

# Fundamentos de la síntesis de péptidos por la técnica de Merrifield, adaptada por Héber Muñoz para realizarse en forma manual

CECILIA JUAREZ-GORDIANO  
Departamento de Inmunología  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Apartado Postal 70-228  
04510 México, D.F.

ANTONIO QUIROZ-GUTIERREZ  
Departamento de Sistemas Complejos  
Instituto de Física  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Apartado Postal 20-364  
01000 México, D.F.

y

Departamento de Química Orgánica  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
Prol. de Carpio y Plan de Ayala  
Apartado Postal 42-186  
Col. Santo Tomás  
11340 México, D.F.

JUÁREZ-GORDIANO, C. y A. QUIROZ-GUTIÉRREZ. 1994. Fundamentos de la síntesis de péptidos por la técnica de Merrifield, adaptada por Héber Muñoz para realizarse en forma manual. *An. Esc. nac. Cienc. biol., Méx.* **39**: 29-43.

**RESUMEN:** Se describen en este trabajo, los fundamentos de la síntesis de péptidos en fase sólida por la técnica de Merrifield, incorporando las diferentes modificaciones del Profr. Héber Muñoz,<sup>1</sup> las que permiten realizar la síntesis en forma manual. Se agregan ocho apéndices de las técnicas en forma sucinta para facilitar la reproducción de este tipo de síntesis.

## INTRODUCCIÓN

Dos fueron para Héber Muñoz, las tecnologías que hicieron posible la síntesis de péptidos en fase sólida: la protección selectiva de los grupos reaccionantes de los aminoácidos y la invención, por parte de Merrifield, del soporte sólido constituido por la resina clorometilada que permite reducir la síntesis a una serie de ciclos de acoplamiento constituidos por la desprotección, neutralización y acoplamiento propiamente dicho de cada uno de

los aminoácidos adecuadamente protegidos.<sup>2</sup> En la figura 1 se aprecia la esquematización del método reducido a cinco etapas hasta la separación del péptido recién sintetizado de la resina. Se podría agregar, como un tercer requisito para una buena síntesis, la separación adecuada por HPLC en fase reversa, sin la cual no se lograrían los rendimientos óptimos.

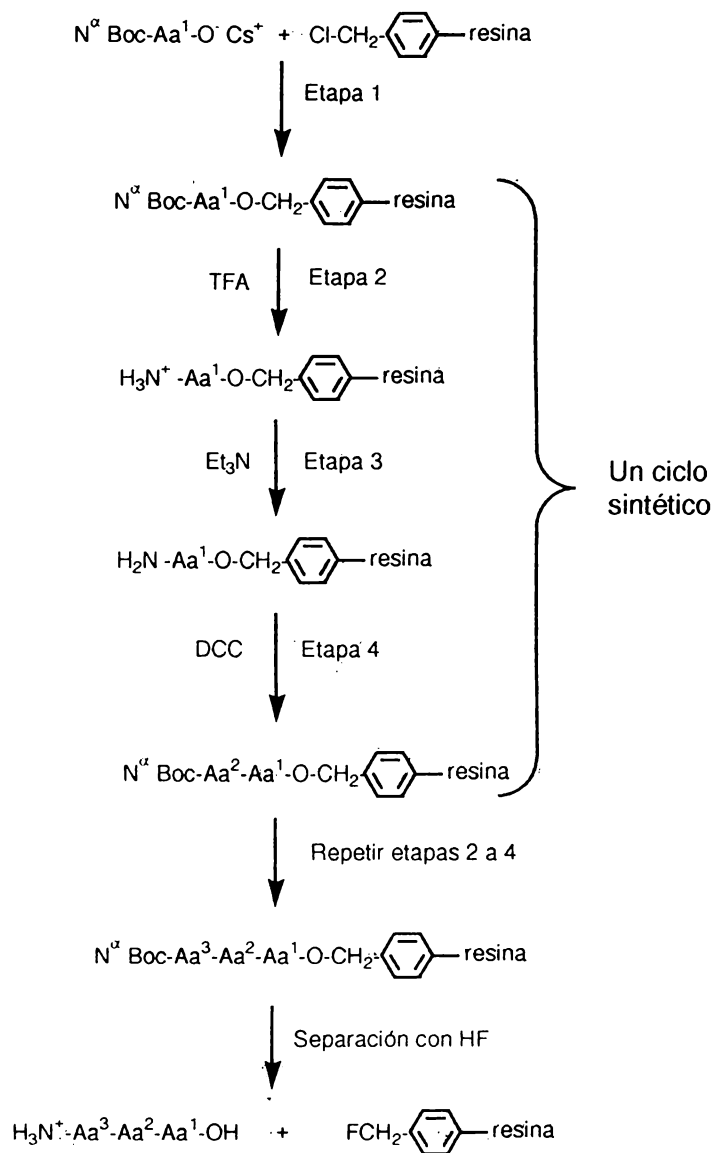


FIG. 1. Esquema general del método de síntesis de péptidos en fase sólida. Las etapas 2 a 4 constituyen el denominado ciclo sintético.

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS MANUAL EN FASE SÓLIDA

Protección de aminoácidos

La formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos (aa) estructuralmente similares, requiere que el grupo amino (del aa que se espera acoplar por su grupo carboxilo) y el grupo carboxilo (del aa que se espera acoplar por su grupo amino) así como sus cadenas laterales, de grupos reactivos (-COOH, NH<sub>2</sub>, -SH, -OH y otros) estén bloqueados durante la síntesis, a fin de evitar la formación de reacciones indeseables que compiten con la formación del enlace peptídico deseado, que da lugar a la formación de productos racémicos y ocasionan un bajo rendimiento del producto principal.

Los grupos protectores son elegidos: Por su facilidad para reaccionar con los grupos activos, por mantener cierto grado de estabilidad química bajo las condiciones en que se lleva a cabo la síntesis, por evitar la racemización del centro quiral adyacente, y por ser fácilmente eliminados bajo condiciones suaves en fases intermediarias o finales del procedimiento.<sup>3</sup>

Los dos tipos más frecuentes de protección son: La de los grupos α-amino, en la que se utiliza el grupo tert-butoxicarbonilo (Boc), y la de los grupos carboxilo α y γ en que se utiliza el grupo bencilo (Z). Existe la necesidad de proteger los grupos reactivos especiales de algunos aa en particular: así, para proteger la cadena lateral de la cisteína se utiliza el grupo tert-butoxicarbonil-S-bencilo. Para proteger los grupos hidroxilo de la serina y treonina se utilizan ésteres benzóilicos.<sup>4</sup>

Para la protección de los grupos α-amino, el grupo más utilizado en la actualidad es el tert-butoxicarbonilo (Boc) por tener una gran estabilidad a la hidrogenación catalítica, y a la acción de álcalis e hidrazinas, lo que permite la síntesis de Boc-aminoácidos con buen grado de pureza libres de contaminantes y en altos rendimientos; además, este grupo se caracteriza por ser fácilmente eliminado del extremo α-amino mediante tratamiento con ácidos moderados, por lo que es ampliamente utilizado tanto en solución como en fase sólida (Fig. 2).

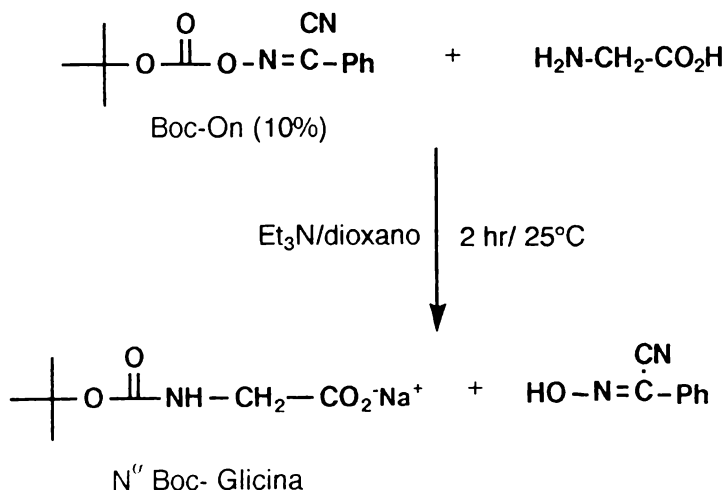


FIG. 2. Grupo ter-butoxicarbonilo (Boc) y proceso de protección de los grupos α-amino (para el caso de Nα-BocGlicina).

La protección de los grupos  $\alpha$ -amino se lleva a cabo usando un exceso (10%) de Boc y un 50% de trietilamina (TTA) en un 50% de dioxano acetona. La reacción se completa en dos a cinco horas (dependiendo del tipo de aminoácido) a temperatura ambiente, y el Boc-aminoácido se extrae fácilmente de la mezcla de reacción con éter, benceno o acetato de étilo.

La desprotección del Boc se practica por tratamiento con ácido moderado, se puede utilizar ácido trifluoroacético (ATF) al 50% en diclorometano. Los productos adicionales, aparte de la sal del aminoácido o péptido libre, son el isobuteno y el  $\text{CO}_2$  (Fig. 3).

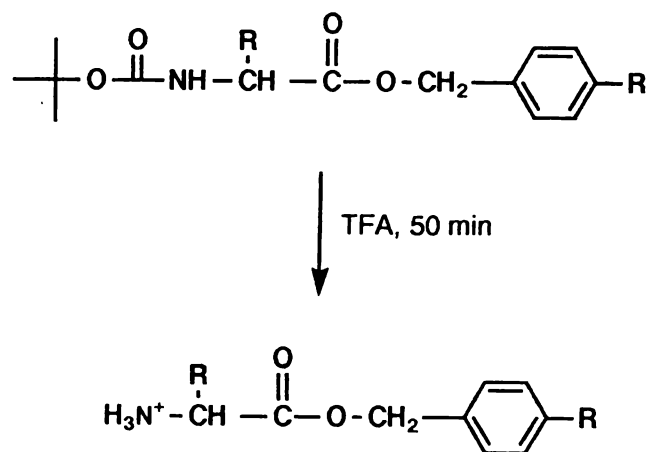


FIG. 3. Desprotección de los grupos  $\alpha$ -amino.

Héber Muñoz mejoró la técnica de protección de los grupos  $\alpha$ -amino, técnica que se tratará por separado.<sup>5</sup>

Para la protección de los grupos carboxilo se utiliza el grupo bencilo (Z) que es muy estable durante toda la síntesis y sólo se libera al final de ésta con HBr/ATF o con HF.<sup>2,5</sup>

### El soporte sólido

La resina o soporte sólido es la característica principal del método de Merrifield, contiene sitios reactivos en los cuales se une el primer aminoácido de la cadena peptídica y es estable en las condiciones físico-químicas empleadas durante la síntesis. Es importante observar el comportamiento de la resina, durante los diferentes pasos de la síntesis, así, el "hinchamiento" de la resina con algunos disolventes orgánicos como el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  o DMF resulta importante, ya que permite un rápido contacto entre los reactivos y la cadena peptídica en crecimiento. El soporte proporciona suficientes puntos de unión, lo que permite un alto rendimiento del péptido por unidad de volumen.<sup>2,7</sup>

Aunque varios tipos de materiales se han estudiado como soporte, la resina de poliestireno es la más aceptada para este tipo de síntesis. La resina, constituida por un copolímero de estireno y divinilbenceno, contiene grupos reactivos clorometilados y grandes cadenas alquílicas con anillos fenílicos en carbonos secundarios, en forma de pequeñas perlas de 20 a 70  $\mu$  de diámetro y de grandes cadenas de álcali que contienen anillos fenílicos en carbonos secundarios. Las cadenas están entrecruzadas aproximadamente cada 50 car-

bonos por residuos p-dietilfenílico, derivados del divinilbenceno. El grado de entrecruzamiento determina la insolubilidad, el hinchamiento y la estabilidad física de la resina (Fig. 4).

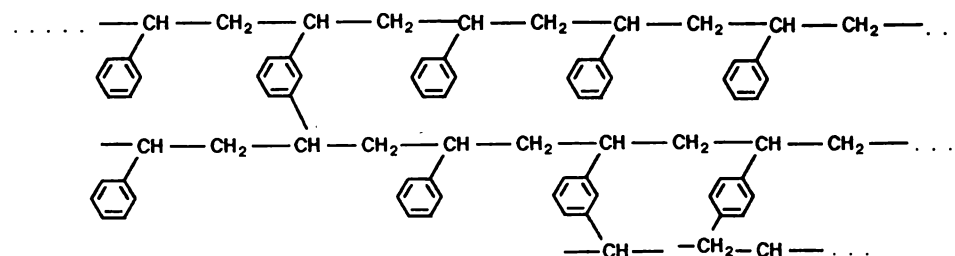


FIG. 4. Estructura parcial de la resina o soporte sólido de copolímero estireno-divinilbenceno.

Para lograr un buen hinchamiento y una buena permeabilidad, la cantidad de divinilbenceno usada en la copolimerización debe ser del 1% al 2%. Con un 1%, el copolímero se hincha muy bien en disolventes orgánicos clorados y aromáticos tales como la dimetilformamida, diclorometano y tolueno, para producir una estabilidad aceptable durante la síntesis.<sup>4,6</sup>

Aunque la resina original hecha por Merrifield aún es muy utilizada, se han introducido numerosas modificaciones como la hidroximetilresina, la aminobencidril o resina de Wong y la para-acetamido-metil-resina o PAM-resina.<sup>7</sup> También se han utilizado polímeros semejantes a péptidos, algunos derivados de copolímeros de poliestireno, y otras moléculas como polidietileniminas.<sup>6</sup> Héber Muñoz y Gonzalo Trujillo trabajaron en la síntesis de nuevas PAM-resinas.<sup>8</sup>

#### Unión del primer aminoácido al soporte sólido

El primer paso de la síntesis es la unión del grupo  $\alpha$ -carboxilo del aminoácido carboxilo terminal de la secuencia deseada al soporte sólido y, posteriormente, extender la cadena hacia el extremo  $\alpha$ -amino por adición del aminoácido protegido y activado.

La reacción utilizada para la unión del aminoácido  $\alpha$ -carboxilo terminal depende del tipo de resina empleada. Para la resina clorometilada, la reacción que se lleva a cabo es la esterificación por medio de las sales de cesio del Boc-aminoácido, originando la sustitución en el soporte de grupos Cl<sup>-</sup> por el ion carboxilato del Boc-aminoácido (Fig. 5).

El aminoácido carboxilo terminal del péptido deseado, se une al soporte sólido por un enlace covalente tipo éster<sup>7</sup> mediante la O-alkilación de su ion carboxilato. La unión tipo éster fue seleccionada por Merrifield debido a su resistencia a ácidos, a condiciones de acoplamiento sucesivos y a la susceptibilidad de romperse al finalizar la síntesis.<sup>2</sup>

Las sales de cesio son muy efectivas para la esterificación, debido a que la densidad de carga es muy baja en el catión cesio en comparación con los cationes de potasio, sodio y litio. Las sales de cesio de un Boc-aminoácido entran más rápidamente al interior no polar de la resina de poliestireno.<sup>3</sup>

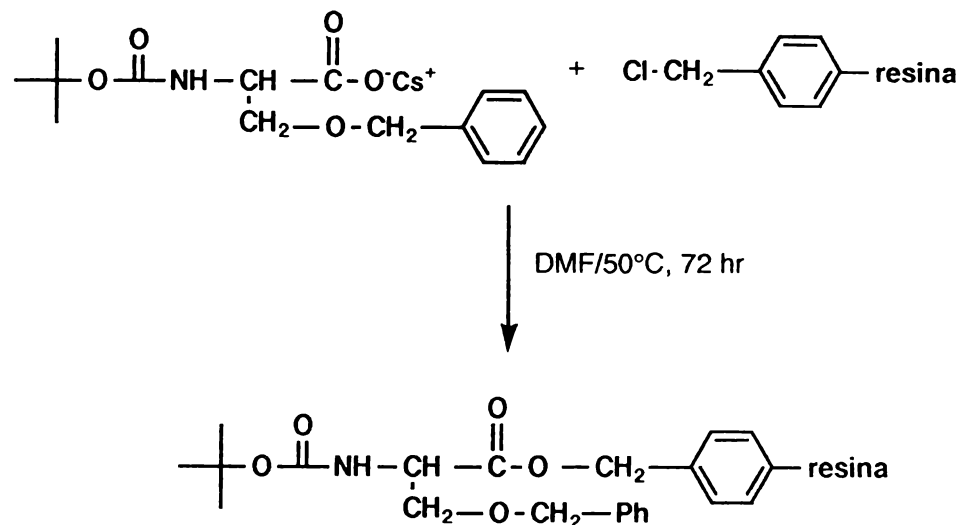


FIG. 5. Unión del primer aminoácido N $\alpha$ -Boc(O-Bzl) Ser por esterificación de las sales de cesio del aminoácido con la resina clorometilada.

El uso de las sales de cesio permite la sustitución completa de grupos clorometilo evitando la formación de grupos amonio cuaternarios, los que pueden intercambiar aniones y por lo tanto proporcionar valores inadecuados en los procedimientos de monitoreo durante el paso de neutralización. La sustitución de resinas clorometiladas también se ha llevado a cabo con Boc-aminoácidos y tert-butóxidos de potasio, el procedimiento es muy rápido y evita también las reacciones de cuaternización.

#### Procedimiento de monitoreo

El método de picrato desarrollado por Gisin<sup>10</sup> emplea métodos espectrofotométricos a fin de determinar el número de grupos amino libres por gramo de resina, y por lo tanto puede dar una indicación exacta de la carga del aminoácido carboxilo terminal unido a la resina, suponiendo que todos los grupos amino libres son efectivamente funciones  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> y no derivados de la sustitución incompleta.

Gisin desarrolló un procedimiento de monitoreo basado en la retención temporal de aniones picrato por grupos amino libres residuales, los cuales se presentan cuando la aminoácil resina se trata con una solución de ácido pícrico en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Posteriormente el desplazamiento cuantitativo de picrato con una solución de trietilamina en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la medida de absorbancia a 358 nm de la solución, proporciona una estimación cuantitativa de grupos aminoreaccionantes (apéndice IV).

El éxito del método depende de la ausencia de otros grupos que retengan picrato y por ello, proporcionen valores falsos. El mayor problema ocurre si el péptido contiene uno o más residuos de histidina. El método de Gisin también puede usarse para monitorear los pasos de desprotección y acoplamiento.

### Neutralización

Durante la eliminación acidolítica de los grupos  $N\alpha$ -protegidos, el extremo  $\alpha$ -amino queda protonado (Fig. 6), los grupos  $-NH_3^+$  libres deben regenerarse, antes de que se acople el siguiente aminoácido protegido. A este proceso se le denomina neutralización y consiste en tratar a la aminoacil-resina o peptidil-resina con un exceso molar de una amina terciaria alifática.

El agente usado para la neutralización es una solución al 5% ó 10% de trietilamina en  $CH_2Cl_2$ , DMF o  $CHCl_3$ . La trietilamina debe estar libre de aminas primarias o secundarias para evitar reacciones laterales, por lo que el disolvente se destila con ninhidrina o naftilisocianato.<sup>6</sup>

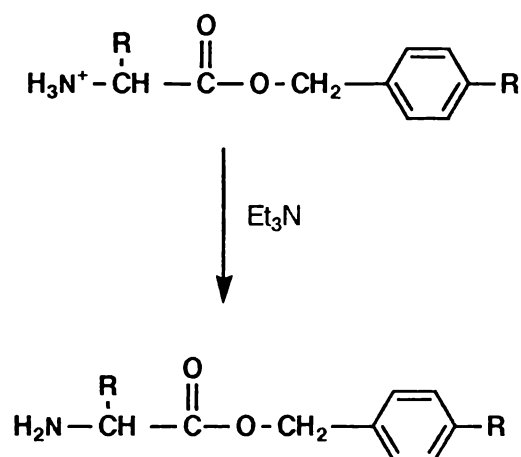


FIG. 6. Neutralización de la amina protonada con la amina terciaria durante los ciclos sintéticos.

En la neutralización puede ocurrir la alquilación de aminas por grupos clorometilados no substituidos en la resina, resultando la formación de grupos amonio cuaternarios; sin embargo la trietilamina y la diisopropiletilamina ofrecen efectos estéricos que disminuyen el intervalo de alquilación de estas bases terciarias.<sup>4</sup>

Es muy importante que todas las trazas de base usadas durante la neutralización se eliminen antes de iniciar la reacción de acoplamiento ya que las sales de amonio terciarias catalizan la racemización.

### Activación y acoplamiento

Puesto que las moléculas de péptidos están formadas por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, la principal reacción en la formación de tales cadenas es la acilación de grupos  $\alpha$ -amino de un aminoácido con el extremo  $\alpha$ -carboxilo de un segundo aminoácido, formándose un enlace tipo amida.<sup>9</sup> Esta reacción no es espontánea, por tanto es necesario que uno de los dos grupos sea convertido a una forma más activa para promover la formación del enlace.

La reactividad en los derivados de los ácidos carboxílicos está dada por el aumento en la electrofilia del átomo de carbono del carboxilo acilante, la baja densidad electrónica de este átomo está muy disminuida por el efecto inductivo negativo del sustituyente activante, conduciendo generalmente a una especie muy estable. Esto da como resultado un centro electrofílico fácil de ser atacado por el grupo amino nucleofílico (Fig. 7). En general todos los agentes acoplantes se basan en este mecanismo.

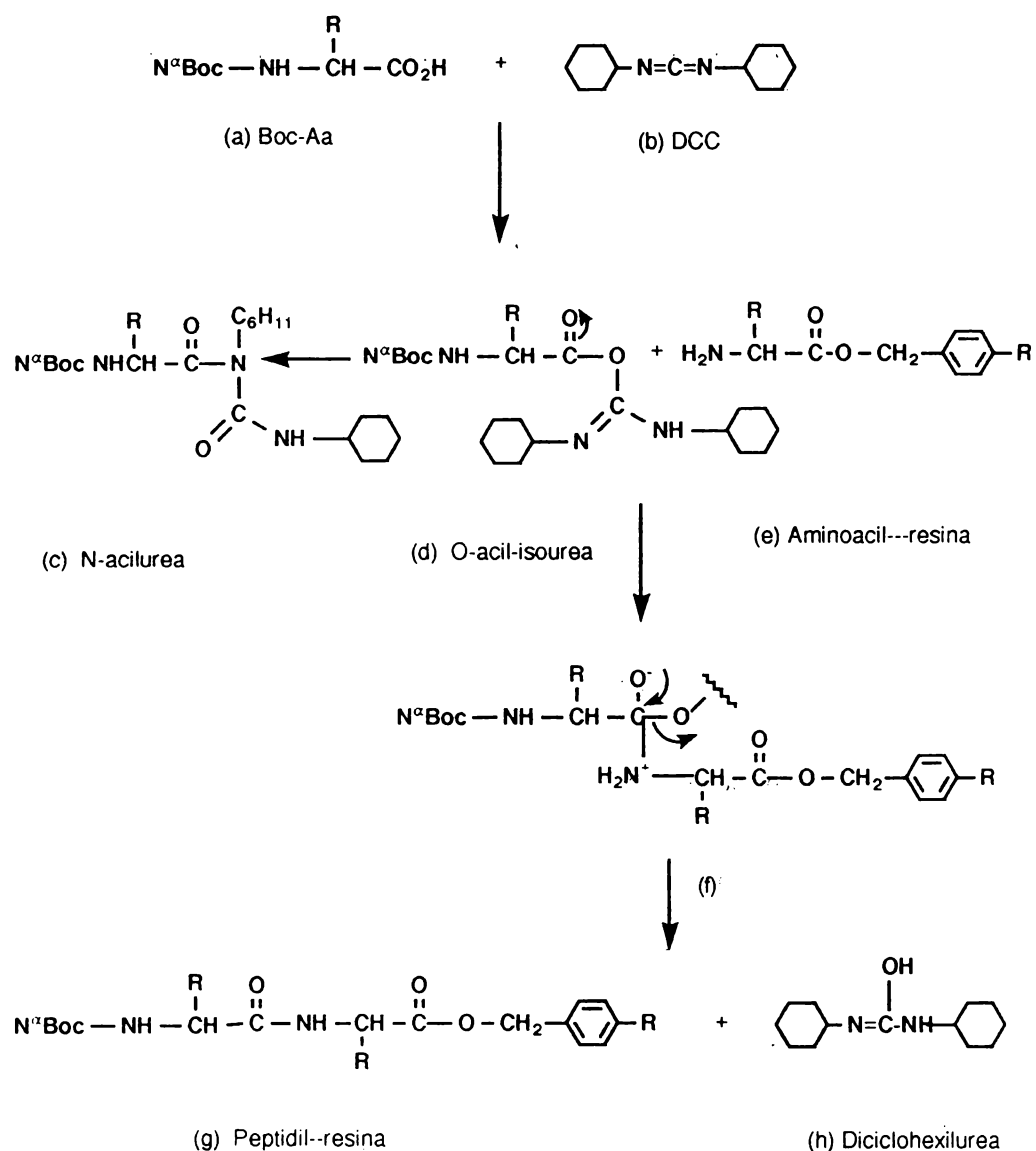


FIG. 7. Activación y acoplamiento del aminoácido entrante con DDC.



La N, N'-diciclohexilcarbodiimida, propuesta por Shehan y Hess,<sup>4</sup> es el agente acoplante más usado. El compuesto es altamente reactivo y da buenos rendimientos en tiempos de reacción relativamente cortos. Se utiliza para acoplamientos tanto en solución como en fase sólida.

La DCC reacciona con el grupo  $\alpha$ -carboxilo del Boc-aminoácido entrante para formar un intermediario activo. El primer compuesto activado en la reacción de acoplamiento es la O-acilisourea (Fig. 7d), es muy activo y reacciona rápidamente con el grupo  $\alpha$ -amino nucleofílico del aminoácido unido a la resina. La vida media de este intermediario es relativamente corta y puede ocurrir una reacción lateral competitiva con la forma inactiva N-acilurea (Fig. 7c), esto ocurre cuando la O-acilisourea no es consumida por una reacción alternativa; por ejemplo, la formación del enlace peptídico por ataque nucleofílico del grupo  $\alpha$ -amino de un péptido o aminoácido. Estas consideraciones sugieren que los tiempos de reacción largos pueden ser desfavorables, por lo que este paso debe limitarse a dos horas o menos.

El subproducto es la N',N'-diciclohexilurea (Fig. 7h), es eliminado del producto por abundantes lavados sin pérdida del péptido. La reacción de acoplamiento depende de los disolventes. Los disolventes de altas constantes dieléctricas que promueven el hinchamiento de la resina, tales como DMF o  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , son muy efectivos.

#### Separación de la cadena peptídica

Una vez concluida la síntesis del péptido deseado, éste se separa del soporte sólido por una reacción de acidólisis, que rompe el enlace tipo éster entre el péptido y la resina. Aunque el reactivo originalmente utilizado por Merrifield para romper este tipo de enlace fue el HBr en ATF,<sup>2</sup> posteriormente fue reemplazado por el HF líquido, propuesto por Sakakibara y Shimonishi,<sup>12</sup> el cual corta no sólo el enlace entre péptido y resina, sino que simultáneamente libera los grupos protectores laterales de la molécula sintetizada, por lo que actualmente es el más utilizado.

Así, el tratamiento de la peptidil-resina con HF líquido por una hora a 0°C elimina todos los grupos protectores de las cadenas laterales y corta el enlace entre el péptido y la resina (Fig. 8). La adición de anisol a la mezcla de reacción, que funciona como un captador de electrófilos, evita la formación de reacciones laterales que redundarían en

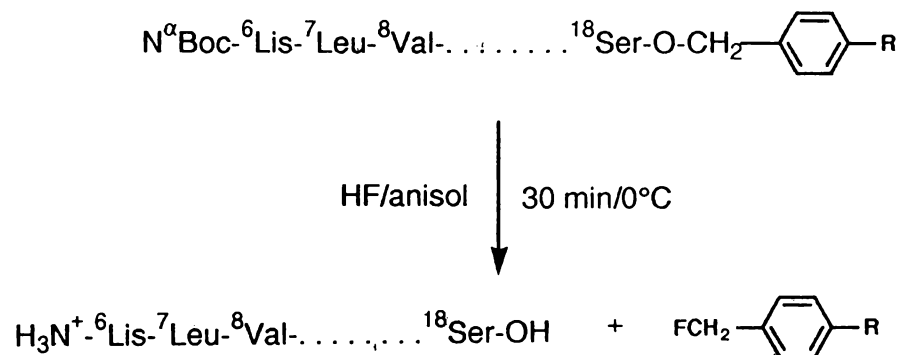


FIG. 8. Separación y desprotección de la cadena peptídica por acidólisis con HF líquido.

un bajo rendimiento del péptido sintetizado. Scotchler recomienda el uso de 1 mmol de anisol por ml de HF, lo cual corresponde a un volumen 10:1 de HF-anisol.<sup>4</sup>

#### PURIFICACIÓN POR HPLC EN FASE REVERSA

Una vez separados de la resina, la purificación de los péptidos es esencial, ya que de la pureza del péptido dependen los resultados de su uso, podemos decir que las técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida, con todas sus ventajas, sólo han pasado a ser operantes una vez que se desarrollaron, las técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa, lo que hizo posible la separación óptima de subproductos indeseables del péptido planeado.

En la síntesis en fase sólida, existen como contaminantes normales, una serie de péptidos que podríamos clasificar como sigue:

- a) Péptidos modificados con uno o más residuos alterados.
- b) Péptidos sobreadicionados con uno o más residuos.
- c) Péptidos cortos intermedios con la pérdida de uno o más residuos intermedios.
- d) Péptidos cortos terminales con uno o varios residuos terminales faltantes.

Como se comprenderá fácilmente, las diferencias físicas y químicas del péptido ideal terminado con sus péptidos contaminantes son muy pequeñas, por lo que sólo las técnicas de HPLC en fase reversa han logrado separar los péptidos deseados con un alto grado de pureza.

El HPLC de fase reversa se basa en las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas entre los diferentes péptidos. Para lo cual hace uso de una fase estacionaria de carbono-silicio y una fase móvil de disolventes orgánicos, determinando así las diferencias de adsorción entre el péptido deseado y sus contaminantes péptidos modificados.<sup>11</sup>

La elección de la fase móvil óptima y en general de las condiciones cromatográficas para la separación, puede ser encontrada por ensayo y error, sin embargo, es posible la predicción del tiempo de retención del péptido en la columna, de acuerdo a la estimación del balance de los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos del péptido.<sup>11</sup>

#### CONTROL DE CALIDAD

1. Control de calidad de los aminoácidos bloqueados (véase 5).
2. Control de calidad de la unión del primer aminoácido  $N\alpha$  Boc(0-Bzl) Ser a la resina clorometilada (ver apéndices III y IV).
3. La titulación de los grupos  $\alpha NH_2$  libres, se lleva a cabo por el método de Gisin después que se hayan formado las sales de cesio del  $N\alpha$  Boc-(0-Bzl)aa y de unir este primer aminoácido a la resina, lo que permite determinar un rendimiento cuantitativo. Se titula la cantidad de grupos amino para cuantificar los aminoácidos que substituyeron a los iones cloro ( $Cl^-$ ) en la resina con ácido pícrico. A la solución del aminoácido libre en ácido pícrico con  $CH_2Cl_2$  ya hidrolizada, se le determina la absorbancia a una longitud de onda de 358 nm en un espectrofotómetro.

Para determinar la concentración de grupos amino o la cantidad de aminoácidos unidos a la resina, se usa la siguiente fórmula:

$$Ab = \epsilon c \quad (1)$$

donde:

$Ab$   $\equiv$  absorbancia

$\epsilon$  = coeficiente de extinción

$c$  = concentración molar

El coeficiente de extinción para este tipo de compuestos es de 14,500, despejando  $c$  de (1) tenemos:

$$c = Ab/\epsilon$$

$$c = 1.02 \times 10^{-4} \text{ moles}$$

El control de calidad del aislamiento y purificación de los péptidos sintetizados se puede llevar a cabo por HPLC analítica o semipreparativa. El aislamiento del (os) péptido (s) puro (s) de las mezclas crudas de reacción es crucial, ya que no se llevan a cabo otros procedimientos de purificación intermediaria durante los ciclos sintéticos.

## SUMMARY

Chemical synthesis of peptide chains is one of the experimental tools available to the modern biological researcher. In this paper we will describe a set of synthetic chemistry that allows the rapid synthesis in a good yield and high purity. This is an optimized version by Héber Muñoz from solid phase peptide synthesis Merrifield method in manual form.

**APÉNDICE I**

Preparación de la sal de cesio del  $N\alpha$ Boc(O-Bz)aa.

1. En un matraz erlenmeyer de 50 ml disolver 1.8 g de  $N\alpha$  Boc(O-Bz)aa en 10 ml de metanol; cuando el Boc-aminoácido queda en solución, diluir con un volumen igual (10 ml) de agua destilada.
2. Por separado, en un matraz erlenmeyer de 20 ml, solubilizar 1.22 g de  $Cs_2CO_3$  en 10 ml de agua destilada.
3. Con la solución acuosa de  $Cs_2CO_3$  se titulará en un potenciómetro el  $N\alpha$ Boc(O-Bz)aa hasta obtener un pH de 7.0.
4. La solución se evapora inmediatamente en un rotavapor a temperatura de 50°C para luego liofilizar.
5. Esto permitirá obtener la sal del Boc-aminoácido como un sólido blanco.

**APÉNDICE II**

Técnica para calcular la cantidad de aminoácido unido a la resina.

Dado que se trata de una técnica espectrofotométrica, los cálculos se hacen con la fórmula:

$$c = Ab/\epsilon$$

donde:  $Ab$  = Absorbancia del compuesto,  $\epsilon$  = coeficiente de extinción ( $14,500 M^{-1}$ ), y  $c$  = concentración de aa unido a la resina.

La solución resultante que se obtiene por la técnica de Gisin se lee al UV a 358 nm, y la absorbancia que se obtuvo al leer la solución de un hidrolizado de  $N\alpha$ Boc(O-Bz) Serina fue de 1.49.

Por lo tanto, sustituyendo estos valores en la fórmula anterior se obtiene:

$$c = Ab/\epsilon = 1.49/14500 = 1.027 \times 10^{-4} \text{ moles/l}$$

La solución resultante se diluye en 500 ml de MeOH, y el valor anterior se divide entre 2:

$$1.027 \times 10^{-4}/2 = 0.51 \times 10^{-4} \text{ moles/500 ml}$$

y como la muestra tomada para hacer la determinación fue de 40 mg:

$$0.51 \times 10^{-4} \text{ moles: 40 mg} :: 1000 \text{ mg}$$

resulta:

$$x = 1.28 \times 10^{-3} \text{ moles de aa/g de resina.}$$

Esta es la cantidad de aminoácido por gramo de resina, 1.28 mmoles/gramo de resina.

Como se debe agregar un exceso de Boc-aminoácido (2 equivalentes) por gramo de resina en cada acoplamiento, resulta:

$$1.28 \times 2 = 2.56 \text{ mmol de Boc-aminoácido/g de resina.}$$

Esta es la cantidad de aminoácido que se debe agregar en cada acoplamiento. Como la resina clorometilada tiene 1.25 mmoles de cloros capaces de ser substituidos por cada g de ésta, y como el valor que se obtuvo fue de 1.28 moles de Boc-aminoácido en cada gramo, el rendimiento fue del 100%.

### APÉNDICE III

Formación del éster Boc-aminoacil-resina (unión del primer aminoácido a la resina).

1. En un matraz bola de 100 ml preparar una mezcla con 20 ml de DMF y 3 g de sal de cesio del  $N\alpha$ Boc(O-Bzl) aminoácido, agitando hasta que homogenice.
2. Ya homogénea, adicionar 3 g de la resina clorometilada de Merrifield.
3. La mezcla permanecerá en agitación moderada por 72 horas a 50°C en un baño de aceite.
4. Terminada la reacción, pasar la aminoacil-resina a un embudo con filtro de vidrio poroso, y lavar el compuesto con DMF,  $CH_2Cl_2$  y metanol.
5. Secar el producto en bomba de alto vacío.

### APÉNDICE IV

Titulación de grupos  $NH_2$  en la aminoacil-resina por el método de Gisin.

1. En un embudo con filtro de vidrio poroso agregar 400 mg de  $N\alpha$ Boc(O-Bzl) aa seco.
2. Adicionar una solución (5 ml) de TFA al 50% en  $CH_2Cl_2$  agitando durante un minuto y filtrar el sobrenadante.
3. Lavar la aminoacil-resina con 5 ml de  $CH_2Cl_2$  tres veces, agitando durante un minuto cada vez.
4. Adicionar 5 ml de trietilamina al 5% en  $CH_2Cl_2$  para neutralizar la aminoacil-resina. Este proceso se repite dos veces por un minuto cada vez y se filtra el residuo.
5. Lavar la resina con 5 ml de  $CH_2Cl_2$  cinco veces durante un minuto cada vez.
6. Agregar 5 ml de 0.1 M de ácido pícrico en  $CH_2Cl_2$  dos veces por tres minutos cada vez y filtrar el sobrenadante.
7. Lavar de nuevo la resina con 5 ml de  $CH_2Cl_2$  cuatro veces durante dos minutos cada vez y colectar los filtrados resultantes.
8. Diluir los filtrados obtenidos con 50 ml de  $CH_2Cl_2$  y aforar a 250 ml con  $CH_2Cl_2$ .
9. Determinar su absorbancia a 358 nm en espectrofotómetro UV-visible.

### APÉNDICE V

Ciclos sintéticos.

Los ciclos sintéticos para cada acoplamiento fueron de seis pasos:

#### A) Desprotección

1. Adicionar en un embudo con filtro de vidrio poroso 3 g de Boc-aminoacil resina.
2. Agregar 30 ml de ATF al 50% en  $CH_2Cl_2$ , agitar durante 1 minuto y filtrar el sobrenadante.
3. De nuevo adicionar 30 ml de ATF al 50% con  $CH_2Cl_2$  con agitación constante durante 30 min. y filtrar.

#### B) Primera neutralización

1. Lavar la aminoacil-resina con  $CH_2Cl_2$  cinco veces durante un minuto cada vez y filtrar.
2. Agregar 10 ml de isopropanol dos veces durante un minuto cada vez y filtrar.

3. Nuevamente lavar con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  cinco veces durante un minuto cada vez y luego filtrar.
4. Adicionar 10 ml de trietilamina al 5% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , tres veces durante un minuto cada vez y filtrar el sobrenadante.
5. Lavar con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , cinco veces durante un minuto cada vez y filtrar.

C) *Acoplamiento*

1. Disolver dos equivalentes del Boc-aminoácido entrante en un volumen mínimo de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y adicionar a la aminoacil-resina.
2. Solubilizar por separado dos equivalentes de DCC en un volumen mínimo de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y mezclar con la muestra anterior.
3. Mantener la mezcla de reacción durante 1.5 horas a temperatura ambiente y con agitación constante.

D) *Segunda neutralización*

1. Lavar con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  cinco veces durante un minuto cada vez y filtrar.
2. Adicionar 10 ml de isopropanol dos veces durante un minuto cada vez en agitación y filtrar.
3. Lavar dos veces durante un minuto cada vez, con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .
4. Agregar 10 ml de isopropanol dos veces por un minuto cada vez y filtrar.
5. Lavar cinco veces durante un minuto cada vez en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y filtrar.
6. Adicionar 10 ml de trietilamina al 5% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en agitación y filtrar.
7. Lavar cinco veces durante un minuto cada vez con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y filtrar.

E) *Segundo acoplamiento*

Se repite el paso C bajo las mismas condiciones.

F) *Ultimos lavados*

1. Lavar la aminoacil-resina con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  cinco veces durante un minuto cada vez.
2. Agregar 10 ml de isopropanol dos veces durante un minuto cada vez en agitación y filtrar.
3. Lavar dos veces durante un minuto cada vez con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .
4. Adicionar 10 ml de isopropanol con agitación dos veces durante un minuto cada vez y filtrar.
5. Lavar la resina cinco veces durante un minuto cada vez con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .
6. Secar en bomba de vacío la peptidil-resina durante 15 a 20 minutos.

Los ciclos sintéticos se repetirán tantas veces como aminoácidos lleve el péptido deseado.

Con el objeto de evitar equivocaciones en los numerosos pasos requeridos en los ciclos sintéticos, se utiliza una hoja especial de registro en la bitácora.<sup>1</sup>

## APÉNDICE VI

Rompimiento del enlace tipo éster entre el péptido y la resina.

1. En viales de teflón con agitadores magnéticos, agregar 1 g de peptidil-resina seca y 1 ml de anisol.
2. Conectar los viales al sistema de vacío, y enfriar en un baño de hielo seco-acetona.

3. Destilar a 19°C, 10 ml de HF en un vial conectado al sistema de vacío.
4. Pasar al HF ya destilado al vial que tiene la peptidil-resina, por medio del sistema de vacío.
5. Mantener la mezcla de reacción a 0°C y en agitación constante durante 30 minutos.
6. Evaporar el HF con vacío hasta que la resina cambie de color, de rojo a amarillo.
7. Ya concluida la reacción, el vial que contiene la peptidil-resina se desconecta del sistema.
8. Para eliminar los posibles residuos de HF lavar el sólido obtenido con éter etílico y se filtra el sobrenadante.
9. Por último, extraer el péptido liberado de la resina con una solución acuosa de ácido acético al 1%.
10. Practicar una segunda extracción con metanol absoluto, a fin de obtener residuos del péptido que pudieran haber quedado en la resina, y se colectarán junto con los filtrados del paso No. 9.
11. Evaporar en un rotavapor con bomba de vacío el metanol y el ácido acético, liofilizar la solución resultante hasta obtener un polvo blanco.

## REFERENCIAS

1. QUIROZ-GUTIÉRREZ, A., Héber Muñoz Martínez y la síntesis de péptidos. En este volumen.
2. MERRIFIELD, R. B. *Science*, 1965, **150**: 178.
3. HAGIWARA, M. I.; KAMURA, T., *Tetrahedron Lett.*, 1975, **49**: 4393.
4. BODANSKY, M., *Principles of peptide synthesis*; Springer-Verlag: New York, 1984.
5. MUÑOZ-MARTÍNEZ, H.; JUÁREZ-GORDIANO, C., *Técnica para proteger aminoácidos a utilizarse en la síntesis en fase sólida*. En este volumen: Juárez, G. C. y, Tesis de licenciatura, UNAM-Iztacala, 1988.; Bolaños, J., Tesis de licenciatura, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, 1984.
6. HIRS, C. H. W.; SERGE, N., *Meth. Enzym.*, 1970, **48**: 578.
7. ERICKSON, B. W.; MERRIFIELD, R. B., en: *The Proteins*; Academic Press: New York, 1976.
8. TRUJILLO, G., Tesis de licenciatura, UNAM-Zaragoza, 1990.
9. STEWART, J. M.; YOUNG, J. D., *Solid-phase peptide synthesis*, Freeman: San Francisco, 1969.
10. GISIN, B. F., *Helv. Chem. Acta*; 1963, **56**: 142.
11. GABRIEL, F. T.; MICHALEWSKY, J.; Meienhofer, J., *J. Chrom.*, 1976, 129, 287; Krieger, D. E.; Erickson, B. W.; Merrifield, R. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, **73**: 3160.
12. SAKAKIBARA, S.; SHIMONISHI, Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1965, **38**: 1412.

Recibido en enero de 1992. Aceptado para su publicación en julio de 1993.