

## 8 Capítulo Experimental

### 8.1 Materiales y Métodos

#### 8.1.1 Disolventes y reactivos

|   |  |
|---|--|
| <b>Resinas, aminoácidos y espaciadores bifuncionales</b>                                  | Applied Biosystems<br>Novabiochem<br>Neosystem |
| <b>Reactivos y agentes de acoplamiento</b>  |  |
| DIPCDI, DMAP  | Fluka Chemie                                   |
| PyAOP   | PerSeptive Biosystems                          |
| TBTU  | Novabiochem                                    |
| HOBt  | Novabiochem/SDS                                |
| <b>Principales disolventes y reactivos</b>  |  |
| DCM calidad Normasolv <i>p.a.</i>   | Scharlau                                       |
| DMF calidad síntesis de péptidos  | Scharlau/Panreac                               |
| DIEA calidad <i>p.s.</i>  | Merck/Acros                                    |
| TFA calidad síntesis de péptidos  | KalioChemie                                    |
| TFA calidad BioChemika*   | Fluka  |
| Piperidina calidad <i>p.a.</i>  | Aldrich  |
| HFIP calidad puriss.  | Fluka  |
| Ácido acético calidad <i>p.s.</i>   | Scharlau                                       |
| Fluoruro de hidrógeno   | Ucar   |
| Metanol calidad espectroscópica   | Aldrich  |
| Metanol calidad HPLC  | Scharlau                                       |
| Éter dietílico** calidad <i>puriss</i>  | Scharlau                                       |
| Acetonitrilo calidad HPLC   | Panreac/Scharlau                               |
| H <sub>2</sub> O***   |  |
| Anisol  | Fluka  |
| Pastillas PBS for molecular biology   | Sigma  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> for molecular biology | Sigma  |
| NaOH SigmaUltra   | Sigma  |
| NH <sub>3</sub> (aq) 32%  | Scharlau                                       |

\* El TFA calidad BioChemika se utiliza en los tratamientos disgregantes y/o manipulación de Aβ.

\*\* Estabilizado con BHT y conservado sobre sodio.

\*\*\* El H<sub>2</sub>O se filtra y desioniza con un sistema Milli-Q Plus (Millipore), de forma que la resistividad es superior a 18 mΩ·cm<sup>-1</sup>.

## 8 Capítulo Experimental

---

### Proteínas amiloidogénicas

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| $\beta$ (1-42) lote nº 500425         | Peptide Institute Inc.♦   |
| $\beta$ (1-42)                        | U.S. Peptide  |
| $\beta$ (1-42)                        | Department of Medical<br>Chemistry, University of<br>Szeged, Hungría. |
| $\beta$ (1-40) lote nº K.Soos/36/1999 | Department of Medical<br>Chemistry, University of<br>Szeged, Hungría. |
| Insulina de páncreas bovino, cadena B | Sigma   |

---

### Colorantes

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| CR calidad Standard Fluka (>99%) | Aldrich |
| ThT                              | Sigma   |

---

### Ensayos biológicos

|   | <u>IIBB</u>  | <u>SCT</u>            |
|---|--------------|-----------------------|
| Línea celular PC12                      | J. Comella♦♦ | ATCC                  |
| Penicilina/estreptomicina               | GIBCO        | Molecular Probes      |
| Suero de caballo (HS)                   | GIBCO        | Biological industries |
| Suero bovino fetal (FCS)                | GIBCO        | Biological industries |
| HEPES                                   | Sigma        | Sigma                 |
| L-glutamina                             | Sigma        | Sigma                 |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | GIBCO        | Biological industries |
| Medio de cultivo RPMI 1640              |              | Biological industries |
| Hoechst 33342 (HO)                      |              | Molecular Probes      |

---

---

♦ Se adquirió un único lote (5 mg de  $\beta$ (1-42)), con una pureza aceptable ( $\geq 95\%$ ).

♦♦ Las células PC12 utilizadas en el IIBB son una cepa adherente cedida por el laboratorio del Dr. Comella de la Facultad de Medicina de Lleida.

## 8.1.2 Instrumentación general

### 8.1.3 Métodos analíticos

#### Análisis de aminoácidos

*Beckman System 6300*

- elución con sales de sodio
- columna 250 mm x 4 mm con relleno de resina polisulfonada
- detección post-columna con ninhidrina

#### Centrifugación

*Eppendorf Centrifuge 5415R*

#### Dicroísmo circular

Espectropolarímetro *Jasco J-720* con accesorio portacubetas termostatzable unido a un controlador de temperatura *Jasco*

#### Fluorimetría

*PerkinElmer LS50B*

#### Resonancia magnética nuclear

*Bruker Avance DRS-800*

#### Medidas de pH

*Crison MicropH 2002*

#### Síntesis automática

Sintetizador de péptidos

*AppliedBiosystem 430A*

#### Fluorescencia

*Luminiscen Spectrometer AMNICO-Bowma Series2*

#### Cromatografía líquida

Ver apartado 8.1.4

#### Espectrometría de masas

- *Voyager-DERP MALDI-TOF, PE Biosystems* con láser de N<sub>2</sub>
- *Waters Separation Module 2690*, detector *Kontron instruments 535*, registrador *Merk-Hitachi D-2520 GPC (HPLC-MS)*

#### Liofilización

*Virtis Freezemobile 12 EL*

#### Absorción UV-vis

*Varian Cary E1*

#### Espectrofotometría IR-FT

*ThermoNicolete Nexus*

#### Lector de placas de 96 pocillos

- *Elisa Multiskan RC*
- *Labsystems IEMS Reader MF*

#### Microscopía electrónica de transmisión

*Hitachi A 600* a 75 KV de potencia

#### Microscopía de fluorescencia

Microscopio *Olympus Fluoview 500*

#### Microscopía de campo claro

Microscopio *Leica DMRB*

#### Microscopía con luz polarizada

Microscopio *Nikon Eclipse E600*

### 8.1.3.1 Ensayo de Kaiser o ensayo de ninhidrina cualitativo

El ensayo de ninhidrina o ensayo de Kaiser<sup>209</sup> permite detectar de forma cualitativa la presencia de grupos amino primarios en una resina, sirviendo como control de la extensión en la que ha tenido lugar un acoplamiento. Se toman entre 0,5 y 2,0 mg de resina seca sobre los que se añade el reactivo A (6 gotas) y el reactivo B (2 gotas). La mezcla se calienta durante 3 minutos a 110°C. El tubo que contiene la muestra se enfría rápidamente. Una coloración azul o azul verdosa de la resina o el sobrenadante indica la presencia de aminas primarias (ensayo positivo). Una coloración amarilla indica la ausencia de aminas primarias (ensayo negativo), es decir, un porcentaje de acoplamiento superior al 99,0-99,5% (según la funcionalización de la resina). Si la alícuota de la resina no se ha lavado ni secado puede hacerse dentro del mismo tubo utilizando MeOH (2 ó 3 veces). Es recomendable realizar un ensayo en blanco (sin peptidilresina) en paralelo.

Reactivo A: se prepara una disolución de fenol (40 g) en EtOH absoluto (10 mL) en caliente. De forma independiente se añaden 2 mL de una disolución de KCN (65 mg en 100 mL de H<sub>2</sub>O) sobre piridina (100 mL) recién destilada sobre ninhidrina. Ambas disoluciones se agitan por separado con 4 g de resina Amberlite MB-3 durante 45 min. Seguidamente se filtran y se mezclan los dos filtrados.

Reactivo B: se prepara una disolución de ninhidrina (2,5 g) en EtOH absoluto (50 mL). La disolución se mantiene protegida de la luz, preferiblemente bajo atmósfera de nitrógeno.

### 8.1.3.2 Ensayo de cloranilo cualitativo

El ensayo de cloranilo cualitativo permite detectar la presencia de aminas secundarias libres (por ejemplo las de Pro) en una resina, sirviendo como control de la extensión en la que se ha dado un acoplamiento. Se prepara una disolución saturada de cloranilo (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona) en tolueno (750 mg en 25 mL). Se toman entre 0,5 y 2,0 mg de resina y se adicionan acetona y la solución anterior en una proporción 3:1 (15 y 5 gotas respectivamente). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Una coloración azul-verdosa de la disolución o la resina (ensayo positivo) indica la existencia de aminas secundarias libres y una coloración amarilla (ensayo negativo) indica la ausencia de aminas secundarias. Igual que en el ensayo de ninhidrina, resulta útil la realización de un ensayo en blanco en paralelo.

### 8.1.3.3 Ensayo del *p*-nitrofenilester del rojo disperso I (Red Dye I) cualitativo

El ensayo del *p*-nitrofenilester del rojo disperso I cualitativo<sup>210</sup> (o ensayo *Red Dye I* cualitativo) permite detectar la presencia de aminas secundarias libres (por ejemplo las de Pro o los N-metilaminoácidos) en una resina con una mayor sensibilidad que el ensayo de cloranilo (apartado 8.1.3.2), sirviendo como control de la extensión en la que se ha dado un acoplamiento. Se toman entre 0,5 y 2 mg de resina limpiada con DCM sobre los que se añaden 10 gotas de reactivo (disolución de *p*-nitrofenilester del rojo disperso I en ACN). La

---

<sup>209</sup> Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.

<sup>210</sup> Madre, A.; Farsi, N.; Hosten, N. G. C.; De Muynck, H.; De Clercq, P. J.; Barry, J.; Davis, A. P. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 385, 1-7.

mezcla se calienta a 60°C durante 10 min. Una vez enfriada la mezcla, se separa el sobrenadante y se lava 3-4 veces con DCM hasta eliminar los restos de colorante en la disolución.

Una coloración rojiza o rosada de los granos de resina (ensayo positivo) indica la presencia de aminas secundarias o primarias libres en el soporte polimérico.

La ausencia de color de los granos de resina (ensayo negativo) indica la ausencia de aminas libres en el soporte polimérico.

El *p*-nitrofenilester del rojo disperso I se obtiene mediante un proceso de tres etapas. Partiendo del colorante comercial Rojo Disperso I se hace reaccionar con diazoacetato de etilo, seguidamente se saponifica y por último se condensa con *p*-nitrofenol utilizando POCl<sub>3</sub>. El producto obtenido se purifica por recristalización. El *p*-nitrofenilester del rojo disperso I se utiliza para la determinación de aminas secundarias libres a una concentración 0,02 M en ACN.

### 8.1.3.4 Hidrólisis peptídica y análisis de aminoácidos

El contenido y la proporción de aminoácidos presentes en una muestra peptídica se determina, tras la acidólisis de la muestra, mediante cromatografía de intercambio iónico de los aminoácidos y posterior derivatización con ninhidrina.

La hidrólisis de la peptidilresina se lleva a cabo con una alícuota seca (2-10 mg, dependiendo de la funcionalización de la resina) a la que se añaden 200 µL de HCl/ácido propiónico 1:1. Se sella el tubo y se mantiene durante 90 min a 155°C. Una vez finalizada la hidrólisis se elimina el ácido a presión reducida hasta sequedad, se redissuelve el residuo en un volumen conocido de tampón citrato pH 2 y se filtra utilizando un filtro de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro. La concentración óptima para realizar el análisis de aminoácidos es ~ 5 nmol de aminoácido en 50 µL de tampón (normalmente se disuelve el residuo en 1 mL de tampón y es necesario diluir la muestra en tampón en una relación 50-100/1000 tras filtrar).

La funcionalización se puede obtener, indistintamente, mediante dos métodos diferentes.

El primer método consiste en secar la resina cuidadosamente (se lava con MeOH y se deja en el desecador a vacío bajo potasa y parafina un mínimo de 2h). Se pesa una cantidad entre 2 y 5 mg con una precisión de centésima de miligramo y se hidroliza según el protocolo ya descrito.

El segundo método (el más utilizado en esta tesis) se utiliza en aquellos casos en los que se bloquean las posiciones sobrantes de la resina con un aminoácido (normalmente Gly o Leu). En esta situación se hidroliza una cantidad aproximada de resina (entre 2 y 5 mg) y la funcionalización de ésta se calcula teniendo en cuenta la relación entre ambos aminoácidos, además de la funcionalización inicial de la resina utilizada.

### 8.1.3.5 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La masa molecular de los péptidos sintetizados en esta tesis se determina mediante MALDI-TOF. Se utilizan dos protocolos de preparación de muestras, dependiendo de la dificultad de detección presentada por la muestra durante el análisis.

Los péptidos pequeños (N-metilinhidores, etc.) sintetizados en esta tesis se detectan por MALDI-TOF. Por este motivo se analizan mezclando 1  $\mu\text{L}$  de disolución de péptido ( $\sim 1\text{-}2$  mg/mL) con 1  $\mu\text{L}$  de matriz. La mezcla resultante se aplica sobre la placa de MALDI y se deja secar a temperatura ambiente. La potencia de láser necesaria oscila entre 2700 y 3000 V.

En el caso de los péptidos pequeños aquí descritos se determinó experimentalmente que la matriz más apropiada es el ácido dihidroxibenzoico (DHB). La preparación habitual de esta matriz para MALDI es 10 mg/mL en una mezcla 1:1 ACN/H<sub>2</sub>O con un 0,1% TFA (la preparación se mantiene a 4°C durante un periodo de tiempo inferior a 2-3 semanas).

La proteína A $\beta$ , debido en parte a su baja solubilidad, presenta mayores dificultades para su caracterización mediante MALDI. La matriz que mejores resultados ofrece en este caso es el ácido sinapínico (SA) disuelto a una concentración 10 mg/mL en una mezcla 1:1 ACN/H<sub>2</sub>O con un 0,1% TFA.

En este caso, además, las muestras se preparan de forma ligeramente diferente para mejorar la interacción de A $\beta$  con la matriz. En un primer paso se deposita 1  $\mu\text{L}$  de matriz sobre la placa de MALDI, se deja secar a temperatura ambiente y por último se aplica 1  $\mu\text{L}$  de la disolución de A $\beta$  (normalmente  $\sim 40$   $\mu\text{M}$ , ya que ésta es la concentración de trabajo habitual). Una vez seca la muestra, el análisis se realiza utilizando intensidades de láser cercanas a 3000 V, requiriendo normalmente la acumulación de 200-300 espectros para obtener una relación señal/ruido mínimamente aceptable (la intensidad de las señales de A $\beta$  es muy baja en todas las preparaciones aquí ensayadas).

### 8.1.4 Cromatografía líquida

#### 8.1.4.1 Cromatografía líquida de alta resolución a escala analítica

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a escala analítica se realizó de forma indistinta en los siguientes aparatos:

1. Un aparato *Shimadzu* formado por dos bombas modelo *LC-6A*, inyector automático *SIL-6B/9A*, controlador del sistema *SCL-6B*, y registrador-integrador modelo *Chromatopac C-R6A*.
2. Un aparato *Waters* formado por un controlador y bomba de doble pistón *600E*, inyector automático *Waters 712*, detector de longitud de onda variable modelo *490* que permite medir a dos longitudes de onda simultáneamente y un registrador-integrador modelo *Chromatopac C-R5A*.

3. Un aparato *Waters* controlado por el Software Millennium versión v.4.00 y formado un inyector-sistema de bombeo *Alliance 2695* y un detector *Photodiode Array* modelo 996.

Los sistemas cromatográficos 1 y 2 se utilizaron de forma rutinaria con columnas de acero Nucleosil C<sub>18</sub> de fase reversa (0,4 x 25 cm) con relleno de octadecilsiloxano de 5 µm de diámetro de partícula y 120 Å de tamaño de poro, y de acero Nucleosil C<sub>4</sub> de fase reversa (0,4 x 25 cm) con relleno de butiloxano de 10 µm de diámetro de partícula y 300 Å de tamaño de poro. Los péptidos fueron eluidos a un flujo de 1 mL/min, utilizando diferentes gradientes lineales de ACN según el caso (A: H<sub>2</sub>O-0,045% de TFA y B: ACN-0,036% de TFA, salvo aquellos casos en que se indica lo contrario) y la detección se realizó en continuo a 220 nm. También se utilizaron, de forma puntual, columnas de acero Poly RP-CO (columna Teknokroma de acero de fase reversa (0,4 x 15 cm) de 4 µm de tamaño de partícula) y Ultrabase (columna de acero de fase reversa (0,4 x 25 cm) con relleno de octadecilsiloxano de 5 µm de diámetro de partícula y 120 Å de tamaño de poro, tratada para bloquear los grupos silanol libres).

El sistema cromatográfico 3 se utilizó con una columna de acero Symmetry™ C<sub>18</sub> de fase reversa (0,4 x 15 cm) con relleno de octadecilsiloxano de 5 µm de diámetro de partícula y 120 Å de tamaño de poro. Los péptidos fueron eluidos a un flujo de 1 mL/min, utilizando diferentes gradientes lineales de ACN según el caso (A: H<sub>2</sub>O-0,045% de TFA y B: ACN-0,036% de TFA) y la detección se realizó de forma continua en el intervalo de 190 a 300 nm mediante un detector de fotodiodos.

### 8.1.4.2 Cromatografía líquida de alta resolución a escala semipreparativa y preparativa

La cromatografía líquida de alta resolución a escala semipreparativa se realizó en el sistema cromatográfico 2 descrito en el apartado anterior, utilizando una columna de acero *Vydac* C<sub>18</sub> de fase reversa (1 x 25 cm) con relleno de octadecilsiloxano de 10 µm de diámetro de partícula y 300 Å de tamaño de poro. La elución se realizó a un flujo de 2,5 mL/min, utilizando gradientes lineales de ACN según el caso (A: H<sub>2</sub>O-0,1% de TFA y B: ACN-0,1% de TFA) y la detección se realizó en continuo a 220 nm.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a escala preparativa se realizó en un sistema *Waters Delta Prep*, con un registrador *Pharmacia Biotech REC 101*, utilizando una columna de acero *Azko* C<sub>18</sub> de fase reversa (5 x 30 cm) con relleno de octadecilsiloxano de 10 µm de diámetro de partícula y 300 Å de tamaño de poro. La elución se realizó a un flujo de 25 mL/min, utilizando gradientes lineales de ACN según el caso (A: H<sub>2</sub>O-0,1% de TFA y B: ACN-0,1% de TFA) y la detección se realizó en continuo a 220 nm.

### 8.1.5 Preparación de disoluciones acuosas

#### 8.1.5.1 Tampón fosfato 0,2 M pH 7,4

Se disuelven 0,282 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 10 mL de H<sub>2</sub>O milliQ (disolución 0,2 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Separadamente se disuelven 0,240 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 10 mL de H<sub>2</sub>O milliQ

## 8 Capítulo Experimental

---

(disolución 0,2 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Estas soluciones madres se preparan justo antes de su utilización y se pueden guardar alicuotadas a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  de forma indefinida (las alicuotas sólo se descongelan una vez y después se descartan).

El tampón fosfato 0,2 M pH 7,4 ( $\sim 1\text{ mL}$ ) se obtiene al mezclar  $190\text{ }\mu\text{L}$  de disolución 0,2 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $810\text{ }\mu\text{L}$  de disolución 0,2 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . La mezcla se realiza el mismo día de su utilización.

### 8.1.5.2 Disolución de NaOH 10 mM

Se disuelven 0,400 g de NaOH en 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ (disolución 1M de NaOH). La solución madre se diluye dos veces 1:10 en  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ para obtener la solución 10 mM de NaOH.

### 8.1.5.3 Disolución $\text{NH}_3$ (aq) 0,1 M

Se diluyen  $676\text{ }\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_3$  en 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ (disolución 1M de  $\text{NH}_3$ ). La solución madre se diluye una vez 1:10 en  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ para obtener la solución 0,1M mM de  $\text{NH}_3$ .

### 8.1.5.4 Disolución PBS y PBS 10x

Se disuelve una pastilla de PBS (phosphate buffered saline) Sigma en 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ<sup>♦</sup>. Esta disolución se guarda un máximo de 7 días a  $-4\text{ }^\circ\text{C}$ .

Para preparar una disolución concentrada de PBS se disuelve una pastilla de PBS-sigma en 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ. De esta forma se obtiene una disolución diez veces más concentrada (10x).

## 8.2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A $\beta$

### 8.2.1 Disolución y fibrillogénesis de A $\beta$

#### 8.2.1.1 Preparación de alicuotas

##### 8.2.1.1.1 Preparación de alicuotas de A $\beta$

Se añaden 4,30 g de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ a un vial de  $\beta(1-42)$  comercial (0,53 mg teóricos). La suspensión se introduce 3 min en un baño de ultrasonidos y se alicuota en viales de vidrio<sup>♦♦</sup>. El volumen de suspensión en cada alicuota se adecúa según la aplicación que se desee hacer posteriormente, estimando una pérdida del 20-30% de materia. Los

---

♦ El tampón PBS o tampón fosfato salino obtenido con este procedimiento es una disolución 10 mM en tampón fosfato pH 7,4, 137 mM en NaCl y 2,7 mM en KCl.

♦♦ El péptido A $\beta$  siempre se guarda en vidrio, ya que los tratamientos posteriores con TFA o disolventes orgánicos pueden arrastrar plastificantes y contaminar la muestra.

nanomoles de péptido presentes en cada alícuota se obtienen mediante el análisis de aminoácidos de una de las alícuotas.

Las alícuotas resultantes se congelan con  $N_2(\ell)$  en el menor tiempo posible, se liofilizan y se guardan a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### **8.2.1.1.2 Preparación de alícuotas de inhibidor + A $\beta$**

A una alícuota de A $\beta$  de concentración conocida se le añaden 5 equivalentes de inhibidor (se prepara una disolución del inhibidor  $\sim 1\text{-}4\text{ mM}$  en  $H_2O$  y se determina su concentración exacta mediante análisis de aminoácidos). Inmediatamente se congela con  $N_2(\ell)$  y se liofiliza. La alícuota con la mezcla inhibidor-A $\beta$  se conserva a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

En el experimento de obtención de la curva concentración-respuesta descrito en el apartado 4.1.3.2.4 se utilizan concentraciones variables de inhibidor. Para ello se añaden cantidades variables de inhibidor (1, 2,5, 5 y 25 equivalentes) a una alícuota de A $\beta$  y se procede como se describe en este apartado para las muestras con 5 equivalentes de inhibidor.

### **8.2.1.1.3 Preparación de alícuotas de inhibidor**

La preparación de alícuotas de cada inhibidor se realiza igual que en el apartado 8.2.1.1.2. Se escoge un volumen final que nos permita realizar los experimentos planeados y trabajar cómodamente (100-200  $\mu\text{L}$ ) y se calcula el volumen de inhibidor que es necesario añadir teniendo en cuenta que la disolución resultante ha de ser 200  $\mu\text{M}$  (nuevamente partimos de una disolución de inhibidor  $\sim 1\text{-}4\text{ mM}$  en  $H_2O$ ). La alícuota con el inhibidor se conserva a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### **8.2.1.1.4 Tratamiento disgregante**

El tratamiento disgregante se realiza a todas las alícuotas de A $\beta$ , inhibidor o mezclas de éstos antes de preparar las correspondientes soluciones.

Cada alícuota se disuelve con 0,5-1,0 mL de TFA (calidad BioChemika) y se evapora bajo una corriente de  $N_2$ . Se disuelve con 0,5-1,0 mL de HFIP (calidad puriss.) y se evapora bajo una corriente de  $N_2$ . Se vuelve a disolver en HFIP, se evapora nuevamente bajo una corriente de  $N_2$  y se disuelve una última vez en HFIP. En este punto la muestra puede guardarse congelada un máximo de una semana. Para utilizar la alícuota, se evapora ésta bajo una corriente de  $N_2$  y se deja en un desecador con parafina y KOH un mínimo de 2 h y un máximo de una noche. Tras este periodo se procede a disolver la muestra como se detalla en el apartado 8.2.1.2.

### 8.2.1.2 Disolución de muestras

#### 8.2.1.2.1 Método A: envejecimiento de alícuotas utilizando $NH_3$

Se suspenden 0,20 mg de  $\beta(1-42)$  en 150  $\mu L$  de  $NH_3$  (aq) 0,1M y después se diluyen con 100  $\mu L$  de  $H_2O$ . De esta forma se obtiene una disolución 170  $\mu M$  de  $\beta(1-42)$  en 0,1% de  $NH_3$  transparente a simple vista. La concentración no se puede determinar de forma exacta mediante AAA debido a la presencia de  $NH_3$ . La disolución se deja envejecer 90 h a 37°C.

#### 8.2.1.2.2 Método B: puesta a punto del envejecimiento de alícuotas utilizando NaOH/fosfato

Una alícuota de 0,10 mg de  $\beta(1-42)$  se disgrega mediante el tratamiento disgregante (apartado 8.2.1.1.4). Se añaden 80  $\mu L$  de NaOH 10mM en porciones de 20  $\mu L$  (17,8% del volumen total). Se observa la práctica disolución de la muestra. La suspensión se diluye con 325  $\mu L$  de  $H_2O$  milliQ (72,2%) y finalmente se añaden 45  $\mu L$  de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4.

La muestra recién preparada se centrifuga y se separa la fracción soluble del precipitado. Mediante AAA se verifica que la concentración de  $\beta(1-42)$  en la fracción soluble es 41  $\mu M$  y que el precipitado contiene ~0,02 mg de  $\beta(1-42)$  insoluble (~20% del total). La disolución resultante se envejece durante 90 h a 37°C.

#### 8.2.1.2.3 Método de envejecimiento de muestras estándar\* (método B modificado)

Este protocolo ha sido utilizado para preparar todas las muestras de A $\beta$  y/o inhibidores a no ser que se indique explícitamente lo contrario en el texto. De forma previa a la disolución descrita en este apartado se realiza siempre el tratamiento de disgregación detallado en el apartado 8.2.1.1.4.

Se calcula el volumen de líquido que es necesario añadir a una alícuota para obtener una concentración final igual a 40  $\mu M$  de A $\beta$  o 200  $\mu M$  de inhibidor (por ejemplo, una alícuota con 4 nmoles de A $\beta$  requiere un volumen total de 100  $\mu L$ ), y se añade, por este orden y agitando con vórtex después de cada adición:

1. 17,8% del volumen final de una disolución 10 mM NaOH (17,8  $\mu L$  para un volumen total de 100  $\mu L$ , apartado 8.1.5.2).
2. 72,2% del volumen final de  $H_2O$  milliQ (72,2  $\mu L$  para un volumen total de 100  $\mu L$ ).
3. 10% del volumen final de una disolución 0,2 M tampón fosfato pH 7,4 (10,0  $\mu L$  para un volumen total de 100  $\mu L$ , apartado 8.1.5.1).

---

\* Se denomina método de envejecimiento estándar ya que es el utilizado en la preparación de todas las muestras de esta tesis, excepto en los casos puntuales en los que se indica lo contrario.

Las muestras así preparadas se mantienen  $\sim 93$  h a  $37^\circ\text{C}$ , en una atmósfera saturada de vapor de  $\text{H}_2\text{O}$  para minimizar la evaporación. Transcurrido este tiempo obtenemos las denominadas *muestras envejecidas*, las cuales se utilizan en el intervalo de 1-3 horas.

El tampón fosfato utilizado en el apartado 8.4.2.5 se prepara siguiendo este mismo protocolo, pero omitiendo la presencia de  $\text{A}\beta$ .

La síntesis peptídica manual se lleva a cabo utilizando jeringas de polipropileno de volúmenes variables, provistas de filtros de polietileno poroso.

La síntesis peptídica automática se realiza utilizando un aparato Applied BioSystems con la estrategia de protección Boc/Bzl. La escala de trabajo es de 0,1 mmol.

## 8.2.2 Protocolos generales para la síntesis de $\text{A}\beta$

### 8.2.2.1 Acondicionamiento de la resina *p*-MBHA en la estrategia Boc/Bzl

La resina *p*-MBHA comercial utilizada en esta tesis presenta una funcionalización de 0,70 mmol/g. Previamente a su uso es necesario acondicionarla utilizando el protocolo descrito en la Tabla 17.

| <b>Etap</b> | <b>Función</b> | <b>Reactivos/Disolventes</b> | <b>Tiempo</b>           |
|-------------|----------------|------------------------------|-------------------------|
| 1           | Lavado         | DCM                          | 5 x 30s                 |
| 2           | Activación     | TFA/DCM 2:3, v/v             | 1 x 30s +<br>1 x 20 min |
| 4           | Lavado         | DCM                          | 5 x 30s                 |
| 5           | Neutralización | DIEA/DCM 1/19, v/v           | 3 x 2 min               |
| 6           | Lavado         | DCM                          | 5 x 30s                 |

Tabla 17. Acondicionamiento de la resina *p*-MBHA.

Una vez activada la resina, se reduce su funcionalización a un valor entre 0,1 y 0,2 mmol/g.

La funcionalización de la resina *p*-MBHA utilizada en la síntesis de  $\beta(1-42)$  se disminuye acoplado un déficit de Boc-Ala y bloqueando las posiciones restantes con Fmoc-Gly o Fmoc-Leu, según el protocolo mostrado en la Tabla 18.

La funcionalización final se calcula mediante análisis de aminoácidos (apartado 8.1.3.4).

| Etapa | Función       | Reactivos/Disolventes                    | Tiempo    |
|-------|---------------|--|-----------|
| 1     | Lavado        | DCM                                      | 5 x 30 s  |
| 2     | Acoplamiento  | Boc-Ala/ DIPCDI/ HOBt 0,5:0,5:0,5 en DCM | 1 h       |
| 3     | Lavado        | DCM                                      | 5 x 30 s  |
| 4     | Acoplamiento  | Fmoc-AA/ DIPCDI/ HOBt 4:4:4 en DMF       | 1 h*      |
| 5     | Lavado        | DMF                                      | 5 x 30 s  |
| 6     | Desprotección | 20% piperidina/DMF                       | 3 x 5 min |
| 7     | Lavado        | DMF                                      | 5 x 30 s  |
| 8     | Acetilación   | Ac <sub>2</sub> O/DIEA 10:10 en DMF      | 20 min*   |
| 9     | Lavado        | DMF                                      | 5 x 30 s  |

Tabla 18. Protocolo para reducir la funcionalización de la resina *p*-MBHA para la síntesis de A $\beta$ .

### 8.2.2.2 Síntesis automática de péptidos en fase sólida

#### 8.2.2.2.1 Elongación de la cadena peptídica utilizando como método de activación el anhídrido simétrico

La elongación de la cadena se lleva a cabo mediante síntesis automática en el aparato *AppliedBiosystem 430A*. Este sistema utiliza normalmente la aproximación del anhídrido simétrico (ciclos de elongación constituidos por un acoplamiento con Boc-AA/ DCC en una relación 6:3 durante 25 a 30 min, seguidos de desprotecciones con TFA 100% y neutralización con DIEA/DCM).

#### 8.2.2.2.2 Elongación de la cadena peptídica utilizando como método de activación TBTU/neutralización *in-situ*

El equipo *AppliedBiosystems 430A* también se puede configurar para trabajar con TBTU como agente de acoplamiento. En este caso la escala de trabajo utilizada son 0,25 mmol y el acoplamiento se lleva a cabo con Boc-AA/TBTU/DIEA en una relación 8:8:16 durante 10 min. La desprotección se realiza también con TFA 100%, pero la neutralización se lleva a cabo *in-situ* (de forma simultánea al acoplamiento).

### 8.2.2.3 Acidólisis del enlace péptido-MBHA

Antes de la escisión del enlace péptido-resina mediante tratamiento con HF<sub>anh.</sub> se eliminan los restos de disolvente en la resina realizando un lavado con MeOH y un secado a presión reducida.

La escisión del enlace entre el péptido y la resina *p*-MBHA se realiza mediante acidólisis con HF en presencia de anisol, el cual actúa como capturador de carbocationes. En estas condiciones, las cadenas laterales de los aminoácidos también se desprotegen, dando lugar

\* La incorporación total se verifica mediante el ensayo de Kaiser (tras lavar la resina con DCM). En caso de no ser cuantitativo, el acoplamiento de Fmoc-AA vuelve a realizarse utilizando ½ de los reactivos indicados.

al péptido libre. Puesto que no se añade ningún reductor, es de esperar la obtención de una mezcla del péptido deseado y el péptido con la metionina oxidada (Met(O)).

La peptidilresina seca ( $\leq 0.5$  g) se dispone en un reactor de teflon junto al anisol (0.5 mL) y se enfría con  $N_2$  líquido durante 10 min. Se destila HF (5 mL) sobre la mezcla y se deja reaccionar 1 h a  $0^\circ C$  con agitación magnética. Transcurrido este tiempo se elimina el HF a presión reducida, se añade éter dietílico anhidro para precipitar el péptido y se filtra la suspensión a través de una jeringa provista de un filtro de polipropileno. El residuo se lava 4 veces con  $\sim 10$  mL de éter.

El péptido A $\beta$  es altamente insoluble en medios acuosos, por lo que se separa del residuo sólido utilizando TFA 100%.

El residuo se lava 4 veces con TFA, se recoge el filtrado y se evapora con corriente de  $N_2$ . La eliminación de los posibles restos de anisol se realiza mediante suspensión del residuo en AcOH glacial y posterior liofilización. De esta forma se obtiene un crudo peptídico en forma de sólido blanco.

### 8.2.3 Síntesis de A $\beta$

#### 8.2.3.1 Síntesis 01-BA del péptido $\beta(1-42)$

La síntesis de A $\beta$  que se realiza en el aparato Applied Biosystems utilizando como método de activación el anhídrido simétrico.

Se reduce la funcionalización de la resina *p*-MBHA de partida (0,70 mmol/g) mediante el protocolo descrito en el apartado 8.2.2.1 (utilizando Fmoc-Gly para bloquear las posiciones sobrantes), obteniendo un valor de 0,16 mmol Boc-Ala/g resina. En la síntesis de 01-BA se utilizan 0,690 g de esta resina (escala de trabajo 0,1 mmol).

Tanto los aminoácidos correspondientes a la región transmembranal (desde Ala<sup>30</sup> hasta Ile<sup>41</sup>), como la región problemática detectada en nuestro grupo durante la síntesis de  $\beta(12-28)$ <sup>211</sup> (desde Glu<sup>11</sup> hasta Gln<sup>15</sup>), se reacoplan de forma sistemática.

La composición aminoacídica de la peptidilresina 01-BA se determina mediante análisis de aminoácidos de una alícuota, obteniendo los valores mostrados en la **Tabla 19**.

La peptidilresina 01-BA se guarda seca a  $-20^\circ C$  y se procede a escindir pequeñas alícuotas, según el protocolo del apartado 8.2.2.3, para su evaluación.

El análisis mediante MALDI (apartado 8.1.3.5) del crudo obtenido tras la escisión con HF muestra la presencia de la masa esperada,  $[M+H]^+=4514$  uma (teórico 4514 uma), no pudiéndose determinar la presencia de ninguna impureza correspondiente a péptidos de deleción, aunque se apreció, en algunas alícuotas, la presencia de producto oxidado en la Met (señal a 4530 uma).

---

<sup>211</sup> Quintero, M. R.; *Máster experimental en Química Orgánica*, Dpto. Química Orgánica, Universidad de Barcelona (septiembre 1999).

| AA    | Contenido obtenido | Contenido teórico |
|-------|--------------------|-------------------|
| Asp*  | 3,47               | 4                 |
| Ser*  | 0,04               | 2                 |
| Glu   | 3,01               | 4                 |
| Gly** | 15,22              | 6                 |
| Ala*  | 4,61               | 4                 |
| Val*  | 6,04               | 6                 |
| Met*  | 0,80               | 1                 |
| Ile*  | 3,25               | 3                 |
| Leu*  | 2,32               | 2                 |
| Tyr   | 0,31               | 1                 |
| Phe   | 2,31               | 3                 |
| His   | 1,51               | 3                 |
| Lys   | 2,73               | 2                 |
| Arg   | 0,00               | 1                 |

**Tabla 19.** Composición aminoacídica de la peptidilresina O1-BA. Hidrólisis realizada en ácido propiónico/HCl 1:1 durante 3 h a 155°C. El símbolo \* indica los aminoácidos cuya composición está comprendida entre  $\pm 20\%$  de la composición teórica y cuyo valor se utiliza para el cálculo del contenido promedio.

### 8.2.3.2 Síntesis O2-BA del péptido $\beta(1-42)$

La síntesis de O2-BA se realiza también en el aparato Applied Biosystems siguiendo una estrategia de protección Boc/Bzl, pero utilizando esta vez TBTU como agente de acoplamiento con neutralización *in-situ*.

Partiendo de resina *p*-MBHA 0,70 mmol/g se reduce la funcionalización mediante el protocolo descrito en el apartado 8.2.2.1 (utilizando Fmoc-Leu para bloquear las posiciones sobrantes). La funcionalización obtenida es de 0,28 mmol Boc-Ala/g resina, por lo que se utilizan 0,874 g de resina para la síntesis (escala de trabajo 0,25 mmol).

Tanto los aminoácidos correspondientes a la región transmembranal (desde Ala<sup>30</sup> hasta Ile<sup>41</sup>), como la región problemática detectada en nuestro grupo durante la síntesis de  $\beta(12-28)$ <sup>211</sup> (desde Glu<sup>11</sup> hasta Gln<sup>15</sup>), se reacoplan de forma sistemática.

La composición aminoacídica de la peptidilresina se determina mediante análisis de aminoácidos de una alícuota de O2-BA, obteniendo los valores mostrados en la **Tabla 20**.

| AA   | Contenido obtenido | Contenido teórico |
|------|--------------------|-------------------|
| Asp* | 3,24               | 4                 |
| Ser* | 0,00               | 2                 |
| Glu  | 3,07               | 4                 |
| Gly* | 6,66               | 6                 |
| Ala* | 4,30               | 4                 |

- \* Durante las hidrólisis largas en ausencia de fenol, como la utilizada en este caso, la Ser se degrada rápidamente, por lo que es normal encontrar valores muy inferiores al teórico.
- \*\* La Gly es anormalmente alta ya que hemos utilizado este aminoácido para reducir la funcionalización de la resina.
- ♦ Durante las hidrólisis largas en ausencia de fenol, como la utilizada en este caso, la Ser se degrada rápidamente, por lo que es normal encontrar valores muy inferiores al teórico.

| AA    | Contenido obtenido | Contenido teórico |
|-------|--------------------|-------------------|
| Val*  | 6,74               | 6                 |
| Met   | 0,31               | 1                 |
| Ile*  | 2,69               | 3                 |
| Leu** | 4,26               | 2                 |
| Tyr   | 0,03               | 1                 |
| Phe   | 2,20               | 3                 |
| His   | 1,75               | 3                 |
| Lys*  | 2,30               | 2                 |
| Arg   | 0,39               | 1                 |

**Tabla 20.** Composición aminoacídica de la peptidilresina 02-BA. Hidrólisis realizada en ácido propiónico/HCl 1:1 durante 3 h a 155°C. El símbolo \* indica los aminoácidos cuya composición está comprendida entre  $\pm 20\%$  de la composición teórica y cuyo valor se utiliza para el cálculo del contenido promedio.

La peptidilresina obtenida se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se procede a escindir pequeñas alícuotas, según el protocolo del apartado 8.2.2.3, para realizar las pruebas de cromatografía, solubilidad, etc. descritas en esta tesis.

El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF (apartado 8.1.3.5) del crudo obtenido tras la escisión con HF muestra la presencia de la masa esperada,  $[\text{M}+\text{H}]^+=4513$  uma (teórico 4514 uma), no pudiéndose determinar la presencia de ninguna impureza correspondiente a péptidos de delección ni al producto oxidado en la Met.

### 8.2.3.3 Síntesis 03-BA del péptido $\beta(1-40)$

La síntesis de  $\beta(1-40)$  se hace en el aparato Applied Biosystems siguiendo una estrategia de protección Boc/Bzl, utilizando la aproximación del anhídrido simétrico.

En esta síntesis se usa resina *p*-MBHA previamente derivatizada con el espaciador PAM y el primer aminoácido (Boc-Val-PAM-MBHA comercial) de funcionalización inicial 0,50 mmol/g. El soporte se acondiciona utilizando el método que se describe en el apartado 8.2.2.1 para la resina *p*-MBHA, pero se acoplan sólo 0,8 equivalentes de Boc-Val para disminuir la funcionalización y se bloquea con Fmoc-Gly. De esta forma se obtiene una funcionalización final de 0,20 mmol Boc-Val/g resina, por lo que se utilizan 0,510 g de resina para la síntesis (escala de trabajo 0,1 mmol).

Igual que en las dos síntesis previas de  $\beta(1-42)$ , tanto los aminoácidos correspondientes a la región transmembranal (desde Ala<sup>30</sup> hasta Ile<sup>41</sup>), como la región problemática detectada en nuestro grupo durante la síntesis de  $\beta(12-28)$ <sup>211</sup> (desde Glu<sup>11</sup> hasta Gln<sup>15</sup>), se reacoplan de forma sistemática.

La composición aminoacídica de la peptidilresina se determina mediante análisis de aminoácidos de una alícuota de 03-BA. En este caso los valores obtenidos (**Tabla 21**) presentan una elevada diferencia respecto a los valores esperados. Por este motivo los valores reales se calculan referidos únicamente a Ile y Leu (no es posible ajustar los valores utilizando ninguna combinación de aminoácidos).

\*\* La Leu es anormalmente alta ya que hemos utilizado este aminoácido para reducir la funcionalización de la resina.

| AA   | Contenido obtenido | Contenido teórico |
|------|--------------------|-------------------|
| Asp  | 1,13               | 4                 |
| Ser  | 0,25               | 2                 |
| Glu  | 0,89               | 4                 |
| Gly* | 9,42               | 6                 |
| Ala  | 2,03               | 4                 |
| Val  | 8,52               | 6                 |
| Met  | 0,94               | 1                 |
| Ile* | 1,82               | 3                 |
| Leu* | 2,18               | 2                 |
| Tyr  | 0,14               | 1                 |
| Phe  | 0,60               | 3                 |
| His  | 0,87               | 3                 |
| Lys  | 0,99               | 2                 |
| Arg  | 0,08               | 1                 |

**Tabla 21.** Composición aminoacídica de la peptidilresina 03-BA. Hidrólisis realizada en ácido propiónico/HCl 1:1 durante 3 h a 155°C. El símbolo \* indica los aminoácidos cuya composición está comprendida entre  $\pm 20\%$  de la composición teórica y cuyo valor se utiliza para el cálculo del contenido promedio.

El sólido obtenido tras la escisión de la peptidiresina (apartado 8.2.2.3), resulta soluble en mezclas ACN/H<sub>2</sub>O.

El análisis mediante MALDI-TOF se lleva a cabo utilizando las condiciones óptimas halladas para  $\beta(1-42)$  (apartado 8.1.3.5), obteniendo de esta forma espectros que muestran una señal mayoritaria a 1129 uma, acompañada de múltiples señales de menor intensidad entre 1568 (correspondiente quizás al fragmento 23-40) y 3744 uma. Dichas señales no son asignables de forma directa a péptidos de deleción, ni tampoco corresponden a producto poliprotonado (masa teórica de  $\beta(1-40)=4330$  uma).

La muestra se analizó por HPLC utilizando columnas C<sub>18</sub>, C<sub>4</sub> (ambas en condiciones ácidas estándar) y POLY RP-CO a pH básico (0,1% NH<sub>3</sub> a T<sub>amb</sub> y a 60°C). En todos los casos se obtienen cromatogramas complejos como el mostrado en la Figura 29.

### 8.2.3.4 Síntesis 04-BA del péptido $\beta(1-40)$

La segunda síntesis de  $\beta(1-40)$  se hizo en el aparato Applied Biosystems con la estrategia de protección Boc/Bzl. Igual que en la síntesis anterior, se utiliza la aproximación del anhídrido simétrico.

El protocolo de síntesis utilizado es el mismo que en el apartado 8.2.3.3, pero utilizando resina hidroximetil-poliestireno de funcionalización 0,68 mmol/g (100-200 Mesh, con un 1% de divinilbenceno). Este soporte se acondiciona utilizando el método descrito en el apartado 8.2.2.1, pero acoplado sólo 0,4 equivalentes de Boc-Val para disminuir la funcionalización (se utiliza Boc-Val/DIPCI/DMAP en una relación 0,4:0,4:0,04 durante 30 min) y se bloquea con Fmoc-Gly como se describe en el apartado 8.2.2.1. De esta forma se obtiene una funcionalización de 0,11 mmol Boc-Val/g resina. Se utiliza 1,02 g de resina para la síntesis (escala de trabajo 0,1 mmol).

\* La Gly es anormalmente alta ya que hemos utilizado este aminoácido para reducir la funcionalización de la resina.

La síntesis se detiene, debido a un problema mecánico, en el aminoácido Ile<sup>32</sup> (se verifica, tanto por ninhidrina como por análisis de aminoácidos, que la secuencia sobre la resina es correcta, pero que el acoplamiento de dicho aminoácido es incompleto). Se reacopla de forma manual la isoleucina durante 2 h utilizando Boc-Ile/DCC/HOBt 3:3:3) y se finaliza la síntesis automática de la forma habitual.

| AA   | Contenido obtenido | Contenido teórico | Contenido hasta Ile <sup>32</sup> |
|------|--------------------|-------------------|-----------------------------------|
| Asp  | 0                  | 4                 |                                   |
| Ser  | 0                  | 2                 |                                   |
| Glu  | 0                  | 4                 |                                   |
| Gly  | 4,25               | 6                 | 3                                 |
| Ala  | 0                  | 3                 |                                   |
| Val* | 2,78               | 6                 | 3                                 |
| Met* | 0,88               | 1                 | 1                                 |
| Ile  | 0,25               | 2                 | 1                                 |
| Leu* | 0,97               | 2                 | 1                                 |
| Tyr  | 0                  | 1                 |                                   |
| Phe  | 0                  | 3                 |                                   |
| His  | 0                  | 3                 |                                   |
| Lys  | 0                  | 2                 |                                   |
| Arg  | 0                  | 1                 |                                   |

**Tabla 22.** Composición aminoacídica de la peptidilresina 04-BA. Hidrólisis realizada en ácido propiónico/HCl 1:1 durante 3 h a 155°C. El símbolo \* indica los aminoácidos cuya composición se utiliza para el cálculo del contenido promedio, utilizando en este caso como referencia los aminoácidos teóricos hasta el residuo Ile<sup>32</sup>.

El crudo obtenido rinde un análisis de aminoácidos muy similar al obtenido antes del reacoplamiento de Ile<sup>32</sup>, como se observa al analizar los datos de la **Tabla 22**.

El análisis del crudo mediante MALDI utilizando las condiciones óptimas halladas para  $\beta(1-42)$  (apartado 8.1.3.5) rinde un espectro de masas no asignable.

### 8.2.3.5 Síntesis 05-BA del péptido $\beta(1-40)$

El quinto intento de síntesis de A $\beta$  se lleva a cabo igual que la síntesis de 04-BA descrita en el apartado 8.2.3.4 (se utiliza la resina preparada para la síntesis de 04-BA), pero en este caso la síntesis se realizó de forma ininterrumpida.

La **Tabla 23** muestra el análisis de aminoácidos de la peptidilresina 01-BA-05.

| AA   | Contenido obtenido | Contenido teórico |
|------|--------------------|-------------------|
| Asp  | 1,86               | 4                 |
| Ser  | 0,38               | 2                 |
| Glu  | 1,98               | 4                 |
| Gly* | 6,52               | 6                 |
| Ala* | 3,48               | 3                 |
| Val  | 10,62              | 6                 |
| Met  | 0,36               | 1                 |
| Ile  | 4,57               | 2                 |
| Leu  | 4,48               | 2                 |

| AA  | Contenido obtenido | Contenido teórico |
|-----|--------------------|-------------------|
| Tyr | 2,44               | 1                 |
| Phe | 1,39               | 3                 |
| His | 0,47               | 3                 |
| Lys | 0,44               | 2                 |
| Arg | 0,00               | 1                 |

**Tabla 23.** Composición aminoacídica de la peptidilresina 03-BA. Hidrólisis realizada en ácido propiónico/HCl 1:1 durante 3 h a 155°C. El símbolo \* indica los aminoácidos cuyo valor se utiliza para el cálculo del contenido promedio.

Nuevamente, e igual que sucede con 04-BA, el crudo obtenido tras escindir una alícuota de 05-BA muestra, mediante EM MALDI-TOF (apartado 8.1.3.5), la ausencia de señales por encima de 1000 uma.

### 8.3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A $\beta$

#### 8.3.1 Síntesis de inhibidores

La síntesis de inhibidores peptídicos se realiza de forma manual utilizando jeringas de polipropileno, provistas de filtros de polietileno poroso. El soporte utilizado en todos los casos es resina *p*-MBHA, cuya funcionalización se reduce a valores comprendidos entre 0,1-0,3 mmol/g resina y se derivatiza, posteriormente, con el espaciador Fmoc-AM.

##### 8.3.1.1 Protocolos generales utilizados en la síntesis de inhibidores

###### 8.3.1.1.1 Acondicionamiento de la resina *p*-MBHA en la estrategia de protección Fmoc / <sup>t</sup>Bu

La resina *p*-MBHA utilizada presenta una funcionalización de 0,70 mmol/g. Previamente a su uso es necesario acondicionarla utilizando el protocolo descrito anteriormente en la Tabla 17.

Para la síntesis de inhibidores peptídicos **1**, **3**, **4**, **5**, **7** y **22** la resina se utiliza sin modificar la funcionalización. En las restantes series la funcionalización se reduce acoplado un déficit de Fmoc-Gly y acetilando las posiciones restantes con Ac<sub>2</sub>O, según el protocolo mostrado en la **Tabla 24**.

En **1**, **2**, **3** y **7** se incorpora Fmoc-Gly antes de la introducción del espaciador como aminoácido de referencia para poder cuantificar el rendimiento de los acoplamientos sobre N-metilaminoácidos (con dicho fin se utiliza el protocolo habitual en química Fmoc/<sup>t</sup>Bu que se describe en el apartado 8.3.1.1.2).

| Etapa | Función       | Reactivos/Disolventes                     | Tiempo    |
|-------|---------------|---|-----------|
| 1     | Lavado        | DMF                                       | 5 x 30 s  |
| 2     | Acoplamiento  | Fmoc-Gly/ DIPCDI/ HOBt 0,5:0,5:0,5 en DMF | 1 h       |
| 3     | Lavado        | DMF                                       | 5 x 30 s  |
| 4     | Desprotección | 20% piperidina/DMF                        | 3 x 5 min |
| 5     | Lavado        | DMF                                       | 5 x 30 s  |
| 6     | Acetilación   | Ac <sub>2</sub> O/DIEA 10:10 en DMF       | 20 min    |
| 7     | Lavado        | DMF                                       | 5 x 30 s  |

**Tabla 24.** Protocolo para reducir la funcionalización de la resina *p*-MBHA para la síntesis de Aβ.

La funcionalización real se calcula mediante análisis de aminoácidos de la resina seca (apartado 8.1.3.4).

### 8.3.1.1.1 Incorporación del espaciador Fmoc-AM sobre *p*-MBHA

El acoplamiento del espaciador Fmoc-AM (ácido *p*-[(*R,S*)-α-[1-(9*H*-fluoren-9-il)-metoxiformamido]-2,4-dimetoxibencil]fenoxiacético) se hace siguiendo el protocolo de la **Tabla 25**.

| Etapa | Función      | Reactivos/Disolventes              | Tiempo                    |
|-------|--------------|------------------------------------|---------------------------|
| 1     | Lavado       | DMF                                | 5 x 30 s                  |
| 2     | Acoplamiento | Fmoc-AM/ DIPCDI/ HOBt 2:2:2 en DMF | 15 h ( <i>overnight</i> ) |
| 3     | Lavado       | DMF                                | 5 x 30 s*                 |

**Tabla 25.** Acoplamiento de Fmoc-AM sobre *p*-MBHA.

La resina obtenida de esta forma se utiliza en la síntesis de los derivados de la secuencia Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH<sub>2</sub>.

### 8.3.1.1.1.2 Incorporación del espaciador AB sobre *p*-MBHA

En el caso del péptido **11**, éste se sintetiza en forma de carboxi-terminal. Para ello se utiliza el ácido 3-(4-hidroximetilfenoxi)propiónico (AB), el cual se incorpora sobre la resina *p*-MBHA previamente acondicionada (Tabla 17) utilizando el protocolo descrito en la **Tabla 26**.

El primer aminoácido que se introduce sobre este soporte (AB-MBHA) lo hace formando un enlace éster. Por ello es necesario utilizar como catalizador dimetilaminopiridina (DMAP), siguiendo el protocolo de la **Tabla 27**.

\* Se verifica mediante el ensayo de Kaiser (tras lavar la resina con DCM) que la incorporación ha sido completa. En caso de no ser cuantitativo, el acoplamiento de Fmoc-AM se repite utilizando ½ de los reactivos iniciales durante 3 h.

## 8 Capítulo Experimental

| Etapa | Función      | Reactivos/Disolventes | Tiempo                    |
|-------|--------------|-----------------------|---------------------------|
| 1     | Lavado       | DMF                   | 5 x 30 s                  |
| 2     | Acoplamiento | AB/DIPCDI 3:3 en DMF  | 15 h ( <i>overnight</i> ) |
| 3     | Lavado       | DMF                   | 5 x 30 s*                 |

Tabla 26. Acoplamiento de Fmoc-AB sobre *p*-MBHA.

| Etapa | Función      | Reactivos/Disolventes              | Tiempo     |
|-------|--------------|------------------------------------|------------|
| 1     | Lavado       | DMF                                | 5 x 30 s   |
| 2     | Acoplamiento | Fmoc-AA/DIPCDI/DMAP 4:4:0,4 en DMF | 3 x 30 min |
| 3     | Lavado       | DMF                                | 5 x 30 s   |

Tabla 27. Protocolo de acoplamiento del primer Fmoc-AA sobre el espaciador AB. En este caso no se puede utilizar el ensayo de Kaiser para monitorizar el acoplamiento, ya que se realiza sobre un grupo hidroxilo.

### 8.3.1.1.2 Acoplamientos sobre aminas no impedidas

El crecimiento de los péptidos sobre el soporte polimérico se realiza siguiendo el protocolo mostrado en la **Tabla 28**.

| Etapa | Función           | Reactivos/Disolventes                | Tiempo                             |
|-------|-------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| 1     | Lavado            | DMF                                  | 5 x 30 s                           |
| 2     | Desprotección     | 20% piperidina/DMF                   | 1 x 30 s +<br>1 x 20 min           |
| 3     | Lavado            | DMF                                  | 5 x 30 s                           |
| 4     | Acoplamiento      | Fmoc-AA-OH/ HOBt/DIPCDI 3:3:3 en DMF | 1,5 h                              |
| 5     | Lavado            | DMF                                  | 5 x 30 s                           |
| 6     | Ensayo de Kaiser: | 1) Positivo →<br>2) Negativo →       | Etapa 4 (1,5 eq)<br>ciclo completo |

Tabla 28. Protocolo para la elongación estándar de la cadena peptídica.

La incorporación de Fmoc-N-metilaminoácidos sobre aminopeptidilresinas no impedidas se consigue de forma satisfactoria utilizando este protocolo. En el caso de incorporaciones sobre N-metilaminoácidos o prolinas se utiliza el protocolo del apartado 8.3.1.1.3.

### 8.3.1.1.3 Acoplamientos sobre aminas impedidas

Los acoplamientos sobre N-alquilaminoácidos presentan mayor dificultad que sobre aminas primarias. En estos casos es necesario utilizar agentes activantes más reactivos, como son el HATU (**Tabla 29**), PyAOP (Tabla 30) o un anhídrido simétrico (**Tabla 31**).

\* Se verifica mediante el ensayo de Kaiser (tras lavar la resina con DCM) que la incorporación ha sido completa. En caso de no ser cuantitativo, el acoplamiento de Fmoc-AB se repite utilizando  $\frac{1}{2}$  de los reactivos iniciales durante 3 h.

| Etapa | Función                     | Reactivos/Disolventes                | Tiempo                           |
|-------|-----------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| 1     | Lavado                      | DMF                                  | 5 x 30 s                         |
| 2     | Desprotección               | 20% piperidina/DMF                   | 1 x 30 s +<br>1 x 20 min         |
| 3     | Lavado                      | DMF                                  | 5 x 30 s                         |
| 4     | Acoplamiento                | Fmoc-AA-OH/ HATU/DIEA 4:3,8:8 en DMF | 6-12 h                           |
| 5     | Lavado                      | DMF                                  | 3 x 30 s                         |
| 6     | Reacoplamiento              | Fmoc-AA-OH/ HATU/DIEA 2:1,9:4 en DMF | 6-12 h                           |
| 7     | Lavado                      | DMF                                  | 5 x 30 s                         |
| 8     | Ensayo de <i>Red Dye</i> I: | 1) Positivo →<br>2) Negativo →       | Etapa 6 (2 eq)<br>ciclo completo |

Tabla 29. Protocolo de acoplamiento sobre un aminoácido impedido utilizando HATU.

| Etapa | Función                     | Reactivos/Disolventes                                   | Tiempo                           |
|-------|-----------------------------|---|----------------------------------|
| 1     | Lavado                      | DMF   | 5 x 30 s                         |
| 2     | Desprotección               | 20% piperidina/DMF                                      | 1 x 30 s +<br>1 x 20 min         |
| 3     | Lavado                      | DMF   | 5 x 30 s                         |
| 4     | Acoplamiento                | Fmoc-AA-OH/PyAOP/DIEA 5:5:10 en mínimo de DMF + DCM     | 1 + 1 h <sup>♦</sup>             |
| 5     | Lavado                      | DMF   | 3 x 30 s                         |
| 6     | Reacoplamiento              | Fmoc-AA-OH/ PyAOP/DIEA 2,5:2,5:5 en mínimo de DMF + DCM | 1 + 1 h <sup>♦</sup>             |
| 7     | Lavado                      | DMF   | 5 x 30 s                         |
| 8     | Ensayo de <i>Red Dye</i> I: | 1) Positivo →<br>2) Negativo →                          | Etapa 6 (2 eq)<br>ciclo completo |

Tabla 30. Protocolo de acoplamiento sobre un aminoácido impedido utilizando PyAOP.

<sup>♦</sup> Tras 1 h de acoplamiento se añade ½ de la cantidad inicial de PyAOP.

## 8 Capítulo Experimental

| <b>Etapa</b> | <b>Función</b>              | <b>Reactivos/Disolventes</b>   | <b>Tiempo</b>                    |
|--------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1            | Lavado                      | DMF                            | 5 x 30 s                         |
| 2            | Desprotección               | 20% piperidina/DMF             | 1 x 30 s +<br>1 x 20 min         |
| 3            | Lavado                      | DMF                            | 5 x 30 s                         |
| 4            | Acoplamiento                | Fmoc-AA-OH/DIP 6:3 en DMF      | 1,5 h                            |
| 5            | Lavado                      | DMF                            | 3 x 30 s                         |
| 6            | Reacoplamiento              | Fmoc-AA-OH/DIP 3:1,5 en DMF    | 1,5 h                            |
| 7            | Lavado                      | DMF                            | 5 x 30 s                         |
| 8            | Ensayo de <i>Red Dye</i> I: | 1) Positivo →<br>2) Negativo → | Etapa 6 (2 eq)<br>ciclo completo |

**Tabla 31.** Protocolo de acoplamiento sobre un aminoácido impedido utilizando el método de activación del anhídrido simétrico.

### 8.3.1.1.4 Escisión del enlace péptido-AM

Una vez finalizada la elongación de la secuencia peptídica se elimina el grupo protector del extremo N-terminal (20% piperidina/DMF durante 30 s seguido de 20 min 20% piperidina/DMF), se lava la resina con DMF (5 x 30 s) y por último con DCM (5 x 30 s) y se deja secar.

El péptido se desancla de la resina mediante tratamiento acidolítico con TFA, utilizando agua como captador de carbocationes. La peptidilresina seca se trata durante 1 h con TFA:H<sub>2</sub>O 95:5 (~1 mL por cada 100 mg de peptidilresina) y se evapora bajo corriente de N<sub>2</sub>. El residuo obtenido se disuelve en agua (5 mL) y se filtra utilizando una jeringa de polipropileno de volumen adecuado, provista de un filtro de polietileno poroso. La resina insoluble se lava sucesivamente con agua (5 mL), 10% AcOH (3x5 mL) y AcOH (2x5 mL) con el fin de recuperar el péptido. Las fracciones obtenidas de cada disolvente se analizan mediante HPLC y MALDI-TOF, se liofilizan por separado y se juntan aquellas que en ambos análisis presentan un grado de pureza similar.

### 8.3.1.2 Síntesis de los inhibidores 1, 3 y 7

Los inhibidores sintetizados se muestran en la **Tabla 32**.

| <b>Péptido</b> | <b>Secuencia del péptido</b>                    |
|----------------|---|
| <b>1</b>       | Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-NMeA-NH <sub>2</sub>    |
| <b>3</b>       | Lys-Lys-Leu-Val-NMePhe-Phe-A-NH <sub>2</sub>    |
| <b>7</b>       | Lys-Lys-NMeLeu-Val-NMePhe-Phe-A-NH <sub>2</sub> |

**Tabla 32.** Péptidos 1, 3 y 7.

La síntesis se realiza sobre *p*-MBHA 0,70 mmol/g. Tras activar la resina, se introduce Gly como aminoácido de referencia (protocolo apartado 8.3.1.1.2). Sobre este soporte, se une el espaciador Fmoc-AM (apartado 8.3.1.1.1) y se procede a elongar las secuencias

deseadas en paralelo (escala de trabajo de 0,1 mmol). Los acoplamientos sobre N-metilaminoácidos se realizan con PyAOP en presencia de DIEA (apartado 8.3.1.1.3).

### Péptido 1

HPLC:  $t_R$  = tres señales a 20,21, 22,24 y 22,70 min (pureza global > 95%). Gradiente lineal de 15% a 40% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Val 0,64 (1) Leu 1,07 (1) Phe 1,97 (2) Lys 1,97 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 865 uma = [M+H]<sup>+</sup>; 888 uma = [M+Na]<sup>+</sup>; 905 uma = [M+K]<sup>+</sup>

### Péptido 3

HPLC:  $t_R$  = 16,30 min (pureza = 86%). Gradiente lineal de 15% a 40% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>4</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,04 (1) Val 0,94 (1) Leu 0,97 (1) Phe 0,89 (1) Lys 2,15 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 866 uma = [M+H]<sup>+</sup>; 888 uma = [M+Na]<sup>+</sup>

### Péptido 7

HPLC:  $t_R$  = 18,11 min (pureza = 93%). Gradiente lineal de 15% a 40% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>4</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,25 (1) Val 0,75 (1) Phe 1,01 (1) Lys 1,99 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 902 uma = [M+Na]<sup>+</sup>

#### **8.3.1.2.1 Purificación de 1**

Una alícuota de éste péptido se purificó para las pruebas de interconversión descritas en el apartado 3.4.3.2. La purificación se realiza en un sistema Waters utilizando las condiciones cromatográficas que se describen a continuación.

Se purifican ~5 mg de crudo disueltos en ACN/H<sub>2</sub>O, con un gradiente de 15% → 40% de B durante 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,1% TFA y B= ACN con 0,1% TFA), columna Vydac C<sub>18</sub> semipreparativa, flujo 2,5 mL/min, detección a 220 nm. Las fracciones colectadas se analizan por HPLC. Se elimina el disolvente orgánico a presión reducida y el agua se termina de eliminar mediante liofilización. Las fracciones de **1** enriquecidas en las distintas especies son utilizadas para las pruebas de interconversión (apartado 3.4.3).

### 8.3.1.3 Síntesis de los inhibidores 2, 10 y 12

Los inhibidores sintetizados se muestran en la **Tabla 33**.

| <b>Péptido</b> | <b>Secuencia del péptido</b>                                 |
|----------------|--|
| <b>2</b>       | Lys-Lys-Leu-Val-Phe-NMePhe-Ala-NH <sub>2</sub>               |
| <b>10</b>      | Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH <sub>2</sub>                  |
| <b>12</b>      | D-Lys-D-Lys-D-Leu-D-Val-D-Phe-D-NMePhe-D-Ala-NH <sub>2</sub> |

**Tabla 33. Péptidos 2, 10 y 12**

La síntesis se realiza sobre resina *p*-MBHA 0,70 mmol/g. La funcionalización se reduce a 0,40 mmol/g antes de la introducción del espaciador Fmoc-AM, como se detalla en el apartado 8.3.1.1.1, utilizando una escala de trabajo de 0,1 mmol. La elongación de los péptidos se lleva a cabo utilizando los protocolos estándar y los acoplamientos sobre N-metilaminoácidos se realizan utilizando PyAOP/DIEA (apartado 8.3.1.1.3).

#### Péptido 2

HPLC:  $t_R = 23,0$  min (pureza > 95%). Gradiente lineal de 15% a 40% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,20 (1) Val 0,84 (1) Leu 1,06 (1) Phe 0,82 (1) Lys 2,08 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 865 uma = [M+H]<sup>+</sup> ; 887 uma = [M+Na]<sup>+</sup>; 903 uma = [M+K]<sup>+</sup>

#### Péptido 10

HPLC:  $t_R = 20,1$  min (pureza > 95%). Gradiente lineal de 15% a 40% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,07 (1) Val 0,98 (1) Leu 1,12 (1) Phe 1,83 (2) Lys 2,08 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 852 uma = [M+H]<sup>+</sup> ; 874 uma = [M+Na]<sup>+</sup>; 890 uma = [M+K]<sup>+</sup>

#### Péptido 12

HPLC:  $t_R = 22,5$  min (pureza > 95%). Gradiente lineal de 15% a 40% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,08 (1) Val 0,89 (1) Leu 1,11 (1) Phe 0,59 (1) Lys 1,92 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 866 uma =  $[M+H]^+$  ; 888 uma =  $[M+Na]^+$ ; 905 uma =  $[M+K]^+$

### 8.3.1.4 Síntesis de los inhibidores 4, 5 y 22

Los inhibidores sintetizados se muestran en la **Tabla 34**.

| Péptido   | Secuencia del péptido                          |
|-----------|--|
| <b>4</b>  | Lys-Lys-Leu-NMeVal-Phe-Phe-Ala-NH <sub>2</sub> |
| <b>5</b>  | Lys-Lys-NMeLeu-Val-Phe-Phe-Ala-NH <sub>2</sub> |
| <b>22</b> | Lys-Lys-Leu-Val-Pro-Phe-Ala-NH <sub>2</sub>    |

**Tabla 34.** Péptidos **4**, **5** y **22**

La síntesis se realiza a partir de 0,5 g de MBHA 0,70 mmol/g. La resina se acondiciona según el protocolo descrito en el apartado 8.3.1.1.1 y se incorporan sobre ella los dos primeros aminoácidos (comunes para las tres secuencias) utilizando el protocolo descrito previamente (apartado 8.3.1.1.2). La peptidilresina obtenida (Fmoc-Phe-Ala-AM-MBHA) se escinde en dos partes.

La primera fracción de peptidilresina (270 mg) se utiliza para sintetizar **22**. La peptidilresina restante (475 mg) se acila con Fmoc-Phe y se divide en dos fracciones iguales que se utilizan para sintetizar, en paralelo, **4** y **5**. Los acoplamiento sobre N-metilaminoácidos se realizan en este caso utilizando HATU (apartado 8.3.1.1.3).

#### Péptido 4

HPLC:  $t_R = 18,46$  min (pureza = 89%). Gradiente lineal de 5% a 60% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,16 (1) Leu 1,14 (1) Phe 1,73 (2) Lys 1,97 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 888 uma =  $[M+Na]^+$ ; 904 uma =  $[M+K]^+$

#### Péptido 5

HPLC:  $t_R = 12,95$  min (pureza = 92%). Gradiente lineal de 15% a 65% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 0,98 (1) Val 1,03 (1) Phe 1,94 (2) Lys 2,03 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 866 uma =  $[M+H]^+$ ; 888 uma =  $[M+Na]^+$ ; 904 uma =  $[M+K]^+$

## 8 Capítulo Experimental

---

### Péptido 22

HPLC:  $t_R = 9,44$  min (pureza = 70%). Gradiente lineal de 15% a 60% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Pro 1,02 (1) Ala 0,98 (1) Val 1,16 (1) Leu 1,18 (1) Phe 0,89 (1) Lys 1,79 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 801 uma = [M]<sup>+</sup>; 915 uma = [M+Leu]<sup>+</sup>

### 8.3.1.5 Síntesis de los inhibidores 6, 8 y 9

Los inhibidores sintetizados se muestran en la *Tabla 35*.

| <b>Péptido</b> | <b>Secuencia del péptido</b>                         |
|----------------|--|
| <b>6</b>       | Lys-Lys-Leu-NMeVal-Phe-NMePhe-Ala-NH <sub>2</sub>    |
| <b>8</b>       | Lys-Lys-Leu-Val-NMePhe-Phe-NMeAla-NH <sub>2</sub>    |
| <b>9</b>       | Lys-Lys-NMeLeu-Val-NMePhe-Phe-NMeAla-NH <sub>2</sub> |

*Tabla 35.* Péptidos **6, 8 y 9**

La síntesis se realiza sobre resina *p*-MBHA 0,70 mmol/g. La funcionalización se reduce a 0,11 mmol/g antes de la introducción del espaciador Fmoc-AM, como se detalla en el apartado 8.3.1.1.1. Los acoplamientos sobre N-metilaminoácidos se realizan utilizando PyAOP/DIEA (apartado 8.3.1.1.3), siguiendo las reacciones tanto por AAA como por HPLC.

### Péptido 6

HPLC:  $t_R = 24,0$  min (pureza = 90%). Gradiente lineal de 15% a 40% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,11 (1) Leu 0,91 (1) Phe 0,74 (1) Lys 2,23 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 879 uma = [M+H]<sup>+</sup>; 901 uma = [M+Na]<sup>+</sup>; 917 uma = [M+K]<sup>+</sup>

### Péptido 8

HPLC:  $t_R =$  dos señales a 22,9 y 24,8 min (pureza global > 85%). Gradiente lineal de 15% a 40% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Val 0,92 (1) Leu 0,87 (1) Phe 1,03 (1) Lys 2,18 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 916 uma = [M+Na]<sup>+</sup>; 933 uma = [M+K]<sup>+</sup>; 788 uma = [M+Na-Lys]<sup>+</sup>

### Péptido 9

HPLC:  $t_r$  = dos señales a 24,2 y 26,3 min (pureza global < 70%). Gradiente lineal de 15% a 40% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Val 0,90 (1) Phe 1,06 (1) Lys 2,05 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 917 uma = [M+Na]<sup>+</sup>; 933 uma = [M+K]<sup>+</sup>; 837 uma = [M+Na-Val]<sup>+</sup>; 933 uma = [M+Na-Lys]<sup>+</sup>

#### **8.3.1.5.1 Purificación de 9**

El crudo obtenido de la síntesis de **9** presenta como impureza mayoritaria el producto proveniente de la deleción de una lisina (en las condiciones cromatográficas en las que se caracteriza el producto, la impureza aparece en forma de dos señales a 27,1 y 30,0 min). La purificación se realiza en un sistema Waters Delta Prep utilizando las condiciones cromatográficas que se describen a continuación.

Se purifican 70 mg de crudo disueltos en ACN/H<sub>2</sub>O, con un gradiente de 10% a 40% de B durante 60 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,10% TFA y B= ACN con 0,10% TFA), columna Azko C<sub>18</sub> preparativa, flujo 25 mL/min, detección a 220 nm. Las fracciones colectadas se analizan tanto por HPLC como por MALDI-TOF, juntando aquellas que contienen sólo el producto deseado. Se elimina el disolvente orgánico a presión reducida y se obtienen 11 mg de **9** (determinado mediante AAA) tras la liofilización de la disolución acuosa resultante.

HPLC:  $t_r$  = dos señales a 24,2 y 26,3 min (pureza global >95%). Gradiente lineal de 15% a 40% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Val 0,85 (1) Phe 0,86 (1) Lys 2,29 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 894 uma = [M+H]<sup>+</sup>; 916 uma = [M+Na]<sup>+</sup>; 932 uma = [M+K]<sup>+</sup>

#### **8.3.1.6 Síntesis de 11**

La síntesis de **11** (LPFFD-OH) se realiza sobre resina *p*-MBHA 0,70 mmol/g. Tras la activación (Tabla 17), se introduce el espaciador AB, el primer aminoácido (apartado 8.3.1.1.1.2) y se procede a elongar la secuencia (escala de trabajo de 0,1 mmol). La escisión se realiza utilizando el protocolo habitual (apartado 8.3.1.1.4), pero prolongando el tiempo de reacción a 3 h.

HPLC:  $t_r$  = 24,76 min (pureza 94%). Gradiente lineal de 15% a 40% de B en 30 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Nucleosil C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

## 8 Capítulo Experimental

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Asp 1,13 (1) Leu 1,01 (1) Pro 1,13 (1) Phe 1,85 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 839 uma =  $[M+H]^+$ ; 860 uma =  $[M+Na]^+$ ; 877 uma =  $[M+K]^+$ .

### 8.3.1.7 Síntesis de los inhibidores 13 al 21

Los inhibidores sintetizados se muestran en la Tabla 36.

| Péptido | Secuencia del péptido   |
|---------|---|
| 13      | D-Lys-D-Lys-D-NMeLeu-D-Val-D-Phe-D-Phe-D-Ala-NH <sub>2</sub>    |
| 14      | D-Lys-D-Lys-D-Leu-D-Val-D-NMePhe-D-Phe-D-Ala-NH <sub>2</sub>    |
| 15      | D-Lys-D-Lys-D-NMeLeu-D-Val-D-NMePhe-D-Phe-D-Ala-NH <sub>2</sub> |
| 16      | Ala-NMePhe-Phe-Val-Leu-Lys-Lys-NH <sub>2</sub>                  |
| 17      | D-Ala-D-NMePhe-D-Phe-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH <sub>2</sub>    |
| 18      | D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-NMeLeu-D-Lys-D-Lys-NH <sub>2</sub>    |
| 19      | D-Ala-D-Phe-D-NMePhe-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH <sub>2</sub>    |
| 20      | D-Ala-D-Phe-D-NMePhe-D-Val-D-NMeLeu-D-Lys-D-Lys-NH <sub>2</sub> |
| 21      | D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH <sub>2</sub>       |

Tabla 36. Péptidos 13 al 21.

La síntesis se realiza sobre resina *p*-MBHA 0,70 mmol/g. La funcionalización se reduce a 0,34 mmol/g antes de la introducción del espaciador Fmoc-AM, como se detalla en el apartado 8.3.1.1.1. La síntesis se realiza en paralelo, utilizando una escala de trabajo de 0,1 mmol para cada inhibidor. La elongación de los péptidos se lleva a cabo utilizando los protocolos estándar, pero en este caso los acoplamientos sobre N-metilaminoácidos se realizan utilizando el método del anhídrido simétrico (apartado 8.3.1.1.3).

#### Péptido 13

HPLC:  $t_R = 11,27$  min (pureza = 94%). Gradiente lineal de 5% a 35% de B en 15 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Symmetry™ C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,13 (1) Val 0,73 (1) Phe 1,77 (2) Lys 2,00 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 866 uma =  $[M+H]^+$  ; 888 uma =  $[M+Na]^+$ ; 904 uma =  $[M+K]^+$

#### Péptido 14

HPLC:  $t_R = 10,03$  min (pureza = 91%). Gradiente lineal de 0% a 50% de B en 15 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Symmetry™ C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,26 (1) Val 1,06 (1) Leu 1,04 (1) Phe 1,06 (1) Lys 1,85 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 865 uma =  $[M+H]^+$  ; 887 uma =  $[M+Na]^+$

### Péptido 15

HPLC:  $t_R$  = 12,80 min (pureza = 81%). Gradiente lineal de 5% a 35% de B en 15 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Symmetry™ C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,19 (1) Leu 1,04 (1) Phe 0,61 (1) Lys 1,68 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 880 uma =  $[M+H]^+$ ; 902 uma =  $[M+Na]^+$ ; 918 uma =  $[M+K]^+$

### Péptido 16

HPLC:  $t_R$  = 11,11 min (pureza = 80%). Gradiente lineal de 5% a 35% de B en 15 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Symmetry™ C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 0,83 (1) Val 0,92 (1) Leu 1,03 (1) Phe 0,89 (1) Lys 2,33 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 866 uma =  $[M+H]^+$ ; 888 uma =  $[M+Na]^+$ ; 905 uma =  $[M+K]^+$ ; 796 uma =  $[M-Ala]^+$

### Péptido 17

HPLC:  $t_R$  = 11,02 min (pureza = 93%). Gradiente lineal de 5% a 35% de B en 15 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Symmetry™ C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,01 (1) Val 0,84 (1) Leu 1,00 (1) Phe 0,89 (1) Lys 2,27 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 865 uma =  $[M+H]^+$ ; 887 uma =  $[M+Na]^+$

### Péptido 18

HPLC:  $t_R$  = 10,73 min (pureza = 93%). Gradiente lineal de 5% a 35% de B en 15 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Symmetry™ C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,09 (1) Val 0,95 (1) Phe 1,94 (2) Lys 2,01 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 866 uma =  $[M+H]^+$ ; 888 uma =  $[M+Na]^+$

## 8 Capítulo Experimental

---

### Péptido 19

HPLC:  $t_R = 12,04$  min (pureza = 92%). Gradiente lineal de 5% a 35% de B en 15 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Symmetry™ C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,01 (1) Val 0,73 (1) Leu 0,85 (1) Phe 0,96 (1) Lys 2,18 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 866 uma = [M+H]<sup>+</sup>; 888 uma = [M+Na]<sup>+</sup>

### Péptido 20

HPLC:  $t_R = 11,02$  min (pureza = 93%). Gradiente lineal de 5% a 35% de B en 15 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Symmetry™ C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 0,99 (1) Leu 1,00 (1) Phe 0,88 (1) Lys 2,12 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 880 uma = [M+H]<sup>+</sup>; 902 uma = [M+Na]<sup>+</sup>

### Péptido 21

HPLC:  $t_R = 10,13$  min (pureza = 91%). Gradiente lineal de 5% a 35% de B en 15 min (A= H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA y B= ACN con 0,036% TFA). Columna Symmetry™ C<sub>18</sub>, flujo 1 mL/min, detección a 220 nm.

Análisis de aminoácidos (valor teórico entre paréntesis): Ala 1,07 (1) Val 0,71 (1) Leu 0,91 (1) Phe 1,90 (2) Lys 2,11 (2).

MALDI-TOF (matriz DHB): 852 uma = [M+H]<sup>+</sup>; 874 uma = [M+Na]<sup>+</sup>

## 8.4 Evaluación de los N-metilinhidores

### 8.4.1 Protocolos utilizados en el IIBB

#### 8.4.1.1 Condiciones de cultivo de la línea celular PC12

Las células PC12 se cultivan adheridas a 37 °C en una atmósfera con un 95% de humedad y con un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo utilizado es DMEM+, que es Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, ver Anexo III) suplementado con: 1 mM glutamina, un 1% de penicilina/estreptomicina, un 10% de suero bovino fetal<sup>♦</sup> y un 5% de suero de caballo<sup>♦</sup>.

---

<sup>♦</sup> El suero se inactiva, previamente a su utilización, en un baño de agua durante 30 min a 60°C.

La siembra de  $2 \cdot 10^6$  -  $4 \cdot 10^6$  células en una cápsula de Petri de 10 cm de diámetro alcanza un 50-60% de confluencia a los 5-7 días, momento en el que se debe realizar el *subcultivo*. La mitad del medio se elimina por decantación ( $\sim 5$  mL) y se utiliza el medio restante para levantar las células adheridas por aspiración/expulsión repetida del sobrenadante. Se divide la suspensión de células en dos placas de Petri y se añade medio DMEM+ hasta completar 10 mL.

El cambio de medio de las células PC12 se realiza 3 veces a la semana, decantando 7-8 mL de medio y añadiendo el mismo volumen de medio DMEM+ a 37 °C.

### 8.4.1.2 Congelación/descongelación de células PC12

Las células PC12 se mantienen congeladas con  $N_2(\ell)$  en DMEM+ con un 10% de DMSO. Para ello se elimina el medio de cultivo habitual (centrifugación 5 min a 1000 rpm) y se añade medio de cultivo con un 10% de DMSO (concentración final de  $4\text{-}6 \cdot 10^6$  células/mL). Inmediatamente se introducen las alícuotas en el congelador a  $-80$  °C, en el interior de un contenedor apropiado para dicho fin. Tras 24 h se procede a traspasar las alícuotas a un contenedor de  $N_2(\ell)$ .

El medio criogénico, con un elevado contenido en DMSO, se elimina en el menor tiempo posible, por decantación tras atemperar la alícuota a 37 °C y centrifugar cinco minutos a 1000 rpm (el DMSO a altas concentraciones resulta tóxico para las células). Sobre las células se añade medio DMEM+ a 37 °C y se rompen los posibles grumos mediante aspiración/expulsión repetida del medio de cultivo. Las células así preparadas se siembran de forma habitual, siendo normal el hecho de observar una proliferación menor a la habitual durante los días posteriores a la descongelación.

### 8.4.1.3 Dilución de muestras en medio DMEM+

La proteína A $\beta$ , las mezclas de ésta o los diferentes inhibidores se diluyen en agua milliQ con el fin de obtener una concentración 10 veces superior a la que se desea aplicar a las células (disolución 10x). Esta dilución se realiza en condiciones no estériles,  $\sim 1$  h antes de su utilización. La dilución final de las muestras 10x se realiza en condiciones estériles, añadiendo medio DMEM+ en una proporción 1:9. El medio con péptido es aplicado a las células (100  $\mu$ L en cada pocillo) inmediatamente después de ser preparado.

### 8.4.1.4 Ensayo de reducción de MTT en presencia de A $\beta$

La cuantificación del efecto de la proteína A $\beta$  y/o de los péptidos sintetizados en la proliferación celular se realiza utilizando el siguiente protocolo.

Se siembran células PC12 en placas de 96 pocillos en medio DMEM+ a una densidad de 32.000 células/pocillo (100  $\mu$ L,  $3,2 \cdot 10^5$  cél./ mL) y se dejan proliferar durante 24 h a 37 °C. Se añade el péptido (100  $\mu$ L/pocillo), diluido como se describe en el apartado 8.4.1.3, sobre las células cuyo medio ha sido decantado con anterioridad. Cada muestra se aplica a 9 pocillos.

## 8 Capítulo Experimental

---

La incubación se prolonga 22 h más a 37 °C, tras las cuales se añaden 25 µL/pocillo de una disolución estéril de MTT 5 mg/mL (apartado 8.4.1.5) y se mantienen nuevamente a 37 °C durante 2 h. Las células se rompen añadiendo 100 µL a cada pocillo de tampón de lisis (apartado 8.1.5.2) y manteniéndolas a 37 °C una noche.

Cada placa de 96 pocillos, además de incluir diferentes preparaciones de Aβ o péptido, contiene siempre un control de supervivencia al que se le asigna un valor del 100% (9 pocillos con células a las que únicamente se les ha aplicado medio DMEM+ en lugar de medio con péptido), un control de toxicidad de Aβ (9 pocillos a los que se les ha aplicado medio con Aβ 1 µM) y un blanco (9 pocillos con 100 µL de tampón de lisis).

La lectura de la placa de 96 pocillos se realiza a 550 nm en un lector Labsystems *IEMS Reader MF*.

### 8.4.1.5 Disolución MTT 5 mg/mL

Se disuelven 50 mg de MTT en 10 mL de tampón PBS-sigma pH 7,4 a 37 °C. En condiciones estériles, la disolución se esteriliza a través de un filtro de 0,22 µm. La solución resultante se guarda protegida de la luz, a 4 °C un máximo de 30 días.

### 8.4.1.6 Tampón de lisis

Se disuelven 20 g de SDS en una mezcla DMF:H<sub>2</sub>O 1:1. Se añade un 2,5% de AcOH 80% y se ajusta el pH 4,7 utilizando una disolución 1M de NaOH. La solución resultante se guarda de forma indefinida a temperatura ambiente.

## 8.4.2 Protocolos utilizados en el SCT

### 8.4.2.1 Condiciones de cultivo de la línea celular PC12 en medio Dulbecco's modified Eagle's Medium suplementado (DMEM+)

Las células PC12 se cultivan en suspensión a 37 °C en una atmósfera con un 95% de humedad y con el 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo DMEM+ utilizado consistente en medio DMEM (ver Anexo III) suplementado con: 2 mM glutamina, un 1% penicilina/estreptomicina, un 15% de suero de caballo<sup>♦</sup> y un 10% de suero bovino fetal<sup>♦</sup>.

La siembra de 2·10<sup>6</sup> - 4·10<sup>6</sup> células en un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> alcanza un 50-60% de confluencia a los 5-7 días, momento en el que se debe realizar el *subcultivo*. Se levantan las células adheridas por aspiración/expulsión repetida del sobrenadante, se centrifugan y se eliminan por decantación dos tercios del medio. El volumen total se lleva a ~ 20 mL con DMEM+ y se rompen los grumos de células haciendo pasar la suspensión por una aguja de 0,8 mm de diámetro 4-5 veces. Una parte de las células se utiliza en los ensayos de reducción de MTT en presencia de Aβ, y el resto se siembran nuevamente, eliminando, en caso necesario, el exceso de células.

---

<sup>♦</sup> El suero se inactiva, previamente a su utilización, en un baño de agua durante 30 min a 60°C.

El cambio de medio de las células PC12 se realiza 3 veces a la semana. Se levantan las células adheridas por aspiración/expulsión repetida del sobrenadante, se centrifugan y se eliminan dos tercios del medio por decantación. Se completa el volumen total de medio (12 mL) con DMEM+ a 37 °C.

### 8.4.2.2 Condiciones de cultivo de la línea celular PC12 en medio RPMI 1640 suplementado (RPMI+)

Las células PC12 se cultivan en suspensión a 37 °C en una atmósfera con un 95% de humedad y con el 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo RPMI+ consistente en medio RPMI 1640 (ver Anexo III) suplementado con: 2 mM glutamina, un 1% de penicilina/estreptomicina, un 10% de suero de caballo y un 5% de suero bovino fetal<sup>212</sup>.

Tanto la siembra como el cambio de medio se realizaron igual que en el apartado 8.4.2.1, pero utilizando medio RPMI+ en lugar de DMEM+.

### 8.4.2.3 Descongelación de células PC12

Las células PC12 se mantienen congeladas con N<sub>2</sub>(ℓ) en DMEM+/RPMI+ con un 10% de DMSO. El líquido criogénico, con alto contenido en DMSO, se elimina, tras descongelar la alícuota y diluirla 1:10 en medio fresco, mediante centrifugación (cuatro minutos a 1000 rpm) y posterior decantación del sobrenadante. Se añade medio suplementado a 37 °C y se rompen los posibles grumos mediante aspiración/expulsión repetida del medio de cultivo. La siembra de las células descongeladas se realiza de la forma habitual, procediendo a cambiar nuevamente el medio transcurridas 24 h desde la descongelación.

### 8.4.2.4 Optimización del ensayo de reducción de MTT en el SCT

Este experimento tiene como fin optimizar, en la cepa de la línea celular PC12 utilizada en el SCT, dos factores: el medio utilizado en el cultivo de las células y el hecho de aspirar o no el sobrenadante 24 h después de realizar el sembrado. Las cuatro posibles combinaciones de ambos factores se ensayaron de forma paralela para minimizar los posibles errores aleatorios en el resultado final.

Tanto en el caso de las células en RPMI+ como el de las células en DMEM+ se sembraron las células PC12 en una placa de 96 pocillos a 5.000, 15.000, 30.000, 45.000 y 60.000 células/pocillo (se sembraron 8 pocillos para cada concentración, 100 µL en cada uno). Transcurridas 24 h a 37 °C se aspiró el medio a cuatro pocillos de cada concentración y se añadieron 100 µL del medio nuevo correspondiente.

Las células se incuban 22 h más a 37 °C, se añaden 25 µL/pocillo de una disolución estéril de MTT 5 mg/mL (apartado 8.4.1.5) y se mantienen nuevamente a 37 °C durante 2 h. La lisis de las células se realiza añadiendo a cada pocillo 100 µL de tampón de lisis (apartado 8.1.5.2) y manteniéndolas a 37 °C una noche. La medida de la absorbancia se realiza a 570 nm en un lector de placas de 96 pocillos *Elisa Multiskan RC*.

---

<sup>212</sup> Greene, L.; Aletta, J. M.; Rukenstein, A.; Green, S. H. *Methods Enzymol.* **1987**, *147B*, 207-216.

### 8.4.2.5 Dilución de muestras en medio RPMI+

Las muestras envejecidas según el protocolo del apartado 8.2.1.2 se diluyen directamente en medio RPMI+ a 37 °C, según la concentración final deseada. Normalmente, y para obtener una disolución 1  $\mu\text{M}$  de A $\beta$  y/o 5  $\mu\text{M}$  de inhibidor en RPMI+, se diluyen 17,5  $\mu\text{L}$  de disolución envejecida con 683  $\mu\text{L}$  de RPMI+ a 37 °C. En estos casos, el control de supervivencia se obtiene diluyendo tampón fosfato<sup>♦</sup> en medio de cultivo en la misma proporción.

### 8.4.2.6 Experimento de disgregación de fibras preformadas: dilución de muestras en medio RPMI+

A una alícuota de A $\beta$  envejecida de la forma habitual (apartado 8.2.1.2) se le añaden 5 equivalentes de una disolución acuosa 1-4 mM de inhibidor (cuantificado mediante análisis de aminoácidos). Se incuban unos minutos a temperatura ambiente y se diluye en medio RPMI+ a 37 °C para obtener una concentración final igual a 1  $\mu\text{M}$  de A $\beta$ .

### 8.4.2.7 Ensayo de reducción de MTT en presencia de A $\beta$

Para determinar el efecto de la presencia de proteína A $\beta$  y/o los péptidos sintetizados en la proliferación celular, se siembran células en placas de 96 pocillos en medio RPMI+ a una densidad de 28.000 células/pocillo (100  $\mu\text{L}$ ,  $2,8 \cdot 10^5$  cél./ mL) y se dejan proliferar durante 24 h a 37 °C. Se añade el péptido diluido en medio RPMI+ (100  $\mu\text{L}$ /pocillo) sobre las células cuyo medio ha sido decantado con anterioridad. Cada muestra se aplica a 6 pocillos.

La incubación se prolonga 22 h más a 37 °C, tras las cuales se añaden 25  $\mu\text{L}$ /pocillo de una disolución estéril de MTT 5 mg/mL (apartado 8.4.1.5) y se mantienen nuevamente a 37 °C durante 2 h. Las células se rompen añadiendo a cada pocillo 100  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis (apartado 8.4.1.6) y manteniéndolas a 37 °C una noche.

Cada placa de 96 pocillos, además de incluir diferentes preparaciones de A $\beta$  o péptido, contiene siempre un control de supervivencia, que establece el 100% de respuesta (6 pocillos con células a las que únicamente se les ha aplicado medio RPMI+, diluido en la misma proporción que los pocillos con péptido utilizando tampón fosfato (apartado 8.2.1.2)), un control de toxicidad de A $\beta$  (9 pocillos a los que se les ha aplicado medio con A $\beta$  1  $\mu\text{M}$ ) y un blanco (6 pocillos con 100  $\mu\text{L}$  de medio más 100  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis).

La lectura de la placa de 96 pocillos se realiza a 570 nm, utilizando un lector de placas modelo *Elisa Multiskan RC*.

### 8.4.2.8 Tinción de los núcleos de células PC12

La tinción de los núcleos de células PC12 vivas se realiza añadiendo 2  $\mu\text{L}$  de una disolución 1 mg/mL de Hoechst 33342 en agua sobre 1 mL de células en RPMI+. La

---

<sup>♦</sup> El tampón fosfato se prepara utilizando las proporciones de tampón fosfato 0,2 M, agua y NaOH 10 mM que se utilizan en la preparación de las muestras de A $\beta$  (apartado 8.2.1.2.3).

mezcla se incubaba durante 2 min a  $T_{amb}$ , se coloca en un portaobjetos, se cubre y se observa bajo el microscopio. Por un lado se registran las imágenes en el visible y, sin desplazar la muestra se observa la fluorescencia a  $\sim 460$  nm irradiando a  $\sim 350$  nm (láser de argón).

### 8.4.3 Tratamiento estadístico de datos biológicos

Los resultados experimentales de los ensayos biológicos fueron procesados utilizando el programa GraphPad Prism versión 3.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California (USA), [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

La comparación de los valores medios de una serie de datos respecto al valor medio de la proteína A $\beta$  se realizó siempre utilizando los valores de toxicidad de A $\beta$  de los experimentos en que se llevaron a cabo dichas series de datos, lo que lleva en algunos casos a pequeñas variaciones en el valor promedio de A $\beta$  entre diferentes gráficos (la mayor diferencia se encuentra al comparar los experimentos realizados en laboratorios distintos).

Para comparar los resultados se utilizaron los valores promedio, la desviación estándar y el número de muestras y se realizó un test ANOVA de un factor\* acompañado de un post-test de Tukey\*\* para establecer los valores que difieren de forma significativa del control. En el caso de los ensayos de toxicidad (apartados 4.1.3.1.2 y 4.1.3.2.2) se compararon los valores obtenidos por los inhibidores solos con el 100% de supervivencia, mientras que en los ensayos de inhibición de la toxicidad (apartados 4.1.3.1.1 y 4.1.3.2.1) se compararon los resultados obtenidos para las mezclas A $\beta$  + inhibidor con los resultados obtenidos para A $\beta$  solo.

En los gráficos se han utilizado asteriscos para indicar los valores que difieren significativamente del valor con el que se les compara en cada caso y que dependen del tipo de ensayo, como se ha definido en el párrafo anterior. A no ser que se especifique lo contrario, \* indica una probabilidad > 95%, \*\* indica una probabilidad > 99% y \*\*\* indica una probabilidad > 99,9% tras realizar un análisis ANOVA de un factor seguido de un post-test Tukey para toda la serie de valores.

En algunos casos, y de forma aislada, también se ha aplicado el test *t* de Student de una cola, el cual da intervalos de confianza más estrechos y por tanto permite dar como significativos valores cuyo análisis mediante un post-test Tukey había indicado que no difieren de forma significativa.

- 
- \* Se hace la hipótesis de que, además de las diferencias entre los valores debidas al error aleatorio, también existe otra posible diferencia: el efecto del inhibidor sobre A $\beta$ .
  - \*\* En realidad no se aplica el test de Tukey, sino que se utiliza el test Tukey-Kramer, que incluye una modificación para poder comparar muestras de diferente tamaño.

### 8.5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

#### 8.5.1 Caracterización estructural de los N-metilinhibidores

##### 8.5.1.1 Experimentos de dicroísmo circular

###### 8.5.1.1.1 Preparación de muestras

La preparación de disoluciones de inhibidor para el análisis mediante CD se realiza a partir de disoluciones madre 1-4 mM en péptido (según análisis de aminoácidos). Estas disoluciones son diluidas utilizando un 10% de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4 respecto al volumen final y la cantidad de H<sub>2</sub>O milliQ necesaria para obtener una concentración final de 200 μM.

Las muestras denominadas “envejecidas”, se preparan de igual forma y posteriormente se mantienen 48 h a 37°C.

En aquellos casos en los que se especifica una concentración final diferente, ésta es preparada por dilución de la solución 200 μM con tampón fosfato 20 mM pH 7,4 (tampón fosfato 0,2 M diluido 1:10 con H<sub>2</sub>O milliQ).

###### 8.5.1.1.2 Medidas de CD

Las medidas de dicroísmo se llevan a cabo a una temperatura de 20°C (menos en aquellos casos en los que se especifica lo contrario).

En general se utilizan cubetas de cuarzo de 0,1 cm de paso de luz (excepcionalmente, para concentraciones iguales o inferiores a 10 μM se utilizan cubetas de 1 cm). Las medidas se llevan a cabo utilizando de forma paralela una cubeta de referencia con tampón fosfato.

Las medidas se realizan utilizando 4 acumulaciones y los siguientes parámetros: Ancho de banda= 2 nm, Resolución= 0,2 nm, Sensibilidad= 50 mdeg, Velocidad de barrido= 20 nm/min, *Step Resolution*= 0,2 nm

###### 8.5.1.1.3 Procesado de espectros

El Jasco J-720 es controlado por el software J-700 for Windows Standard Measurements versión 1.33.00 y los espectros obtenidos son tratados (suavizados, sustracción de línea base, etc.) utilizando el programa J-700 for Windows Standard Análisis versión 1.35.01.

## 8.5.1.2 Experimentos de IR-FT

### 8.5.1.2.1 Eliminación del contraión TFA

El intercambio del contraión trifluoroacetato por cloruro se realiza liofilizando diversas veces el péptido con HCl diluido. Se disuelven 1-2 mg de péptido en 1 mL de HCl 0,1 M y se liofiliza. Este proceso se repite dos veces y el sólido obtenido se utiliza para la preparación de muestras para IR-FT.

### 8.5.1.2.2 Preparación de un film de péptido

El péptido en forma de clorhidrato (1-2 mg) se disuelve en D<sub>2</sub>O (~200-500 µL) y se deposita una gota sobre un soporte de BaF<sub>2</sub>. El disolvente se evapora bajo una corriente de N<sub>2</sub> suave y se añade otra gota de disolución, hasta evaporar todo el disolvente. De esta forma se consigue depositar el péptido sobre el soporte en forma de film.

### 8.5.1.2.3 Deconvolución de señales de IR

El procesado de los datos de IR se realizó utilizando el programa PickFit versión 4 para Win32 (AISN Software Inc.).

La asignación de señales se llevó a cabo utilizando los datos de absorbancia correspondientes a la zona entre 1600 y 1700 cm<sup>-1</sup>. En primer lugar se suavizó el espectro mediante una función de filtrado de ruido tipo Savitzky-Golay. El análisis de la segunda y cuarta derivada de la curva muestra los valores máximos de las componentes individuales de la curva.

Tras aplicar una corrección de línea base lineal, tipo D2, se fijan los valores de cada componente según los valores máximos obtenidos mediante el análisis de la segunda derivada (utilizando los valores obtenidos con la cuarta derivada para corroborar y/o ampliar éstos en caso necesario). El tipo de curva utilizado para las componentes es de tipo gaussiano. Los restantes parámetros se calculan automáticamente mediante sucesivas iteraciones del programa utilizando el método del mínimo cuadrado. Una vez alcanzada una solución adecuada (el sistema converge al obtener un resultado gráfico correcto, con valores de  $r^2 \geq 0,99$ ) se elimina la restricción impuesta sobre los valores centrales de las componentes y se itera nuevamente hasta converger, siendo éste el resultado final (un buen resultado ha de dar valores de las componentes iguales a los estimados previamente  $\pm 2$  cm<sup>-1</sup>)<sup>213</sup>.

## 8.5.1.3 Análisis mediante TEM

Las muestras para TEM se prepararan sobre rejillas de cobre de 400 *mesh* recubiertas con formvar y carbono. La deposición se realiza aplicando 5-10 µL de muestra sobre la rejilla durante 2 min. Se elimina el exceso de disolvente utilizando papel Wathman 5, se tiñe durante 30 s con 15 µL de una disolución al 2% en UO<sub>2</sub>·(AcO)<sub>2</sub> recién filtrada y se vuelve a

<sup>213</sup> Seshadri, S.; Khurana, R.; Fink, A. L. *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 559-576.

eliminar el exceso de líquido utilizando papel Wathman 5. Una vez finalizado el proceso las rejillas se dejan secar un mínimo de 2 h en un desecador con silicagel.

Las medidas se llevaron a cabo en un aparato Hitachi 600 a 75 kV. Las imágenes se registran a magnificaciones entre 1.000 y 230.000 aumentos.

### 8.5.1.4 Cálculos computacionales

Los cálculos teóricos se realizaron utilizando el programa InsightII Discover 3.0 v2000 en un terminal *Silicon Graphics* modelo *Octane2* (R12000, 256 MB RAM, 1,2 GB) bajo el sistema operativo IRIX 6.5.

Los péptidos son construidos con conformación extendida mediante la aplicación Biopolymers. Los cálculos, tanto la minimización como la dinámica molecular, se llevan a cabo en el interior de una celda de agua de  $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}^3$  a pH 7,4, definiendo el conjunto con condiciones de contorno periódicas (periodic boundary conditions, PBC) y utilizando el campo de fuerzas Amber implementado en Discover 3.0 v2000. Para la minimización se utiliza el algoritmo *Steepest Discount* para los primeros 1500 ciclos y luego el algoritmo de gradiente conjugado hasta alcanzar la convergencia a  $0,001 \text{ Kcal}/(\text{mol} \cdot \text{Å})$ . La dinámica molecular se lleva a cabo a 310 K y con un paso de integración de 1 ps. Tras un período de equilibración de 50 ps se realiza la dinámica molecular durante un intervalo de tiempo de 1 ns.

### 8.5.2 Ensayos de proteólisis

Las muestras se preparan en viales Eppendorf® individuales para evitar contaminaciones durante la manipulación, por lo que son necesarias tantas alícuotas del mismo péptido como tiempos diferentes se van a medir. Se añaden  $40 \mu\text{L}$  de disolución de péptido en agua (8-12 mM) sobre  $200 \mu\text{L}$  de medio de cultivo. La mezcla se deja evolucionar el tiempo deseado (entre 0 y 31 h) a  $37^\circ\text{C}$ . Transcurrido dicho tiempo se procede a precipitar las proteínas y sales presentes en la mezcla añadiendo  $200 \mu\text{L}$  de acetonitrilo, con lo que se observa la aparición de turbidez. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm durante 5 min. A  $370 \mu\text{L}$  de este sobrenadante se les añaden  $200 \mu\text{L}$  de ACN y se vuelve a separar del precipitado formado mediante centrifugación (5 min a 10.000 rpm). El sobrenadante obtenido se analiza por HPLC (volumen de inyección =  $100 \mu\text{L}$ ), utilizando un detector de fotodiodos para facilitar la asignación de señales provinientes de la degradación del péptido\*.

---

\* La cuantificación mediante HPLC se realiza a 210 nm debido a que en esta longitud de onda se tiene una respuesta de péptido máxima y un ruido debido a la matriz de suero mínimo. El perfil UV en la zona 190-300 nm permite diferenciar fácilmente las señales debidas a péptido de las provinientes del medio de cultivo.

## 8.6 Agentes de tinción específicos de estructura amiloide

### 8.6.1 Microscopía óptica en presencia de CR

#### 8.6.1.1 Método clásico

Sobre un portaobjetos de cristal se deja secar al aire una gota de disolución de proteína A $\beta$ . El residuo se lava con etanol absoluto y se tiñe durante varios minutos con una disolución de CR al 5% (5 g en 100 mL de una disolución hidroalcohólica con un 80% de etanol y saturada en cloruro sódico). El exceso de colorante se elimina con una disolución hidroalcohólica con un 90% de etanol.

#### 8.6.1.2 Método en suspensión

Se mezclan 25-50  $\mu$ L de disolución de la proteína amiloide ( $\leq 10 \mu$ M) con un volumen igual de disolución de CR (aproximadamente tres veces más concentrada que la disolución de proteína amiloide, preparado según el método del apartado 8.6.2.2.2) se deja reposar unos minutos y se deposita sobre un portaobjetos de cristal. Las medidas se realizan sin evaporar el disolvente.

### 8.6.2 Estudios espectrofotométricos en presencia de CR

#### 8.6.2.1 Primer intento: $\beta$ (1-40)

##### 8.6.2.1.1 Disolución de $\beta$ (1-40)

Una alícuota de  $\beta$ (1-40) (10 nmol, determinado mediante AAA) se disgrega utilizando el protocolo disgregante descrito en el apartado 8.2.1.1.4. La disolución de la muestra se realiza en 100  $\mu$ L de PBS previamente filtrado (0,22  $\mu$ M) y la muestra se envejece durante un periodo de 48 h con agitación magnética suave.

##### 8.6.2.1.2 Disoluciones de CR

La disolución madre se prepara a una concentración 100-300  $\mu$ M en PBS con un 10% de EtOH y se utiliza preferiblemente el mismo día. Se disuelven 16 mg de CR en 40 mL de PBS Sigma pH 7,4 y se añaden 10 mL de EtOH absoluto. La preparación se filtra tres veces utilizando filtros de fibra de vidrio\* Gelman ( $\sim 1 \mu$ m de tamaño de poro nominal).

La concentración exacta de la disolución madre se calcula midiendo la absorbancia de una alícuota diluida con una solución con 40% de EtOH y 60% de una solución acuosa 1 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0 (600  $\mu$ L de solución madre se llevan a 2 mL de volumen final y 1 mL

---

\* Los filtros habituales (de polímeros orgánicos) adsorben CR haciendo variar la concentración de forma incontrolada.

## 8 Capítulo Experimental

---

de la disolución resultante se vuelve a diluir en 10 mL). El valor de  $\epsilon_{CR}$  de la disolución resultante es de  $59.300 \text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$  a 505 nm.

Durante la utilización de disoluciones de CR se pudo observar que, preparándolas de esta forma, no son estables a temperatura ambiente (transcurridos unos días aparece un precipitado abundante).

### 8.6.2.1.3 Mezcla $\beta(1-40)$ +CR para medidas UV-vis

La concentración final de CR en la mezcla a evaluar ha de ser mayor o igual a la de fibras de A $\beta$  ( $[\text{A}\beta_{\text{fibrilar}}] \leq [\text{CR}]$ ).

La solución madre de CR ( $\sim 300\text{-}100 \mu\text{M}$ ) se diluye en una relación 1:10 con tampón PBS Sigma para obtener una solución  $30\text{-}10 \mu\text{M}$ . Para obtener  $800 \mu\text{L}$  de mezcla  $\beta(1-40)$  + CR se diluyen  $27\text{-}80 \mu\text{L}$  de CR ( $30\text{-}10 \mu\text{M}$ ) en  $753\text{-}700 \mu\text{L}$  de PBS y por último se añaden  $20 \mu\text{L}$  de  $\beta(1-40)$ , de forma que la concentración final de CR es  $1 \mu\text{M}$  y la concentración de  $\beta(1-40)$  es  $2,5 \mu\text{M}^*$ . En este caso se analizaron muestras a las 0, 24 y 48 h.

Junto con la muestra a  $t=48$  h se tomó una alícuota de  $\beta(1-40)$  para determinar la turbidez final. Se diluyeron  $20 \mu\text{L}$  de la suspensión de A $\beta$  en  $780 \mu\text{L}$  de tampón PBS y se registró el espectro UV-vis en las mismas condiciones que las mezclas CR-A $\beta$ . En todos los casos se registró el espectro de la disolución de CR sin fibras amiloides.

El espectro UV-vis se registra entre 300 y 700 nm, y la preparación se mantiene a temperatura ambiente durante un mínimo de 15 min para permitir la formación del complejo A $\beta$ -CR. En este experimento se midieron los espectros UV-vis a diferentes tiempos para corroborar los valores encontrados por Klunk y colaboradores.

### 8.6.2.2 Segundo intento: insulina

#### 8.6.2.2.1 Suspensión de fibras amiloides de insulina

En el interior de un tubo pyrex se disuelven  $14,5 \text{ mg}$  de insulina en  $1,5 \text{ mL}$  de una disolución de HCl pH  $2,0^{**}$ . El tubo se cierra herméticamente y se procede a calentar la mezcla a  $92\text{-}98^\circ\text{C}$  hasta la gelificación de la muestra (este proceso puede necesitar varios minutos). En este punto se enfría la disolución con un baño de nieve carbónica-acetona hasta la completa congelación del líquido, se atempera brevemente en agua y se vuelve a calentar ( $92\text{-}98^\circ\text{C}$ ) durante  $\sim 1$  min. Se repiten los ciclos de congelación-calentamiento un mínimo de tres veces, hasta conseguir una suspensión fina de aspecto homogéneo y abundante (las partículas formadas se mantienen en suspensión durante minutos). En este punto se procede a abrir el tubo y a añadir tampón PBS ( $11,2 \text{ mL}$ ).

---

\* En este caso  $[\text{A}\beta] > [\text{CR}]$  ya que se pudo comprobar al analizar los espectros UV-vis obtenidos que realidad una pequeña parte de A $\beta$  forma fibrilas.

\*\* En estas condiciones la insulina ha de ser soluble mediante agitación manual. Si aparece un precipitado insoluble la formación de fibras amiloides no se llevará a cabo en su totalidad, aunque se consiga la disolución durante el proceso de calentamiento.

La suspensión de insulina resultante se utiliza el mismo día de su preparación, ya que de lo contrario el contenido en estructura amiloide se ve alterado. Para conocer la concentración exacta de la disolución se realiza un análisis de aminoácidos de una alícuota de la suspensión, previamente homogeneizada.

### 8.6.2.2.2 *Disolución de CR*

Para obtener una disolución madre de CR  $\sim 300 \mu\text{M}$  se disuelven 5,8 mg de CR en 22,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ. El medio se tampona añadiendo 2,5 mL de una preparación de PBS 10x (apartado 8.1.5.4) y se filtra tres veces utilizando filtros de fibra de vidrio<sup>♦</sup> Gelman ( $\sim 1 \mu\text{m}$  de tamaño de poro nominal). La disolución obtenida se utiliza en un plazo de 1-2 días.

La concentración de la disolución filtrada se calcula midiendo la absorbancia de una alícuota, como se especifica en el apartado 8.6.2.1.2, o bien diluyendo una alícuota de CR en PBS-sigma hasta obtener una concentración final 3-10  $\mu\text{M}$  de CR y utilizando el valor de  $^{541}\epsilon = 22.700 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ .

### 8.6.2.2.3 *Mezcla insulina + CR para medidas UV-vis*

La concentración final de CR en la mezcla a evaluar ha de ser cómo mínimo dos veces la concentración de fibras de insulina ( $[\text{insulina}_{\text{fibrilar}}] \leq 2 \cdot [\text{CR}]$ ), ya que la estequiometría de unión es de 1 molécula de insulina por cada 2 de CR.

A partir de la solución madre de CR ( $\sim 300$ - $100 \mu\text{M}$ ) se preparan diluciones en tampón PBS tales que, tras añadir el péptido, la concentración final de CR es igual para todas las preparaciones (entre 5 y  $10 \mu\text{M}$  de CR). Finalmente se añaden volúmenes variables de una suspensión  $200 \mu\text{M}$  de insulina fibrilar (apartado 8.6.2.2.1). En los experimentos con insulina se trabaja con volúmenes del orden de 4 mL, adecuados para cubetas estándar de 1 cm de paso de luz.

El espectro UV-vis se registra entre 300 y 700 nm, y la preparación se mantiene a temperatura ambiente durante un mínimo de 15 min para permitir la formación del complejo insulina-CR. Paralelamente se mide la turbidez que muestran las preparaciones de insulina en PBS (se preparan diluciones de la misma concentración que las utilizadas en presencia de CR). El espectro mostrado en las diferentes figuras (y sobre el que se aplican las ecuaciones detalladas en el apartado 6.2.2.2) se obtiene sustrayendo matemáticamente la turbidez obtenida a los espectros de las mezclas insulina-CR.

---

<sup>♦</sup> Los filtros habituales (de polímeros orgánicos) adsorben CR haciendo variar la concentración de forma incontrolada .

### 8.6.2.3 Ensayos de $\beta(1-42)$

#### 8.6.2.3.1 Suspensión de fibras amiloides de $\beta(1-42)$

Las suspensiones de  $\beta(1-42)$  utilizadas se obtienen según el protocolo general de envejecimiento de muestras utilizado en esta tesis (apartado 8.2.1.2.3). Sólo en un caso (el cual se indica en el texto del apartado 6.2.2.3) se modificó dicho protocolo introduciendo agitación orbital durante el proceso de envejecimiento (el péptido se disolvió de la forma establecida en el apartado 8.2.1.2.3, pero se envejeció 93 h a 37°C en una estufa con agitación orbital).

#### 8.6.2.3.2 Disolución de CR

La disolución de CR se prepara de la forma detallada en el apartado 8.6.2.2.2 para los experimentos de CR con insulina.

#### 8.6.2.3.3 Mezcla $\beta(1-42)$ + CR para medidas UV-vis

Igual que en el caso de  $\beta(1-40)$ , la concentración final de CR en la mezcla a evaluar ha de ser mayor o igual a la de fibras de A $\beta$  ( $[A\beta_{\text{fibrilar}}] \leq [CR]$ ).

La solución madre de CR ( $\sim 300-100 \mu\text{M}$ ) se diluye en una relación 1:10 con tampón PBS Sigma para obtener una solución 30-10  $\mu\text{M}$ . A partir de ésta se preparan disoluciones diluidas de CR en PBS (2-5  $\mu\text{M}$ ), a las que se añade un volumen adecuado de suspensión 40  $\mu\text{M}$  de  $\beta(1-42)$  envejecida, de forma que  $[A\beta_{\text{fibrilar}}] \leq [CR]$ . El volumen final es de 500  $\mu\text{L}$  (se utilizan cubetas de volumen reducido (450-500  $\mu\text{L}$ ) con paso de luz 1 cm para minimizar la cantidad de A $\beta$  necesaria). Paralelamente se registra el espectro de una disolución de CR sin fibras amiloides.

El espectro UV-vis de la mezcla se registra entre 300 y 700 nm, y la preparación se mantiene a temperatura ambiente durante un mínimo de 15 min para permitir la formación del complejo A $\beta$ -CR.

### 8.6.3 Estudios de fluorescencia en presencia de ThT

#### 8.6.3.1 Suspensión de fibras amiloides de $\beta(1-42)$

Las suspensiones de  $\beta(1-42)$  utilizadas se obtienen según el protocolo general de envejecimiento de muestras utilizado en esta tesis (apartado 8.2.1.2.3).

#### 8.6.3.2 Disolución de ThT

Se prepara una disolución madre de ThT 10 mM disolviendo 6,4 mg de ThT (65% pureza) en 2 mL de tampón fosfato 20 mM pH 7,4 (se obtiene a partir del tampón fosfato 0,2 M descrito en el apartado 8.1.5.1 diluyendo en agua con una relación 1:10). La disolución

obtenida se diluye dos veces en tampón fosfato 20 mM pH 7,4 en una relación 1:10 para obtener una disolución 100  $\mu$ M de ThT en tampón fosfato 20 mM pH 7,4

### **8.6.3.3 Mezcla $\beta$ (1-42) + ThT para medidas de fluorescencia**

La mezcla ThT + A $\beta$  se realiza justo antes de la medida (en este caso no es necesario incubar la mezcla durante un periodo de tiempo). Se añaden 12  $\mu$ L de ThT 100  $\mu$ M sobre 374  $\mu$ L de tampón fosfato 20 mM y por último se añaden 14,4  $\mu$ L de A $\beta$  envejecido previamente.