

**“MONITOREO POR MALDI-TOF MS DEL PROCESO DE SÍNTESIS EN FASE
SÓLIDA DEL PÉPTIDO CONOPRESINA PRESENTE EN EL VENENO DE
CONUS TEXTILE”.**

MÓNICA ALEJANDRA VEGA JEREZ



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2016**

**MONITOREO POR MALDI-TOF MS DEL PROCESO DE SÍNTESIS EN FASE
SÓLIDA DEL PÉPTIDO CONOPRESINA PRESENTE EN EL VENENO DE
CONUS TEXTILE".**

MÓNICA ALEJANDRA VEGA JEREZ

Trabajo de grado para optar al título de Químico

Director:

HERMINSUL DE JESÚS CANO CALLE

Doctor en Química

Codirector

JOHANNA MARCELA FLÓREZ CASTILLO

Doctora en Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2016

DEDICATORIA

A Dios, por darme la fortaleza y sabiduría para afrontar todas las dificultades que surgieron durante mi camino, porque a cada paso que doy siento su presencia y por poner en mi camino a tantas personas maravillosas que creyeron en mí y me apoyaron incondicionalmente.

También dedico este trabajo de grado a mis padres Armando Vega y María Estela Jerez por su esfuerzo y dedicación, porque me han brindado apoyo y amor incondicional. Todo lo que soy y todos los logros que he conseguido y conseguiré son gracias a ellos y para ellos.

“Podemos seguir miles de caminos, pero el camino de Dios es el único seguro”

AGRADECIMIENTOS

Dios pone en nuestro camino diversas personas que son difíciles de olvidar por que han dejado una huella importante en nuestro corazón, por esto quiero expresar mi gratitud y mi apoyo incondicional hacia ellas siempre.

Quiero agradecer al profesor Herminul Cano, mi director de tesis, y a mi codirectora Johana Flórez por confiar en mí y brindarme su amistad. Por tantas enseñanzas, no solo académicas, sino también de la vida.

A mis compañeros de laboratorio por ayudarme y apoyarme durante todo mi proyecto de grado, especialmente a Deisy Giraldo y Jeferson Valencia.

A mis amigos Yulieth Caballero, Jaz Grillo y Jair Flórez, por estar conmigo en tantos momentos buenos y malos, alegrías, tristezas, anhelos y decepciones. Hoy quiero agradecerles por su apoyo incondicional, porque cuando más los necesite estuvieron a mi lado. Dicen que los amigos son la familia que se escoge y ustedes van a ser siempre mi familia.

También quiero agradecer a mi novio Johny Ruiz, por su amor incondicional, sus consejos, su comprensión y por hacerme feliz cada día de mi vida. Porque con su apoyo voy a lograr todo lo que me proponga. Más que mi novio te has convertido en mi mejor amigo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	16
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1 CONOTOXINAS	18
1.1.1 Generalidades	18
1.1.2 Clasificación.....	19
1.1.3 Conotoxinas como agentes terapéuticos	22
1.2 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SOLIDA (SPPS).....	23
1.3 SOPORTE SÓLIDO EN SPPS	25
1.4 FORMACIÓN DE ENLACES DISULFURO	26
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	29
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.	29
4. SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	30
4.1 SÍNTESIS DEL PÉPTIDO LINEAL.....	30
4.2 ACTIVACIÓN DE LA RESINA.	30
4.3 ACOPLA DE AMINOÁCIDOS	31
4.4 ACETILACIÓN.....	33
4.5 PRUEBAS CUALITATIVAS.	33
4.6 DES-ANCLAJE DEL PÉPTIDO DE LA RESINA.	36
4.7 LIOFILIZACIÓN	37
4.8 OXIDACIÓN DEL PÉPTIDO (FORMACIÓN ENLACE DISULFURO).....	37
4.9 MONITOREO Y CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO POR MALDI-TOF MS.....	38
4.10 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO POR RP-HPLC	38

5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	40
5.1 REACCIONES DEL PROCESO DE SÍNTESIS.....	40
5.1.1 Remoción Fmoc con piperidina.....	40
5.1.2 Activación de aminoácidos.....	42
5.1.3 Reacción de acoplamiento.....	43
5.1.4 Acetilación de la peptidil-resina.....	44
5.1.5 Desanclaje y precipitación del péptido	44
5.2 MONITOREO Y CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO POR MALDI-TOF MS.....	46
5.2.1 Síntesis 1	49
5.2.2 Síntesis 2.....	63
5.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO POR RP-HPLC	67
6. CONCLUSIONES	69
7. RECOMENDACIONES.....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	78

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 .Caracol Conus textile[6].	18
Figura 2. Diagrama organizacional de los conopéptidos.	21
Esquema 1. Esquema general de la síntesis en fase sólida.	24
Figura 3. Resina Rink Amida.	26
Figura 4. Enfoques de formación de enlaces disulfuro.	27
Figura 5. Aminoácido activado.	32
Figura 6. Test de Káiser o Prueba de Ninhidrina	34
Figura 7. Test de cloranilo	35
Figura 8. Test de azul de bromofenol.	36
Figura 9. Aducto Fmoc-piperidina.	41
Figura 10. Péptido libre obtenido.	46
Figura 11. Espectros MALDI-TOF MS correspondiente al monitoreo de la síntesis del reactor N°1 péptido lineal con secuencia aminoacídica CFIRNCPP.	50
Figura 12. Espectro MALDI-TOF MS formación de enlace disulfuro por oxidación con DMSO a pH ácido.	52
Figura 13. Mc, Conopresina textile.	53
Figura 14. a. Dímero por puente de hidrogeno. b. Dímero por puentes disulfuro.	54
Figura 15. Espectro MALDI-TOF MS formación de enlace disulfuro por oxidación con DMSO a pH básico.	56
Figura 16. Aducto inestable entre DMSO y Cisteína N-terminal a pH básico.	58
Figura 17. Espectro MALDI-TOF MS péptido lineal 15 días después de clivaje.	59
Figura 18. Espectro MALDI-TOF MS formación de enlace disulfuro con yodo en resina.	60
Figura 19. Aducto Péptido+ etanoditiol	61

Figura 20. Espectros MALDI-TOF MS correspondiente al monitoreo de la síntesis del reactor N°2 péptido lineal con secuencia aminoacídica CFIRNCP.	64
Figura 21. Espectro MALDI-TOF MS del péptido conopresina textile de la síntesis N°2.	66
Figura 22. Cromatograma de RP-HPLC del péptido cíclico de la síntesis 2.	67
Figura 23. Espectro MALDI-TOF MS de la señal recogida del RP-HPLC que corresponde al péptido conopresina textile	68

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Esquema general de la síntesis en fase sólida.	24
Esquema 2. Mecanismo de remoción de Fmoc con piperidina.[46]	41
Esquema 3. Mecanismo de activación de aminoácidos con TBTU y DIPEA [51]. .	42
Esquema 4. Mecanismo de formación de enlace peptidil-resina. [46]	43
Esquema 5. Mecanismo de acetilación de la peptidil-resina.	44
Esquema 6. Desanclaje del péptido de la resina. [54]	45
Esquema 7. Formación de enlace disulfuro con DMSO.	57
Esquema 8. Mecanismo de formación del enlace disulfuro con yodo en resina	62

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Ejemplos conotoxinas sintéticas con potencial farmacéutico	22
Tabla 2. Activación de la resina Rink Amide AM.	31
Tabla 3. Pesos calculados para 7 excesos de aminoácido.	32
Tabla 4. Características del método de síntesis.	40
Tabla 5. Pesos calculados de cada acople durante la síntesis del péptido conopresina.	46

ACRÓNIMOS

ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
Boc	Grupo tert-butoxicarbonil
Bzl	Grupo bencil
CHCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico
DCM	Diclorometano
DIPEA	N,N-diisopropiletilendiamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetra-azaciclododecano- 1,4,7,10-tetraacético
DVB	Divinilbenceno
EDT	1,2-etanoditiol
EMA	Agencia de medicina europea
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
Fmoc	Grupo 9-fluorometoxicarbonilo
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa
IPA	Alcohol isopropílico
LC	Cromatografía líquida
MALDI	Desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz
MS	Espectrometría de masas
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
SPPS	Síntesis de péptidos en fase solida
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
tBu	Grupos del tipo tert-butil
TFA	Ácido trifluoroacético
TIS	Triisopropilsilano
TOF	Tiempo de vuelo
Trt	Grupo tritilio

RESUMEN

TÍTULO: “MONITOREO POR MALDI-TOF MS DEL PROCESO DE SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DEL PÉPTIDO CONOPRESINA PRESENTE EN EL VENENO DE *CONUS TEXTILE*”.*

AUTOR: VEGA JEREZ, MÓNICA ALEJANDRA **

Palabras clave: SPPS, N-Fmoc, EM-MALDI-TOF.

DESCRIPCIÓN

El péptido fue sintetizado con conopressin aminoacídica CFIRNCPP secuencia localizada en la industria textil caracol *Conus veneno*. Tiene un enlace disulfuro entre las cisteínas en las posiciones 1-6. El enlace disulfuro proporciona a la formación de la estructura tridimensional, que desempeñan un papel importante en la actividad biológica dando todas las características agonista de oxitocina.

La síntesis conopéptido se completó mediante una síntesis metodológica en fase sólida (SPPS), utilizando una estrategia de N-Fmoc, es decir, el grupo 9-fluoromethoxycarbonyl como un protector temporal de α -amino y terc-butil (tBu) tipo grupos para proteger las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales. protección cisteínas se llevó a cabo con tritely (trt). La formación de enlaces disulfuro se realiza a través de diferentes métodos, de hecho, DMSO oxidación en tampón fosfato con 7,5 pH era el más eficiente. El seguimiento de síntesis de péptidos y de la formación de enlaces disulfuro se realizan a través de MALDI-TOF espectrometría de masas y, finalmente, la técnica analítica RP-HPLC se empleó usando una columna C18 de gradiente de acetonitrilo (ACN) / agua.

La técnica analítica espectrometría de masas MALDI-TOF permitió realizar un monitoreo adecuado de cada acople para mejorar el proceso de síntesis y evitar la formación de delecciones.

El método de oxidación elegido, empleando DMSO a pH básico, fue el más adecuado para la formación del enlace disulfuro de las posiciones 1- 6 en la conopresina *textile*, ya que se dio una conversión completa del péptido lineal al péptido cíclico.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Herminul De Jesús Cano Calle, Doctor en Química. Codirector: Johanna Marcela Flórez Castillo, Doctora en Química

SUMMARY

TITLE: MONITORING BY MALDI-TOF MS OF THE SYNTHESIS PROCESS IN SOLID PHASE OF THE CONOPRESSIN PEPTIDE LOCATED IN THE SNAIL POISON *CONUS TEXTILE*.

AUTHOR: VEGA JEREZ, MÓNICA ALEJANDRA **

KEYWORDS: SPPS, N-Fmoc, MS-MALDI-TOF.

DESCRIPTION

The conopressin peptide was synthesized with aminoacidic sequence CFIRNCPP located in the snail poison *Conus textile*. It has a disulfide bond between the cysteines in the positions 1-6. The disulfide bond provides to the tridimensional structure formation which play an important role in the biological activity giving all the oxytocin agonist characteristics.

The conopeptide synthesis was completed through a methodologic synthesis in solid phase (SPPS), using an N-Fmoc strategy, it means, the 9-fluoromethoxycarbonyl group as a temporal protector of α -amino and tert-butyl (tBu) type groups to protect the side chains of the trifunctional amino acids. Cysteines protection was carried out with tritely (trt). The disulfide bond formation was made through different methods, in fact, DMSO oxidation in phosphate buffer with pH 7,5 was the most efficient. The peptide synthesis monitoring and the disulfide bond formation was made through MALDI-TOF mass spectrometry and finally the RP-HPLC analytic technique was employed by using a C18 column with acetonitrile gradient (ACN)/Water.

The analytical mass spectrometry MALDI-TOF technique allowed for adequate monitoring of each coupling to improve the synthesis process and prevent the formation of deletions.

The oxidation method chosen, basified using DMSO was the most suitable for disulphide bond formation of 1- 6 positions on the textile conopresina because complete conversion of the linear peptide to cyclic peptide gave.

* Degree work

** Science Faculty. School of Chemistry. Director: Hermínsul De Jesus Cano Street, Doctor in Chemistry. Co-director: Marcela Florez Johanna Castillo, Doctor of Chemistry

INTRODUCCIÓN

El potencial marino como fuente de neurofármacos se considera actualmente un anexo prometedor en la industria farmacéutica. Los caracoles del género *Conus* son una de las fuentes principales de estudio con aproximadamente 700 especies, cada una con un perfil farmacológico diferente. Cada especie posee una mezcla de alrededor de 200 conotoxinas caracterizadas por tener propiedades como neurofármacos, gracias a su alta especificidad y su gran actividad [1][2]. Estas toxinas son péptidos entre 7 y 40 aminoácidos con gran cantidad de cisteínas lo cual permite la formación de enlaces disulfuro intramoleculares que les proveen una alta estabilidad. Según el número de estos enlaces los conopéptidos pueden ser clasificados en dos categorías; el primer grupo comprende péptidos pobres en puentes disulfuro como las conopresinas, conantokinas, conorfamidas entre otras, el segundo grupo comprende diferentes súper-familias de las conotoxinas con múltiples enlaces disulfuro [3].

Los estudios realizados por el grupo del profesor Baldomero Olivera definen las secuencias de un gran número de conopéptidos y hacen un estudio de su actividad biológica, a partir de la cual se hizo evidente que las conotoxinas podrían tener gran potencial en el tratamiento de una variedad de trastornos neurológicos como lo son el Alzheimer, Parkinson, Epilepsia, entre otras enfermedades neurodegenerativas. Desde entonces, el interés por los péptidos presentes en estos venenos ha venido en aumento, ya que tienen grandes posibilidades como agentes terapéuticos altamente selectivos en los seres humanos [4].

Teniendo en cuenta la importancia de los conopéptidos en la búsqueda de fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, durante este proyecto de investigación se llevó a cabo la síntesis del péptido conopresina (CFIRN CPP) presente en el veneno del caracol *Conus textile* empleando una

metodología F-moc, probando diversas metodologías de formación de enlaces disulfuro y monitoreando su proceso por MALDI-TOF y RP-HPLC hasta la purificación final.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CONOTOXINAS

1.1.1 Generalidades. Los caracoles del género *cono* han sido conocidos desde hace muchos años debido a sus llamativos caparazones y su mortal veneno. Han sido reportados gran cantidad de casos de gente lastimada o muerta por su picadura. El análisis bioquímico de los componentes de veneno revela una gran cantidad de péptidos, conocidos como conopéptidos o conotoxinas. La especie asociada con más frecuencia al envenenamiento humano es el *Conus textile* [5]. Este caracol se considera una de las criaturas más tóxicas del planeta [6]. (Ver Figura 1).

Figura 1 .Caracol Conus textile



Fuente: [6].

Su veneno ataca el sistema nervioso con gran rapidez, esto se debe en gran parte al pequeño tamaño de sus péptidos y alta estabilidad generada por su gran cantidad de residuos de cisteína que permiten la formación de enlaces disulfuro [7].

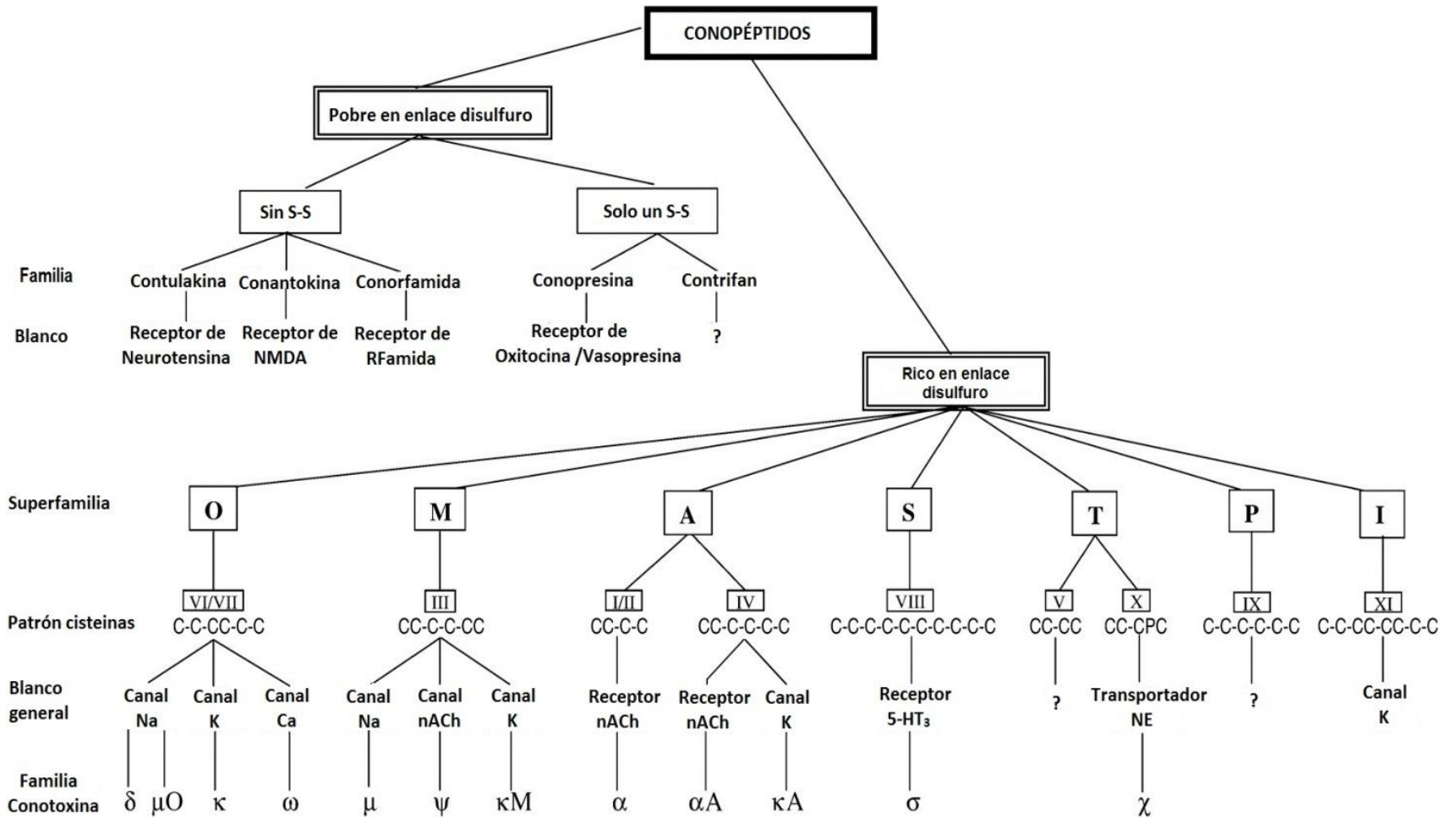
La mayor parte de péptidos Conus tienen una alta selectividad por canales iónicos o dependientes de voltaje, provocando que no se excite la célula, y no se libere el neurotransmisor. El direccionamiento hacia los canales iónicos, la cual es una estrategia de veneno poderosa en este contexto, y la rica diversidad molecular son factores que ha despertado el interés de varios investigadores [8] [9]. Otro de los mecanismos de acción, en algunos tipos específicos de estas conotoxinas, consiste en antagonizar competitivamente, de manera reversible o irreversible al neurotransmisor, inhibiendo así su acción, por ejemplo, la ω -conotoxina GVIA permitió distinguir farmacológicamente el subtipo-N del canal de calcio implicado en la liberación de neurotransmisores en células nerviosas [10].

1.1.2 Clasificación. Las conotoxinas se clasifican según el número y el patrón de enlaces disulfuro, en la Figura 2 se indica dicha clasificación y a su vez se muestran las súper-familias de genes, los patrones de cisteína, y dianas farmacológicas conocidas. Cada familia de péptidos tiene blancos diferentes los cuales le atribuyen características farmacológicas en diversas áreas [11]. (Ver Figura 2)

La conopresina es el conopéptido más pequeño, tiene una secuencia de 8 aminoácidos los cuales varían dependiendo de la especie del caracol, presentan un enlace disulfuro formado entre las cisteínas en las posiciones 1-6. Son agonistas de la vasopresina u oxitocina dependiendo del aminoácido en la octava posición, si presenta un residuo básico se considera de la familia de la vasopresina con características de antidiurético y relacionado con la regulación hidromineral, si por el contrario en la posición 8 presenta un aminoácido neutro se

inclina más a la familia de la oxitocina, presentando propiedades uterotónicas, actividades de producción de leche y regulación de los aspectos del comportamiento humano [12] [13].

Figura 2. Diagrama organizacional de los conopéptidos.



Fuente: Conus Venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides [11]

1.1.3 Conotoxinas como agentes terapéuticos. La biblioteca de conopeptidos es amplia y presenta un potencial terapéutico ilimitado. En la actualidad se están estudiando y sintetizando varios de estos péptidos como agonistas o antagonistas de diferentes canales iónicos empleando síntesis en fase sólida por la metodología Fmoc. Algunos ejemplos de conopeptidos sintetizados aplicados en farmacología se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos conotoxinas sintéticas con potencial farmacéutico

Péptido	Nombre farmacológico	Especie	Blanco molecular	Enfermedad	Estado clínico	Ref.
ω -conotoxina MVIIA	Ziconotide o Prialt	Conus magnus	Canales de calcio Cav2.2	Dolor neuropático	Aprobado por la FDA y EMA	[14][15]
ω -conotoxina CVID	Leconotide o AM-336	Conus catus	Canales de calcio Cav2.2	Dolor neuropático	Fase preclínica	[16]
χ -conotoxina MrIA	Xen 2174	Conus marmoreus	Transportador de norepinefrina	Dolor neuropático	Fase clínica I	[17]
μ -conotoxina MrVIB	CGX-1002		Canales de sodio Nav1.8	Dolor neuropático	Fase preclínica	[18]
α -conotoxina Vc1.1	SNX-111	Conus victoriae	Receptores de acetilcolina de tipo nicotínico	Dolor neuropático	Fase clínica I	[19][20]
Contulakina-G	CGX-1160	Conus geographus	Receptor de neurotensina	Dolor neuropático	Fase clínica I	[21]
	CGX-1007		Receptor NMDA (NR2B)	Epilepsia	Fase clínica II	[21]
ρ -conotoxina TIA	---	Conus tulipa	Receptor adrenérgico	Antinociceptivo	Fase preclínica	[22]
Conantokina-T	CGX-100		Receptor NMDA (NR2A y NR2B)	Antinociceptivo	Fase clínica II	[23]
μ -conotoxina SIIIA	PEG-SIIIA	Conus striatus	Canales de sodio	Dolor inflamatorio	Fase clínica I	[24]

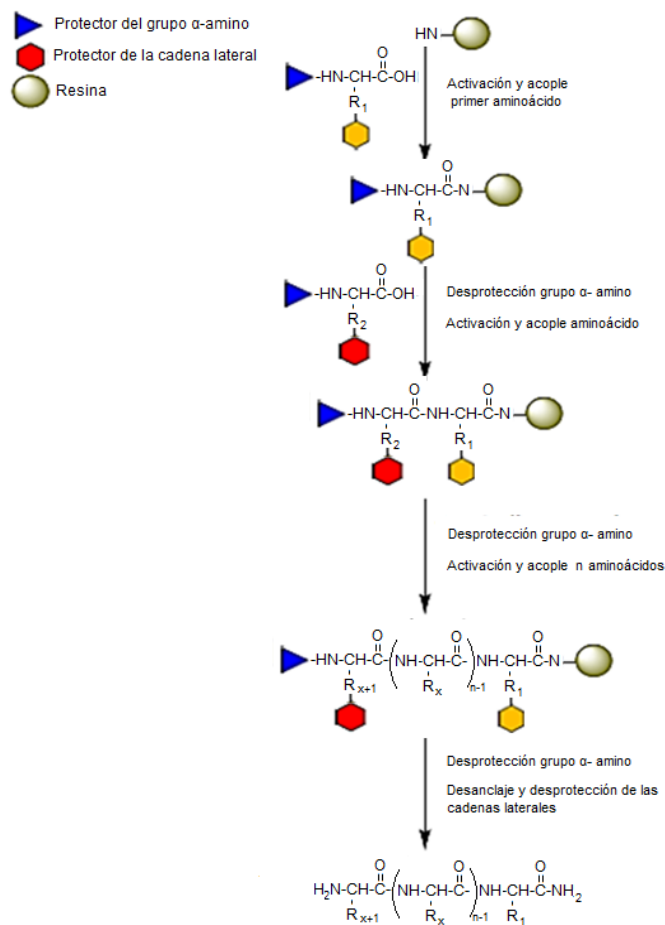
Aunque la aplicación de las conotoxinas en farmacéutica no ha sido extensa, la literatura científica actual ha demostrado que tienen un alto potencial como tratamiento para ciertas enfermedades neurodegenerativas o como analgésicos. Estas aplicaciones surgieron con el conocimiento de la afinidad y especificidad de varias toxinas por canales iónicos específicos o receptores que se observan en la tabla 1, estos blancos moleculares están involucrados en el desarrollo de este tipo de patologías.

1.2 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SOLIDA (SPPS)

La SPPS es actualmente el procedimiento más implementado en la síntesis de péptidos a nivel mundial. Este método permite incorporar aminoácidos no proteicos, modificar el esqueleto peptídico, siendo favorable para diversos estudios, especialmente farmacología. Adicionalmente se obtienen menos impurezas ya que permite eliminar los excesos de reactivos. La cadena peptídica se sintetiza sobre un soporte polimérico insoluble o resina por la unión del aminoácido C-terminal o un conector al que se le unirá el primer aminoácido. En el caso de los aminoácidos trifuncionales, las cadenas laterales están protegidas para evitar polimerizaciones o reacciones no deseadas con dichas cadenas. Estos grupos protectores dependen del tipo de grupo funcional del aminoácido y del tipo de estrategia que se emplee para la síntesis. El crecimiento de la cadena tiene lugar desde el extremo carboxilo hacia el extremo amino del péptido, durante el proceso de síntesis se sigue un patrón general de ciclos repetitivos de acoplamiento-lavado-desprotección-lavado hasta obtener la secuencia aminoacídica deseada. (Ver Esquema 1). Una vez sintetizada la cadena peptídica, ésta se separa del soporte polimérico y se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos, habitualmente en una única etapa [25-27].

Existen dos estrategias para la síntesis de péptidos en fase sólida, la estrategia propuesta por Merrifield llamada Boc/Bzl [28] y la estrategia propuesta por Sheppard conocida como Fmoc/tBu [29]. La estrategia Boc/Bzl utiliza el grupo tert-butoxicarbonil (Boc) como protector de los grupos α -amino y grupos del tipo benzil (Bzl) como protector de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales. La estrategia Fmoc/tBu emplea el grupo 9-fluorometoxicarbonil (Fmoc) como protector temporal del grupo α -amino y grupos del tipo tert-butil (tBu) para proteger las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales [30].

Esquema 1. Esquema general de la síntesis en fase sólida.



Fuente: Diseño y síntesis de péptido para el diagnóstico de la infección por el virus de la Hepatitis G [30]

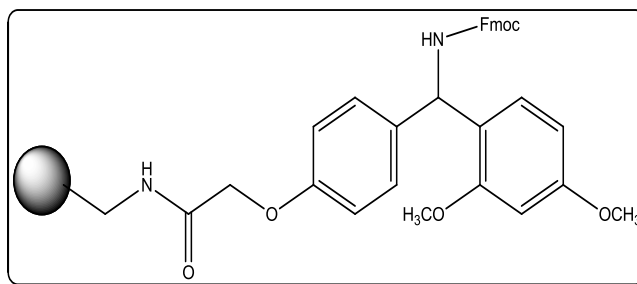
1.3 SOPORTE SÓLIDO EN SPPS

La idea central de SPPS es el anclaje de una cadena peptídica en crecimiento a un soporte sólido o resina polimérica. Este soporte debe presentar características específicas para considerarse eficiente y adecuado para esta síntesis, entre ellas [27] [31]:

- Tener una forma y tamaño que permita la manipulación y filtración rápida de líquidos. Adicionalmente debe ser físicamente estable.
- Ser inerte a reactivos, solventes y a gran variedad de condiciones de reacción (temperatura, presión, etc.) empleados durante la síntesis.
- Presentar amplio hinchamiento con el solvente usado para favorecer la interacción entre resina-aminoácido.
- Ser fácilmente modificado para permitir la unión covalente con el primer aminoácido.

Entre estos soportes sólidos se encuentra la resina Rink amida AM, la cual es de las más usadas actualmente. Es compatible con la estrategia de síntesis Fmoc/tBu por lo cual ésta resina presenta un grupo protector Fmoc (Ver Figura 3). Es una resina lábil en medio ácido ampliamente utilizado para preparar péptidos amidados. Presenta un entrecruzamiento de 1% de divinilbenceno (DVB), con perlas de diámetro entre 50 y 150 micrómetro [32].

Figura 3. Resina Rink Amida.

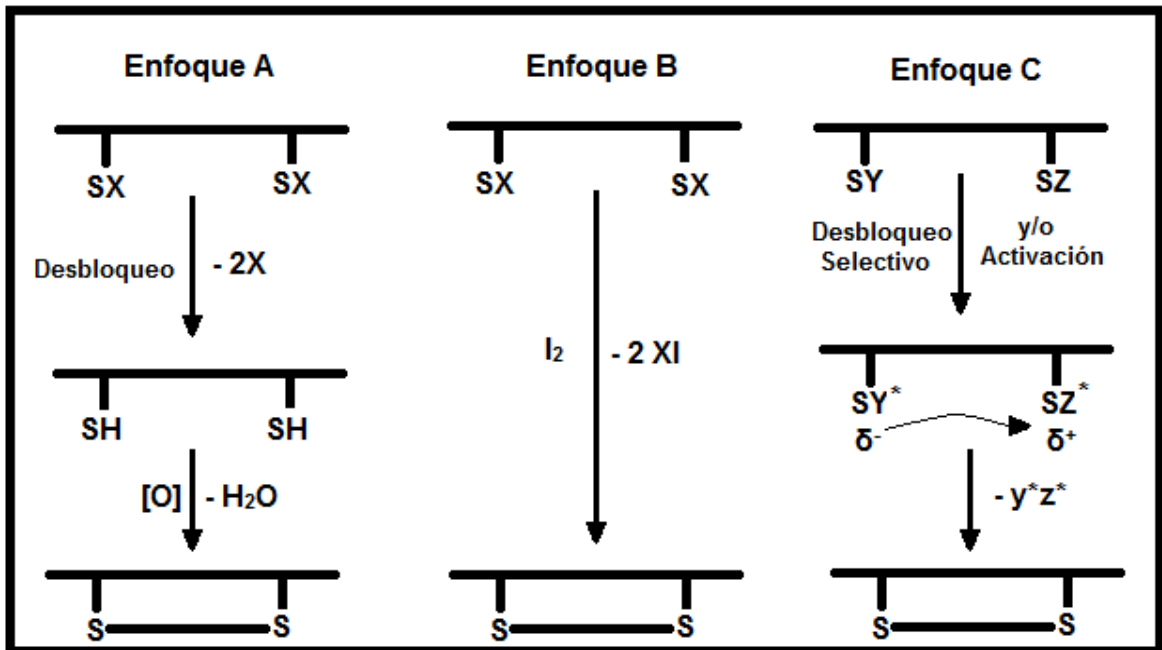


1.4 FORMACIÓN DE ENLACES DISULFURO

Los enlaces disulfuro en péptidos juegan un papel importante en el plegamiento y estabilización estructural de los péptidos y proteínas. Debido a su importancia, muchos estudios se han centrado en el papel de los enlaces disulfuro para la creación de restricciones conformacionales que puedan aumentar la actividad biológica o conferir termo-estabilidad. La síntesis química de un péptido o una proteína que contiene uno o más enlaces disulfuro, requiere como etapa final, la formación de estos enlaces. El éxito de una adecuada formación de enlaces disulfuro dependerá de la elección apropiada de los grupos de protección de las cisteínas y de las condiciones de desbloqueo correspondientes [33] [34].

Para la formación del enlace disulfuro se han estudiado tres enfoques diferentes (Ver Figura 4).

Figura 4. Enfoques de formación de enlaces disulfuro.



Fuente: Formation of disulfide bonds in synthetic peptides and proteins. [35]

En el mecanismo A, los dos residuos de cisteína tienen el mismo grupo protector, que se elimina para dar la forma de ditiol del péptido. La oxidación por el oxígeno molecular u otros reactivos apropiados facilita la formación del enlace disulfuro intramolecular. Este enlace también puede ser establecido desde el ditiol en presencia de mezclas redox, que catalizan reacciones de intercambio de tiol-disulfuro. En el mecanismo B, los grupos protectores de cisteína se eliminan por oxidación con yodo, o mediante reactivos electrófilos alternativos, para proporcionar el enlace disulfuro de manera directa. Por último, el mecanismo C químicamente más exigente, requiere dos grupos protectores de cisteína diferentes que se pueden escindir selectivamente y activar diferencialmente; una reacción de desplazamiento posterior da como resultado el enlace disulfuro. [35] [36].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los trastornos neurológicos son frecuentes en la actualidad, convirtiéndose en un eje central de investigación farmacológica [37-39]. Con el fin de buscar soluciones viables a gran cantidad de enfermedades neurológicas a principio de la década de los 70 se iniciaron estudios usando venenos de caracoles, los cuales pueden contener hasta 100.000 péptidos con actividad biológica [40]. El Dr. Alan Kohn, fue uno de los primeros interesados en dichos estudios, reconoció que los venenos de estos caracoles pueden poseer componentes terapéuticos [41]. Por su parte, el Dr. Robert Endean y colaboradores en Australia demostraron que el veneno de las diferentes especies de caracol como contenía una diversidad de componentes biológicamente activos. El Dr. Baldomero Olivera y compañeros de trabajo en la Universidad de Utah se convirtieron en los innovadores principales de técnicas exitosas de laboratorio para el estudio de los componentes del veneno extraído de los caracoles como [42]. Entre estos péptidos se encuentran las conopresinas, estos conopéptidos son agonistas de la oxitocina o vasopresina. La especificidad de estos péptidos es uno de los atributos que los hacen valiosas herramientas de diagnóstico en la caracterización de los caminos nerviosos y como agentes terapéuticos en la medicina. El número de péptidos activos dentro de las numerosas especies de *Conus* se considera que es enorme. Sin embargo, la extracción de estos péptidos del veneno se torna compleja [43].

Este proyecto de investigación se llevó a cabo con el fin de generar un aporte en la obtención del péptido *Conopresina textile* de forma sintética para posibles usos como neurofármaco. Adicionalmente se monitoreó el proceso de síntesis de péptidos en fase solida por la metodología Fmoc por medio de las técnicas instrumentales MALDI-TOF y RP-HPLC.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Sintetizar y monitorear el péptido conopresina con secuencia aminoacídica CFIRN CPP presente en el veneno de *Conus textile* por medio de la técnica analítica espectrometría de masas MALDI-TOF.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.

- Obtener el péptido *Conopresina textile* con secuencia aminoacídica CFIRN CPP por medio de síntesis en fase sólida por una metodología Fmoc.
- Determinar el método de formación de enlace disulfuro más adecuado para el péptido conopresina textile.
- Monitorear la síntesis del péptido Conopresina textile por medio de la técnica analítica MALDI-TOF.

4. SECCIÓN EXPERIMENTAL

4.1 SÍNTESIS DEL PÉPTIDO LINEAL.

Se llevó a cabo una síntesis peptídica en fase sólida, empleando una metodología Fmoc, es decir, el 9-fluorenilmetoxicarbonilo como grupo protector de los aminoácidos. Se utilizaron 2 jeringas de 10 mL como reactores. Como soporte sólido polimérico se usaron 100 mg de la resina Rink amida AM que presentaba un grado de sustitución de 0,56 mmol/g, la cual se activó por medio del procedimiento que se muestra en la sección 4.1.1. Los disolventes utilizados para la síntesis fueron Diclorometano (DCM), Dimetilformamida (DMF) y alcohol isopropílico (IPA). Se incorporaron las cisteínas presentes en el péptido protegidas con el grupo tritilo (trt). Se realizó la activación de los aminoácidos con N,N-diisopropil-etilendiamina(DIPEA) y 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU). Para la remoción del grupo protector Fmoc se empleó piperidina en DMF al 5%. Las reacciones de acople de las cadenas peptídicas se realizaron siguiendo el procedimiento desarrollado por Albericio y Barany [44]. Éste método garantiza un tiempo de reacción adecuado para favorecer la reacción entre el éster del aminoácido activado y el nuevo amino libre. Para comprobar el avance de cada acople se realizaron el test de azul de bromofenol, test de cloranilo y el test de káiser antes y después de cada acople [45].

4.2 ACTIVACIÓN DE LA RESINA.

La resina se activó mediante el protocolo descrito en la Tabla 2. En ella se muestra los solventes que se implementaron y la función que cumplen durante la

activación. Estos solventes permiten el aumento de volumen de la resina. En solventes apolares como el DCM la resina sufre un hinchamiento mayor que en solventes apróticos como el DMF. Por otro lado, en presencia de solventes próticos como el alcohol isopropílico (IPA) sufre una reducción de su volumen. Estas características se emplean para la eliminación de excesos de reactivos utilizados durante el proceso de síntesis.

Tabla 2. Activación de la resina Rink Amide AM.

FASE	REACTIVO	CARACTERÍSTICAS DEL REACTIVO	FUNCIÓN	TIEMPO DE AGITACIÓN
1	Dimetilformamida (DMF)	Solvente aprótico	Hinchar resina moderadamente	2 x 15 min
2	Piperidina /DMF 5%	Genera condiciones básicas	Desproteger resina removiendo grupo Fmoc	2 x 30 min
3	Dimetilformamida (DMF)	Solvente aprótico	Lavado (Hinchar resina moderadamente)	5 x 1 min
4	Alcohol Isopropilico (IPA)	Solvente polar prótico	Lavado (Encojer resina)	1 x 1 min
5	Diclorometano (DCM)	Solvente aprótico	Lavado (Hinchar resina)	2 x 1 min

4.3 ACOPLE DE AMINOÁCIDOS

La activación de los aminoácidos se realizó empleando siete excesos del aminoácido a acoplar, los respectivos pesos empleados se muestran en la Tabla 3. La mezcla de reacción se elaboró adicionando al aminoácido 125,87 mg de TBTU, 2 mL de DMF y 273,13 μ L de DIPEA; posteriormente, se dejó en agitación por 15 minutos. Esta solución presenta una coloración amarilla como se observa

en la Figura 5. Se succionó el aminoácido activado en el reactor y se dejó en agitación suave durante dos horas.

Tabla 3. Pesos calculados para 7 excesos de aminoácido.

Aminoácido	Símbolo	P.M.	7 excesos de aminoácido (mg)
Prolina	P	337,4	132,26
Cisteína	C (trt)	585,7	229,59
Asparagina	N (trt)	596,7	233,91
Arginina	R (Pbf)	684,8	254,32
Isoleucina	I	353,4	138,53
Fenilalanina	F	387,4	151,86

Una vez culminadas las dos horas se drenó el reactor y se realizaron tres lavados con DMF, uno con IPA y tres con DCM cada uno de un minuto. Posterior al lavado se realizaron las pruebas cualitativas de aminas libres, se realizó el test de azul de bromofenol, test de ninhidrina y test de káiser.

Figura 5. Aminoácido activado.



4.4 ACETILACIÓN

La acetilación se realizó después del acople del primer aminoácido a la resina con el fin de bloquear las aminas libres de la resina. La peptidil-resina se puso en agitación con 1,5 mL de una solución de 15% anhídrido acético, 40% DMF, 40 % DCM y 5 % DIPEA durante 30 minutos. Finalizado el tiempo se realizaron tres lavados con DMF y tres lavados con DCM de dos minutos cada uno.

4.5 PRUEBAS CUALITATIVAS.

- **Test de Kaiser o prueba de Ninhidrina [45]**

Esta prueba permite identificar las aminas primarias libres, lo que ayuda a identificar si se realizó un acople completo. Para realizar este test se prepararon dos soluciones:

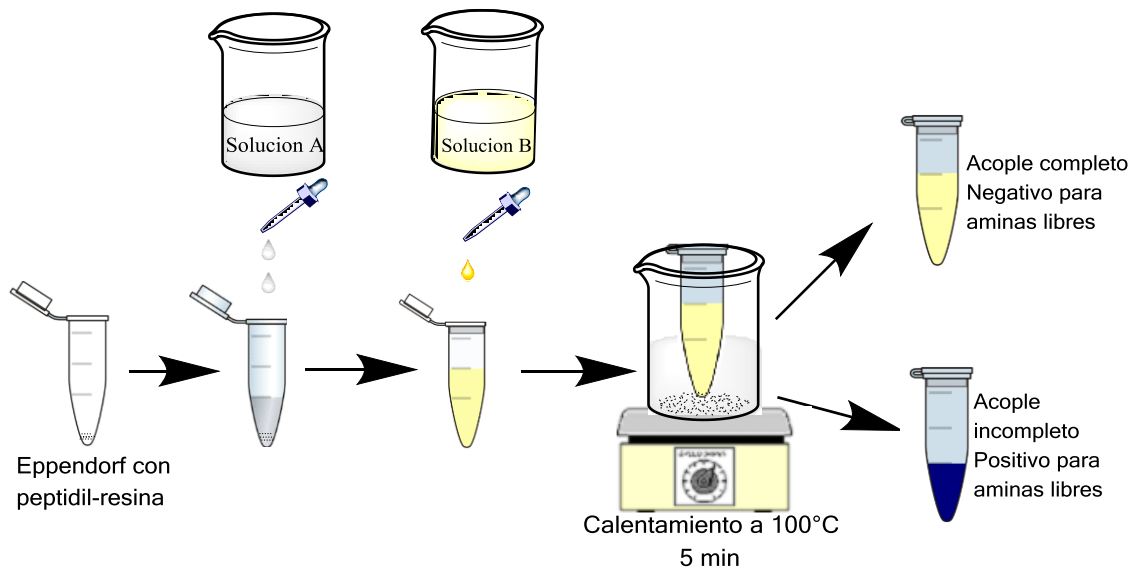
Solución A: Se disolvieron 32,5 g de KCN en 50 mL de agua desionizada, se tomó 0,250 mL de esta solución y se le adicionaron 12,5 mL de piperidina. En un frasco ámbar aparte se disolvió 40 g de fenol en 10 mL de etanol. Se mezclaron las soluciones de KCN/piperidina y la solución de fenol en proporciones de 10:1 respectivamente, se agitó y se almaceno en la oscuridad.

Solución B: Se disolvió 1,25 g de ninhidrina en 25 mL de etanol.

Después de cada acople realizado se tomó una pequeña cantidad de muestra peptidil-resina y se colocó en un eppendorf de 1 mL, se agregaron dos gotas de la solución A y una gota de la solución B. Se calentó la mezcla por cinco minutos a aproximadamente 100°C. Se observó la coloración, según la cual si la solución es incolora o amarilla se corrobora que se realizó un acople completo y no hay

presencia de aminas primarias libres, por el contrario si se presenta una coloración azul no hay un acople adecuado. (Ver Figura 6).

Figura 6. Test de Káiser o Prueba de Ninhidrina

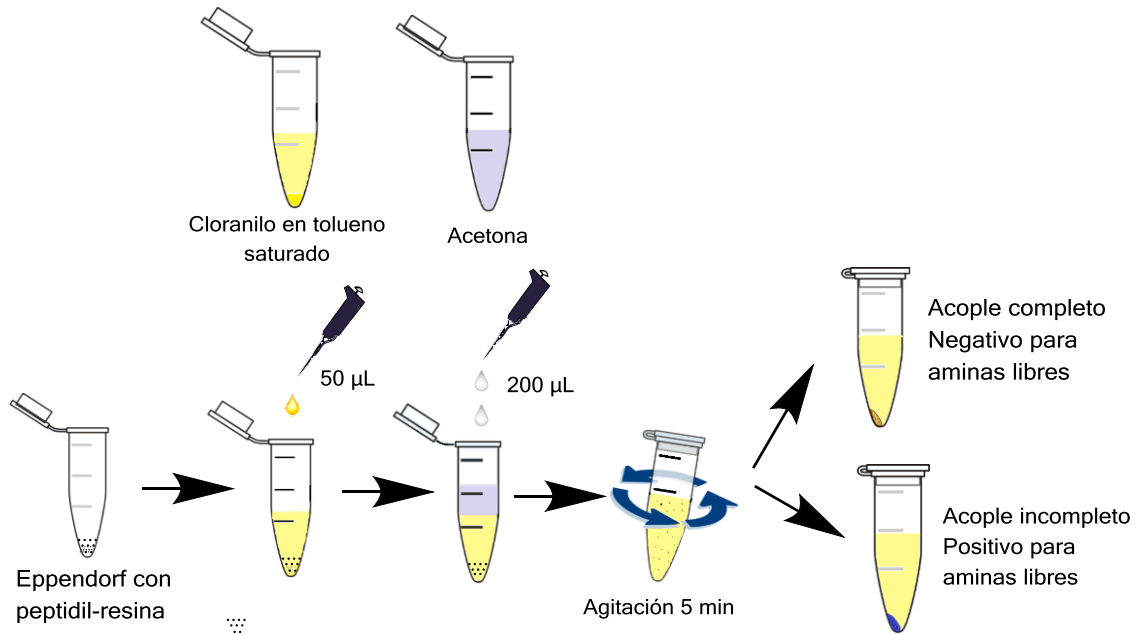


- **Test de cloranilo [46]**

Esta prueba permite evaluar acoplamientos sobre aminas secundarias como el grupo amino de la prolina.

Durante y después de cada acople de prolina se tomó una pequeña cantidad de muestra peptidil-resina y se colocó en un eppendorf de 1 mL, se agregó 50 μ L de cloranilo en tolueno saturado y 200 μ L de acetona. Se agitó la mezcla por cinco minutos a temperatura ambiente. Se observó la coloración, según la cual si la solución o las perlas de resina son amarillo/marrón se corrobora que se realizó un acople completo y no hay presencia de aminas libres, por el contrario si se presenta una coloración azul/verdosa oscura no hay un acople adecuado. (Ver Figura 7).

Figura 7. Test de cloranilo

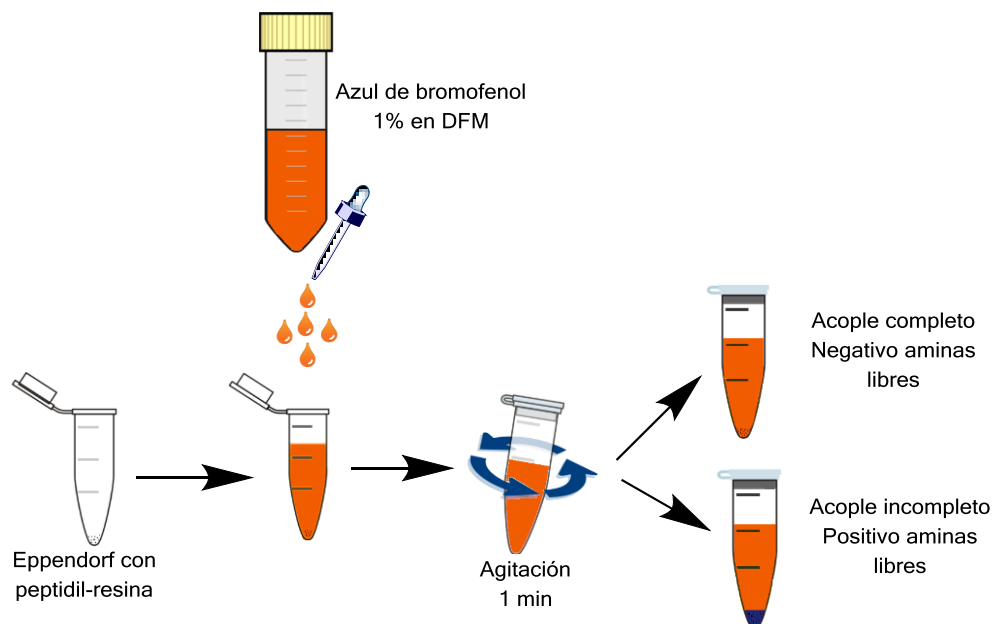


- **Test azul de Bromofenol.**

Este test permite identificar aminas primarias libres y por ende permite comprobar un adecuado acoplamiento de los aminoácidos.

Se tomó una pequeña cantidad de muestra peptidil-resina en un eppendorf de 1 mL y se le adicionaron cinco gotas de una solución de azul de bromofenol al 1% en DMF. Se agitó por un minuto y se observó la coloración de las perlas de resina. Si las perlas presentan una coloración transparente el acople fue completo, si por el contrario las perlas presentan una coloración azul, hay aminas libres y el aminoácido no acopló. (Ver Figura 8)

Figura 8. Test de azul de bromofenol.



4.6 DES-ANCLAJE DEL PÉPTIDO DE LA RESINA.

Se pesaron 50 mg de péptido-resina en un reactor de 100 mL, se adicionó 1 mL de solución de clivaje (92,5% TFA, 2,5% TIPS, 2,5% EDT o DOTA y 2,5% de agua desionizada), se tapó el reactor y se dejó en agitación suave durante dos horas. Culminadas el tiempo se pasó la solución a un tubo de centrifuga de 15 mL y se agregó 8 mL de dietil éter frío. La muestra se centrifugó y se separaron la fase sólida y la fase líquida. El péptido en estado sólido se almacenó a -20°C. [47]

4.7 LIOFILIZACIÓN

La liofilización del péptido se llevó a cabo en un equipo LABCONCO modelo 79340, donde se empleó una temperatura de -90°C en la cámara de enfriamiento y una presión de 0,040 mBar. Las muestras se congelaron previamente en una nevera de -20°C y se dejaron 24 horas en el equipo.

4.8 OXIDACIÓN DEL PÉPTIDO (FORMACIÓN ENLACE DISULFURO)

Una vez sintetizado el péptido lineal deseado se procedió con la formación del enlace disulfuro. Se probaron cuatro métodos diferentes entre ellos:

- **Oxidación con DMSO a pH ácido [49]:**

Se disolvió el péptido en una solución 5% AcOH/agua hasta obtener una concentración de 2 mg/mL. Se ajustó el pH a 6 con carbonato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Posteriormente se adicionó DMSO (15% vol) y se dejó en agitación 12 horas.

- **Oxidación con DMSO a pH básico[49]:**

La oxidación se realizó disolviendo el péptido en una solución buffer fosfato a pH 7,5 hasta obtener una solución de 1mg/mL. Se adicionó 1% de DMSO y se dejó en agitación durante siete horas a 25°C .

- **Oxidación con yodo en resina [48]:**

Se añadió DMF a la péptidil-resina (1 mL). Posteriormente se adicionaron 9 mL de una solución de yodo en DCM 0,013M. Se agitó durante cinco minutos y se adicionó 2 mL de una solución 0,065M de ácido ascórbico en buffer citrato (pH

5). Finalmente se agregó 2 mL de agua desionizada para diluir y se dejó en agitación durante dos horas a 0°C.

4.9 MONITOREO Y CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO POR MALDI-TOF MS.

A partir del quinto acople se tomaron espectros de masas MALDI-TOF de cada acople con el fin de corroborar que la síntesis se estaba llevando a cabo de forma adecuada. Adicionalmente se tomaron espectros MALDI-TOF de cada método de la formación de enlaces disulfuro para determinar el más apropiado para el péptido.

Se diluyó 10µg aproximadamente de péptido en una solución ACN/agua en una proporción 1:1 con 0,1% de TFA. Se preparó la matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) sobresaturada en una solución ACN/agua con 0,1% de TFA. Se realizó la mezcla de la solución del péptido y la matriz en proporción 1:1 y se agitó por 5 minutos. Se depositó 1 µL en el porta muestra, se dejó secar a temperatura ambiente para su análisis posterior.

Para ésta medición se empleó un equipo ultraflex extreme Bruker, con una resolución de 40.000 FWHM, exactitud 1ppm, fluencia de laser de 30 y un rango de masas de 0 a 2500 Da en modo positivo.

4.10 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO POR RP-HPLC

Una vez sintetizado el péptido y realizada la formación del enlace disulfuro se realizó un análisis por RP-HPLC del péptido final. Se empleó un equipo Agilent

modelo 1100 con detector de arreglo de diodos DAD G1315B y una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 de 4,6 x 150 mm, 5 μ m. La longitud de onda de detección fue de 220 nm, el volumen de inyección de la muestra fue de 30 μ L y se empleó una velocidad de flujo de 0,6 μ L/min. Se utilizó acetonitrilo (ACN) y agua tipo MQ como fase móvil con un método de gradiente de 0-100% de ACN en 20 minutos. La muestra del péptido se preparó en agua tipo MQ.

5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A continuación se presentan los datos obtenidos durante el proceso de síntesis del péptido en fase sólida y su caracterización por MALDI-TOF MS. Las características del método de síntesis del péptido conopresina sintetizado de muestran en la Tabla 4.

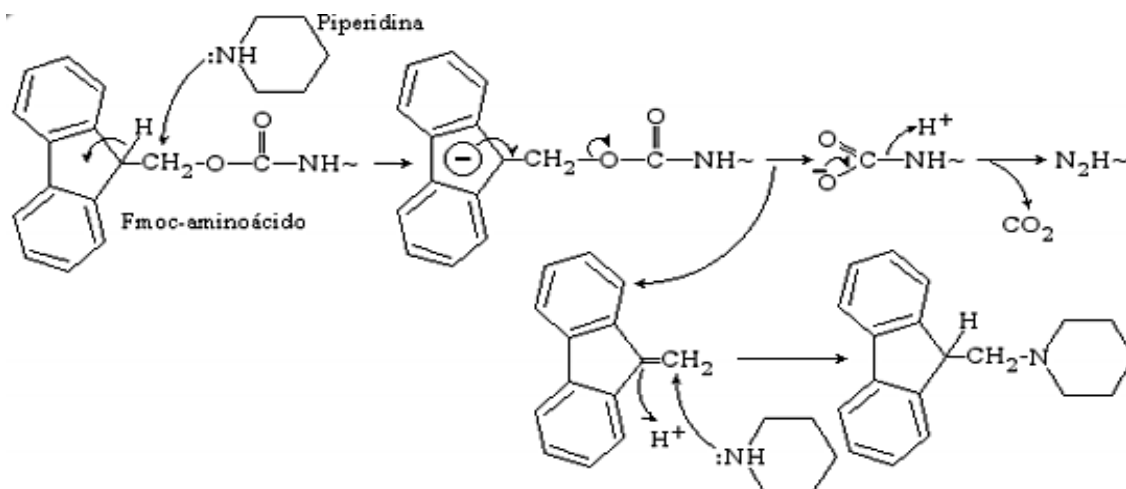
Tabla 4. Características del método de síntesis.

Secuencia	C	F	I	R	N	C	P	P
Orden de acoplamiento	8	7	6	5	4	3	2	1
Grupo protector de la cadena lateral	trt			Pbf	trt	Trt		

5.1 REACCIONES DEL PROCESO DE SÍNTESIS.

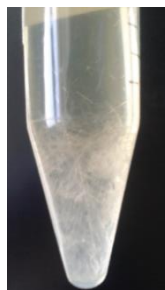
5.1.1 Remoción Fmoc con piperidina. El grupo Fmoc es muy estable en presencia de agentes ácidos, pero puede removerse fácilmente en ciertas condiciones básicas, se utilizó Piperidina al 5% en dimetilformamida (DMF) para desprotección de los aminoácidos Fmoc, mecanismo que es muy rápido a temperatura ambiente (Esquema 2). Este procedimiento no afecta a la mayoría de los grupos protectores, incluidos los grupos Z o Boc.

Esquema 2. Mecanismo de remoción de Fmoc con piperidina.[46]



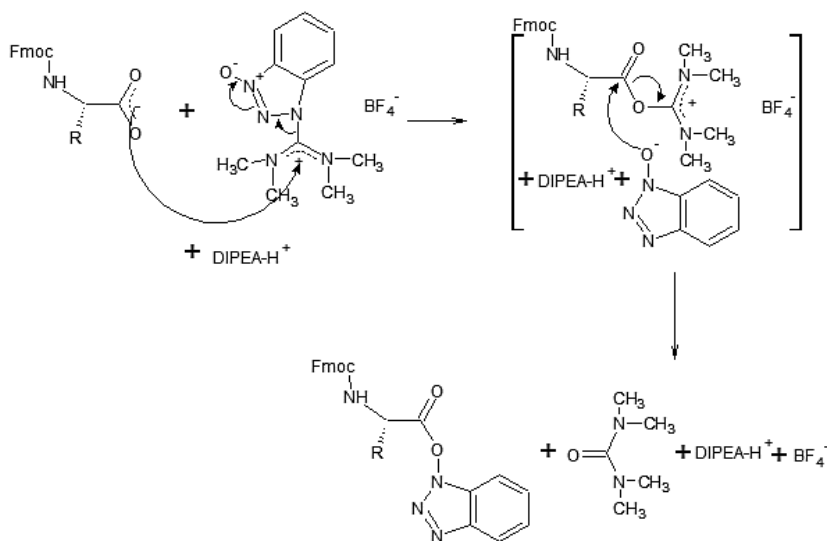
Esta reacción ocurre por medio de un mecanismo de eliminación E1cB (Eliminación base conjugada) en el cual el nucleófilo o base (Piperidina) abstrae el protón del sustrato generando un carbanión, el par de electrones libres de éste forman un enlace doble y se da la remoción del grupo saliente formando carbamato y divenzofulveno [50]. Posteriormente la piperidina realiza un ataque nucleofílico al divenzofulveno para finalmente obtener el aducto divenzofulveno-Piperidina que se puede observar en la *Figura 9*.

Figura 9. Aducto Fmoc-piperidina.



5.1.2 Activación de aminoácidos. Para la formación del enlace péptido es necesario activar primero el grupo carboxilo del aminoácido que se unirá a la resina. Hay dos tipos principales de activadores: las carbodiimidas y los triazoles. Los últimos avances han permitido eliminar totalmente las carbodiimidas. El éster activo es formado por sales de uronio o fosfonio, a partir del anión no nucleofílico (tetrafluoroborato o hexafluorofosfato): HBTU, HATU, HCTU, PyBOP. Durante la síntesis realizada en este trabajo se empleó el TBTU como activador de los aminoácidos y su mecanismo de muestra en el Esquema 3.

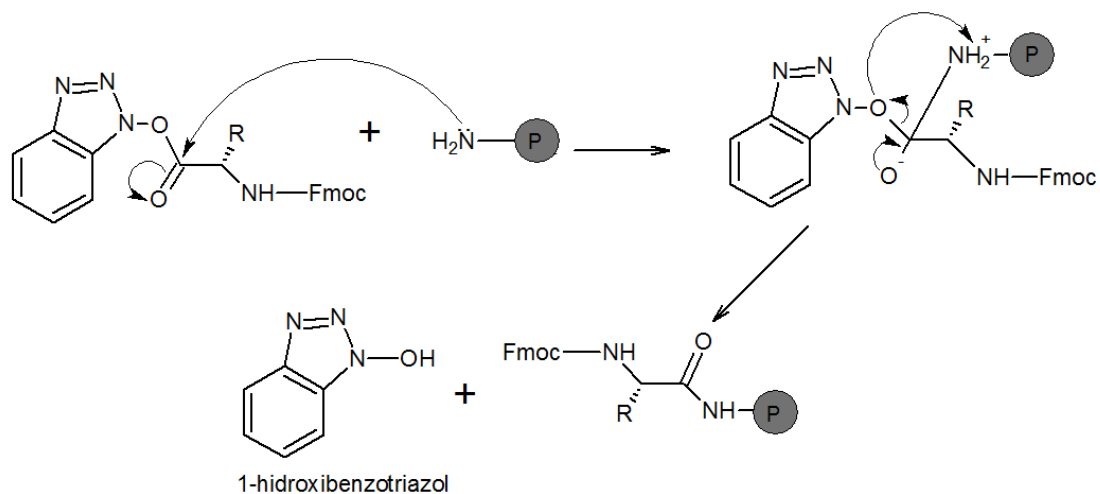
Esquema 3. Mecanismo de activación de aminoácidos con TBTU y DIPEA [51].



La reacción de activación de los aminoácidos se inicia con la desprotonación del ácido carboxílico por medio de la base (DIPEA). El anión carboxilato resultante ataca al carbono electro-deficiente del TBTU. El anión resultante HOAt reacciona con el ácido carboxílico activado recién formado. Finalmente la amina reacciona con el éster activado para formar la amida [52].

5.1.3 Reacción de acoplamiento. Una vez activado el aminoácido se procedió con la formación del enlace peptidil-resina o peptídico. (Ver Esquema 4)

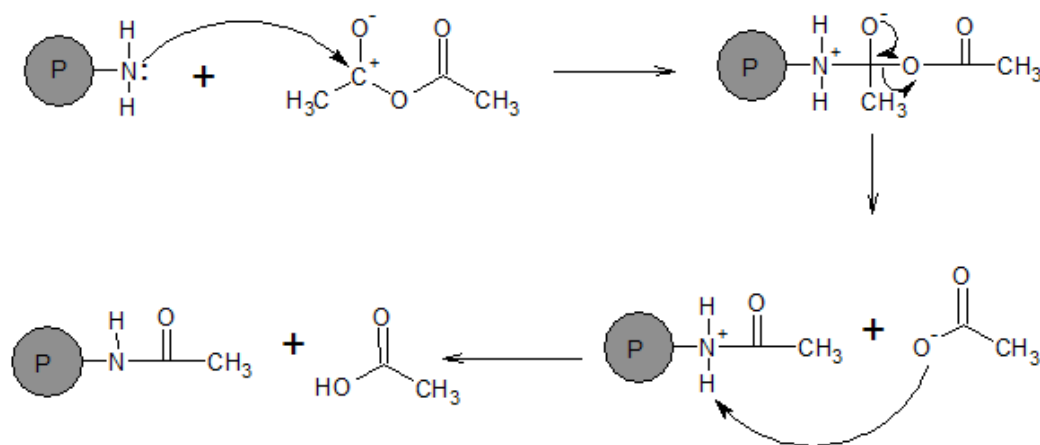
Esquema 4. Mecanismo de formación de enlace peptidil-resina. [46]



La formación del enlace peptidil-resina y del enlace peptídico ocurre con el ataque nucleofílico del nitrógeno de la amina al carbono electrofílico del éster lo que genera un movimiento de cargas y un intermediario de reacción. Cuando las cargas se reordenan forman un enlace amida y se libera el 1-hidroxibenzotriazol.

5.1.4 Acetilación de la peptidil-resina. La acetilación se emplea con el fin de proteger los grupos aminos que quedaron libres en la resina posterior a la unión del primer aminoácido de la síntesis. Se empleó un método con anhídrido acético el cual ha demostrado ser eficiente y el mecanismo de muestra en el Esquema 5.

Esquema 5. Mecanismo de acetilación de la peptidil-resina.



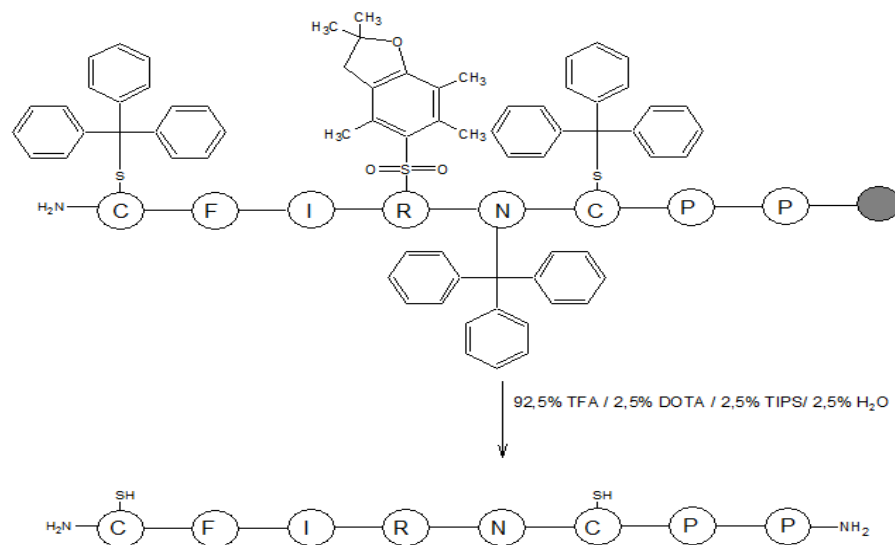
La acetilación de una amina es una reacción ácido base en la que el grupo amino básico efectúa un ataque nucleófilo sobre el carbono carbonílico que es el centro ácido. [53]

5.1.5 Desanclaje y precipitación del péptido. La etapa de desanclaje se realiza mediante la adición de TFA (80%-97%) y compuestos que sean capaces de capturar y eliminar los grupos protectores de cadenas laterales denominados “scavengers”.

Dependiendo de la secuencia obtenida se escogen los “scavengers”. Mediante lavados con dietil éter al péptido, se realiza la remoción de las especies formadas entre los diferentes “scavengers” usados en el desanclaje y los grupos protectores

de las cadenas laterales, garantizando la remoción efectiva de especies no deseadas, con lo que se logra observar la precipitación de un sólido blanco que corresponde al péptido libre obtenido [54]. (Ver Figura 10)

Esquema 6. Desanclaje del péptido de la resina. [54]



En el Esquema 6 se observa la reacción de desanclaje y los scavengers o captadores que se emplearon. Se observa la cadena peptídica y sus respectivos grupos protectores.

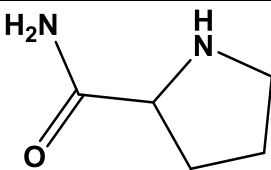
Figura 10. Péptido libre obtenido.

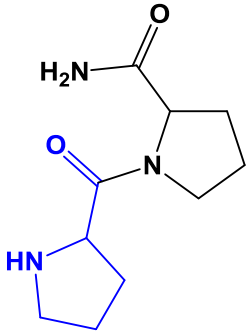
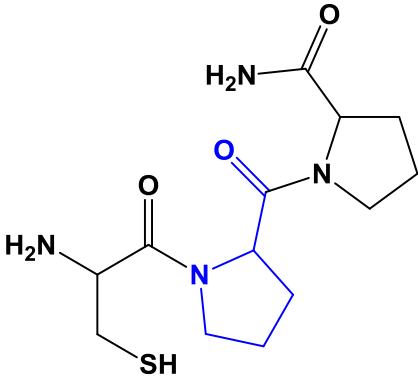
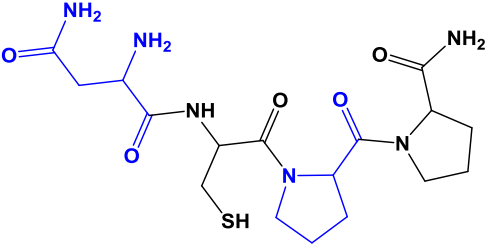
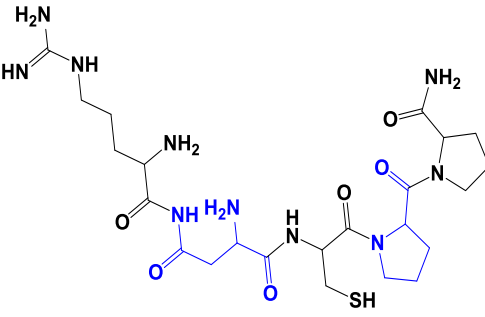


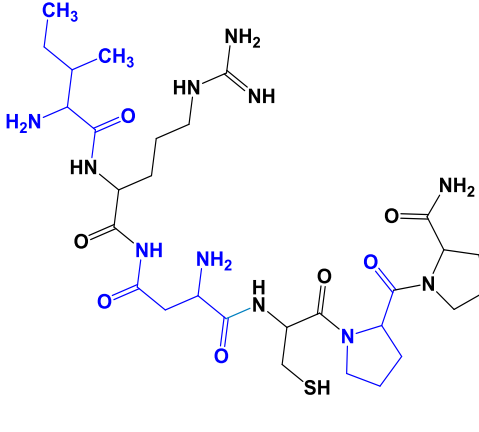
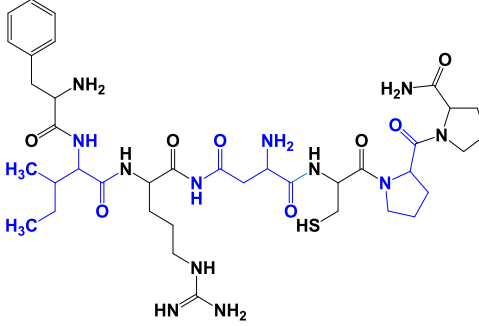
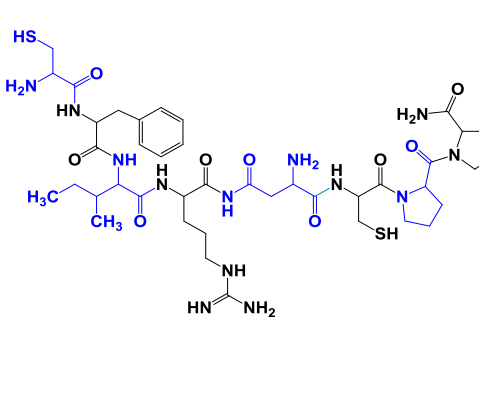
5.2 MONITOREO Y CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO POR MALDI-TOF MS.

Las síntesis de la conopresina fueron monitoreadas a partir del acople número 5 utilizando la técnica MALDI-TOF MS. Acoples anteriores no se pudieron analizar debido a que no se observó precipitación de los péptidos por su baja masa molecular. En la tabla 5 se observa la masa monoisotópica calculada con el programa Protein prospector v 5.16.0 [55] de cada acople amidado durante el proceso sintético.

Tabla 5. Pesos calculados de cada acople durante la síntesis del péptido conopresina.

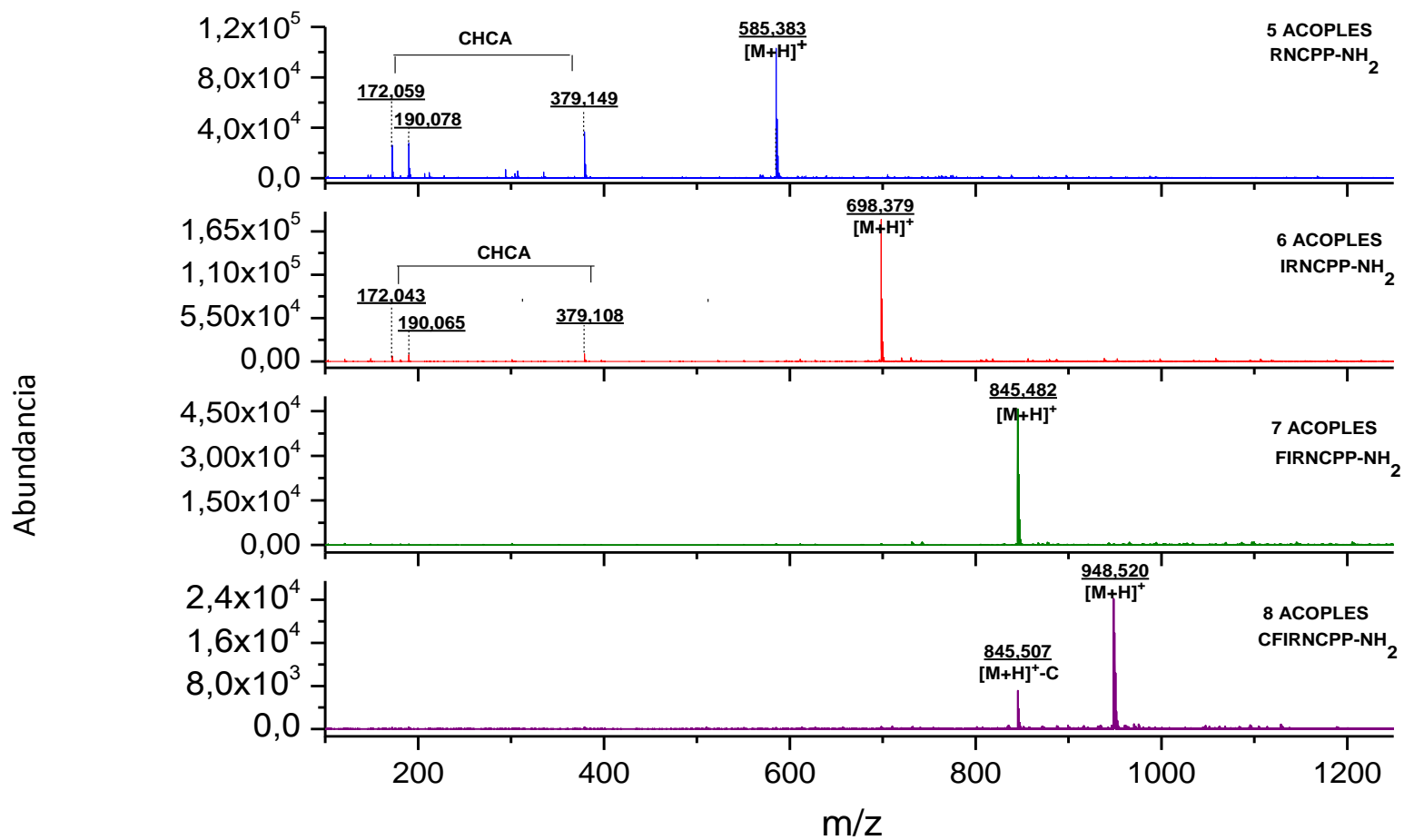
N° Acople	Secuencia		Formula química	Masa monoisotópica
1	P		C ₅ H ₁₀ N ₂ O	114.0793

N° Acople	Secuencia		Formula química	Masa monoisotópica
2	PP		C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₂	211.1320
3	CPP		C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₃ S	314.1412
4	NCPP		C ₁₇ H ₂₈ N ₆ O ₅ S	428.1841
5	RNCPP		C ₂₃ H ₄₀ N ₁₀ O ₆ S	584.2853

N° Acople	Secuencia		Formula química	Masa monoisotópica
6	IRNCP	 <p>The structure shows a peptide backbone with the following modifications: a dimethylamino group (CH₂CH(CH₃)₂) at the N-terminus, a guanidino group (NH-C(=NH)-NH₂) on the side chain, a primary amide (NH₂) on the side chain, a primary amide (NH₂) on the side chain, and a primary amide (NH₂) on the side chain.</p>	C ₂₉ H ₅₁ N ₁₁ O ₇ S	697.3693
7	FIRNCP	 <p>The structure shows a peptide backbone with the following modifications: a benzylamino group (CH₂CH₂Ph) at the N-terminus, a dimethylamino group (CH₂CH(CH₃)₂) on the side chain, a guanidino group (NH-C(=NH)-NH₂) on the side chain, a primary amide (NH₂) on the side chain, a primary amide (NH₂) on the side chain, and a primary amide (NH₂) on the side chain.</p>	C ₃₈ H ₆₀ N ₁₂ O ₈ S	844.4377
8	CFIRNCP	 <p>The structure shows a peptide backbone with the following modifications: a dimethylamino group (CH₂CH(CH₃)₂) at the N-terminus, a primary amide (NH₂) on the side chain, a primary amide (NH₂) on the side chain, a primary amide (NH₂) on the side chain, and a primary amide (NH₂) on the side chain.</p>	C ₄₁ H ₆₅ N ₁₃ O ₉ S ₂	947.4469

5.2.1 Síntesis 1. En la Figura 11 se observan los espectros MALDI-TOF MS obtenidos en modo positivo correspondientes al monitoreo de los acoples durante el proceso de síntesis 1 del péptido lineal en fase solida (SPPS) desde el pentapéptido hasta el polipéptido de 8 aminoácidos.

Figura 11. Espectros MALDI-TOF MS correspondiente al monitoreo de la síntesis del reactor N°1 péptido lineal con secuencia aminoacídica CFIRNCPP.

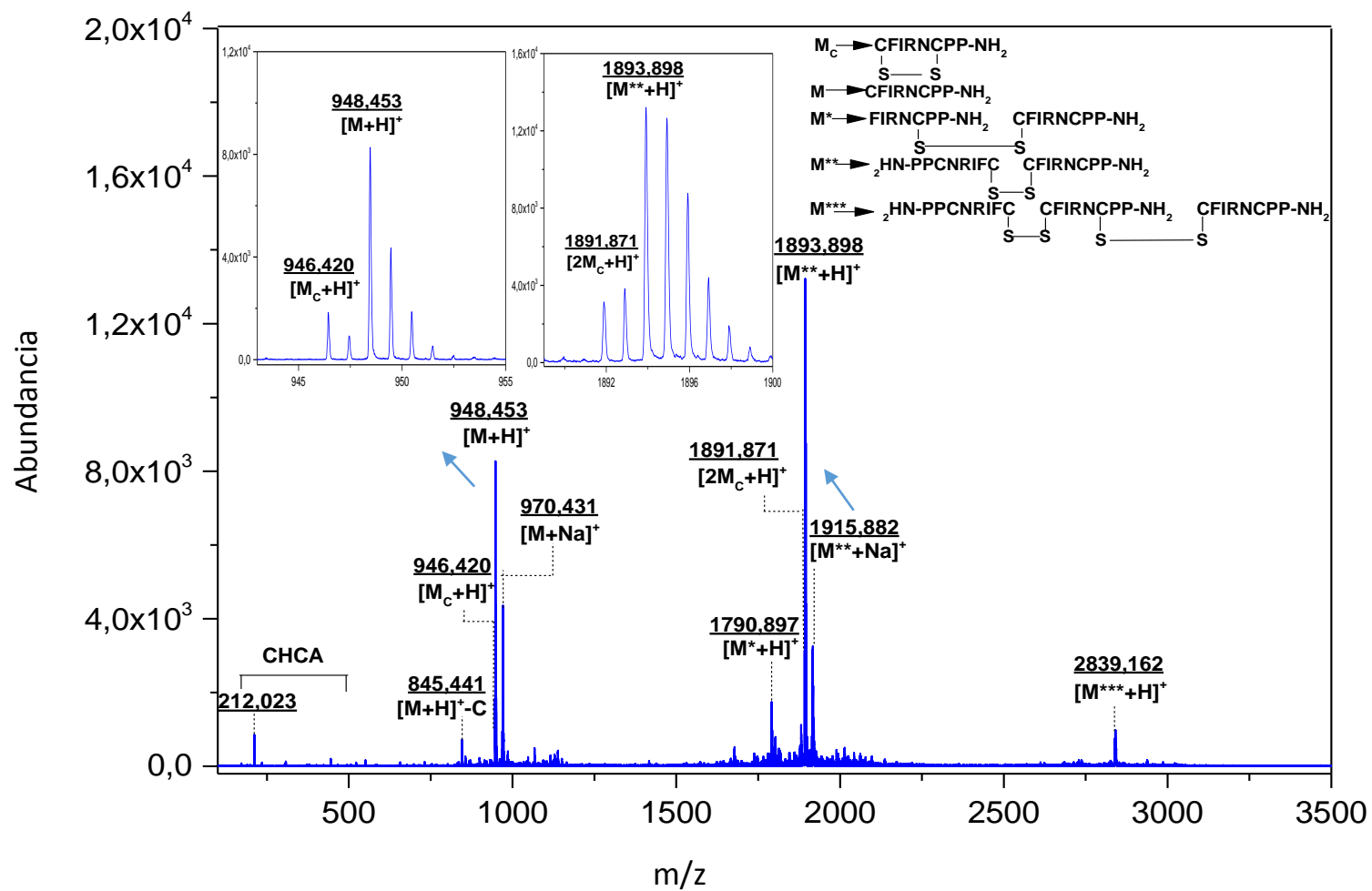


Las señales que se obtienen de la relación m/z por debajo de 500 corresponden a la matriz empleada como blanco CHCA (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico). En cada espectro la relación m/z concuerda con la del ion $[M+H]^+$ de cada acople comprobando que la síntesis se llevó a cabo de forma adecuada hasta el acople número 7. En el espectro de 5 acoples se observa la relación m/z del pentapéptido en 585,383, a los 6 acoples se obtiene una señal m/z de 698,379 y a los 7 acoples se obtiene una señal de m/z en 845,482. Sin embargo en el acople final de 8 aminoácidos que corresponde a la unión de una cisteína se observa en el espectro que se obtienen dos señales la del péptido lineal con m/z 948,520 y la correspondiente a la deleción de cisteína en m/z 845,507, es decir que la cisteína no se une por completo. Esta deleción se debe posiblemente al impedimento estérico generado por la fenilalanina al tener una cadena lateral de gran tamaño.

Una vez obtenido y analizado el péptido lineal se procedió a realizar la formación del enlace disulfuro entre las cisteínas. Se probaron 3 métodos diferentes con el fin de determinar el más eficiente y el que menos productos secundarios generara para facilitar la purificación y poder obtener mayor cantidad de péptido cíclico. Las metodologías utilizadas fueron: oxidación con DMSO a pH ácido, oxidación con DMSO a pH básico y oxidación con yodo en resina. A continuación se presentan los espectros de espectrometría de masas MALDI-TOF obtenidos y el análisis de las señales de los espectros de cada método.

En la figura 12 se muestra el espectro que se obtuvo de la formación del enlace disulfuro con DMSO a pH ácido. En este espectro se observan las señales de los aductos $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ del péptido lineal de 8 aminoácidos. Se observa nuevamente la señal del ion del péptido lineal con una deleción de cisteína $[M+H]^+-C$ y a su vez se observa una señal que corresponde a la formación de un enlace disulfuro entre el péptido con esta deleción y un péptido lineal de 8 aminoácidos nombrado como M^* .

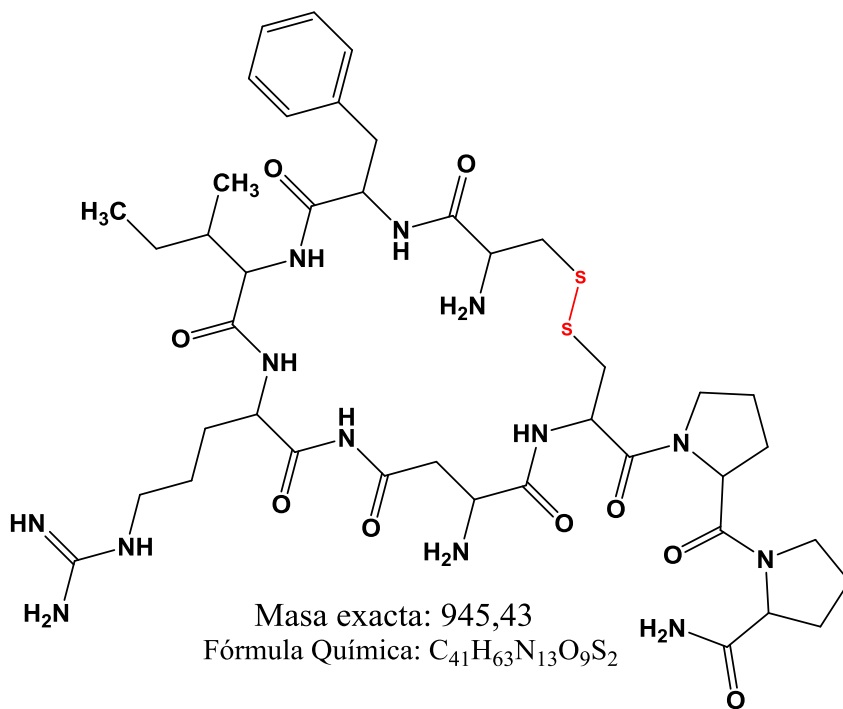
Figura 12. Espectro MALDI-TOF MS formación de enlace disulfuro por oxidación con DMSO a pH ácido.



Las señales de 1893,898 y 1915,883 corresponden a los aductos $[M^{**}+H]^+$ y $[M^{**}+Na]^+$ de la formación de un dímero generado por un enlace disulfuro y la señal en 2839,162 correspondiente a la formación del ion $[M^{***}+H]^+$ de un trímero generado por la formación de dos enlaces disulfuro entre tres péptidos lineales. La posición de la cisteína, en este caso, en el N-terminal favorece la formación de dímeros y trímeros ya que presenta menos impedimento para la formación de enlaces disulfuro con otros péptidos [56]. Estudios han demostrado que la propensión a formar dímeros disminuye al aumentar la distancia de la cisteína a los extremos N y C terminal [57].

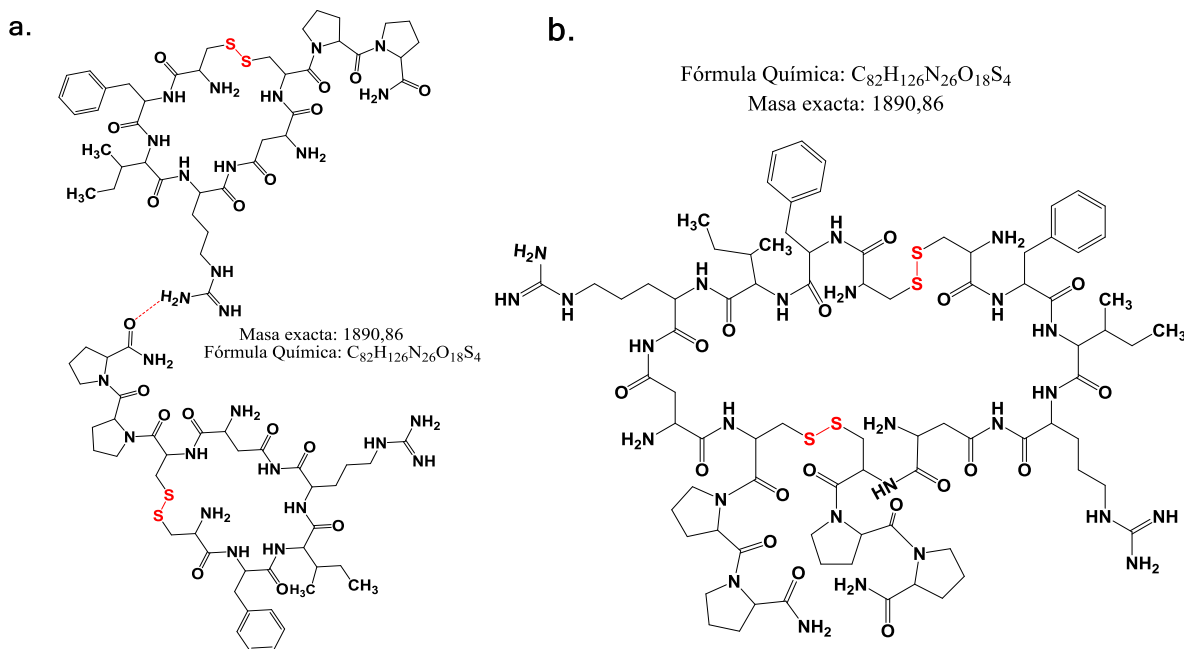
Adicionalmente aparecen las señales esperadas de los aductos característicos al péptido cíclico deseado nombrado como M_c en la relación m/z de $[M_c+H]^+$ en 946,420 (Ver Figura 13). Sin embargo, la conversión hacia el péptido cíclico no fue completa pues aun aparece la señal del péptido lineal.

Figura 13. M_c , Conopresina textil.



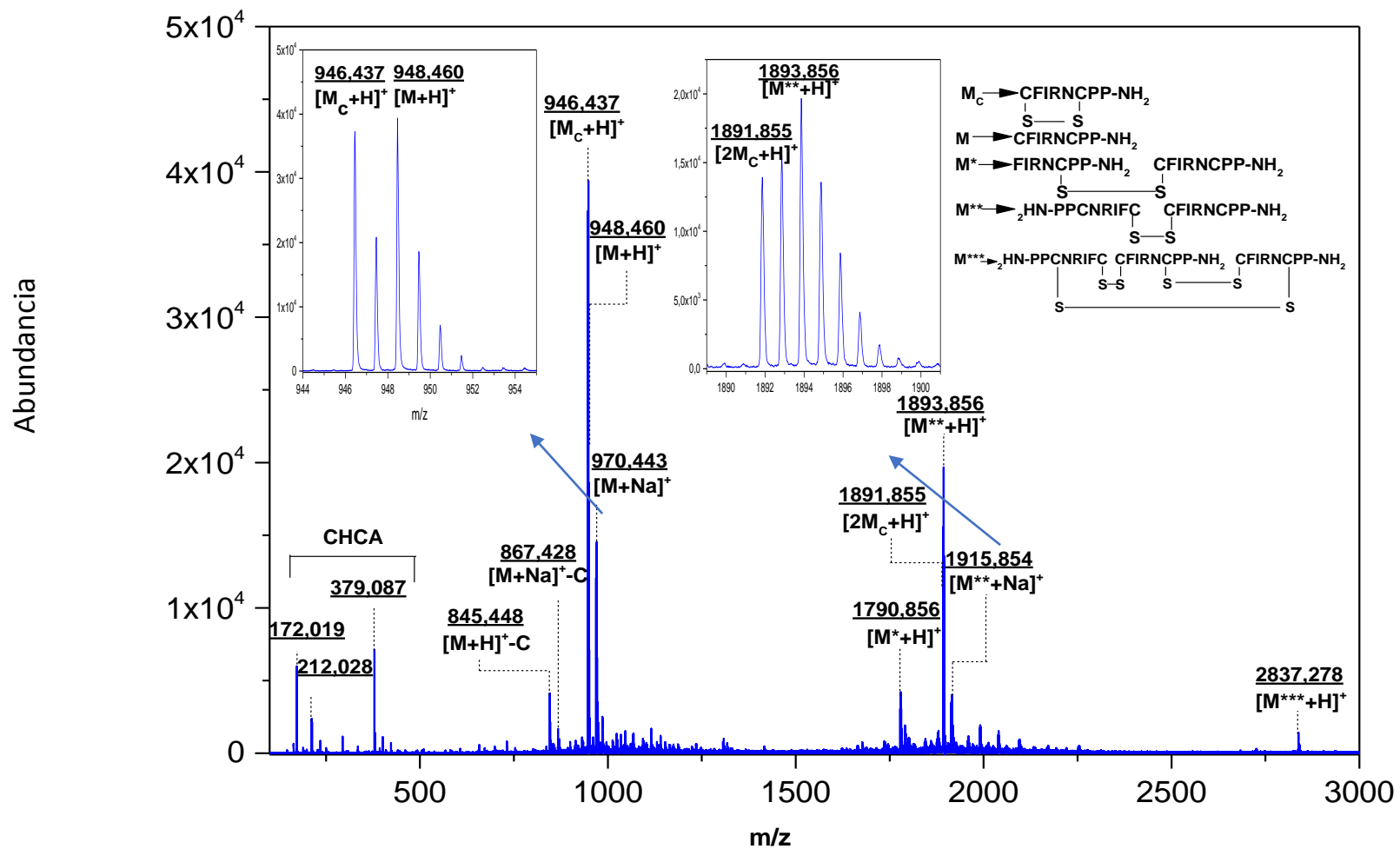
En el espectro de la figura 12 también se observa una señal m/z en 1891,871 esta señal puede corresponder a un dímero no covalente del péptido cíclico $[2M_c+H]^+$ formado por un puente de hidrogeno. Estudios realizados por Banerjee y Mazumdar de funcionalización selectiva mostraron que las cadenas laterales de aminoácidos con grupos amino ($-NH_2$) en este caso la arginina y la presencia de una amida C-terminal ($-CONH_2$) facilitan la dimerización en estado gaseoso a través de puentes de hidrógeno intermoleculares (Ver Figura 14.a.) [58]. Sin embargo, teniendo en cuenta la facilidad de formación de enlaces disulfuro entre las cisteínas terminales de los péptidos, es posible también que esta señal corresponda a un dímero formado por dos enlaces disulfuro entre las cisteínas terminales. En la Figura 14.b. se presenta la estructura propuesta para éste dímero.

Figura 14. a. Dímero por puente de hidrogeno. b. Dímero por puentes disulfuro.



En la figura 15 se muestra el espectro MALDI-TOF MS de la formación del enlace disulfuro con DMSO a pH básico.

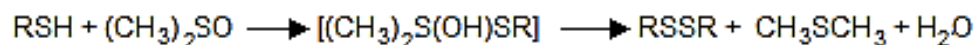
Figura 15. Espectro MALDI-TOF MS formación de enlace disulfuro por oxidación con DMSO a pH básico.



En el espectro se observa que aparecen las mismas señales que en la figura 20 correspondiente a la formación del enlace disulfuro a pH ácido. Es decir que el resultado de la oxidación con DMSO no depende del pH.

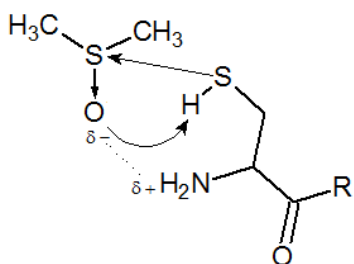
El esquema general de la oxidación de tioles con DMSO se muestra en el esquema 7.

Esquema 7. Formación de enlace disulfuro con DMSO.



La estequiometria de la reacción requiere de dos moles de tiol y una mol de DMSO. El paso determinante de la velocidad es la formación del aducto inestable $[(\text{CH}_3)_2\text{S}(\text{OH})\text{SR}]$ que es capturado rápidamente por otro grupo tiol para dar el enlace disulfuro. Este aducto requiere la protonación de DMSO y la formación del anión tiolato justificando que las constantes de velocidad no son dependientes del pH. Sin embargo, en algunos casos el pH puede afectar la velocidad de reacción con DMSO cuando la cisteína está en el extremo terminal, como en este caso. Cuando el pH del medio es básico se da una interacción débil entre el sulfóxido parcial con densidad de carga negativa y la α -amina parcial no protonada con una densidad de carga negativa que facilita la formación del aducto inestable de la figura 16. Esta interacción débil favorece la formación del disulfuro y aumenta la velocidad de reacción [59].

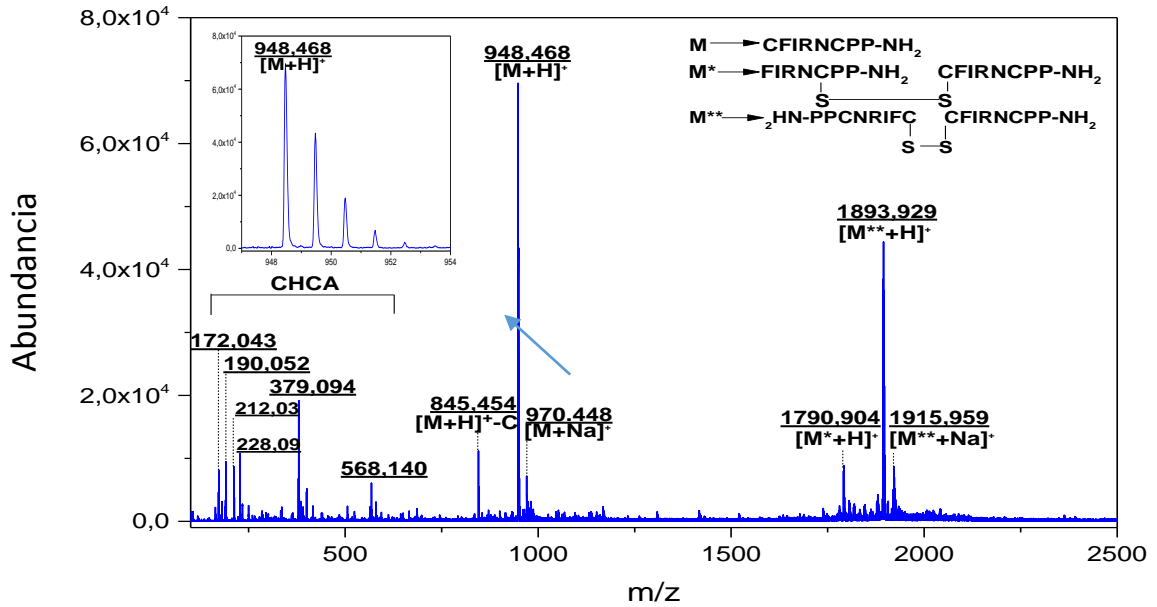
Figura 16. Aducto inestable entre DMSO y Cisteína N-terminal a pH básico.



Por el contrario, si el pH del medio es ácido la α -amina terminal se protona y genera una carga positiva que puede causar una interacción fuerte con el sulfóxido parcial formando una amida lo que dificulta la formación del enlace disulfuro y por ende disminuye la velocidad de reacción de este [59].

Con el fin de observar la estabilidad del péptido a las condiciones de almacenamiento empleadas y determinar si este almacenamiento influye en los resultados obtenidos de la formación de enlaces disulfuro con DMSO, se analizó el péptido lineal 15 días después del clivaje sin realizar ningún procedimiento de formación de disulfuro, el cual permaneció a una temperatura de -20°C en estado sólido. El espectro obtenido se muestra en la Figura 17.

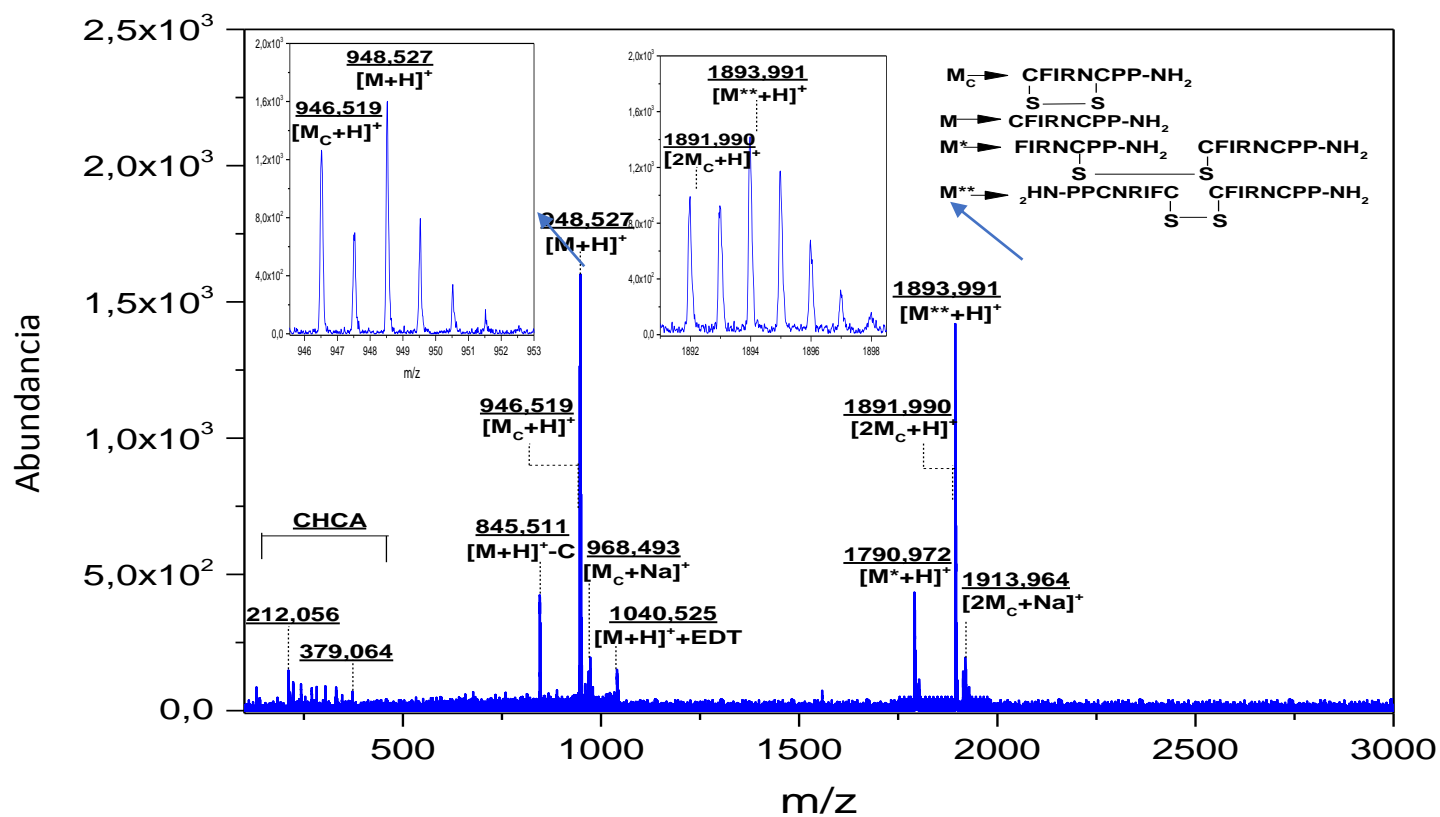
Figura 17. Espectro MALDI-TOF MS péptido lineal 15 días después de clivaje.



En la figura aparecen las señales m/z esperadas de los aductos del péptido lineal y con la delección de cisteína $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ y $[M+H]^+-C$. Sin embargo, se observa la aparición de tres señales correspondientes a una oxidación del péptido. Las señales en 1790,904, 1893,929 y 1915,959 que corresponden a la homodimerización y heterodimerización del péptido lineal y con delección de cisteína. Con el resultado obtenido se puede ver que el tiempo de almacenamiento influye en los resultados obtenidos. Se ha demostrado que péptidos con presencia de cisteína o metionina tienen tendencia a oxidarse fácilmente. La susceptibilidad de esta oxidación depende de la secuencia y de la exposición incluso mínima al aire. La velocidad de oxidación aumenta con el pH por lo que incluso péptidos en condiciones neutras pueden presentar oxidación [60].

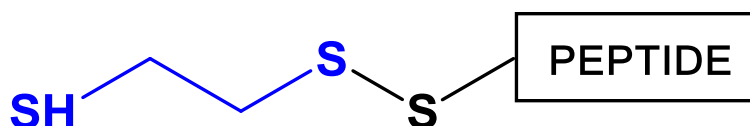
Se realizó la formación del enlace disulfuro con yodo en resina para observar si se evitaba la formación de dímeros y subproductos. El espectro correspondiente a la formación del disulfuro con yodo en resina se muestra en la Figura 18.

Figura 18. Espectro MALDI-TOF MS formación de enlace disulfuro con yodo en resina.



En el espectro de la formación del enlace disulfuro con yodo en resina aparece una señal en la relación del ión m/z de 1040,525 que corresponde a la formación de un enlace disulfuro entre el 1,2-etanoditiol (EDT) y el péptido lineal. Este aducto se forma a causa de la desprotección del tiol de la cisteína o remoción del grupo protector tritilo durante la oxidación con yodo y una reacción posterior con el scavenger etanoditiol durante el proceso de clivaje formando un enlace disulfuro entre ellos el cual se esquematiza en la figura 19 [61].

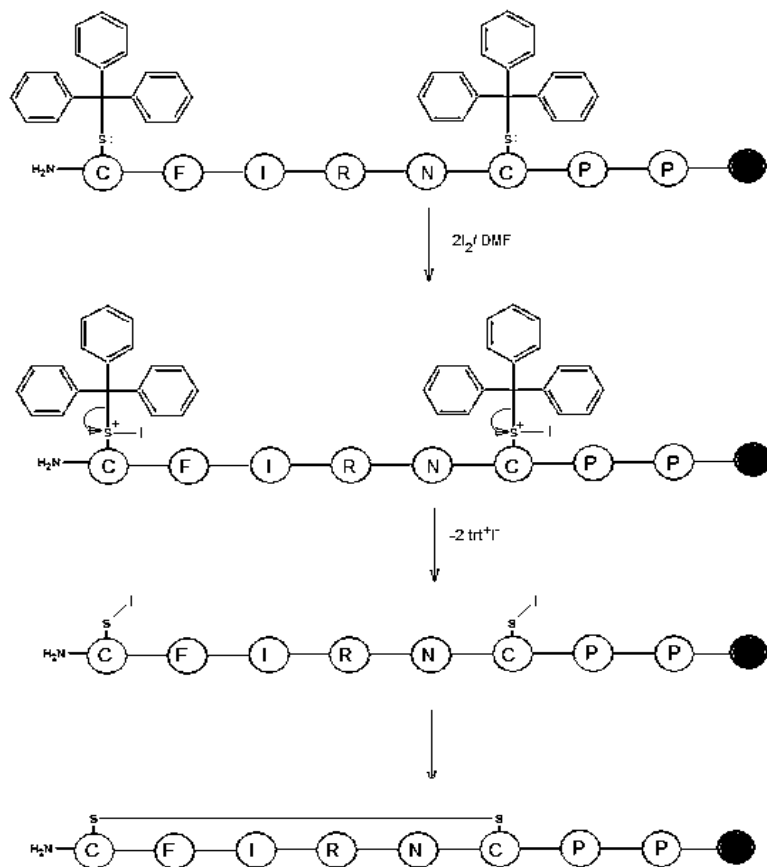
Figura 19. Aducto Péptido+ etanoditiol



De igual forma aparecen las señales del péptido lineal, del péptido cíclico y de la formación de dímeros. La formación de estos dímeros se debe posiblemente al fácil acceso de las cisteínas N-terminales durante la oxidación con yodo reaccionando entre ellas formando subproductos diméricos, mientras las cisteínas del tercer acople presentan mayor impedimento estérico por parte de las prolinas, de los grupos protectores de aminoácidos adyacentes que no han sido removidos y de la resina dificultando la ciclación.

El mecanismo de la formación del enlace disulfuro por medio de yodo en resina es una oxidación directa, es decir, durante la reacción se remueve el grupo protector tritilo (trt) y se forma el enlace disulfuro (Ver esquema 8).

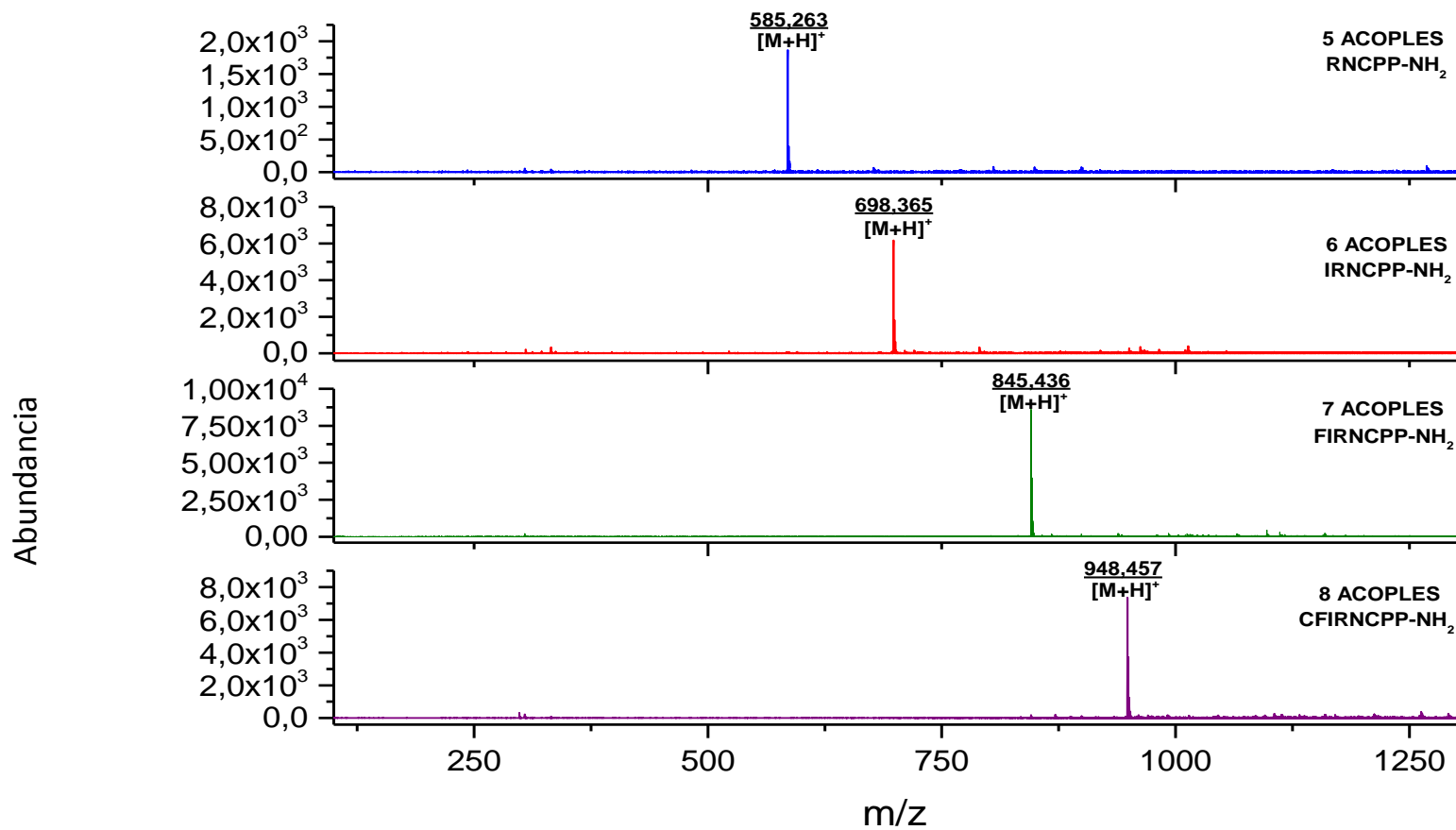
Esquema 8. Mecanismo de formación del enlace disulfuro con yodo en resina



En el mecanismo del esquema 8 el yodo reacciona con el tiol protegido de la cisteína formando el ion yodo sulfonio. Posteriormente se da la salida del grupo protector tritilo (trt) y la formación de los yodosulfenilos. Una vez formados reaccionan entre ellos para finalmente obtener el enlace disulfuro.

5.2.2 Síntesis 2. Con los resultados obtenidos del proceso de síntesis 1 se observó que el péptido obtenido presentó una deleción de cisteína correspondiente al último aminoácido acoplado, por esta razón durante la síntesis 2 en el acople final se emplearon 10 excesos de cisteína es decir 327,99 mg de aminoácido. Con 100 mg de resina se obtuvo 45 mg de péptido lineal. Los espectros obtenidos del monitoreo de la síntesis 2 desde el quinto acople hasta el octavo acople se muestran en la figura 20.

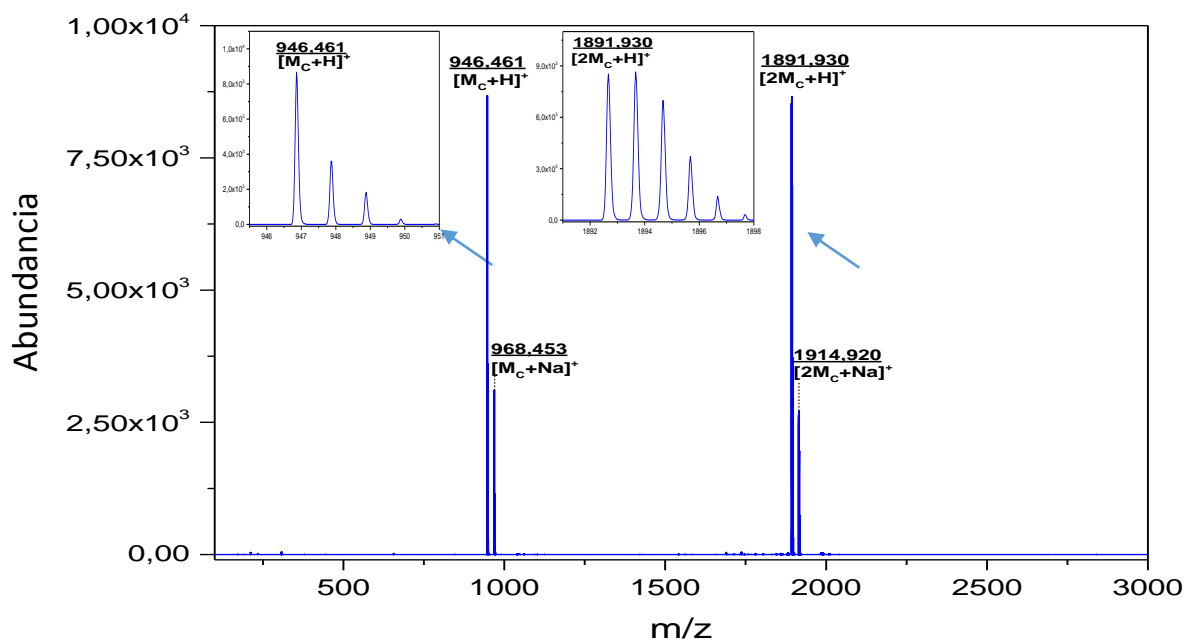
Figura 20. Espectros MALDI-TOF MS correspondiente al monitoreo de la síntesis del reactor N°2 péptido lineal con secuencia aminoacídica CFIRNCPP.



En cada espectro la relación m/z concuerda con la del ion $[M+H]^+$ de cada acople comprobando que la síntesis se llevó a cabo de forma adecuada. Adicionalmente se logró eliminar la formación del subproducto del péptido con una deleción de cisteína. Con los resultados obtenidos con esta síntesis se procede a realizar la formación del enlace disulfuro teniendo en cuenta que el método con DMSO a pH ácido se descartó por presentar los mismos resultados del método con DMSO a pH básico, pero con un mayor tiempo de reacción. De igual manera el método por oxidación con yodo en resina no solo favorece la formación de dímeros y subproductos, también el procedimiento es más complejo al tener que controlar la temperatura. Por estos motivos el método elegido para la formación del enlace disulfuro es la oxidación con DMSO a pH básico.

La formación del enlace disulfuro con DMSO a pH básico se realizó dos días después de la separación de la resina, ya que con los resultados de la síntesis anterior se observó que el tiempo de almacenamiento afecta la estabilidad del péptido formando dímeros después de 15 días de almacenamiento. El espectro correspondiente a la ciclación del péptido por oxidación con DMSO a pH básico se muestra en la figura 21.

Figura 21. Espectro MALDI-TOF MS del péptido conopresina textile de la síntesis N°2.

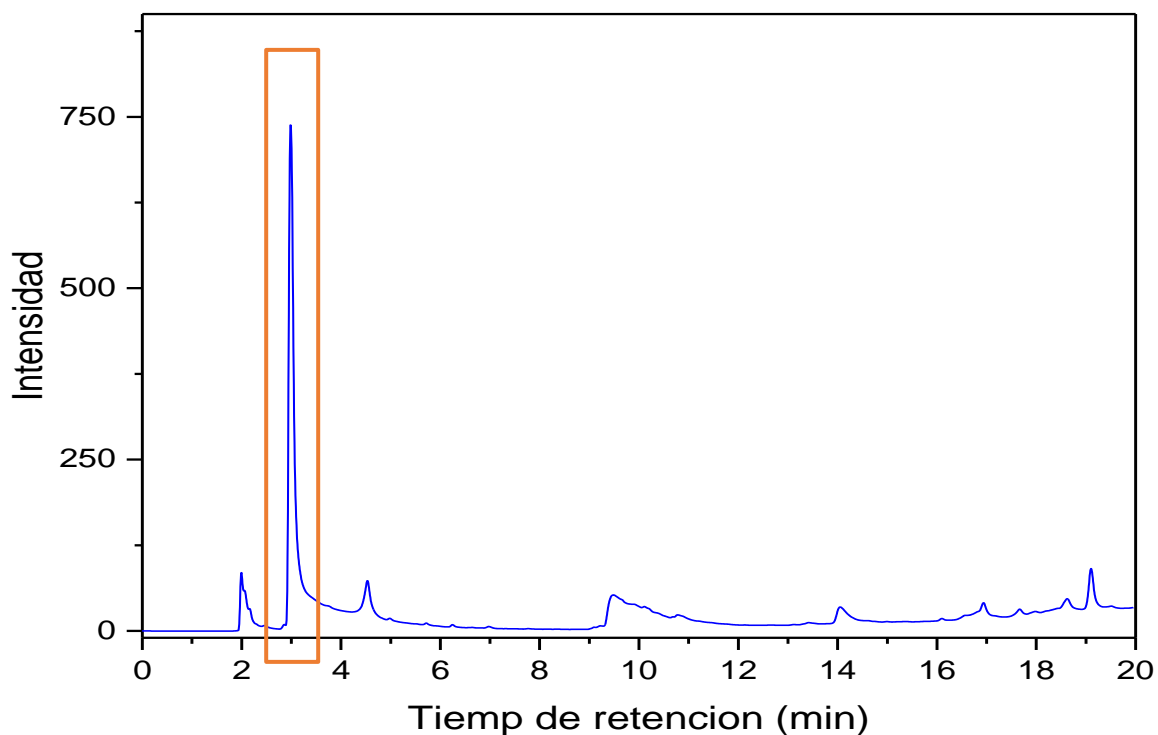


En el espectro se observan las señales correspondientes a los aductos del péptido cíclico en m/z 946,461 y 968,453. Se evidencia que la formación del enlace disulfuro con el método elegido fue adecuada ya que no se encuentra la señal correspondiente al péptido lineal. Aparecen las señales correspondientes al dímero que tiene dos posibles formaciones, ya sea por formación de puentes e hidrogeno o por puentes disulfuro, estructuras que se proponen en la Figura 14. Gracias al espectro se puede observar que se logró una síntesis sin deleciones y con pocos subproductos facilitando una purificación posterior.

5.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO POR RP-HPLC

El péptido obtenido de la síntesis 2 con la formación del enlace disulfuro por DMSO a pH básico se analizó por RP-HPLC con detector de arreglos de diodos empleando una longitud de onda de 220nm característica para analizar péptidos. El cromatograma que se obtuvo se muestra en la Figura 22.

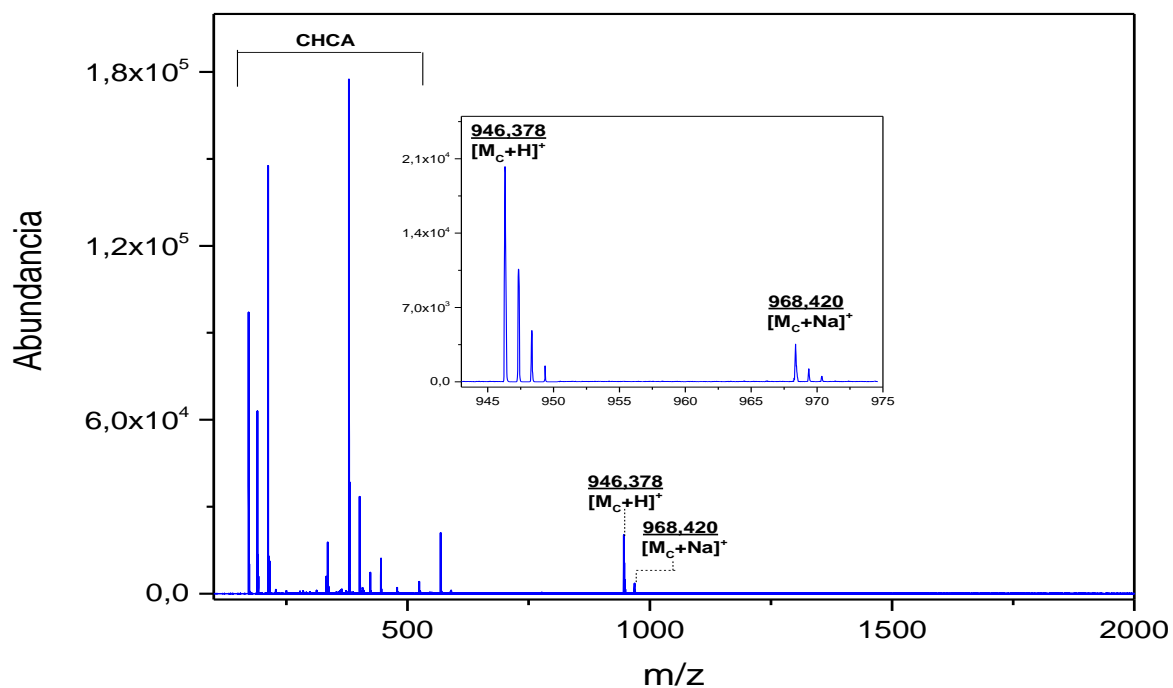
Figura 22. Cromatograma de RP-HPLC del péptido cíclico de la síntesis 2.



Con el fin de determinar la señal correspondiente al péptido, se recogieron los picos más representativos del cromatograma y se analizaron por MALDI-TOF MS. Se observó que la señal de mayor intensidad con un tiempo de retención de 3 minutos que se señala en la Figura 22 corresponde al péptido sintetizado. En la

Figura 23 se observa el espectro MALDI-TOF MS del pico recogido en el RP-HPLC que corresponde al péptido. Los otros picos recogidos corresponden posiblemente a moléculas empleadas durante el proceso de síntesis que no son ionizables como el buffer fosfato, por lo cual no se pudieron identificar por la técnica analítica MALDI-TOF.

Figura 23. Espectro MALDI-TOF MS de la señal recogida del RP-HPLC que corresponde al péptido conopresina textile .



En el espectro aparecen las señales de los aductos del péptido conopresina textile comprobando que la señal de mayor intensidad en el cromatograma es la del péptido. Con la información proporcionada por RP-HPLC de grado analítico se puede observar que el péptido.

6. CONCLUSIONES

Fue posible la síntesis del péptido conopresina *textile* con secuencia aminoacídica CFIRNCPD con el extremo C-terminal amidado por medio de una metodología Fmoc, 9-fluorometoxicarbonil como grupo protector, en fase sólida, obteniendo resultados eficientes, ya que se obtuvo un producto final sin la presencia de deleciones.

La acetilación de los grupos amino de la resina Rink Amida disminuyó la formación de cadenas peptídicas no deseadas al bloquear los puntos de síntesis sobrantes posteriores al primer acople, lo que se evidencia en los espectros de masas obtenidos durante el monitoreo de los acoples del péptido lineal.

La técnica analítica espectrometría de masas MALDI-TOF permitió realizar un monitoreo adecuado de cada acople para mejorar el proceso de síntesis y evitar la formación de deleciones.

El método de oxidación elegido, empleando DMSO a pH básico, fue el más adecuado para la formación del enlace disulfuro de las posiciones 1- 6 en la conopresina *textile*, ya que se dio una conversión completa del péptido lineal al péptido cíclico.

7. RECOMENDACIONES

El tiempo y la temperatura son factores que afectan la estabilidad de los péptidos por lo cual se necesita emplear temperaturas de almacenamiento de -20°C y tiempo de almacenamiento inferior a 15 días.

Para la purificación del péptido a gran escala sería recomendable emplear RP-HPLC semi-preparativa, preparativa o técnicas similares para obtener mayor cantidad de muestra.

El péptido sintetizado hace parte de la familia de las conotoxinas, péptidos que han presentado gran actividad contra enfermedades neurodegenerativas por lo que se recomienda hacer estudios de actividad biológica.

La estructura tridimensional de los péptidos es fundamental en el estudio como neurofármaco, teniendo en cuenta el tamaño pequeño, alta solubilidad y estabilidad de la conopresina *textile* se recomienda realizar la determinación de la estructura por la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Olivera, B. M. Conus Peptides: Biodiversity-Based Discovery and Exogenomics. *J. Biol. Chem.* 2006, 281 (42), 31173-31177.
- [2]. Olivera, B. M.; Teichert, R. W. Diversity of the Neurotoxic Conus Peptides: A model for Concerted Pharmacological Discovery. *Mol. Interv.* 2007, 7 (5), 251-260.
- [3]. Akondi, K. B. ; Muttenthaler, M. ; Dutertre, S.; Kaas, Q.; Craik, D. J.; Newis, R. J.; Alewood, P. F. Discovery, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Conotoxins. *Chem. Rev* 2014, 114 (11), 5815-5847.
- [4]. Olivera, B. M. Conus Venom Peptides, Receptor and Ion Channel Targets, and Drug Design: 50 Million Years of Neuropharmacology: IR- UScholar Works. *Am. Soc. Cell Biol.* 1997, 2101-2109.
- [5]. McIntosh, J. M.; Jones, R. M. Cone venom from accidental stings to deliberate injection. *Toxicon.* 2001, 39 (10), 1447-1451.
- [6]. National Geographic Society. National Geographic. Criaturas marinas peligrosas y mortíferas. 2015.
- [7]. Dobsin, R.; Colladoro, M.; Gilles, N.; Turtoi, A.; De Pauw, E.; Quinton, L. Secretion and maturation of conotoxins in the venom ducts of Conus Textile. *Toxicon.* 2012, 60(8), 1370-1379.
- [8]. Norton, R. S.; Olivera, B. M. Conotoxins down Under. *Toxicon.* 2006, 48 (7), 780-798.
- [9]. Jones, R. M.; Bulaj, G. Conotoxins- New Vistas for peptide therapeutics. *Curr. Pharm. Des.* 2000, 6 (12), 1249-1285.
- [10]. Tsien, R. W.; Lipscombe, D.; Madison, D. V.; Bley, K. r.; Fox, A. P. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* 1988, 11 (10), 431-438.
- [11]. Terlau, H.; Olivera, B. M. Conus Venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* 2004, 84 (1), 41-68.

- [12]. Van Kesteren, R. E.; Smit, A. B.; De Lange, R. P.; Kits, K. S.; Van Golen, F. A.; Van Der Schors, R. C.; De With, N. D.; Burke, J. F.; Geraets, W. P. Structural and functional evolution of the Vasopressin/Oxytocin superfamily; Vasopressin-related Conopressin is the only member present in Lymnaea, and is involved in the control of sexual behavior. *J. Neurosci.* 1995, 15 (9), 5989-5998.
- [13]. Cruz, L.; de Santos, V.; Zafaralla, G.; Ramilo, C.; Zeikus, R.; Gray, W.; Olivera, B. M. Invertebrate Vasopressin/Oxytocin homologs. Characterization of peptides from conus *Geographus* and conus *Straitus* venoms. *J. Biol. Chem.* 1987, 262 (33), 15821-15824.
- [14]. Schmidtko, A.; Lötsch, J.; Freynhagen, R.; Geisslinger, G. Ziconotide for treatment of severe chronic pain. *Lancet (London, England)* 2010, 375 (9725), 1569-1577.
- [15]. Staats, P. S.; Yearwood, T.; Chaparapata, S. G.; Presley, R. W.; Wallace, M. S.; Byas-Smith, M.; Fisher, R.; Bryce, D. A.; Mangieri, E. A.; Luther, R. R.; Mayo, M.; McGuire, D.; Ellis, D. Intrathecal Ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: A randomized controlled trial. *JAMA.* 2004, 291 (1), 63-70.
- [16]. Kolosov, A.; Aurini, L.; Williams, E. D.; Cooke, I; Goodchild, C. S. Intravenous injection of leconoid, an Omega Conotoxin: Synergistic antihyperalgesic effects with morphine in a rat model of bone cancer pain. *Pain Med.* 2011, 12 (6), 923-941.
- [17]. Nielsen C. K.; Lewis R. J.; Alewood D.; Drinkwater R.; Palant E.; Patterson M.; Yaksh T. L.; McCumber D.; Smith M. T. Anti-allodynic efficacy of the chiconopeptide, Xen2174, in rats with neuropathic pain. *Pain Med.* 2005, 118(1-2), 112-124.
- [18]. Wilson, M.J., Zhang, M.M., Azam, L., Olivera, B.M., Bulaj, G. and Yoshikami, D. NaV β Subunits Modulate the Inhibition of NaV1.8 by the Analgesic Gating Modifier μ O-Conotoxin MrVIB. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011, 338, 687-693

- [19]. Satkunanathan, N.; Livett, B.; Gayler, K.; Sandall, D; Down, J; Khalil, Z. Alpha-Conotoxin Vc1.1 Alleviates neuropathic pain and accelerates functional recovery of injured neurones. *Brain Res.* 2005, 1059 (2), 149-158.
- [20]. Hernández, L. M.; López Vera, E.; Aguilar Ramírez, M. B.. El veneno de los caracoles marinos y su paradójico uso médico. *Revista Digital Universitaria UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México)*. 2014, 15(11).
- [21]. Essack M, Bajic VB, Archer JA. conotoxins that confer therapeutic possibilities. *Marine drugs*. 2012;10: 1244-1265.
- [22]. Lima V.; Mueller A.; Kamikihara S. Y.; Raymundi V.; Alewood D.; Lewis R.; Chen Z.; Minneman K. P.; Pupo A. S. Differential antagonism by conotoxin ρ -TIA of contractions mediated by distinct α_1 -adrenoceptor subtypes in rat vas deferens, spleen and aorta. *European Journal of pharmacology*. 2005, 508(1-3), 183-192.
- [23]. Malmberg A.B., Gilbert H., McCabe R.T., Basbaum A.I. "Powerful antinociceptive effects of the cone snail venom-derived subtype-selective NMDA receptor antagonists conantokins G and T. *Pain Med.* 2003, 101, 109-116.
- [24]. Green BR, Catlin P, Zhang MM, et al. Conotoxins containing nonnatural backbone spacers: cladistic-based design, chemical synthesis, and improved analgesic activity. *Chem Biol.* 2007;14(4):399–407.
- [25]. Fields, G.; Noble, R. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990, 35 (3), 161-214.
- [26]. SCHNölzer, M.; Alewood, P. F. In situ neutralization in Boc- chemistry solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2007, 13 (1-2), 31-44.
- [27]. Kates, S. A.; Albericio, F. *Solid-Phase synthesis: A practical guide*, Marcel Dek.; EBSCO publishing: New York, 2000.
- [28]. Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85 (14), 2149-2154.

- [29]. Atherton, E.; Fox, H.; Harkiss, D. ; Logan, C. J.; Sheppard, R. C.; Williams, B. J. A mild procedure for solid phase peptide synthesis: Use of Fluoroenylmethoxycarbonyl amino-acids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1978, 3 (13), 537.
- [30]. Escoda, M.T.P. Diseño y síntesis de péptido para el diagnóstico de la infección por el virus de la Hepatitis G, GBV-C/HGV (Tesis Doctoral), Universidad de Barcelona, 2007.
- [31]. Garcia, M. F.; Albericio, F. Solid supports for the synthesis of peptides from the first resin used to the most sophisticated in the market. *Chim. Offi.* 2008, 26 (4), 29-34.
- [32]. Jung, G. *Combinatorial chemistry: synthesis, analysis, screening*; John Wiley & Sons, 2008; Vol 4.
- [33]. Tam, J. P.; Wu, C. R.; Liu, W.; Zhang, J. W. Disulfide bond formation in peptides by Dimethyl Sulfoxide. Scope and Application. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113 (17), 6657-6662.
- [34]. Bulaj, G. Formation of Disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnol. Adv.* 2005, 23 (1), 87-92.
- [35]. Andreu, D.; Albericio, F.; Solé, N. A.; Munson, M. C.; Ferrer, M.; Barany, G. Formation of disulfide bonds in synthetic peptides and proteins. *Methods Mol. Biol.* 1994, 35, 91-169.
- [36]. Annis, I.; Hargittai, B.; Barany, G. Disulfide bond formation in peptides. *Methods Enzymol.* 1997, 298, 198-221.
- [37]. Su, L. L.; Chong, Y. S., Samuel, M. Oxytocin agonist for preventing postpartum haemorrhage. *Cochrane database syst. Rev.* 2007, No. 3, CD005457.
- [38]. Manning, M.; Misicka, A.; Olma, A.; Bankowski, K.; Stoev, S.; Chini, B.; Durroux, T.; Mouillac, B.; Corbani, M.; Guillon, G. Oxitocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics. *J. Neuroendocrinol.* 2012, 24 (4), 609-628.

- [39]. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years-autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *MMWR. Surveill. Summ.* 2014, 63 (2), 1-21.
- [40]. Olivera, B. M.; Cruz, L. J. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon.* 2001, 39(1), 7-14.
- [41]. Kohn, A. J. Piscivorous gastropods of the genus conus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1956, 42 (3), 168-171.
- [42]. Spence, I.; Gillessen, D.; Gregson, R. P.; Quinn, R. J. Characterization of the neurotoxic constituents of conus *Geographus* (L) Venom. *Life Sci.* 1977, 21 (12), 1759-1769.
- [43]. Adams, D. J.; Alewood, P. F.; Craik, D. J.; Drinkwater, R. D.; Lewis, R. J. Conotoxins and their potential pharmaceutical applications. *Drug Dev. Res.* 1999, 46 (3-4), 219-234.
- [44]. Barany, G.; Albericio, F. Three-Dimensional orthogonal protection scheme for solid phase peptide synthesis under mild conditions. *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107 (17), 4936-4942.
- [45]. Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. Quantitative monitoring of solid phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal. Biochem.* 1981, 117 (2), 147-157.
- [46]. Navarrete, E. L. Síntesis de péptidos. Univ. Nac. Auton. México, Inst. Biotecnol. 2007, Cuernavaca, Morelos, 1-53.
- [47]. Kates, S. A.; Solé, N. A.; Johnson, C. R.; Hudson, D.; Barany, G.; Albericio, F. A novel, convenient, three-Dimensional orthogonal strategy for solid phase synthesis of cyclic peptides. *Tetrahedron letters.* 1993, 34 (10), 1549-1550.
- [48]. Kamber, B.; Hartmann, A.; Eisler, K.; Riniker, B.; Rink, H.; Sieber, P.; Rittel, W. The synthesis of cysteine peptides by iodine oxidation of S-trityl-cysteine and S-Acetamidomethyl-cysteine peptides. *Helv. Chim. Acta* 1980 ,63 (4), 899-915.
- [49]. Chan, W. C.; White, P. Formation of disulphides. In *Fmoc solid phase peptide synthesis. A practical approach*; 2000, 91-114.

- [50]. Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins; CRC Press, 1997.
- [51]. Valliant, J. F.; Dorff, P.; Chirakal, R. inventors; PCT Int. Appl. WO 035744 A2. 2004
- [52]. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 2005, 61 (46), 10827-10852.
- [53]. Fieser, L. F.; Fieser, M. Capítulo 9: Ácidos y bases. En *Química orgánica fundamental*; 1981, 150-154.
- [54]. Amblard, M.; Fehrentz, J. A.; Martínez, J.; Subra, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.* 2006, 33 (3), 239-254.
- [55]. Prospector.ucsf.edu. (2016). *ProteinProspector*. [online] Available at: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm> [Accessed 6 Oct. 2015].
- [56]. Fukuda M; Kanno E; Mikoshiba K; Conserved N-terminal Cysteine Motif Is Essential for Homoand Heterodimer Formation of Synaptotagmins III, V, VI, and X*. *J Biol Chem.* 1999, 274(44), 31421-7.
- [57]. Welbourn, S.; Kao, S.; Pont, K.; Andrew, A.; Berndsen, C.; Strebel, K. Position of cysteine residues within the N-terminal portion of the BST-2/tetherin ectodomain is important for functional dimerization of BST-2. *J Biol Chem.* 2015, 290(6): 3740–3751.
- [58]. Banerjee S; Mazumdar S. Non-covalent dimers of the lysine containing protonated peptide ions in gaseous state: electrospray ionization mass spectrometric study. *J Mass Spectrom.* 2010, 45(10):1212-9.
- [59]. Tam, J. P.; Wu, C.; Liu, W.; Zhang, J. W. Disulfide Bond Formation in Peptides by Dimethyl Sulfoxide. Scope and Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113 (17), 6657–6662
- [60]. Grant, G. *Synthetic Peptides: A User's Guide*, New York, United States. W.H. Freeman & Co, 1992, 180.
- [61]. Singh, P. R.; Rajopadhye, M.; Clark, S. L.; Williams, N. E. Effect of scavengers in acidolytic cleavage of Cys(Acm)-containing peptides from solid support:

Isolation of an ethanedithiol disulfide adduct . Tetrahedron letters, Elsevier.
1996, 37(24), 4117-4120

BIBLIOGRAFÍA

Adams, D. J.; Alewood, P. F.; Craik, D. J.; Drinkwater, R. D.; Lewis, R. J. Conotoxins and their potential pharmaceutical applications. *Drug Dev. Res.* 1999, 46 (3-4), 219-234.

Akondi, K. B. ; Muttenthaler, M. ; Dutertre, S.; Kaas, Q.; Craik, D. J.; Lewis, R. J.; Alewood, P. F. Discovery, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Conotoxins. *Chem. Rev* 2014, 114 (11), 5815-5847.

Amblard, M.; Fehrentz, J. A.; Martínez, J.; Subra, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.* 2006, 33 (3), 239-254.

Andreu, D.; Albericio, F.; Solé, N. A.; Munson, M. C.; Ferrer, M.; Barany, G. Formation of disulfide bonds in synthetic peptides and proteins. *Methods Mol. Biol.* 1994, 35, 91-169.

Annis, I.; Hargittai, B.; Barany, G. Disulfide bond formation in peptides. *Methods Enzymol.* 1997, 298, 198-221.

Atherton, E.; Fox, H.; Harkiss, D. ; Logan, C. J.; Sheppard, R. C.; Williams, B. J. A mild procedure for solid phase peptide synthesis: Use of Fluoroenylmethoxycarbonyl amino-acids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1978, 3 (13), 537.

Banerjee S; Mazumdar S. Non-covalent dimers of the lysine containing protonated peptide ions in gaseous state:electrospray ionizationmass spectrometricstudy. *J Mass Spectrom.* 2010, 45(10):1212-9.

Barany, G.; Albericio, F. Three-Dimensional orthogonal protection scheme for solid phase peptide synthesis under mild conditions. *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107 (17), 4936-4942.

Bulaj, G. Formation of Disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnol. Adv.* 2005, 23 (1), 87-92.

Chan, W. C.; White, P. Formation of disulphides. In *Fmoc solid phase peptide synthesis. A practical approach*; 2000, 91-114.

Cruz, L.; de Santos, V.; Zafaralla, G.; Ramilo, C.; Zeikus, R.; Gray, W.; Olivera, B. M. Invertebrate Vasopressin/Oxytocin homologs. Characterization of peptides from conus *Geographus* and conus *Straitus* venoms. *J. Biol. Chem.* 1987, 262 (33), 15821-15824.

Dobsin, R.; Colladoro, M.; Gilles, N.; Turtoi, A.; De Pauw, E.; Quinton, L. Secretion and maturation of conotoxins in the venom ducts of *Conus Textile*. *Toxicon.* 2012, 60(8), 1370-1379.

Escoda, M.T.P. Diseño y síntesis de péptido para el diagnóstico de la infección por el virus de la Hepatitis G, GBV-C/HGV (Tesis Doctoral), Universidad de Barcelona, 2007.

Essack M, Bajic VB, Archer JA. conotoxins that confer therapeutic possibilities. *Marine drugs.* 2012;10: 1244-1265.

Fields, G.; Noble, R. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990, 35 (3), 161-214.

Fieser, L. F.; Fieser, M. Capítulo 9: Ácidos y bases. En Química orgánica fundamental; 1981, 150-154.

Fukuda M; Kanno E; Mikoshiba K; Conserved N-terminal Cysteine Motif Is Essential for Homoand Heterodimer Formation of Synaptotagmins III, V, VI, and X*. J Biol Chem. 1999, 274(44), 31421-7.

García, M. F.; Albericio, F. Solid supports for the synthesis of peptides from the first resin used to the most sophisticated in the market. *Chim. Offi.* 2008, 26 (4), 29-34.

Grant, G. *Synthetic Peptides: A User's Guide*, New York, United States. W.H.Freeman & Co, 1992, 180.

Green BR, Catlin P, Zhang MM, et al. Conotoxins containing nonnatural backbone spacers: cladistic-based design, chemical synthesis, and improved analgesic activity. *Chem Biol.* 2007;14 (4):399–407.

Hernández, L. M.; López Vera, E.; Aguilar Ramírez, M. B.. El veneno de los caracoles marinos y su paradójico uso médico. *Revista Digital Universitaria UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México)*. 2014, 15(11).

Jones, R. M.; Bulaj, G. Conotoxins- New Vistas for peptide therapeutics. *Curr. Pharm. Des.* 2000, 6 (12), 1249-1285.

Jung, G. *Combinatorial chemistry: synthesis, analysis, screening*; John Wiley & Sons, 2008; Vol 4.

Kamber, B.; Hartmann, A.; Eisler, K.; Riniker, B.; Rink, H.; Sieber, P.; Rittel, W. The synthesis of cysteine peptides by iodine oxidation of S-trityl-cysteine and S-Acetamidomethyl-cysteine peptides. *Helv. Chim. Acta* 1980 ,63 (4), 899-915.

Kates, S. A.; Albericio, F. *Solid-Phase synthesis: A practical guide*, Marcel Dek.; EBSCO publishing: New York, 2000.

Kates, S. A.; Solé, N. A.; Johnson, C. R.; Hudson, D.; Barany, G.; Albericio, F. A novel, convenient, three-Dimensional ortogonal strategy for solid phase synthesis of cyclic peptides. *Tetrahedron letters*. 1993, 34 (10), 1549-1550.

Kohn, A. J. Piscivorous gastropods of the genus *Conus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1956, 42 (3), 168-171.

Kolosov, A.; Aurini, L.; Williams, E. D.; Cooke, I; Goodchild, C. S. Intravenous injection of leconoides, an Omega Conotoxin: Synergistic antihyperalgesic effects with morphine in a rat model of bone cancer pain. *Pain Med.* 2011, 12 (6), 923-941.

Lima V.; Mueller A.; Kamikihara S. Y.; Raymundi V.; Alewood D.; Lewis R.; Chen Z.; Minneman K. P.; Pupo A. S. Differential antagonism by conotoxin ρ -TIA of contractions mediated by distinct α_1 -adrenoceptor subtypes in rat vas deferens, spleen and aorta. *European Journal of pharmacology*. 2005, 508(1-3), 183-192.

Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*; CRC Press, 1997.

Malmberg A.B., Gilbert H., McCabe R.T., Basbaum A.I. "Powerful antinociceptive effects of the cone snail venom-derived subtype-selective NMDA receptor antagonists conantokins G and T. *Pain Med.* 2003, 101, 109-116.

Manning, M.; Misicka, A.; Olma, A.; Bankowski, K.; Stoev, S.; Chini, B.; Durroux, T.; Mouillac, B.; Corbani, M.; Guillon, G. Oxitocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics. *J. Neuroendocrinol.* 2012, 24 (4), 609-628.

McIntosh, J. M.; Jones, R. M. Cone venom from accidental stings to deliberate injection. *Toxicon.* 2001, 39 (10), 1447-1451.

Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85 (14), 2149-2154.

Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron,* 2005, 61 (46), 10827-10852.

National Geographic Society. National Geographic. Criaturas marinas peligrosas y mortíferas. 2015.

Navarrete, E. L. Síntesis de péptidos. Univ. Nac. Auton. México, Inst. Biotecnol. 2007, Cuernavaca, Morelos, 1-53.

Nielsen C. K.; Lewis R. J.; Alewood D.; Drinkwater R.; Palant E.; Patterson M.; Yaksh T. L.; McCumber D.; Smith M. T. Anti-allodynic efficacy of the chiconopeptide, Xen2174, in rats with neuropathic pain. *Pain Med.* 2005, 118(1-2), 112-124.

Norton, R. S.; Olivera, B. M. Conotoxins down Under. *Toxicon.* 2006, 48 (7), 780-798.

Olivera, B. M. Conus Peptides: Biodiversity-Based Discovery and Exogenomics. *J. Biol. Chem.* 2006, 281 (42), 31173-31177.

_____. Venom Peptides, Receptor and Ion Channel Targets, and Drug Design: 50 Million Years of Neuropharmacology : IR- UScholar Works. Am. Soc. Cell Biol. 1997, 2101-2109.

Olivera, B. M.; Cruz, L. J. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon*. 2001, 39(1), 7-14.

Olivera, B. M.; Teichert, R. W. Diversity of the Neurotoxic Conus Peptides: A model for Concerted Pharmacological Discovery. *Mol. Interv.* 2007, 7 (5), 251-260.

Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years-autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *MMWR. Surveill. Summ.* 2014, 63 (2), 1-21.

Prospector.ucsf.edu. (2016). *ProteinProspector*. [online] Available at: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm> [Accessed 6 Oct. 2015].

Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. Quantitative monitoring of solid phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal. Biochem.* 1981, 117 (2), 147-157.

Satkunanathan, N.; Livett, B.; Gayler, K.; Sandall, D; Down, J; Khalil, Z. Alpha-Conotoxin Vc1.1 Alleviates neuropathic pain and accelerates functional recovery of injured neurones. *Brain Res.* 2005, 1059 (2), 149-158.

Schmidtko, A.; Lötsch, J.; Freynhagen, R.; Geisslinger, G. Ziconotide for treatment of severe chronic pain. *Lancet (London, England)* 2010, 375 (9725), 1569-1577.

SCHNölzer, M.; Alewood, P. F. In situ neutralization in Boc- chemistry solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2007, 13 (1-2), 31-44.

Singh,P.R.; Rajopadhye ,M.; Clark,S.L. ; Williams, N.E. Effect of scavengers in acidolytic cleavage of Cys(Acm)-containing peptides from solid support: Isolation of an ethanedithiol disulfide adduct . Tetrahedrom letters, Elsevier. 1996, 37(24), 4117-4120

Spence, I.; Gillessen, D.; Gregson, R. P.; Quinn, R. J. Characterization of the neurotoxic constituents of conus Geographus (L) Venom. Life Sci. 1977, 21 (12), 1759-1769.

Staats, P. S.; Yearwood, T.; Chaparapata, S. G.; Presley, R. W.; Wallace, M. S.; Byas-Smith, M.; Fisher, R.; Bryce, D. A.; Mangieri, E. A.; Luther, R. R.; Mayo, M.; McGuire, D.; Ellis, D. Intreathecal Ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cáncer or AIDS: A randomized controlled trial. JAMA. 2004, 291 (1), 63-70.

Su, L. L.; Chong, Y. S., Samuel, M. Oxytocin agonist for preventing postpartum haemorrhage. Cochrane database syst. Rev. 2007, No. 3, CD005457.

Tam, J. P.; Wu, C. R.; Liu, W.; Zhang, J. W. Disulfide bond formation in peptides by Dimethyl Sulfoxide. Scope and Application. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113 (17), 6657-6662.

Tam,J. P. ; Wu,C.; Liu,W.; Zhang, J.W. Disulfide Bond Formation in Peptides by Dimethyl Sulfoxide. Scope and Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113 (17), 6657–6662

Terlau, H.; Olivera, B. M. Conus Venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. Physiol. Rev. 2004, 84 (1), 41-68.

Tsien, R. W.; Lipscombe, D.; Madison, D. V.; Bley, K. r.; Fox, A. P. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* 1988, 11 (10), 431-438.

Valliant, J. F.; Dorff, P.; Chirakal, R. inventors; PCT Int. Appl. WO 035744 A2. 2004

Van Kesteren, R. E.; Smit, A. B.; De Lange, R. P.; Kits, K. S.; Van Golen, F. A.; Van Der Schors, R. C.; De With, N. D.; Burke, J. F.; Geraets, W. P. Structural and funtional evolution of the Vasopressin/Oxytocin superfamily; Vasopressin-related Conopressin is the inly member present in Lymnaea, and is involved in the control of sexual behavior. *J. Neurosci.* 1995, 15 (9), 5989-5998.

Welbourn,S.; Kao, S. ; Pont,K.; Andrew,A.; Berndsen,C.; Strebel' K..Position of cysteine residues within the N-terminal portion of the BST-2/tetherin ectodomain is important for functional dimerization of BST-2. *J Biol Chem.* 2015, 290(6): 3740–3751.

Wilson, M.J., Zhang, M.M., Azam, L., Olivera, B.M., Bulaj, G. and Yoshikami, D. NaV {beta} Subunits Modulate the Inhibition of NaV1.8 by the Analgesic Gating Modifier {micro}O-Conotoxin MrVIB. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011, 338, 687-693