

Bibliotecas combinatorias en fase sólida

Oswaldo Reyes Acosta

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 e/ 158 y 190, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.
AP 6072, CP 10600. Telf.: (53-7) 271 8164; E-mail: osvaldo.reyes@cigb.edu.cu

RESUMEN

La búsqueda de nuevos fármacos requiere de la síntesis y la evaluación de muchos compuestos diferentes. Un factor que limita estos estudios ha sido el tiempo y el esfuerzo empleado en la obtención de estas moléculas. Por lo tanto, es importante disponer de bibliotecas combinatorias de compuestos que se caractericen por una gran variedad en cuanto a un factor determinado: composición química, estructura, etc. Se conocen cuatro grupos de bibliotecas combinatorias: las biológicas, restringidas a la obtención de compuestos naturales (proteínas, péptidos, anticuerpos, etc.); las que se alcanzan por síntesis paralela de estructuras definidas y que se aplican a la obtención de péptidos, oligonucleótidos y moléculas orgánicas pequeñas (tiadiazinas, hidantoinas, etc.); las bibliotecas con deconvolución de las mezclas, con similares usos y las bibliotecas inmovilizadas sobre un soporte sólido que se emplea fundamentalmente para la obtención de péptidos y péptidos modificados. Con la profundización en el proyecto del genoma humano y el alto grado de eficiencia de los sistemas de pesquiasaje de alto flujo, las bibliotecas combinatorias de péptidos y moléculas orgánicas continúan ocupando un lugar importante en la obtención de resultados relevantes en la medicina humana. La relativamente fácil automatización de las metodologías de síntesis en fase sólida ha hecho de las bibliotecas combinatorias en fase sólida la mejor opción para disponer de una adecuada diversidad de compuestos químicos con posibilidades de convertirse en productos terapéuticos.

Palabras claves: bibliotecas combinatorias, compuestos orgánicos pequeños, péptidos sintéticos, síntesis en fase sólida

Biotecnología Aplicada 2002;19:1-8

ABSTRACT

Combinatorial Libraries on Solid Phase. The finding of novel biologically active leads requires of the synthesis and evaluation of many different compounds. A factor usually limiting these searches has been the time and the efforts employed to obtain these molecules. Thus, it is very important to have available for the screening, combinatorial libraries of compounds characterized by the diversity of a given quality: structure, composition, etc. There are four general approaches in the combinatorial library methods: biological libraries restricted only to natural compounds (proteins, peptides, antibodies, etc.); spatially addressable parallel libraries, applied to the screening of peptides, peptidomimetics and small organic compounds (thiadiazines, hydantoines, etc.); synthetic libraries requiring deconvolution with similar applications; and libraries immobilized on solid supports applied basically to peptides and modified peptides (peptidomimetics). Accelerated advances in the human genome and proteomic projects and the high-throughput screening insure that combinatorial libraries of peptides and small organic compounds still play an important role to obtain relevant results in the human medicine. The relatively easy automation of solid phase synthetic methodologies makes combinatorial libraries on solid phase the source of choice for the adequate diversity of compounds for the screening of novel biologically active leads.

Keywords: combinatorial libraries, small organic compounds, solid phase synthesis, synthetic peptides

Introducción

La búsqueda de nuevos fármacos requiere de la síntesis y la evaluación de muchos compuestos diferentes. Un factor que limita estos estudios frecuentemente ha sido el tiempo y el esfuerzo empleado en la obtención de estas moléculas. Hasta la década de los años 80, la presentación de unos 50 productos, candidatos anuales a fármacos, se consideró un buen promedio. Este número se correspondía con aquellas investigaciones que habían obtenido un buen resultado en sus diferentes etapas, dentro de una gran cantidad de productos naturales o sintéticos que se investigaban.

Posteriormente estos productos eran ensayados directamente en modelos de animales previo a la realización de los ensayos clínicos correspondientes. Como promedio, por esta vía, la salida al mercado de un nuevo fármaco demoraba de 9-16 años con un costo total de unos 360 millones de dólares [1].

Por lo tanto, es de vital importancia en la búsqueda de nuevas moléculas biológicamente activas re-

solver el problema de la diversidad. Esto significa que es necesario disponer de mezclas o familias de compuestos que se caractericen por una gran variedad en cuanto a un factor determinado: composición química, estructura, origen, etc. A estas familias de compuestos se les denomina bibliotecas y a la búsqueda de los compuestos con mayor actividad biológica, pesquiasaje. Así, por ejemplo, una familia de productos naturales aislados y caracterizados, de productos químicos obtenidos por los métodos tradicionales o una base de datos de determinados compuestos pueden considerarse una biblioteca. En el caso de las mezclas que se obtengan combinando de una forma controlada determinadas reacciones químicas o bioquímicas, se les conoce como bibliotecas combinatorias.

Con los avances alcanzados en la bioquímica, la biología molecular, celular y estructural, se desarrollaron metodologías de pesquiasaje primario más

eficientes basadas en los blancos directos, generalmente receptores moleculares. Estas metodologías permitieron el establecimiento de la obtención y pesquaje de las bibliotecas combinatorias como tecnología indispensable en la búsqueda de nuevos medicamentos.

El enfoque más reciente lo constituye la utilización de la computación en el desarrollo de nuevas herramientas para estimar la diversidad molecular, la búsqueda en las bases de datos de compuestos químicos y en el diseño de ligandos. El pesquaje virtual es una metodología que analiza, mediante programas de computación, el acoplamiento de los diferentes productos disponibles y caracterizados de las bases de datos al sitio activo de un blanco para identificar los que con mayor probabilidad tendrán una actividad biológica óptima [2]. También se trabaja en la generación de bibliotecas virtuales de compuestos químicos con determinados estreñimientos predefinidos por descriptores estructurales [3]. Un elemento importante para la “síntesis virtual” de estas bibliotecas es que deben generarse compuestos químicos con posibilidades reales de ser obtenidos en la práctica.

El desarrollo alcanzado en este tema ha condicionado el surgimiento de nuevas ramas de la Química Medicinal, como son la Química Combinatoria y la Química Computacional. Dentro de la Química Combinatoria, las bibliotecas que más se han desarrollado son las que se obtienen por las técnicas de síntesis en fase sólida, debido a que infieren todas las ventajas de esta tecnología y muchas veces facilita el análisis biológico de las mezclas.

Seguidamente se describen las principales variantes de bibliotecas combinatorias en fase sólida, sus características generales, ventajas y desventajas en la obtención de estructuras.

Bibliotecas combinatorias en fase sólida

La primera versión de una biblioteca combinatoria fue publicada en 1984. Se aplicó a la obtención en fase sólida de una familia de péptidos sintéticos para estudiar las regiones más antigénicas de una proteína antiviral [4]. Posteriormente en 1988, se aplicó la expresión en fagos filamentosos para la generación de bibliotecas combinatorias de péptidos y proteínas. Hacia el final del siglo ya se resumían en cuatro grandes grupos las principales variantes de bibliotecas combinatorias (Tabla).

Teniendo en cuenta el procedimiento final que se realice, las bibliotecas combinatorias de compuestos sintéticos pueden dividirse en dos grandes grupos: las bibliotecas en la que los compuestos son liberados del soporte sólido a una solución y las bibliotecas en las que éstos se mantienen inmovilizados sobre el soporte sólido. En el primer caso los métodos de pesquaje 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 pesquaje se realiza directamente sobre la fase sólida y los resultados se visualizan empleando moléculas marcadas con radiactividad o con elementos capaces de desarrollar color [18]. A continuación

Tabla. Tipos de bibliotecas combinatorias.

Tipos	Aplicaciones	Referencias
Bibliotecas biológicas	Restringidas solo a la obtención de compuestos naturales como proteínas, péptidos y oligonucleótidos	[5-8]
Bibliotecas obtenidas por síntesis paralela de estructuras definidas	Para la obtención de compuestos naturales como péptidos, oligonucleótidos, azúcares, etc. y moléculas orgánicas pequeñas como benzodiazepinas, hidantoinas, tiadizinas, piperazidonas, etc.	[9-14]
Bibliotecas con deconvolución de las mezclas	Para la obtención de péptidos, péptidos modificados, y moléculas orgánicas de diferentes tipos	[4, 15, 16]
Bibliotecas inmovilizadas sobre el soporte sólido	Para la obtención de péptidos y péptidos modificados	[17]

se exponen las características generales de las bibliotecas combinatorias de compuestos sintéticos.

Bibliotecas obtenidas por síntesis paralela de estructuras definidas

La característica fundamental de este tipo de bibliotecas es que los compuestos químicos son sintetizados sobre la fase sólida en un formato espacialmente definido y la estructura es predeterminada. Esto quiere decir que la síntesis se realizará en reactores diferentes y únicos para cada estructura química que se obtendrá sobre la fase sólida que se coloque en cada reactor. Tanto la síntesis como el pesquaje de estas bibliotecas se realiza de forma paralela, teniendo en cuenta un número determinado de moléculas simultáneamente. En dependencia de la estrategia que se utilice, el pesquaje puede ser realizado con los compuestos 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 compuesto químico con actividad positiva puede ser fácilmente localizado e identificado estructuralmente sin necesidad de ningún método químico-físico analítico [18]. Sin embargo, la limitación fundamental de este tipo de bibliotecas es que solo un número relativamente pequeño de compuestos puede ser sintetizado y la biblioteca se considera generalmente muy pequeña para las necesidades de diversidad química.

Las técnicas de síntesis paralela de estructuras definidas con mayor aplicación en la química combinatoria son la síntesis en multipines, la síntesis múltiple en bolsas, la síntesis sobre membranas de celulosa y la síntesis dirigida por luz.

El método de síntesis en multipines [4] puede ser utilizado para la síntesis simultánea de hasta 96 compuestos. Esta técnica se aplica fundamentalmente a la obtención de bibliotecas combinatorias de péptidos sintéticos y péptido-miméticos (péptidos modificados químicamente que mantienen la misma actividad biológica de la secuencia original). El ensamblaje de los péptidos se realiza con la metodología convencional de síntesis en fase sólida en la que como soporte sólido se emplean las cabezas (coronas) de los pines de polietileno (Figura 1) en un arreglo de 8 x 12. Para la síntesis se utiliza igual número de reactores, de mane-

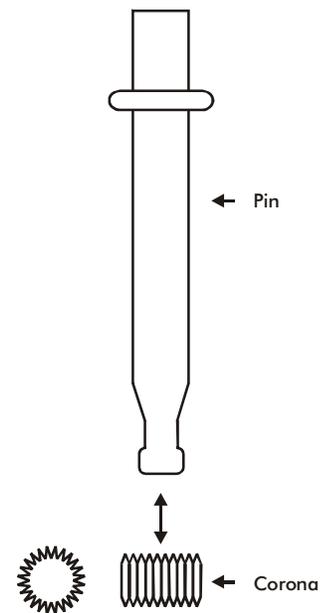


Figura 1. Pin de polietileno con cabeza (corona) reemplazable. La superficie de la corona está funcionalizada con grupos amino, a los que se le acopla el primer amino ácido de la secuencia de los péptidos. Estos pines se fijan en una plataforma en un arreglo de 8 x 12 con una geometría semejante a una placa para ELISA. Esto permite realizar la síntesis simultánea de hasta 96 péptidos diferentes y los inmunoenayos en el formato estándar con placas de 96 pocillos.

ra que en cada corona de pin se ensambla un único compuesto. Para facilitar el trabajo y la manipulación, los reactores que se emplean tienen el diseño de una placa con 8 x 12 pocillos y el material debe ser resistente a todos los reactivos y solventes.

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. Esto 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.

La síntesis múltiple en bolsas porosas de polipropileno (Figura 2A) se conoce popularmente como síntesis en "bolsas de té", por la similitud de estas bolsas con las utilizadas en esta técnica [9]. La resina 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 del proceso se pueden realizar simultáneamente en un solo frasco de reacción (Figura 2B). Al final de la síntesis, cada bolsa contiene una secuencia peptídica única.

El uso más efectivo que ha encontrado esta técnica ha sido en el mapeo de epítomos [19], en la caracterización estructural de proteínas [20] y en conjunto con algunos métodos de predicción estructural para el diseño de fármacos [21].

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 mmol) 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. No se conoce hasta el momento la obtención de otras moléculas orgánicas con la aplicación de esta técnica combinatoria.

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. 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 los compuestos deseados [11]. La síntesis se realiza con la aplicación de un volumen adecuado de la mezcla de reacción que contiene el monómero en un solvente poco volátil como la N,N-dimetilformamida 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 [22]. Esta operación se puede realizar paralelamente con diferentes monómeros y formar un gran número de estas manchas en una misma superficie íntegra de celulosa. En cada mancha se ensamblará un compuesto químico con una estructura diferente.

Cada mancha se identifica escribiendo con lápiz un número consecutivo que se corresponde con una

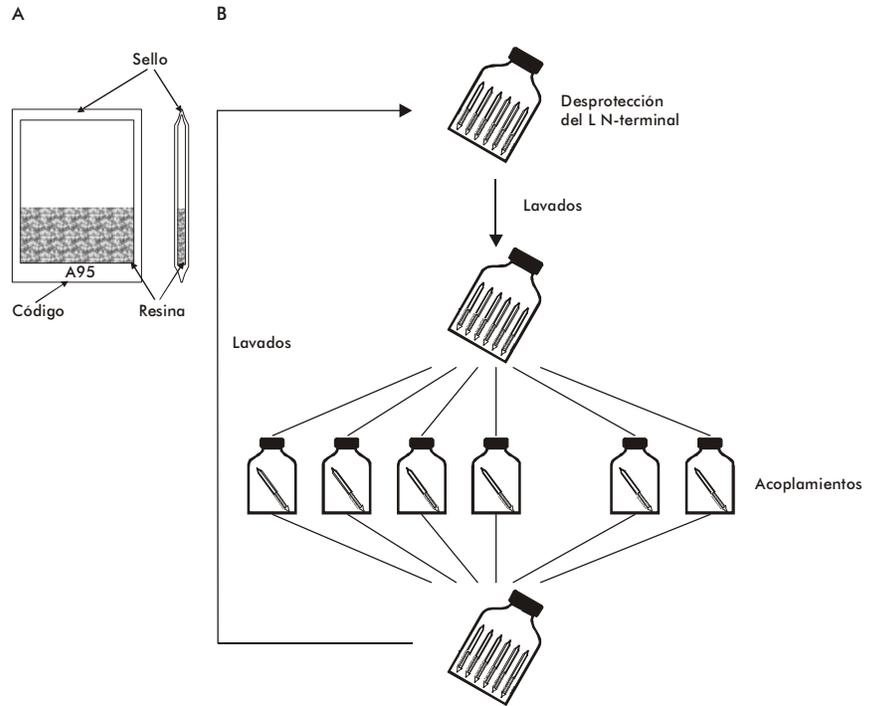


Figura 2. A) La resina se coloca en el interior de la bolsa porosa de polipropileno con el código correspondiente. El diámetro de los poros permite el flujo de los reactivos y solventes hacia dentro y fuera de la bolsa. B) Representación del esquema de la síntesis múltiple con el uso de estas bolsas permeables. Algunos pasos comunes se pueden realizar simultáneamente en un solo frasco de reacción.

estructura específica en el listado de los compuestos a sintetizar.

Las manchas o zonas reactivas sobre la membrana se pueden teñir con bromofenol azul [23] antes de la reacción de acoplamiento del próximo monómero (Figura 3). Esta tinción no destructiva permite el con-

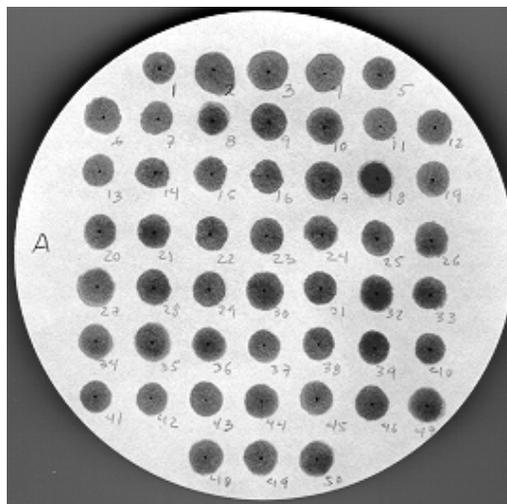


Figura 3. Membrana de papel Whatman 540 (9 cm de diámetro) con 50 manchas teñidas con bromofenol azul. La identificación de la membrana (A), así como la enumeración de los diferentes compuestos se realiza con lápiz directamente sobre la superficie del papel.

tol visual de la eficiencia del dispensado de los volúmenes y de la eficiencia de cada reacción. La técnica de los péptidos sintetizados sobre membranas de celulosa fue utilizada inicialmente para el mapeo de epítomos con anticuerpos monoclonales [24] siguiendo el procedimiento estándar para un ELISA (Figura 4). Sin embargo, la práctica ha mostrado la utilidad de esta técnica en ensayos de unión con sueros totales, proteínas purificadas y péptidos sintéticos [25].

La síntesis mediada por luz dirigida es una combinación de la síntesis múltiple y paralela con la fotolitografía. La metodología para la obtención de estas bibliotecas ha encontrado aplicación fundamentalmente en la obtención de bibliotecas de péptidos sintéticos [10].

Es imprescindible utilizar el grupo nitroveratrilo-carbonilo (Nvoc-) para proteger el grupo N^o-amino de los aminoácidos empleados durante la síntesis (Figura 5), el cual se elimina fácilmente en presencia de luz ultravioleta. En general, el procedimiento es el siguiente: se funcionaliza la superficie de vidrio con aminopropiltrióxosilano, se hace reaccionar toda la superficie con ácido Nvoc-N^o-aminohexanoico, se desprotegen los grupos aminos de una región específica con irradiación de luz ultravioleta de 365 nm a través de una pantalla litográfica, se lava y se hace reaccionar la superficie irradiada con otro aminoácido determinado (Figura 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 cm².

Una de las estrategias de pesquiasaje 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 [26]. 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.

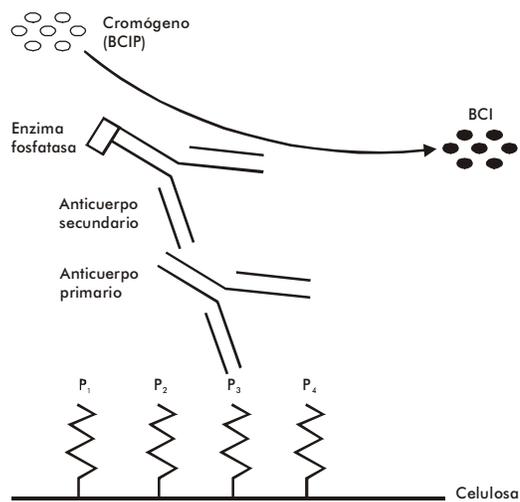


Figura 4. Esquema de reconocimiento de un péptido en un ensayo inmunoenzimático.

Bibliotecas con deconvolución de las mezclas

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 estructura química dada no puede ser determinada; es decir, se conoce solo todas las posibles variantes de compuestos presentes en la mezcla, pero espacialmente no pueden ser asignadas. Por lo tanto la identificación de los compuestos activos debe ser realizada por un proceso iterativo de pesquiasaje y resíntesis de mezclas cada vez más 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 solo 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 compuestos sintéticos: las bibliotecas iterativas y las bibliotecas con barrido de posición.

Bibliotecas combinatorias iterativas. El procedimiento general para la obtención de una biblioteca combinatoria iterativa de hexámeros se muestra en la Figura 7. Inicialmente se preparan O² subbibliotecas, en las cuales se predefinen las dos posiciones iniciales O₁O₂XXXX (O representa el número total de monómeros utilizados en las reacciones combinatorias). Por ejemplo, si se utilizan 20 compuestos de partida dife-

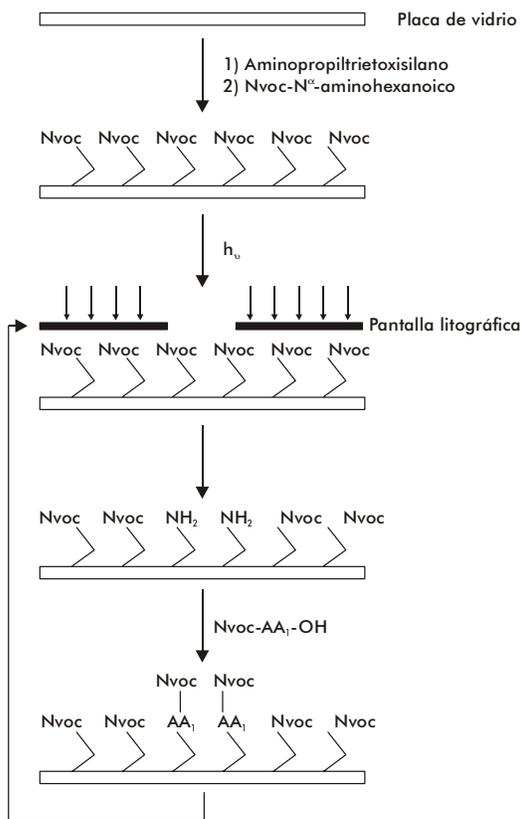


Figura 6. Síntesis de péptidos mediada por luz dirigida. El uso de la luz ultravioleta para la desprotección de los grupos Nvoc controlada por la presentación sobre la superficie del vidrio de diferentes pantallas

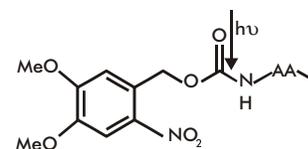


Figura 5. Estructura química del grupo N^o-amino protector, nitroveratrilo-carbonilo (Nvoc-). Cuando se irradia con luz ultravioleta a 365 nm, el enlace entre el grupo Nvoc- y el aminoácido (AA) se rompe y libera al grupo amino para una posterior reacción con otro aminoácido.

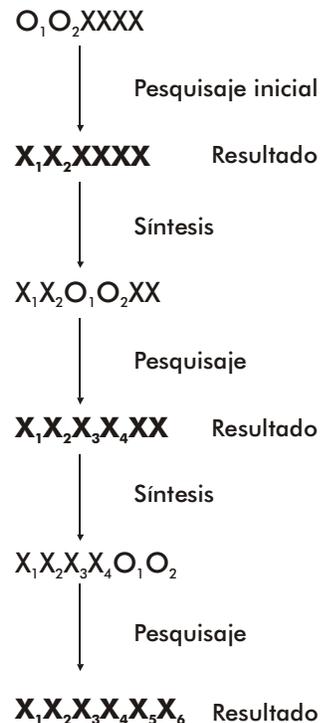


Figura 7. Esquema del procedimiento de pesquiasaje de una biblioteca combinatoria iterativa de compuestos formados a partir de la combinación de diferentes monómeros de partida en seis posiciones. O₁ y O₂ representan posiciones fijas de compuestos de partida, X₁, X₂, ... X₆ son posiciones definidas después de cada ciclo de pesquiasaje y X representa las posiciones aleatorias.

rentes (aminoácidos, ácidos carboxílicos, aldehídos, etc.) el número total de subbibliotecas será de 400 (20^2). Las restantes posiciones X se generan de forma aleatoria e incluyen todas las posibles combinaciones de los monómeros empleados en la síntesis, por lo que cada subbiblioteca contendrá 160 000 compuestos (20^4) y en total la biblioteca incluirá 64 millones de productos sintéticos ($20^2 \times 20^4$). La combinación óptima de los dos primeros monómeros O_1O_2 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 compuestos de partida en las siguientes dos posiciones. El número total de péptidos se reduce a 160 000 debido a que se generan 400 subbibliotecas con solo 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 las siguientes dos posiciones X_3X_4 . Finalmente se requiere la síntesis y el pesquiasaje de solamente 400 moléculas $X_1X_2X_3X_4O_1O_2$ para la determinación del producto final 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 en la biblioteca combinatoria iterativa se generan utilizando la estrategia de síntesis conocida como "racionar y mezclar" [27], como "dividir, acoplar y recombinar" [15] o como "síntesis por partición" [17]. El procedimiento se muestra en la figura 8 y consiste en dividir la cantidad inicial de la resina en un número (n) de partes igual al número de compuestos de partida que se utilice para la obtención de la biblioteca. Posteriormente se realizan las (n) reacciones por separado y una vez concluido este paso, se mezclan todas las partes para dar una cantidad total de resina con los productos intermedarios anclados 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.

Esta variante de bibliotecas combinatorias requiere de un esfuerzo y una dedicación considerables 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 [28] y de antagonistas del receptor opioide [29].

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 la idea es obtener una biblioteca de hexapéptidos, pero a diferencia de las bibliotecas iterativas, solo se fija una posición (O) que barre toda la secuencia: OXXXXX, XOXXXX, XXOXXX, ..., XXXXXO [16]. Las restantes cinco posiciones (X) se obtienen igualmente de forma aleatoria. El número total de subbibliotecas depende de la cantidad de monómeros empleados en la síntesis y del número de ciclos necesarios para ensamblar las estructuras necesarias. Por ejemplo, si se emplean los 20 aminoácidos proteogénicos en la obtención de una biblioteca de hexapéptidos, se deben preparar

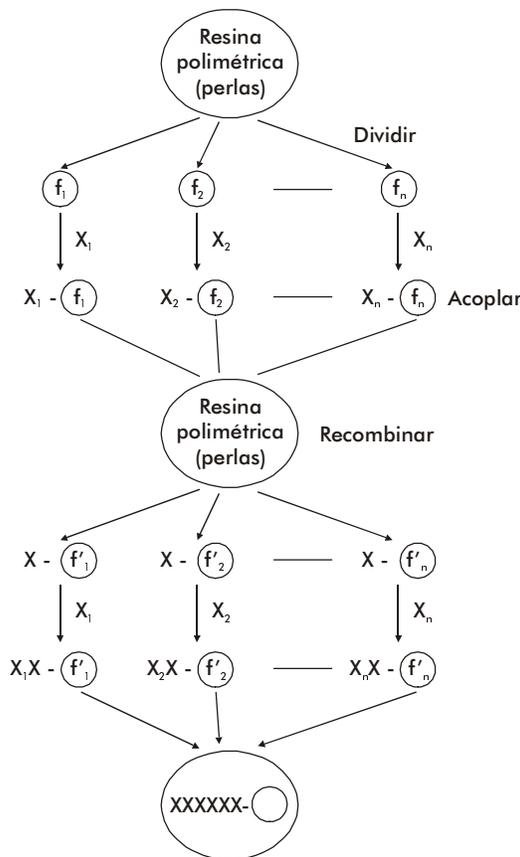


Figura 8. El método de "dividir, acoplar y recombinar" para la generación de las posiciones aleatorias en la secuencia de una biblioteca combinatoria iterativa.

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 (20×20^5).

Esta variante es mucho más efectiva que las bibliotecas combinatorias iterativas por cuanto del pesquiasaje 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. Al igual que la variante de bibliotecas del tipo iterativas, las de barrido de posición se han aplicado fundamentalmente en el pesquiasaje de antagonistas de receptores y péptidos antimicrobianos [30-32]. Un inconveniente de las bibliotecas iterativas y de barrido de posición es la poca solubilidad en el medio acuoso necesario para los ensayos biológicos de algunas secuencias que se generan.

Bibliotecas inmovilizadas sobre el soporte sólido

Bibliotecas combinatorias del tipo "una perla, una estructura"

La preparación de esta variante de bibliotecas combinatorias solo es posible con el empleo como soporte sólido

do de alguna de las resinas poliméricas (perlas) comúnmente utilizadas en la síntesis estándar en fase sólida. El concepto de “una perla, una estructura” se basa en 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 [17]. Esto se debe a que en cada ciclo de acoplamiento, cada perla encuentra un solo aminoácido para reaccionar, lo que resulta en el ensamblaje de una única secuencia por perla individual. Se estima que en una perla de 0,1 mm 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. 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 pesquaje 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 [18].

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 ya que este polímero se comporta de manera similar tanto en medio orgánico como acuoso [17, 33]. 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 [34], las PEG-PS [35] y las resinas de Meldal basadas en la copolimerización de la acrilamida y el polioxietileno [36, 37].

Métodos de pesquaje. El pesquaje 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 [38] o un radionucleótido [39], aunque también es posible acoplar un colorante [40] o un grupo fluorogénico [41] 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 μm de diámetro unidas a la perla son fácilmente visibles al microscopio [42]. 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 quinasas [43] y cisteínicas [35] y de sustratos proteolíticos para varias proteasas [44].

En principio, la mayoría de los ensayos en solución 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 [45]. De esta forma, 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 [37].

En general, la realización de los ensayos directamente sobre las perlas representa un menor esfuerzo de trabajo y elimina el inconveniente de la solubilidad de determinadas secuencias. Esto se debe a que la presencia del espaciador de origen orgánico e hidrofílico 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 previamente no necesitan de la determinación estructural con la ayuda de métodos físico-químicos, ya que éstas 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, 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 0,1 mm contiene aproximadamente 100 pmol 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; éstas incluyen polioxinucleótidos [46] que son analizados por la reacción con la polimerasa y la secuenciación de ADN y péptidos [47] que son analizados por microsecuenciación automática de Edman. 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”.

Conclusiones

El rápido avance en la robótica, en las metodologías de síntesis, en la biología molecular, en los métodos rápidos de pesquises y otras tecnologías relacionadas ha tenido una gran influencia en el desarrollo de la química combinatoria para una amplia serie de aplicaciones biológicas y químicas. No es difícil predecir que con la profundización en el proyecto del genoma humano y

el alto grado de eficiencia que alcanzan, en estos momentos, los sistemas de pesquise de alto flujo, las bibliotecas combinatorias de péptidos y moléculas orgánicas continuarán ocupando un lugar importante en la obtención de resultados relevantes en la medicina humana. La relativamente fácil automatización de las metodologías de síntesis en fase sólida ha hecho de las bibliotecas combinatorias en fase sólida la mejor opción para disponer de un adecuado grado de diversidad de compuestos químicos con posibilidades de convertirse en productos terapéuticos.

- Hogan Jr JC. Combinatorial chemistry in drug discovery. *Nature Biotechnology* 1997; 15:328-30.
- Perola E, Xu K, Kollmeyer TM, Kaufmann SH, Prendergast FG, Pang YP. Successful virtual screening of a chemical database for farnesyltransferase inhibitor leads. *J Med Chem* 2000;43(3):401-8.
- Ivanciuc O, Taraviras SL, Cabrol-Bass D. Quasi-orthogonal basis sets of molecular graph descriptors as a chemical diversity measure. *J Chem Inf Comput Sci* 2000;40 (1):126-134.
- 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.
- Parmely SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988;73:305-310.
- 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.
- Kawasaki G, inventor. Cell-free synthesis and isolation of novel genes and polypeptides. PCT International Patent Application WO91/05058. 1991.
- 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.
- Houghten RA. 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: 5131-35.
- Fodor SPA, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 1991;251:767-73.
- Frank R. Spot-synthesis: an easy technique for the positional addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 1992;48(42):9217-32.
- Boojamra CG, Burow KM, Thomson LA, Ellman JA. Solid Phase synthesis of 1,4-benzodiazepines-2,5-diones. Library preparation and demonstration of synthesis generality. *J Org Chem* 1997;62:1240-56.
- Kim SW, Ahn SY, KohJS, Lee JH, Ro S, Cho HY. Solid Phase synthesis of hydantoinis using a novel cyclization and traceless cleavage step. *Tetrahedron Lett* 1997;38:4603-4606.
- Pérez R, Reyes O, Suárez M, Garay HE, Cruz LJ, Rodríguez H, et al. Solid phase synthesis of 3-(50-carboxypentyl)-5-substituted tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazin-2-thione derivatives. *Tetrahedron Letters* 2000;41: 613-616.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lam KS, Lebl M, Krchňák V. The “one bead-one-compound” combinatorial library method. *Chemical Reviews* 1997;97 (2):411-48.
- Duarte C, Pérez L, Vázquez J, Dueñas M, Vilarubia OL, Nevea L, Váides R, Reyes O, et al. Epitope Mapping V-region DNA Sequence and Neutralizing Fab Fragments Two Monoclonal Antibodies Against HIV-1 V₃ Loop. *Immunotechnology* 1996;2:11-20.
- Guillén G, Álvarez A, Nazabal C, Leal MJ, Alonso LM, Musacchio A, et al. Molecular analysis of *Neisseria meningitidis* class 3 outer membrane protein in strains recognized by the Mab CB-Nm.2. *Biotecnología Aplicada* 1997;14 (1):23-30.
- Araña MJ, Santiago N, China G, Torres B, Pons T, Guerra M, et al. Molecules modulating immune/inflammatory responses, design and development of potential therapeutics. *Biotecnología Aplicada* 1995;12(2):101-2.
- Kramer A, Reineke U, Dong L, Hoffman B, Hoffmuller U, Winkler D, et al. Spot synthesis: observations and optimizations. *J Pept Res* 1999;54 (4):319-27.
- Krchňák 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;38:415-16.
- 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.
- Torrens I, Reyes O, Ojalvo AG, Seralena A, China G, Cruz LJ, et al. Mapping of the Antigenic Regions of Streptokinase in Humans after Streptokinase Therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;259 (1):162-8.
- 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.
- Furka A, Sebastyen F, Asgedon M, Dibo G. General method for rapid synthesis of multi-component peptide mixtures. *Int J Pept Protein Res* 1991;37 (6):487-93.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dooley CT, Chung NN, Schiller PW, Houghten RA. Acetalins: Opioid receptor antagonists determined through the use of synthetic peptide combinatorial libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;90:10811-15.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

39. Turck CW. Radioactive screening of synthetic peptide libraries. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 1994;6:396-400.

40. 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;90:10922-26.

41. Yu H, Chen JK, Feng S, Damalco DC, Brauer AW, Schreiber SL. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* 1994;76 (5):933-45.

42. 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.

43. 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.

44. 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 Transactions* 1995;1(12): 1591-98.

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

46. 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: 10700-04.

47. 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. *Pept Res* 1993;6(3):161-70.

Recibido en agosto del 2001. Aprobado en diciembre del 2001.



Bases moleculares para el estudio de las hepatitis virales

Guillermo J. Padrón

ISBN 959-235-006-X

TP
Teoría y Práctica

Los recientes avances en el estudio de la biología molecular han tenido un importante impacto en el conocimiento de los virus de hepatitis y las infecciones causadas por ellos. Este impacto se hace especialmente manifiesto en los nuevos métodos disponibles para el diagnóstico y estudio de estos virus, así como de las enfermedades por ellos causadas y el desarrollo de vacunas. El propósito de este libro es brindar a los lectores los conocimientos básicos de biología molecular, además de una información actualizada de los más recientes avances relacionados con el conocimiento de los virus de hepatitis. Está dirigido a profesionales (médicos, biólogos, investigadores y otros) vinculados al diagnóstico y al manejo de las hepatitis virales.

Editado por Guillermo J. Padrón — quien ha trabajado durante más de diez años en la biología molecular de las hepatitis virales— este libro es el resultado de la colaboración de un colectivo de autores de Cuba, Italia y la India, todos ellos vinculados directamente a la investigación y al manejo de las hepatitis virales y sus bases moleculares.

Entre otros temas...

- ❖ Generalidades de los virus humanos y animales
- ❖ Clínica de las hepatitis virales
- ❖ El virus de la hepatitis A
- ❖ El virus de la hepatitis B
- ❖ El virus de la hepatitis C
- ❖ El virus de la hepatitis D
- ❖ El virus de la hepatitis E
- ❖ Los virus de las hepatitis no-A-E
- ❖ Vacunas combinadas

Precio: \$20.00 USD



Envíe su solicitud a:
 Elfos Scientiae
 Apartado 6072,
 La Habana 6, Cuba.
 Tel.: (53-7) 33 1917
 Fax: (53-7) 33 1917
 E-mail: elfos@cigb.edu.cu
<http://www.elfoscientiae.com.cu>