracterización del control de síntesis del residuo 26 (PM Teórico 2984.33 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución.....</i>	34
<i>Figura 12. Caracterización del control de síntesis del residuo 30 (PM Teórico 3481.66 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución;.....</i>	36
<i>Figura 13. Caracterización del control de síntesis del residuo 33 (PM Teórico 3887.86 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución.....</i>	37
<i>Figura 14. Caracterización del control de síntesis del residuo 35 (PM Teórico 4043.95 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución;.....</i>	38
<i>Figura 15. Caracterización del control de síntesis del residuo 39 (PM Teórico 4424.19 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución.....</i>	39
<i>Figura 16. Caracterización del control de síntesis del residuo 44 (PM Teórico 5065.51 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución.....</i>	40
<i>Figura 17. Caracterización del control de síntesis del residuo 50 (PM Teórico 5513.68 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución.....</i>	42
<i>Figura 18. Caracterización del control de síntesis del residuo 60 (PM Teórico 6703.24 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución.....</i>	43
<i>Figura 19. Caracterización del control de síntesis del residuo 64 (PM Teórico 7255.53 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución.....</i>	44
<i>Figura 20. Caracterización del control de síntesis del residuo 66 (PM Teórico 7467.68 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución.....</i>	44
<i>Figura 21. Caracterización del control de síntesis del residuo 77 (PM Teórico 8488.15 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución.....</i>	45
<i>Figura 22. Caracterización del control de síntesis del residuo 82 (PM Teórico 9051.42 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución.....</i>	46
<i>Figura 23. Caracterización del péptido quimérico de 82 residuos (PM Teórico 9051.42 Da) purificado y previamente sintetizado en resinas de diferentes sustitución.....</i>	47

<b>Figura 24. Caracterización del péptido quimérico en la evaluación de LiCl en los residuos 23 y 24 (<math>^{24}\text{G}^{23}\text{GMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG}^1</math>). Cromatograma y espectro de masas crudos.</b> .....	52
<b>Figura 25. Dicroísmo Circular de péptidos. A) Espectros de dicroísmo circular en agua, B) Espectros de dicroísmo circular en TFE 30%.</b> .....	54
<b>Figura 26. Diseño experimental de vacunación y evaluación de péptidos derivados de proteínas del Plasmodium falciparum. La inmunización se realizó para seis grupos de animales, de cuatro individuos cada uno, con los diferentes péptidos, controles y placebo.</b> .....	56
<b>Figura 27. Perfil de antigenicidad de los péptidos evaluados.</b> .....	58
<b>Figura 28. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Reactividad de anticuerpos de sueros de ratones inmunizados frente a esporozoitos cepa NF54 de Plasmodium falciparum. a) 24320 (STARP), b) 25608 (CSP), c) M1 (24320+25608+10014+9948), d) M2 (todos los polímeros + quimera), e) quimera (39543) y f) Placebo. Eritrocitos infectados de merozoito (esquizontes maduros) con la cepa FBC2 de Plasmodium falciparum g) M1 y f) M2.</b> .....	59
<b>Figura 29. Ensayo in vivo del control de la parasitemia de los grupos inoculados con los péptidos poliméricos, péptido quimérico y mezclas.</b> .....	61

## Lista de Tablas

<i>Tabla 1. Algunas resinas comúnmente usadas en síntesis de péptidos en fase sólida</i>	<u>4</u>
<i>Tabla 2. Secuencias seleccionadas para conformar el péptido quimérico multi-estadio y multi-epítipo derivado de cuatro proteínas relevantes en el proceso de invasión del parásito al humano.</i>	<u>14</u>
<i>Tabla 3. Análisis por MLDI-TOF y RP-HPLC de los intermediarios del péptido quimérico sintetizado en condición estándar y asistida por radiación microondas.</i>	<u>31</u>
<i>Tabla 4. Porcentaje de rendimiento en síntesis y purificación para el péptido quimérico obtenido por las estrategias estándar y la asistida por radiación microondas.</i>	<u>31</u>
<i>Tabla 5. Análisis por MLDI-TOF y RP-HPLC de los intermediarios en la síntesis del péptido quimérico en tres sustituciones de resina (0.15, 0.10 y 0.08 meq/g ) asistidas por radiación microondas.</i>	<u>48</u>
<i>Tabla 6. Porcentaje de rendimiento en síntesis para el péptido quimérico para las resinas con diferentes sustituciones.</i>	<u>49</u>
<i>Tabla 7. Desconvolución del diámetro circular de los péptidos componentes de las proteínas. En rojo se resaltan los porcentajes de elementos de estructura de mayor porcentaje determinados por cada uno de los tres programas. Analizados en agua o TFE al 30%.</i>	<u>54</u>
<i>Tabla 8. Secuencias de las moléculas ensayadas en los ensayos de actividad funcional.</i>	<u>55</u>



## Lista de símbolos y abreviaturas

abreviatura	nombre
1-HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
ACN	Acetonitrilo
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
DC	Dicroísmo Circular
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DCU	Diciclohexilurea
DDC	Constructo de doble dendrímero
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIEA	N,N'-di-isopropiletilamina
DMF	N,N'-dimetilformamida
DMP	Dimetil propano
EDT	Etanoditiol
ELISA	EnzymeLinked Immunosorbent Assay
EM	Espectro de masas
9-Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarbonilo
Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Alanina-OH
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Fmoc-Arginina(Pbf)-OH
Fmoc-Asn(Trt)-OH	Fmoc-Asparagina(Trt)-OH
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Fmoc-Aspártico(OtBu)-OH
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Fmoc-Glutamina(Trt)-OH
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Fmoc-Glutámico(OtBu)-OH
Fmoc-Gly-OH	Fmoc-Glicina-OH
Fmoc-His(Trt)-OH	Fmoc-Histidina(Trt)-OH
Fmoc-Ile-OH	Fmoc-Isoleucina-OH
Fmoc-Leu-OH	Fmoc-Leucina-OH
Fmoc-Lys(t-Boc)-OH	Fmoc-Lisina(t-Boc)-OH
Fmoc-Met-OH	Fmoc-Metionina-OH
Fmoc-Phe-OH	Fmoc-FenilAlanina-OH
Fmoc-Pro-OH	Fmoc-Prolina-OH
Fmoc-Ser(tBu)-OH	Fmoc-Serina(tBu)-OH
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Fmoc-Treonina(tBu)-OH
Fmoc-Trp(t-Boc)-OH	Fmoc-Triptófano(t-Boc)-OH
Fmoc-Trp-OH	Fmoc-Triptófano-OH
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Fmoc-Tirosina(tBu)-OH
Fmoc-Val-OH	Fmoc-Valina-OH
HABPs	High activitybinding peptides
HCCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico
HF	Ácido Fluorhídrico
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IPA	Isopropanol

KCN	Cianuro de potasio
M1	Mezcla de los péptidos 9918, 10014, 24320 y 25608
M2	Mezcla de los péptidos 9918, 10014, 24320, 25608 y 39543
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption of Ions Time of Flight
MAPs	<i>Multiple Antigen Peptides</i>
MeOH	Metanol
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NMM	N-metilmorfolina
NMP	1-metil-2-pirrolidona
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidroxi-benzofurano-5-sulfonilo
PBS	Buffer fosfato salino
PTSFP	Piridinio <i>p</i> -toluensulfonato
PM	Peso Molecular
Reactivo de Ellman	Ácido ditionitrobenzoico
Ninhidrina	2,2-Dihidroxiindano-1,3-diona
Rink-Amida-ChemMatrix	Ácido 4-[(2,4-Dimetoxifenil)(amino)metil] fenoxiacético, polímero unido a la resina ChemMatrix®
RP-HPLC	<i>Reversed phase High performance liquid chromatography</i>
SPf66	<i>Synthetic Plasmodium falciparum 66</i>
SPFS	Síntesis de péptidos en fase sólida
t-Bu	ter-Butilo
TBTU	Tetrafluoroborato de O-(1H-Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
TFA	Ácido trifluoroacético
TFE	2,2,2-Trifluoroetanol
TIS	Triisopropilsilano
Tritón X100	Polioxietilenoetilfenileter
t <sub>R</sub>	Tiempo de Retención







## Introducción

La malaria es una enfermedad causada por el parásito protozoario del género *Plasmodium* y se transmite al humano por medio de la picadura del mosquito hembra *Anopheles*. De las cinco especies de parásitos que infectan al humano el *Plasmodium falciparum* es el más letal y responsable de aproximadamente de 1000000 de muertes anualmente de acuerdo con el reporte oficial del 2014 de la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>1</sup>. Esta tasa de mortalidad continúa siendo elevada a pesar del aumento en las medias de prevención como el uso de mosquiteros e insecticidas y el tratamiento de la enfermedad con nuevos medicamentos contra la malaria. Por consiguiente, existe una necesidad urgente en el desarrollo de una vacuna eficaz contra esta enfermedad para disminuir de manera significativa su morbilidad y mortalidad<sup>2</sup>.

El ciclo de vida del parásito *Plasmodium* es complejo, requiere para su desarrollo de una fase sexual que se da en el mosquito y otra fase asexual que se da en el humano e inicia con la picadura del mosquito hembra que inyecta esporozoitos (estadio inicial del parásito) dentro de la dermis del huésped; estos viajan por el sistema circulatorio hacia el hígado e infecta a los hepatocitos, allí los esporozoitos se transforman y proliferan de forma masiva al estadio merozoito que infecta glóbulos rojos y son los causantes de los síntomas de la enfermedad; algunos parásitos de este último estadio sufren una diferenciación sexual en gametocitos masculinos y femeninos que son tomados por el mosquito cuando se alimenta de un humano infectado, y dentro del mosquito los gametocitos completan el ciclo de vida del parásito<sup>3</sup>.

Producir inmunidad protectora por medio de una vacuna en contra de la malaria es posible debido a que personas que están en constante exposición pueden desarrollar inmunidad. Los grupos de investigación han centrado su trabajo en el desarrollo de una vacuna contra la malaria que involucra uno o los dos estadios del parásito en el humano; ejemplo de esto es el candidato a vacuna *RTS,S*, el cual contiene un antígeno de hepatitis B junto a la proteína de superficie de esporozoito también conocida como proteína de *circumsporozoito*, esta quimera es construida con el fin de mejorar su respuesta biológica, sin embargo, la *RTS,S* tiene eficacia moderada la cual decrece con el tiempo de vacunación<sup>4</sup>.

En la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) se tiene como objetivo el desarrollo de una vacuna contra la malaria que involucra los dos estadios del *Plasmodium falciparum* basado en el complejo ciclo de vida del parásito. La primera línea de defensa contra el parásito debe incluir proteínas del esporozoito capaces de bloquear la invasión a las células hepáticas, para impedir el desarrollo de la enfermedad y en caso tal que invada estas células que su número sea menor. La segunda línea de defensa involucra proteínas del merozoito las cuales son utilizadas por el parásito para invadir a los glóbulos rojos. La mayoría de estas proteínas han sido ampliamente estudiadas en la FIDIC en la búsqueda de una metodología racional para el desarrollo de una vacuna multi-estadio y multi-epítipo, totalmente efectiva contra la malaria<sup>5</sup>.

En 1987 en la FIDIC se desarrolló la *SPf66*, una vacuna sintética multiestadio y multiepitipo contra la malaria. La *SPf66* es un péptido quimérico de 45 residuos compuesto de tres proteínas de merozoito y una proteína de esporozoito del parásito (CGDELEAETQNVYAAPNANPYSLSFQKEKMLPNANPPANKKNAGC), contiene una cisteína en el C-terminal y otra en el N-terminal con el fin de permitir su polimerización por oxidación del grupo tiol de las cisteínas para obtener moléculas peptídicas del rango de 8 a 12 KDa, las cuales presentan mejor respuesta biológica que moléculas de menor tamaño; la *SPf66* demostró que las vacunas químicamente sintetizadas eran factibles, seguras e inmunogénicas, proporcionando una protección de aproximadamente el 40% en monos *Aotus* y de 38% en humanos expuestos al reto experimental<sup>6,7</sup>. Desde entonces en la FIDIC se ha establecido una metodología que permite identificar péptidos derivados de regiones conservadas de proteínas del parásito presentes en los dos estadios y que se unen de manera específica a hepatocitos y glóbulos rojos; posteriormente, se modifica de forma sistemática los residuos críticos del péptido que permiten su unión a la respectiva célula, lo cual ha permitido obtener más de 70 análogos peptídicos que inducen un efecto protector en contra del *Plasmodium falciparum*<sup>8</sup>.

Las moléculas peptídicas anteriormente mencionadas (péptidos análogos, modificados y el quimérico *SPf66*) han sido obtenidas por medio de la metodología de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPFS), desarrollada en 1963 por Bruce Merrifield; esta emplea un soporte sólido que es un polímero insoluble (resina) donde la cadena peptídica es sintetizada y después de cada paso de reacción (acilaciones y desprotección de los aminoácidos) los reactivos en exceso y subproductos son retirados por filtración lo cual simplifica el proceso sintético. Desde sus inicios la SPFS ha presentado importantes avances, sin embargo, como todo proceso sintético no todos los pasos de reacción son al 100 %<sup>9</sup>. Los péptidos que muestran de forma marcada ineficiencias (denominados péptidos de secuencias difíciles) en las reacciones de acople (acilaciones) y desprotecciones dependen de los residuos de aminoácidos que lo componen; en general, secuencias con alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos, que poseen cadenas o grupos protectores voluminoso en sus cadenas laterales son más propensos a presentar ineficiencias sintéticas, lo cual produce baja pureza por la presencia de deleciones y/o cadenas truncadas junto al péptido objetivo. Estas ineficiencias son causadas esencialmente por fenómenos de agregación del péptido con la resina y a la formación de estructuras secundarias principalmente tipo hojas- $\beta$  entre cadenas peptídicas las cuales

presentan baja solvatación y accesibilidad a los reactivos; los péptidos con mayor número de residuos tienen mayor probabilidad de presentar estos problemas puesto que no solo se aumenta el número de pasos de reacción, también, la probabilidad de que las cadenas adyacentes interactúen y dificulten así la síntesis<sup>10-11</sup>.

Para superar estas dificultades sintéticas se emplean resinas de poliestireno-polietilenglicol (PS-PEG), polietilenglicol-acrilamida (PEGA) y polietilenglicol (PEG) las cuales han presentado un efecto favorable porque tienen altos índices de hinchamiento y buena solvatación, lo cual facilita la difusión de los reactivos a los sitios de reacción y que el complejo péptido-resina esté accesible para reaccionar; otra aproximación es la utilización de resinas de bajas sustituciones para disminuir la posibilidad de interacción entre las cadenas peptídicas<sup>12</sup>. Los agentes caotrópicos son también utilizados porque evitan la formación de puentes de hidrógeno y a su vez la agregación entre cadenas adyacentes durante la síntesis<sup>13</sup>; dipéptidos de pseudo-prolinas que simulan la estructura de la prolina y que ejercen un efecto similar al evitar la formación de agregados y de estructuras secundarias<sup>14</sup>; adicionalmente, las reacciones pueden ser aceleradas por medio del uso de ultrasonido<sup>15</sup>, calentamiento convencional o por radiación microondas los cuales no solo aceleran la reacción sino que también pueden ejercer un efecto disgregador<sup>16</sup>. Sin embargo, el empleo de una o varias estrategias expuestas no asegura la eliminación o disminución de las ineficiencias sintéticas, por eso es necesario definir la estrategia o estrategias que permitan mejorar su obtención con el fin de optimizar la síntesis de la secuencia peptídica.

De acuerdo a lo anterior, en este trabajo se planteó el estudio sintético para la obtención de un péptido quimérico derivado de secuencias modificadas de proteínas relevantes del proceso de invasión de *P. falciparum*, para el diseño de este péptido quimérico se seleccionaron dos proteínas del estadio esporozoito CSP (*Circumsporozoite protein*), STARP (*sporozoite threonine-asparagine-rich protein*) y dos del estadio merozoito MSP-1 (*Merozoite Surface protein-1*) y RESA-155 (*Ring infected surface antigen protein*)<sup>17,18,19</sup>, se considera que estas proteínas desempeñan un rol fundamental en el proceso de invasión a células hepáticas y glóbulos rojos en el hospedero. Para la obtención de esta quimera de 82 residuos multiestadio y multiepítipo, se empleó la metodología de SPFS por medio de la química Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo). También, se realizó el estudio funcional de la quimera sintetizada y purificada en modelo murino (ratones BALB/c) frente a dos cepas del parásito del *Plasmodium* (*Plasmodium yoelii* y *Plasmodium berghei*).



## Problema de investigación.

La obtención de péptidos de alto peso molecular es un campo de estudio vigente; debido a las dificultades para su síntesis. Por tanto, la obtención de un péptido quimérico de alto peso molecular (mayor de 80 residuos) es importante desde el punto de vista sintético, junto a la importancia inherente que acompaña a esta macromolécula derivada de 4 proteínas del *Plasmodium falciparum*.



## **Justificación.**

La radiación microondas en la síntesis de péptidos ha probado ser eficiente en la disminución de tiempos de reacción, deleciones y truncamientos en las secuencias peptídicas; lo cual se ve reflejado en un mayor rendimiento. Por su lado, el uso de resinas a base de polietilenglicol permite una mayor pureza del producto debido a la disminución de efectos estéricos y de agregación en la síntesis de péptidos. El uso de resinas de baja sustitución ayuda a disminuir los efectos de agregación; al igual que el uso de sales de litio. Sin embargo, existen secuencias peptídicas que presentan dificultades para su obtención, esto es más visible en péptidos y proteínas de alto peso molecular a causa de las ineficiencias acumuladas en la síntesis. Por tanto, el estudio en conjunto de la radiación microondas, la sal de cloruro de litio y una resina ChemMatrix Rink Amida de baja sustitución son una combinación de interés para evaluar la síntesis del péptido quimérico de alto peso molecular. Por otra parte, la exploración de un adecuado diseño sintético que permita sobre pasar las dificultades sintéticas propias de un compuesto polipeptídico de gran tamaño debe considerarse para la obtención de nuevos sistemas de presentación de candidatos a vacuna contra la malaria.





## Objetivos

### Objetivo General.

Evaluar y estandarizar la síntesis de un péptido quimérico de alto peso molecular derivado de 4 proteínas del *Plasmodium falciparum*, utilizando un soporte sólido a base de polietilenglicol (resina ChemMatrix Rink Amide).

### Objetivos Específicos

- Sintetizar el péptido quimérico propuesto por síntesis de péptidos por pasos en fase sólida y evaluar el efecto de la radiación microondas en la síntesis.
- Evaluar el efecto de la sustitución de la resina ChemMatrix Rink Amide para la síntesis del péptido quimérico de alto peso molecular.
- Evaluar el efecto del Cloruro de litio como sal caotrópica en la síntesis del péptido quimérico de alto peso molecular, para los acoples que presenten dificultad previa.
- Caracterizar las moléculas obtenidas por cada una de las variaciones de la estrategia de péptidos en fase sólida, por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC por sus siglas en inglés *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*) y espectrometría de masas MALDI-TOF. (*Matrix Assited Laser Desorption Ionization-time of flight*).





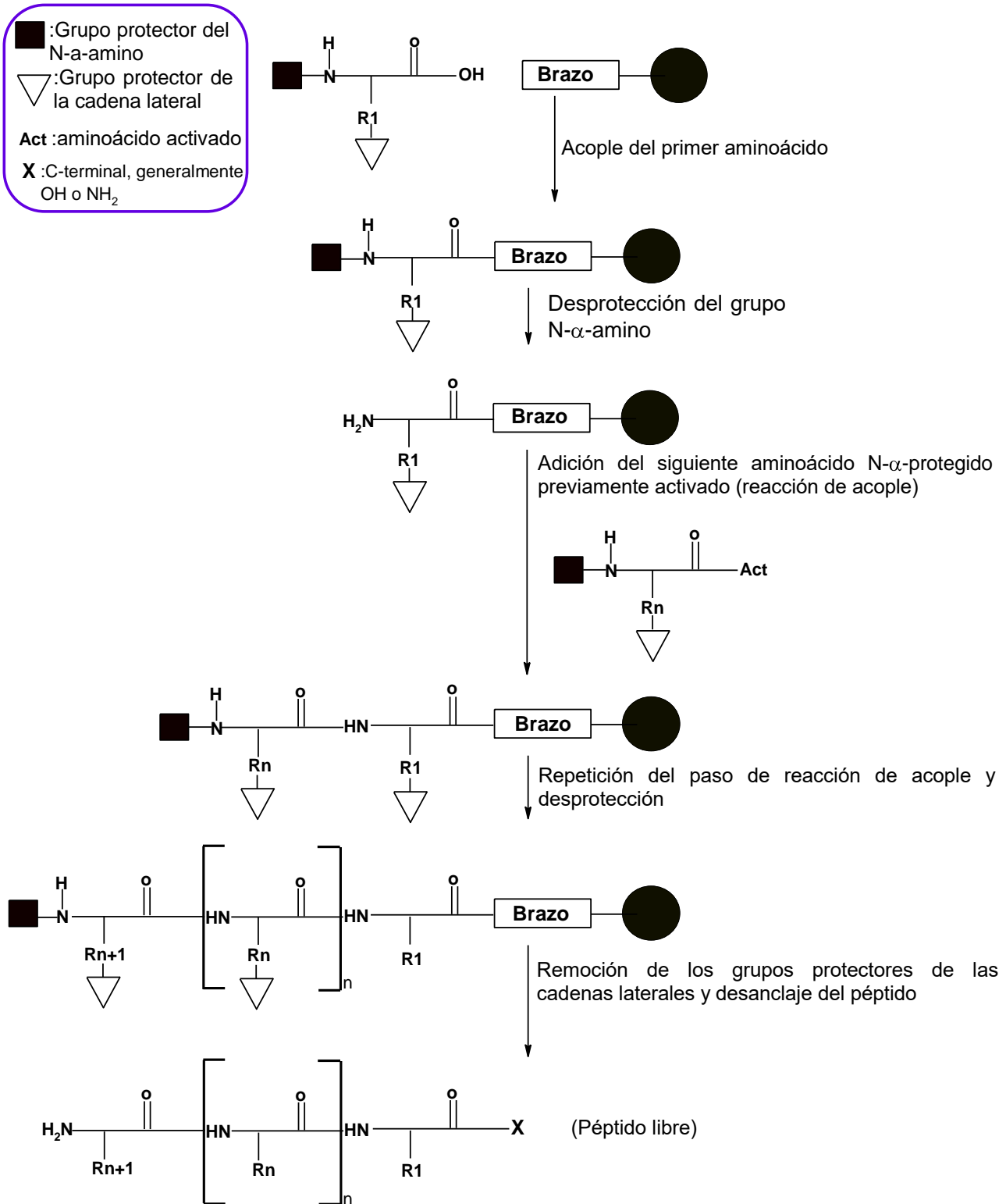


# 1. Marco Teórico

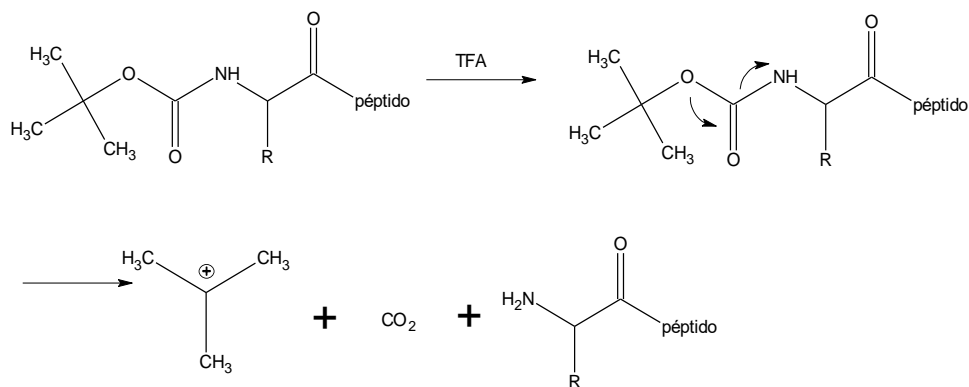
## 1.1 Síntesis de péptidos en fase sólida

Bruce Merrifield en 1963 sintetizó un tetrapéptido empleando por primera vez un polímero insoluble de poliestireno entrecruzado con 1 % de divinilbenceno (soporte sólido), esta metodología fue denominada síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS)<sup>20</sup> y le hizo merecedor del premio Nobel de química en 1984; la SPFS utiliza un soporte sólido sobre el cual se dan los pasos de reacción (Esquema 1), este contiene un brazo que permite anclar covalentemente el primer aminoácido al soporte. Los aminoácidos empleados en la síntesis están protegidos en sus cadenas laterales solo en el caso de contener grupos funcionales susceptibles a reaccionar; además, tiene un grupo protector en su N- $\alpha$ -amino con el fin de evitar la polimerización y direccionar la reacción de formación del enlace peptídico, los dos grupos protectores del N- $\alpha$ -amino más empleados en SPFS son el t-Boc (t-Butiloxicarbonilo)<sup>21</sup> y Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo)<sup>22</sup>, el primero ácido lábil (Esquema 2), el segundo básico lábil (Esquema 3) y su utilización define qué estrategia química se empleará, es decir química t-Boc o Fmoc.

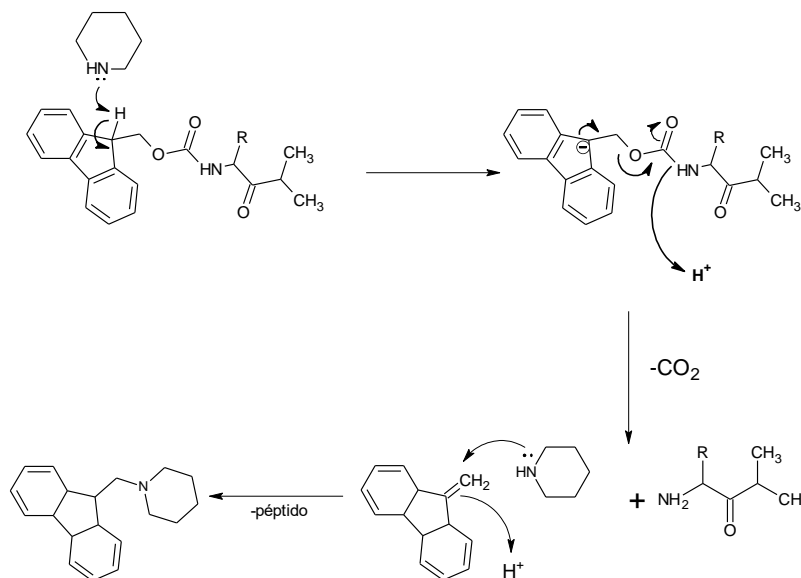
En general, la metodología SPFS es como se describe a continuación: después que el primer aminoácido es anclado al soporte se procede a remover el grupo protector N- $\alpha$ -amino (reacción de desprotección) sin afectar el grupo protector de la cadena lateral, dejando el grupo amino libre y listo para reaccionar con el siguiente aminoácido que es previamente activado para dar la formación de un enlace amida. En el aminoácido a acoplar se activa el grupo funcional carboxilo con el fin de potenciar y permitir la rápida formación del enlace, estos procesos de acilación (acople) y desprotección se realizan tantas veces sea necesario para obtener el péptido objetivo, y en cada paso de reacción se aísla la molécula interés por medio de lavados y filtración del soporte sólido. Cuando la totalidad de los residuos componentes del péptido son incorporados, se procede a retirar simultáneamente los grupos protectores de las cadenas laterales y a desanclar el péptido del soporte sólido para obtener el péptido sintetizado; para la química t-Boc este proceso se realiza con ácido fluorhídrico (HF) y para la para la química Fmoc con ácido trifluoroacético (TFA)<sup>23,24,25</sup>.



**Esquema 1.** Pasos generales en la síntesis de péptidos en fase sólida en dirección C a N-terminal.



**Esquema 2.** Desprotección del grupo t-Boc de un aminoácido por el ácido trifluoroacético.



**Esquema 3.** Desprotección del grupo Fmoc de un aminoácido por la piperidina como base y *escavenger*.

### 1.1.1 Soporte sólido

El soporte sólido es una matriz polimérica insoluble (resina) sobre el cual se dan las reacciones químicas; este debe ser física y químicamente estable, e inerte a los reactivos y disolventes usados en los diferentes pasos de reacción y separación; el soporte no solo facilita el proceso de separación, también, desempeña un papel crucial en la obtención del péptido puesto que su hinchamiento limita el acceso de los reactivos a los sitios de reacción y la solvatación del complejo péptido-resina afecta el rendimiento y la pureza de la molécula sintetizada<sup>26</sup>.

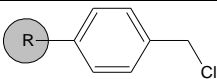
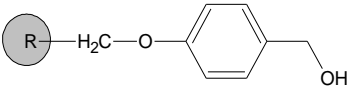
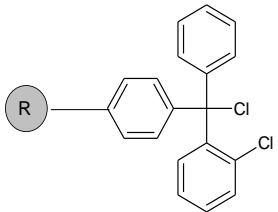
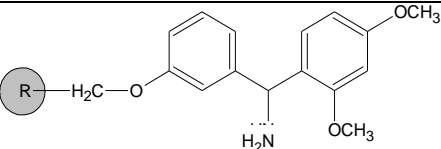
A partir del desarrollo del soporte apolar de poliestireno introducido por B. Merrifield, se han perfeccionado soportes más polares como los de PS-PEG, PEGA y PEG los cuales presentan un mayor hinchamiento en la mayoría de los solventes polares que son empleados en síntesis la SPFS como la dimetilformamida (DMF) y la N-

metilpirrolidona (NMP), que mejoran la solvatación del complejo péptido-resina de péptidos lo cual produce por lo general un aumento de la pureza del péptido sintetizado en referencia a resinas a base de poliestireno<sup>24</sup>. En este sentido, resinas a base de PEG han demostrado ser una herramienta importante para la obtención de péptidos poco polares o largos los cuales tienen una alta tendencia a la agregación y generalmente presentan una alta dificultad sintética<sup>12,27,28</sup>

### 1.1.2 Brazo Espaciador

La resina contiene un brazo que permite la unión covalente y reversible entre la cadena peptídica y el soporte sólido, y protege el grupo carboxilo C-terminal durante la síntesis. La elección del brazo determina las condiciones de anclaje del primer aminoácido y desanclaje de la cadena peptídica, así como también el grupo funcional del C-terminal que tradicionalmente permite obtener péptidos con grupos ácido o amida; sin embargo, es posible obtener otros grupos funcionales gracias a estos espaciadores<sup>23,29</sup> (tabla 1).

**Tabla 1.** Algunas resinas comúnmente usadas en síntesis de péptidos en fase sólida

Resina-(brazo)	Brazo o espaciador	Desanclaje	C-Terminal
*Resina de Merrifield		HF	Ácido
*Resina de Wang		95 % TFA	Ácido
Resina 2-Clorotritil cloruro		95 % TFA 1 % TFA/DCM	Ácido péptido protegido
Resina Rink Amida		95 % TFA	Amida

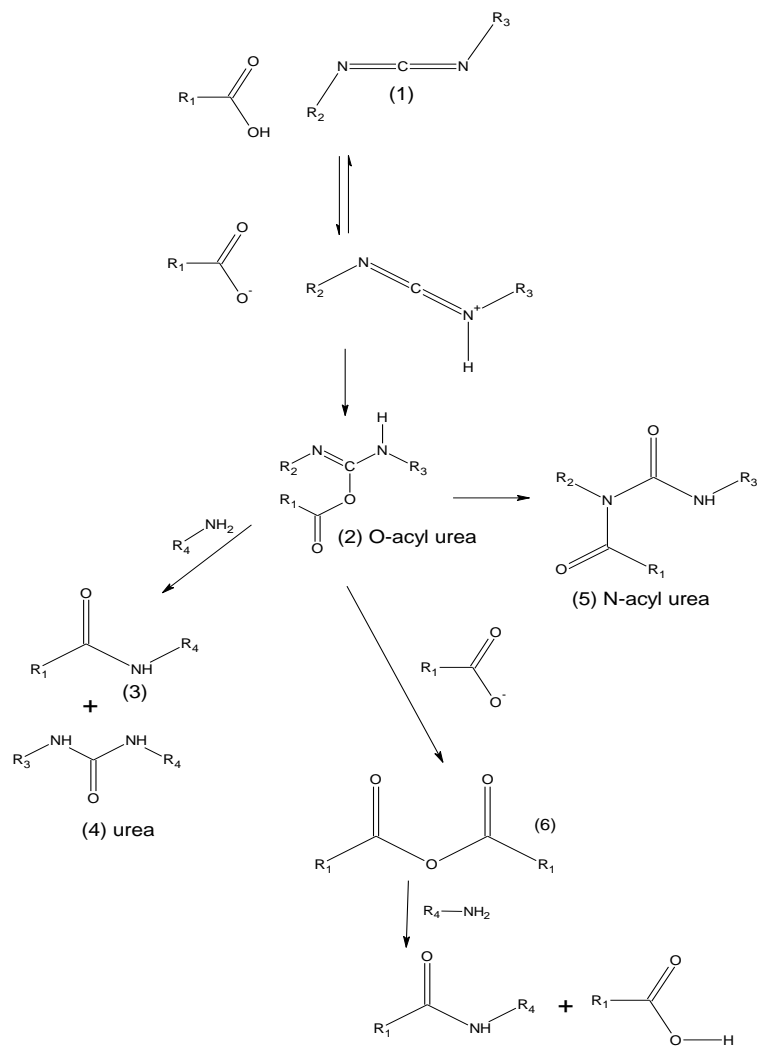
\*Resina usada en la estrategia t-Boc; R: representa a la resina



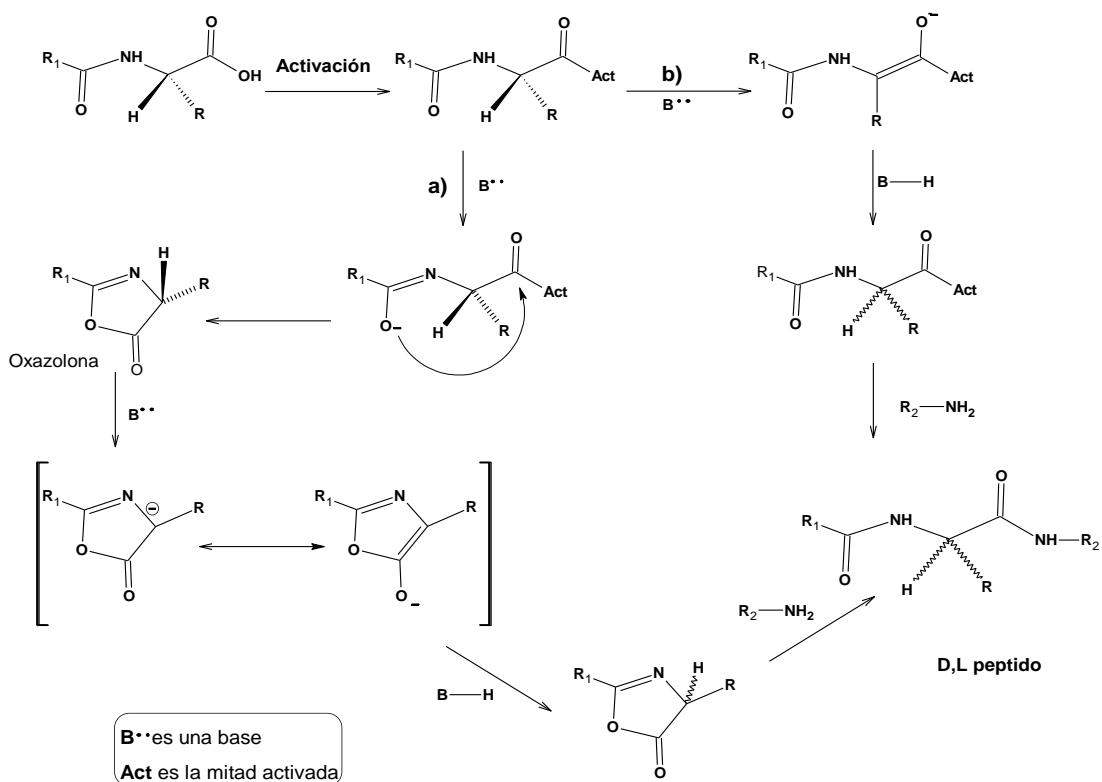
### 1.1.3 Reactivos de acople

La formación del enlace amida entre un grupo carboxilo y uno amino procede lentamente y por esta razón es necesaria la activación del ácido carboxilo, la cual consiste en la sustitución del hidroxilo del ácido por un buen grupo saliente para que posteriormente se dé el ataque nucleofílico por parte del grupo amino; la reacción entre el ácido carboxílico activado y el amino se conoce en síntesis de péptidos como reacción de acople<sup>30</sup>.

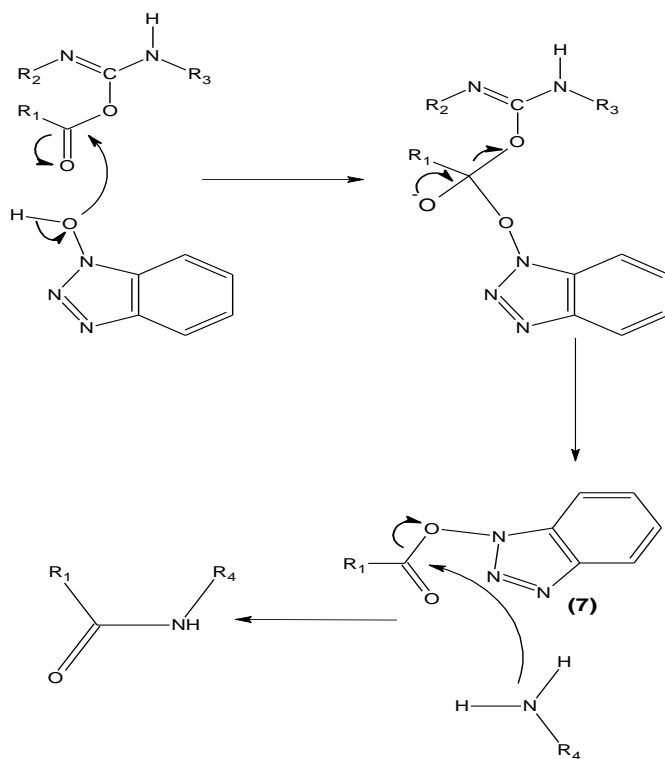
Las carbodiimidas han sido empleadas desde los años 50 para activar el grupo carboxilo, el primer paso del mecanismo de activación (esquema 4) involucra la reacción del ácido carboxílico con la carbodiimida (1) para formar la O-acilurea (2), este intermediario puede dar diferentes productos: puede reaccionar directamente con una amina para dar el enlace amida (3) y una urea como subproducto (4) que en caso de ser insoluble es retirado por filtración, dar la formación del subproducto N-acilurea (5) o la formación del anhídrido del ácido carboxílico (6) que subsecuentemente reacciona con la amina (se requiere 2 equivalentes del ácido carboxílico para la formación del anhídrido simétrico)<sup>28</sup>. En este proceso de activación el intermediario O-acilurea puede dar lugar a la racemización del aminoácido por medio de la formación de una oxazolona (Esquema 5. vía a) o un enol (Esquema 5. vía b), esta pérdida de la configuración es minimizada de forma significativa con la adición del 1-hidrobenzotriazol (HOBt) que produce un éster activado del aminoácido (7), además aumenta la velocidad de reacción (esquema 6). La diisopropilcarbodiimida (DIC) es más utilizada que la dicitclohexilcarbodiimida (DCC) debido a que da una urea soluble como subproducto de reacción la cual es más fácil de retirar que la obtenida por la DCC. Actualmente, en síntesis de péptidos la mayoría de los enlaces amida se forman en presencia de 1-hidroxibenzotriazol o sus derivados, junto a carbodiimidas u otros reactivos de acople; o está integrada en una única molécula como las sales de amonio y fosfonio (esquema 7) las cuales dan una reacción de acople eficiente y baja racemización del aminoácido activado<sup>31,32</sup>.



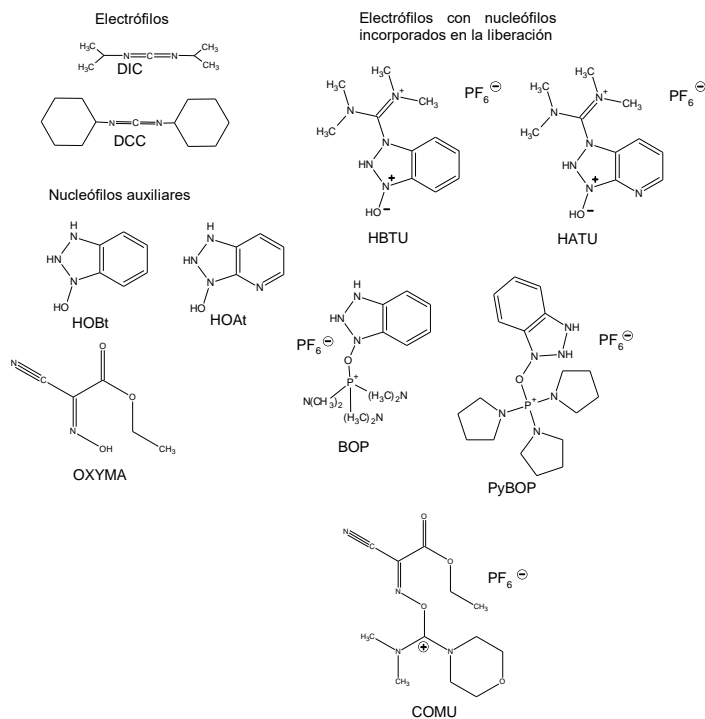
**Esquema 4.** Productos de la activación de un grupo ácido por una carbodiimida.



**Esquema 5.** Mecanismos de racemización de un aminoácido catalizado por una base cuando el grupo carboxilo es activado. a) Vía oxazolonas y b) Vía enol.



**Esquema 6.** Mecanismo de Activación del aminoácido con la carbodiimida y HOBT para la formación del enlace amida.



**Esquema 7.** Estructuras de reactivos de acople derivados del HOBT (izquierda), imonio/uronio centro y sales de HOBT; DIPC (diidopropilcarbodiimida), HBTU,HATU,HOAt, BOP,PyBOP, COMU.

## 1.2 Estrategias sintéticas para la obtención de péptidos de secuencia difícil

La SPFS es una metodología robusta que permite obtener una gran variedad de péptidos y pequeñas proteínas pero como todo proceso químico puede presentar dificultades, siendo la más significativa la denominada 'péptidos de secuencia difícil' en la que ocurre una falla en la síntesis, es decir, una ineficiencia sintética la cual frecuentemente es abrupta e inesperada y es consecuencia del colapso significativo de la resina por lo cual la secuencia objetivo no es sintetizada satisfactoriamente en condiciones estándar. Los péptidos de secuencia difícil están poco solvatados mientras están unidos al soporte sólido lo cual produce acilaciones y desprotecciones incompletas del N- $\alpha$ -amino, que dan frecuentemente un deficiente resultado sintético. Esta dificultad se da tanto en péptidos cortos como largos y producen deleciones o cadenas truncadas que entorpece la obtención de la molécula objetivo<sup>33</sup>.

La ineficiencia sintética es dependiente de la secuencia, debida a efectos estéricos y de agregación; los efectos estéricos están relacionados con aminoácidos con cadenas laterales voluminosas (o grupos protectores) y puede ocurrir en cualquier lugar durante la síntesis del péptido; por otro lado, las agregaciones son producidas por interacciones entre la cadena peptídica y el soporte o por interacciones intra o intermoleculares de las cadenas

peptídicas que forman principalmente estructuras secundarias tipo hojas- $\beta$  por medio de puentes de hidrógeno lo cual produce una baja solvatación del péptido en crecimiento, que disminuye la reactividad de los sitios de reacción del N-terminal de la cadena peptídica en síntesis y consecuentemente afectará la desprotección y acilación del N- terminal<sup>33, 34</sup>.

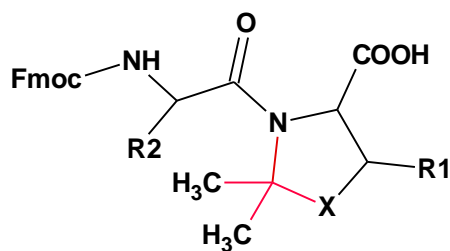
Para superar esta dificultad sintética se debe evitar la formación de estas asociaciones y para esto se han empleado resinas con una sustitución baja (cerca a 0.20 meq/g) puesto que sustituciones altas permiten el crecimiento cercano de las cadenas peptídicas, lo que a su vez incrementa la posibilidad de interacciones intermoleculares y subsecuente falla en la síntesis; además se puede cambiar el soporte empleado debido a que resinas no polares como las de poliestireno (PS) han mostrado menor eficiencia en la síntesis de este tipo de secuencias (determinado por medio de RP-HPLC y espectrometría de masas) comparado con aquellas que son ensambladas en soportes polares como los de Polidimetilacrilamida, poliestireno-polietilenglicol (PS-PEG) o PEG los cuales contribuyen a un ambiente polar que reduce la propensión de péptidos hidrofóbicos a sufrir auto-agregación. La agregación también puede ser prevenida por medio del aumento de la solvatación del complejo péptido-resina y para esto se ha empleado solventes como el dimetilsulfóxido (DMSO) que ha demostrado inhibir la agregación aún mejor que la N,N-dimetilformamida (DMF); la N-metil-2-pirrolidona (NMP) también ha demostrado ser un solvente útil, igualmente el uso de la mezcla mágica (DCM (diclorometano), DMF y NMP con tritón X-100 y etilencarbonato) a 55°C. Junto a los solventes se han empleados detergentes y sales caotrópicas, también se ha incorporan aminoácidos con protecciones que disminuyan o eviten la formación de estos agregados como las pseudoprolinas. Otra iniciativa para superar este tipo de dificultades es el uso de radiación microondas como método de calentamiento<sup>35, 36</sup>.

### 1.2.1 Agentes Caotrópicos

Un agente caotrópico es definido como aquel que evita la formación de puentes de hidrógeno, en casos donde se presenta dificultad para acoplar un aminoácido o varios de estos en una secuencia de difícil obtención, como agentes caotrópicos son utilizados el Cloruro de Litio, Bromuro de Litio y Peryodato de sodio. La eficacia de un agente caotrópico se debe a la disminución de la agregación entre cadenas peptídicas adyacentes y las interacciones entre la misma cadena<sup>37, 38</sup>.

## 1.2.2 Dipéptidos de Pseudoprolinas

Los dipéptidos de pseudoprolinas simulan la estructura de la prolina la cual ha demostrado ser un disruptor de estructuras secundarias y cuando es incorporada en secuencias que son propensas a presentar este tipo de asociaciones en la SPFS las disminuye<sup>39</sup>. Los dipéptidos de pseudoprolina (esquema 8) son derivados que contienen en su estructura un residuo de treonina, serina (oxazolidinas) o cisteína (tiazolidina), y son acoplados por medio de las condiciones estándar de SPFS, su protección es removida en el proceso de desanclaje con TFA para obtener la secuencia correspondiente en la estrategia química Fmoc<sup>38</sup>. La introducción de estos derivados ejerce un efecto pronunciado en la conformación de la cadena en SPFS originando en preferencia una conformación cis del enlace amida, y evita o disminuye así la formación de puentes de hidrógeno que pueden producir la agregación<sup>40</sup>. Por medio de estas pseudoprolinas se ha logrado sintetizar péptidos de secuencias difícil y con un mayor número de residuos, que presentan un mejor rendimiento y pureza, sin embargo, su empleo está limitado a secuencias que contengan los residuos de los aminoácidos anteriormente mencionados y depende también de la ubicación de este pues no siempre se puede asegurar que la incorporación de estas pseudoprolinas tenga un efecto positivo en la síntesis del péptido<sup>41</sup>.



**Esquema 8.** Dipéptido de Pseudoprolina. Para la Serina R1=H y X=O, Treonina R1= CH<sub>3</sub> y X=O, R2 es la cadena lateral del aminoácido que conforma el dipéptido de Pseudoprolina, para la cisteína R1=H y X=S. Para todos casos R2 corresponde a la cadena lateral del aminoácido que precede a la pseudoprolina de dichos aminoácidos.

### 1.2.3 Radiación Microondas

La síntesis asistida por radiación microondas se basa en el eficiente calentamiento por medio del efecto de calentamiento dieléctrico; este es dependiente de la habilidad de un material específico (solvente o reactivo) de absorber la radiación microondas y convertir esa energía en calor. La radiación de una muestra por la frecuencia del microondas produce el alineamiento de dipolos o iones con el campo eléctrico alternante aplicado y en el proceso la energía perdida es transformada en forma de calor a través de la fricción<sup>42</sup>.

Desde 1992 la radiación microondas ha sido empleada en la SPFS de forma exitosa<sup>43,44</sup>; su uso reduce los tiempos de reacción de desprotección y acople, y en general produce un aumento del rendimiento y pureza de la molécula objetivo. La radiación microondas ha presentado un gran desempeño en la síntesis de péptidos de un número elevado de residuos o con dificultad sintética debido a que el grupo amino como la cadena peptídica tratan constantemente de alinearse con el campo eléctrico del microondas y esto puede ayudar a romper la agregación intra o intermolecular y mejorar la eficiencia de acople y desprotección<sup>42, 43, 45</sup>.

Sin embargo, la radiación microondas también puede favorecer reacciones colaterales de racemización y formación de aspartimidas. La cisteína, histidina y el aspártico son susceptibles a la racemización durante la SPFS asistida por radiación microondas; para la disminución de la racemización de la cisteína, histidina y aspártico se debe realizar acoples a temperaturas inferiores a los 50°C. Adicionalmente, la formación de aspartimida del ácido aspártico es reducida por la adición de HOBt a la solución de desprotección o empleando piperazina en lugar de piperidina<sup>46</sup>. El desempeño en cada uno los activadores comúnmente empleados en síntesis de péptidos ha sido estudiado mostrando un comportamiento similar al presentado en temperatura ambiente, utilizando típicamente de 3 a 5 excesos. En la mayoría de las aplicaciones de la estrategia Fmoc se emplea piperidina 20-50 % en DMF o NMP con 0.5 minutos de radiación (temperatura promedio 80°C) y 3 minutos de reposo (temperatura ambiente)<sup>47,48</sup>.

Péptidos de secuencias difíciles han sido sintetizados mostrando un mejor perfil cromatográfico, rendimiento y pureza; pero hay otros que no mejoran aún con utilización de resinas de PEG, incorporación de pseudoprolinas, agentes caotrópicos o calentamiento por radiación microondas razón por la cual en esta y otras técnicas se pueden complementar con la condensación de bloques<sup>49,16, 50, 51, 52, 46, 53</sup>.





## 2. Metodología

### 2.1 Selección y diseño sintético del péptido quimérico

En la FIDIC se han identificado alrededor de 70 moléculas peptídicas modificadas que son candidatas a vacuna, las cuales se unen con alta afinidad a la célula objetivo (hepáticas o glóbulos rojos) y provienen de regiones conservadas de proteínas de los dos estadios en el ciclo asexual del parásito *Plasmodium falciparum*<sup>54</sup>. La forma de presentación de estas moléculas es aún campo de estudio y en este sentido las quimeras peptídicas son una aproximación interesante a evaluar ya que no solo permiten presentar varios epítomos diferentes a la vez, también es posible obtener una molécula de alto peso molecular; requisito fundamental pues se ha determinado que el tamaño de la molécula desempeña un rol importante en su actividad y biodisponibilidad, puesto que podría potenciar la respuesta inmune y por ende la protección<sup>54</sup>.

Se eligieron cuatro secuencias de péptidos modificados, todos ellos derivados de secuencias provenientes de regiones conservadas de proteínas que están implicadas en el proceso de invasión de los dos estadios del parásito en el humano, y la selección se basó en función del número de títulos de anticuerpos y la protección de cada molécula peptídica en monos *Aotus*. Para conformar el péptido quimérico se escogió la secuencia **MTDVNRYRYSNNYEEQPHIS** derivada de un fragmento de la proteína RESA<sup>55</sup>, la secuencia **EVLYHVPLAGVYRSLKKQLE** que proviene de un fragmento de la proteína MSP-1<sup>56</sup>, la secuencia **VIKHMRFHADYQAPFLGGGY** que proviene de un fragmento de la proteína STARP<sup>18</sup> y la secuencia **KNSFSLGENPNANP** derivada de un fragmento de la proteína CSP<sup>57,56</sup> (tabla 2). Características que hacen de la quimera seleccionada una macromolécula interesante para evaluar sintéticamente por su alto número de residuos; adicionalmente, esta tiene un alto potencial biológico al ser multiestadio y multiepitopo.

Posterior a la selección de los fragmentos se incorporó al diseño de la secuencia del péptido quimérico dos Glicinas como espaciadores en la parte C-terminal de cada uno de los epítomos puesto que en la FIDIC se ha empleado estos espaciadores de Glicina en péptidos que son polimerizados y en general las moléculas analizadas por dicroísmo circular muestran gran similitud a las mismas moléculas en presentaciones monoméricas, además, este aminoácido le confiere flexibilidad; a todas las permutaciones posibles (24 permutaciones) se les realizó un análisis predictivo por medio del Software libre de PEPTIDE COMPANION, que es una herramienta que permite conocer la dificultad sintética y se seleccionó la permutación:

<sup>82</sup>**KNSFSLGENPNANPGGVIKHMRFHADYQAPFLGGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG<sup>1</sup>** (número asignado a este péptido: 39543), debido a que esta es una de las que teóricamente presenta la menor dificultad

de las 24 permutaciones posibles y parte del objetivo general de este trabajo fue la de sintetizar y obtener el péptido quimérico.

**Tabla 2.** Secuencias seleccionadas para conformar el péptido quimérico multi-estadio y multi-epítipo derivado de cuatro proteínas relevantes en el proceso de invasión del parásito al humano.

Derivado de proteína *	Número de péptido ‡	SECUENCIA
		N → C ‡
RESA-155 <sup>141-160</sup>	9948	MTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG
MSP1 <sup>1282-1301</sup>	10014	EVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGG
STARP <sup>24-43</sup>	24320	VIKHMRFHADYQAPFLGGGYGG
CSP <sup>68-87</sup>	25608	KNSFSLGENPNANPGG

\* Los números de los superíndices indican la región de la proteína de la que deriva el fragmento péptido.

‡ El número de péptido es una codificación consecutiva de los péptidos sintetizados en la FIDIC y en este caso, estos péptidos tiene tanto en su N-terminal y C-terminal una Glicina y una cisteína; la Glicina es empleada como espaciador y la Cisteína es incorporada en la secuencia para utilizar el grupo tiol en la formación de enlaces disulfuros que produce la polimerización de cadenas para obtener moléculas de mayor peso molecular las cuales son empleadas en los ensayos funcionales.

‡ Las Glicinas fueron incorporadas en este trabajo como espaciadores entre los aminoácidos de las secuencias seleccionadas.

## 2.2 Síntesis química en fase sólida del péptido quimérico

Se empleó una resina ChemMatrix Rink amida de sustitución 0.60 meq/g. Los disolventes utilizados fueron *N,N'*-dimetilformamida (DMF), 1-metil-2-pirrolidona (NMP), diclorometano (DCM) e isopropanol (IPA). Los activadores del grupo funcional carboxilo fueron *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), tetrafluoroborato-*o*-benzotriazol-il-*N,N,N,N*-tetrametiluronium (TBTU). El grupo protector Fmoc protege el grupo amino de los L- $\alpha$ -aminoácidos; los grupos protectores de las cadenas laterales utilizados fueron: 4-ter-butyl éster (OtBu) para Ácido aspártico (D) y Ácido glutámico (E); ter-butilo (t-Bu) para Treonina (T), Tirosina (Y) y Serina (S); ter-Butiloxicarbonilo (t-Boc) para Lisina (K), tritilo (Trt) para Asparagina (N), Glutamina (Q) e Histidina (H), 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf) para Arginina (R). Se emplearon como reactores Jeringas de polipropileno de 20 mL adaptadas con un filtro de poliestireno.

La síntesis del péptido quimérico de 82 residuos de longitud fue realizada manualmente en SPFS utilizando la estrategia química Fmoc y se procedió de la siguiente forma<sup>58</sup>:

La síntesis se efectuó en dirección C a N-terminal; inicialmente, la resina ChemMatrix Rink Amida con una sustitución de 0.60 meq/g fue hinchada con 5 mL de DCM y luego 5 mL de NMP por 10 minutos en cada solvente. Se disminuyó la sustitución de la resina a 0.20 meq/g por medio de la adición del primer aminoácido a acoplar (Fmoc-Gly-OH), el cual fue disuelto previamente en 5 mL de NMP y activado con TBTU/HOBt/DIPEA (1:1:2, miliequivalentes respectivamente), la reacción se dejó por 1 hora (a todas las resinas empleadas en la síntesis se les disminuyó la sustitución en la proporción deseada en forma análoga a la aquí descrita); en seguida se acetilaron los grupos aminos libres de la resina con 10 mL de una solución que contenía Anhídrido acético/DMF/piridina (1:1:1) por 1 hora, luego se lavó la resina con DMF (2x1'), IPA (3X1') y con DCM (3X1').

En este punto se realizó el test de Kaiser para determinar de forma cualitativa la presencia de grupos amino libres; este test se realizó con una solución del reactivo de ninhidrina, tomando una pequeña porción de resina-péptido a la cual se le adicionó dos gotas de solución A (40g de fenol en 10 mL de etanol absoluto, 1 mL del stock de KCN (65 mg de KCN/100 mL de H<sub>2</sub>O) y 50 mL de piridina) y una gota de solución B (1,25g de ninhidrina en 25 mL etanol absoluto), se mezcló y se calentó a 100°C durante 6 minutos dando coloración azul a verde (prueba positiva) si hay presencia de grupos amino libres y amarillo (prueba negativa) en caso contrario; en este punto específico de reacción como se acetilo los grupos aminos que no reaccionaron el test de káiser da una coloración amarilla.

Por otro lado, la determinación de la sustitución en la resina del primer aminoácido acoplado se realizó con 10 mg de resina y utilizando 0.5 mL de una solución de Piperidina/DMF (3:7) por 30 min, se adicionó 6.5 mL de metanol; la cual fue analizada a una longitud de onda 301 nm<sup>24</sup>.

### **2.3 Síntesis de péptidos en fase sólida en Condición Estándar**

Después del acople del primer aminoácido en la proporción deseada y de obtener un test de Kaiser con coloración amarilla; el grupo protector Fmoc del aminoácido fue removido con una solución de Piperidina al 50 % en DMF (3X10' min), después se lavó con DMF (5X1min), IPA (3X1min) y DCM (3x1min).

Del segundo aminoácido en adelante la activación del grupo carboxilo se realizó como se describe a continuación: en el primer ciclo de acople se activó con DCC y HOBt (5 excesos de cada uno en relación a la sustitución de la resina) disueltos en NMP y se dejó reaccionar por 1 hora; finalizado este tiempo de acople se realizaron los lavados descritos anteriormente, se verificó la eficiencia del acople con el test de Kaiser, si el ensayo era negativo se procedía a la desprotección del grupo amino como se mencionó al inicio de este párrafo y si el ensayo daba positivo se procedía a realizar el segundo ciclo de acople empleando TBTU/HOBt/DIPEA en NMP por 1 hora, se

lavó la resina y se realizó nuevamente el test de Kaiser; si el resultado era negativo se procedía a la desprotección del grupo amino, pero si el ensayo era positivo se realizaba el tercer ciclo de acople activando el grupo carboxilo con DIPC/HOBt y empleando NMP como solvente de acople y Tritón X-100 al 0.5% (v/v). Para un cuarto ciclo de acople, el grupo carboxilo fue activado como anhídrido simétrico y dejando reaccionar por una hora más. Si en este punto la prueba de ninhidrina seguía siendo positiva con una coloración verde clara (que indica que hay menos de un 1% de grupos aminos libres) se bloqueaba los grupos aminos libres con una solución de acetilación. El ciclo de acople y desprotección se repitió las veces que fueron necesarias para obtener la molécula objetivo.

El desanclaje del péptido quimérico obtenido para cada una de las condiciones evaluadas se efectuó a temperatura ambiente como se describe: El desanclaje del péptido de la resina se realizó con una solución (20 mL/g resina-péptido) de TFA/TIS/EDT/H<sub>2</sub>O (ácido trifluoroacético/triisopropilsilano/etanoditiol/agua) en proporciones 94:1:2.5:2.5, respectivamente. Se dejó reaccionar por 3 horas, se transfirió la solución de desanclaje a un falcón y la resina fue lavada con éter etílico frío tres veces, se reunió la solución de clivaje con los lavados de éter, luego se dejó enfriar esta por 10 minutos en la nevera a 4°C para precipitar el péptido y subsecuentemente se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos, el precipitado obtenido se lavó cuatro veces con éter etílico frío y entre cada lavado se centrifugó de la manera anteriormente descrita. Finalmente, el péptido obtenido se dejó secar en una cabina de extracción, y el péptido crudo se caracterizó por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) y espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*).

## 2.4 Síntesis de péptidos en fase sólida asistida por radiación microondas

Después de disminuir la sustitución de la resina como se describe al inicio de esta sección se procedió a asistir la síntesis por radiación microondas siguiendo los pasos descritos anteriormente, variando sólo los tiempos de reacción; en el acople y desprotección se dejó reaccionar por 3x30 seg, dejando intervalos 3 min entre cada calentamiento y se irradió a una potencia de 10 Watts con un horno comercial marca *Simply* 0.7 pc (Referencia SM071WPLU:114562). En los acoples de los aminoácidos aspártico (Asp) e histidina (His) no se irradió con microondas, mientras que en la desprotección sólo al aspártico no se irradió, realizando en estos casos el procedimiento descrito en condiciones estándar. Terminado el proceso de síntesis se desprotegió y desancló el péptido como se describió en el numeral anterior.

## 2.5 Caracterización por RP-HPLC y MADI-TOF

La caracterización por RP-HPLC del péptido y los controles de reacción fueron realizados en un cromatógrafo Merck-Hitachi L-6200 A (Merck, Tokio, Japón) con detector UV-VIS L-4250 a longitud de onda de 210 nm, columna VYDAD RP-18 de 250 mm (Longitud) x 4.6 mm (Diámetro interno) con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , a temperatura ambiente y un flujo de 1.0 mL/min. En condiciones de gradiente lineal de 0 a 70 % de B (A: Agua desionizada/0.05% TFA, B: acetonitrilo/0.05% TFA) en 45 minutos. En el cromatógrafo se inyectaron 80  $\mu\text{L}$  de volumen de la solución del péptido a una concentración de 1 mg/mL que fue disuelto en  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (1:1).

La caracterización por espectrometría de masas MALDI-TOF se realizó en un espectrómetro de masas Bruker Daltonics (Bruker Daltonics Inc. Billerica, U. S. A.) Serie Microflex MALDI-TOF. Se empleó como matriz una solución sobresaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico. La concentración péptida fue de  $5.0 \times 10^{-4}$  mg/ $\mu\text{L}$ , se dispensó en placa 2.5  $\mu\text{L}$  de una solución que contenía una relación 2.5:18 de péptido y matriz respectivamente.

## 2.6 Purificación de la quimera peptídica

El péptido quimérico de 82 residuos fue purificado en un cromatógrafo Merck-Hitachi L-6200 A (Merck, Tokio, Japón) con detector UV-VIS L-4250 a longitud de onda de 210 nm, columna semi-preparativa VYDAD RP-18 de 250 mm (Longitud) x 4.6 mm (Diámetro interno) con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , a temperatura ambiente y un flujo de 3.0 mL/min. En condiciones de gradiente lineal de 21-41% de B (A: Agua desionizada/0.05% TFA, B: acetonitrilo/0.05% TFA) en 60 minutos. Se inyectaron 1.0 mL de volumen de la solución del péptido a una concentración de 10 mg/mL que fue disuelto en  $\text{H}_2\text{O}$  y se recolectaron fracciones del péptido que fueron analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF y se seleccionó aquellas que contenían al péptido quimérico, se hizo la mezcla de dichas fracciones y se corroboró que se obtuviera un solo pico por medio de cromatografía analítica y el respectivo valor del ion molecular, y posteriormente fueron recolectadas y liofilizadas para así obtener el péptido purificado.



## 3. Resultados y discusión

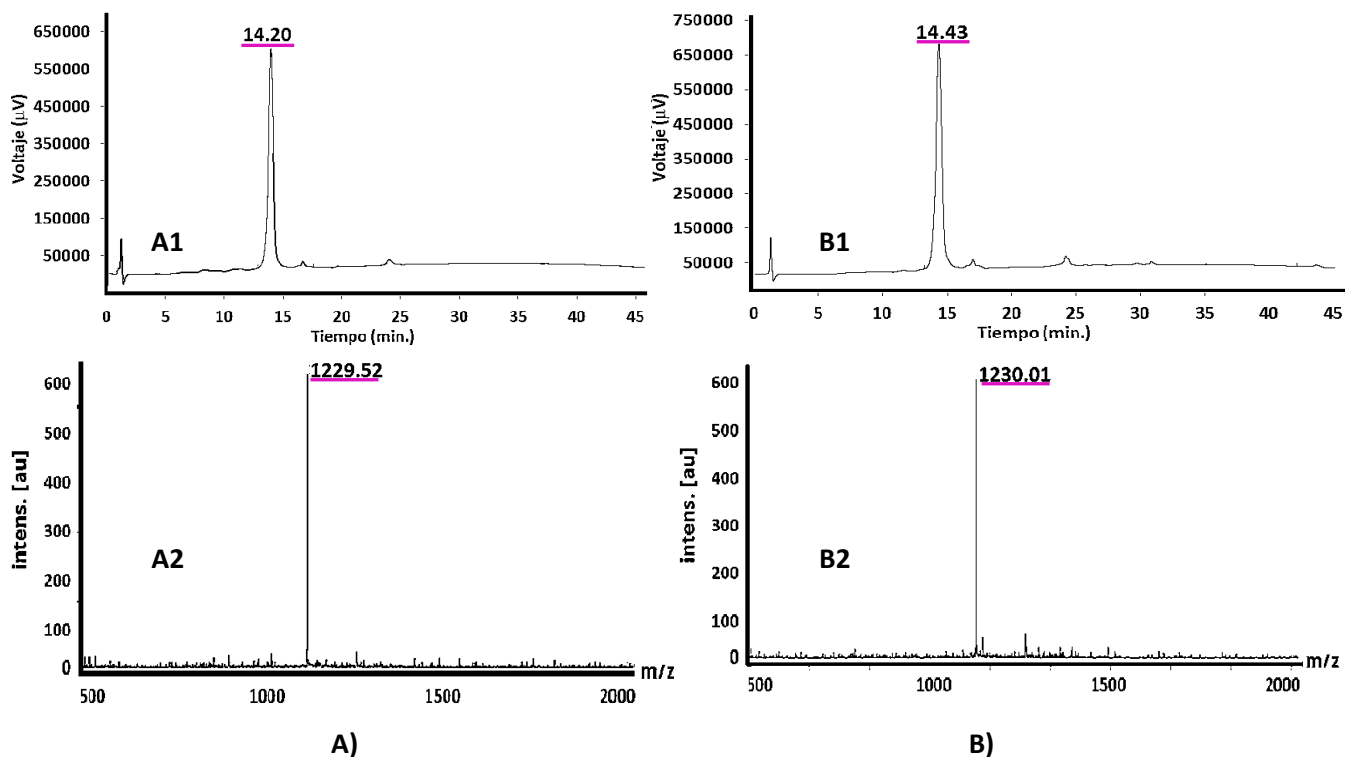
### 3.1. Aspectos sintéticos

#### 3.1.1 Efecto de la Radiación Microondas en la síntesis del péptido quimérico

Se disminuyó la sustitución nominal de la resina ChemMatrix Rink amida (0.60 meq/g) a 0.20 meq/g acoplado 0.20 meq del aminoácido Fmoc-Gly-OH, se acetilaron los grupos aminos libres de la resina, con el fin de disminuir posibles dificultades sintéticas causadas por los fenómenos de agregación y formación de estructuras secundarias tipo hojas- $\beta$  entre cadenas adyacentes<sup>59,11</sup>.

Con esta resina (ChemMatrix Rink Amida 0.2 meq/g) se evaluaron dos condiciones de reacción para la síntesis del péptido quimérico (<sup>82</sup>KNSFSLGENPNANPGGVIKHMRFHADYQAPFLGGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG<sup>1</sup>). La primera en condición estándar (acople y desprotección a temperatura ambiente) y la segunda fue asistida con radiación microondas (acople y desprotección a una temperatura promedio de 80°C, excepto para la histidina y el ácido aspártico), con el objetivo de determinar si hay un efecto en la síntesis al asistir la reacción con radiación microondas. Las reacciones de acople y desprotección fueron seguidas cualitativamente mediante el test de ninhidrina y aproximadamente cada 11 residuos se realizó un control sintético por RP- HPLC y MS-MALDI-TOF con el fin evaluar el progreso de la síntesis.

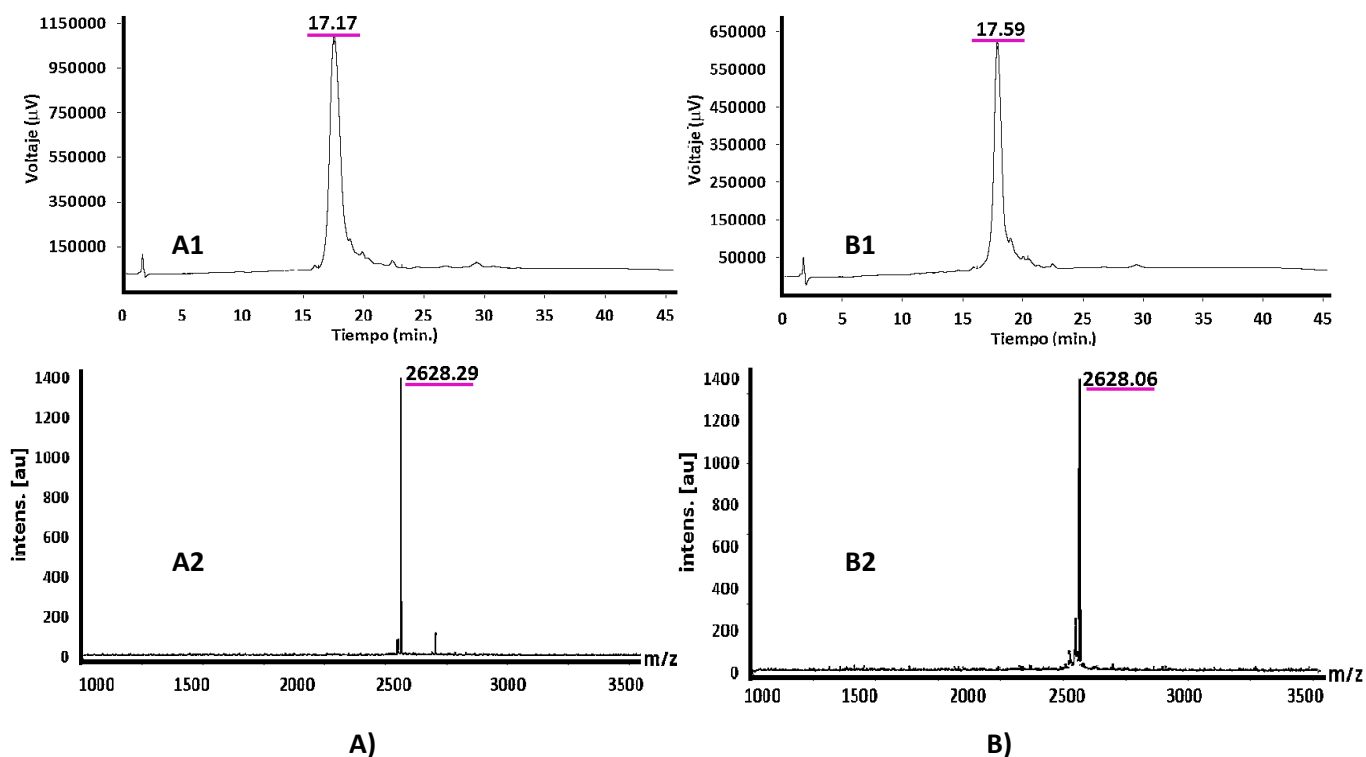
En el primer control del residuo 11 (<sup>14</sup>NYEEQPHISGG<sup>1</sup>) de la síntesis del péptido quimérico se observó para la condición estándar una señal en el cromatograma con un tiempo de retención ( $t_R$ ) de 14.20 minutos y un espectro de masas con un ion molecular de 1229.52 m/z (figura 1. A; tabla 3, Anexo 1) que corresponde al peso molecular (PM) calculado para el péptido quimérico de esta longitud; el control de síntesis de esta misma molécula asistida por radiación microondas mostró, igualmente, una sola señal en el cromatograma con un  $t_R=14.43$  minutos y un ion molecular 1230.01 m/z (figura 1. B). Hasta este punto de reacción no se observó una diferencia entre las dos condiciones y la molécula de 11 residuos de longitud no presento indicios de ineficiencias aparentes puesto que se obtuvo una sola especie en cada uno de los cromatogramas y espectros de masas.



**Figura 1. Caracterización del control de síntesis del residuo 11 (teórico 1228.53 Da) del péptido quimérico sintetizado en dos condiciones; A) Condición estándar (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido Crudo) y B) Condición asistida por Radiación Microondas (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido Crudo).**

Después de acoplar 11 aminoácidos más se realizó el control sintético en el residuo 22 ( $^{22}\text{MTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG}^1$ ), la síntesis en condición estándar mostró una señal en el cromatograma con un  $t_R=17.17$  minutos y un espectro de masas con un ion molecular de 2628.29 m/z (figura 2. A); la molécula sintetizada por radiación microondas mostró una señal en el cromatograma con un  $t_R=17.59$  minutos y un ion molecular de 2628.06 m/z (figura 2. B). Los tiempos de retención obtenidos en las dos condiciones evaluadas son cercanos entre si y los iones moleculares determinados por espectrometría de masas corresponden al valor calculado para el péptido quimérico de 22 residuos. No hubo diferencia significativa entre las dos condiciones de reacción y cabe resaltar que se observó un aumento del tiempo de retención en relación al control anterior de síntesis, lo cual indica que la molécula de 22 residuos de aminoácidos tiene un carácter más hidrofóbico.



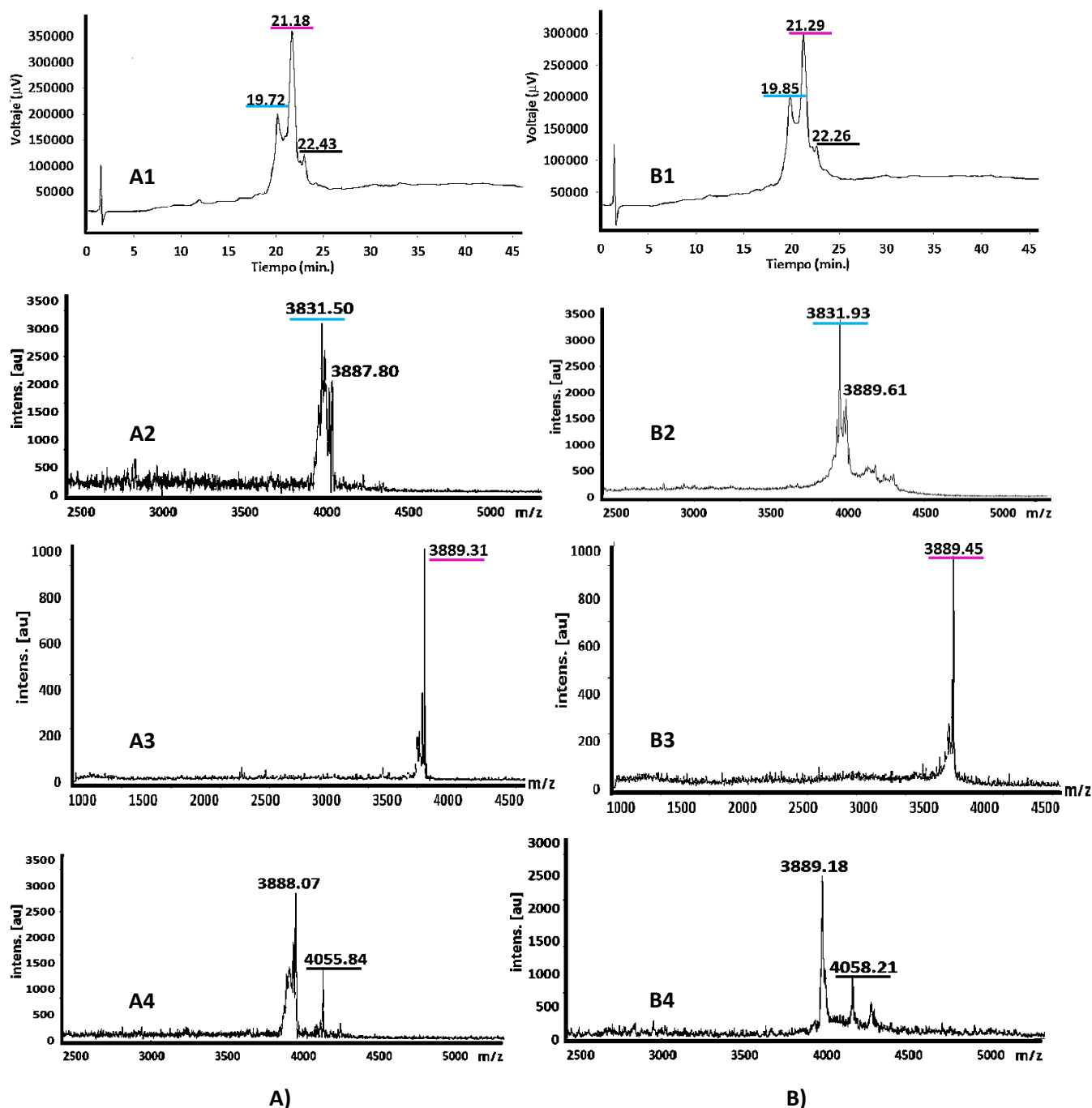


**Figura 2. Caracterización del control de síntesis del residuo 22 (PM Teórico 2628.16 Da) del péptido quimérico sintetizado en dos condiciones; A) Condición estándar (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido Crudo) y B) Condición asistida por Radiación Microondas (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido Crudo).**

En la figura 3 se observa el control síntesis del péptido quimérico elongado hasta el residuo 33 ( $^{33}\text{YRSLKKQLGEGMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG}^1$ ). En condición estándar se obtuvo un cromatograma con tres señales de  $t_R=19.72$ ,  $21.18$  y  $22.43$  minutos (Figura 3. A1); se analizó cada una de estas señales haciendo la recolección de fracciones y se determinó por espectrometría de masas que el  $t_R=19.72$  minutos contiene un ion molecular de  $3831.50$  m/z (Figura 3. A2) el cual corresponde al péptido con una posible delección de glicina ( $3831.50$  m/z -  $3889.31$  m/z =  $-57.81$  m/z; tabla 3 y Anexo 2); para la señal de  $t_R=21.18$  minutos se obtuvo un ion molecular de  $3889.31$  m/z que corresponde al peso del péptido quimérico sintetizado hasta el residuo 33 (Figura 3. A3); la señal con un  $t_R=22.43$  minutos tiene un ion molecular de  $4055.84$  m/z (Figura 3. A4) que corresponden probablemente a tres ter-butilaciones de la cadena peptídica ( $4055.84$  m/z -  $3889.31$  m/z =  $+166.53$  m/z;  $56.10$  Da. equivale a un grupo ter-butilo) que son subproductos comúnmente obtenidos en el proceso de desanclado del péptido de la resina y proviene del grupo protector ter-butilo de las cadenas laterales protegidas con este, y que pueden ser minimizados variando parámetros del desanclaje como temperatura, tiempo de reacción y *escavengers* empleados, sin embargo, el principal objetivo de este estudio fue el de evaluar el efecto de las dos condiciones empleadas en la síntesis.

Para el péptido asistido por radiación microondas en este mismo punto de control (residuo 33) se observó tres señales en su cromatograma (figura 3. B1), la señal con un  $t_R=19.85$  minutos presentó en el espectro de masas un ion de 3831.93 m/z (figura 3. B2) el cual posiblemente corresponde a una deleción de glicina (-57.52 m/z), el  $t_R=21.29$  minutos que corresponde a un ion molecular de 3889.45 m/z (figura 3. B3) del péptido quimérico y el  $t_R=22.26$  minutos corresponde a un ion de 4058.04 m/z (+168.59 m/z) que se atribuyó a tres ter-butilaciones (figura 3. B4).

En el control de síntesis del residuo 33 los cromatogramas obtenidos de las dos condiciones evaluadas presentaron similitud en el perfil, tiempo de retención de las señales e iones moleculares obtenidos para cada señal; además, se observó un aumento del tiempo de retención de la especie que contiene al péptido de 33 residuos lo que indica que este es más hidrofóbico que su predecesor de 22 residuos. No se observó una diferencia marcada entre las dos condiciones sintéticas; igualmente, con los resultados obtenidos se puede atribuir la ineficiencia sintética a una deleción de una glicina que está presente en la secuencia (ubicada en los residuos 23 y 24; <sup>33</sup>YRSLKKQLE<sup>24</sup>G<sup>23</sup>GMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG<sup>1</sup>). En vista que se obtuvo el péptido quimérico de 33 residuos de longitud se continuó el proceso sintético.



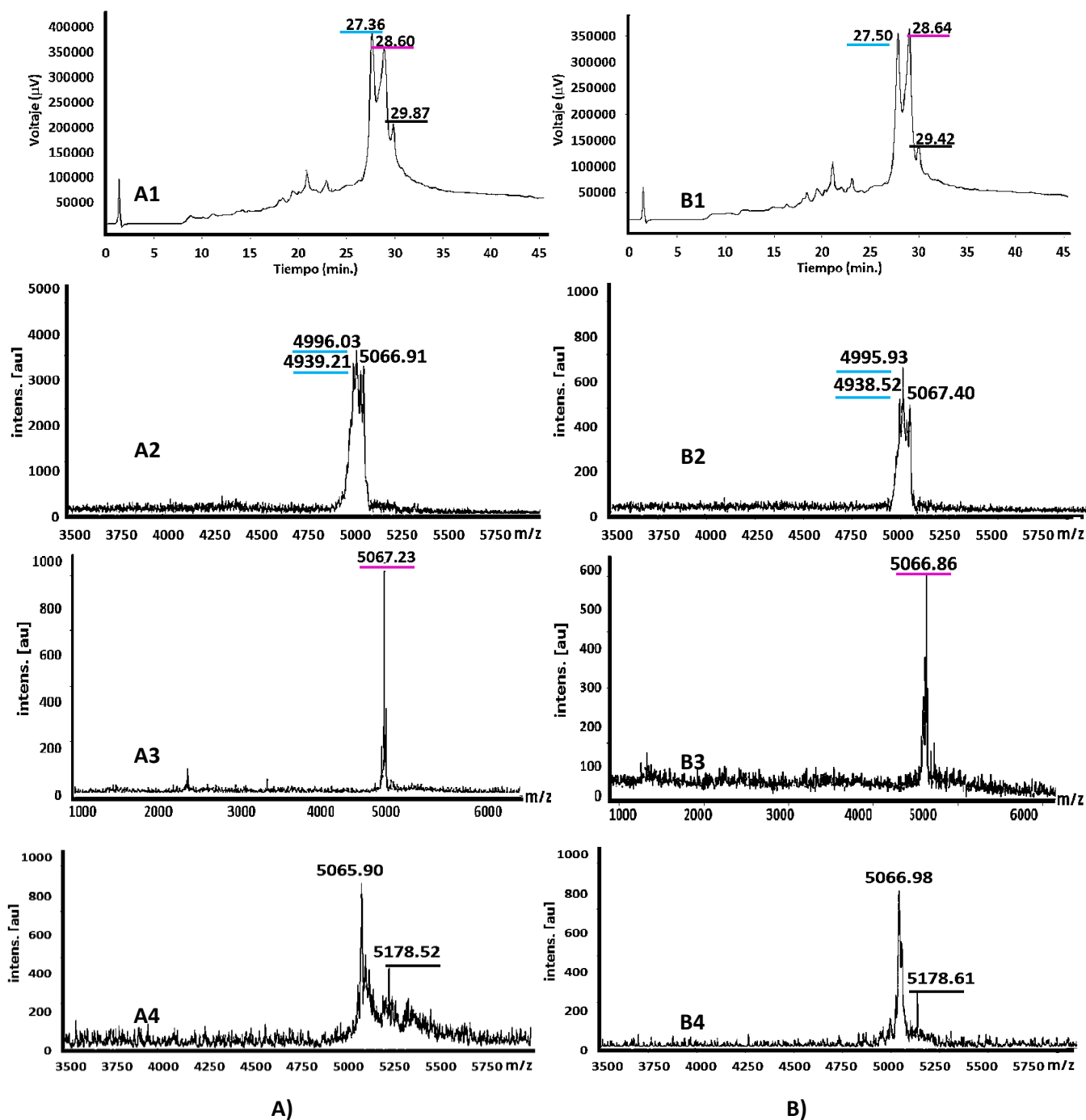
**Figura 3. Caracterización del control de síntesis del residuo 33 (PM Teórico 3887.86 Da) del péptido quimérico sintetizado en dos condiciones; A) Condición (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) de la señal de  $t_R$  resaltada en azul claro, A3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia y A4: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en negro) y B) Condición asistida por Radiación Microondas (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en azul claro, B3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia, B4: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en negro).**

**Nota:** En las figuras de la caracterización (cromatogramas y espectro de masas) del péptido quimérico las señales o valores resaltados en color Azul: corresponden o contiene a especies de menor peso molecular al esperado para el control respectivo; Fucsia: peso molecular cercano al calculado para la molécula; Negro: peso molecular de valor mayor y que son posibles subproductos del proceso de desanclado del péptido.

En el control síntesis del residuo 44 (figura 4. A) del péptido en condición estándar se obtuvo un cromatograma con tres señales, con un  $t_R=27.36$  minutos que corresponde a los iones de 4996.03 m/z (-71.20 m/z) y 4939.21 m/z (-128.02 m/z) que coeluyen en esta señal y que fueron atribuidos a una deleción de alanina (71.08 Da) y otra de alanina-glicina (tabla 3, Anexo 2), puesto que a partir de los resultados previos del control anterior para la molécula de 33 residuos se obtuvo una posible deleción de glicina (aminoácido presente en las posiciones de acople 23, 24 y 35;  $^{44}\text{EVLVHVP}^{36}\text{A}^{35}\text{GVYRSLKKQLE}^{24}\text{G}^{23}\text{GMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG}^1$ ) y en el control del residuo 44 se suma una deleción atribuida a la alanina (residuo posición 36) lo cual se evidencia en un aumento de la intensidad de la señal en la que coeluyen las especies de menor peso y una disminución de la señal de  $t_R=28.60$  minutos que contiene a la molécula objetivo (5067.23 m/z) de 44 residuos de longitud; en la señal de  $t_R=29.87$  minutos se observó un ion molecular de 5178.52 m/z atribuido a dos ter-butilaciones (+111.29 m/z).

En el control de síntesis del péptido quimérico asistido por radiación microondas (figura 4. B) en el cromatograma se obtuvo tres señales, la primera con un  $t_R=27.50$  minutos la cual contiene a los iones de 4995.93 m/z y 4938.52 m/z que son atribuidos a las deleciones anteriormente mencionadas de alanina (-70.93 m/z) y alanina-glicina (-128.34 m/z), respectivamente; la segunda señal con un  $t_R=28.64$  minutos e ion molecular de 5066.86 m/z (molécula peptídica de 44 residuos) y la tercera señal con un  $t_R=29.4$  minutos e ion de 5178.61 m/z el cual posiblemente es producto de dos ter-butilaciones (+111.75 m/z) de la cadena peptídica de 44 residuos.

En las dos condiciones de síntesis evaluadas se obtuvo cromatogramas con perfiles y tiempos de retención similares, e iones moleculares de valor cercano para cada una de las señales analizadas, lo cual mostró que no hay diferencia sintética entre las dos condiciones y que las dificultades son propias de la secuencia, además, fue posible obtener la molécula peptídica de 44 residuos de longitud. Se evidenció un aumento del  $t_R$  de la señal que contiene la molécula de 44 residuos frente al control anterior (33 residuos).



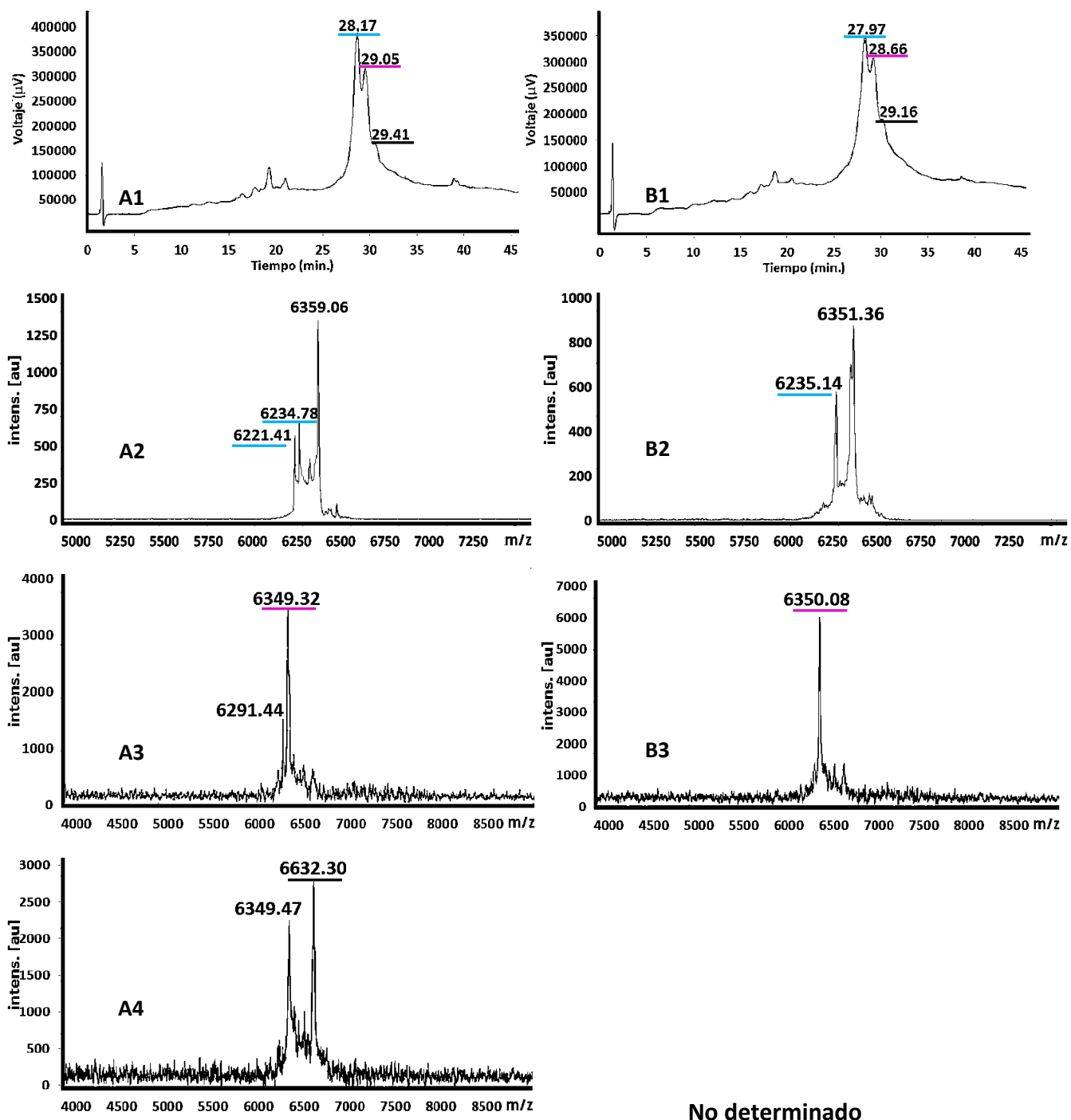
**Figura 4. Caracterización del control de síntesis del residuo 44 (PM Teórico 5065.51 Da) del péptido químico sintetizado en dos condiciones; A) Condición (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) de la señal de  $t_R$  resaltada en azul claro, A3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia y A4: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en negro) y B) Condición asistida por Radiación Microondas (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en azul claro, B3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia, B4: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en negro).**

A partir de este punto de control a medida que el número de residuos aumentaba la lectura por espectrometría de masas se hacía más difícil puesto que no se definían picos de iones moleculares de forma clara, es por esto que aparte de la metodología descrita para la preparación del péptido se realizó variaciones como agregar sobre la mezcla seca (péptido y matriz que estaba sembrada en el pozo) 2.5  $\mu\text{L}$  de matriz adicional o se disminuyó la proporción del péptido sembrado o se hizo ambas variaciones.

El control de síntesis en el residuo 57 en condición estándar se obtuvo en su cromatograma tres señales (figura 5. A). La primera a un  $t_R=28.17$  minutos con los iones de 6221.41 m/z y 6234.78 m/z que probablemente corresponden a deleciones (6221.41 m/z-6349.32 m/z=-127.59 m/z, de deleción de alanina-glicina; 6234.78 m/z - 6349.32 m/z=114.54 m/z, deleción de dos glicinas); la segunda señal con un  $t_R =29.05$  minutos contiene los iones 6291.44 m/z (-57.88 m/z) y 6349.32 m/z, que son debidos a una deleción de glicina y al péptido quimérico de 57 residuos, respectivamente; la señal de menor intensidad de  $t_R=29.41$  minutos contiene al ion molecular de 6632.30 m/z que se atribuyó a cinco ter-butilaciones de la cadena peptídica (+282.98 m/z) causadas en el proceso de desanclaje del péptido de la resina.

En el control de síntesis del péptido (57 residuos) asistido por radiación microondas (figura 5. B), se obtuvo un perfil cromatográfico con tres señales, una de  $t_R=27.97$  minutos que contiene al ion 6235.14 que fue atribuido a una deleción de dos glicinas (no se observó la deleción de alanina como en la condición estándar, muy probablemente debido a la dificultad en la lectura de esta), la segunda señal de  $t_R=28.66$  minutos e ion molecular de 6350.08 m/z que correspondiente al peso molecular del péptido quimérico y una tercera de  $t_R$  de 29.16 minutos.

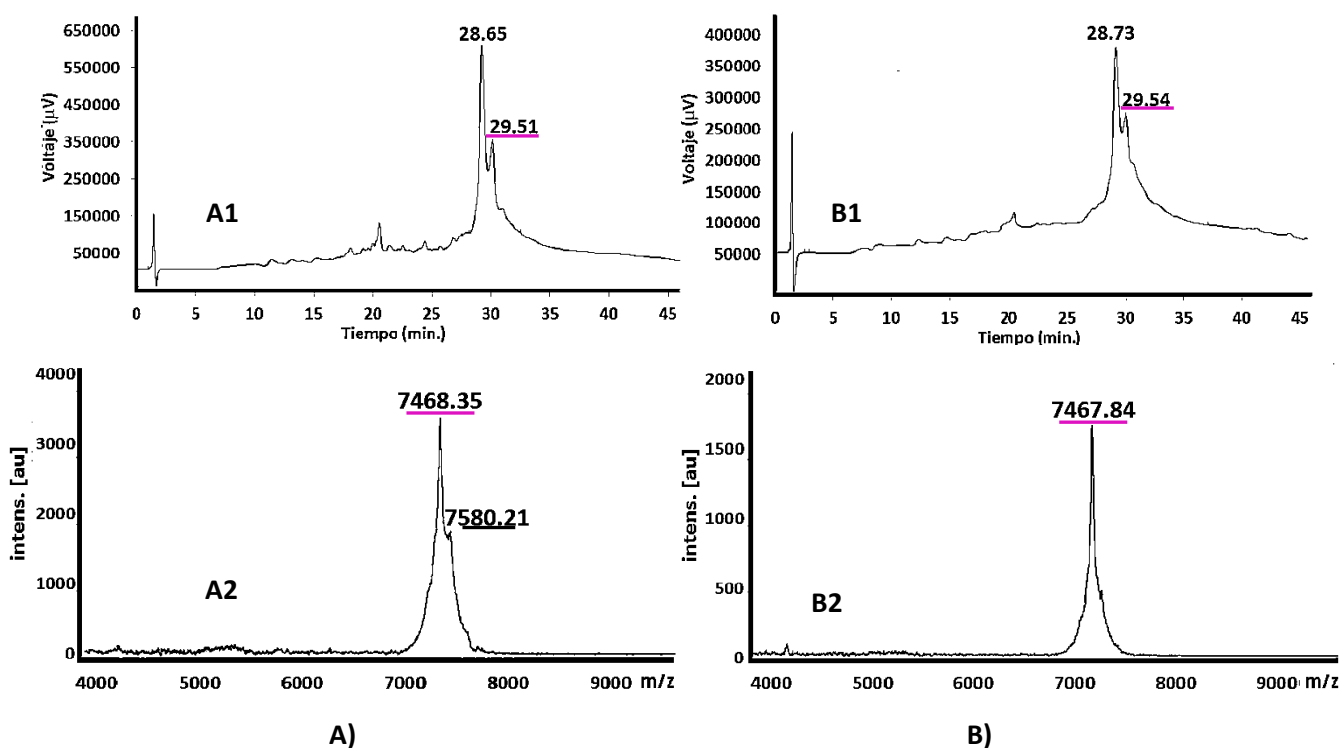
La especie de 57 residuos de aminoácidos ( $^{57}\text{DYQAPFLGGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTD VNRYRYSNNYEEQP HISSG}^1$ ) fue obtenida en las dos condiciones evaluadas, pero en menor proporción en relación al control de síntesis anterior de 44 residuos, debido a la acumulación de las ineficiencias sintéticas durante el proceso de ensamblaje del péptido quimérico, las cuales fueron evidenciadas en los perfiles cromatográficos por el aumento de la intensidad en la señal que contiene a las especies delecionadas y una disminución de la intensidad de la señal que contiene la especie de interés. También se observó un aumento leve del  $t_R$  en relación al control anterior; además, no se obtuvo una diferencia apreciable entre las dos condiciones de síntesis de la molécula de 57 residuos.



**Figura 5. Caracterización del control de síntesis del residuo 57 (PM Teórico 6348.07 Da) del péptido químérico sintetizado en dos condiciones; A) Condición (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) de la señal de  $t_R$  resaltada en azul claro, A3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia y A4: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en negro) y B) Condición asistida por Radiación Microondas (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en azul claro, B3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia).**

Para el control de síntesis de la molécula peptídica de 66 residuos (figura 6.) se observó para las dos condiciones de reacción, en ambos casos, un perfil similar en los cromatogramas y de tiempos de retención cercano entre las dos condiciones evaluadas. Se determinó por medio de espectrometría de masas que la señal de mayor tiempo de retención contiene a la molécula de 66 residuos.

La molécula peptídica de 66 residuos ( $^{66}\text{VIKHMRFHADYQAPFLGGYGGVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTD VNRVRYSNYYEEQPHISGG}^1$ ) fue obtenida por las dos vías sintéticas, presentado similitud entre los perfiles de sus cromatogramas e iones de masas correspondientes, se observó un aumento del tiempo de retención comparado con la molécula de 57 residuos; y una disminución en la intensidad de la señal que pertenece al péptido de 66 residuos, lo cual fue causado por la acumulación de las ineficiencias durante la SPFS.



**Figura 6. Caracterización del control de síntesis del residuo 66 (PM Teórico 7467.68 Da) del péptido químico sintetizado en dos condiciones; A) Condición (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia) y B) Condición asistida por Radiación Microondas (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM de la señal de  $t_R$  en fucsia).**



Para la síntesis en condición estándar para el péptido quimérico de 82 residuos (figura 7. A) se obtuvo un cromatograma con una señal de base ancha con dos tiempos de retención definidos, el primero de  $t_R=26.61$  minutos y el segundo de  $t_R=27.73$  minutos, con los iones moleculares de  $8146.32 \text{ m/z}$  ( $-928.97 \text{ m/z}$ ) y  $9075.29 \text{ m/z}$  ( $+23.87 \text{ m/z}$ , debido al sodio [ $22.99 \text{ Da}$ ]), este último corresponde al péptido 82 residuos de longitud. Para el péptido asistido por radiación microondas (figura 7. B) se evidenció en el cromatograma una señal de base ancha con un solo tiempo de retención definido en  $26.79$  minutos el cual contiene al del ion del péptido quimérico  $9052.46 \text{ m/z}$ . La lectura de estos espectros de masas se realizó en el método lineal del equipo debido a la dificultad en la lectura.

El péptido quimérico ( $^{82}\text{KNSFSLGENPNANPGGVKHMRFHADYQAPFLGGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG}^1$ ) fue sintetizado por medio de las condiciones evaluadas. Se evidenció que las dificultades acumuladas en los procesos repetitivos de acople y desprotección son propias de la secuencia debido a que en las dos condiciones de síntesis (estándar y asistido por radiación microondas) se observaron las mismas ineficiencias sintéticas. La síntesis en condición estándar requirió un tiempo total de  $9720$  minutos, mientras que la asistida por radiación fue de  $2268$  minutos (tiempo calculado para las reacciones de acople y desprotección; Anexo 3). Se obtuvo un rendimiento del péptido crudo de  $9.98 \%$  y  $13.06\%$  en condición estándar y radiación microondas, respectivamente (tabla 4). Posteriormente, se tomó una porción del péptido quimérico de 82 residuos obtenido por estas dos condiciones de síntesis y cada uno fue purificado en una columna semi-preparativa (figura 9) con un rendimiento de recuperación de  $9.16 \%$  y  $12.67 \%$  respectivamente (tabla 4).

A partir de los resultados obtenidos se determinó que la síntesis del péptido quimérico tiene dificultades propias a la secuencia y aunque no son eliminadas o disminuidas por la asistencia de la radiación microondas (ver resumen Anexo 4), este si disminuye de manera marcada el tiempo total de síntesis, mejora el rendimiento para la síntesis de dicha molécula.

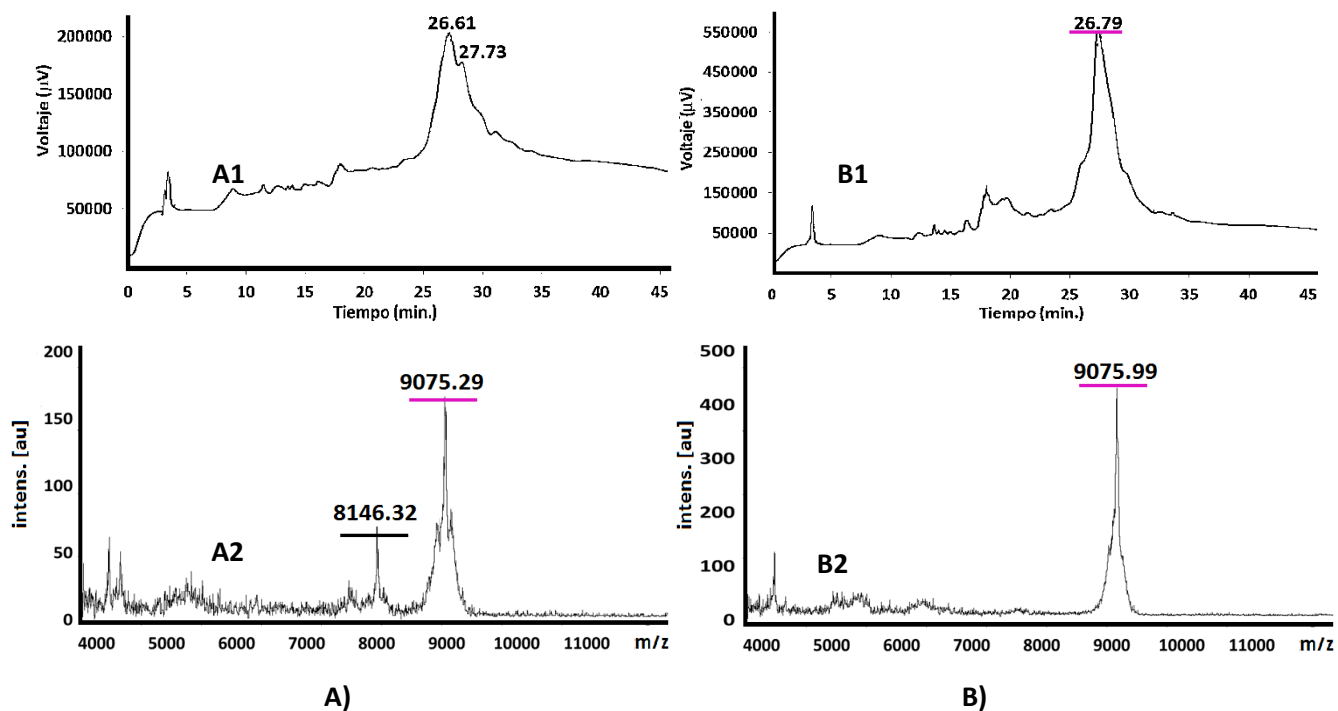


Figura 7. Caracterización del control de síntesis del residuo 82 (PM Teórico 9051.42 Da) del péptido quimérico crudo sintetizado en dos condiciones; A) Condición (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas del crudo y B) Condición asistida por Radiación Microondas (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: Espectro de masas del crudo).

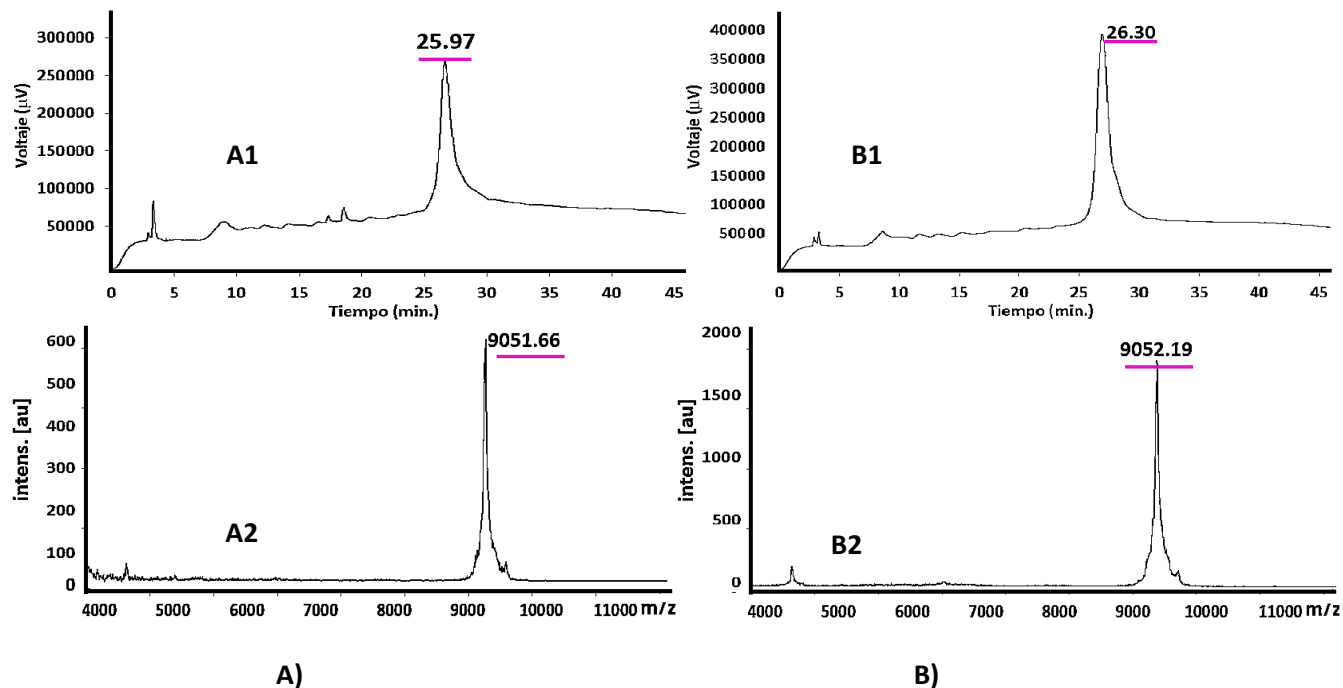


Figura 8. Caracterización del péptido quimérico de 82 residuos (PM Teórico 9051.42 Da) purificado y previamente sintetizado en dos condiciones; A) Condición estándar (A1: Cromatograma, A2: Espectro de masas) y B) Condición asistida por Radiación Microondas (B1: Cromatograma, B2: Espectro de masas).

**Tabla 3. Análisis por MALDI-TOF y RP-HPLC de los intermediarios del péptido quimérico sintetizado en condición estándar y asistida por radiación microondas.**

Residuo	PM (Da)	Condición de reacción‡				observaciones
		Estándar		Radiación Microondas		
		PM exp. (m/z)	t <sub>R</sub> (min.)	PM exp. (m/z)	t <sub>R</sub> (min.)	
11	1228.53	1229.52	14.20	1230.01	14.43	En las dos condiciones de síntesis se obtuvo una sola especie por cromatografía y espectrometría de masas) y no se observó una diferencia significativa entre los análisis.
22	2628.16	2628.29	17.17	2628.06	17.59	En las dos condiciones de reacción no se observó una diferencia significativa y se obtuvo una sola especie por cromatografía y espectrometría de masas.
33	3887.86	3831.50 (-57.81) 3887.90	19.72	3831.93 (-57.52) 3889.61	19.85	En las dos condiciones se observó especies de menor peso atribuidas a una deleción de Glicina*, el peso molecular del péptido quimérico sintetizado hasta el residuo 33, y una especie de mayor peso molecular que es atribuida a tres ter-butilaciones.
		<b>3889.31</b>	21.18	<b>3889.45</b>	21.29	
		3888.07 4055.84 (+166.53)	22.43	3889.18 4058.04 (+168.59)	22.26	
44	5065.51	4939.21 (-128.02) 4996.03 (-71.20) 5066.91	27.36	4938.52 (-128.34) 4995.93 (-70.93) 5067.40	27.50	En las dos condiciones se observa una deleción atribuida a Alanina y otra de Alanina-Glicina*, el peso molecular del péptido quimérico sintetizado hasta el residuo 44, y una especie de mayor peso molecular de dos ter-butilaciones.
		<b>5067.23</b>	28.60	<b>5066.86</b>	28.64	
		5065.90 5178.52 (+111.29)	29.87	5066.98 5178.61 (+111.75)	29.42	
57	6348.07	6221.41 (-127.59) 6234.78 (-114.54) 6350.06	28.17	6235.14 (-114.91) 6351.36	27.97	En las dos condiciones se observó una deleción de dos Glicinas y para la condición estándar se observó además la deleción previamente vista en el control anterior de Alanina-Glicina. En ambas condiciones de reacción se obtuvo la molécula objetivo de 57 residuos, y una especie de mayor peso molecular que se atribuye a ter-butilaciones.
		6291.44 (-57.88) <b>6349.32</b>	29.05	<b>6350.05</b>	28.66	
		6349.47 6632.30 (+282.98)	29.41	ND	29.16	
66	7467.68	ND	28.65	ND	28.73	En las dos condiciones de síntesis se observó especies delecionadas, el peso molecular del péptido quimérico sintetizado hasta el residuo 66, y una especie de mayor que posiblemente es obtenida por reacciones colaterales en el proceso de desanclaje del péptido.
		<b>7469.35</b> 7580.21 (+111.86)	29.51	<b>7467.84</b>	29.54	
82	9051.42	<b>8146.32</b> (928.97) <b>9075.29</b> (+23.87)	26,61 27.73	<b>9075.99</b> (+24.57)	26.79	En las dos condiciones se obtuvo el peso molecular del péptido quimérico sintetizado hasta de 82 residuos.

‡ el valor experimental de m/z en negrita corresponde al valor de la molécula peptídica sintetizada para el número de residuos correspondiente para cada control de síntesis, los valores en paréntesis son las diferencias que tiene ese ion en referencia a la especie en negrita experimental.

\*valor de los residuos delecionados atribuidos: Gly= 57.05 Da, Ala= 71.08 Da, Gly-Gly= 114.10 Da, Ala-Gly=128.12 Da (anexo 2); y valor de la una ter-butilación debido a la reacción colateral en el proceso de desanclaje: t-Bu= 56.10 Da; Sodio [Na]:22.99 Da.

ND: No Determinado.

**Tabla 4. Porcentaje de rendimiento en síntesis y purificación para el péptido quimérico obtenido por condición de síntesis estándar y la asistida por radiación microondas.**

Resina (g)‡	Cantidad obtenida (mg)		% de Rendimiento	Cantidad purificada (mg)	Cantidad de péptido obtenido en la purificación (mg)	% de Rendimiento de purificación
	Teórica	Experimental				
0.507	905.70	90.42	9.98	10.58	0.97	9.16
0.501	905.80	118.32	13.06	11.13	1.41	12.67

‡ Se preparó un lote de sustitución 0.20 meq/g y con este se evaluó las dos condiciones de síntesis.

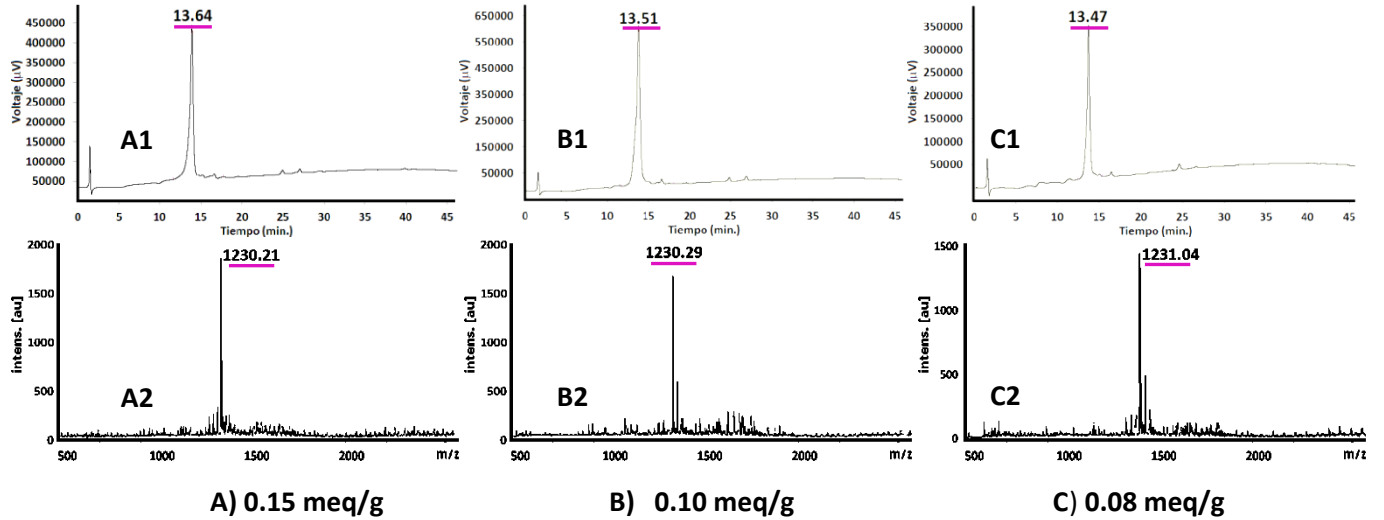
### 3.1.2 Efecto de la sustitución de la resina en la síntesis del péptido quimérico

A partir de los resultados obtenidos se determinó que la radiación microondas disminuye los tiempos de reacción y aumenta el rendimiento sintético del péptido quimérico; sin embargo, la ineficiencia sintética propia de la secuencia de esta quimera persiste. Se procedió evaluar resinas de menor sustitución a la inicialmente utilizada (0.20 meq/g) en la síntesis, asistiendo las reacciones de acople y desprotección con radiación microondas con el objetivo de determinar si sustituciones menores de resina permitían disminuir o superar dichas ineficiencias las cuales pueden deberse a asociaciones entre cadenas adyacentes; Se prepararon tres lotes de resina con sustituciones de 0.15, 0.10 y 0.08 meq/g.

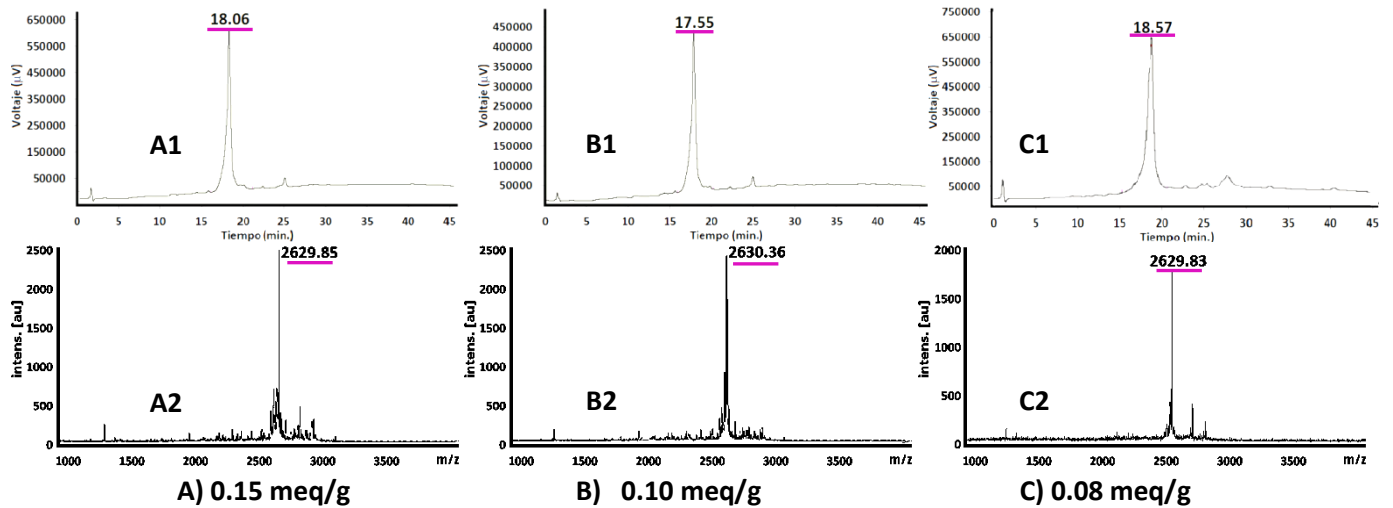
Se realizaron controles de síntesis después del acople de los residuos numerados a continuación en superíndice:

<sup>82</sup>KNSFS<sup>77</sup>LGENPNANPGG<sup>66</sup>VI<sup>64</sup>KHMR<sup>60</sup>FHADYQAPFL<sup>50</sup>GGGYGG<sup>44</sup>EVL<sup>39</sup>YH<sup>35</sup>VPLA<sup>33</sup>GV<sup>30</sup>YRS<sup>26</sup>LKKQ<sup>22</sup>LEGG<sup>11</sup>MTDVNRYRYSN<sup>11</sup>NYEEQPHISGG, para el desanclaje de los controles sintéticos se aumentó el volumen de la solución de desanclado de a un volumen de 30 mL/ g de resina-péptido para disminuir las reacciones colaterales de este proceso.

En el control de síntesis para el péptido de 11 residuos en las tres sustituciones de resina evaluadas (0.15, 0.10 y 0.08 meq/g), se observó una sola señal en los cromatogramas y el valor del ion molecular corresponde al esperado para el péptido de esta longitud (figura 9, tabla 5). En el control del péptido de 22 residuos igualmente se observó una sola señal en el cromatograma y el ion molecular correspondiente para las tres sustituciones de resina (figura 10), lo que demuestra que la síntesis del péptido hasta el residuo 22 no presenta dificultad sintética como se obtuvo cuando se empleó una resina de mayor sustitución (0.20 meq/g).



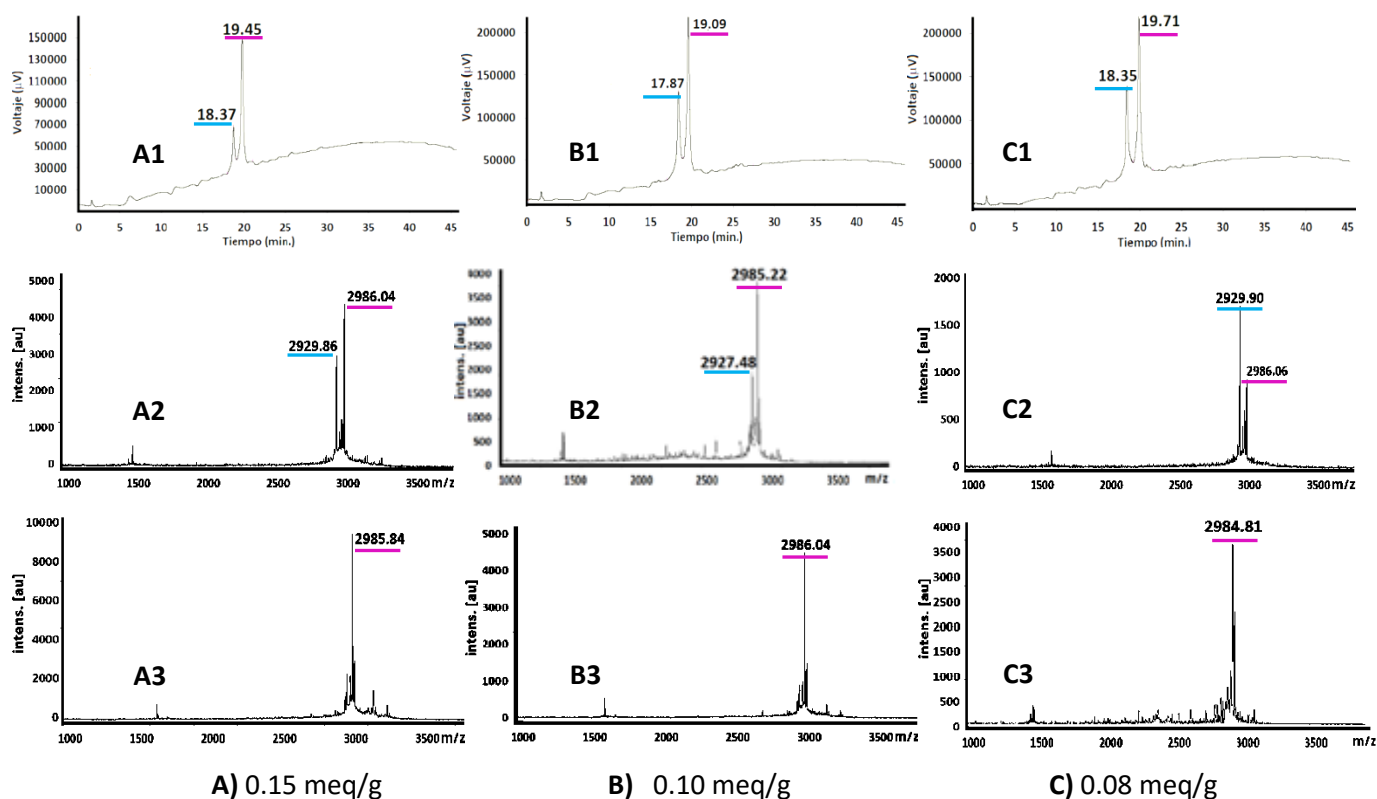
**Figura 9.** Caracterización del control de síntesis del residuo 11 (PM Teórico 1228.53 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferente sustitución; **A) 0.15 meq/g** (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido crudo, **B) 0.10 meq/g** (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido crudo) y **C) 0.08 meq/g** (C1: Cromatograma del péptido crudo, C2: EM del péptido crudo).



**Figura 10.** Caracterización del control de síntesis del residuo 22 (PM Teórico 2628.16 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustituciones; **A) 0.15 meq/g** (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido crudo, **B) 0.10 meq/g** (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido crudo) y **C) 0.08 meq/g** (C1: Cromatograma del péptido crudo, C2: EM del péptido crudo).

El control del péptido con 26 residuos sintetizado con las tres sustituciones de resina mostró en todos los casos dos señales en los cromatogramas (figura 11), en el espectro de masas se observó un ion de una especie peptídica con una delección de glicina (tabla 5), y el otro ion que corresponde a la molécula de 26 residuos de aminoácidos ( $^{26}\text{LEGGMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG}^1$ ). Posteriormente, se analizó cada una de las señales y se determinó que la señal de mayor tiempo de retención (figura 11. A3, B3 y C3) correspondía a la molécula objetivo.

El perfil cromatográfico de las tres sustituciones empleadas en la síntesis del péptido es similar entre sí, sin embargo, cualitativamente se observa una mayor intensidad de la señal que contiene el péptido sintetizado de 26 residuos en la resina de 0.15 meq/g en referencia a las síntesis de las resinas de menor sustitución (0.10 y 0.08 meq/g).

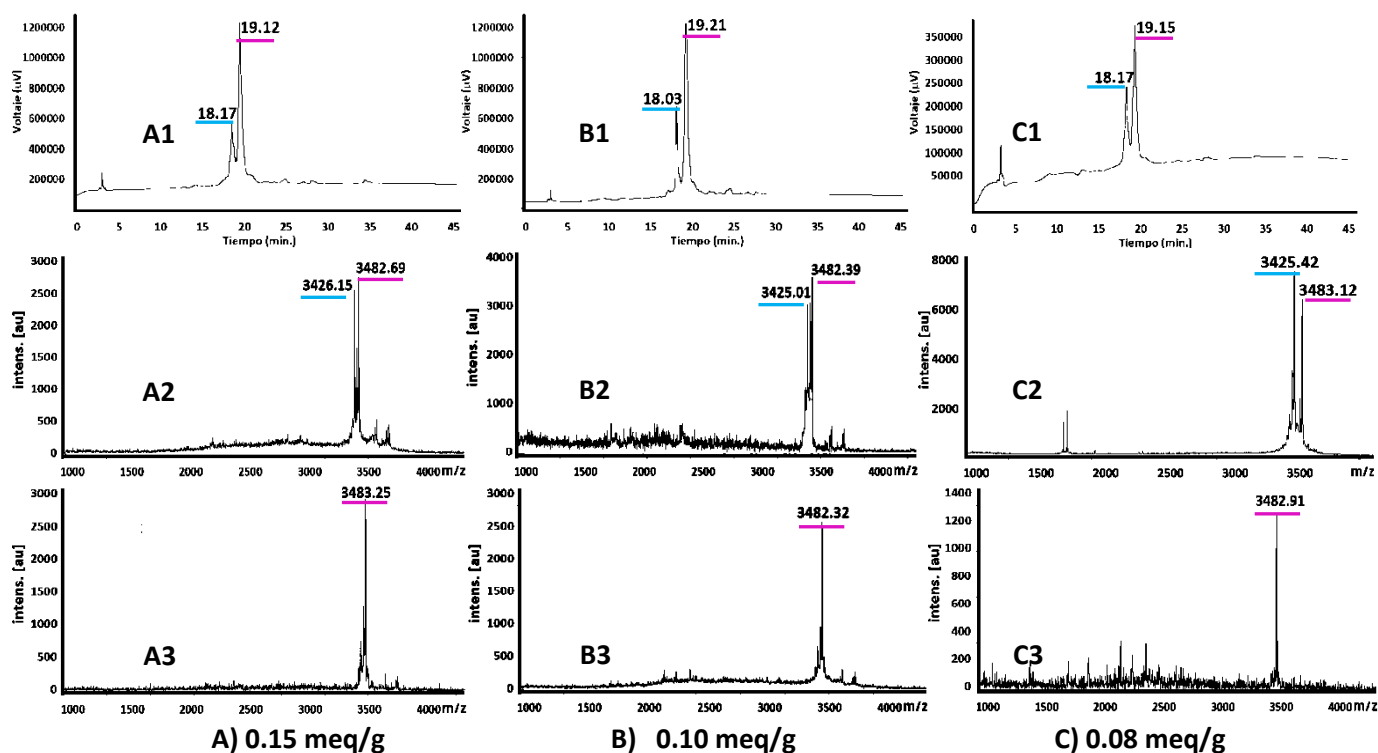


**Figura 11. Caracterización del control de síntesis del residuo 26 (PM Teórico 2984.33 Da) del péptido químico sintetizado en resinas de diferentes sustitución; A) 0.15 meq/g (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido crudo, A3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia), B) 0.10 meq/g (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido crudo, B3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia) y C) 0.08 meq/g (C1: Cromatograma del péptido crudo, C2: Espectro de masas (EM) del péptido crudo, C3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia).**

**Nota:** En las figuras de la caracterización (cromatogramas y espectro de masas (EM)) del péptido químico las señales o valores resaltados en color Azul: corresponden o contiene a especies de menor peso molecular al esperado para el control respectivo; Fucsia: peso molecular cercano al calculado para la molécula.

En el control de síntesis después de acoplar el residuo 30 (figura 12) se observó en la sustitución de 0.15 meq/g un cromatograma con señales de  $t_R=18.17$  minutos y  $t_R=19.12$  minutos, y en el espectro de masas del dos iones moleculares de 3426.15 m/z (-56.54 m/z) y 3482.69 m/z (figura 12. A2) que corresponden a la deleción de glicina y a la molécula peptídica de 30 residuos, se determinó que la señal de mayor tiempo de retención contiene a la especie de interés ( $^{30}\text{LKKQLEGGMTDVNRYYSNNYEEQPHISGG}^1$ , figura 12. A3). El control de síntesis en la resina con sustitución de 0.10 meq/g (figura 12. B) presento un perfil similar en el cromatograma con dos señales de tiempos de retención ( $t_R=18.03$  minutos y  $t_R=19.21$  minutos) e iones moleculares (3425.01 m/z debido a una deleción de glicina [-57.38 m/z] y 3482.39 m/z del péptido de 30 residuos) de valor cercano al obtenido en la síntesis de la resina de mayor sustitución, se determinó que la señal de mayor tiempo de retención ( $t_R=29.21$  minutos) contiene al péptido de 30 residuos. En el control de la síntesis en la resina de 0.08 meq/g se obtuvo un cromatograma con dos señales con un  $t_R=18.17$  minutos y otro de  $t_R=19.15$  minutos, con un espectro de masas con dos iones moleculares 3425.42 m/z (-57.70 m/z) y 3483.12 m/z, igualmente, se determinó que la señal de mayor tiempo de retención corresponde al péptido objetivo.

El perfil cromatográfico observado en las tres sustituciones de resina (0.15, 0.10 y 0.08 meq/g) fue similar, para la obtención del péptido quimérico en el control de síntesis de 30 residuos acoplados e igual correlación se observó entre los iones moleculares, sin embargo, cualitativamente la señal de la deleción de glicina es menor en intensidad para la sustitución de 0.15 meq/g; las sustituciones de la resina evaluadas en la síntesis de la misma molécula peptídica acoplada hasta el residuo 30 y se volvió a observar la ineficiencia antes detectada (deleción de una glicina ubicada entre las posiciones 23 y 24).

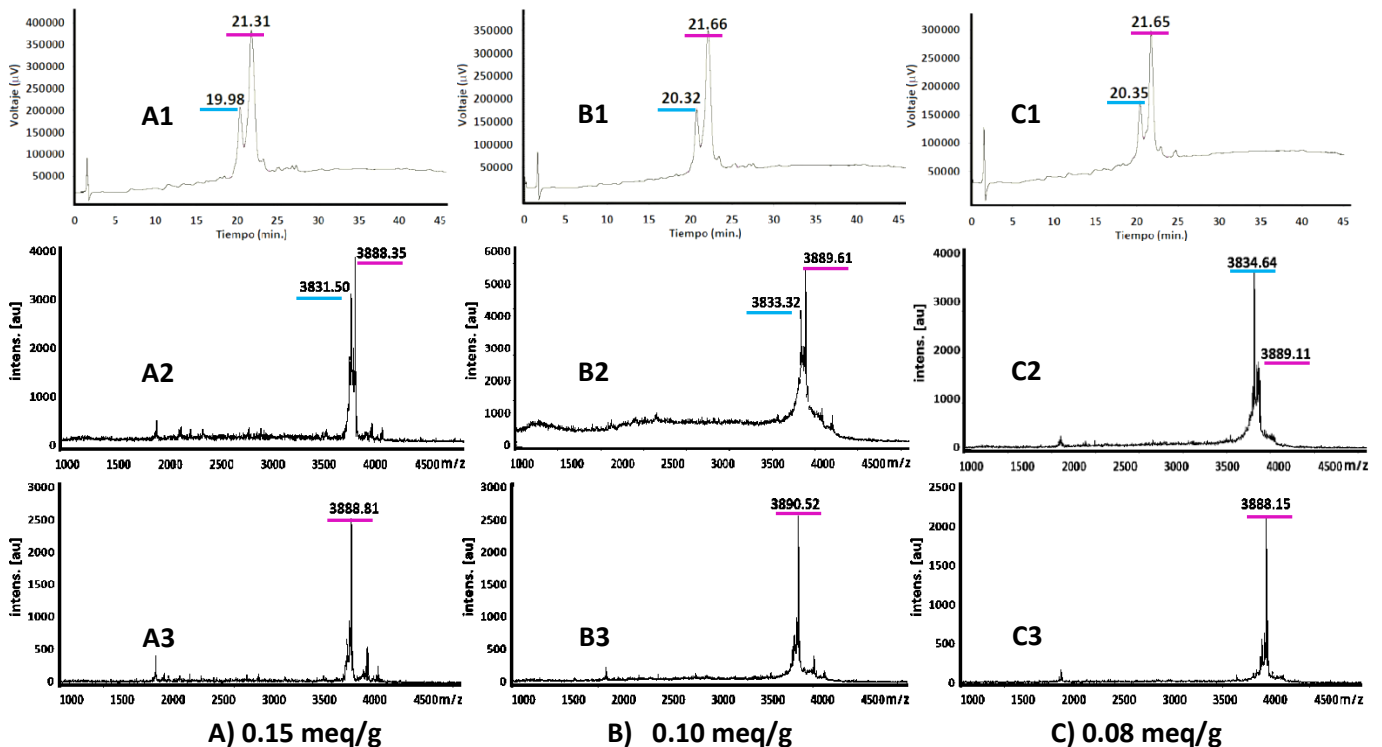


**Figura 12.** Caracterización del control de síntesis del residuo 30 (PM Teórico 3481.66 Da) del péptido químérico sintetizado en resinas de diferente sustitución; **A) 0.15 meq/g** (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido crudo, A3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia), **B) 0.10 meq/g** (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido crudo, B3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia) y **C) 0.08 meq/g** (C1: Cromatograma del péptido crudo, C2: EM del péptido crudo, C3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia).

En el control del péptido de 33 residuos (figura 13) sintetizado en la resina de sustitución 0.15 meq/g se obtuvo un cromatograma con una señal  $t_R=19.98$  minutos e ion molecular de 3831.50 m/z que corresponde a la deleción de glicina (-56.85 m/z) y otra con  $t_R=21.31$  minutos e ion molecular 3888.35 m/z del péptido químérico. En la sustitución de 0.10 meq/g se obtuvo dos señales en el cromatograma, la primera con un  $t_R=20.32$  minutos e ion molecular de 3833.32 m/z (-56.29 m/z) y la segunda señal con  $t_R=21.66$  minutos e ion molecular de 3889.61m/z que corresponde al péptido químérico. En la sustitución de 0.08 meq/g se obtuvo un cromatograma con dos señales, la primera con un  $t_R=20.35$  minutos e ion molecular de 3834.64 m/z (-54.47 m/z) y la segunda señal con  $t_R=21.65$  minutos e ion molecular de 3889.11 m/z que corresponde al péptido de 33 residuos.



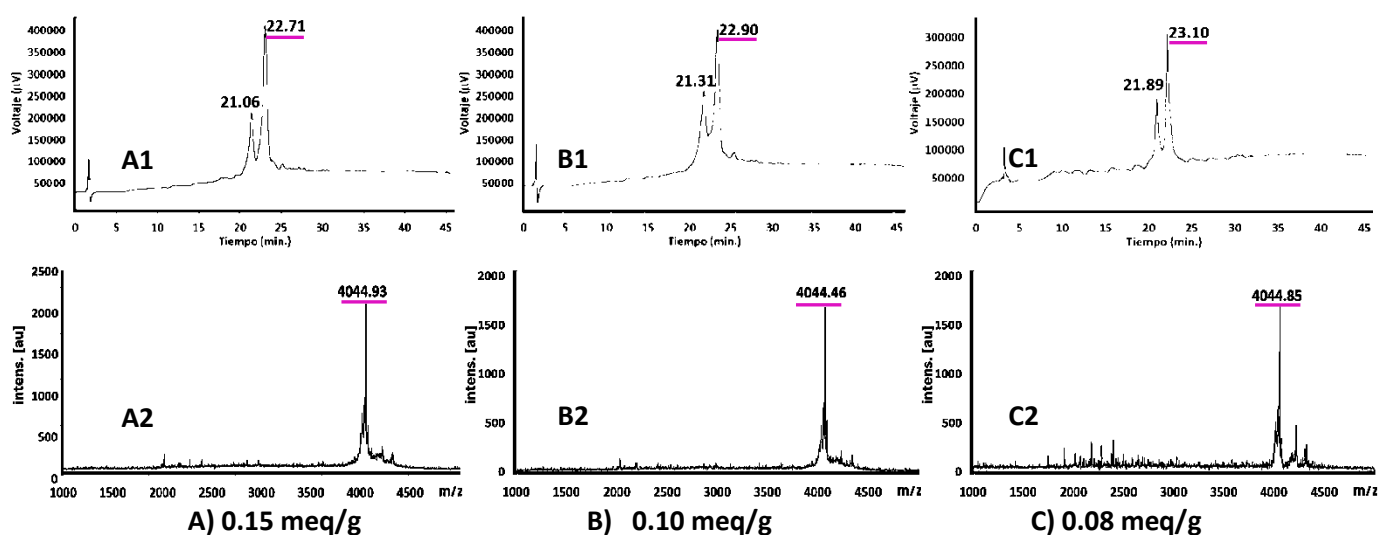
El control sintético para el péptido de 33 residuos de longitud ( $^{33}\text{YRSLKKQLEGGMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG}^1$ ) mostró en todas las sustituciones de resinas evaluadas una especie delecionada que corresponde a una glicina y la molécula objetivo de 33 residuos. Cualitativamente se observó en los cromatogramas que para la síntesis del péptido en la resina de 0.15 meq/g hay una mayor relación entre la intensidad de la señal del  $t_R$  que contiene la molécula de 33 residuos y el  $t_R$  de la deleción de glicina, que en las otras sustituciones (0.10 y 0.08 meq/g), lo cual indicaría que esta resina permite obtener una mayor cantidad de la especie de interés en este punto de control sintético; además, la resina de 0.20 meq/g (figura 3. B) tiene la menor relación entre la intensidad de la señal de  $t_R$  de la especie de interés y el  $t_R$  de la deleción frente a las resinas de menor sustitución (0.15, 0.10, 0.08 meq/g), lo que demuestra esto es que sustituciones menores a 0.20 meq/g tienen un efecto positivo en la síntesis del péptido quimérico acoplado hasta el residuo 33.



**Figura 13. Caracterización del control de síntesis del residuo 33 (PM Teórico 3887.86 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferente sustitución; A) 0.15 meq/g (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido crudo, A3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia), B) 0.10 meq/g (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido crudo, B3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia) y C) 0.08 meq/g (C1: Cromatograma del péptido crudo, C2: EM del péptido crudo, C3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia).**

El control de síntesis para la molécula de 35 residuos de longitud ( $^{35}\text{GVYRSLKKQLEGGMTD VNRYRSNNYEEQPHISGG}^1$ , figura 14) en las tres sustituciones de resina evaluadas dio un perfil cromatográfico similar entre ellas y los correspondientes iones moleculares obtenidos para cada señal la señal de  $t_R$  mayor (resaltado en fucsia) en cada caso.

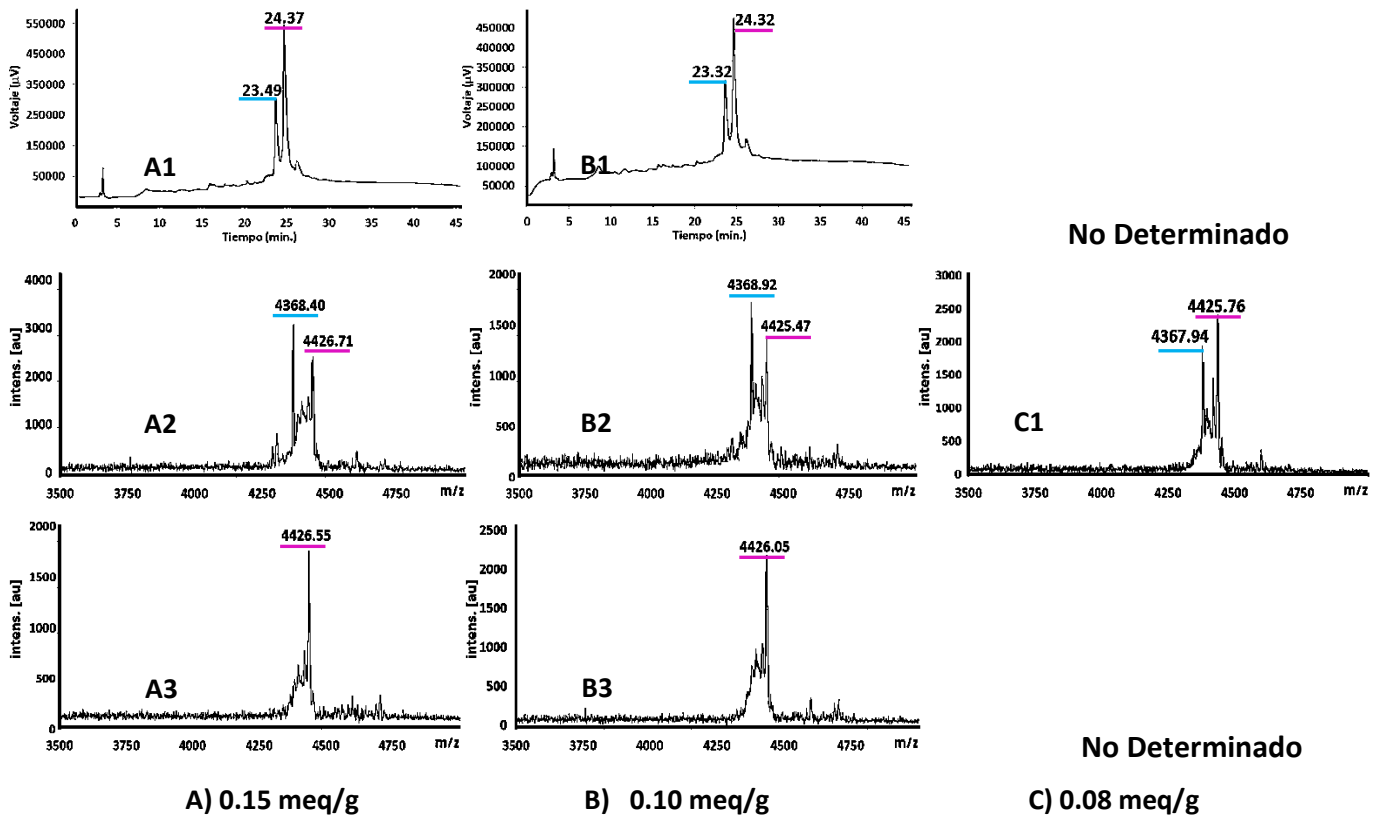
En este punto de reacción no hay una diferencia marcada entre estas sustituciones, sin embargo, cualitativamente se obtuvo mayor intensidad en la señal del péptido de 35 residuos en la resina de 0.15 meq/g en referencia a la deleción observada de glicina de menor tiempo de retención. Comparativamente no hay un cambio marcado con los cromatogramas obtenidos en el control anterior.



**Figura 14 . Caracterización del control de síntesis del residuo 35 (PM Teórico 4043.95 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferente sustitución; A) 0.15 meq/g (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia), B) 0.10 meq/g (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia).**

En el control del residuo 39 ( $^{39}\text{VPLAGVYRSLKKQLEGGMTD VNR YRSNNYEEQPHISGG}^1$ ) en el cromatograma de la resina de sustitución de 0.15 meq/g (figura 15 A.) se observó señales a  $t_R=23.49$  minutos y 24.37 minutos, la primera con un ion de 4368.40 m/z (-58.31 m/z) y la segunda a un ion molecular de 4426.71 m/z que corresponde respectivamente a la deleción de glicina y el segundo al del péptido quimérico sintetizado hasta ese punto el residuo 39. Para la resina de sustitución de 0.10 meq/g se obtuvo dos señales para su control cromatográfico con  $t_R=23.32$  minutos y  $t_R=24.32$  minutos, con los iones moleculares de 4368.92 m/z (-56.55 m/z) y 4425.47 m/z que corresponden a la deleción de glicina y al péptido quimérico (respectivamente). Para la síntesis con una sustitución 0.08 meq/g por espectrometría de masas un ion dos iones de 4367.94 m/z (-57.82 m/z) y 4425.76 m/z que corresponden a la deleción y al péptido quimérico, respectivamente.

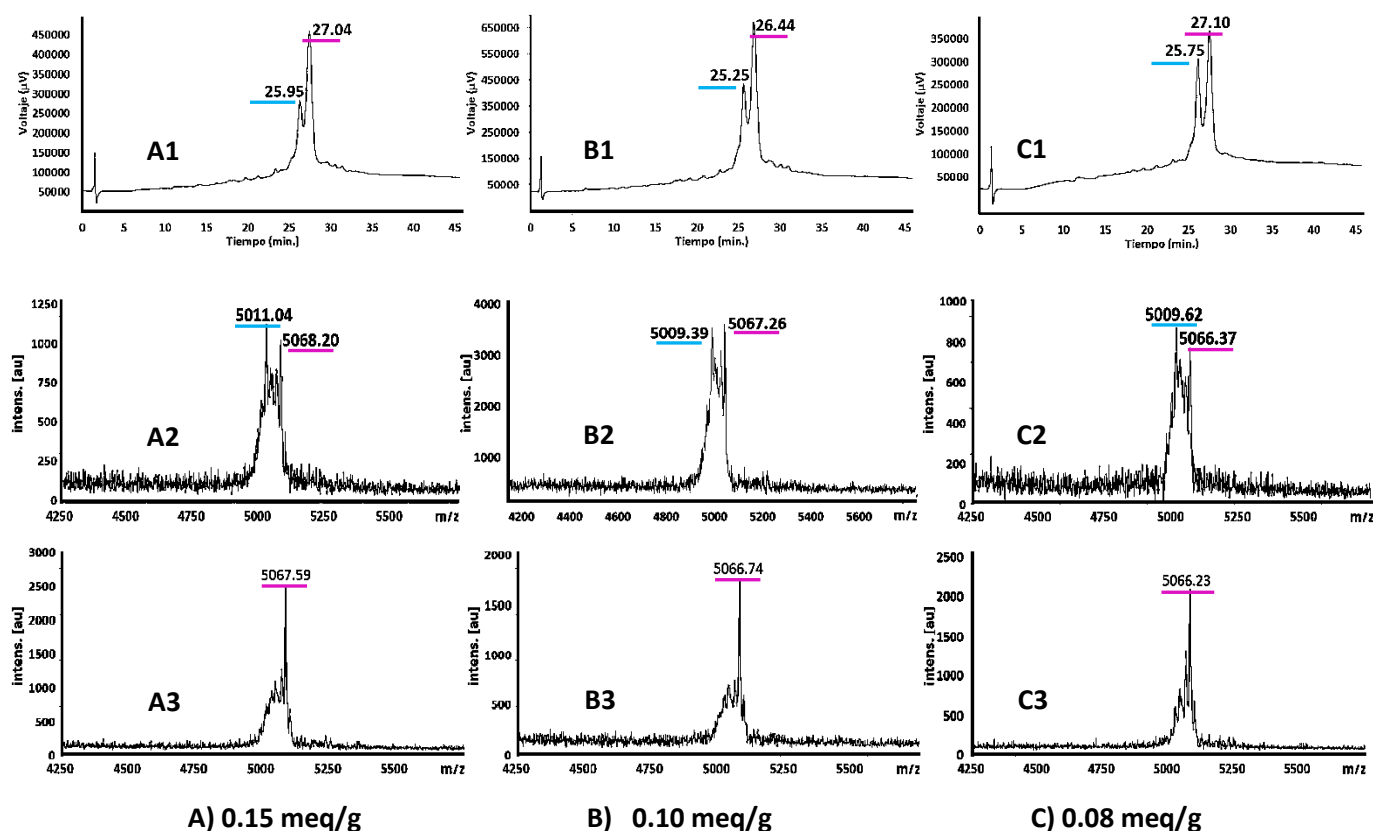
En este control de síntesis se vio una mejoría en la eficiencia puesto que no se observó la deleción de alanina que si fue anteriormente observada cuando se empleó una resina de mayor sustitución (0.20 meq/g).



**Figura 15 . Caracterización del control de síntesis del residuo 39 (PM Teórico 4424.19 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferente sustitución; A) 0.15 meq/g (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido crudo, A3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia), B) 0.10 meq/g (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido crudo, B3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia) y C) 0.08 meq/g (C1: EM del péptido crudo).**

En el control del acople 44 ( $^{44}\text{EVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTDVRNRYRYSNNYEEQPHISGG}^1$ ; figura 16) para las síntesis del péptido quimérico con la resina de sustitución de 0.15 meq/g se observó un cromatograma con dos señales a un  $t_R=25.95$  minutos de ion de 5011.04 m/z el cual corresponde a la deleción de glicina y otra con  $t_R=27.04$  minutos del peso molecular de 5068.20 m/z que corresponde al péptido quimérico de 44 residuos. La sustitución de 0.10 meq/g mostró también dos señales en su cromatograma con  $t_R=25.25$  minutos de ion molecular de 5009.39 m/z y 5067.26 minutos; y otra señal con  $t_R=26.44$  minutos e ion molecular de 5066.74 m/z; para la resina de sustitución de 0.08 meq/g se obtuvo igualmente dos señales en su cromatograma de  $t_R=25.75$  minutos con un ion molecular de 5009.62 m/z y otra de  $t_R=27.10$  minutos con un ion molecular de 5066.37 m/z.

La síntesis del péptido en tres sustituciones evaluadas mostró el mismo perfil en los cromatogramas y es de resaltar que se tiene una mejoría debido a que en este punto no se tiene la deleción de alanina; además, la intensidad de la señal relativa del péptido de 44 ( $t_R= 27.04, 26.44$  y  $27.10$  minutos para las sustituciones de 0.15, 0.10 y 0.08 meq/g, respectivamente) es mayor al de las especies de menor peso que la obtenida en el cromatograma de la síntesis en la resina de 0.20 meq/g.



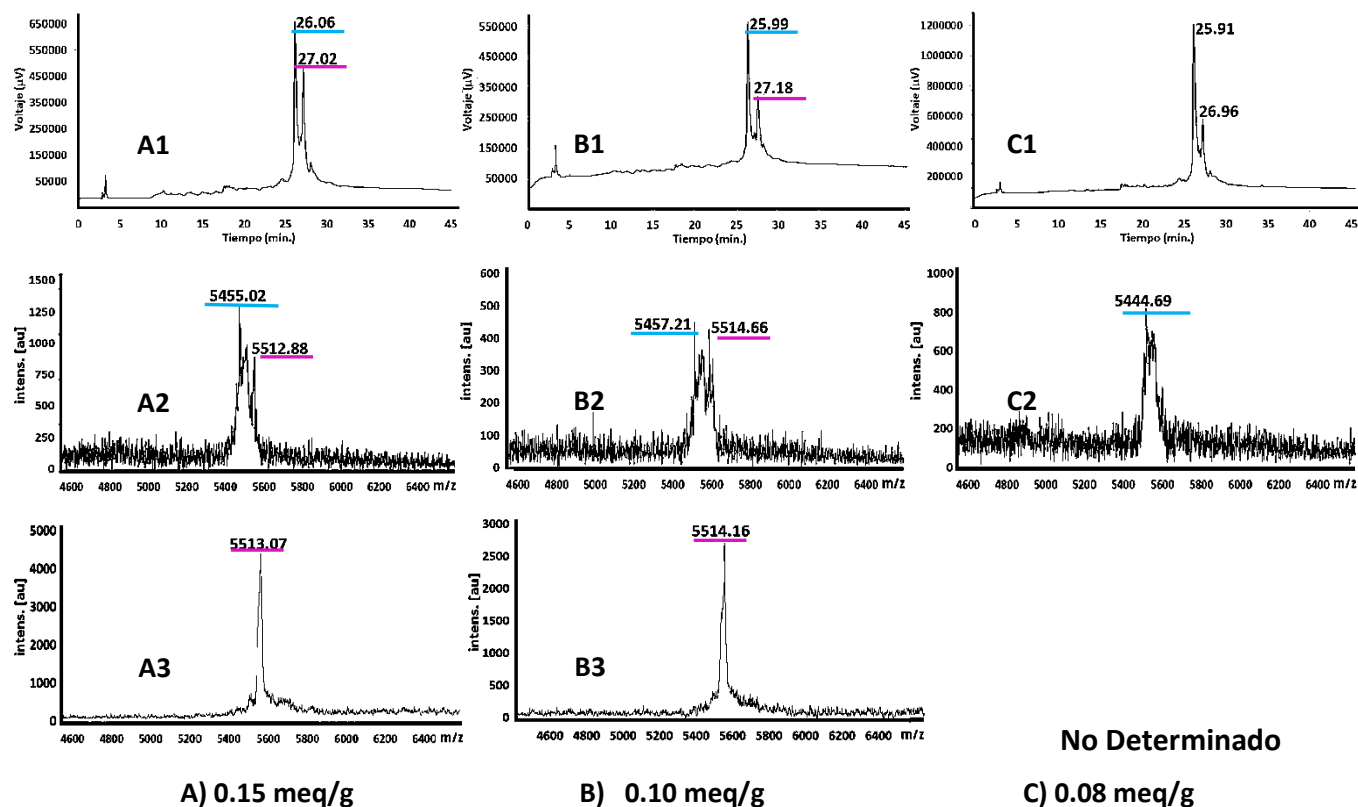
**Figura 16 . Caracterización del control de síntesis del residuo 44 (PM Teórico 5065.51 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferente sustitución; A) 0.15 meq/g (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido crudo, A3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia), B) 0.10 meq/g (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido crudo, B3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia) y C) 0.08 meq/g (C1: Cromatograma del péptido crudo, C2: EM del péptido crudo, C3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia).**

En el control de síntesis del péptido de 50 residuos (figura 17) se obtuvo para sustitución de resina de 0.15 meq/g un cromatograma con dos señales de  $t_R=26.06$  minutos e ion de 5455.02 m/z que corresponde al péptido con una deleción de glicina, la segunda señal de  $t_R=27.02$  minutos con un ion molecular de 5512.88 m/z que corresponde al péptido quimérico sintetizado hasta el residuo 50; para la resina de sustitución de 0.10 meq/g se obtuvo un cromatograma con dos señales de  $t_R=25.99$  minutos y 27.18 minutos que corresponden a 5457.21 m/z y 5514.66 m/z que son los iones moleculares de la deleción de glicina y el del ion molecular del péptido quimérico, respectivamente. Para la sustitución de 0.08 meq/g se obtuvo igualmente un cromatograma con dos señales de  $t_R=25.91$  minutos y 26.96 y un espectro de masas con un ion molecular 5444.69 m/z que corresponde a una especie de menor peso molecular que la de 50 residuos.

Experimentalmente la lectura de las muestras por espectrometría de masas se hizo más difícil a medida que aumentaba de tamaño el péptido; se observó claramente la deleción de glicina.

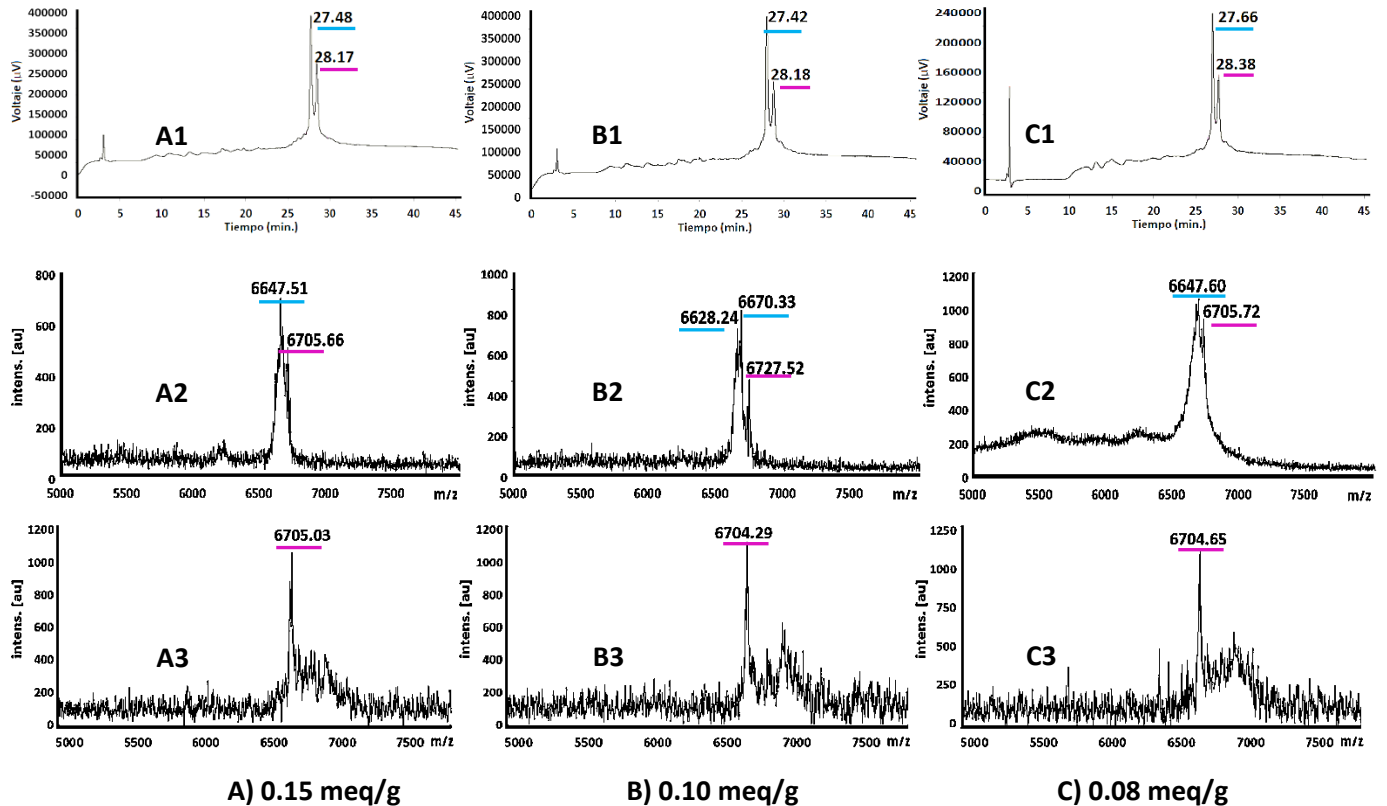
Hasta el control de la molécula peptídica de 50 residuos ( $^{50}\text{GGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTD VNRYRYSNNYEEQPHISGG}^1$ ) se observa a en cada una de las síntesis con resinas de diferente sustitución, que hay dos señales, una que corresponde a una deleción de la glicina y otra a la especie de interés de 50 residuos. En los cromatogramas se observa que cualitativamente que la señal de la deleción es más intensa que la que contiene el péptido objetivo, y en este punto de síntesis se cambia la tendencia de la relación entre las señales de los tiempos de retención de las deleciones y los de las moléculas objetivo como se observaba en los controles anteriores de menor números de residuos acoplados.

También, se evidencia que la utilización de resinas de sustitución menor a 0.20 meq/g mejora un poco la síntesis, sin embargo, algunas ineficiencias sintéticas persisten.



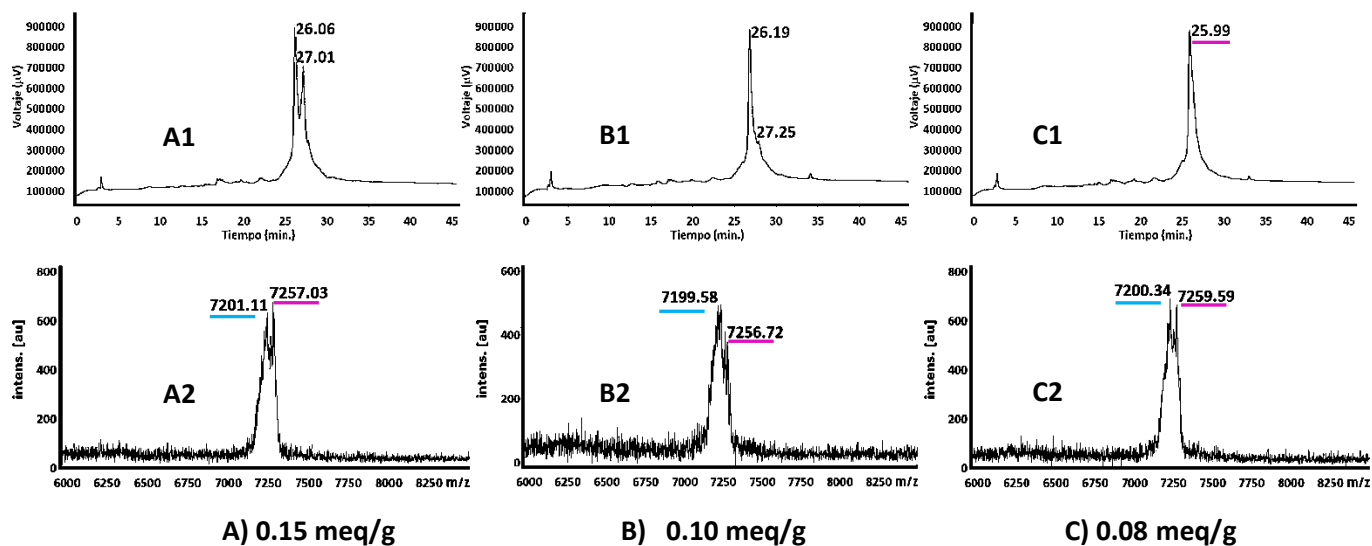
**Figura 17. Caracterización del control de síntesis del residuo 50 (PM Teórico 5513.68 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferente sustitución; A) 0.15 meq/g (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido crudo, A3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia), B) 0.10 meq/g (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido crudo, B3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia) y C) 0.08 meq/g (C1: Cromatograma del péptido crudo, C2: EM del péptido crudo).**

En el control del residuo 60 ( $^{60}\text{FHADYQAPFLGGYGGVLYHVPLAGVYRSLKKQLGGMTD VNRYRYSNNYEEQPHISGG}^1$ ; figura 18) se observa para la sustitución 0.15 meq/g una señal con  $t_R = 27.48$  minutos con ion molecular de 6647.51 m/z de la deleción de glicina y  $t_R = 28.17$  minutos de 6705.66 m/z del ion molecular; para 0.10 meq/g con un cromatograma de  $t_R = 27.42$  minutos con ion molecular de 6628.24 m/z (-99.28 m/z) y 6670.33 m/z (-57.19 m/z+) y  $t_R = 28.18$  minutos con un ion molecular de 6727.52 m/z que corresponde al peso molecular del péptido quimérico (+22.99 Da). Para la resina con sustitución 0.80 meq/g se obtuvo un cromatograma con dos señales de  $t_R = 27.66$  y 28.38 minutos, e iones moleculares 6647.60 m/z y 6705.72 m/z que corresponden a la deleción de glicina y a la molécula de 60 residuos del péptido quimérico. Hasta este punto no se observa una diferencia significativa de las tres sustituciones en la síntesis del péptido quimérico, manteniéndose el mismo perfil sintético en sus cromatogramas y las mismas especies determinadas por espectrometría de masas.



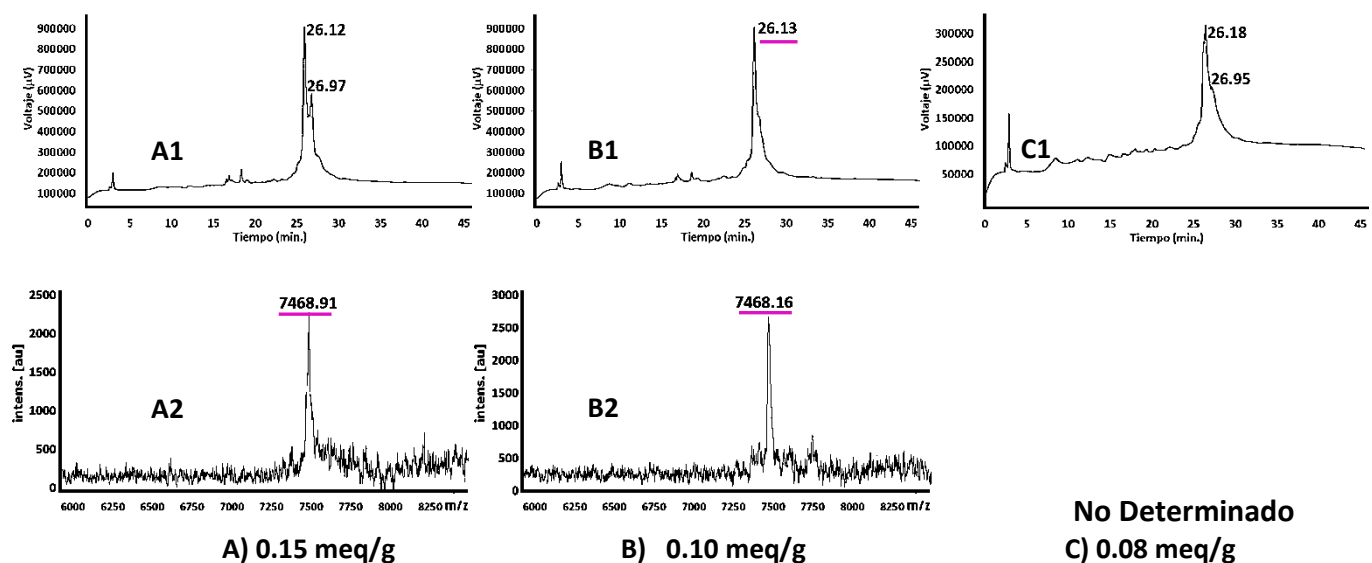
**A) 0.15 meq/g**                      **B) 0.10 meq/g**                      **C) 0.08 meq/g**  
**Figura 18. Caracterización del control de síntesis del residuo 60 (PM Teórico 6703.24 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferente sustitución; A) 0.15 meq/g (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido crudo, A3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia), B) 0.10 meq/g (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido crudo, B3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia) y C) 0.08 meq/g (C1: Cromatograma del péptido crudo, C2: EM del péptido crudo, C3: EM de la señal de  $t_R$  resaltada en fucsia).**

En el control del acople 64 ( $^{64}\text{KHMRFHADYQAPFLGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKQLEGGMTD VNRVYRSNNYEEQPHISGG}^1$ ; figura 19) se observa para la resina de sustitución 0.15 meq/g un cromatograma con dos señales de tiempos de retención de 26.06 y 27.01 minutos y un espectro de masas que contiene la especie delecionada en una Glicina y el ion molecular del péptido de 64 residuos de longitud. Para la resina de 0.10 meq/g se observó una señal intensa con un  $t_R=26.19$  minutos y un hombro a 27.25 minutos, esta también contenía la deleción de Glicina y la quimera sintetizada hasta el residuo 64. La sustitución de 0.08 meq/g se tiene una sola señal con  $t_R=25.99$  minutos y un espectro de masas con los iones anteriormente mencionados. Las especies delecionadas y la molécula de interés no se resuelven bien este sistema cromatográfico; y aparentemente en este punto se observa una disminución de la especie de interés al disminuir la sustitución de la resina.



**Figura 19. Caracterización del control de síntesis del residuo 64 (PM Teórico 7255.53 Da) del péptido químico sintetizado en resinas de diferente sustitución; A) 0.15 meq/g (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido crudo), B) 0.10 meq/g (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido crudo) y C) 0.08 meq/g (C1: Cromatograma del péptido crudo, C2: EM del péptido crudo).**

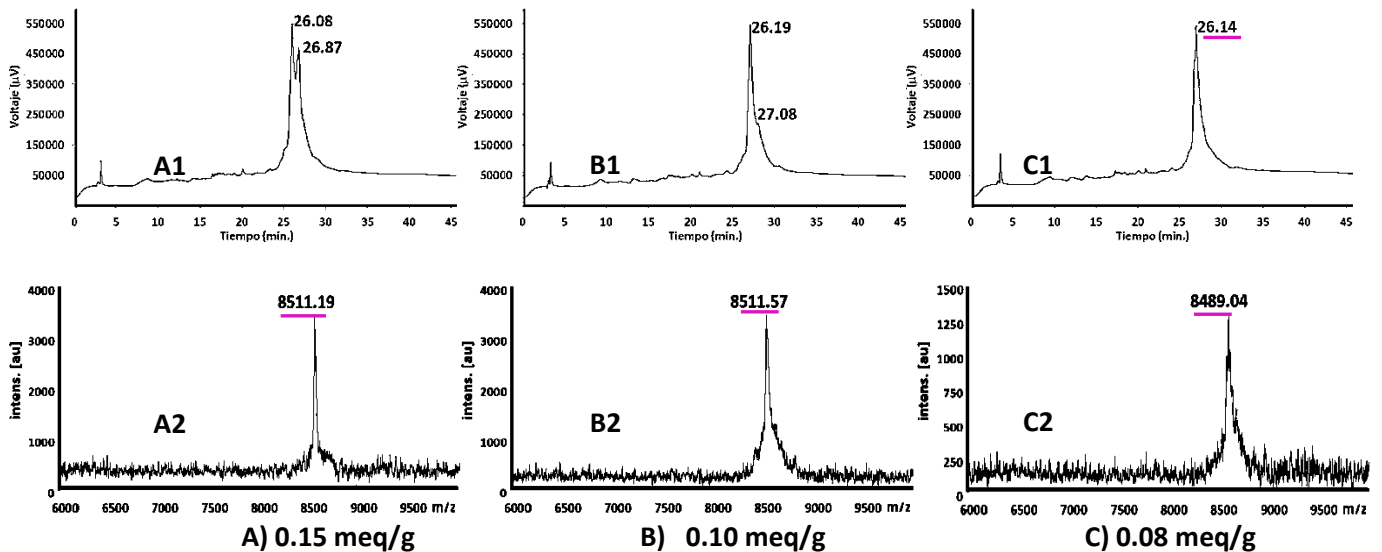
Para el control sintético del residuo 66 (<sup>66</sup>VIKHMRFHADYQAPFLGGYGGEVLYHVP LAGVYRSLKKQLGGMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG<sup>1</sup>; figura 20) se obtuvo un cromatograma con dos señales de t<sub>R</sub>=26.12 y 26.97 minutos y el espectro de masa del péptido crudo tiene una señal de 7468.91 que corresponde al pico de ion molecular del péptido químico. Para la sustitución de 0.10 meq/g se obtuvo una señal ancha con un t<sub>R</sub>=26.13 minutos e ion molecular de 7468.16 m/z. Para la sustitución de 0.08 meq/g en el cromatograma se observó una señal ancha de t<sub>R</sub>= 26.18 minutos y un hombro a 26.95 minutos (figura 20. C1).



**Figura 20. Caracterización del control de síntesis del residuo 66 (PM Teórico 7467.68 Da) del péptido químico sintetizado en resinas de diferente sustitución; A) 0.15 meq/g (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido crudo), B) 0.10 meq/g (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido crudo) y C) 0.08 meq/g (C1: Cromatograma del péptido crudo).**



Para el control sintético del residuo 77 (figura 21) para la sustitución de 0.15 meq/g se obtuvo un cromatograma con dos señales de  $t_R=26.08$  y 26.87 minutos, el espectro de masas de esta muestra tiene un ion molecular de 8511.19 m/z que corresponde al péptido quimérico con el ion sodio. Para la sustitución de 0.10 meq/g se tiene un cromatograma con un  $t_R=26.19$  minutos y un hombro  $t_R=27.08$  minutos, se observó en el espectro de masas un ion de 8511.57 m/z el cual corresponde al péptido quimérico de 77 residuos más el contraión Sodio. Para la sustitución de 0.08 meq/g se tiene un cromatograma con una señal de  $t_R=26.14$  minutos y por espectrometría de masas se determinó que corresponde a un ion de 8489.04 m/z que es del péptido quimérico sintetizado hasta el residuo 77.



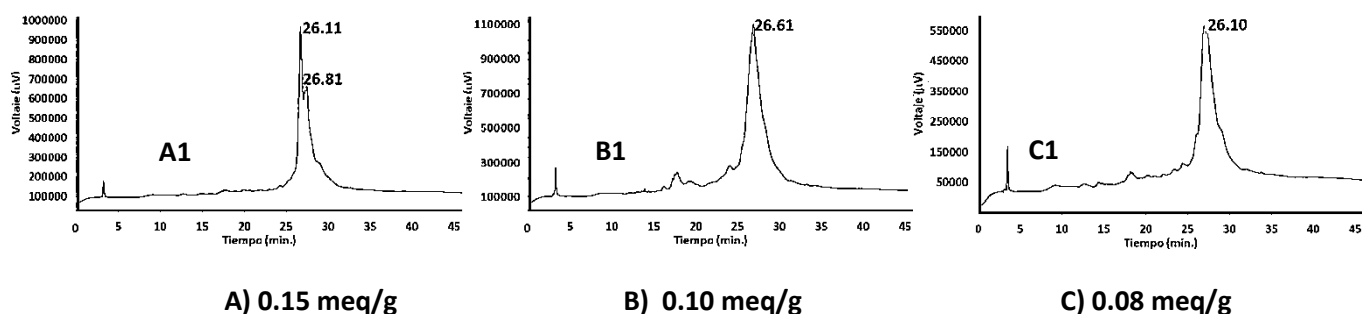
**Figura 21. Caracterización del control de síntesis del residuo 77 (PM Teórico 8488.15 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferentes sustitución; A) 0.15 meq/g (A1: Cromatograma del péptido crudo, A2: Espectro de masas (EM) del péptido crudo), B) 0.10 meq/g (B1: Cromatograma del péptido crudo, B2: EM del péptido crudo) y C) 0.08 meq/g (C1: Cromatograma del péptido crudo, C2: EM del péptido crudo).**

Para el control del residuo 82 (figura 22) del péptido quimérico se obtuvo para la sustitución de 0.15 meq/g un cromatograma con dos señales de  $t_R=26.11$  y 26.81 minutos. Para la sustitución de 0.10 meq/g se tiene una señal con  $t_R$  de 26.61 minutos. La resina de sustitución de 0.08 meq/g tiene una señal de  $t_R=26.10$  minutos. Se obtuvo el péptido quimérico de 82 residuos de longitud para las tres sustituciones evaluadas (0.15, 0.10 y 0.08 meq/g) con tiempos de retención cercanos al previamente obtenido con la resina de sustitución de 0.20 meq/g ( $t_R=26.79$  minutos, ver anexo 5).

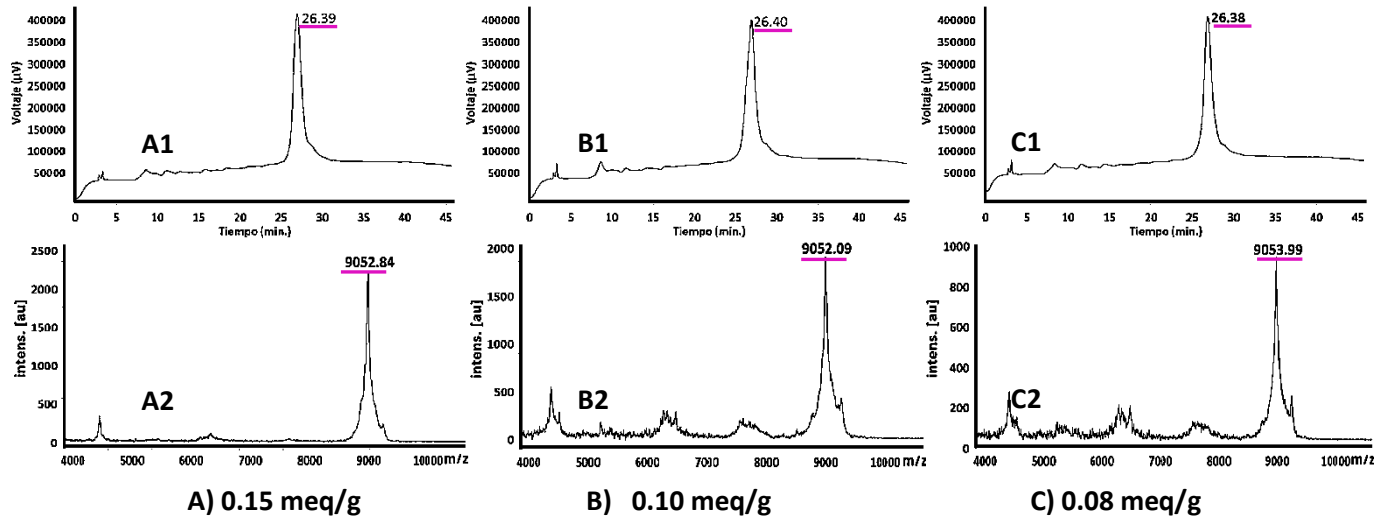
El rendimiento de síntesis fue de 15.07 %, 16.53 % y 16.61 % para las sustituciones de 0.15 meq/g, 0.10 meq/g y 0.08 meq/g, respectivamente (tabla 6). En general, no se observó una diferencia significativa en la síntesis del péptido quimérico entre las tres sustituciones evaluadas (0.15, 0.10 y 0.08 meq/g, con tiempos de reacción de 2282, 2087 y 2128 minutos, respetivamente), sin embargo, si se observó una leve mejoría en la síntesis al emplear estas sustituciones en referencia a la sustitución de 0.20 meq/g (rendimiento de 13.06 %).

Posteriormente, se tomó una porción del péptido obtenido con cada una de estas sustituciones (0.15, 0.10 y 0.08 meq/g) el cual fue purificado (figura 23) en un equipo semi-preparativo y se determinó el rendimiento de purificación (tabla 6), el cual fue mayor para la resina de 0.15 meq/g.

A partir de los todos los resultados obtenidos se establece que el péptido quimérico de 82 residuos ( $^{82}\text{KNSFSLGENPNANPGGVIKHMRFHADYQAPFLGGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGMTD VNRVRYRSNNYEEQPHISGG}^1$ ) fue sintetizado y que la síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) con resinas de sustitución menor a 0.20 meq/g permiten aumentar el rendimiento y el porcentaje de recuperación del procedimiento de purificación, debido a la disminución de algunas ineficiencias sintéticas como lo fue la deleción de alanina.



**Figura 22. Caracterización del control de síntesis del residuo 82 (PM Teórico 9051.42 Da) del péptido quimérico sintetizado en resinas de diferente sustitución; A) 0.15 meq/g (A1: Cromatograma del péptido crudo), B) 0.10 meq/g (B1: Cromatograma del péptido crudo) y C) 0.08 meq/g (C1: Cromatograma del péptido crudo).**



**Figura 23.** Caracterización del péptido quimérico de 82 residuos (PM Teórico 9051.42 Da) purificado y previamente sintetizado en resinas de diferente sustitución; **A) 0.15 meq/g** (A1: Cromatograma, A2: Espectro de masas), **B) 0.10 meq/g** (B1: Cromatograma, B2: EM) y **C) 0.08 meq/g** (C1: Cromatograma, C2: EM).

**Tabla 5. Análisis por MALDI-TOF y RP-HPLC de los intermediarios en la síntesis del péptido quimérico en tres sustituciones de resina (0.15, 0.10 y 0.08 meq/g) asistidas por radiación microondas.**

RESIDUO	PM (Da)	Sustitución (meq/g) ‡						observaciones
		0.15		0.10		0.08		
		PM exp. (m/z)	t <sub>R</sub> (min)	PM exp. (m/z)	t <sub>R</sub> (min)	PM exp. (m/z)	t <sub>R</sub> (min)	
11	1228.53	1230.21	13.64	1230.29	13.51	1231.04	13.47	En las tres sustituciones de resina no se observa una diferencia significativa y se tiene una sola especie por cromatografía y por espectrometría de masas.
22	2628.16	2629.85	18.06	2630.36	17.55	2629.83	18.57	En las tres sustituciones de resina no se observa una diferencia significativa y se tiene una sola especie por cromatografía y por espectrometría de masas.
26	2984.33	2929.86 (-56.18) 2986.04 2985.84 <sup>§</sup>	18.37 19.45 <sup>§</sup>	2927.48 (-57.74) 2985.22 2986.04 <sup>§</sup>	17.87 19.09 <sup>§</sup>	2928.90 (-57.16) 2986.06 2984.81 <sup>§</sup>	18.35 19.71 <sup>§</sup>	En las tres sustituciones de resina se observa una deleción de Glicina*, el peso molecular (pm) del péptido quimérico sintetizado hasta el acople 26.
30	3481.66	3426.15 (-56.54) 3482.69 3483.25 <sup>§</sup>	18.17 19.12 <sup>§</sup>	3425.01 (-57.38) 3482.39 3482.32 <sup>§</sup>	18.03 19.21 <sup>§</sup>	3425.42 (-57.70) 3483.12 3482.91 <sup>§</sup>	18.17 19.15 <sup>§</sup>	En las tres sustituciones de resina se observa una deleción de Glicina, el pm del péptido quimérico sintetizado hasta el acople 30.
33	3887.86	3831.50 (-56.85) 3888.35 3888.81 <sup>§</sup>	19.98 21.31 <sup>§</sup>	3833.32 (-56.29) 3889.61 3890.52 <sup>§</sup>	20.32 21.66 <sup>§</sup>	3834.64 (-54.47) 3889.11 3888.15 <sup>§</sup>	20.35 21.65 <sup>§</sup>	En las tres sustituciones de resina se observa una deleción de Glicina, el pm del péptido quimérico sintetizado hasta el acople 33.
35	4043.95	4044.93 <sup>§</sup>	21.06 22.71 <sup>§</sup>	4044.46 <sup>§</sup>	21.31 22.90 <sup>§</sup>	4044.85 <sup>§</sup>	21.89 23.10	En las tres sustituciones de resina se observa una deleción de Glicina, el pm del péptido quimérico sintetizado hasta el acople 35.
39	4424.19	4368.40 (-58.31) 4426.71 4426.55 <sup>§</sup>	23.49 24.37 <sup>§</sup>	4368.92 (-56.55) 4425.47 4426.05 <sup>§</sup>	23.32 24.32 <sup>§</sup>	4367.94 (-57.82) 4425.76	ND	En las tres sustituciones de resina se observa una deleción de Glicina, el pm del péptido quimérico sintetizado hasta el acople 39. Hay una leve mejoría en la eficiencia de la síntesis puesto que no se observa la deleción de Alanina previamente observada.
44	5065.51	5011.04 (-57.16) 5068.20 5067.59 <sup>§</sup>	25.95 27.04 <sup>§</sup>	5009.39 (-57.87) 5067.26 5066.74 <sup>§</sup>	25.25 26.44 <sup>§</sup>	5009.62 (-56.75) 5066.37 5066.23 <sup>§</sup>	25.75 27.10 <sup>§</sup>	En las tres sustituciones de resina se observa una deleción de Glicina, el pm del péptido quimérico sintetizado hasta el acople 44. En las tres sustituciones se observó el mismo perfil sintético.
50	5513.68	5455.02 (-57.86) 5512.88 5513.07 <sup>§</sup>	26.06 27.02 <sup>§</sup>	5457.21 (-57.45) 5514.66 5514.16 <sup>§</sup>	25.99 27.18 <sup>§</sup>	5444.69 (-68.99)	25.91 26.96	Se observa una deleción de Glicina y el pm del péptido quimérico sintetizado hasta el acople 50.
60	6703.24	6647.51 (-58.15) 6705.66 6705.03 <sup>§</sup>	27.48 28.17 <sup>§</sup>	6628.24 (-99.28) 6670.33 (-57.19) 6727.52 (+23.99) 6704.29 <sup>§</sup>	27.42 28.18 <sup>§</sup>	6647.60 (-58.12) 6705.72 6704.65 <sup>§</sup>	27.66 28.38 <sup>§</sup>	En las tres sustituciones de resina se observa una deleción de Glicina y el pm del péptido quimérico sintetizado hasta el acople 60.
64	7255.53	7201.11 (-55.92) 7257.03	26.06 27.01	7199.58 (-57.14) 7256.72	26,19 27.25 (hombro)	7200.34 (-59.25) 7259.59	25.99	En las tres sustituciones de resina se observa una deleción de Glicina y el pm del péptido quimérico sintetizado hasta el acople 66, y una diferencia marcada en el perfil cromatográfico.
66	7467.68	7468.91	26.12 26.97	7468.16	26.13	ND	26.18 26.95 (hombro)	Se observa una deleción de Glicina y el pm del péptido quimérico sintetizado hasta el acople 66, y una diferencia marcada en el perfil cromatográfico.

77	<b>8488.15</b>	<b>8511.19</b> (+23.04)	26.28 26.87	<b>8511.57</b> (+23.42)	26.19 27.08 (Hombro)	<b>8489.04</b>	26.14	En las tres sustituciones de resina se observa el pm del péptido quimérico sintetizado hasta el acople 77, observándose una disminución de la intensidad de la señal en los cromatogramas para las resinas de menor sustitución.
82	<b>9051.42</b>	ND	26.11 26.81	ND	26.61	ND	26.10	Se obtuvo el péptido quimérico sintetizado hasta el acople 82 con t <sub>R</sub> cercanos al obtenido previamente en la resina de sustitución de 0.20 meq/g. (t <sub>R</sub> =26.79 minutos). Posteriormente el péptido obtenido en cada una de las resinas (0.15, 0.10 y 0.08 meq/g) fue purificado y se determinó que contenían el péptido de 82 residuos.

‡ el valor experimental de m/z en negrita corresponde al valor de la molécula peptídica sintetizada para el número de ‡ el valor experimental de m/z en negrita corresponde al valor de la molécula peptídica sintetizada para el número de residuos correspondiente para cada control de síntesis, los valores en paréntesis son las diferencias que tiene ese ion en referencia a la especie en negrita experimental.

\*valor de los residuos delecionados atribuidos: Gly= 57.05 Da, Ala= 71.08 Da, Gly-Gly= 114.10 Da, Ala-Gly=128.12 Da (anexo 2); y valor de la una ter-butilación debido a la reacción colateral en el proceso de desanclaje: t-Bu= 56.10 Da; Sodio [Na]:22.99 Da.

**ND:** No Determinado.

§ En el tiempo retención significa que a este se le recogieron fracciones y por medio de espectrometría de masas se determinó que este contenía la especie de interés correspondiente al punto de control de síntesis.

**ND:** No Determinado.

**Tabla 6. Porcentaje de rendimiento en síntesis para el péptido quimérico para resinas con diferentes sustituciones.**

Sustitución (meq/g)	Resina (g)	Cantidad obtenida (mg)		% de Rendimiento	Cantidad purificada (mg)	Cantidad de péptido obtenido en la purificación (mg)	% de Rendimiento de purificación
		Teórica	Experimental				
0.15	0.511	694.4	104.62	15.07	10.45	1.62	15.50
0.10	0.515	466.6	77.14	16.53	10.16	1.15	11.32
0.08	0.500	362.4	60.21	16.61	10.05	1.23	12.24



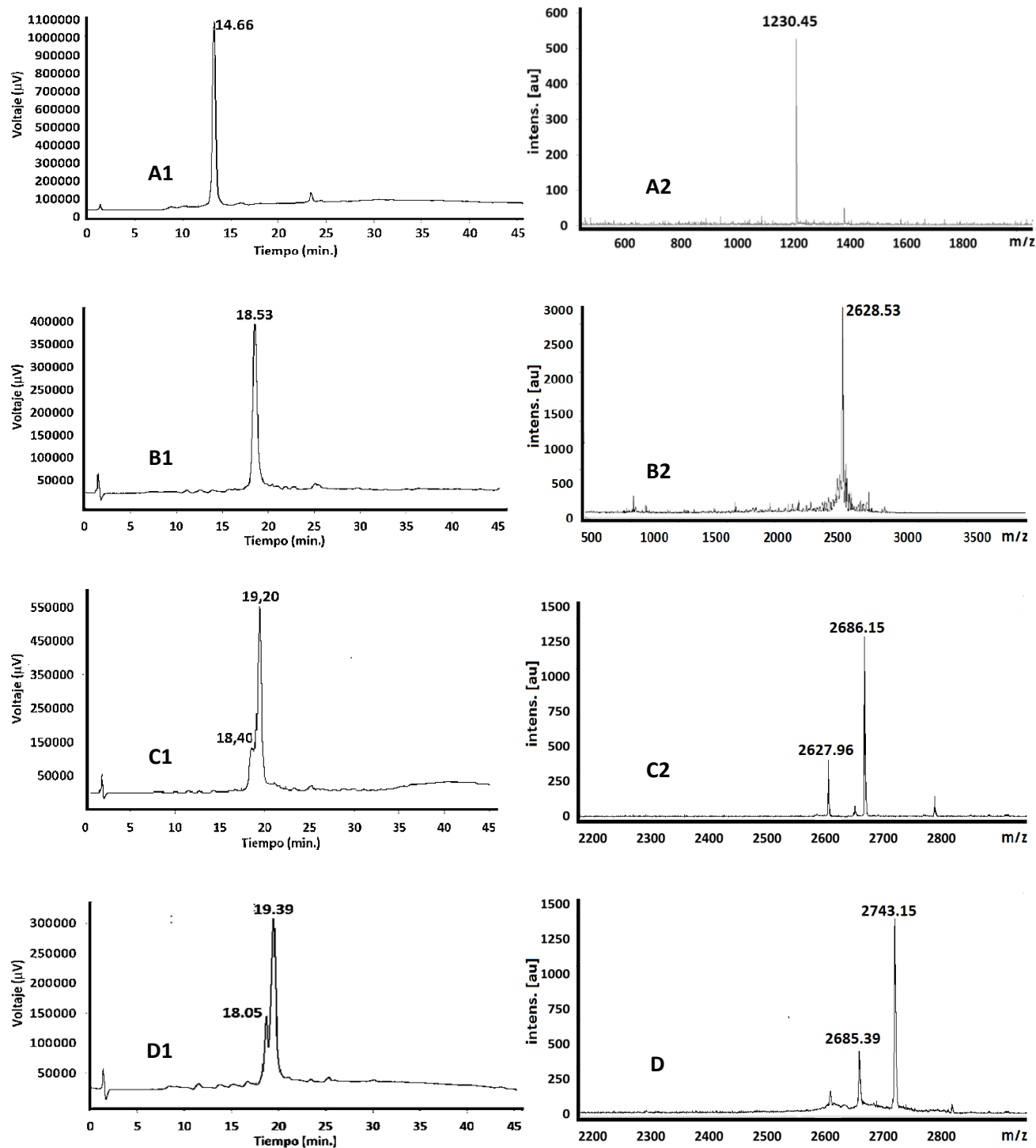
### 3.1.3 Efecto del agente caotrópico Cloruro de litio en la síntesis del péptido quimérico

A partir de los resultados de la radiación microondas se determinó que esta tenía un efecto positivo en la disminución de los tiempos de reacción y en el aumento del rendimiento en la síntesis del péptido quimérico, también, se determinó que el empleo de una resina de sustitución de 0.15 meq/g presenta cualitativamente una mayor eficiencia sintética y un mayor porcentaje de rendimiento en la purificación en referencia a otras sustituciones de resinas evaluadas (0.20, 0.10 y 0.08 meq/g); sin embargo, algunas ineficiencias sintéticas no fueron completamente superadas. Por tanto, en este punto la síntesis del péptido quimérico se centró en superar las ineficiencias de los residuos identificados anteriormente.

Para tal fin se asistió la síntesis con radiación microondas y se empleó una resina de 0.15 meq/g, los acoplos se realizaron como se describe en la metodología previamente expuesta; en las regiones de la secuencia que se identificaron previamente, primero se realizó un acople con radiación microondas y posteriormente se procedió a emplear la sal caotrópica de LiCl a una concentración de 0.5 M en NMP, activando el aminoácido en forma de anhídrido simétrico con DCC (5 equivalentes de anhídrido simétrico por cada equivalente de la resina, reacción a temperatura ambiente) y dejando en reacción durante 1 hora, posteriormente se procedió a realizar el test de Ninhidrina.

Se realizó el control después del acople del residuo 11 (figura 24. A) y posteriormente del y 22 (Figura 24. B), en ambos controles se obtuvo en el cromatograma una sola señal y el correspondiente ion molecular lo cual confirmó de nuevo que la síntesis del péptido quimérico elongado hasta el residuo 22 no presenta ineficiencias aparentes.

El cromatograma del control sintético del residuo 23 (figura 24. C) mostró una señal definida a  $t_R=19.20$  minutos y un hombro a 18.40 minutos, en el espectro de masas de este control se observó dos iones de 2627.96 m/z y 2686 m/z los cuales corresponden a la especie con deleción de glicina y al péptido de 23 residuos. Se acoplo el siguiente aminoácido y se volvió a realizar el control obteniéndose un cromatograma con dos señales claramente definidas y en el espectro de masas los iones moleculares correspondientes a la especie con una deleción de glicina y al péptido objetivo. En este punto se decidió parar la síntesis del péptido quimérico puesto que la sal de cloruro de litio no permitió superar esta primera ineficiencia sintética, que es una de las principales causantes de la disminución de la pureza de la secuencia quimérica estudiada.



**Figura 24. Caracterización del péptido quimérico en la evaluación de LiCl en los residuos 23 y 24 ( $^{24}\text{G}^{23}\text{GMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG}^1$ ). Cromatograma y espectro de masas crudos. A) Control del residuo 11, PM teórico 1228.53 Da (A1: Cromatograma, A2: Espectro de masas (EM)); B) control del residuo 22, PM teórico 2628.16 Da (B1: Cromatograma, B2: EM); C) control del residuo 23, PM teórico 2685.18 Da (C1: Cromatograma, C2: EM); y D) control del residuo 24, PM teórico 2742.20 Da (D1: Cromatograma, D2: EM).**



## 3.2. Actividad funcional

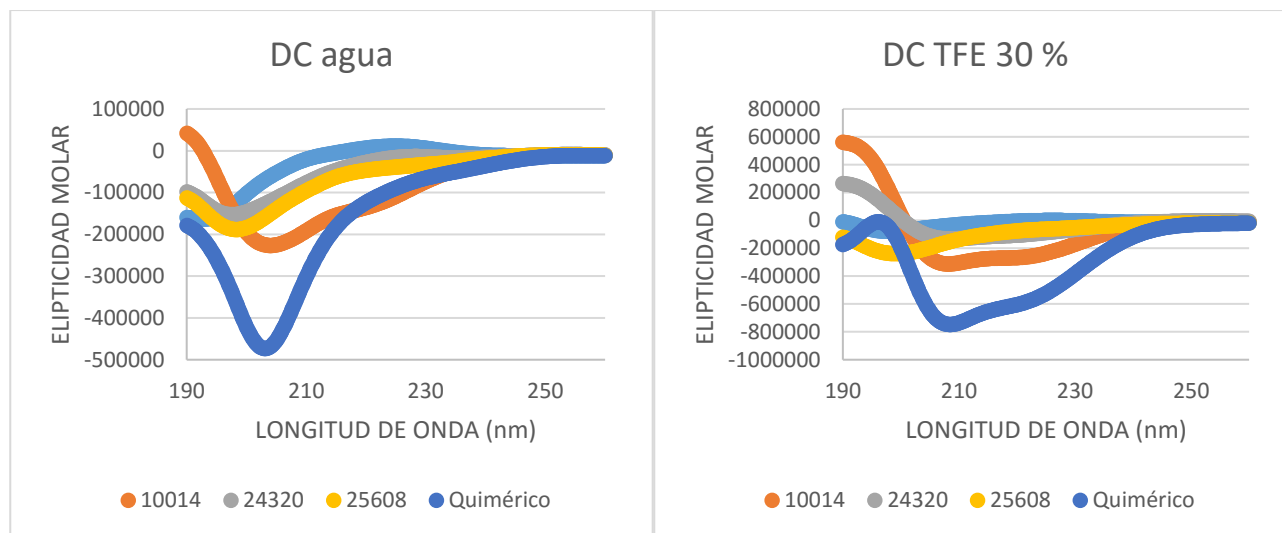
Como se enunció al inicio de este texto, el desarrollo de una vacuna contra la malaria en un campo de estudio vigente y una de las aproximaciones es el empleo de varios epítomos de proteínas de los dos estadios del parásito de ahí la importancia de la quimera sintetizada puesto que cumple con este criterio (multiestadio y multiepítomo). Además, presenta un alto peso molecular lo cual puede contribuir a la biodisponibilidad y funcionalidad; por esta razón, resulta de gran importancia la evaluación biológica de la quimera. Es importante enfatizar que esta quimera sería una de las tantas empleadas, pues para un parásito tan complejo como lo es el *Plasmodium falciparum* se requiere un conjunto de péptidos derivados de proteínas que cubran aquellas que son relevantes en los diferentes puntos de invasión a la célula objetivo.

La evaluación de la actividad funcional del péptido quimérico se desarrolló adicionalmente al estudio sintético; y se determinó elementos de estructura secundaria, antigenicidad, reconocimiento de los anticuerpos producidos por el péptido a las proteínas del parásito y la protección.

### 3.2.1 Análisis de los elementos de estructura secundaria por dicroísmo circular

Se realizó el dicroísmo circular de los péptidos modificados 9948 (CGMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGC), 10014 (CGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGC), 24320 (CGVIKHMRFHADYQAPFLGGGYGC), 25608 (CGKNSFSLGENPNANPGC) y del péptido quimérico la quimera derivada de estos, con el fin de dilucidar los elementos de estructura de estas moléculas y hacer una comparativa estructural con dicho análisis se efectuó en agua y en TFE al 30 %.

En la figura 25 se observa los dicroísmos circulares y en la tabla 7 el consolidado de la desconvolución para cada molécula, en la Tabla 7 se registraron los resultados de las desconvoluciones realizadas en cada uno de los tres programas, aquí se observa que el porcentaje de elementos de estructura en cada uno de los cuatro péptidos y del quimérico. Para el péptido 9948 se tiene que en agua predomina la estructura *turn* y *random coil*, y en TFE al 30 % predomina la estructura alfa hélice. Los péptidos 10014, 24320 y 25608 conservaron la estructura helicoidal tanto en agua como en TFE al 30 %. El péptido quimérico (39543) no desconvolucionó, sin embargo, observa claramente (figura 25) que tiene una tendencia *random coil* en agua y helicoidal en presencia de TFE al 30 %



A)

B)

Figura 25. Dicroísmo Circular de péptidos. A) Espectros de dicroísmo circular en agua, B) Espectros de dicroísmo circular en TFE 30%.

Tabla 7. Desconvolución del dicroísmo circular de los péptidos componentes de las proteínas. En rojo se resaltan los porcentajes de elementos de estructura de mayor porcentaje determinados por cada uno de los tres programas. Analizados en agua o TFE al 30%.

Programa	Péptido	Estructura					
		H (r)	H (d)	S(r)	S (d)	Turn	Unrd
CONTINLL	9948 AGUA	0.000	0.056	0.108	0.161	<b>0.345</b>	<b>0.330</b>
	9948 TFE 30 %	0.000	<b>0.570</b>	0.000	<b>0.308</b>	0.048	0.073
	10014 AGUA	<b>0.915</b>	0.085	0.000	0.000	0.000	0.000
	10014 TFE 30 %	<b>0.549</b>	<b>0.451</b>	0.000	0.000	0.000	0.000
	24320 AGUA	<b>0.922</b>	<b>0.078</b>	0.000	0.000	0.000	0.000
	24320 TFE 30 %	<b>0.134</b>	<b>0.507</b>	0.000	0.317	0.043	0.000
	25608 AGUA	<b>0.097</b>	<b>0.791</b>	0.000	0.094	0.018	0.000
	25608 TFE 30 %	<b>0.212</b>	<b>0.549</b>	0.000	0.135	0.000	0.102
	Quimérico AGUA	No desconvolucionó					
Quimérico TFE 30 %	No desconvolucionó						
CDSSTR	9948 AGUA	0.197	0.193	0.130	0.149	0.157	0.171
	9948 TFE 30 %	No desconvolucionó					
	10014 AGUA	<b>0.408</b>	<b>0.252</b>	0.031	0.105	0.096	0.120
	10014 TFE 30 %	<b>0.271</b>	<b>0.228</b>	0.052	0.140	0.139	0.167
	24320 AGUA	<b>0.486</b>	<b>0.245</b>	0.032	0.089	0.051	0.098
	24320 TFE 30 %	<b>0.269</b>	<b>0.272</b>	0.079	0.118	0.102	0.175
	25608 AGUA	<b>0.237</b>	<b>0.218</b>	0.057	0.144	0.161	0.186
	25608 TFE 30 %	<b>0.259</b>	<b>0.246</b>	0.032	0.133	0.149	0.185
	Quimérico AGUA	No desconvolucionó					
Quimérico TFE 30 %	No desconvolucionó						
SELCON3	9948 AGUA	0.091	0.111	0.022	0.104	<b>0.278</b>	<b>0.443</b>
	9948 TFE 30 %	-0.023	0.152	0.013	0.089	<b>0.219</b>	<b>0.606</b>
	10014 AGUA	<b>0.605</b>	<b>0.233</b>	0.001	0.000	0.054	0.156
	10014 TFE 30 %	0.205	0.153	0.063	0.079	<b>0.271</b>	<b>0.365</b>
	24320 AGUA	<b>0.668</b>	<b>0.248</b>	0.006	-0.002	0.054	0.184
	24320 TFE 30 %	No desconvolucionó					
	25608 AGUA	No desconvolucionó					
	25608 TFE 30 %	No desconvolucionó					
	Quimérico AGUA	No desconvolucionó					
Quimérico TFE 30 %	No desconvolucionó						

### 3.2.2 Evaluación de la antigenicidad e inhibición de la invasión del péptido quimérico

Se determinó la actividad funcional de la quimera (39543) y moléculas de que esta deriva (CSP-1 del 9948, STARP del 10014, MSP-1 del 24320 y Resa-155 del 25608; tabla 8), se realizó un ensayo *in vivo* y un reto experimental en ratones BALB/c con dos cepas de *Plasmodium*. La Antigenicidad y protección de cada molécula se realizó como lo esquematiza la figura 26, donde cada péptido o mezcla fue administrado a grupos de cuatro ratones BALB/c hembras entre 5 y 7 semanas de edad y al grupo control se le administró solución salina. La inoculación se realizó vía intraperitoneal, en la primera dosis se formuló adyuvante completo de Freund (día 1) y las posteriores se administraron con adyuvante incompleto de Freund (día 14, 28, 43 y 55); con sangrías de pre-inmune y posteriores a la tercera, cuarta y quinta inoculación.

**Tabla 8. Secuencias de las moléculas ensayadas en los ensayos de actividad funcional.**

GRUPO	RATÓN	NÚMERO PÉPTIDO	ORIGEN/ ANTIGENO	PARASITO- ESTADIO - CODIGO	SECUENCIA* N—————>C
1	1-4	9948	RESA-155 <sup>141-160</sup>	Merozoito	CGMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGC
2	5-8	10014	MSP1 <sup>1282-1301</sup>	Merozoito	CGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGC
3	9-12	24320	STARP <sup>24-43</sup>	Esporozoito	CGVIKHMRFHADYQAPFLGGGYGC
4	13-16	25608	CSP-1 <sup>68-87</sup>	Esporozoito	CGKNSFSLGENPNANPGC
5	17-20	39543: quimera (Secuencia total)	Todos consecutivo: RESA-155 <sup>141-160</sup> MSP1 <sup>1282-1301</sup> STARP <sup>24-43</sup> CSP-1 <sup>68-87</sup>	Esporozoito-Merozoito	<sup>82</sup> KNSFSLGENPNANPGG <sup>67</sup> <sup>66</sup> VIKHMRFHADYQAPFLGGGYGG <sup>45</sup> <sup>44</sup> EVLVHVPLAGVYRSLKKQLEGG <sup>23</sup> <sup>22</sup> MTDVNRYRYSNNYEEQPHISGG <sup>1</sup>
6	21-24	M1	Mezcla de todos los polímeros: RESA-155 <sup>141-160</sup> MSP1 <sup>1282-1301</sup> STARP <sup>24-43</sup> CSP-1 <sup>68-87</sup>	Mezcla 1 (M1)	CGKNSFSLGENPNANPGC+ CGVIKHMRFHADYQAPFLGGGYGC+ CGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGC+ CGMTDVNRYRYSNNYEEQPHISGC
7	25-28	M2	Mezcla de los todos polímeros y la quimera: RESA-155 <sup>141-160</sup> MSP1 <sup>1282-1301</sup> STARP <sup>24-43</sup> CSP-1 <sup>68-87</sup>	Mezcla 2 (M2)	Todos los Polímeros + quimera
8	51-54	SOLUCIÓN SALINA	PLACEBO		

\*Los péptidos que contienen la cisteína, sombreada en gris, fueron previamente polimerizados cada uno por medio del grupo tiol para dar la formación de enlaces disulfuro con el propósito de obtener moléculas de mayor peso molecular.

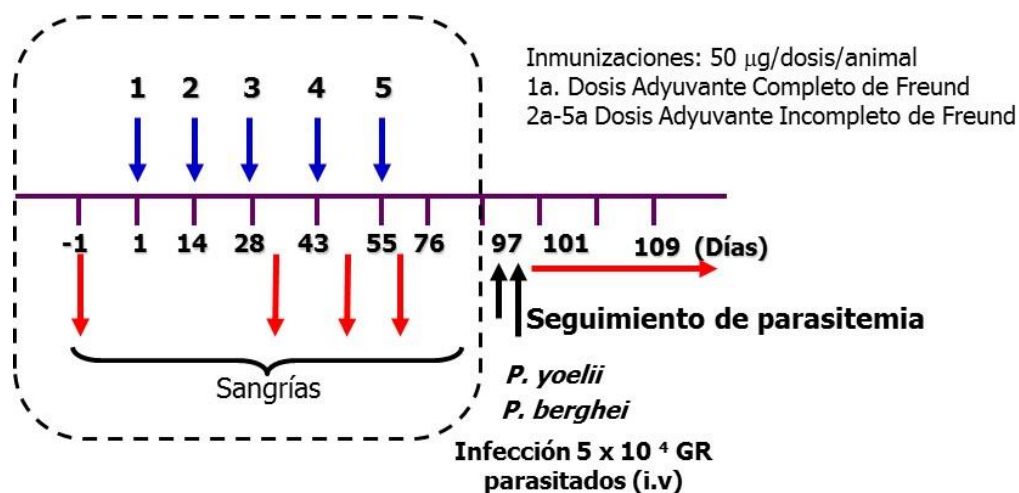


Figura 26. Diseño experimental de vacunación y evaluación de péptidos derivados de proteínas del *Plasmodium falciparum*. La inmunización se realizó para seis grupos de animales, de cuatro individuos cada uno, con los diferentes péptidos, controles y placebo.

### 3.2.2.2 Determinación de la Antigenicidad por medio del ensayo de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Los ensayos de antigenicidad por ELISA se prepararon con una solución stock (1mg/mL) de cada péptido y posteriormente se diluyó a una concentración de 10 µg/mL en 10 mL de Buffer fosfato salino (PBS) a pH7.2-7.4). En una caja de 96 pozos se adicionó 100 µL/pozo, dejándose incubar a 37 °C durante 1 hora y posteriormente se enfrió a 4°C toda la noche. Al día siguiente la caja con el péptido fue incubada a 37°C por 1 hora y se procedió a lavar cinco veces con solución de lavado (PBS pH 7.2-7.4 con Tween-20 al 0.5%) y se lavó con agua destilada. Las cajas fueron tratadas para bloquear las interacciones inespecíficas con una solución que contenía PBS (pH 7.2-7.4), Tween-20 al 0.5% y leche al 5% (solución de bloqueo), se dejó en incubación a 37°C durante 1 hora y se realizó los lavados con la solución de lavado y agua destilada.

Posteriormente, se adicionó 100 µL de los sueros diluidos (1:200) de los ratones en cada pozo y se dejó incubar a 37°C por 1 Hora, se lavó cinco veces con solución de lavado y una vez con agua destilada; se agregó en cada pozo 100 µL del conjugado IgG Anti-IgG(H+L) de ratón la cual esta acoplada a peroxidasa en una dilución (1:5000) en solución de bloqueo, se incubo a 37°C por 1 hora y luego se realizaron cinco lavados con la solución de lavado y una última con agua destilada. Las cajas fueron reveladas con la adición en cada pozo de una solución de revelado que contiene un substrato de peroxidasa (Tetrametilbencidina, TMB Microwell Peroxidase substrate) y después de la aparición de una coloración azul, se leyó a 620 nm en un lector de placas de Elisa y después de 15 minutos al determinar que la reacción se detuvo se adiciono 50 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en cada pozo, el color cambia a un amarillo el cual

tiene una intensidad conforme a la cantidad de complejo formado (antígeno-anticuerpo) y se precedió a leer dicha coloración a 450 nm. Se consideró un valor positivo de la prueba a las lecturas de absorbancia superior de 0.100 UA, que es tres veces la desviación estándar del valor obtenido con sueros pre-inmunes.

### **3.2.2.3 Reactividad de anticuerpos por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)**

#### **3.2.2.3.1 La determinación de la reactividad en el estadio merozoito**

La reactividad de los anticuerpos producidos en ratón BALB/c y los merozoito se realizó con un cultivo de Parásitos de la Cepa FCB2 de *Plasmodium falciparum* en estadio merozoito (esquizontes maduros) con una parasitemia entre el 5 – 7%. Los glóbulos rojos infectados se lavaron tres veces con buffer fosfato salino (PBS pH 7.2-7.4), centrifugando a 2500 rpm durante 5 minutos, posteriormente, se resuspendió en PBS obteniendo un hematocrito del 1%. Este se adiciono en láminas de 8 pozos en relación de 20µL/ pozo y se dejó secar las láminas a temperatura ambiente. En cada pozo se adicionó 30 µL de solución de bloqueo (PBS leche descremada al 1%) y se incubo por 10 minutos, se lavó cinco veces con PBS y posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente. Se adicionó 10 µL por pozo de los sueros de los ratones empleando una dilución de 1:40 en PBS. Se incubaron las láminas durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente, se procedió a lavar las láminas con PBS cinco veces durante 5 minutos cada lavado y se dejó secar a temperatura ambiente. En seguida se agregó 10 µL de una solución que contenía el conjugado de Anti-ratón IgG (H+L) isotiocianato de fluoresceína en una dilución de 1:20 en PBS junto al colorante de contraste (Azul de Evans (dilución de 1:100)), se incubo a temperatura ambiente por 30 minutos en humedad y oscuridad, se repitió los lavados con PBS y se dejó secar. Se adicionó una gota de glicerol al 50% en PBS entre la lámina y la laminilla y se observó la muestra en el microscopio de fluorescencia.

#### **3.2.2.3.2 La determinación de la reactividad en el estadio esporozoito**

Para determinar la unión de los anticuerpos producidos a esporozoito se utilizaron laminas que contenían la cepa NF54 de *Plasmodium falciparum*. Se bloquearon con 30 µL/pozo de Albumina Sérica Bovina al 1% durante 10 minutos, se lavó y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego se colocaron 10 µL/pozo de los sueros de los ratones a partir de la dilución 1:40 en PBS y se incubaron las láminas en cámara húmeda 30 minutos, se lavó con PBS en piscina cinco veces durante 5 minutos y se dejó secar. En seguida se adicionó el conjugado anti-Aotus Isotiocianato de fluoresceína a una dilución de 1:25 en PBS, se incubo en cámara húmeda y en oscuridad durante 30 minutos, se lavó de igual manera y se dejó secar. Se adicionaron 10 µL/pozo de Dapi en concentración de 1.5 mg/ml y se incubó por 10 minutos. Se lavó en una piscina durante cinco. Se dejó secar las láminas y se agregó una gota de glicerol al 50% en solución salina entre la lámina y la laminilla y se realizó las observaciones en el microscopio de fluorescencia en objetivo de inmersión (100X).

### 3.2.4 Resultados y discusión de la actividad funcional

#### 3.2.4.1 Antigenicidad, reconocimiento y protección de los péptidos poliméricos y la quimera.

Inicialmente, a cada uno de los péptidos poliméricos individuales se le evaluó la antigenicidad (tabla 8), como también a los péptidos de la mezcla M1 y mezcla M2, y al péptido quimérico 39543 (figura 27). Se observó que todos los péptidos estudiados fueron reconocidos por los anticuerpos de los ratones inoculados obteniéndose valores de absorbancia a 450 nm (DO) estadísticamente diferenciable del grupo placebo, lo que implica que los péptidos producen en los ratones anticuerpos que los reconocen efectivamente.

Se obtuvo un valor moderado en los títulos de los anticuerpos de los péptidos individuales 9948 (1:800), 10014 (1:200), 24320 (1:200) y 25608 (1:200), mientras que el título de anticuerpos fue mayor para la mezcla M1 (1:12800), lo que indica que la mezcla de los péptidos de los diferentes estadios tienen un efecto positivo que produce un mayores títulos; para la mezcla M2 (1:6400) se obtuvo un valor superior en los títulos de anticuerpo en referencia a los péptidos individuales y a la mezcla M1; En el péptido quimérico 39543 los títulos de anticuerpo (1:25600) fueron más altos elevados respecto a los péptidos individuales y las mezclas M1 y M2. De los resultados anteriormente obtenidos se atribuye los altos títulos de anticuerpos del péptido quimérico a la forma de presentación de la molécula.

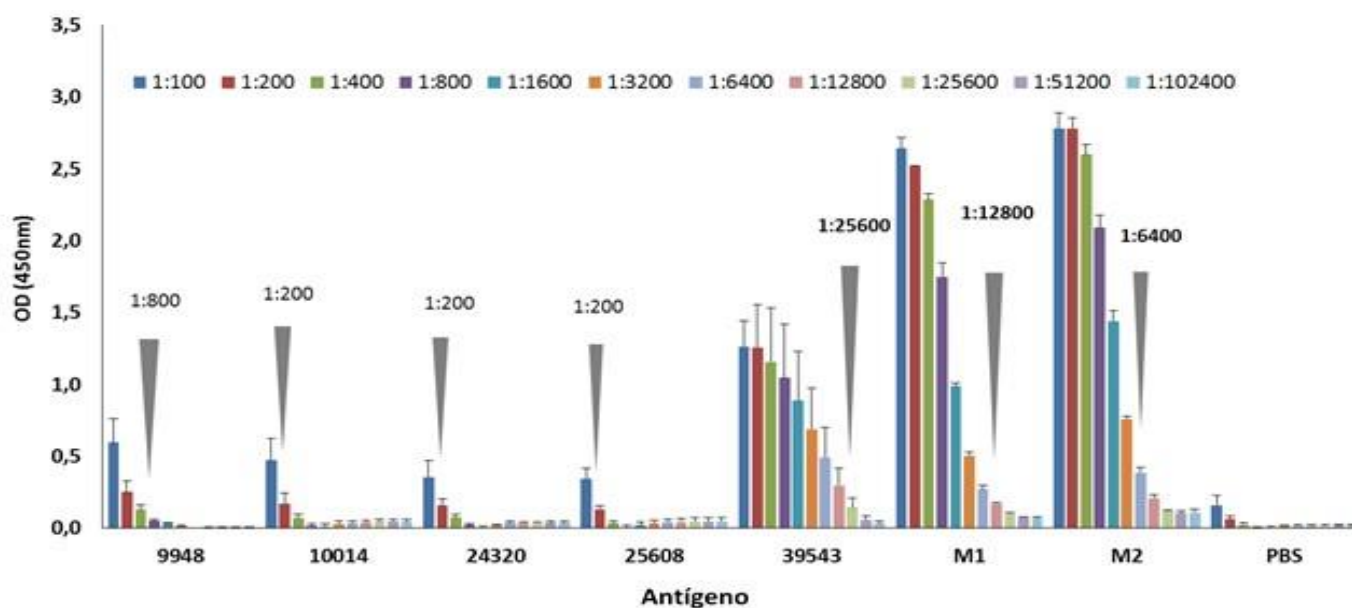
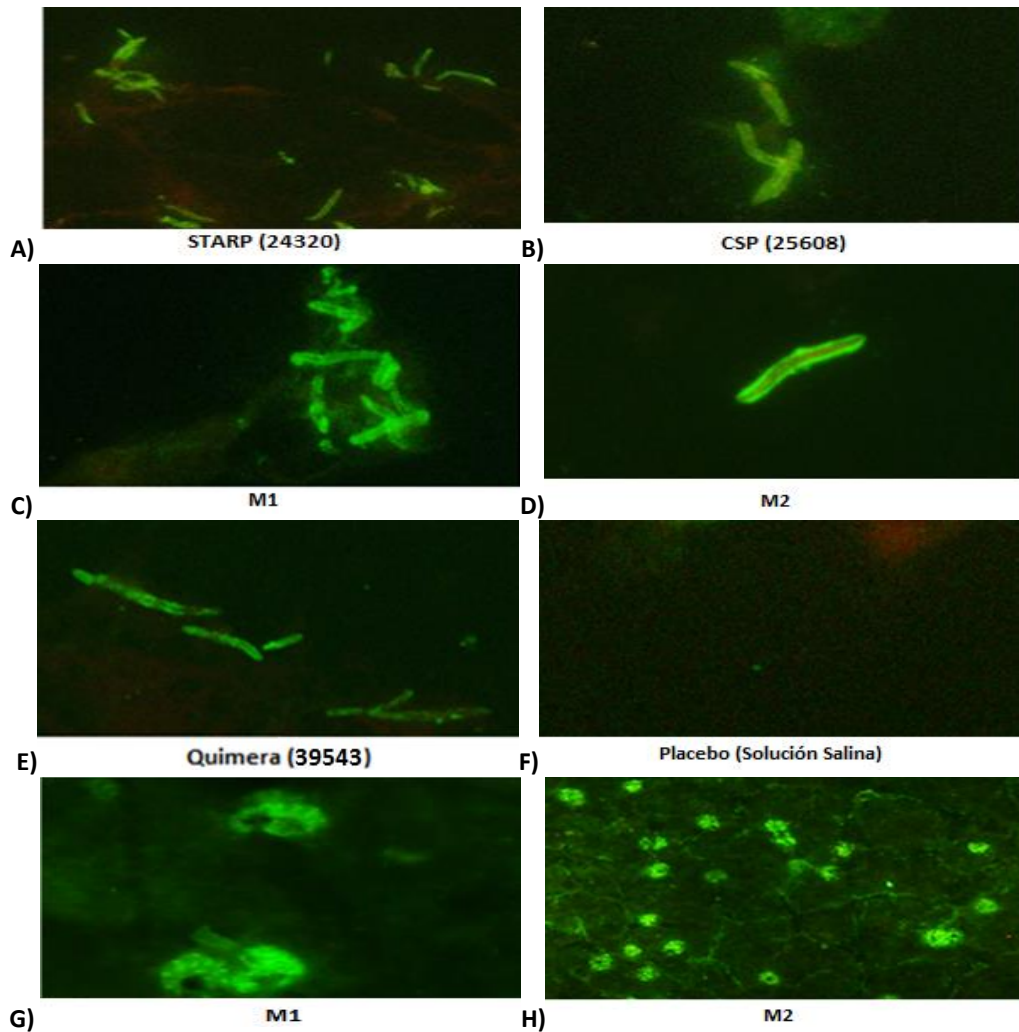


Figura 27. Perfil de antigenicidad de los péptidos evaluados.

En la figura 28 se observa el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) realizado con los sueros obtenidos de los diferentes grupos (tabla 8). En este se determina la interacción específica de los anticuerpos producidos en los ratones por los péptidos, la quimera y las mezclas, y como estos reconocen a su vez proteínas del parásito de los dos estadios (esporozoito y merozoito).

Se observó que los sueros producidos por las dos moléculas del estadio esporozoito (figura 28. A y B) reconocen al parásito en este estadio, lo mismo pasa con la mezcla de los péptidos M1 y M2; también, se observó un reconocimiento por parte de la quimera, mostrando lo anterior que las moléculas individuales, en mezcla y quimera producen anticuerpos capaces de reconocer al parásito en los dos estadios. Para el estadio merozoito mezclas M1 y M2 (que contiene la quimera) fueron reconocidas dando fluorescencia. A partir de los resultados obtenidos se determinó que hay un reconocimiento de los anticuerpos obtenidos de péptidos a proteínas del parásito.



**Figura 28.** Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Reactividad de anticuerpos de sueros de ratones inmunizados frente a esporozoitos cepa NF54 de *Plasmodium falciparum*. a) 24320 (STARP), b) 25608 (CSP), c) M1 (24320+25608+10014+9948), d) M2 (todos los polímeros + quimera), e) quimera (39543) y f) Placebo. Eritrocitos infectados de merozoito (esquizontes maduros) con la cepa FBC2 de *Plasmodium falciparum* g) M1 y f) M2.

El día 97 posterior a la primera dosis (figura 26), cada grupo de estudio se dividió en dos, para dos ratones se le realizó el desafío experimental ( $5 \times 10^4$  glóbulos rojos murinos infectados, dosis estandarizada previamente) de la cepa de malaria murina *Plasmodium yoelii* 17XL y en el día 101 con la cepa *Plasmodium berghei* ANKA. Los ratones fueron infectados vía intravenosa con glóbulos rojos murinos previamente parasitados con la cepa respectiva. Posterior al cuarto y sexto día de infección se evaluó diariamente de los porcentajes de parasitemia durante 14 días, todo esto con el objetivo de evaluar la inmunogenicidad de cada grupo estudiado. El grupo control (cuatro ratones) fue inoculado con solución salina (placebo).

Se siguió la protección de cada molécula peptídica y las mezclas para las dos cepas de *Plasmodium*. Como se observa en la figura 29. A para la cepa de *plasmodium yoelii* el péptido 9948 inicialmente presenta un control de la parasitemia del 20 % y tiene un aumento en el día 6 para posteriormente decaer en el día 8. Los péptidos 10014, 24320 y 25608 tienen un comportamiento de protección similar al descrito anteriormente. En contraste, la mezcla de péptidos M1 aumentó y mantuvo un control de la parasitemia por encima del 50 % después del día 10, la quimera (39543) tuvo un control de la parasitemia del 25 % el día 4, disminuye el día 6 y 8 y aumenta de forma marcada el día 10, manteniendo el control en el tiempo evaluado en (días 10, 12 y 14). La mezcla M2, que contiene a los péptidos poliméricos y el quimérico, presento un aumento del control de la enfermedad en el día 6 y un descenso en el día 8, para después ir aumentando paulatinamente en los días 10, 12 y 14 terminado con un porcentaje de control de alrededor del 65%, el cual fue el más alto que se obtuvo para todos los grupos evaluados. A partir de los resultados obtenidos se evidenció que la mezcla de los polímeros tiene un efecto positivo en el control de la enfermedad, el péptido quimérico 39543 controla de forma moderada la parasitemia y la mezcla M2 presenta un efecto sinérgico pues se obtiene un porcentaje mayor de control que las mezclas de los polímeros (M1) y la quimera por separado.

En la cepa de *Plasmodium berguei*, se observó un bajo control de la parasitemia de los péptidos individuales y el péptido quimérico, y de nuevo se observó un buen control de la parasitemia por parte de las mezclas M1 y M2, en esta última se observó de nuevo un efecto positivo al mezclar la quimera con los polímeros.



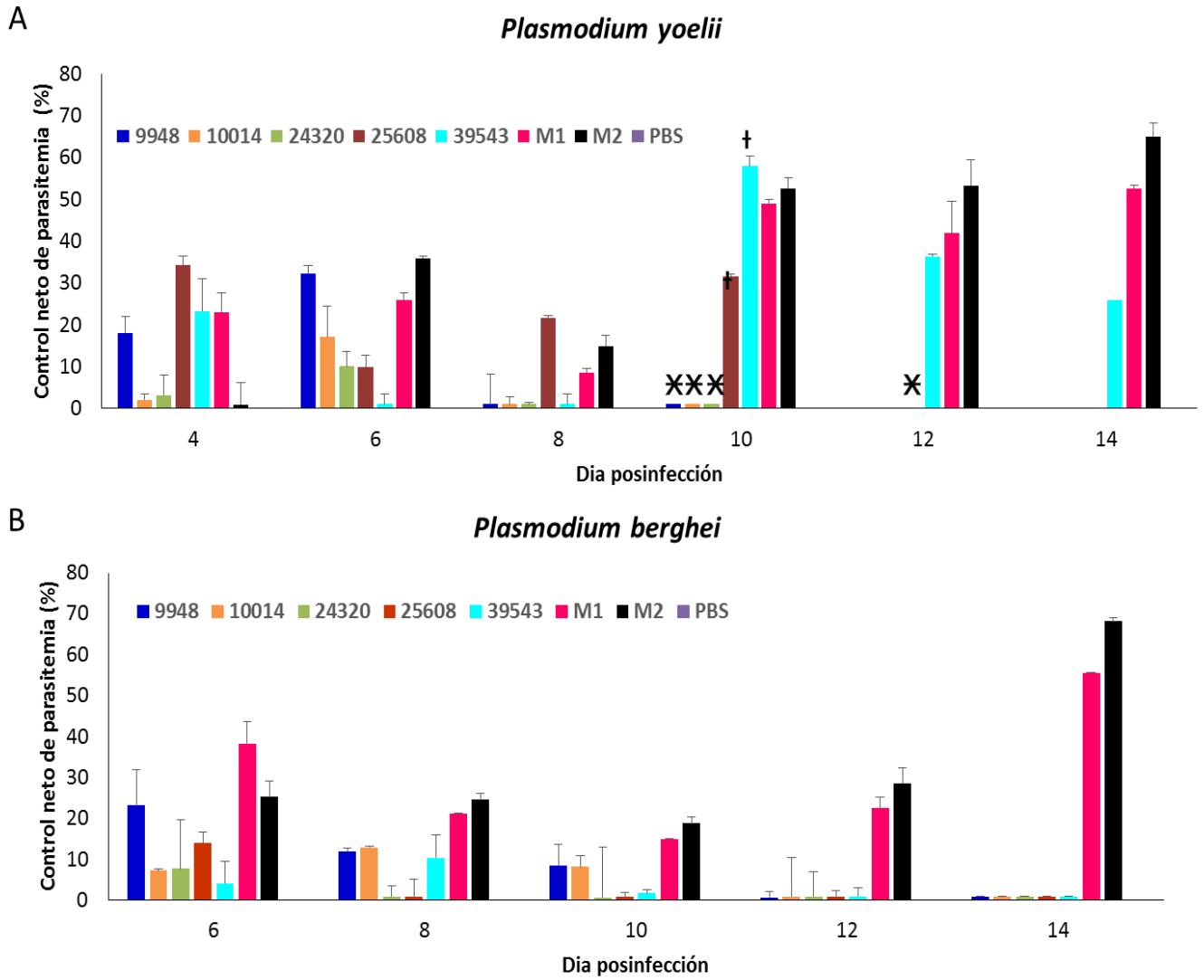


Figura 29. Ensayo *in vivo* del control de la parasitemia de los grupos inoculados con los péptidos poliméricos, péptido quimérico y mezclas.



## 4. Conclusiones

- Se sintetizó el péptido quimérico (39543) de alto peso molecular de 82 residuos, KNSFSLGENPNANPGGVIKHMRFHADYQAPFLGGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTD VNRYSNNYEEQPHISGG, derivado de 4 proteínas de *Plasmodium falciparum* por medio de síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) en una resina de polietilenglicol.
- Mediante la evaluación sintética del péptido quimérico de 82 residuos por SPFS en una resina a base de polietilenglicol con una sustitución de 0.20 meq/g, se determinó ineficiencias sintéticas similares en las dos condiciones estudiadas, síntesis estándar y asistidas por radiación microondas. Se evidenció que el calentamiento por microondas disminuye de forma pronunciada el tiempo total de la síntesis de la molécula peptídica, además, produjo un aumento del rendimiento sintético.
- Al estudiar el efecto de la sustitución de la resina en la síntesis del péptido quimérico, donde se evaluaron tres sustituciones (0.15, 0.10 y 0.08 meq/g) estas permitieron minimizar una delección de alanina previamente observada cuando se evaluó la síntesis en la resina de 0.20 meq/g manteniendo las mismas condiciones de reacción, además, de disminuir levemente (en general) el tiempo total de la síntesis, junto a un aumento del rendimiento de la reacción para las resinas de menor sustitución.
- La utilización de la sal caotrópica (Cloruro de litio) en la zona inicial de dificultad sintética detectada en los ensayos previos en los residuos de glicina de la posición 23 y 24 del péptido quimérico no permitió superar dicha ineficiencia.
- El estudio de actividad funcional demostró el potencial biológico del péptido quimérico de 82 residuos (39543). Se obtuvo para esta presentación peptídica los títulos más altos de anticuerpos en el ensayo de reconocimiento lo cual demuestra el efecto de un diseño adecuado de este constructo, pues los títulos de anticuerpo estimulados por este sobrepasan a cada uno de los péptidos individuales (9948, 10014, 24320 y 25608) y potencia la respuesta obtenida previamente por la mezcla (M1) de estos.

- Se determinó que los anticuerpos en sueros producidos a partir péptido quimérico tienen un reconocimiento específico por parte de las proteínas de los dos estadios (esporozoito y merozoito) del parásito.
- El péptido quimérico demostró su funcionalidad al lograr un porcentaje superior de control de parasitemia en comparación a los péptidos poliméricos individuales y cuando fue inoculado en mezcla con estos, presentó un efecto potenciador en el control el cual fue muy superior a cada una de las inoculaciones hechas en los ratones retados con las dos cepas de *Plasmodium yoelii* y *berghei*.

## 5. Perspectivas

- Es pertinente evaluar la síntesis del péptido quimérico en fase sólida acoplado pequeños bloques de las zonas que previamente se identificaron por presentar ineficiencias sintéticas para determinar si con el empleo de síntesis convergente es posible aumentar aún más el rendimiento sintético.
- Se plantea la síntesis y evaluación de la pseudoprolina Fmoc-Met-Thr( $\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$ )-OH (residuos  $^{22}\text{MT}^{21}$ ) antes de la zona inicialmente determinada (residuos  $^{24}\text{GG}^{23}$ ) que presenta una delección de glicina en la síntesis del péptido quimérico, por lo que al incluir una pseudoprolina podría disminuir o superar la delección de glicina la cual es una de las causales importantes en la disminución de la pureza de la molécula peptídica. La inclusión de la pseudoprolina se propone este punto pues se realizó un ensayo empleando el dipéptido de pseudoprolina Fmoc-Tyr(OtBu)-Ser( $\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$ )-OH en los residuos ubicados en la posición 14 y 13 ( $^{14}\text{YS}^{13}$ ) y no se observó una mejora en la síntesis del péptido quimérico. por esta razón, se propone para estudios posteriores la utilización de esta pseudoprolina que ubicada en el punto adecuado podría presentar un efecto disruptor efectivo.
- También se propone evaluar la síntesis de esta quimera con otro tipo de espaciadores como la b-Alania o el ácido aminohexanóico.
- El péptido quimérico obtenido presentó buenos resultados de actividad funcional por esta razón se propone el continuar estudios en el modelo monos Aotus y demás ensayos funcionales de citotoxicidad y hemólisis.



## Anexo 1. Peso molecular calculado para del péptido quimérico en diferentes puntos de síntesis.

Longitud	PM mono isotópico (Da.)	SECUENCIA
11	1228.53	NYEEQPHISGG
22	2628.16	MTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
23	2685.18	GMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
24	2742.20	GGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
25	2871.25	EGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
26	2984.33	LEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
30	3481.66	LKKQLEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
33	3887.86	YRSLKKQLEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
35	4043.95	GVYRSLKKQLEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
36	4114.99	AGVYRSLKKQLEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
39	4424.19	VPLAGVYRSLKKQLEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
44	5065.51	EVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
50	5513.68	GGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
57	6348.07	DYQAPFLGGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
60	6703.24	FHADYQAPFLGGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
64	7255.53	KHMRFHADYQAPFLGGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
66	7467.68	VIKMRFHADYQAPFLGGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
77	8488.15	LGENPNANPGGVKHMRFHADYQAPFLGGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG
82	9051.42	KNSFSLGENPNANPGGVKHMRFHADYQAPFLGGGYGGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGGMTDYNRYYSNNYEEQPHISGG

Los pesos moleculares fueron calculados por medio programa online *Peptide mass calculator* (<http://www.ionsource.com/programs/PEPCALC.HTM>)

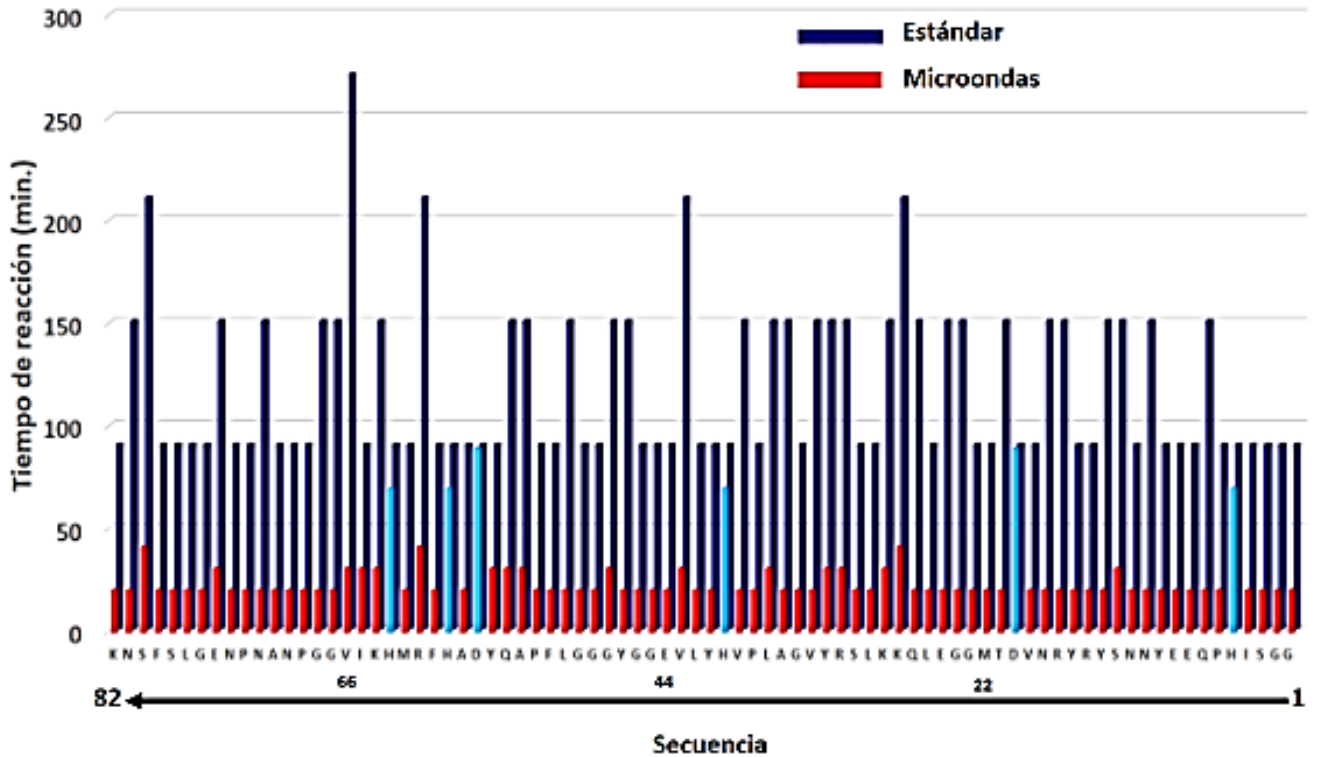
## Anexo 2: Pesos moleculares de los residuos de aminoácidos y del número de ter-butilaciones.

Código de letras		Peso molecular promedio (Da)	Código de letras		Peso molecular promedio (Da)
Gly	G	57.05	Asp	D	115.10
Ala	A	71.08	Gln	Q	128.10
Ser	S	87.08	Lys	K	128.20
Pro	P	97.12	Glu	E	129.10
Val	V	99.07	Met	M	131.20
Thr	T	101.10	His	H	137.10
Cys	C	103.10	Phe	F	147.20
Leu	L	113.20	Arg	R	156.20
Ile	I	113.20	Tyr	Y	163.20
Asn	N	114.10	Trp	W	186.20

Número ter-butilaciones	Da
1	56.10
2	112.20
3	168.30
4	224.40
5	280.50
6	336.60

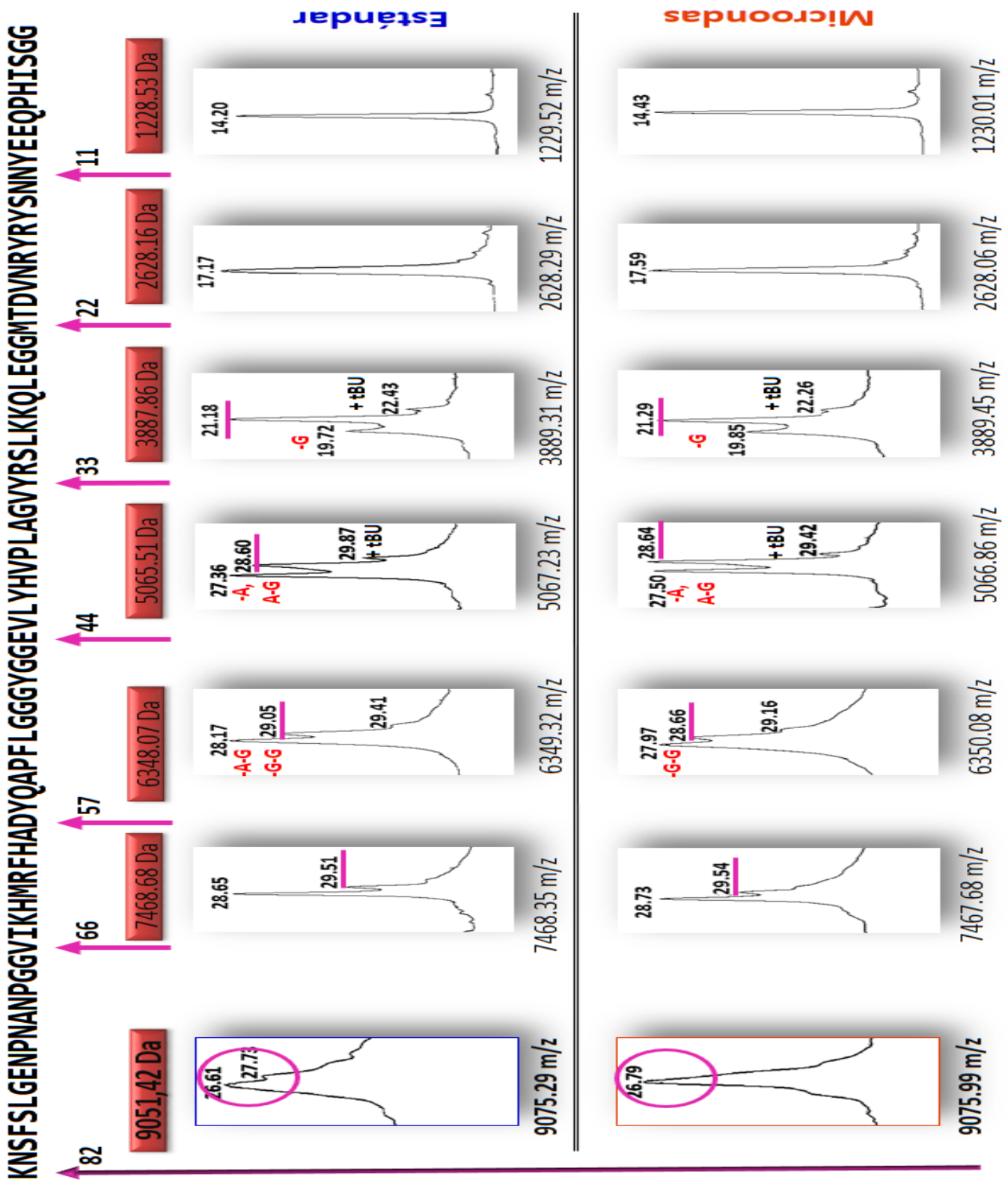


### Anexo 3: Perfil sintético en la evaluación de las dos condiciones de reacción: Estándar y Asistida por Radiación Microondas

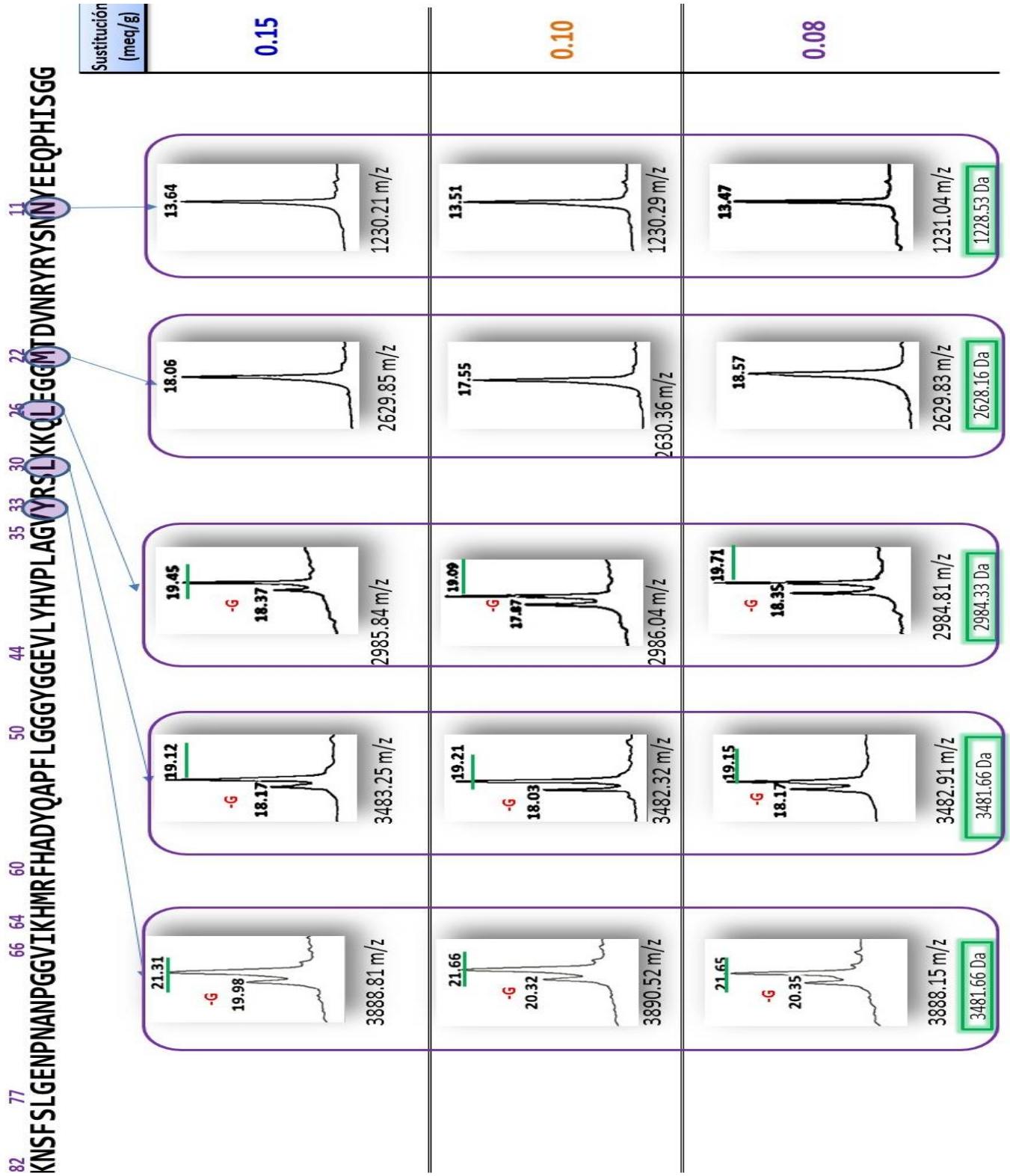


Comparación de los perfiles sintéticos para la obtención del péptido quimérico de 82 residuos en condiciones estándar (a temperatura ambiente, barra azul) y asistido por radiación microondas (temperatura promedio 80 °C, barra roja); La reacción de acople fue seguida cualitativamente por medio de la reacción de ninhidrina. El tiempo efectivo de reacción es la sumatoria del tiempo requerido para el acople y la desprotección, para condición estándar fue de 9720 minutos y para el asistido por microondas de 2268 minutos. Los aminoácidos aspártico (D) y histidina (H) no fueron asistidos por radiación microondas en el acople y el aspártico para la desprotección (barra azul celeste).

Anexo 4: Resumen de los cromatogramas y valores de m/z de los espectros de masas en la evaluación de la síntesis del péptido quimérico en las dos condiciones de reacción: Estándar y Asistida por Radiación Microondas



Anexo 5: Resumen de los cromatogramas y valores de m/z de los espectros de masas en la evaluación de la síntesis del péptido quimérico con las tres sustituciones de resina evaluadas: 0.15, 0.10 y 0.08 meq/g



82 KNSFSLGENPNANPGGVIKHMRFHADYQAPFLGGYGGEVLYHVPLAGVYRSIKKQLEGNTDVRNRYRYSNNYEEQPHISGG

Sustitución (meq/g)	0.15	0.10	0.08
77	<p>26.06 27.01 7257.03 m/z</p>	<p>26.19 27.25 7256.72 m/z</p>	<p>25.99 7259.59 m/z</p>
66	<p>27.48 6705.03 m/z</p>	<p>27.42 6704.29 m/z</p>	<p>27.66 6704.65 m/z</p>
60	<p>26.06 27.02 5513.07 m/z</p>	<p>25.99 27.18 5514.16 m/z</p>	<p>25.91 26.96 ND</p>
35	<p>27.04 25.95 5067.59 m/z</p>	<p>26.44 25.25 5066.74 m/z</p>	<p>27.10 25.75 5066.23 m/z</p>
26	<p>22.71 21.06 4044.93 m/z</p>	<p>22.90 21.31 4044.46 m/z</p>	<p>23.10 21.89 4044.85 m/z</p>
11	<p>21.31 19.98 3888.81 m/z</p>	<p>21.66 20.32 3890.52 m/z</p>	<p>21.65 20.35 3888.15 m/z</p>



82 **K**NSFSLGENPNANPGGV<sup>56</sup>**I**K<sup>54</sup>HMR<sup>60</sup>PHADYQAPFL<sup>50</sup>GGYGG<sup>44</sup>EVLYHVPLAG<sup>35</sup>VRS<sup>33</sup>LKK<sup>30</sup>Q<sup>26</sup>LEG<sup>22</sup>MTD<sup>11</sup>VNR<sup>11</sup>RYRS<sup>11</sup>NYEEQPHISGG

Sustitución (meq/g)	0.15	0.10	0.08
7468.91 m/z	<p>26.12 26.97</p>	<p>26.13</p>	<p>26.18 26.95</p> <p>7467.68 Da</p>
8511.19 m/z	<p>26.08 26.87</p>	<p>26.19 27.08</p>	<p>26.14</p> <p>8489.04 m/z</p> <p>8488.15 Da</p>
ND	<p>26.11 26.81</p> <p>ND</p>	<p>26.61</p> <p>ND</p>	<p>26.10</p> <p>9051.42 Da</p>

## Bibliografía

1. Tran, T. M. *et al.* Naturally acquired antibodies specific for plasmodium falciparum reticulocyte-binding protein homologue 5 inhibit parasite growth and predict protection from malaria. *J. Infect. Dis.* **209**, 789–798 (2014).
2. del Prado, G. R. L. *et al.* Malaria in developing countries. *J. Infect. Dev. Ctries.* **8**, 1–4 (2014).
3. Chia, W. N., Goh, Y. S. & RÃ©nia, L. Novel approaches to identify protective malaria vaccine candidates. *Front. Microbiol.* **5**, 1–9 (2014).
4. Good, M. F. The hope but challenge for developing a vaccine that might control malaria. *Eur. J. Immunol.* **39**, 939–943 (2009).
5. Patarroyo, M. E., Patarroyo, M. A., Pabón, L., Curtidor, H. & Poloche, L. A. Immune protection-inducing protein structures (IMPIPS) against malaria: The weapons needed for beating Odysseus. *Vaccine* **33**, 7525–7537 (2015).
6. Bermúdez, A. *et al.* Synthetic vaccine update: Applying lessons learned from recent SPf66 malarial vaccine physicochemical, structural and immunological characterization. *Vaccine* **25**, 4487–4501 (2007).
7. Tam, J. P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5409–5413 (1988).
8. Vanegas, M. *et al.* Protecting capacity against malaria of chemically defined tetramer forms based on the Plasmodium falciparum apical sushi protein as potential vaccine components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **451**, 15–23 (2014).
9. Goodwin, D., Simerska, P. & Toth, I. Peptides As Therapeutics with Enhanced Bioactivity. *Curr. Med. Chem.* **19**, 4451–4461 (2012).
10. Amblard, M., Fehrentz, J.-A., Martinez, J. & Subra, G. Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.* **33**, 239–254 (2006).
11. White, P., Keyte, J. W., Bailey, K. & Bloomberg, G. Expediting the Fmoc solid phase synthesis of long peptides through the application of dimethylloxazolidine dipeptides. *J. Pept. Sci.* **10**, 18–26 (2004).
12. Garcí, F. *et al.* ChemMatrix , a Poly ( ethylene glycol ) -Based Support for the Solid-Phase Synthesis of Complex Peptides. *Society* 213–220 (2006).
13. Hamada, H., Arakawa, T. & Shiraki, K. Effect of additives on protein aggregation. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**, 400–407 (2009).
14. Von Eggelkraut-Gottanka, R., Machova, Z., Grouzmann, E. & Beck-Sickinger, A. G. Semisynthesis and characterization of the first analogues of pro-neuropeptide Y. *ChemBioChem* **4**, 425–433 (2003).
15. Sureshbabu, V. V., Nagendra, G. & Venkataramanarao, R. Ultrasound accelerated conversion of N??-urethane protected peptide esters to their thiopeptides using P2S5. *Ultrason. Sonochem.* **15**, 927–929 (2008).
16. Application of Microwave Irradiation to the Synthesis of 14 Helical  $\beta$ -Peptides.pdf.
17. Patarroyo, M. E., Bermudez, A. & Alba, M. P. The high immunogenicity induced by modified sporozoites' malarial peptides depends on their phi (??) and psi (??) angles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **429**, 81–86 (2012).
18. Bermúdez, A., Alba, M. P., Vanegas, M. & Patarroyo, M. E. 3D structure determination of STARP peptides implicated in P. falciparum invasion of hepatic cells. *Vaccine* **28**, 4989–4996 (2010).
19. Patarroyo, M. E., Moreno-Vranich, A. & Bermúdez, A. Phi ( $\Phi$ ) and psi ( $\Psi$ ) angles involved in malarial

- peptide bonds determine sterile protective immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **429**, 75–80 (2012).
20. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149 (1963).
  21. Anderson, W. & Mcgregor, A. C. t-Butyloxycarbonylamino Acids and Their Use in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 6180–6183 (1957).
  22. Function, F., Group, N. B. A., Service, P. H. & No, C. No Title. 5748–5749 (1970).
  23. Jensen, Knud J.; Tofteng Shelton, Pernille; Pedersen, S. L. *Peptide Synthesis and Applications*. (2013). doi:10.1007/978-1-62703-544-6
  24. Barlos, K. *et al.* Solid phase synthesis of partially protected and free peptides containing disulphide bonds by simultaneous cysteine oxidation-release from 2-chlorotrityl resin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **38**, 562–568 (1991).
  25. Chandrudu, S., Simerska, P. & Toth, I. Chemical methods for peptide and protein production. *Molecules* **18**, 4373–4388 (2013).
  26. Sarin, V. K., Kent, S. B. H. & Merrifield, R. B. Properties of Swollen Polymer Networks - Solvation and Swelling of Peptide-Containing Resins in Solid-Phase Peptide-Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 5463–5470 (1980).
  27. Dekker, M. s.
  28. Frutos, S., Tulla-Puche, J., Albericio, F. & Giralt, E. Chemical synthesis of 19F-labeled HIV-1 protease using Fmoc-chemistry and chemmatrix resin. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **13**, 221–227 (2007).
  29. Barlos, K. *et al.* Application of 2-chlorotrityl resin in solid phase synthesis of (Leu15)-gastrin I and unsulfated cholecystokinin octapeptide. Selective O-deprotection of tyrosine. *Int. J. Pept. Protein Res.* **38**, 555–561 (1991).
  30. Joullié, M. M. & Lassen, K. M. Evolution of amide bond formation. *Arkivoc* **2010**, 189–250 (2010).
  31. Valeur, E. & Bradley, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 606–631 (2009).
  32. Al-Warhi, T. I., Al-Hazimi, H. M. a & El-Faham, A. Recent development in peptide coupling reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **16**, 97–116 (2012).
  33. Zinieris, N., Zikos, C. & Ferderigos, N. Improved solid-phase peptide synthesis of ‘difficult peptides’ by altering the microenvironment of the developing sequence. *Tetrahedron Lett.* **47**, 6861–6864 (2006).
  34. Abdel-Aal, A.-B. M., Papageorgiou, G., Quibell, M. & Offer, J. Automated synthesis of backbone protected peptides. *Chem. Commun. (Camb)*. **50**, 8316–9 (2014).
  35. Ns, K. & Albericio, F. *Molecular Pharmaceutics & Organic Process Research Peptide Coupling Reactions*. **3**, 1–2 (2015).
  36. Coin, I., Beyermann, M. & Bienert, M. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nat. Protoc.* **2**, 3247–3256 (2007).
  37. Thalerl, A. *et al.* Conditions for the Use of Lithium-Salts in Coupling Reactions [“ I. **74**, (1991).
  38. Thaler, A. *et al.* Improvement of Degree of Resin Swelling and of Efficiency of Coupling. **74**, (1991).
  39. Coič, Y. M., Le Lan, C., Neumann, J. M., Jamin, N. & Baleux, F. Slightly modifying pseudoproline dipeptides incorporation strategy enables solid phase synthesis of a 54 AA fragment of caveolin-1 encompassing the intramembrane domain. *J. Pept. Sci.* **16**, 98–104 (2010).
  40. Wöhr, T. *et al.* Pseudo-prolines as a solubilizing, structure-disrupting protection technique in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 9218–9227 (1996).
  41. Cardona, V. *et al.* Application of Dmb-dipeptides in the Fmoc SPPS of difficult and aspartimide-prone sequences. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **14**, 285–292 (2008).
  42. Kappe, C. O. & Dallinger, D. Controlled microwave heating in modern organic synthesis: Highlights from the 2004-2008 literature. *Mol. Divers.* **13**, 71–193 (2009).
  43. Fara, M. a., Díaz-Mochón, J. J. & Bradley, M. Microwave-assisted coupling with DIC/HOBt for the synthesis of difficult peptoids and fluorescently labelled peptides - A gentle heat goes a long way. *Tetrahedron Lett.* **47**, 1011–1014 (2006).
  44. Kluczyk, A., Rudowska, M., Stefanowicz, P. & Szewczuk, Z. Microwave-assisted TFA cleavage of peptides from Merrifield resin. *J. Pept. Sci.* **16**, 31–39 (2010).



45. Alexakis, A., Lensen, N., Tranchier, J. & Mangeney, P. Organic Chemistry. *Society M*, 4563–4565 (1992).
46. Latajka, R. *et al.* Pentapeptides containing two dehydrophenylalanine residues--synthesis, structural studies and evaluation of their activity towards cathepsin C. *J. Pept. Sci.* **14**, 1084–1095 (2008).
47. Pedersen, S. L., Tofteng, a. P., Malik, L. & Jensen, K. J. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1826 (2012).
48. Chi, Y. *et al.* Microwave-assisted solid phase synthesis, PEGylation, and biological activity studies of glucagon-like peptide-1(7-36) amide. *Bioorganic Med. Chem.* **16**, 7607–7614 (2008).
49. Abu-baker, S. *et al.* Microwave Assisted Peptide Synthesis as a New Gold Standard in Solid Phase Peptide Synthesis : Phospholamban as an Example. **2014**, 1–4 (2014).
50. Echalié, C. *et al.* Heating and microwave assisted SPPS of C-terminal acid peptides on trityl resin: the truth behind the yield. *Amino Acids* **45**, 1395–1403 (2013).
51. Friligou, I., Papadimitriou, E., Gatos, D., Matsoukas, J. & Tselios, T. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis of the 60-110 domain of human pleiotrophin on 2-chlorotrityl resin. *Amino Acids* **40**, 1431–1440 (2011).
52. Varanda, L. M. & Miranda, M. T. Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for and optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. *J. Pept. Res.* **50**, 102–108 (1997).
53. Muthusamy, K. *et al.* Microwave assisted SPPS of amylin and its toxicity of the pure product to RIN-5F cells. *Biopolymers* **94**, 323–330 (2010).
54. Patarroyo, M. E. *et al.* IMPIPS: The Immune Protection-Inducing Protein Structure Concept in the Search for Steric-Electron and Topochemical Principles for Complete Fully-Protective Chemically Synthesised Vaccine Development. *PLoS One* **10**, e0123249 (2015).
55. Alba, M. P. *et al.* Modifying RESA protein peptide 6671 to fit into HLA-DR $\beta$ 1\* pockets induces protection against malaria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 1154–1164 (2004).
56. Bermúdez, A. *et al.* Gauche+ side-chain orientation as a key factor in the search for an immunogenic peptide mixture leading to a complete fully protective vaccine. *Vaccine* **32**, 2117–2126 (2014).
57. Bermúdez, A., Vanegas, M. & Patarroyo, M. E. Structural and immunological analysis of circumsporozoite protein peptides: A further step in the identification of potential components of a minimal subunit-based, chemically synthesised antimalarial vaccine. *Vaccine* **26**, 6908–6918 (2008).
58. Rivera, Z. *et al.* Double dimer peptide constructs are immunogenic and protective against Plasmodium falciparum in the experimental Aotus monkey model. *J. Pept. Res.* **59**, 62–70 (2002).
59. Urquiza, M. *et al.* Two L1-peptides are excellent tools for serological detection of HPV-associated cervical carcinoma lesions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 224–232 (2005).