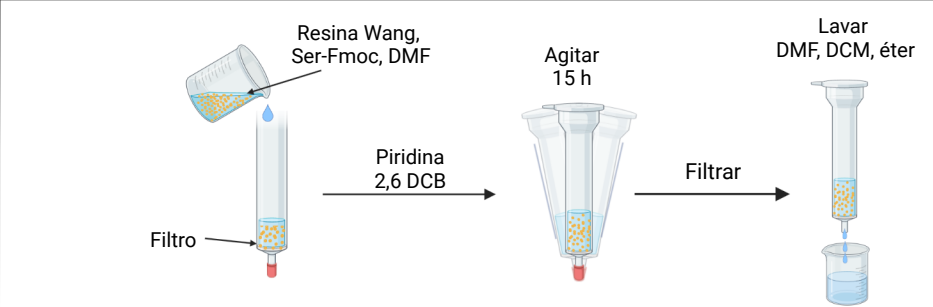
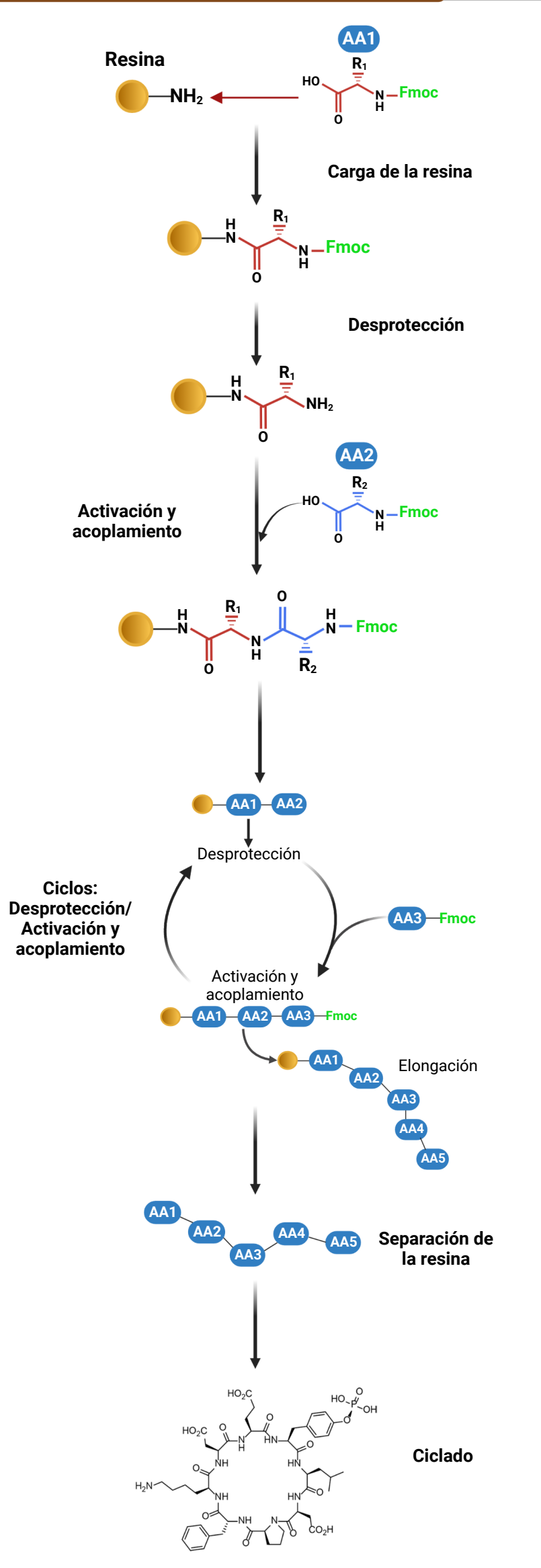
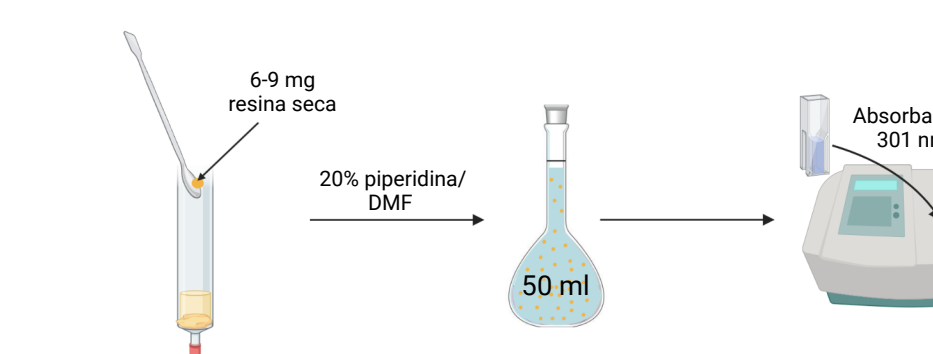
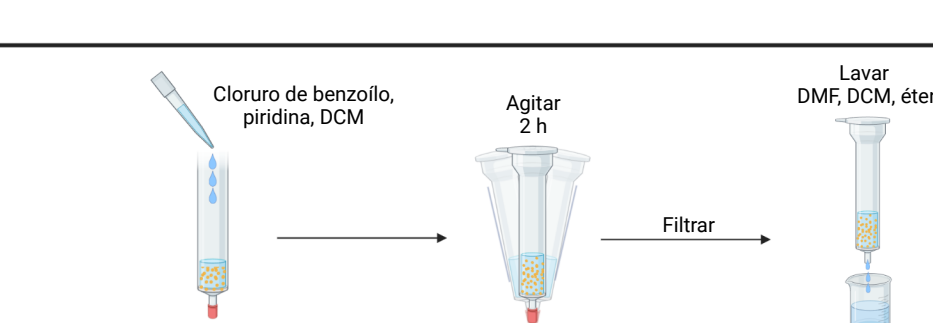
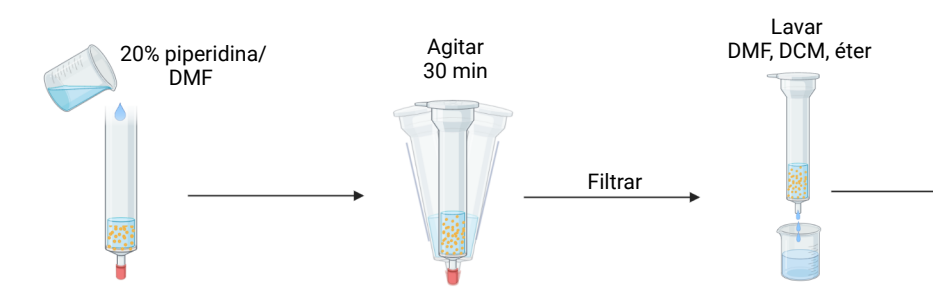
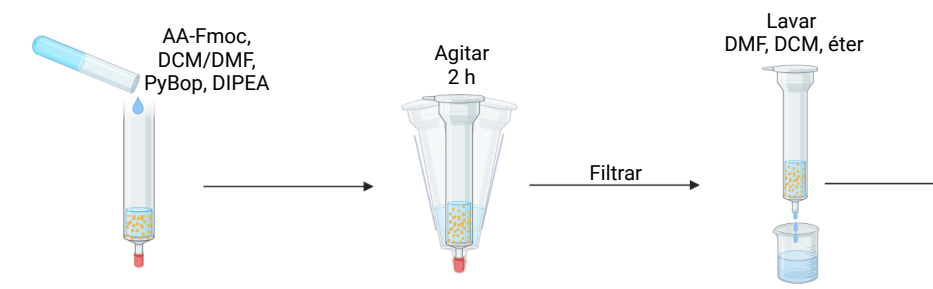
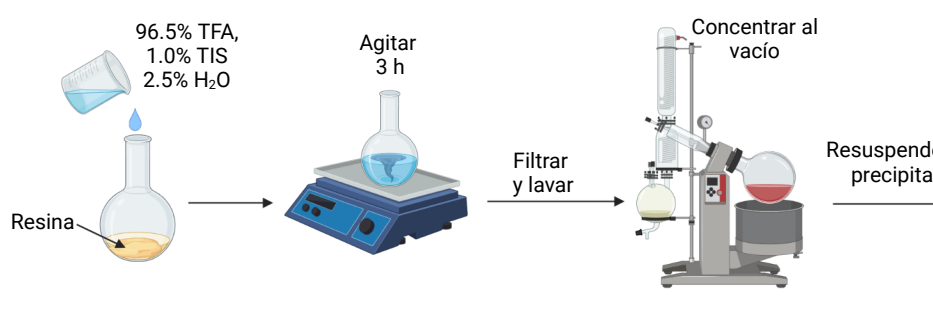
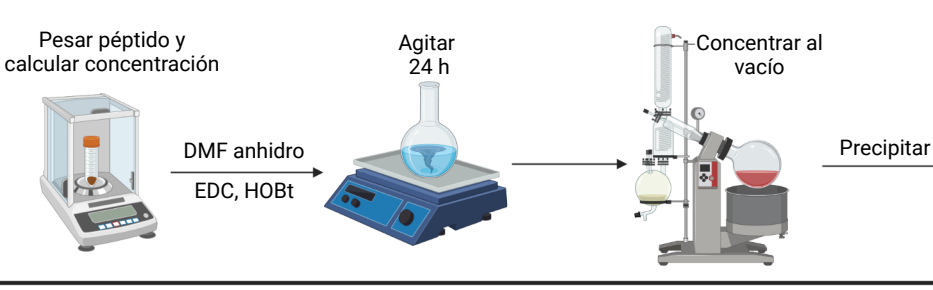


La síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) actualmente es la técnica por excelencia para la construcción química de estas moléculas. Este método trae consigo multiples ventajas respecto a la síntesis en solución. Se aumenta el rendimiento y se incrementa la velocidad de síntesis, además de permitir la eliminación del exceso de reactivos y de productos secundarios con simples lavados y todo el proceso de elongación de la cadena peptídica puede llevarse a cabo en el mismo contenedor. En el Laboratorio de la Diversidad Biomolecular se ha establecido una metodología basada en la SPFS por la vía Fmoc que permite obtener péptidos cíclicos en lapsos de tiempo relativamente cortos.

Procedimiento general:		Esquema del proceso químico:
1. Carga de la resina. Pesar 1 eq de resina Wang (0.5 g, 0.55 mmol), 2 eq del aminoácido (AA) serina (0.42 g, 1.1 mmol) protegido con Fmoc. Disolver en 3 ml de DMF y agitar en vortex 30 minutos. Agregar 3.3 eq (147 µl, 1.82 mmol) de piridina, agitar 5 minutos y agregar 2 eq (158 µl, 1.1 mmol) de 2,6 DCB. Agitar en vortex 15 horas. Filtrar reacción. Lavar resina con DMF (3 x 15 ml), DCM (3 x 15 ml) y éter dietílico (3 x 15 ml). Secar al vacío.		
2. Medición de la carga de la resina. Se realiza para cuantificar la cantidad de AA (eq/mmol) que se adhirió a la resina. Este valor será la referencia para los pasos subsecuentes (1 eq). Disolver 6-9 mg de la resina cargada en 10 ml de solución 20% piperidina/DMF. Incubar 15 minutos. Aforar hasta 50 ml con solución 20% piperidina/DMF. Medir absorbancia a 301 nm y calcular la carga usando la siguiente ecuación: Carga= ((AxV)/(E x W)) x 1000 A= absorbancia a 301 nm V= volumen (L) W= masa de la resina (g) E= coeficiente de extinción molar del aducto a 301 nm (7800 m ⁻¹)		
3. Bloqueo. Añadir a la resina cargada 150 µl de cloruro de benzoilo, 150 µl de piridina y 4 ml de DCM. Agitar en vortex 2 h. Lavar resina con DMF (3 x 15 ml), DCM (3 x 15 ml) y éter dietílico (3 x 15 ml).		
4. Desprotección. Agregar a la resina 10 ml de solución 20% piperidina/DMF, agitar 30 minutos. Lavar resina con DMF (3 x 15 ml), DCM (3 x 15 ml) y éter dietílico (3 x 15 ml). Verificar la correcta eliminación del grupo Fmoc por medio de la prueba de la Ninhidrina (observar color azul/purpura).		
5. Activación y acoplamiento. Disolver 3 eq del siguiente AA-Fmoc en 2.5 ml de solución DCM/DMF (4:1). Añadir 3 eq de PyBop, mezclar bien y agregar 6 eq de DIPEA. Añadir la mezcla a la resina y agitar 3 h en vortex. Lavar resina con DMF (3 x 15 ml), DCM (3 x 15 ml), éter dietílico (3 x 15 ml). Verificar correcta adición del AA con prueba de la Ninhidrina (observar color amarillo). -----> Ciclos sucesivos de desprotección y acoplamiento por cada AA.		
6. Separación de la resina. Al finalizar el proceso de elongación del péptido pesar la resina seca y colocarla en un recipiente nuevo para separarlo de la resina y eliminar grupos protectores laterales. Agregar 15 ml de solución 96.5% TFA, 1.0% TIS y 2.5% H ₂ O por g de resina y agitar 3 h. Filtrar solución y lavar con TFA (3-4 ml), combinar los filtrados. Concentrar filtrados al vacío con rotaevaporador. Resuspender concentrado en una cantidad mínima de TFA (2-3 ml). Precipitar péptido agregando 10 volúmenes de éter dietílico frío (-20°C). Centrifugar (4000 rpm x 5 min, 4 °C) y desechar sobrenadante. Recuperar precipitado y secar al vacío.		
7. Reacción de ciclado. Pesar el péptido y calcular concentración (mmol) a partir de la secuencia de AA. Disolver en 250 ml de DMF anhidro y agregar 3 eq de EDC y 6 eq de HOBT. Agitar 24 h en condiciones inertes. Concentrar al vacío con rotaevaporador. Precipitar agregando 10 volúmenes de éter dietílico frío (-20°C). Centrifugar (5000 rpm x 5 minutos, 4 °C) y desechar sobrenadante. Secar precipitado al vacío. Guardar péptido a 4 °C hasta su uso en análisis posteriores.		
8. Purificación y análisis. Purificar péptido cíclico por medio de cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC. Ensayos de resonancia magnética nuclear (RMN) para verificar estructura.		

Glosario:	DMF: Dimetilformamida. DCM: Diclorometano. 2,6 DCB: Cloruro de 2,6 diclorobenzoilo PyBop: benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate. EDC: 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida	TFA: Ácido trifluoroacético. DIPEA: N-Ethylidiisopropylamina. TIS: Triisopropil silano. HOBT: 1-Hidroxibenzotriazol	Prueba de la Ninhidrina: Colocar una pequeña cantidad de resina en un vial, añadir 200 µl de solución A (0.5 g de ninhidrina en 10 ml de etanol 10%) y 50 µl de solución B (400 µl de KCN en 20 ml de piridina). Calentar el vial a 95°C por 2 minutos y observar cambios en la coloración.
------------------	--	--	--