

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

---

Como muestran la Figura 115 y la Figura 116, tanto para la estructura paralela como anti-paralela se obtuvieron valores de energía total del sistema similares (del orden de  $-7100$  Kcal) y, lo que es más importante, aunque las estructuras se alejaron de la situación inicial y se pudo observar que los puentes de hidrógeno pre-establecidos se rompieron, la situación final muestra, en ambos casos, una estructura donde ambas cadenas se encuentran relativamente cercanas, estabilizadas básicamente por la interacción de las cadenas laterales hidrofóbicas (las estructuras finales no muestran ningún puente de hidrógeno intermolecular).

Este resultado nos indica que la hipótesis de una especie dimérica en disolución no es descartable. La dinámica realizada muestra que, tras 1000 ps, ambas unidades siguen interaccionando de forma notable. No obstante, este cálculo preliminar no permite decidir cual de las dos estructuras es la que, en caso de existir un dímero en disolución, sería la más favorecida: la paralela o la antiparalela.

### 5.3 Resumen estructural de los péptidos estudiados y comparación con los resultados descritos en la bibliografía

Los datos de CD y los de IR-FT muestran claramente que nuestros péptidos adoptan una estructura extendida de tipo  $\beta$ , tanto en disolución como en estado sólido, datos que se correlacionan con los resultados obtenidos del modelaje molecular. Además, el uso de TEM permite afirmar que las moléculas ensayadas no presentan tendencia a formar fibras amiloides en las condiciones de envejecimiento utilizadas en la presente tesis.

En la bibliografía más reciente se pueden encontrar referencias previas de estudios estructurales de N-metilpéptidos relacionados con proteínas amiloidogénicas, los cuales pueden compararse con nuestras moléculas. Por un lado están los resultados de Meredith y colaboradores<sup>166</sup>, que muestran estudios estructurales utilizando CD, ultracentrifugación y RMN. Por otro lado tenemos a Kapurniotu y colaboradores, los cuales utilizan también CD y complementan los datos con estudios de IR-FT<sup>165</sup>.

Al analizar los espectros de CD de los N-metilpéptidos obtenidos tanto por nosotros como por el grupo de Meredith y el de Kapurniotu, se observa en todos un marcado carácter de estructura  $\beta$ , mostrando espectros muy similares, independientemente de la secuencia analizada. Este comportamiento es más destacado en el caso de los compuestos con diversos N-metilaminoácidos, en los cuales la estructura  $\beta$  es más pronunciada (los trabajos de Kapurniotu y Meredith no muestran péptidos monometilados), con una estructura más rígida.

Al comparar los resultados de dicroísmo, a concentración o temperatura variable, obtenidos en nuestro laboratorio con aquellos descritos por Meredith aparece una discrepancia importante. Según sus experimentos, los dimetilpéptidos son estructuras muy estables, invariantes en un amplio rango de temperaturas y concentraciones. Esto, junto a los resultados de ultracentrifugación analítica, le lleva a afirmar que los dimetilpéptidos se encuentran en disolución en forma de monómeros.

Nuestras moléculas mostraron un comportamiento diferente: el péptido **9**, por debajo de  $\sim 10 \mu\text{M}$ , presenta valores de  $[\Theta]_{\text{MRW}}$  dependientes de la **[9]** (Figura 101, página 153). Algo parecido sucede al registrar espectros de CD a temperaturas variables para **2, 9 y 10**.

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

---

A temperaturas más elevadas, mayor contenido de estructura  $\beta$  o, dicho de otra manera, a temperaturas menores parece disminuir el grado de estructuración, siendo mucho más notable la variación en el monometilpéptido y el péptido sin N-metilaminoácidos que en el trimetilpéptido. Los resultados podrían indicar la existencia de una especie dimérica, bien sea paralela o anti-paralela, como las mostradas en el apartado 5.2.2.

Los resultados del análisis de IR-FT realizado en nuestro laboratorio indican un elevado contenido en estructuras  $\beta$ , tanto para la secuencia sin N-metilaminoácidos, **10**, como para **2** y **9**. Esta observación no coincide con los resultados obtenidos por Kaporniotu<sup>165</sup>, en los cuales se muestra que diversos N-metilpéptidos derivados de una secuencia amiloidogénica dan lugar a una mezcla compleja de conformaciones, entre las cuales aparece la estructura  $\beta$  de forma minoritaria.

Además, el hecho de observar un elevado contenido de estructura  $\beta$  mediante IR-FT se corresponde con los resultados obtenidos mediante dicroísmo circular y, probablemente, las discrepancias con los resultados de Kaporniotu se deban a la forma de obtener el péptido en estado sólido (diferencias en el secado).

Por último, los resultados obtenidos de los cálculos teóricos muestran que las estructuras con menos número de metilos presentan una mayor flexibilidad en la cadena peptídica respecto a la disposición de lámina  $\beta$  canónica, aunque todas las estructuras estudiadas no divergen en exceso respecto a la estructura extendida de partida. Esto indica que dicha estructura es un mínimo energético (es probable que en las moléculas con varios N-metilaminoácidos la forma extendida se vea especialmente favorecida, convirtiéndose en un mínimo absoluto, como indican los resultados de CD y IR-FT). Además, la dinámica molecular indica que la existencia de una especie dimérica es factible. Dicha especie dimérica, a pesar del comportamiento esperado para dos estructuras  $\beta$  que interaccionan entre sí, parece estar estabilizada mediante interacciones hidrofóbicas en lugar de a través de puentes de hidrógeno, como sería de esperar en una lámina  $\beta$ .

### 5.4 Estudio de estabilidad a proteasas de los inhibidores

Uno de los mayores problemas que presenta el uso de péptidos como potenciales fármacos es la facilidad con la que se degradan en el organismo humano. Las proteasas y peptidasas presentes en los medios biológicos son capaces de degradar moléculas de origen peptídico en cuestión de minutos<sup>185</sup>.

Por este motivo se decidió estudiar el comportamiento de algunas de nuestras moléculas en las condiciones en las que se llevaron a cabo los ensayos biológicos, verificando de esta forma la cinética de degradación de los inhibidores durante los ensayos *in vitro*.

Las proteasas presentan, en general, una elevada estereoespecificidad. Por este motivo es fácil predecir que los compuestos constituidos con aminoácidos D se degradarán mucho más lentamente que aquellos formados utilizando aminoácidos L. Esta resistencia es aprovechada incluso por algunos organismos, como las bacterias, para defenderse de la acción de las proteasas del organismo huésped. Además, este incremento del tiempo de vida media de los péptidos constituidos por aminoácidos D respecto a las secuencias originales ha sido descrito por otros investigadores en este campo<sup>185</sup>.

En el caso de péptidos modificados también es de esperar, gracias a la selectividad que presentan las peptidasas, una cinética de degradación más lenta que con péptidos constituidos a partir de aminoácidos naturales. Esto sucede siempre que la modificación no sea reconocida por peptidasas endógenas (los peptoides con enlaces éster diseñados por Meredith son mucho más lábiles que los péptidos originales<sup>186</sup>).

#### 5.4.1 Estabilidad de los inhibidores en medio de cultivo

##### 5.4.1.1 Estudio de la estabilidad de 2, 10 y 12 en medio de cultivo DMEM+

Inicialmente se escogieron tres péptidos, teniendo en cuenta las premisas anteriores, para realizar un estudio de estabilidad a proteasas en las condiciones de realización del ensayo *in vitro*. En primer lugar se escogió la secuencia original, **10**, para observar cómo

---

<sup>185</sup> Poduslo, J. F.; Curran, G. L.; Kumar, A.; Frangione, B.; Soto, C. J. *Neurobiol.* **1999**, 39, 371-382.

<sup>186</sup> Gordon, D. J.; Meredith, S. C. *Neurobiol. Aging*, **2002**, 23, S201.

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

---

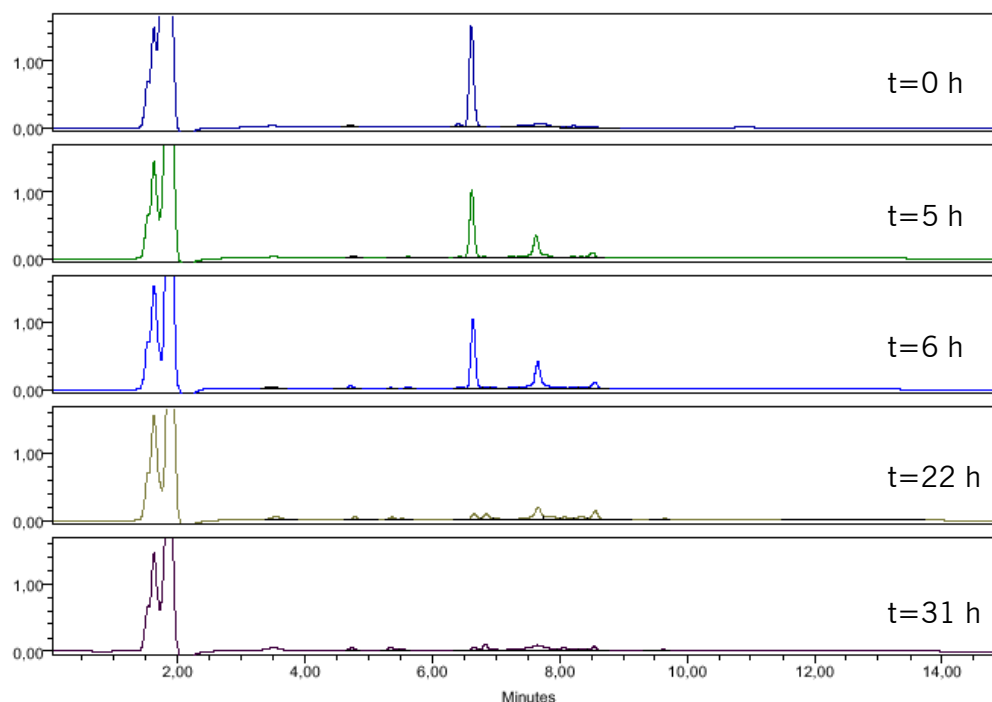
se degrada el péptido sin N-metilaminoácidos ni aminoácidos D. También se escogió el péptido **2**, ya que es el que mejores resultados había mostrado en los ensayos biológicos hasta ese momento, y la forma *enantio* de **2**, es decir, **12**.

El seguimiento de la degradación de los diferentes péptidos en medio de cultivo DMEM+ se realizó por HPLC. Para ello se modificó el protocolo utilizado habitualmente por Teixidor<sup>187</sup>. El péptido se incubaba, durante diferentes periodos de tiempo, a 37°C; las sales y proteínas presentes en el medio de cultivo se precipitan mediante la adición de ACN y el sobrenadante se analiza por HPLC (ver apartado 8.5.2). El resultado obtenido para el péptido **10**, incubado a diferentes tiempos en el medio de cultivo DMEM suplementado (DMEM+) utilizado en el SCT (apartado 8.4.1.1), se muestra en la Figura 117.

A pesar de que la intensidad de las señales peptídicas disminuye sustancialmente tras 22 h, se pudo determinar la naturaleza de los diversos productos de degradación de **10** presentes en dicha disolución mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. La mezcla presenta la señal correspondiente al péptido intacto a 873 uma (la masa de **10** más un átomo de sodio), acompañada de un pico mayoritario a 745 uma y varias señales a 617, 504, 429 y 273 uma. Estas masas se pueden asignar a los fragmentos obtenidos tras la pérdida de los residuos Lys-Lys-, Lys-Lys-Leu-, Lys-Lys-Leu-Val- y Lys-Lys-Leu-Val-Phe- respectivamente (en el caso de 429 y 273 uma ambos corresponden al peso del fragmento restante más un átomo de potasio, en lugar de un átomo de sodio). Sorprendentemente, no se observa ninguna señal correspondiente a la degradación del péptido por el extremo C-terminal.

---

<sup>187</sup> Teixidor, M., Tesis Doctoral, *en curso*. Departamento de Química Orgánica. Universidad de Barcelona.

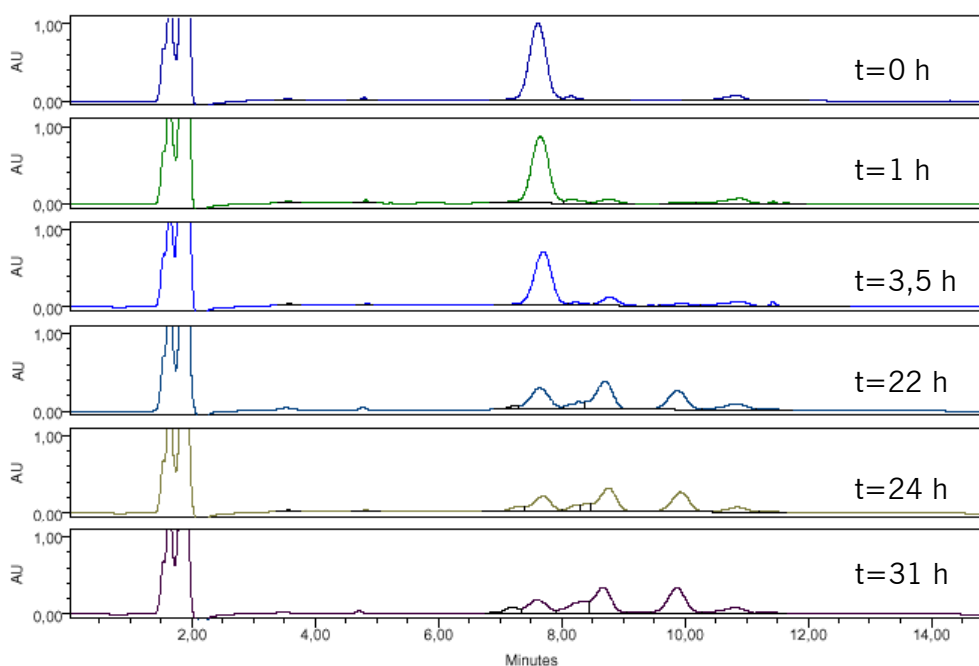


**Figura 117.** Cromatogramas de **10** obtenidos tras incubarlo con medio de cultivo DMEM+ durante los tiempos indicados. Se inyectaron 100  $\mu$ L utilizando una columna Symmetry™ C<sub>18</sub>. El gradiente usado fue: de 10% a 60% de B en 15 min, en 0,5 min a 100% de B e isocrático 5 min. A = H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA, B = ACN con 0,036% TFA. Detección por detector de fotodiodos 190-300 nm (se muestra el perfil a 210 nm).

La realización del mismo experimento con el péptido **2** rindió los cromatogramas que se muestran en la Figura 118. El análisis de la mezcla a tiempo 22 h permitió determinar la presencia de diversos productos de degradación. Igual que en el caso de **10**, el pico más intenso corresponde a **2** menos una lisina (señal a 759 uma = Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH<sub>2</sub> + Na<sup>+</sup>), observándose también señales correspondientes a la masa de la secuencia intacta (887 uma) y dos señales más a 631 y 518 uma provenientes de la pérdida de los fragmentos Lys-Lys- y Lys-Lys-Leu- respectivamente.

La recolección por separado de las diferentes señales que aparecen en el cromatograma tras 24 h de incubación permite determinar la naturaleza de cada una ellas. Tal y como se puede predecir teniendo en cuenta el carácter hidrofóbico de los fragmentos, se puede determinar que la señal a 7,6 min corresponde a **2** (como ya sabíamos), el pico que le sucede (8,8 min) proviene de la pérdida de una lisina y el siguiente (a 9,9 min) se obtiene tras la pérdida de ambas lisinas. El último pico, a 10,8 min, corresponde al fragmento que se obtiene tras la pérdida del grupo Lys-Lys-Leu-.

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

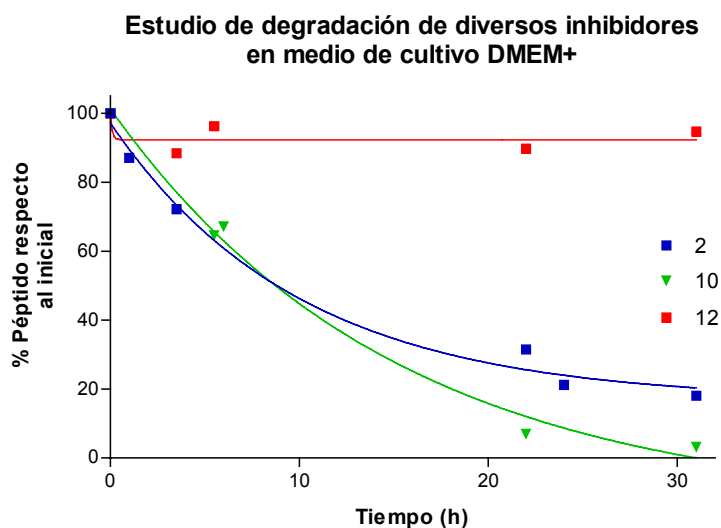


**Figura 118.** Cromatogramas de **2** obtenidos tras incubarlo con medio de cultivo DMEM+ durante los tiempos indicados. Se inyectaron 100  $\mu$ L utilizando una columna Symmetry™ C<sub>18</sub>. El gradiente de elución fue: de 10% a 60% de B en 15 min, en 0,5 min a 100% de B e isocrático 5 min. A = H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA, B = ACN con 0,036% TFA. Detección por detector de fotodiodos 190-300 nm (se muestra el perfil a 210 nm).

Al llevar a cabo el experimento de degradación en medio DMEM+ con el péptido **12** se observó que el cromatograma obtenido es invariable con el tiempo. La cuantificación del área correspondiente a **12** en función del tiempo dio un valor prácticamente constante, como se muestra en la Figura 119. Además, el análisis mediante MALDI-TOF de la disolución tras 30 h de incubación no permitió detectar la presencia de ningún producto de degradación.

En la Figura 119 también se representa cómo varían las áreas de **2** y **10** en función del tiempo. La comparación de los tres resultados permite afirmar que, efectivamente, la degradación de los péptidos constituidos por D-aminoácidos es muy inferior a la observada en péptidos con aminoácidos L (en el tiempo que duró el ensayo prácticamente no se pudo detectar la desaparición de **12**).

Además, **10** presenta una mayor tendencia a ser degradado en las condiciones ensayadas, lo que apoyaría la hipótesis de que la presencia de N-metilaminoácidos aumenta la estabilidad del péptido a la degradación proteolítica. La diferencia observada en la Figura 119 es demasiado pequeña, por lo que se decidió ensayar dos péptidos más para ampliar la información sobre el efecto de los N-metilaminoácidos.



**Figura 119.** Representación del porcentaje de péptido que queda en disolución respecto al inicial a diferentes tiempos (el porcentaje de péptido se calcula dividiendo el área a tiempo (t) entre el área inicial de péptido en las condiciones de ensayo).

### 5.4.1.2 Estudio de la estabilidad de **6** y **16** en medio de cultivo DMEM+

Para comprobar cómo influye la presencia de metilaminoácidos en la estabilidad proteolítica del péptido se escogieron las secuencias **6** y **16**.

La elección de **6** se hizo para comprobar si la presencia de dos grupos N-metilo confiere una mayor estabilidad al péptido respecto a la secuencia con un único grupo. En principio, si la presencia del grupo metilo detiene la acción de las proteasas, sería de esperar que la secuencia  $\text{KKLNMeVFNMeFA-NH}_2$  presentara como productos de degradación sólo los fragmentos procedentes de la pérdida de las lisinas.

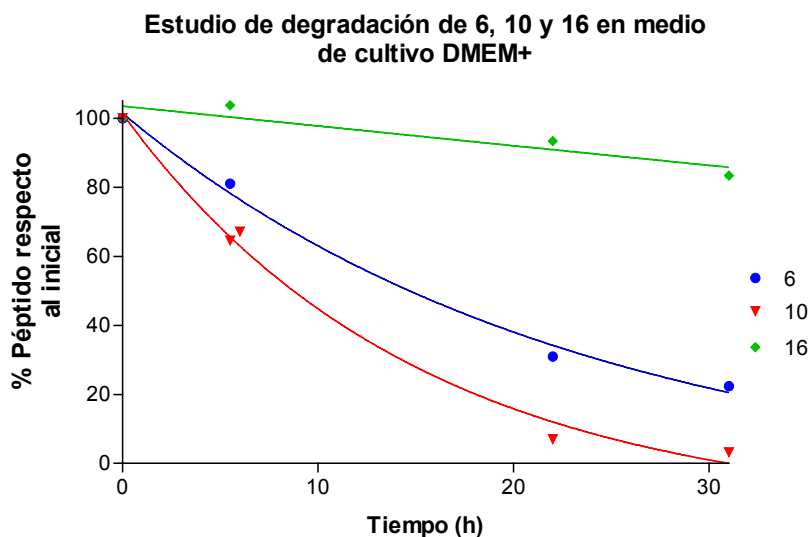
El péptido **16** tiene un N-metilaminoácido en el segundo residuo de la secuencia. Si tenemos en cuenta que en las proteólisis que hemos observado parece que la degradación es secuencial (primero aparece la señal correspondiente a la pérdida de una lisina, luego la de dos, etc.), es de esperar que en este caso las proteasas no puedan actuar (no son capaces de romper el primer enlace, y por tanto no pueden continuar hidrolizando el péptido).

En la Figura 120 se muestra cómo varía la concentración de **6** y **16** en función del tiempo de incubación. Además, e igual que se hizo anteriormente, se analizó la muestra tras 22 h utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF.



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

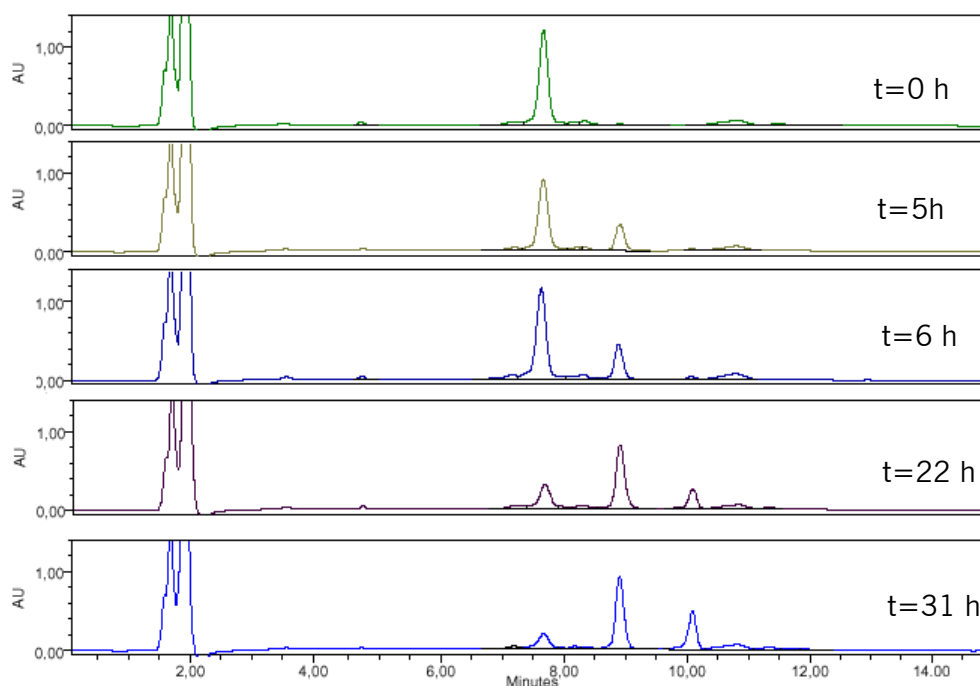
En la Figura 120 se puede ver cómo **6** presenta una mayor estabilidad que **10** a la degradación. Si nos fijamos en los valores finales a los que se llega, tenemos que aunque **6** es inicialmente más estable que **2** (Figura 119), tras 30 h el porcentaje de péptido intacto es muy similar en ambos casos.



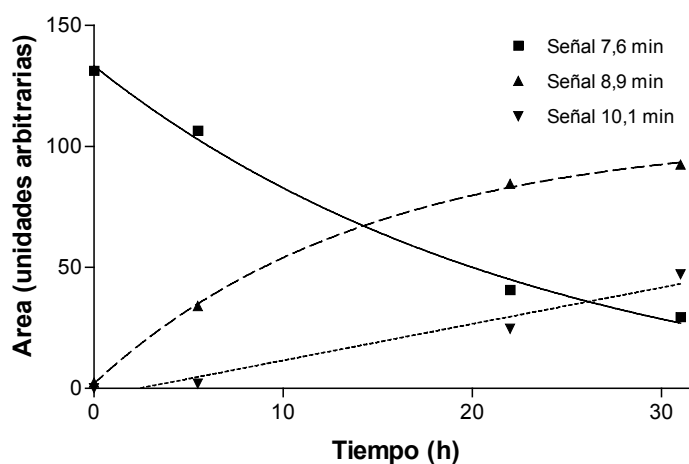
**Figura 120.** Representación del porcentaje de péptido que queda en disolución respecto al inicial a diferentes tiempos para las moléculas **6**, **10** y **16**.

Por otro lado, el análisis mediante MALDI-TOF de **6** tras 22 h de incubación en DMEM+ muestra solamente los compuestos de degradación correspondientes a la pérdida de una y dos lisinas (773 y 645 uma respectivamente), además de la señal proveniente del péptido intacto (901 uma). En la sucesión de cromatogramas mostrados en la Figura 121 se observa cómo la formación de las especies de degradación se da de forma gradual, apareciendo primero el pico correspondiente a la pérdida de una lisina y aumentando posteriormente la señal correspondiente a la degradación de la segunda lisina.

La representación de las áreas de cada señal en función del tiempo nos da la evolución de cada una de las especies durante la incubación, como se muestra en la Figura 122. Así puede verse cómo la señal a 7,6 min, atribuible al péptido inicial intacto, desaparece gradualmente, a la vez que se genera primero el producto que eluye a 8,9 min, correspondiente a la pérdida de una lisina, y posteriormente el péptido sin ambas lisinas, a 10,1 min. Este tipo de comportamiento nos indica que, muy probablemente, el mecanismo de degradación principal en estas condiciones consiste en la hidrólisis secuencial del primer aminoácido (extremo N-terminal).



**Figura 121.** Cromatogramas de **6** obtenidos tras incubarlo con medio de cultivo durante los tiempos indicados. Se inyectaron 100  $\mu$ L utilizando una columna Symmetry™ C<sub>18</sub>. El gradiente usado fue: de 10% a 60% de B en 15 min, en 0,5 min a 100% de B e isocrático 5 min. A = H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA, B = ACN con 0,036% TFA. Detección por detector de fotiodos 190-300 nm (se muestra el perfil a 210 nm).

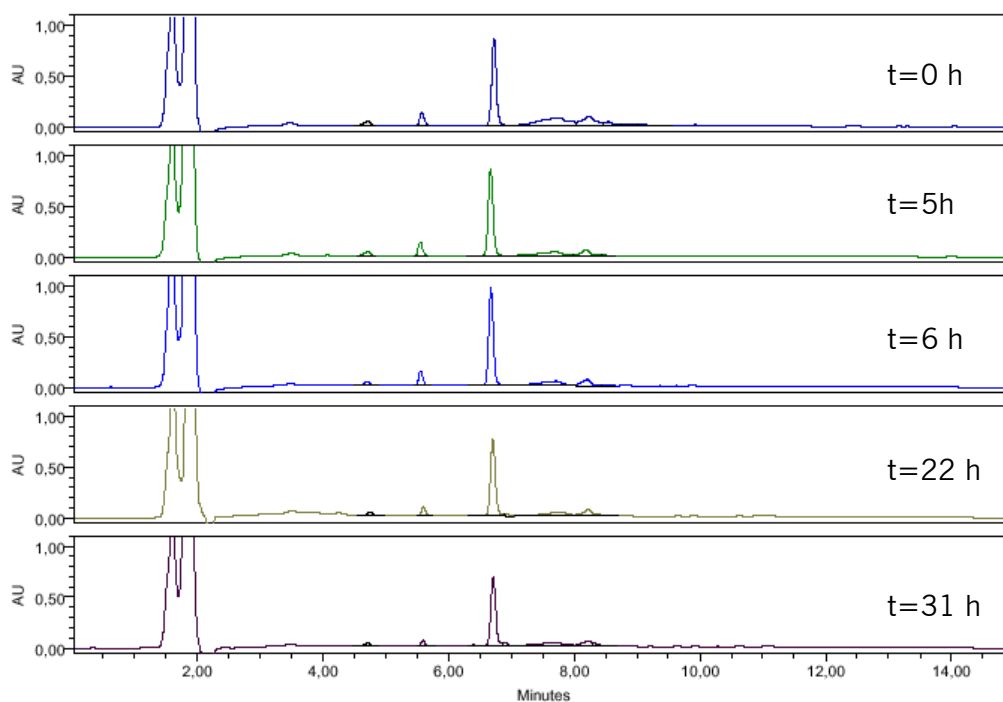


**Figura 122.** Evolución de los diferentes compuestos que se detectan en las muestras de **6** incubadas en medio de cultivo en función del tiempo. La señal a 7,6 min corresponde al péptido entero, mientras que las señales a 8,9 y 10,1 min se corresponde con los productos de degradación que se obtienen al eliminar una y dos lisinas, respectivamente.

La afirmación de que la degradación se produce por el extremo N-terminal se ve corroborada con el comportamiento del péptido **16**. Este péptido es, aparentemente, resistente a proteasas, como se aprecia en la secuencia de cromatogramas de la Figura 123. No se pudo detectar, en este caso, la aparición de señales correspondientes a productos de degradación, aunque el análisis mediante espectrometría de masas tras 22 h

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

de incubación mostró la presencia mayoritaria del péptido intacto ( $M+Na^+=887$  uma), acompañado de señales correspondientes a la pérdida de la alanina del extremo N-terminal y del fragmento ANMeF- (816 y 655 uma respectivamente). La aparición de estos productos de degradación explicaría la leve disminución de **16** con el tiempo que se observa en la Figura 120.



**Figura 123.** Cromatogramas de **16** obtenidos tras incubarlo en DMEM+ durante los tiempos indicados. Se inyectaron 100  $\mu$ L utilizando una columna Symmetry™ C<sub>18</sub>. El gradiente utilizado fue: de 10% a 60% de B en 15 min, en 0,5 min a 100% de B e isocrático 5 min. A = H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA, B = ACN con 0,036% TFA. Detección por detector de fotiodios 190-300 nm (se muestra el perfil a 210 nm).

### 5.4.1.3 Estudio de la estabilidad de **2** en medio de cultivo RPMI+

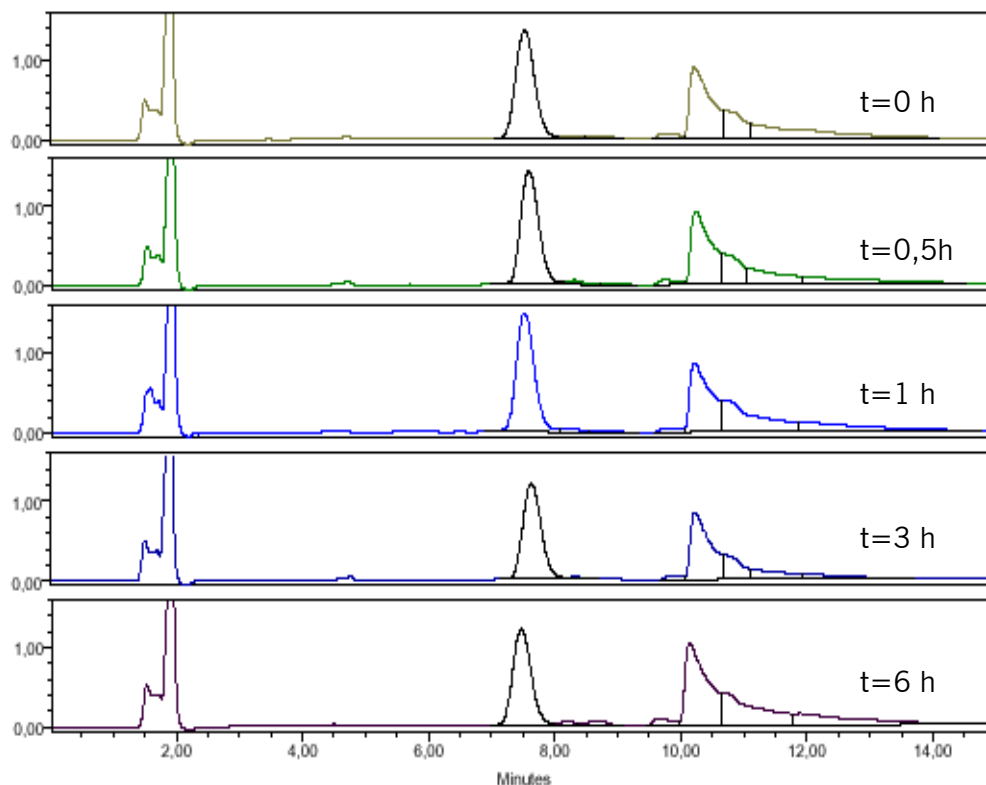
Los resultados de actividad biológica obtenidos para los péptidos **2** y **10** en el SCT difieren significativamente de los observados en el IIBB. Esto hizo pensar en la posibilidad de que los medios de cultivo utilizados en cada laboratorio presenten una actividad proteolítica diferente. Concretamente, se pensó en la posibilidad de estar utilizando un medio de cultivo más rico en proteasas o, quizás, con una mayor actividad de éstas\*. Esta hipótesis podría explicar el hecho de que los únicos péptidos que presentaron actividad

\* El medio de cultivo, entre otros aditivos, incluye suero de caballo y bovino. Este tipo de ingrediente es rico en proteínas y enzimas naturales, los cuales se desactivan mediante un tratamiento de 1 h a 60°C. La cantidad y actividad de las proteasas presentes puede por tanto variar debido a la fuente comercial del suero y/o al proceso de inactivación.

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

biológica durante los experimentos realizados en el SCT fueron aquellos constituidos por D-aminoácidos.

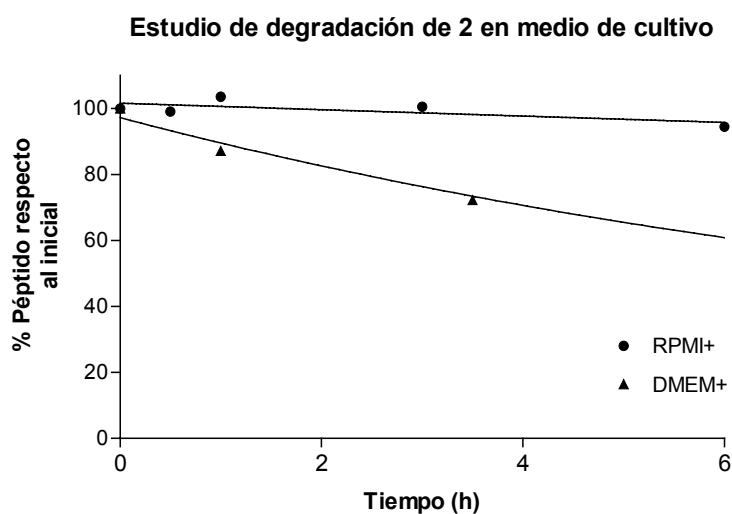
En este caso se decidió ensayar únicamente el péptido **2** en medio RPMI+ para poder comparar los resultados con los observados en medio DMEM+. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 124.



**Figura 124.** Cromatogramas de **2** obtenidos tras incubarlo con medio de cultivo RPMI+ durante los tiempos indicados. Se inyectaron 100  $\mu$ L utilizando una columna Symmetry™ C<sub>18</sub>. El gradiente usado fue: de 10% a 60% de B en 15 min, en 0,5 min a 100% de B e isocrático 5 min. A = H<sub>2</sub>O con 0,045% TFA, B = ACN con 0,036% TFA. Detección por detector de fotiodios 190-300 nm (se muestra el perfil a 220 nm).

El análisis de esta serie de cromatogramas no muestra, aparentemente, variaciones de la concentración de **2** con el tiempo. La Figura 125 muestra la representación del porcentaje de péptido en función del tiempo de incubación en medio RPMI+. Se aprecia que **2** se degrada mucho más rápido en medio DMEM+, que en medio RPMI+.

Este experimento descarta que los inhibidores constituidos por aminoácidos L se degraden más rápido en el medio de cultivo utilizado en el SCT. Es más, los resultados obtenidos parecen indicar de forma clara que **2** es mucho más estable en RPMI+ que en DMEM+.



**Figura 125.** Representación de la variación de la concentración de **2** con el tiempo en los dos medios de cultivo ensayados: DMEM+ y RPMI+ (las líneas muestran la tendencia seguida por los puntos experimentales).

Esta observación, muy probablemente, está relacionada con las diferencias en el suero utilizado (marca comercial, lote y/o manipulación) en ambas series de experimentos<sup>♦,189</sup>. Las proteasas presentes en el medio de cultivo provienen del suero (es un extracto animal), por lo que cualquier variación en la capacidad proteolítica del medio de cultivo puede atribuirse, *a priori*, a cambios en la composición de dicho suero.

Tras analizar estos resultados se puede afirmar que la diferencia de comportamiento de los inhibidores ensayados en los dos laboratorios no es debida a una velocidad de degradación diferente. Esto descarta que la variación en el contenido o la actividad de las proteasas presentes en el medio usado sea la causa de las diferencias observadas en el SCT y el IIBB.

### 5.4.2 Resumen y conclusiones sobre la estabilidad relativa de los péptidos ensayados

Los datos obtenidos de las diferentes pruebas de proteólisis nos dan mucha información sobre cómo afectan las modificaciones introducidas sobre la secuencia nativa en la estabilidad del péptido. De los experimentos realizados utilizando medio DMEM+ se pueden destacar los siguientes puntos:

<sup>♦</sup> Es sabido que un mismo tipo de suero puede presentar variaciones importantes entre proveedores e, incluso, entre lotes<sup>189</sup>.

<sup>189</sup> Greene, L.; Aletta, J. M.; Rukenstein, A.; Green, S. H. *Methods Enzymol.* **1987**, *147B*, 207-216.

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

---

- La secuencia sin grupos metilo, **10**, se degrada prácticamente en su totalidad tras un periodo de 24 h. Es decir, en las condiciones del ensayo biológico, donde además del medio de cultivo tenemos los factores liberados por las células PC12 (el medio en que se realiza el experimento biológico es, por tanto, más rico en proteasas), el péptido **10** es degradado totalmente 24 h después de su aplicación.
- La degradación, en todos los casos, tiene lugar por el extremo N-terminal. Esto se debe, muy probablemente, a que todos los péptidos ensayados son carboxiamida. La sustitución del ácido carboxílico natural por otro grupo funcional ralentiza la proteólisis por el extremo C-terminal<sup>190</sup>.
- El cambio de los aminoácidos L por aminoácidos D hace que el péptido sea resistente a proteasas en el intervalo de tiempo ensayado (24 h). En este caso ni siquiera pudo detectarse la presencia de productos de degradación mediante el uso de espectrometría de masas MALDI-TOF.
- El uso de N-metilaminoácidos retarda la degradación por proteasas. El inconveniente es que la protección no es tan eficiente como la que ofrecen los aminoácidos D (se ha detectado mediante espectrometría de masas el producto proveniente de la rotura del enlace entre el N-metilaminoácido y el residuo que le precede, mientras que no se ha detectado la pérdida de D-aminoácidos) y depende, además, de la posición del N-metilaminoácido en la secuencia (el enlace entre el aminoácido que le precede y el N-metilaminoácido resulta mucho más difícil de degradar que un enlace normal, pero no afecta prácticamente a los restantes residuos).

El ensayo de proteólisis en RPMI+ muestra que la degradación en este medio se da en menor medida que en el utilizado previamente, DMEM+. La principal conclusión que se extrae de esto es que en el SCT se ha trabajado con un medio menos activo en proteasas que el usado previamente en el IIBB.

---

<sup>190</sup> Adessi, C.; Soto, C. *Drug Dev. Res.* **2002**, 56, 184-193.

