

# BIBLIOTECAS DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS

REYES O, GARAY HE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave. 31 e/ 158 y 190, Playa. AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.

La primera versión de una biblioteca combinatoria de péptidos fue publicada en 1984. Posteriormente en 1988 se aplicó la expresión en fagos filamentosos para la generación de bibliotecas de péptidos y proteínas. Hacia el final del siglo XX ya se resumían en cuatro grandes grupos las principales variantes de bibliotecas combinatorias de secuencias peptídicas (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Bibliotecas combinatorias de péptidos

Tipos	Variantes	Referencia
Bibliotecas biológicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En fagos</li> <li>- En plásmidos</li> <li>- En polisomas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>[1, 2]</li> <li>[3]</li> <li>[4]</li> </ul>
Bibliotecas obtenidas por síntesis paralela de estructuras definidas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Síntesis en multipines</li> <li>- Síntesis en bolsas de polipropileno</li> <li>- Síntesis sobre membranas de celulosa</li> <li>- Síntesis dirigida por luz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>[5]</li> <li>[6]</li> <li>[7]</li> <li>[8]</li> </ul>
Bibliotecas con deconvolución de las mezclas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bibliotecas iterativas</li> <li>- Bibliotecas con barrido de posición</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>[9, 10]</li> <li>[11]</li> </ul>
Bibliotecas inmovilizadas sobre el soporte sólido	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bibliotecas tipo "una perla, una estructura"</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>[12]</li> </ul>

Entre los soportes sólidos más utilizados están las resinas poliméricas de poliestireno entrecruzado con 1 % de divinilbenceno (denominadas comúnmente perlas por la forma esférica que se observa al microscopio), la celulosa, el vidrio y el algodón [13]. Según el procedimiento final con el soporte sólido que se utilice, las bibliotecas de péptidos sintéticos pueden dividirse en dos grandes grupos: las bibliotecas que son liberadas del soporte sólido a una solución y las

bibliotecas en las que las moléculas de péptidos se mantienen inmovilizadas sobre el soporte sólido. En el primer caso los métodos de pesquiasaje son los utilizados en los ensayos estándar de bioactividad: ensayos de competencia de unión a un receptor, ELISA de competencia, ensayos enzimáticos, ensayos con células intactas, etc. En el segundo caso, el pesquiasaje se realiza directamente sobre la fase sólida y los resultados se visualizan con el empleo de moléculas marcadas con radiactividad o con elementos capaces de desarrollar color [14].

## **BIBLIOTECAS OBTENIDAS POR SÍNTESIS PARALELA DE ESTRUCTURAS DEFINIDAS**

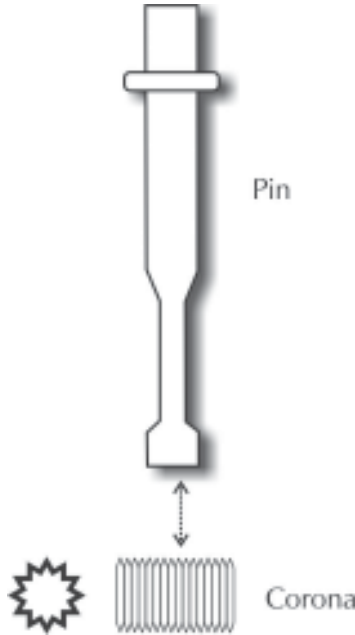
La característica fundamental de este tipo de bibliotecas es que los péptidos son sintetizados sobre la fase sólida en un formato espacialmente definido y la secuencia de los aminoácidos es predeterminada. Tanto la síntesis como el pesquiasaje de estas bibliotecas se realizan de forma paralela, es decir, teniendo en cuenta un número determinado de moléculas simultáneamente. En dependencia de la estrategia que se utilice, el pesquiasaje puede ser realizado con los péptidos anclados sobre el soporte sólido, sobre el cual se realizó la síntesis o éstos pueden ser liberados para ser ensayados en solución. En cualquiera de las dos variantes el péptido con actividad positiva puede ser fácilmente localizado e identificado estructuralmente. Esta es la mayor ventaja de la utilización de estas bibliotecas: la estructura química de los péptidos es predeterminada y por lo tanto no se necesita de ningún método químico-físico analítico para su caracterización [14]. Sin embargo, la limitación fundamental de este tipo de bibliotecas es que sólo un número relativamente pequeño de péptidos puede ser sintetizado y la biblioteca se considera generalmente muy pequeña para las necesidades de diversidad química.

Se han desarrollado cuatro técnicas fundamentales de síntesis paralela de estructuras definidas: la síntesis en multipines, la síntesis en bolsas de polipropileno, la síntesis sobre membranas de celulosa y la síntesis dirigida por luz.

### **LA SÍNTESIS EN MULTIPINES**

El método de síntesis en multipines desarrollado por H Mario Geysen [5] puede ser utilizado para la síntesis simultánea de hasta 96 péptidos tanto para el ensayo en solución como en la fase sólida. Esta técnica consiste en el ensamblaje de los péptidos en las cabezas (coronas) de los pines de polietileno (Figura 2.1) en un arreglo de 8 x 12 de acuerdo con la química convencional Fmoc-tBu. Estas coronas están recubiertas de polímero irradiado y funcionalizado de manera tal

que sea posible el acoplamiento eficiente del primer aminoácido de la secuencia peptídica. Las coronas son fácilmente reemplazables, lo que permite utilizar el mismo sistema de pines para varias síntesis consecutivas.



**Figura 2.1.** Pin de polietileno con cabeza (corona) reemplazable. La superficie de la corona está funcionalizada con grupos aminos, a los que se le acopla el primer amino ácido de la secuencia de los péptidos. Estos pines se fijan en una plataforma en un arreglo de 8 x 12 con una geometría semejante a una placa para ELISA. Esto permite realizar la síntesis simultánea de hasta 96 péptidos diferentes y los inmunoensayos en el formato estándar con placas de 96 pocillos.

Estos pines se montan en una base de plástico con una geometría que se corresponde con el formato de una placa de ELISA de 96 pocillos, lo que facilita el ensayo de actividad, tanto en solución, si se liberan los péptidos a los pocillos de la placa, como en fase sólida, si se mantienen anclados al soporte sólido. Este formato minimiza de forma efectiva los pasos de la manipulación de los péptidos relacionados con la síntesis, permite la realización de varios ensayos de actividad con las mismas moléculas y no requiere de equipamiento costoso.

Se conocen cuatro variantes comerciales de esta tecnología (Tabla 2.2) [15]. El nivel de sustitución o la carga del pin, como también se le conoce, está definida como la cantidad, en micromoles, de una secuencia determinada de un péptido que se puede generar en la síntesis sobre la corona del pin. Esta función varía en dependencia de los requerimientos de los diferentes ensayos de actividad y

se predetermina en cada variante comercial. El método de desanclaje y liberación de los péptidos a una solución está condicionado por el tipo de espaciador utilizado en la funcionalización de las coronas de los pines [16]. En el caso del juego de reactivos y medios para síntesis múltiple, la carga es relativamente alta con el objetivo de obtener cantidades suficientes para otros ensayos biológicos.

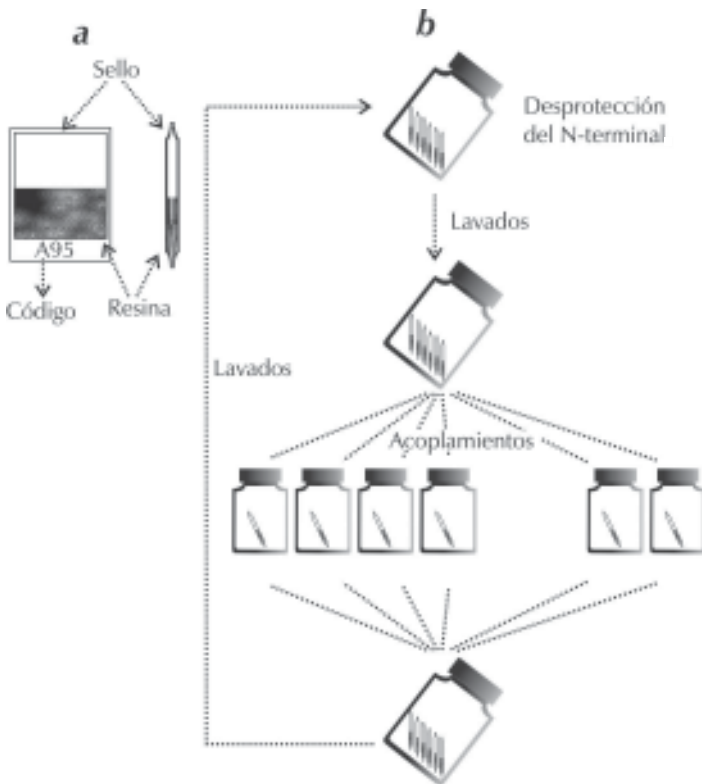
**Tabla 2.2.** Juegos de reactivos comerciales de síntesis de péptidos en multipines

Tipo de juego de reactivos	Carga (nmol/pin)	Método de desanclaje
NCP (Noncleavable multipin peptide synthesis kit) Sistema de síntesis sobre multipines sin desanclaje final de los péptidos	0,1	No es necesario
DKP (Cleavable peptide kit-diketopiperazine C-termini) Sistema de síntesis sobre multipines con desanclaje final de los péptidos con el C-terminal en forma de dicetopiperazina	1	Tratamiento con un bufer de pH 7-8 con un 40 % de acetonitrilo
GAP (Cleavable peptide kit-glycine acid or amide C-termini) Sistema de síntesis sobre multipines con desanclaje final de los péptidos con C-terminal en forma de amida o de ácido glicínico	1	Tratamiento con una solución 0,1 mol/L de NaOH con un 40 % de acetonitrilo
MPS (Multiple peptide synthesis) Sistema de síntesis de múltiples péptidos	7-8	Tratamiento con ácido trifluoracético y una mezcla de agentes nucleofílicos

## LA SÍNTESIS EN BOLSAS DE POLIPROPILENO

La síntesis en bolsas de polipropileno (Figura 2.2a) fue desarrollada por Richard A. Houghten [6, 30] y se conoce popularmente como síntesis en “bolsas de té”, por la similitud con las utilizadas en esta técnica. Inicialmente se utilizó en la preparación de una serie de análogos de un péptido de 13 aminoácidos correspondiente a la región 75-110 de la hemaglutinina (HA1) [16]. Posteriormente su uso se extendió a la obtención de bibliotecas de hasta aproximadamente 150 péptidos con diferentes secuencias.

La estrategia de síntesis de estas bibliotecas no se diferencia de la normalmente utilizada en la síntesis múltiple. La resina (60-100 mg/bolsa) se coloca en el interior de una bolsa porosa de polipropileno, generalmente de 30 x 40 mm, se sella y se codifica. El ensamblaje de los péptidos se realiza colocando cada bolsa en la solución individual del aminoácido correspondiente, aunque en dependencia de las secuencias diseñadas, varias bolsas pueden coincidir en una misma solución. Todos los pasos comunes, como los lavados y la desprotección de los grupos  $N^{\alpha}$ -aminos, se pueden realizar simultáneamente en un solo frasco de reacción (Figura 2.2b). Al final del proceso de síntesis, cada bolsa contiene una secuencia peptídica única que se libera de la fase sólida también de forma múltiple y simultánea en equipos especiales para estos fines.



**Figura 2.2 a.** La resina se coloca en el interior de la bolsa porosa de polipropileno con el código correspondiente. El diámetro de los poros permite el flujo de los reactivos y solventes hacia dentro y fuera de la bolsa. **b.** Representación del esquema de la síntesis múltiple con el uso de estas bolsas permeables. Algunos pasos comunes se pueden realizar simultáneamente en un solo frasco de reacción.

El uso más efectivo que ha encontrado esta técnica ha sido en el mapeo de epítomos [31], en la caracterización estructural de proteínas [32] y en conjunto con algunos métodos de predicción estructural para el diseño de fármacos [33].

La ventaja fundamental de la aplicación de esta técnica para la preparación de bibliotecas de péptidos es que se pueden producir cantidades suficientes de estas moléculas (0,05-0,5 mmoles) para la purificación y la caracterización, si es necesario. Estas bibliotecas pueden ser efectivas cuando se utilizan en ciclos avanzados de pesquiasaje, donde las posibilidades se reducen a un número menor de moléculas y crece la necesidad de cantidades suficientes de cada compuesto para ensayos más restringentes.

## LA SÍNTESIS SOBRE MEMBRANAS DE CELULOSA

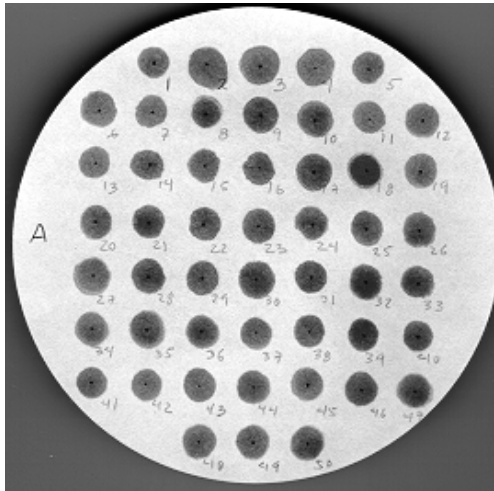
La síntesis sobre membranas de celulosa se desarrolló, en un primer intento, como una técnica rápida para el estudio de sitios de unión de anticuerpos con péptidos inmovilizados sobre un área predefinida. Este nuevo concepto de síntesis paralela en fase sólida de péptidos fue desarrollado por Ronald Frank [7] y utiliza la estrategia de síntesis Fmoc-/tBu. El fundamento del método consiste en la utilización de la superficie previamente funcionalizada de una membrana de celulosa como soporte sólido para el ensamblaje de secuencias peptídicas. La síntesis se realiza con la aplicación de un volumen conveniente de la mezcla de reacción que contiene el amino ácido protegido en un solvente poco volátil como la N,N-dimetilformamida o la N,N-dimetilacetamida sobre la membrana de celulosa. Esta mezcla, mientras se absorbe y difunde en una superficie circular (mancha) de un diámetro proporcional al volumen que se dispensa, reacciona con los grupos reactivos que se encuentran dentro de esta área [34]. Esta operación se puede realizar paralelamente y formar un gran número de estas manchas en una misma superficie integra de celulosa, de manera que si en cada volumen dispensado se utiliza un monómero diferente, en cada mancha se ensamblará una molécula de péptido con una secuencia diferente.

Con la funcionalización de la superficie de la membrana de celulosa se introducen los grupos aminos necesarios para el posterior ensamblaje de las secuencias peptídicas, según el procedimiento convencional de síntesis. Generalmente se utiliza la esterificación de la Fmoc-βAla con los grupos hidroxilos de la celulosa en presencia de activadores como el N-metilimidazol y la N,N'-diisopropilcarbodiimida. En la definición del área de las manchas se utiliza una segunda βAla, con lo que queda ensamblado el brazo espaciador βAla-βAla. El resto del área de la membrana queda inactivada por una acetilación.

El volumen dispensado y la capacidad absorbente de la membrana determinan la dimensión de la mancha. A su vez, el tamaño de la mancha determina la distancia

mínima entre cada una y por lo tanto el número total de estas distribuidas en una membrana de celulosa de dimensiones dadas [35]. Cada mancha se identifica escribiendo con lápiz un número consecutivo que se corresponde con una secuencia específica en el listado de los péptidos a sintetizar. Esta identificación permite una rápida distribución de las soluciones de los derivados de aminoácidos activados en cada ciclo de elongación de la secuencia. Este procedimiento puede ser auxiliado por un programa de computación.

Los grupos aminos libres sobre la membrana se pueden teñir con bromofenol azul [36] antes de la reacción de acoplamiento del próximo derivado de aminoácido (Figura 2.3). Esta tinción no destructiva permite el control visual de la eficiencia del dispensado de los volúmenes, de la eficiencia de cada acoplamiento y de la eliminación de las protecciones temporales de los grupos aminos terminales. Como en la tecnología de síntesis sobre multipines, todos los Fmoc-derivados de aminoácidos son acoplados con el método de activación con N,N'-diisopropilcarbodiimida y 1-hidroxibenzotriazol. Debido a la caída en la eficiencia de los acoplamientos, no se recomienda la síntesis de péptidos con más de 15 residuos en la secuencia.



**Figura 2.3.** Membrana de papel Whatman 540 (9 cm de diámetro) con 50 manchas teñidas con bromofenol azul. La identificación de la membrana (A), así como la enumeración de los diferentes péptidos se realiza con lápiz directamente sobre la superficie del papel.

Una vez que se ensambla paralelamente la secuencia de cada péptido, se procede a la desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos. Este paso infiere un tratamiento con ácido trifluoroacético al 50 %, 3 % de triisobutilsilano

y 2 % de agua en diclorometano durante dos horas a temperatura ambiente. Después de varios lavados con diclorometano, N,N'-dimetilformamida y etanol consecutivamente, la membrana queda lista para los ensayos biológicos.

## ***ENSAYOS DE UNIÓN CON ANTICUERPOS***

La técnica de los péptidos sintetizados sobre membranas de celulosa fue utilizada inicialmente para el mapeo de epítomos con anticuerpos monoclonales [37, 38] y se siguió el procedimiento estándar para un ELISA (Figura 2.4). Sin embargo, la práctica ha mostrado la utilidad de esta técnica en ensayos de unión con sueros totales, proteínas purificadas y péptidos sintéticos [39, 40].

**Figura 2.4.** Esquema de reconocimiento de un péptido en un ensayo inmunoenzimático

De forma general se puede aplicar el siguiente procedimiento para estos ensayos biológicos:

1. La membrana de celulosa se lava varias veces con una solución de T-TBS (0,05 % de Tween-20 en un solución de Tris 10 mmol/L, NaCl 150 mmol/L a pH 7.6).
2. Se bloquea con una solución de leche al 5 % en TBS (Tris 10 mmol/L, NaCl 150 mmol/L pH 7.6) durante toda la noche a 4 °C o por un período de tres horas a temperatura ambiente.
3. Se incuba con agitación durante dos o tres horas a 37 °C con la solución del anticuerpo, diluida en leche al 5 % en TBS.

4. Se incuba durante una hora con la solución del anticuerpo secundario conjugado a la fosfatasa alcalina en leche al 5 % en TBS.
5. Se añade finalmente el sustrato BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) a 0,3 mg/mL, diluido en la solución tampón Tris-HCl 0.1 mol/L, NaCl 0.1 mol/L, MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L) a pH 8,7. La reacción se detiene con lavados de PBS al aparecer la coloración azul en determinadas manchas.

La aparición de la coloración sobre la superficie de las manchas indica el reconocimiento de una secuencia determinada por el anticuerpo. El procedimiento para sueros, proteínas, péptidos sintéticos u otras moléculas puede ser el descrito con modificaciones específicas para cada ensayo. La concentración adecuada de la molécula blanco utilizada en el pesquisaje de los péptidos con actividad biológica positiva se determina con ensayos progresivos de disminución de la dilución.

Una de las ventajas de esta técnica es la posibilidad de reutilizar la membrana en varios pesquisajes sucesivos. Si durante los ensayos biológicos, la membrana no sufre daños significativos, como por ejemplo un exceso en la intensidad del color del revelado, es posible su utilización en no menos de 10 experimentos consecutivos. Pero antes de cada próximo ensayo es necesaria la regeneración de la membrana.

Este se logra con un procedimiento sencillo:

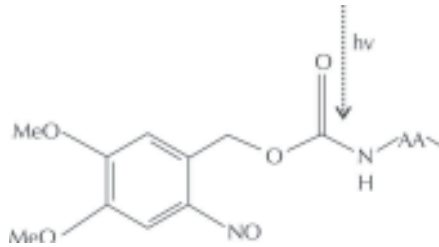
1. La membrana de celulosa se lava dos veces con agua y tres veces con DMF. Si el color azul del sustrato precipitado no es eliminado en los primeros lavados con DMF, el tercer lavado se debe realizar con ultrasonido.
2. Se realizan lavados con agua y se trata con una solución de urea 8 mol/L, SDS al 1 % y 2-mercaptoetanol al 0,1 % en agua a 40 °C con ultrasonido (3 veces durante 5 min).
3. Finalmente se lava tres veces durante cinco minutos con una solución de etanol al 30 % y ácido acético al 20 % en agua y 2 veces con etanol.

De esta forma la membrana de celulosa queda lista para un próximo ensayo o se seca y se guarda a -20 °C si no se va a utilizar de inmediato.

## LA SÍNTESIS MEDIADA POR LUZ DIRIGIDA

La síntesis de péptidos mediada por luz dirigida es una combinación de la síntesis múltiple y paralela con la fotolitografía, tecnología desarrollada para la producción de microchips de computadoras. La metodología para la obtención de estas bibliotecas fue descrita por Stephen PA Fodor y colaboradores

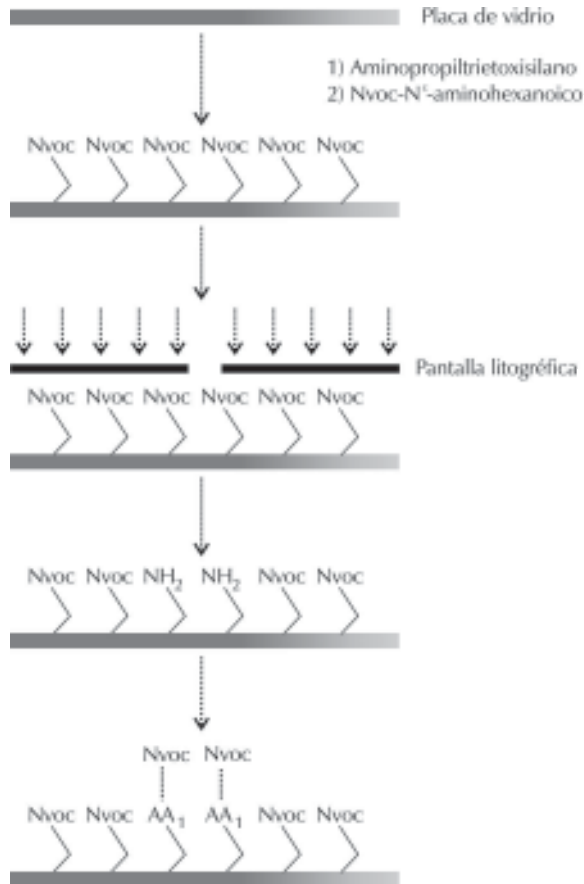
[8] y consiste en ensamblar sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio para trabajos al microscopio, previamente funcionalizado con grupos aminos, las secuencias de los péptidos. Es imprescindible utilizar el grupo nitroveratriloxicarbonilo (Nvoc-) para proteger el grupo N<sup>α</sup>-amino de los aminoácidos empleados durante la síntesis (Figura 2.5), el cual se elimina fácilmente en presencia de luz ultravioleta.



**Figura 2.5.** Estructura química del grupo N<sup>α</sup>-amino protector, nitroveratriloxicarbonilo (Nvoc-). Cuando se irradia con luz ultravioleta a 365 nm, el enlace entre el grupo Nvoc- y el aminoácido (AA) se rompe y libera al grupo amino para una posterior reacción con otro aminoácido.

En general, el procedimiento es el siguiente: se funcionaliza la superficie de vidrio con aminopropiltriethoxisilano, se hace reaccionar toda la superficie con ácido Nvoc-N<sup>α</sup>-aminohexanoico, se desprotegen los grupos aminos de una región específica irradiando con luz ultravioleta de 365 nm a través de una pantalla litográfica en presencia de una solución 5 mmol/L de ácido sulfúrico en dioxano, se lava y se hace reaccionar la superficie irradiada con otro aminoácido determinado (Figura 2.6). Este ciclo de operaciones se repite con diferentes pantallas litográficas y con el número de aminoácidos que sea necesario. Es posible un alto grado de miniaturización para la obtención de miles de diferentes péptidos en un área tan pequeña como 1 cm<sup>2</sup>.

Por último se realiza un tratamiento con ácido trifluoroacético que elimina los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos. Los péptidos libres quedan anclados sobre la superficie del vidrio, listos para los ensayos de pesquisaje. Una de las estrategias de pesquisaje más recomendadas es la utilización de anticuerpos marcados con fluoresceína. En este caso la eficiencia de la unión de los anticuerpos es proporcional a la intensidad de la fluorescencia en una superficie dada y se puede medir en un microscopio fluorescente [41]. La utilización de un equipamiento adicional para la irradiación de la superficie de síntesis y para la detección de los péptidos reconocidos por los anticuerpos ha motivado que esta variante de bibliotecas de péptidos sintéticos sea poco utilizada.



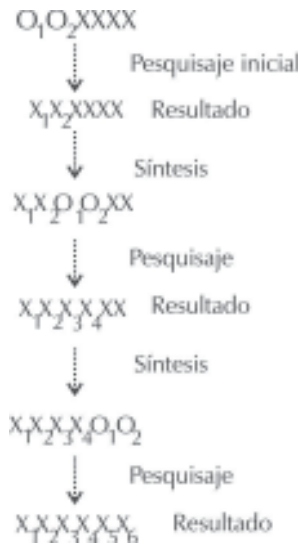
**Figura 2.6.** Síntesis de péptidos mediada por luz dirigida. El uso de la luz ultravioleta para la desprotección de los grupos Nvoc- es controlada por la presentación sobre la superficie del vidrio de diferentes pantallas litográficas.

Este tipo de bibliotecas implica la síntesis de mezclas con un alto grado de diversidad. A diferencia de la síntesis paralela de estructuras definidas, la localización espacial de una secuencia dada no puede ser determinada, es decir, como resultado del diseño de la mezcla combinatoria de péptidos, se conoce sólo todas las posibles secuencias presentes en la mezcla, pero espacialmente no pueden ser asignadas. Por lo tanto la identificación de los péptidos activos debe ser realizada por un proceso iterativo de pesquiasaje y resíntesis de mezclas cada vez mas pequeñas en cuanto al número de moléculas que las integran. Este proceso se conoce como *deconvolución* y a las mezclas que se generan en cada proceso iterativo y que representan sólo una parte de la biblioteca inicial, se les denomina *subbibliotecas*.

De acuerdo a la estrategia de deconvolución de las mezclas, se ha generalizado el uso de dos variantes de estas bibliotecas combinatorias de péptidos sintéticos: las bibliotecas iterativas y las bibliotecas con barrido de posición. Sin embargo, la práctica no se limita a estas variantes solamente, se han probado otras estrategias como la de Blake y colaboradores [42] y la de Erb y colaboradores [43] que merecen ser revisadas en sus informes originales.

## BIBLIOTECAS COMBINATORIAS ITERATIVAS

La variante de bibliotecas combinatorias iterativas de péptidos sintéticos fue aplicada por primera vez en la síntesis en multipines con el objetivo de encontrar un análogo (mimotopo) capaz de mimificar el reconocimiento por un monoclonal dirigido contra un epítipo discontinuo del virus de la fiebre aftosa [9]. Los ensayos de unión se realizaron en formato ELISA con los péptidos anclados en el soporte sólido. Para realizar el pesquiasaje de esta variante en solución, Houghten y colaboradores utilizaron esta estrategia combinada con la síntesis sobre resina de poliestireno [10]. El procedimiento general seguido por estos autores para la obtención y el pesquiasaje de una biblioteca combinatoria iterativa de hexapéptidos se muestra en la Figura 2.7.



**Figura 2.7.** Esquema del procedimiento de pesquiasaje de una biblioteca combinatoria iterativa de hexapéptidos.  $O_1$  y  $O_2$  representan posiciones fijas de aminoácidos,  $X_1, X_2, \dots, X_6$  son posiciones definidas después de cada ciclo de pesquiasaje y  $X$  son las posiciones aleatorias de los aminoácidos en la secuencia.

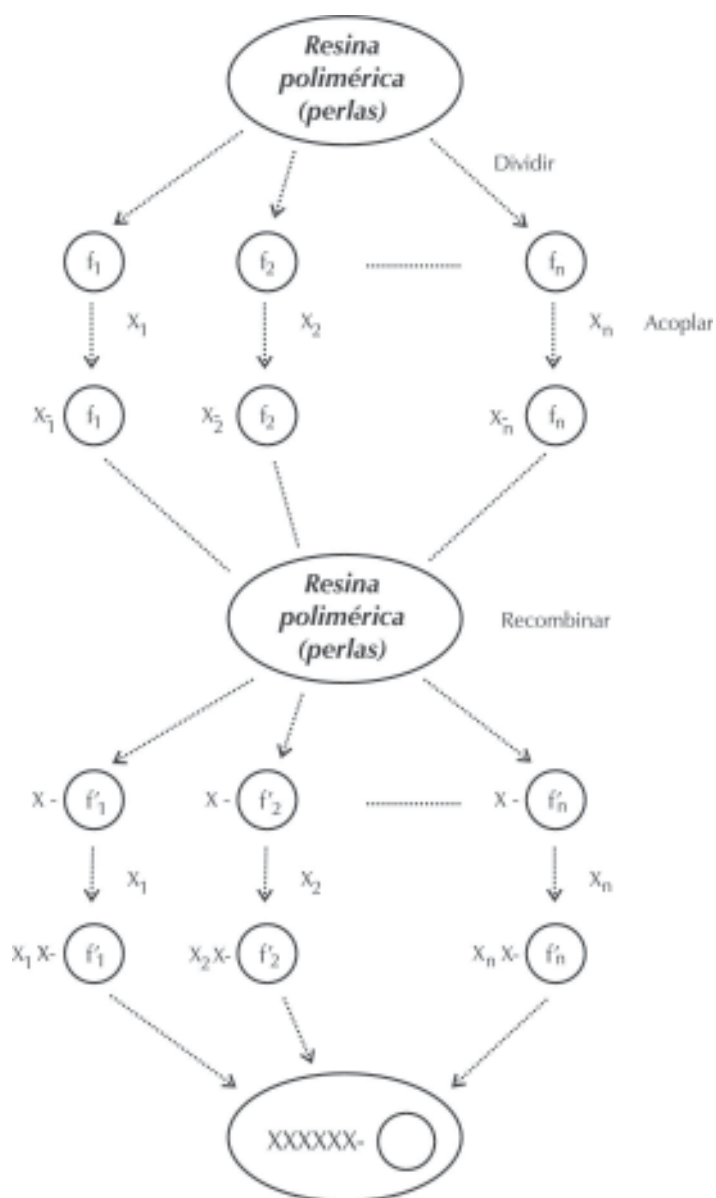
Inicialmente se preparan  $O^2$  subbibliotecas, en las cuales se predefinen las dos posiciones iniciales del N-terminal  $O_1O_2XXXX$ . Si se utilizan los 20 aminoácidos proteogénicos, el número total de subbibliotecas es de 400 ( $20^2$ ), aunque es posible excluir algún aminoácido en específico como la cisteína (Cys) y el triptófano (Trp) lo que reduce el número de éstas mezclas. Las restantes posiciones X se generan de forma aleatoria e incluyen todas las posibles combinaciones de los aminoácidos empleados en la síntesis. Si se utilizan igualmente los 20 aminoácidos proteogénicos, cada subbiblioteca contendrá 160 000 secuencias diferentes ( $20^4$ ) y en total la biblioteca incluirá 64 millones de péptidos ( $20^2 \times 20^4$ ). La combinación óptima de los dos residuos  $O_1O_2$  en el aminoterminal de la secuencia se selecciona con el pesquiasaje de las 400 mezclas para la determinación de cuál presenta mayor actividad biológica.

Una segunda síntesis es necesaria, esta vez con las dos primeras posiciones  $X_1X_2$  determinadas por el pesquiasaje inicial y con la combinación predefinida de dos aminoácidos en las siguientes dos posiciones. El número total de péptidos se reduce a 160 000 debido a que se generan 400 subbibliotecas con sólo dos posiciones aleatorias en la secuencia ( $20^2 \times 20^2$ ):  $X_1X_2O_1O_2XX$ . En la segunda iteración de pesquiasaje se selecciona la combinación óptima de los siguientes dos residuos  $X_3X_4$ . Finalmente se requiere la síntesis y el pesquiasaje de solamente 400 moléculas con secuencias  $X_1X_2X_3X_4O_1O_2$  para la determinación de un péptido con una actividad biológica dada. Este último paso no difiere metodológicamente de la obtención de bibliotecas por síntesis paralela de estructuras definidas.

Las posiciones aleatorias de las secuencias en la biblioteca combinatoria iterativa se generan utilizando la estrategia de síntesis conocida como “racionar y mezclar” [44], como “dividir, acoplar y recombinar” [10] o como “síntesis por partición” [12]. El procedimiento, como se muestra en la Figura 2.8, consiste en dividir la cantidad inicial de la resina polimérica en un número (n) de partes, igual al número de monómeros o aminoácidos protegidos que se utilice para la obtención de la biblioteca, posteriormente se realizan las (n) reacciones de acoplamiento por separado y una vez concluido este paso, se mezclan todas las partes para dar una cantidad total de resina con secuencias parciales que se toma como punto de partida para un nuevo ciclo de dividir, acoplar y recombinar. Este proceso se repite para todas las posiciones aleatorias en las secuencias.

Esta variante de bibliotecas combinatorias tiene el inconveniente de que requieren de un esfuerzo y una dedicación considerable en la preparación de las subbibliotecas necesarias para un proceso de pesquiasaje completo hasta determinar una estructura biológicamente activa.

No obstante, se han aplicado en la identificación de potentes péptidos antimicrobianos [45] y de antagonistas del receptor opioide [46].



**Figura 2.8.** El método de “dividir, acoplar y recombinar” para la generación de las posiciones aleatorias en la secuencia de una biblioteca combinatoria iterativa de péptidos.

## BIBLIOTECAS COMBINATORIAS DE BARRIDO DE POSICIÓN

Un enfoque similar al de las bibliotecas combinatorias iterativas se describe para la variante de las bibliotecas combinatorias de barrido de posición. En este caso los autores Dooley y Houghten, proponen obtener una biblioteca de hexapéptidos, pero que a diferencia del ejemplo de la variante del capítulo anterior, solo se fija una posición (O) que barre toda la secuencia: OXXXXX, XOXXXX, XXOXXX,..., XXXXXO. Las restantes cinco posiciones (X) se obtienen igualmente de forma aleatoria [11].

El número total de subbibliotecas depende de la cantidad de aminoácidos empleados en la síntesis y del tamaño de la secuencia. Por ejemplo si se emplean los 20 aminoácidos proteogénicos en la obtención de una biblioteca de hexapéptidos, como la descrita anteriormente, se deben preparar 120 subbibliotecas que contendrán, cada una 3,2 millones de secuencias diferentes ( $20^5$ ). Si se agrupan por el orden que ocupa la posición fija en la secuencia, cada grupo de subbibliotecas contendrá 64 millones de péptidos ( $20 \times 20^5$ ).

Esta variante es mucho más efectiva que las bibliotecas combinatorias iterativas por cuanto del pesquaje de las 120 mezclas, se selecciona un residuo activo en cada posición específica para formar la estructura final del péptido con mayor actividad biológica. Esto implica además, que los pasos de resíntesis y análisis de las mezclas no son necesarios [29]. Al igual que la variante de bibliotecas del tipo iterativas, las de barrido de posición se han aplicado fundamentalmente en el pesquaje de antagonistas de receptores y péptidos antimicrobianos [47-51]. Un inconveniente de las bibliotecas iterativas y de barrido de posición es la poca solubilidad en medio acuoso necesario para los ensayos biológicos de algunas secuencias que se generan en el proceso combinatorio.

## BIBLIOTECAS INMOVILIZADAS SOBRE EL SOPORTE SÓLIDO

### BIBLIOTECAS COMBINATORIAS DEL TIPO “UNA PERLA, UNA ESTRUCTURA”

La preparación de esta variante de bibliotecas combinatorias sólo es posible empleando como soporte sólido alguna de las resinas poliméricas (perlas) comúnmente utilizadas en la síntesis estándar en fase sólida. El concepto de “una perla, una estructura”, descrito por primera vez por Lam y colaboradores, se basa en el hecho de que en las bibliotecas combinatorias preparadas por la estrategia de síntesis de “racionar y mezclar” sobre cada perla de resina polimérica se mantiene anclado un solo tipo de péptido [12]. Esto se debe a que en cada ciclo de acoplamiento, cada perla encuentra un solo aminoácido para

reaccionar, lo que resulta en que se ensambla una única secuencia por perla individual. Se estima que en una perla de 0,1 nm de diámetro pueden ensamblarse aproximadamente  $10^3$  copias del mismo péptido.

La característica fundamental de estas bibliotecas es que se preparan con todas las posiciones aleatorias de una manera rápida y sin mucho esfuerzo y dedicación. El procedimiento para la preparación de una biblioteca de hexapéptidos requiere no más de dos o tres días de trabajo. Si se emplean los 20 aminoácidos proteogénicos, en una biblioteca de este tipo se obtienen 64 millones de secuencias diferentes en el mismo número de perlas.

Un factor determinante en el éxito de la preparación y el pesquisaje de estas bibliotecas es la selección del soporte sólido. La homogeneidad en el tamaño y la carga de las perlas poliméricas es de extrema importancia para la correcta evaluación de los ensayos biológicos, debido a que de estas características depende la cantidad de cada péptido por perla. Para la obtención del número esperado de estructuras, la resina también debe caracterizarse por ser resistente a la formación de conglomerados que dificulten la distribución estadística de las perlas durante la preparación de la biblioteca. Por último, el soporte sólido debe ser capaz de hincharse tanto en el medio orgánico, durante la síntesis, como en el medio acuoso durante el ensayo biológico [14].

Se ha desarrollado un número considerable de resinas adecuadas para la preparación de bibliotecas del tipo “una perla, una estructura”. Se han utilizado perlas de polidimetilacrilamida debido a que este polímero se comporta de manera similar tanto en medio orgánico como acuoso [12, 52]. También han encontrado una amplia aplicación las resinas que incluyen una matriz hidrofóbica de poliestireno con un espaciador hidrofílico de polioxietileno que asegura un comportamiento similar de los péptidos en medio acuoso como las TentaGel [53-55], las PEG-PS [56, 57] y las resinas de Meldal basadas en la copolimerización de la acrilamida y el polioxietileno [58, 59].

### **MÉTODOS DE PESQUISAJE**

El pesquisaje en fase sólida es posible tanto para los ensayos de unión directa del blanco molecular (anticuerpos monoclonales y policlonales, receptores moleculares, células aisladas, etc.) al ligando inmovilizado en las perlas, como para los ensayos de detección de algunas propiedades funcionales del ligando (identificación de sustratos proteolíticos, de sitios de fosforilación, etc.). En el caso de los ensayos de unión directa, la detección del resultado positivo se realiza utilizando un grupo reportero como una enzima [60, 61] o un radionucleótido [62, 63], aunque también es posible acoplar un colorante [64] o un grupo fluorogénico [65], directamente a la molécula blanco. Cada perla

coloreada, fluorescente o radiactiva es separada cuidadosamente al microscopio para la subsiguiente determinación de la secuencia del péptido que porta. Cuando se utilizan células aisladas como blancos, la detección se puede realizar sin la ayuda de grupos reporteros, debido a que las células de 6-10 mm de diámetro unidas a la perla con el péptido-ligando, son fácilmente visibles al microscopio [66]. Aunque los ensayos funcionales tradicionalmente se realizan en solución, se han publicado procedimientos para la determinación en fase sólida de algunas propiedades funcionales como la identificación de sustratos peptídicos para las proteínas quinazas [67, 68], para proteínas cisteínicas [57] y de sustratos proteolíticos para varias proteasas [58, 69].

La mayoría de los ensayos en solución, en principio, pueden adaptarse al pesquaje de bibliotecas combinatorias, pero debido al gran número de compuestos o de mezclas de compuestos que se generan, la tendencia es miniaturizar y automatizar estos ensayos. En este caso hay que incluir en el diseño de la biblioteca espaciadores especiales con un sistema ortogonal de simple o doble liberación de los péptidos [16]. De esta, una parte de las moléculas peptídicas es liberada para los ensayos biológicos en solución, mientras otra parte se mantiene anclada a las perlas para un segundo ensayo o para la determinación de la secuencia [59, 70].

La selección del tipo de ensayo depende en gran medida de la naturaleza del blanco biológico, de su grado de pureza, de las posibilidades del marcaje directo o de la utilización de moléculas secundarias marcadas con una enzima, un colorante o un radionucleótido, así como del tipo de biblioteca combinatoria diseñada. En general, la realización de los ensayos directamente sobre las perlas es más eficiente que los ensayos en solución. Además de representar un menor esfuerzo de trabajo, elimina el inconveniente de la solubilidad de determinadas secuencias. Esto se debe a que la presencia del espaciador de origen orgánico e hidrofílico de polioxietileno permite mantener soluble prácticamente cualquier secuencia en medio acuoso. Sin embargo, la necesidad de un blanco purificado muchas veces se convierte en una limitación considerable para los ensayos en fase sólida.

### ***DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA***

Las bibliotecas combinatorias descritas en los epígrafes 1 y 2 no necesitan de la determinación estructural con la ayuda de métodos físico-químicos, ya que las secuencias peptídicas bioactivas o son conocidas previamente (para la síntesis paralela de estructuras definidas) o son deducidas a partir de los ensayos de actividad biológica (para las bibliotecas con deconvolución de las mezclas). Sin embargo, como se había mencionado antes, en el caso de las bibliotecas del tipo

“una perla, una estructura”, la secuencia de un péptido en una perla individual con actividad positiva no es conocida y por lo tanto debe ser aislada para la determinación estructural por un método instrumental. La microsecuenciación automática de Edman y la espectrometría de masas son la mejor elección para este fin debido a que son capaces de detectar cantidades de hasta 1 pmol de un péptido (una perla de 100 mm contiene aproximadamente 100 pmoles de una secuencia dada).

También se ha empleado la estrategia de marcaje con “etiquetas moleculares” a partir de las cuales la secuencia peptídica activa se deduce a través del análisis de la “etiqueta” correspondiente. Se han descrito varias etiquetas moleculares, estas incluyen polioxinucleotidos [71], péptidos [72] y derivados haloaromáticos [73] que son analizados por la reacción con la polimerasa y la secuenciación de ADN, por microsecuenciación automática de Edman y por cromatografía gaseosa de captura de electrones respectivamente. El encarecimiento de la preparación de las bibliotecas y las limitaciones prácticas de la introducción de estas etiquetas moleculares, han hecho de la microsecuenciación automática y la espectrometría de masas las técnicas más utilizadas para la determinación estructural de las moléculas activas en una biblioteca del tipo “una perla, una estructura”.

## **PESQUISAJE CON ANTICUERPOS ANTI-SKC-2 DE UNA BIBLIOTECA DE PÉPTIDOS SOBRE MEMBRANA DE CELULOSA GENERADA A PARTIR DE LA SECUENCIA DE LA ESTREPTOQUINASA SKC-2**

La estreptoquinasa SKC-2 es utilizada como una droga trombolítica eficaz para el tratamiento del infarto del miocardio [40]. Debido a que es una proteína de origen bacteriano, la SK es inmunogénica en humanos, es decir, los pacientes tratados con esta droga resultan inmunizados y por tanto responden con anticuerpos anti-SK. Estos anticuerpos cuando alcanzan altos títulos provocan reacciones adversas severas en los pacientes e incluso neutralizan la actividad trombolítica de esta proteína. El mapeo de las regiones antigénicas de esta proteína puede resultar en el diseño de una droga con características inmunogénicas disminuidas y con mayor actividad trombolítica.

Para la identificación de las regiones de la secuencia primaria de la SKC-2 [74] involucradas en el reconocimiento de los anticuerpos anti-SKC-2, se empleó el pesquisaje de una biblioteca de 41 péptidos de 20 residuos sintetizada sobre una membrana de celulosa (Whatman 540, Ø 90 mm). En el pesquisaje se emplearon los sueros de 10 pacientes, colectados a los 10 días después de la terapia con Heberkinasa®.

## SÍNTESIS DE LA BIBLIOTECA DE PÉPTIDOS SOBRE LA MEMBRANA DE CELULOSA.

### *DERIVATIZACIÓN DE LA MEMBRANA DE CELULOSA*

1. Marcar y enumerar la posición de las manchas con lápiz a una distancia de 10 mm una de otra sobre la superficie del papel.
2. Lavar la membrana con agua, N, N-dimetilformamida (DMF) y etanol respectivamente. Déjela secar al vacío en una desecadora durante varias horas.
3. Colocar la membrana en un recipiente adecuado y añadir 10 mL de una solución que contenga 0,2 mol/L de Fmoc- $\beta$ Ala-OH, 0,2 mol/L de N, N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) y 0,4 mol/L de N-metilimidazol (NMI) en DMF.
4. Mantener la reacción durante toda la noche.
5. Lavar cuatro veces con DMF.
6. Eliminar los grupos Fmoc- de la superficie de la membrana con una solución al 20 % de piperidina en DMF durante 20 min de reacción.
7. Lavar cuatro veces con DMF.
8. Definir las manchas ( $\varnothing$  7 mm/mancha) con el goteo sobre cada punto marcado con lápiz de 0,6 mL de una solución que contenga 0,5 mol/L del ester de N-hidroxibenzotriazol de la Fmoc- $\beta$ Ala-OH en DMF. Esta operación garantiza una funcionalización de las manchas de 0,2-0,4 mmoles/cm<sup>2</sup>.
9. Inactivar el resto de los grupos aminos sobre la superficie de la membrana. Para esto añada 10 mL de una solución al 2 % de anhídrido acético y 1 % de N,N-diisopropiletilamina (DIEA) en DMF y mantener la reacción durante 30 min.
10. Eliminar el grupo protector Fmoc- del área de las manchas según el procedimiento descrito anteriormente.

Para una mejor visualización del área de las manchas y controlar el completamiento de las reacciones de acoplamiento, los grupos aminos libres se tiñen con una solución de 1 % de bromofenol azul en DMF.

### *PLANIFICACIÓN DE LAS REACCIONES DE ACOPLAMIENTO*

Calcular a partir de la lista de secuencias de los péptidos que integran la biblioteca las cantidades de amino ácidos protegidos, HOBt y DIC necesarios para cada uno de los 20 acoplamientos múltiples. Esta operación puede ser auxiliada por algún programa de computación.

### ***ENSAMBLAJE DE LOS PÉPTIDOS***

1. Acoplar el primer amino ácido protegido con la aplicación sobre cada una de las 41 manchas teñidas de azul, 1 mL de una solución que contenga 0,5 mol/L del éster del HOBt del Fmoc-amino ácido correspondiente según la lista de secuencias. Repetir esta operación una vez mas hasta que la reacción cambie a amarillo la coloración de cada mancha.
2. Bloquear los grupos aminos residuales con 10 mL de una solución al 2 % de anhídrido acético en DMF.
3. Lavar cuatro veces con DMF.
4. Eliminar el grupo Fmoc- de los grupos aminos con 10 mL de una solución al 20 % de piperidina en DMF durante 20 min.
5. Lavar cuatro veces con DMF.
6. Teñir los grupos aminos libres en el área de las manchas con una solución al 1 % de bromofenol azul en DMF.
7. Repetir los pasos anteriores hasta completar la secuencia de los péptidos en las 41 posiciones.
8. Acetilar el N-terminal de los péptidos con una solución al 2 % de anhídrido acético y 1 % de DIEA en DMF.
9. Lavar cuatro veces con DMF y etanol.

### ***DESPROTECCIÓN DE LAS CADENAS LATERALES DE LOS PÉPTIDOS***

1. Añadir a la membrana seca 10-15 mL de una solución que contenga 50 % de ácido trifluoroacético, 2 % de tiofenol, 2 % de etanoditiol, 2 % de agua y 1 % de fenol en diclorometano (DCM). Agitar durante 2,5 h a temperatura ambiente.
2. Lavar intensamente con DCM, DMF y metanol.
3. Secar la membrana. Mantenerla al vacío o guardarla a -20 °C si no la va a utilizar inmediatamente.

### **PESQUISAJE DE LA BIBLIOTECA CON ANTICUERPOS ANTI-SKC-2 DE SUEROS DE PACIENTES TRATADOS CON STREPTOQUINASA SKC-2**

1. Lavar la membrana con etanol para prevenir las interacciones hidrofóbicas entre los péptidos.
2. Lavar tres veces con una solución de TBS (10 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, pH 7,6).

3. Bloquear las interacciones inespecíficas con 10 mL de una solución 5 % de leche en TBS. Agitar durante toda la noche a 4 °C.
4. Incubar durante 3 h con el suero a la dilución predeterminada [40] en T-TBS (0,05 % de Tween-20 en TBS).
5. Añadir el conjugado anti-IgG humano-fosfatasa alcalina (1:2 500) en T-TBS y mantener la reacción durante una hora.
6. Revelar las manchas con 5 mL (0,3 mg/mL) del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indonil fosfato (BCIP) en la solución tampón (100 mmol/L Tris, pH 8,7, 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>). Las manchas positivas se colorean de azul violeta (Figura 2.9).
7. Detener la reacción de revelado con una solución de PBS.

### **RECUPERACIÓN DE LA MEMBRANA PARA OTROS ENSAYOS**

1. Lavar 2 veces con agua y 3 veces con DMF. Si el color azul del sustrato precipitado no es eliminado en los primeros lavados con DMF, realice el tercer lavado con ultrasonido. Repetir los lavados con agua.
2. Añadir a la membrana una solución de 8 mol/L de urea, 1 % de SDS y 0,1 % de 2-mercaptoetanol en agua y colocarla en un baño a 40 °C con ultrasonido. Realizar esta operación 3 veces durante 5 min.
3. Lavar 3 veces durante 5 min con una solución de etanol al 30 % y ácido acético al 20 % en agua y 2 veces con etanol.

De esta forma la membrana de celulosa queda lista para un próximo ensayo o se seca y se guarda a -20 °C si no se va a utilizar de inmediato.

### **RESULTADOS DEL PESQUISAJE DE LA BIBLIOTECA**

Se probaron 10 sueros con títulos de anticuerpos anti-SKC-2 de al menos  $1:5 \times 10^4$ . Esto permitió trabajar con diluciones muy altas (1:300 – 1:1 000) y disminuir los posibles niveles de fondo en los ensayos. Se identificaron secuencias en la molécula de SKC-2 que son aparentemente antigénicas para la mayoría de los sueros (Tabla 2.3).

La discusión amplia de estos resultados está publicada por Torrens y colaboradores [40]. El análisis de los datos de la estructura cristalográfica de la estreptoquinasa [75] sugirió, que los péptidos identificados como los más reconocidos por los sueros humanos pertenecen precisamente a regiones desorganizadas de la proteína que comprenden epítomos susceptibles a ser antigénicos.



Tabla 2.3. (continuación)

No. de la mancha	Secuencia del péptido	PACIENTE											
		SA 05	SA 06	SA 07	SA 12	SA 14	SA 07	SA 28	SA 32	SA 42	SA 46	N 1	
21	LAQAQSILNKTHOGYTIYER												
22	THPGYTIYERDSSIVTHDND												
23	DSSIVTHDNDIFRTILPMDQ												
24	IFRTILPMDQEFTYHVKNRE					■							1
25	EFTYHVKNREQATEINKKSG						■						1
26	QATEINKKSGLNEEINNTDL											■	1
27	LNEEINNTDLISEKYVLLK		■	■	■								3
28	ISEKYVLLKGEKPYDPFDR		■	■	■								3
29	GEKPYDPFDRSHLKLFTIKY		■	■	■								3
30	SHLKLFTIKYVDVNTNELLK				■								1
31	VDVNTNELLKSEQLLTASER												
32	SEQLLTASERNLDFRDLYDP												
33	NLDFRDLYDPRDKAKLLYNN		■		■		■						3
34	RDKAKLLYNNLDAFGIMDYT												
35	LDAFGIMDYTLTGKVEDNHDD												
36	LTGKVEDNHDDTNRIITVYM			■									1
37	DINRIITVYMGKRPEGENAS												
38	GKRPEGENASYHLAYDKDRY				■								1
39	YHLAYDKDRYTEEEREVYSY		■	■	■			■	■	■			6
40	TEEEREVYSYLRYTGTPIPD			■		■		■	■	■			5
41	EVYSYLRYTGTPIPDNPNDK								■				1

## REFERENCIAS

1. Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988;73:305-10.
2. Cwirla SE, Peters EA, Barrett RW, Dower WJ. Peptides on phage. A vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6578-82.
3. Schatz PJ. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13-residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 1993; 11 (10):1138-43.
4. Kawasaki G. Cell-free synthesis and isolation of novel genes and polypeptides. PCT International Patent Application W091/05058. United States, 1991.
5. Geysen HM, Meleon RH, Barteling SJ. Use of peptide synthesis to probe viral antigens from epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3998-4002.
6. Houghten R A. General Methods for rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:5131-5.
7. Frank R. Spot-synthesis: an easy technique for the positional addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 1992;48(42):9217-32.
8. Fodor SPA, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 1991;251:767-73.
9. Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ. *A priori* delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol Immunol* 1986;23(7):709-15.
10. Houghten RA, Pinilla C, Blondelle SE, Appel JR, Dooley CT, Cuervo HJ. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature* 1991;354:84-6.
11. Dooley CT, Houghten RA. The use of positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries for the rapid determination of opioid receptor ligands. *Life Sci* 1993;52(18):1509-17.
12. Lam KS, Salmon SE, Hersh EM, Hruby VJ, Kazmierski WM, Knapp RJ. A new type of synthetic peptide combinatorial library for identifying ligand-binding activity. *Nature* 1991;354:82-4.
13. Terrett NK, Gardner M, Gordon DW, Kobylecki RJ, Steele J. Combinatorial synthesis-the design of compound libraries and their application to drug discovery. *Tetrahedron* 1995;51(30):8135-73.
14. Lam KS, Lebl M, Krchňák V. The "one bead-one-compound" combinatorial library method. *Chemical Reviews* 1997;97(2):411-48.
15. Bray AM. Multiple peptide synthesis with commercially available Multipin™ kits. In: *Immunology Methods Manual*. Chiron Mimotopes Pty. Ltd., Clayton, Victoria, Australia. 1997. p.810-6.
16. Lloyd-Williams P, Albericio F, Giralt E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. New York: CRC Press; 1997.
17. Fieser TM, Tainer JA, Geysen HM, Houghten RA, Lerner RA. Influence of protein flexibility and peptide conformation on reactivity of monoclonal anti-peptide antibodies with a protein  $\alpha$ -helix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:8568-72.
18. Aaskov JG, Geysen HM, Mason TJ. Serologically defined linear epitopes in the envelope protein of dengue 2 (Jamaica strain 1409). *Arch Virol* 1989; 105: 209-21.
19. Price KM, Cuthbertson AS, Vardell IM, Sheppard PW. The production and characterisation of monoclonal antibodies to myc-c, erbB-2 and EGF-receptor using a synthetic peptide approach. *Dev Biol Standard* 1990;71:23-31.
20. Cassels FJ, Deal CD, Reid RH, Jarboe DL, Nauss JL, Carter JM, Boedeker EC. *Escherichia coli* CFA/I primary sequence verification and linear B cell epitope analysis in primates. *Infect Immun* 1992;60:2174-81.
21. Castric P, Deal CD. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa pili* based on sequence and B cell epitope analysis. *Infect Immun* 1994;62:371-6.

23. Maeji NJ, Bray AM, Geysen HM. Multi-pin peptide synthesis strategy for T cell determinant analysis. *J Immunol Methods* 1990;134:23-33.
24. Mutch DA, Rodda SJ, Benstead M, Valerio RM, Geysen HM. Effects of end groups on the stimulatory capacity of minimal length T-cell determinant peptides. *Peptides Res* 1991;4(3): 132-7.
25. Cassels FJ, Jarboe DL, Reid RH, Lees A, Deal CD. Linear epitopes of colonization factor antigen I and peptide vaccine approach to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1997;19(1):66-70.
26. Yssel H, De Vries JE, Koken M, Van Blitterswijk W, Spits H. Serum-free medium for generation and propagation of functional human cytotoxic and helper T cell clones. 1984. *J Immunol Methods* 1984;72:219-23.
27. Townsend ARM, Rothbard J, Gotch FM, Bahadur G, Wraith D, McMichael AJ. The epitope of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T-lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* 1986;44:959-68.
28. Pemberton RM, Wraith DC, Askonas BA. Influenza peptide-induced self-lysis and down-regulation of cloned cytotoxic T cell. *Immunology* 1990;70:223-9.
29. Burrows SR, Rodda SJ, Suhrbier A, Geysen HM, Moss DJ. The specificity of recognition of a cytotoxic T lymphocyte epitope. *Eur J Immunol* 1992;22:191-5.
30. Houghten RA, DeGraw ST, Bray MK, Hoffmann SR, Frizzell ND. Simultaneous multiple peptide synthesis: The rapid preparation of large number of discrete peptide for biological, immunological, and methodological studies. *Biotechniques* 1986;4(6):522-6.
31. Duarte C, Pérez L, Vázquez J, Dueñas M, Vilarubia OL, Nevea L, Váldez R, Reyes O, Montero M, Ayala M, Gavilondo J. Epitope Mapping V-region DNA Sequence and Neutralizing Fab Fragments Two Monoclonal Antibodies Against HIV-1 V<sub>3</sub> Loop. *Immunotechnology* 1996;2:11-20.
32. Guillén G, Alvarez A, Nazabal C, Leal MJ, Alonso LM, Musacchio A, Delgado M, Reyes O, Silva R. Molecular analysis of *Neisseria meningitidis* class 3 outer membrane protein in strains recognized by the monoclonal antibody CB-Nm.2. *Biotecnología Aplicada* 1997;14(1):23-30.
33. Araña MJ, Santiago N, Chinae G, Torres B, Pons T, Guerra M, López E, Callejo M, Garay HE, Reyes O. Molecules modulating immune/inflammatory responses, design and development of potential therapeutics. *Biotecnología Aplicada* 1995;12(2):101-2.
34. Kramer A, Reineke U, Dong L, Hoffman B, Hoffmuller U, Winkler D, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J. Spot synthesis: observations and optimizations. *J Peptides Res* 1999;54 (4):319-27.
35. Frank R. Multiple peptide synthesis with SPOT technique. *Immunology Methods Manual*. Academic Press Ltd; 1997.p.784-95.
36. Krchnák V, Vágner J, Safár P, Lebl M. Noninvasive continuous monitoring of solid phase peptide synthesis by acid-base indicator. *Int J Pept Protein Res* 1988;38:415-6.
37. Volkmer-Engert R, Hellwig J, Ehrhard B, Hohne W, Schneider-Mergener J. Characterization of the interaction between the monoclonal antibody CB 4-1 and its peptide epitope GATPQDLNTM using a soluble and cellulose-bound peptide epitope library. In: Maia HLS, editor. *Peptides*. Leiden: Escom; 1994. p.473-74.
38. Allauzen S, Joly S, Granier C, Molina F, Bouix O, Pau B et al. Immunoanalysis of human insulin using monoclonal antibodies reveals antigenicity of evolutionary conserved residues. *Mol Immunol* 1995;32:27-36.
39. Kramer A, Volkmer-Engert R, Malin R, Reineke U, Schneider-Mergener J. Simultaneous synthesis of peptide libraries on single resin and continuous cellulose membrane supports: examples for the identification of protein, metal and DNA binding peptide mixtures. *Peptides Res* 1993;6: 314-9.
40. Torrens I, Reyes O, Ojalvo AG, Seralena A, Chinae G, Cruz L J et al. Mapping of the Antigenic Regions of Streptokinase in Humans after Streptokinase Therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259(1):162-8.

41. Holmes CP, Adams CL, Kochersperger LM, Mortensen RB, Aldwin LA. The use of light-directed combinatorial peptide synthesis in epitope mapping. *Biopolymers* 1995;37:199-211.
42. Blake J, Litzzi-Davis L. Evaluation of peptide libraries: an iterative strategy to analyze the reactivity of peptide mixtures with antibodies. *Bioconjugate Chem* 1992;3(6):510-3.
43. Erb E, Janda KD, Brenner S. Recursive deconvolution of combinatorial chemical libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11422-6.
44. Furka A, Sebastyen F, Asgedom M, Dibo G. General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Int J Pept Protein Res* 1991;37(6):487-93.
45. Houghten RA, Appel JR, Blondelle SE, Cuervo JH, Dooley CT, Pinilla C. The use of synthetic peptide libraries for the identification of bioactive peptide. *Biotechniques* 1992;13(3):412-21.
46. Dooley CT, Chung NN, Schiller PW, Houghten RA. Acetalins: Opioid receptor antagonists determined through the use of synthetic peptide combinatorial libraries. *Proc Nat. Acad Sci USA* 1993;90:10811-5.
47. Pinilla C, Appel JR, Blanc P, Houghten RA. Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries. *Biothechniques* 1992;13(6): 901-5.
48. Appel JR, Muller S, Benkirane N, Houghten RA, Pinilla C. Highly specific, cross-reactive sequences recognized by an anti-HBsAg antibody identified from a positional scanning synthetic combinatorial library. *Pept Res* 1996;9(4):174-82.
49. Dooley CT, Ny P, Bidlack JM, Houghten RA. Selective ligands for the *mu*, *delta*, and *kappa* opioid receptors identified from a single mixture based tetrapeptide positional scanning combinatorial library. *J Biol Chem* 1998;273(30):18848-56.
50. Rothman RB, Baumann MH, Dersch CM, Appel J, Houghten RA. Discovery of novel peptidic dopamine transporter ligands by screening a positional scanning combinatorial hexapeptide library. *Synapse* 1999;33(3):239-46.
51. Tanaka Y, Ohyama H, Ogawa M, Nishimura Y, Matsushita S. Identification of peptide superagonists for a self-K-ras-reactive CD4+ T cell clone using combinatorial peptide libraries and mass spectrometry. *J Immunol* 1999;162(12):7155-61.
52. McBride JD, Freeman HN, Leatherbarrow RJ. Selection of human elastase inhibitors from a conformationally constrained combinatorial peptide library. *Eur J Biochem* 1999;266(2):403-12.
53. Quarrell R, Claridge TD, Weaver GW, Lowe G. Structure and properties of TentaGel resin beads: implications for combinatorial library chemistry. *Mol Divers* 1996;1:223-32.
54. Chen CL, Strop P, Lebl M, Lam KS. One bead-one compound combinatorial peptide library: different types of screening. *Methods Enzymol* 1996;267:211-9.
55. Leon S, Quarrell R, Lowe G. Evaluation of resins for on-bead screening: a study of papain and chymotrypsin specificity using PEGA-bound combinatorial peptide libraries. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8(21):2997-3002.
56. Kates SA, McGuinness BF, Blackburn C, Griffin GW, Sole NA, Barany G, Albericio F. "High-load" polyethylene glycol-polystyrene (PEG-PS) graft supports for solid-phase synthesis. *Biopolymers* 1998;47(5):365-80.
57. St Hilaire PM, Willert M, Juliano MA, Juliano L, Meldal M. Fluorescence-quenched solid phase combinatorial libraries in the characterization of cysteine protease substrate specificity. *J Comb Chem* 1999;1(6):509-23.
58. Meldal M, Svendsen I, Breddam K, Auzanneau FI. Portion-mixing peptide libraries of quenched fluorogenic substrates for complete subsite mapping of endoprotease specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3314-18.
59. Smith HK, Bradley M. Comparison of resin and solution screening methodologies in combinatorial chemistry and the identification of a 100 nM inhibitor of trypanothione reductase. *J Comb Chem* 1999;1(4):326-32.

60. Salmon SE, Lam KS, Felder S, Yeoman H, Schlessinger J, Ullrich A et al. One bead, one chemical compound: use of the selectide process for anticancer drug discovery. *Acta Oncol* 1994;33(2): 127-31.
61. Saskia de Koster H, Amons R, Benckhuijsen WE, Feijlbrief M, Schellekens GA, Drijfhout JW. The use of dedicated peptide libraries permits the discovery of high affinity binding peptides. *J Immunol Methods* 1995;187(1):179-88.
62. Kassarijan A, Schellenberger V, Turck CW. Screening of synthetic peptide libraries with radiolabeled acceptor molecules. *Peptides Res* 1993;6(3):129-33.
63. Turck CW. Radioactive screening of synthetic peptide libraries. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 1994;6:396-400.
64. Ohlmeyer MH, Swanson RN, Dillard LW, Reader JC, Asouline G, Kobayashi R, Wigler M, Still WC. Complex synthetic chemical libraries indexed with molecular tags. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10922-6.
65. Yu H, Chen JK, Feng S, Damalgo DC, Brauer AW, Schreiber SL. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH<sub>3</sub> domains. *Cell* 1994;76(5):933-45.
66. Pennington ME, Lam KS, Cress AE. The use of a combinatorial library method to isolate human tumor cell adhesion peptides. *Mol Divers* 1996;2:19-28.
67. Wu J, Ma QN, Lam KS. Identifying substrate motifs of protein kinases by a random library approach. *Biochemistry* 1994;33(49):14825-33.
68. Lam KS, Wu J, Lou Q. Identification and characterization of a novel synthetic peptide substrate specific for Src-family protein tyrosine kinases. *Int J Pept Protein Res* 1995;45(6):587-92.
69. Meldal M, Svendsen I. Direct visualization of enzyme inhibitors using a portion-mixing inhibitor library containing a quenched fluorogenic peptide substrate. Part 1. inhibitors for subtilisin Carlsberg. *J of the Chem Soc Perkin Trassactions* 1995;1(12):1591-8.
70. Jayawickreme CK, Graminski GF, Quillan JM, Lerner MR. Creation and functional screening of a multi-use peptide library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1614-8.
71. Needels MC, Jones DG, Tate EH, Heinkel GL, Kochersperger LM, Dower WJ, Barrett RW, Gallop MA. Generation and screening of an oligonucleotide-encoded synthetic peptide library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10700-4.
72. Nikolaiev V, Stierandova A, Krchnak V, Seligmann B, Lam KS, Salmon SE, Lebl M. Peptide-encoding for structure determination of nonsequenceable polymers within libraries synthesized and tested on solid-phase supports. *Peptides Res* 1993;6(3):161-70.
73. Nestler HP, Barlett PA, Still WC. A general method for molecular tagging of encoded library. *J Org Chem* 1994;59:4723-4
74. Estrada M, Hernández L, Pérez A, Rodríguez P, Serrano R, Rubiera R, Pedraza A, Padrón G, Antuch W, de la Fuente J, Herrera L. High level expression of streptokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 1992;10:1138-42.
75. Wang X, Lin X, Loy J, Tang J, Zhang X. Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science* 1998;281:1662-5.