



ESCUELA DE DOCTORADO  
INTERNACIONAL DE LA USC

Iván  
Gallego Gómez

Tesis doctoral

Diseño de nuevos materiales  
orgánicos híbridos para el  
reconocimiento proteico y el  
control de procesos celulares  
de transporte

Santiago de Compostela, 2022

Programa de doctorado en Ciencia y Tecnología Química



ESCUELA DE DOCTORADO  
INTERNACIONAL EN CIENCIAS  
Y TECNOLOGÍAS DE LA USC

TESIS DOCTORAL

**DISEÑO DE NUEVOS  
MATERIALES ORGÁNICOS  
HÍBRIDOS PARA EL  
RECONOCIMIENTO  
PROTEICO Y EL CONTROL DE  
PROCESOS CELULARES DE  
TRANSPORTE**

Iván Gallego Gómez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA



SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022





## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

### **Diseño de nuevos materiales orgánicos híbridos para el reconocimiento proteico y el control de procesos celulares de transporte**

D. Iván Gallego Gómez

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

*En Santiago de Compostela, ..... de ..... de 2022.*

Fdo. Iván Gallego Gómez







## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

**Diseño de nuevos materiales orgánicos híbridos para el reconocimiento proteico y el control de procesos celulares de transporte**

D. Juan Ramón Granja Guillán  
En condición de Tutor /Director

D. Javier Montenegro García  
En condición de Director

INFORMAN:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. **Iván Gallego Gómez**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en la que la participación del doctorando fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

*En Santiago de Compostela, ..... de ..... de 2022.*



Fdo. Juan Ramón Granja Guillán

Fdo. Javier Montenegro García



# Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría expresar un inmenso agradecimiento a los directores de esta Tesis doctoral, Javier Montenegro y Juan R. Granja por la extraordinaria oportunidad que me brindasteis y por permitir que todo esto haya sido posible.

A Javier Montenegro, por fijarte en mí, aun recuerdo aquella etapa donde eras mi profesor de Química Orgánica V durante el grado y un día me citaste en tu despacho para darme la oportunidad de formar parte de esta gran familia. Hoy en día, no solo eres mi profesor o mi director de Tesis, eres un referente y si me permites la confianza un amigo. A lo largo de estos años he podido descubrir no solo tu faceta científica, incuestionable, y con unas ganas desbordantes e incasables por la investigación y por la química, sino también, a una gran persona, preocupado por los problemas personales de cada uno de nosotros fuera del laboratorio. Gracias por tu apoyo, por tus llamadas fuera del horario laboral únicamente para auparme, animarme y que no me rindiera, justo para que hoy, puedas estar leyendo este manuscrito. Infinitas gracias por confiar en mí en todo momento.

A Juan R. Granja, por sus enseñanzas y consejos, por transmitirnos a toda una generación los valores e intereses de un verdadero científico. Por volcar en todos nosotros la sabiduría para poder desarrollar una química de alta calidad. Gracias por la preocupación diaria en cada uno de nosotros, en nuestros problemas sintéticos o de laboratorio, pero sobre todo por tu implicación y apoyo ante alguna dificultad o bache personal.

Agradecer a la Xunta de Galicia por la concesión de mi primera beca predoctoral (ED481A-2018/116) y posteriormente al ministerio de ciencia, innovación y universidades por la aceptación en el Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU17/00941). A la plataforma BioRender.com por proporcionar un gran abanico de herramientas para crear las figuras expuestas en esta tesis doctoral. Además, quería agradecer a todas las instituciones la confianza depositada en los ambiciosos proyectos del grupo y que con su financiación han hecho posible la labor investigadora a lo largo de estos años.

Al profesor Nazario Martín por haberme brindado la oportunidad de realizar una pequeña estancia en su grupo de investigación en la Universidad Complutense de Madrid, España. A todos los integrantes de su grupo y en especial a Beatriz Illesca y Javier Ramos, agradecerles el cariño con el que me recibieron, por acompañarme en esta experiencia y ampliar mis fronteras mas allá de la química peptídica aportando su granito de arena para seguir creciendo como investigador.

A Rebeca Menaya-Vargas por toda su ayuda con los cultivos celulares, por su disposición diaria para que tuviéramos células donde trabajar y por su preocupación constante por que todo saliera siempre a la perfección. A Patricia Lago y María Rey por su ayuda y disposición ante cualquier problema de gestión que se pudiera generar. También, me gustaría agradecer el trabajo realizado por todo el personal del CIQUS y que permite un correcto funcionamiento y una eficiente organización de todo el centro, en especial a Arcadio, Laura, Pablo y Noela.

Al profesor Luis Castedo y a los doctores Manuel Amorín y Rebeca García-Fandiño por los atractivos debates químicos durante los seminarios semanales.

Quisiera darles las gracias a todos/as y cada uno/a de mis compañeros de laboratorio, juntos hemos formado esta gran familia y durante estos años hemos compartido alegrías, risas, excursiones y a veces, momentos menos buenos pero que sin duda hubieran sido peores si no hubierais estado, por este motivo, a muchos/as de vosotros puedo consideraros hoy en día verdaderos amigos/as.

A Marisa por todo el cariño con el que me recibiste nada más entrar en el grupo, por todas las ganas, el esfuerzo y la paciencia que pusiste para aguantar la retahíla de preguntas como tu pupilo. Uno de los motivos de empezar la etapa doctoral fue precisamente por ti, por inculcarme la pasión por la investigación que tu iniciaste y que posteriormente yo continué, ambos proyectos unidos por la misma secuencia. Gran parte de lo que soy como químico es gracias a tus enseñanzas. Te has convertido en una gran amiga durante estos años, y que, por lo tanto, es imprescindible que sigas estando en todas las nuevas etapas que me queden por superar.

A Jose J. Reina por trasmitirme toda tu experiencia, todos tus trucos y toda tu arte química a la hora de desarrollar y afrontar cualquier reto sintético. Has sido un gran apoyo a lo largo de esta etapa, incluso después de tu traslado, preocupándote de las novedades de los proyectos y manteniendo siempre un contacto estrecho y cercano a pesar de la distancia. Gracias por “endulzar” esta Tesis doctoral.

A Irene Lostalé por trasmitirme el rigor científico con el que trabajas, por tu experiencia y por tus inmensos conocimientos en el campo de la biología, donde eres única, y que poco a poco has sabido inculcarme. Si de algo me siento agradecido durante esta etapa, es de haber podido compartir el laboratorio al lado de un portento como investigadora. Por poseer esa capacidad para reconducir los proyectos y cualquier situación y hacer que lo difícil parezca fácil. Algún día aspiro a realizar los cálculos de cabeza con la rapidez con la que los realizas. Eres admirable.

A Alejandro Méndez por tu explicaciones, enseñanzas, consejos y experiencia, sobre todo en la última etapa de la Tesis que sin tu ayuda no hubiera despegado de igual forma. Gracias por tu dedicación y por emplear tu tiempo en procesar y gestionar los datos para que hoy en día se puedan plasmar tanto en una publicación científica como en esta Tesis doctoral.

A Nacho Insua y a Julian Bergueiro, gracias por vuestras preguntas y sugerencias constructivas durante los seminarios que consiguen hacernos pensar y aportan y mejoran los proyectos y la química que desarrollamos, con vosotros siempre aprendemos algo nuevo. A Geert, Richard, Ghibom y Sahnawaz por darme la oportunidad de conocerlos y aprender de vosotros.

A Lionel y a Juanillo, gracias por vuestras bromas, por ponérselo fácil a los nuevos integrantes del grupo, por convertir mis primeros días en el laboratorio en algo divertido donde es imposible no encajar. A Martín Calvelo siempre dispuesto a generarte las mejores estructuras 3D para las presentaciones. A Iria Louzao por tus enseñanzas y por las risas en el laboratorio.

A Alberto por todos tus consejos, sin duda, eres una apuesta segura cuando se plantea cualquier tipo de problema en el laboratorio. Gracias por esos chistes tan malos que siempre acababan sacándome una sonrisa.

A Evita por todas las conversaciones juntos, por aquel inolvidable congreso en San Sebastián, donde te duplicaste y apareció Lucía, aun escucharás mis gritos de “Evaaaa” desde las alturas. A Ángel por tu bondad y tus ganas incansables de ayudarme cuando se atragantaba la síntesis de algún compuesto. A Fede por inculcarnos la pulcritud y la rigurosidad a la hora de trabajar en un laboratorio.

A Héctor por toda tu energía y simpatía cuando más se necesitaba. A Lamas y Alfonso, gracias por hacer que los días dentro y fuera del laboratorio hayan sido más llevaderos con vuestro sentido del humor.

A Marta y a Giulia gracias por las charlas reconfortantes, las risas, y los cotilleos a última hora del día. No puedo olvidarme de los festivales, que junto a Álvaro se convertían en una fórmula perfecta, añoro esos momentos con vosotros y deseo que se repitan de nuevo muy pronto. A Vicky por ser la alegría personificada, por entrar al laboratorio siempre con esa sonrisa de oreja a oreja que alegra las mañanas. Echaré de menos picarte haciéndote cosquillas o con esas cortinas que nos hacías creer que eran vestidos. A Alicia por los debates, las charlas y risas en el laboratorio, no dejes de luchar con esa ambición por conquistar tus metas.

A Marcos, Ezequiel, Rebeca y Jose María, gracias por permitirme compartir distintos momentos con vosotros, os deseo mucho ánimo, estoy seguro de que tendréis un futuro brillante.

A las nuevas caras del grupo, Yeray y Patricia, mucho ánimo, estoy seguro de que los años del doctorado se convertirán en una etapa muy fructífera en vuestra carrera investigadora, no os desesperéis, todo esfuerzo tiene su recompensa, mucha suerte.

A Sandra porque has sido un verdadero descubrimiento estos últimos años, apareciste sin hacer ruido, sin llamar la atención, y de repente me enseñaste lo que significa de verdad la palabra amistad. Gracias por escucharme durante horas y por auparme para poder subir la última cuesta de la tesis. Siendo “conscientes” del poco tiempo que hace que nos conocemos, hemos vivido múltiples locuras y aventuras dentro y fuera del laboratorio. Tienes una energía extremadamente contagiable a la que uno se vuelve adicto. No cambies nunca. Siempre serás mi alma gemela en amiga.

A todas las demás personas que hayan aportado o contribuido en mayor o menor medida en esta fase de mi vida y que no haya citado anteriormente. Muchísimas gracias a todos.

Centrándome en un ámbito mas familiar o personal, me gustaría devolver en forma de “INFINITAS GRACIAS” todo el ánimo y las palabras de apoyo diarias que me habéis brindado a lo largo de estos años.

A mis amigos de la infancia, mis “Ourenfermos”: Natalia, Andrea, Gloria, Brais y Sara. Se que la distancia provoca que en muchas ocasiones sea muy difícil reunirnos todos de nuevo, sin embargo, eso no me impide saber que siempre estaréis ahí, que cuando más os necesite no me vais a fallar. Estoy deseando que nos volvamos a reencontrar muy pronto. A Alma por estar al otro lado del teléfono para escucharme y siempre darme el mejor consejo. Os echo en falta.

A Andrea por pertenecer al triángulo tan increíble que hemos formado, por preocuparte de mí constantemente, cuidarme y aconsejarme solo como tú sabes.

A Ibán, Cristian, Braulio y Borja, gracias por acogerme como lo habéis hecho, por la cantidad de emociones, locuras y momentos que hemos vivido este último año, sin vosotros estoy seguro de que la recta final de la tesis no la hubiera afrontado de igual forma.

A Noa, por estar incondicionalmente a mi lado cada día desde hace 15 años, sin importar la hora o el momento y regalándome cantidades inmensas de muestras de cariño sin esperar nada a cambio, bueno sí, comida.

A Sergio por ser mi compañero y cómplice en todas mis aventuras. En algunas ocasiones, los momentos de estrés o frustración a lo largo de la tesis no te lo pusieron nada fácil, sin embargo, no tiraste la toalla para poder levantarme y sacar la mejor versión de mí, siendo el combustible que a veces me faltaba. Todos estos momentos me han hecho crecer como persona y solo puedo darte las gracias por estar ahí día tras día. “Siempre es siempre”.

A mis padres, María y Víctor, por dejaros la piel para que vuestros hijos pudieran convertirse en lo que ellos quisiesen, dotándonos de todos los medios de los que disponíais para que pudiéramos lograrlo. Gracias por la educación y por los valores que me habéis inculcado. A mis hermanos Gael y Luca. A Juan. A Maite, mi segunda madre, a Alberto y mi prima Alma. A mis abuelos, Teresa, Camilo, Lola y Manolo. A mi bisabuela por enseñarme que las mentes abiertas y el respeto no entienden ni de educación ni de generaciones. A mi bisabuelo porque estoy seguro de que desde donde estés te sentirás orgulloso de mí. Gracias por haberme convertido en la persona que soy hoy en día, llegar hasta aquí hubiera sido imposible sin todos vosotros. Hoy concluyo mi doctorado y os dedico a vosotros este logro.

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abreviaturas .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>Resumen .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>Objetivos generales .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>Introducción I.....</b>   | <b>23</b> |
| 1. Química supramolecular .....  | 25        |
| 1.1 Autoensamblaje molecular.....  | 26        |
| 1.2 Reconocimiento molecular o química anfitrión-huésped.....                                      | 27        |
| 1.3 Herramientas de la química supramolecular: química covalente dinámica .....                    | 30        |
| 1.3.1 Formación de enlaces Carbono-Heteroátomo .....   | 30        |
| 1.3.2 Formación de enlaces Carbono-Carbono y Heteroátomo-Heteroátomo .....                         | 31        |
| 2. Péptidos penetrantes de células (CPPs).....   | 33        |
| 2.1 Antecedentes históricos.....   | 33        |
| 2.1.1 Proteína TAT del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1).....                           | 33        |
| 2.1.2 Homeodominio de Antennapedia, una homeoproteína de <i>Drosophila</i> .....                   | 34        |
| 2.1.3 Otras proteínas con comportamientos atípicos.....  | 35        |
| 2.2 Nuevas estructuras con características penetrantes.....  | 37        |
| 2.3 Clasificación de los CPPs.....   | 41        |
| 2.4 Mecanismos de translocación.....   | 42        |
| 2.4.1 Transporte pasivo o independiente de energía .....   | 43        |
| 2.4.2 Transporte activo o dependiente de energía.....  | 43        |
| 2.5 Escape endosomal.....  | 47        |
| 2.6 Cargos.....  | 49        |
| 2.7 Aplicaciones terapéuticas .....  | 54        |
| 2.8 Limitaciones de los CPPs.....  | 55        |
| 3. Reconocimiento de carbohidratos: receptores y glicoestructuras .....                            | 57        |
| 4. Síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) .....  | 63        |
| <b>Capítulo I. Péptidos penetrantes de células glicosilados (GCPPs) .....</b>                      | <b>65</b> |
| 1. Objetivos .....   | 67        |
| 2. Diseño y síntesis.....  | 68        |
| 3. Medidas de espectroscopía RMN.....  | 70        |
| 4. Estudios de internalización celular.....  | 71        |
| 5. Estudios <i>in vivo</i> en modelos de peces cebra.....  | 75        |
| 6. Conclusiones .....  | 77        |
| <b>Capítulo II. Escudos de carbohidratos para péptidos penetrantes de células.....</b>             | <b>79</b> |
| 1. Objetivos .....   | 81        |
| 2. Diseño y síntesis.....  | 82        |
| 3. Estudios de internalización celular y citotoxicidad.....  | 83        |
| 4. Experimentos de biodistribución <i>in vivo</i> en modelos de ratón.....                         | 86        |
| 5. Conclusiones .....  | 88        |
| <b>Introducción II .....</b>   | <b>89</b> |
| 1. El cáncer y el proceso de metástasis .....  | 91        |
| 1.1 Moléculas de adhesión celular: la familia de las selectinas.....                               | 92        |
| 1.2 Ácidos siálicos: Sialil Lewis X (sLe <sup>x</sup> ) y Sialil Lewis A (sLe <sup>A</sup> ) ..... | 95        |

|  |   |            |
|--|---|------------|
| 2.   | Estructuras miméticas de los ligandos naturales sLe <sup>X</sup> y sLe <sup>A</sup> ..... | 97         |
| 3.   | Estructuras de carbono como moldes de construcción: La ciencia de los fullerenos ..       | 98         |
| 3.1  | <i>Antecedentes históricos</i> .....  | 98         |
| 3.2  | <i>La química de los fullerenos en la actualidad</i> .....                                | 99         |
| <b>Capítulo III. Híbrido 3D péptido/fullereno para el reconocimiento proteico multivalente .....</b> |   | <b>103</b> |
| 1.   | Objetivos .....   | 105        |
| 2.   | Diseño, síntesis y estudio por SPR de los ligandos peptídicos .....                       | 107        |
| 3.   | Síntesis de los conjugados híbridos péptido/[60]fullereno .....                           | 108        |
| 4.   | Ensayo de afinidad mediante SPR .....   | 111        |
| 5.   | Estudio de interacción en células .....   | 112        |
| 6.   | Conclusiones .....  | 114        |
| <b>Conclusiones generales .....</b>  |   | <b>115</b> |
| <b>Sección Experimental, Capítulo I .....</b>  |   | <b>119</b> |
| 1.   | Figuras de apoyo .....  | 121        |
| 2.   | Materiales, instrumentación y métodos.....  | 124        |
| 3.   | Síntesis peptídica.....   | 125        |
| 3.1  | <i>Protocolos generales</i> .....   | 125        |
| 3.2  | <i>Péptido TmP(Man)<sub>2</sub></i> .....   | 127        |
| 3.3  | <i>Péptido TmP(Gal)<sub>2</sub></i> .....   | 127        |
| 3.4  | <i>Péptido TmP(NAG)<sub>2</sub></i> .....   | 127        |
| 3.5  | <i>Péptido TmP(Glu)<sub>2</sub></i> .....   | 128        |
| 3.6  | <i>Péptido TmP(Man<sub>3</sub>)<sub>2</sub></i> .....                                     | 128        |
| 3.7  | <i>Péptido TmP(Acetona)<sub>2</sub></i> .....   | 128        |
| 4.   | Procedimiento general para el dicroísmo circular.....                                     | 129        |
| 5.   | Medidas de RMN .....  | 129        |
| 6.   | Líneas celulares y cultivo.....   | 130        |
| 7.   | Viabilidad celular: Ensayo MTT.....   | 130        |
| 8.   | Protocolo general para la citometría de flujo .....                                       | 130        |
| 9.   | Experimentos <i>in vivo</i> en peces cebra.....   | 131        |
| 10.  | Caracterización peptídica .....   | 132        |
| <b>Sección Experimental, Capítulo II.....</b>  |   | <b>139</b> |
| 1.   | Figuras de apoyo .....  | 141        |
| 2.   | Materiales, instrumentación y métodos.....  | 144        |
| 3.   | Síntesis y caracterización del conector di-alcoxiamina.....                               | 145        |
| 3.1  | <i>Compuesto 14</i> .....   | 145        |
| 3.2  | <i>Compuesto 2</i> .....  | 146        |
| 4.   | Síntesis peptídica.....   | 147        |
| 4.1  | <i>Protocolos generales</i> .....   | 147        |
| 4.2  | <i>Péptido TmP(Glu)<sub>4</sub></i> .....   | 148        |
| 4.3  | <i>Péptido TmP(Gal)<sub>4</sub></i> .....   | 148        |
| 4.4  | <i>Péptido TmP(Man)<sub>4</sub></i> .....   | 149        |
| 4.5  | <i>Péptido TmP(Glu)<sub>6</sub></i> .....   | 149        |
| 4.6  | <i>Péptido TmP(Gal)<sub>6</sub></i> .....   | 149        |
| 4.7  | <i>Péptido TmP(Man)<sub>6</sub></i> .....   | 150        |

|   |  |            |
|---|--|------------|
| 4.8   | <i>Péptido TmR<sub>8</sub></i> .....   | 150        |
| 5.  | Procedimiento general para el dicroísmo circular.....  | 150        |
| 6.  | Líneas celulares y cultivos .....  | 151        |
| 7.  | Viabilidad celular: Ensayo MTT.....  | 151        |
| 8.  | Protocolo general para la citometría de flujo .....  | 152        |
| 9.  | Experimentos <i>in vivo</i> en modelos de ratón.....   | 152        |
| 10.   | Caracterización peptídica .....  | 153        |
| <b>Sección Experimental, Capítulo III .....</b> |  | <b>161</b> |
| 1.  | Materiales, instrumentación y métodos.....   | 163        |
| 2.  | Síntesis y caracterización peptídica.....  | 164        |
| 2.1   | <i>Compuesto 15</i> .....  | 164        |
| 2.2   | <i>Compuesto 16</i> .....  | 165        |
| 2.3   | <i>Compuesto 4</i> .....   | 166        |
| 2.4   | <i>Protocolos generales para la SPPS para obtener los péptidos P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> y P<sub>C</sub></i> .....  | 167        |
| 2.5   | <i>Péptido P<sub>1</sub>: IELLQARK-(PEG)<sub>4</sub>-N<sub>3</sub></i> .....   | 168        |
| 2.6   | <i>Péptido P<sub>2</sub>: N<sub>3</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-IELLQAR</i> .....  | 169        |
| 2.7   | <i>Péptido P<sub>C</sub>: N<sub>3</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-ISELRSE</i> .....  | 170        |
| 3.  | Síntesis y caracterización de los conjugados péptido/[60]fullereno .....   | 171        |
| 3.1   | <i>Procedimiento general para la reacción “click” tipo SPAAC para obtener los hexa-aductos simétricos F<sub>1</sub> y F<sub>C</sub></i> .....                            | 171        |
| 3.2   | <i>Fullereno F<sub>1</sub>: C<sub>60</sub>-(IELLQARK)<sub>12</sub></i> .....   | 172        |
| 3.3   | <i>Fullereno F<sub>C</sub>: C<sub>60</sub>-(ISELRSE)<sub>12</sub></i> .....  | 175        |
| 3.4   | <i>Compuesto 8</i> .....   | 177        |
| 3.5   | <i>Compuesto 10</i> .....  | 179        |
| 3.6   | <i>Compuesto 11</i> .....  | 181        |
| 3.7   | <i>Compuesto 13</i> .....  | 183        |
| 3.8   | <i>Procedimiento general para la reacción “click” tipo SPAAC para obtener los hexa-aductos asimétricos F<sub>1</sub><sup>RB</sup> y F<sub>C</sub><sup>RB</sup></i> ..... | 185        |
| 3.9   | <i>Fullereno F<sub>1</sub><sup>RB</sup>: RB-C<sub>60</sub>-(IELLQARK)<sub>10</sub></i> .....   | 186        |
| 3.10  | <i>Fullereno F<sub>C</sub><sup>RB</sup>: RB-C<sub>60</sub>-(ISELRSE)<sub>10</sub></i> .....  | 189        |
| 4.  | Procedimiento general para los experimentos de SPR.....  | 191        |
| 4.1   | <i>Preparación de la superficie del sensor recubierta de E-selectina</i> .....   | 191        |
| 4.2   | <i>Ensayos de interacción</i> .....  | 191        |
| 4.3   | <i>Análisis cinético de la unión de sLe<sup>x</sup> y los péptidos, P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> a la E-selectina</i> ...   | 192        |
| 4.4   | <i>Análisis cinético de la unión de los fullerenos F<sub>1</sub> y F<sub>1</sub><sup>RB</sup> a la E-selectina</i> .....   | 192        |
| 4.5   | <i>Factor de mejora</i> .....  | 193        |
| 4.6   | <i>Sensogramas de los conjugados control péptido/[60]fullereno F<sub>C</sub> y F<sub>C</sub><sup>RB</sup></i> .....  | 193        |
| 5.  | Líneas celulares y cultivos .....  | 194        |
| 6.  | Protocolo general para la citometría de flujo .....  | 194        |



## Abreviaturas

|       |   |
|-------|---|
| Aa    | Aminoácido  |
| 6Ahx  | Ácido Fmoc-6-aminohexanoico   |
| Boc   | <i>tert</i> -Butiloxicarbonilo  |
| CD    | Dicroísmo circular  |
| CPPs  | Péptidos penetrantes de células   |
| DCC   | <i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida   |
| DCM   | Diclorometano   |
| DCTB  | trans-2-[3-(4- <i>tert</i> -Butilfenil)-2-metil-2-propenilideno]malononitrilo |
| DIEA  | <i>N,N</i> -Diisopropiletilamina  |
| DMAP  | 4-Dimetilaminopiridina  |
| DMEM  | Dulbecco's Modified Eagle Medium (Medio Eagle modificado por Dulbecco)        |
| DMF   | <i>N,N</i> -Dimetilformamida  |
| DMSO  | Dimetilsulfóxido  |
| DPTS  | p-toluensulfonato de piridinio  |
| EDAC  | Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida                    |
| FBS   | Suero fetal bovino  |
| Fmoc  | 9-Fluorenilmetoxicarbonil   |
| HEPES | Ácido 2-[4-(2-Hidroxi-etil)piperazin-1-il]etano-1-sulfónico                   |
| HFIP  | 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol   |
| HKR   | Buffer HEPES-Krebs-Ringer   |
| Hz    | Hertz   |
| Mtt   | 4-Metiltritilo  |
| MTT   | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.                  |

|                 |   |
|-----------------|---|
| N-HATU          | Hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]piridin-1-il-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamino |
| N-HBTU          | Hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(1H-benzotriazol-1-il)dimetilamino-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamino                           |
| Pbf             | 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo  |
| PEG             | Polietilenglicol  |
| PFP             | 2,3,4,5,6-pentafluorofenol  |
| RMN             | Resonancia Magnética Nuclear  |
| SPPS            | Síntesis peptídica en fase sólida   |
| Sulfo-NHS       | <i>N</i> -hidroxisulfosuccinimida   |
| TAMRA           | Éster <i>N</i> -succidiminílico del 5(6)-carboxitetrametilrodamina  |
| 5-TAMRA         | Éster <i>N</i> -succidiminílico del 5-carboxitetrametilrodamina   |
| <sup>t</sup> Bu | <i>tert</i> -Butil  |
| TFA             | Ácido trifluoroacético  |
| TFE             | Trifluoroetanol   |
| TIS             | Triisopropilsilano  |
| TNBS            | Ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico  |
| Trt             | Tritil  |

## Resumen

En el siglo XVIII, la “química moderna” centró gran parte de sus esfuerzos en la síntesis de nuevas moléculas mediante la formación de enlaces covalentes, sin embargo, la obtención de moléculas de gran tamaño y complejidad resultaba imposible mediante esta aproximación clásica. Por este motivo, la química sintética necesitaba avanzar hacia el desarrollo de entidades químicas complejas con funciones específicas, instante en el que la química supramolecular empieza a adquirir un especial interés. En 1978, el premio Nobel Jean-Marie Lehn definió por primera vez este nuevo campo como “la química de los enlaces intermoleculares” ya que se centra en el estudio de las interacciones débiles no-covalentes y reversibles entre las moléculas. La química supramolecular abarca conceptos como el autoensamblaje o el reconocimiento molecular (química anfitrión-huésped) y emplea, para la construcción de estas complejas estructuras, herramientas de gran utilidad como la química covalente dinámica. La gestación y crecimiento de todo este conocimiento ha permitido desde el desarrollo de increíbles arquitecturas supramoleculares capaces de reconocer sustratos con una elevada afinidad, pasando por complejas cajas de coordinación o cápsulas autoensambladas hasta el actual desarrollo de las conocidas como máquinas moleculares reconocidas con el premio Nobel de química 2016 a B. L. Feringa, J. P. Sauvage, y J. F. Stoddart.

El avance hacia nuevas tecnologías terapéuticas requiere que los fármacos y compuestos biológicamente activos sean liberados en el interior celular para ejercer su función en el citoplasma, en el núcleo o en otros orgánulos específicos. Sin embargo, la membrana plasmática actúa como una barrera hidrofóbica semipermeable que impide el paso de las macromoléculas exógenas. En esta evolución, la química supramolecular ha jugado un papel fundamental consiguiendo satisfacer las necesidades científicas del momento aportando novedosos sistemas de bioconjugación, liberación y transporte de fármacos, aumentando su internalización celular y permitiendo que los agentes terapéuticos alcancen sus dianas intracelulares. Entre algunos de estos materiales sintéticos destacan: los liposomas, los polímeros o las nanopartículas, sin embargo, en los últimos años, los Péptidos Penetrantes de Células (CPPs) han surgido como una alternativa prometedora para la internalización efectiva y transporte al interior celular. Estas moléculas consisten en pequeñas secuencias peptídicas altamente ricas en residuos básicos catiónicos, en algunas ocasiones, combinadas con características hidrofóbicas y que han mostrado una alta capacidad de penetración a través de la membrana plasmática. Los hallazgos iniciales del péptido TAT del VIH-1 y de Penetratina-1 del homeodominio de Antennapedia, comenzaban a demostrar el potencial de los CPPs, y permitieron el uso del conocimiento observado en estas proteínas naturales para expandir este nuevo y prometedor campo hacia numerosas estructuras sintéticas con propiedades translocantes como las poliargininas ( $R_n$ ), Pep-1, MPG, o diferentes estructuras ricas en grupos guanidino como glicósidos, PNAs o estructuras dendríticas no peptídicas.

Hoy en día, el nombre de CPPs designa una gran superfamilia de péptidos que difieren en sus propiedades físicas, químicas o biológicas, así como en su longitud, carga, hidrofobicidad, flexibilidad y solubilidad. Se han realizado detalladas taxonomías de las diferentes CPPs y se han podido clasificar según su origen y naturaleza (naturales, sintéticos o quiméricos) o según sus propiedades físico-químicas (catiónicos, hidrofóbicos o anfipáticos). Nuestro grupo de investigación ha contribuido a ampliar y mejorar esta quimioteca de CPPs dotando diversas estructuras catiónicas o péptidos anfífilicos pseudo-helicoidales con grupos alcoxiamina o

hidrazida para unir diferentes ligandos aldehídos y conseguir de forma sencilla la modulación de las propiedades de un CPP modelo. Mediante esta química dinámica, que emplea uniones tipo oxima o hidrazona, se han acoplado distintos electrófilos hidrofóbicos e hidrofílicos, o incluso ligandos tipo carbohidrato.

Irremediablemente, debido a sus capacidades penetrantes sin precedentes, los CPPs han resultado ser unos vectores con gran potencial para el transporte de cargos biológicamente activos convirtiéndose en una de sus principales aplicaciones. La naturaleza de los cargos transportados es muy variada y engloba proteínas, anticuerpos, ácidos nucleicos (ADN, ARN, siARN, APNs, plásmidos, oligonucleótidos), fluoróforos o agentes de contraste entre otros. La unión covalente CPP-cargo se ha empleado tradicionalmente para la preparación de transportadores intracelulares de fármacos, sin embargo, nuestro grupo de investigación ha demostrado que las metodologías supramoleculares poseen grandes beneficios en la liberación del cargo y la reducción de esfuerzo sintético. De esta forma, se han sintetizado diversas estructuras peptídicas ricas en aminoácidos de arginina que contienen ligandos carbohidrato para el transporte selectivo de determinadas proteínas como la Concanavalina A o con colas hidrofóbicas unidas mediante enlaces hidrazona para el transporte de plásmidos o de la proteína CRISPR/Cas9 al interior celular. A pesar de todo el éxito cosechado, debido a su capacidad penetrante y su habilidad para poder transportar distintos cargos al interior celular, hoy en día, continuas ideas, avances y estrategias se siguen desarrollando para superar algunas de las limitaciones que presentan. De manera general cabe destacar su inestabilidad o baja resistencia frente a la digestión enzimática, su baja selectividad y una alta toxicidad asociada a su carácter altamente catiónico.

Es inexorable negar, la importancia y la constante presencia, directa o indirecta, que cobran a lo largo de este manuscrito las interacciones de reconocimiento molecular, en concreto, las conexiones proteína-carbohidrato. Las interacciones reversibles entre los carbohidratos y sus receptores están ampliamente involucradas en muchos procesos biológicos y patológicos, que van desde la comunicación celular hasta la metástasis tumoral. Las células tumorales muestran una amplia gama de alteraciones de glicosilación en comparación con sus equivalentes sanas. La existencia de esta diferenciación en los patrones de glicosidación conduce a una regulación distinta de la segregación intracelular, la localización y el recambio de receptores. Entre algunas de las principales proteínas de unión a carbohidratos podemos destacar las lectinas de tipo C (DC-SIGN), lectinas SIGLEC como el receptor CD22, galectinas, o la familia de las selectinas. Por este motivo, la conjugación de carbohidratos a diferentes estructuras portadoras de fármacos dirigidos al cáncer para la entrega celular selectiva como, por ejemplo, dendrímeros, liposomas o fullerenos entre otras arquitecturas químicas, ha recibido una atención creciente en los últimos años. Además, la posibilidad de contar con múltiples grupos glicósido en un mismo andamio estructural da lugar a una capacidad de unión mejorada con sus respectivos receptores diana, lo que se conoce como interacciones multivalentes o efecto clúster.

En este primer capítulo, hemos empleado estrategias supramoleculares para la bioconjugación de ligandos carbohidrato de interés, a través de enlaces dinámicos reversibles tipo oxima sensibles al pH, a una plantilla peptídica común con características penetrantes para el desarrollo de futuros vehículos de transporte de múltiples cargos. Esta aproximación genera una estrategia sencilla, rápida y con rendimientos cuantitativos para la conexión CPP-carbohidratos, en concreto, a cada molde peptídico marcado fluorescente con TAMRA (Tm), se unieron dos unidades de  $\alpha$ -D-manosa,  $\beta$ -D-glucosa, *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina,  $\beta$ -D-galactosa

o un aldehído trisacárido ramificado de  $\alpha$ -D-manosa generando péptidos penetrantes de células glicosilados (GCPPs) con una estructura general  $\text{TmP}(X)_2$ , donde  $X = \text{Man, Glu, NAG, Gal y Man}_3$  respectivamente. El planteamiento teórico inicial en el que una secuencia peptídica lineal sería capaz de plegarse para la obtención de una estructura helicoidal fue posteriormente contrastado mediante dicroísmo circular y medidas de espectroscopía de RMN que arrojó información de su estructura interna en donde los dominios de arginina y leucina se encuentran orientados en lados opuestos del eje longitudinal helicoidal en cuya interfase entre ambos dominios se encuentran los residuos de lisina modificados con grupos alcoxiamina. Además, a lo largo de este capítulo, se ha realizado una evaluación de la internalización celular mediante microscopía y citometría en diferentes líneas celulares (HeLa, A549, HepG2, Raw264.7, Vero, HCT116). Los diferentes glicanos mostraron un fuerte impacto en la internalización de estructuras peptídicas similares y son capaces de modular la eficiencia de captación y la citotoxicidad. Además, se ha demostrado que la tendencia de internalización de los híbridos de glicopéptidos no cambia con las líneas celulares analizadas y que la capacidad de penetración de la estructura peptídica sigue dominando su internalización. Para completar este capítulo, se investigó el comportamiento *in vivo* y la distribución de los glicopéptidos  $\text{TmP}(\text{Gal})_2$  y  $\text{TmP}(\text{Man}_3)_2$  en modelos de animales de peces cebra. Se observó una internalización sin efectos tóxicos significativos sobre la supervivencia larval, la fluorescencia se localizó principalmente en la yema, aunque se detectó una biodistribución débil a lo largo del cuerpo. Además, se distinguieron algunas diferencias en los patrones de fluorescencia, en concreto,  $\text{TmP}(\text{Gal})_2$  se localizó específicamente en la región olfativa del pez cebra. A diferencia de lo observado con los glicopéptidos anteriores, el péptido control hidrofóbico,  $\text{TmP}(\text{Acetona})_2$ , mostró una fuerte internalización en la yema, pero sin la capacidad de abandonarla, es decir de expandirse o biodistribuirse a lo largo del pez cebra unido a una mortalidad muy fuerte, incluso en tiempos cortos.

En el segundo capítulo, la necesidad de mejorar los CPPs como vehículos de transporte más efectivos, nos ha impulsado a desarrollar un nuevo conector bencílico di-alcoxiamina que nos permite aumentar el número de carbohidratos sin alterar la estrategia glicopeptídica diseñada inicialmente y manteniendo la sencillez sintética que nos aporta la química de las oximas. Mediante esta estrategia se han sintetizado estructuras tipo  $\text{TmP}(X)_Z$  que contienen  $\alpha$ -D-manosa,  $\beta$ -D-glucosa, y  $\beta$ -D-galactosa ( $X = \text{Man, Glu o Gal}$ ) y con un número total de cuatro o seis carbohidratos ( $Z = 4 \text{ o } 6$ ). Estos nuevos CPPs altamente glicosilados vieron reducida su eficacia de internalización respecto a sus homólogos con dos carbohidratos descritos en el capítulo anterior. Sorprendentemente, se descubrió que una sustitución de cuatro a seis sacáridos no disminuía la eficiencia de captación en las células, adquirieron valores similares a CPPs de referencia como la octa-arginina, sin embargo, mejoraba significativamente el perfil de toxicidad de los soportes peptídicos. En particular, la sustitución por glucosa se confirmó como un escudo de carbohidratos óptimo con una excelente internalización *in vitro* y localización intracelular, así como una excelente biodistribución *in vivo*. Estos resultados apoyan el potencial de la funcionalización de péptidos con carbohidratos, y en particular la inserción de glucosa, para la mejora del perfil de captación/toxicidad de péptidos penetrantes celulares cortos.

Los eventos de reconocimiento proteína-carbohidrato siguen detrás de procesos biológicos como el desarrollo metastásico. La metástasis es el proceso de propagación, reproducción y extensión de un foco cancerígeno a un órgano o tejido distinto de aquel en el que fue iniciado. Durante este proceso las células tumorales adquieren la capacidad de penetrar en los vasos

sanguíneos y linfáticos, viajar a través de la circulación sanguínea y una vez fuera son capaces de proliferar en tejidos sanos de otra parte del cuerpo. Una de las etapas principales del proceso de metástasis es el reconocimiento molecular a través de interacciones multivalentes ligando-receptor entre las células tumorales del flujo sanguíneo y las células endoteliales de tejidos alejados del foco principal del tumor, en particular, las interacciones entre oligosacáridos sialilados ( $sLe^X$  y  $sLe^A$ ) sobreexpresados en células tumorales circulantes y entre las proteínas de membrana de la familia de las selectinas (P-, L- y E-selectina). Por lo tanto, el desarrollo de ligandos específicos de alta afinidad para las selectinas constituye un objetivo primordial para el desarrollo de estrategias de bloqueo de la adhesión tumoral. Sin embargo, la compleja síntesis química de estos oligosacáridos y/o sustitutos eficientes dificulta el potencial desarrollo de nuevos agentes terapéuticos o de diagnóstico. Recientemente, a través de la técnica “phage-display”, que realiza un secreeening para reconocer secuencias que interaccionan con la E-selectina, se logró identificar un péptido simple con una secuencia lineal de siete aminoácidos (Ile-Glu-Leu-Leu-Gln-Ala-Arg) denominado IELLQAR que interacciona específicamente con la E-selectina, demostrando que por sí solo, inhibe la metástasis dependiente de  $sLe^X$ .

Con estos precedentes, el tercer y último capítulo de la tesis se ha centrado en el desarrollo de nuevas plataformas multivalentes híbridas con sustitutos peptídicos más sencillos y viables (IELLQAR) que mimetizan la función de los ligandos naturales ( $sLe^X$  o  $sLe^A$ ) y que presentan la misma capacidad de interaccionar con gran afinidad con sus receptores proteicos correspondientes. Entre las diferentes plataformas disponibles, el hexa-aducto del fullereno  $C_{60}$  con geometría Th octaédrica ha mostrado un gran potencial como andamio nanocarbónico globular para la presentación tridimensional multivalente de diferentes ligandos. En este capítulo se describe la primera síntesis del hexa-aducto péptido/[60]fullereno altamente funcionalizado en las tres dimensiones mediante la combinación de la síntesis de péptidos en fase sólida y la química de “click” tipo SPAAC. El aducto de fullereno final ( $F_1$ ) está dotado de 12 subunidades peptídicas que fueron reconocidas específicamente por el receptor proteico. También se sintetizó un aducto asimétrico  $A_{10}B$  marcado fluorescentemente con una sonda de Rodamina B ( $F_1^{RB}$ ). Los experimentos de SPR confirmaron la unión multivalente específica a la E-selectina, que también fue validada en modelos de células vivas. Esta estrategia valida el potencial de los conjugados de [60]fullereno para la presentación multivalente de ligandos peptídicos con información específica para el reconocimiento de proteínas.

## Objetivos generales

La investigación química tiene como objetivos comprender y conocer nuevos conceptos hasta ahora desconocidos y desarrollar nuevas herramientas que permitan la resolución de diferentes problemas. Uno de los principales retos de la química, la biología y la medicina es el desarrollo de nuevas terapias, vacunas y fármacos innovadores que permitan resultados efectivos contra las distintas patologías y abra la puerta a una nueva era científica que de lugar a la mejora de la calidad de vida y un aumento de la longevidad de la población. La administración de fármacos contra estas enfermedades genéticas, autoinmunes, infecciosas o metabólicas se encuentra, en muchas ocasiones, con limitaciones en su transporte al interior de la célula lo que dificulta enormemente su aplicabilidad. La membrana celular regula el intercambio de moléculas e información con el entorno externo y actúa como una barrera semipermeable que impide el paso de macromoléculas exógenas. En este proceso, las interacciones proteína-carbohidrato cobran especial importancia y están involucradas en muchos procesos biológicos y patológicos, desde la comunicación celular hasta la metástasis tumoral.

En esta tesis doctoral, uno de los principales objetivos es intentar abordar el problema de la entrega celular desarrollando nuevos glico-vehículos sintéticos basados en CPPs (Péptidos Penetrantes de Células) capaces de atravesar la membrana plasmática y hacerse paso hasta el citosol con gran eficacia y minimizando sus efectos adversos o citotóxicos. Dentro de este primer bloque que integran los capítulos I y II, se llevarán a cabo diferentes sub-objetivos como la bio-conjugación de la región peptídica con los dominios carbohidrato a través de enlaces oxima, la síntesis de nuevos conectores alcoxiamina, el desarrollo de péptidos altamente glicosilados, la evaluación *in vitro* de sus propiedades de penetración o el análisis del perfil de biodistribución *in vivo* en modelos simples. La consecuencia de todos estos objetivos tiene la finalidad de construir una gran familia de CPPs glicosilados con propiedades mejoradas.

Por otro lado, el segundo gran bloque de esta tesis doctoral, comprendido por el capítulo III, tiene el objetivo de desarrollar nuevos materiales multivalentes capaces de participar en procesos proteína-carbohidrato como los implicados en la metástasis del cáncer. Para ello se pretende combinar la síntesis peptídica con la química de los fullerenos[60] para dar lugar a nuevos conjugados tridimensionales con resultados prometedores en el reconocimiento de E-selectina. Se pretende estudiar la interacción de estas nuevas arquitecturas 3D mediante técnicas de SPR y evaluar su comportamiento *in vitro* en célula viva.

Por lo tanto, el desarrollo de nuevos materiales orgánicos híbridos que alcancen sus dianas intracelulares y que sean capaces de controlar los eventos de reconocimiento molecular ligando-receptor, lo que les proporcionará una alta selectividad y especificidad, representa un gran reto para el desarrollo de la próxima generación de terapias y métodos de diagnóstico.



# Introducción I



## 1. Química supramolecular

En la historia de la ciencia, desde la alquimia en la antigüedad, uno de los principales retos de la química ha sido entender y emular las transformaciones llevadas a cabo en los organismos vivos. En el siglo XVIII, el cual puede considerarse el nacimiento de la "química moderna", todos los esfuerzos se centraron en la síntesis de moléculas mediante la formación de enlaces covalentes. Sin embargo, la obtención de moléculas con estructuras de gran tamaño y complejidad resultaba imposible mediante esta aproximación clásica de construir todas las conexiones a través de uniones covalentes.<sup>1</sup> Con el desarrollo de campos como la bioquímica o la biología molecular, la química sintética necesitaba avanzar hacia el desarrollo de entidades químicas complejas con funciones específicas.<sup>2</sup> Teniendo en cuenta la escala de tiempo durante la que la evolución ha perfeccionado su maquinaria biológica, la "joven" ciencia química todavía tiene un largo camino que recorrer para intentar aproximarse al nivel de sofisticación y complejidad que se observa en la mayoría de los sistemas biológicos.

Por esta razón, el interés en el campo de la química supramolecular ha aumentado considerablemente. Como su nombre indica, es un dominio de la química que hace referencia a los sistemas químicos compuestos de un número discreto de moléculas<sup>3</sup>: mientras que la química tradicional se centra en el enlace covalente, la química supramolecular examina las interacciones débiles no-covalentes y reversibles entre las moléculas.<sup>4</sup> En 1873, J. D. van der Waals estableció por primera vez la existencia de fuerzas intermoleculares.<sup>5</sup> Poco después, E. Fischer sugirió las uniones enzima-sustrato (modelo de llave-cerradura) como interacciones débiles, fundamentos del reconocimiento molecular o química anfitrión-huésped.<sup>6</sup> A principios del siglo XX, Latimer y Rodebush describieron el enlace de hidrógeno, aportando grandes progresos a esta nueva familia en expansión de las interacciones no-covalentes.<sup>7</sup> El uso de estos nuevos conocimientos permitió grandes avances: como la estructura de doble hélice de la cadena de ADN<sup>8,9,10</sup>, la estructura secundaria de las proteínas (hélice-alfa o lámina beta),<sup>11</sup> así como el descubrimiento de otras fuerzas intermoleculares débiles como las interacciones  $\pi$ - $\pi$ , ion-dipolo, dipolo-dipolo o los efectos electrostáticos.<sup>12</sup> En la década de 1960, se produjo el gran empuje de este campo con los trabajos de C. J. Pedersen, D. J. Cram y J. M. Lehn sobre receptores macrocíclicos selectivos de iones. A lo largo de las décadas siguientes, la química supramolecular se volvió aún más sofisticada, desarrollando estructuras altamente complejas.<sup>13</sup>

La química supramolecular incluye conceptos importantes como el autoensamblaje o el reconocimiento molecular (química anfitrión-huésped), y emplea, para la construcción de estas complejas arquitecturas, herramientas de gran utilidad como la química covalente dinámica. El

<sup>1</sup> K. C. Nicolaou, *Isr. J. Chem.*, **2018**, 58, 104-113.

<sup>2</sup> J. M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 2836-2850.

<sup>3</sup> J. M. Lehn, *Science*, **1993**, 260, 1762-1763.

<sup>4</sup> H. J. Schneider, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2009**, 48, 3924-3977.

<sup>5</sup> J. D. van der Waals, *On the Continuity of the Gaseous and Liquid States* (Tesis), Universiteit Leiden, (1873).

<sup>6</sup> E. Fischer, *Ber. Deutsch. Ges.*, **1894**, 27, 2985-2993.

<sup>7</sup> W. M. Latimer, W. H. Rodebush, *J. Am. Chem. Soc.*, **1920**, 42, 1419-1433.

<sup>8</sup> J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **1953**, 171, 737-738.

<sup>9</sup> M. H. F. Wilkins, A. R. Stokes, H. R. Wilson, *Nature*, **1953**, 171, 738-740.

<sup>10</sup> R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature*, **1953**, 171, 740-741.

<sup>11</sup> L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, *Proc Natl Acad Sci USA*, **1951**, 37, 205-211.

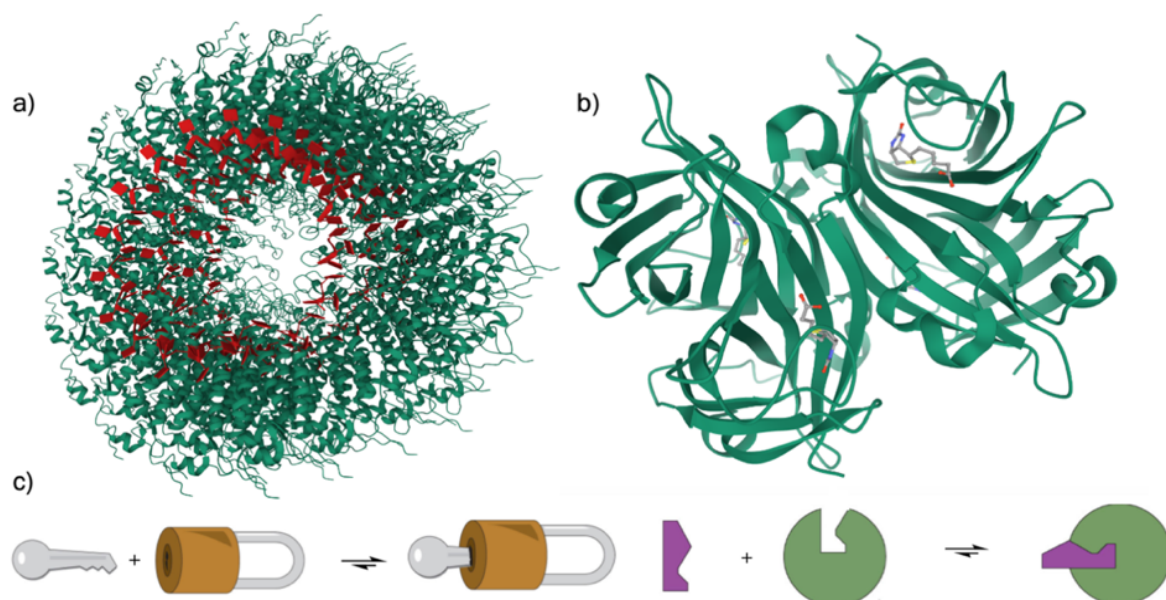
<sup>12</sup> F. Biedermann, H. J. Schneider, *Chem. Rev.*, **2016**, 116, 5216-5300.

<sup>13</sup> M. J. Webber, E. A. Appel, E. W. Meijer, R. Langer, *Nat. Mater.*, **2016**, 15, 13-26.

estudio de las interacciones no-covalentes es crucial para comprender muchos procesos biológicos que dependen de estas fuerzas para su estructura y función. Los sistemas biológicos son a menudo la inspiración para la investigación supramolecular.

## 1.1 Autoensamblaje molecular

En general, se podría decir que los conceptos de autoensamblaje y reconocimiento molecular son los dos pilares fundamentales sobre los que descansa el campo de la química supramolecular. Para que dos moléculas den lugar a una especie supramolecular, deben tener grupos complementarios, que estén localizados apropiadamente en la superficie de contacto entre ambos o, lo que es lo mismo, que estén topológicamente pre-organizados para que dicha interacción entre unidades complementarias puede eventualmente ocurrir. Aunque ambas ideas incluyen implícitamente el concepto de reconocimiento o interacción que tiene lugar entre dos especies, el autoensamblaje molecular es la construcción de sistemas que, por lo general, abarcan un mayor número de moléculas que interactúan simultáneamente entre sí a través de interacciones no covalentes, independientemente de sus tamaños, y que generan sistemas normalmente más complejos (**Fig. 1a**).



**Figura 1.** a) Virus del mosaico del Tabaco como ejemplo de autoensamblaje donde una sola cadena de ARN (rojo) guía el ordenamiento de más de 2000 unidades de proteínas a su alrededor (verde), PDB ID: 2TMV.<sup>14</sup> b) Complejo de estreptavidina-biotina, PDB ID: 1STP.<sup>15</sup> c) Representación esquemática del modelo de llave-cerradura.

El autoensamblaje, podría subdividirse en autoensamblaje intermolecular e intramolecular o plegado molecular.<sup>16</sup> Respecto a este último concepto, es importante destacar los foldámeros (plegómero o tiligómero),<sup>17</sup> estructuras moleculares artificiales diseñadas para autoplegarse específicamente hacia un estado ordenado, destacan especialmente aquellos en los que el

<sup>14</sup> K. Namba, G. Stuubs, *Science*, **1986**, 231, 1401-1406.

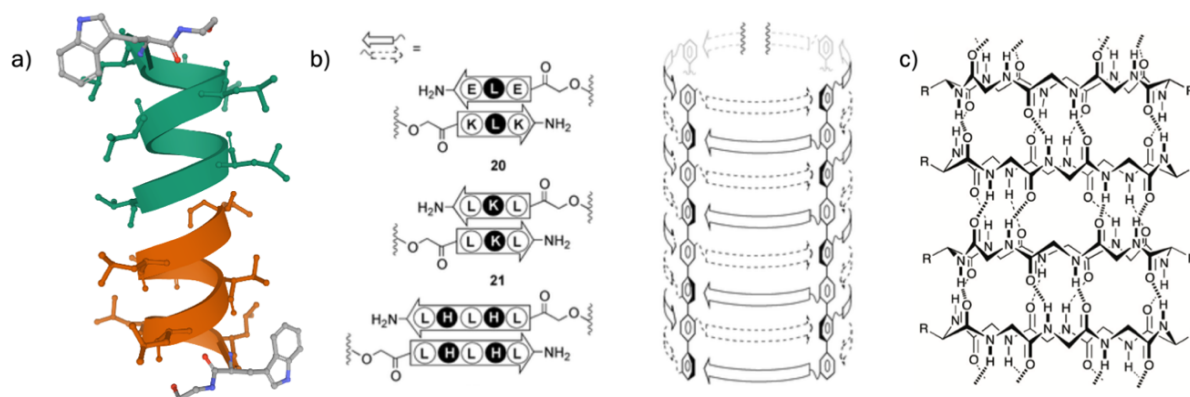
<sup>15</sup> P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science*, **1989**, 243, 85-88.

<sup>16</sup> K. Ariga, J. P. Hill, M. V. Lee, A. Vinu, R. Charvet, S. Acharya, *Science and Technology of Advanced Materials*, **2008**, 9, 014109.

<sup>17</sup> D. J. Hill, M. J. Mio, R. B. Prince, T. S. Hughes, J. S. Moore, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 12, 3893-4012.

plegamiento genera una estructura tubular final con una cavidad. Algunos ejemplos son las hélices lineales basadas en  $\beta$ - y  $\gamma$ -péptidos,<sup>18</sup> en el ácido fólico<sup>19</sup> o foldámeros aromáticos.<sup>20</sup>

Dentro del campo del autoensamblaje intermolecular, cabe resaltar la construcción de agregados solubles utilizando interacciones no covalentes entre derivados del ácido cianúrico y la melanina.<sup>21</sup> Los diseños de polibisfenoles *para*-conectados, decorados con otros grupos en la posición 2 y 5 del anillo, que pueden ensamblarse para dar lugar a una cavidad interna, desarrollados por el profesor Stefan Matile (**Fig. 2b**).<sup>22</sup> Otra aproximación son los nanotubos peptídicos, el grupo de M. R. Ghadiri fue pionero en la síntesis de un octapéptido cíclico *c*-[(L-Gln-D-Ala-L-Glu-D-Ala)<sub>2</sub>] donde se alternaron  $\alpha$ -aminoácidos de quiralidad opuesta (D,L- $\alpha$ -CPs) de tal forma que cada tubo está formado por el apilamiento de unidades cíclicas mediante enlaces de hidrógeno (**Fig. 2c**).<sup>23</sup> Mientras que se iban descubriendo las propiedades de autoensamblaje de los D,L- $\alpha$ -CPs, quedaba patente que no eran buenos candidatos a la hora de intentar modular las condiciones internas del nanotubo. Para solucionar estas limitaciones, el grupo de J. R. Granja desarrolló una nueva familia de péptidos cíclicos, denominados  $\alpha,\gamma$ -CPs, que proporcionaban nuevas oportunidades de funcionalización tanto en la superficie interna como externa del nanotubo.<sup>24,25</sup>



**Figura 2.** a) Aproximaciones moleculares basadas en foldámeros lineares que se pliegan dando lugar a estructuras helicoidales con cavidades internas. Estructura secundaria y autoensamblaje de la Gramicidina A considerada la inspiración biológica de este tipo de nanotubos PDB ID: 1GRM,<sup>26</sup> b) octiphenylenos de Matile<sup>22</sup> c) estructura tubular basada en el apilamiento de péptidos cíclicos.<sup>23</sup> Figura adaptada con permisos de la Ref. 22 Copyright 2008 American Chemical Society y de la Ref 23 Copyright 1993 Springer Nature.

## 1.2 Reconocimiento molecular o química anfitrión-huésped

El reconocimiento molecular es la unión específica de una molécula huésped a su sitio de unión complementario para formar un complejo anfitrión-huésped. De nuevo, las moléculas

<sup>18</sup> I. Huc, H. Jiang, "Organic foldamers and helices". *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*. Eds. P. A. Gale, J. W. Steed, John Wiley & Sons. Chichester, **2012**.

<sup>19</sup> Y. Zhao, Z. J. Zhong, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17894-17901.

<sup>20</sup> D. W. Zhang, X. Zhao, Z. T. Li, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, 1961-1970.

<sup>21</sup> E. E. Simanek, X. Li, I. S. Choi, G. M. Whitesides, *Compr. Supramol. Chem.*, **1996**, *9*, 595-621.

<sup>22</sup> N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 1354-1365.

<sup>23</sup> M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee and N. Khazanovich, *Nature*, **1993**, *366*, 324-327.

<sup>24</sup> M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 2844-2845.

<sup>25</sup> N. R. Vázquez, M. Amorín, J. R. Granja, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 4490-4505.

<sup>26</sup> D. A. Kelkar, A. Chattopadhyay, *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1768*, 2011-2025.

son capaces de identificarse unas a otras mediante interacciones no-covalentes.<sup>27</sup> Un claro ejemplo de este tipo de interacción es el reconocimiento entre la biotina y la estreptavidina (**Fig. 1b**)<sup>28</sup> o los procesos catalíticos naturales entre enzimas y sus sustratos específicos. En este caso, la información codificada en el sitio de unión del anfitrión (geometría, dimensiones, y grupos funcionales expuestos) restringe el tipo de huésped que es capaz de reconocer, siendo procesos, en la mayoría de los casos, altamente selectivos.<sup>29</sup> Un concepto que explica de manera concreta el reconocimiento molecular es el modelo de llave-cerradura (**Fig. 1c**) propuesto en 1894 por E. Fisher, donde ambos, la enzima y el sustrato presentan formas geométricas complementarias que se ajustan exactamente una a la otra,<sup>6</sup> y que ha servido como fundamento para los diseños de los primeros receptores moleculares.<sup>30</sup>

Tal y como se ha descrito anteriormente, se considera que el nacimiento de la química supramolecular moderna ocurrió con los trabajos de C. J. Pedersen., D. J. Cram y J. M. Lehn sobre el descubrimiento de moléculas macrocíclicas capaces de encapsular iones metálicos del grupo I y II. En 1967, C. J. Pedersen fue pionero en el descubrimiento del dibenzo-18-corona-6 y otros poliéteres los cuales denominó éteres corona (**Fig. 3a**).<sup>31</sup> Estos macrociclos mostraron una directa dependencia entre el tamaño de su cavidad interna y el tipo de ion alcalino o alcalinotérreo con el cual interactuaban.<sup>31</sup> Continuando la línea empezada por Pedersen, J. M. Lehn profundizó en el estudio de este tipo de estructuras, proporcionándoles tridimensionalidad, a las cuales denominó criptandos (**Fig. 3b**) debido al mejor confinamiento de los iones metálicos en su interior.<sup>32,33</sup> En el mismo camino, D. Cram describió una nueva familia de moléculas a las que acuñó como esferandos, estos receptores tridimensionales de alta rigidez, contienen anillos aromáticos derivados del óxido de etileno que se alternan por encima y por debajo del plano formando una esfera.<sup>34</sup> Estos tres autores fueron galardonados con el Premio Nobel de química en 1987. Posteriormente a estos trabajos, se desarrollaron nuevos ciclos capaces de complejar moléculas apolares en su interior hidrofóbico conocidos como ciclofanos.<sup>35</sup> Dentro de este grupo requieren una mención especial las ciclodextrinas,<sup>36</sup> los pillar[n]arenos,<sup>37</sup> y los cucurbit[n]urilos.<sup>38</sup>

A medida que fue avanzando el conocimiento en este campo, las ventajas de afinidad y especificidad del confinamiento de un sustrato dentro de una estructura receptora, completamente protegida del entorno externo, parecían beneficiosas en comparación con estructuras más abiertas. En esta línea, D. Cram promovió un nuevo concepto en el campo de la química supramolecular, al que denominó cavitandos, donde una molécula cóncava que formaba una cavidad protegida, abierta solo por un extremo, podía encapsular determinadas

<sup>27</sup> J.M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1990**, 29, 1304–1319.

<sup>28</sup> N. M. Green, *Methods Enzymol.*, **1990**, 184, 51-67.

<sup>29</sup> J. Pleiss, *ChemCatChem*, **2014**, 6, 944-950.

<sup>30</sup> J. M. Lehn, *Science*, **1986**, 227, 849-856

<sup>31</sup> C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 7017-7036.

<sup>32</sup> B. Dietrich, J.-M. Lehn, J. P. Sauvage, *Tetrahedron Lett.*, **1969**, 10, 2885-2888.

<sup>33</sup> B. Dietrich, J.-M. Lehn, J. P. Sauvage, *Tetrahedron Lett.*, **1969**, 10, 2889-2892.

<sup>34</sup> D. J. Cram, T. Kaneda, T. R. C. Helgeson, G. M. Lein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 6752- 6754.

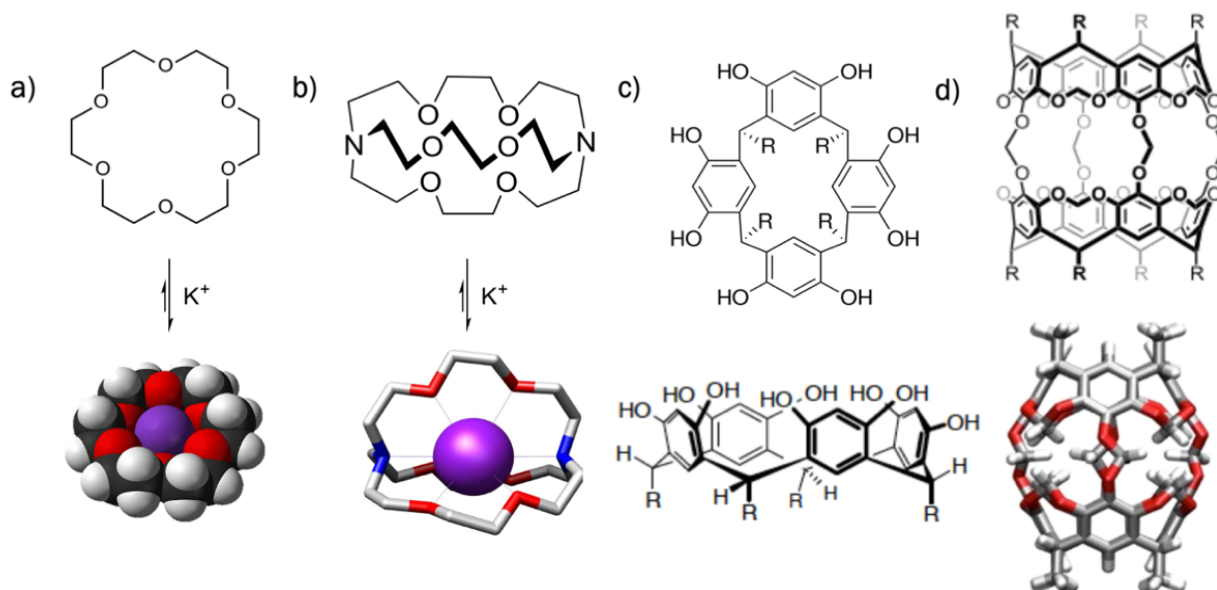
<sup>35</sup> K. Odashima, A. Itai, Y. Iitaka, K. Koga, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 2504-2505.

<sup>36</sup> B. V. K. J. Schmidt, C. Barnerr-Kowollik, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2017**, 56, 8350-8369.

<sup>37</sup> T. Ogoshi, S. Kanai, S. Fujinami, T. Yamagishi, Y. Nakamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 5022-5023.

<sup>38</sup> R. Behrend, E. Meyer, F. I. Rusche, Ueber Condensationsproducte aus Glycoluril und Formaldehyd. (Tesis), Heidelberg University, Heidelberg, (**1905**). W. A. Freeman, W. L. Mock, N. Y. Shih, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 7367-7368.

moléculas de interés. Entre ellos, cabe destacar los macrociclos de calix[n]arenos y resorcin[n]arenos (**Fig. 3c**) basados en un producto de hidroxialquilación de un aldehído y un fenol o resorcinol respectivamente.<sup>39</sup> Llevando este concepto un paso más allá, D. Cram describió por primera vez una molécula polimacrocíclica que rodeaba completamente a una más pequeña.<sup>40,41</sup> Esta aproximación estaba basada en la condensación entre dos unidades de resorcin[4]areno en la presencia del ligando a encapsular, el cual, tras la formación del enlace covalente que unía ambas unidades, se encontraba completamente retenido en el interior de la cavidad. Estas nuevas estructuras recibieron el nombre de carcerandos (**Fig. 3d**).<sup>40,41</sup>



**Figura 3.** Ejemplo de receptores supramoleculares diseñados para reconocer diferentes tipos de ligandos: a) 18-corona-6,<sup>31</sup> b) [2.2.2]criptando y sus complejos anfitrión-huésped respectivamente,<sup>32,33</sup> c) resorcin[4]areno<sup>39</sup> y d) estructura representativa de un carcerando.<sup>40,41</sup> Figura adaptada con los permisos de la Ref. 31 Copyright 1967 American Chemical Society, Ref. 32 Copyright 1969 Elsevier, Ref. 39 Copyright 1982 American Chemical Society y de la Ref. 40 Copyright 1988 American Chemical Society.

La maduración de este campo ha hecho posible desarrollar nuevos receptores con múltiples cavidades.<sup>42</sup> El resultado se traduce en arquitecturas supramoleculares más complejas que son capaces de reconocer diferentes sustratos con exquisita afinidad. Caben destacar los análogos de metaloenzimas desarrolladas por el grupo de O. Reinaud (**Fig. 4a**),<sup>43</sup> las cajas de coordinación tetraédrica del grupo de K. Raymond,<sup>44</sup> o los trabajos pioneros de M. Fujita en el desarrollo de cajas de coordinación o capsulas autoensambladas, que presentan la ventaja de que, dependiendo del metal de transición que se emplee y del tipo de ligando que este coordine, se pueden obtener diferentes geometrías de coordinación en la cápsula final (**Fig. 4b**).<sup>45,46</sup>

<sup>39</sup> J. R. Moran, S. Karbach, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 5826-5828.

<sup>40</sup> D. Cram, S. Karbach, Y. H. Kim, L. Baczynskyj, K. Marti, R. M. Sampson, G. W. Kallemeyn, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 2554-2560.

<sup>41</sup> D. Cram, S. Karbach, Y. H. Kim, L. Baczynskyj, G. W. Kallemeyn, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 2575-2576.

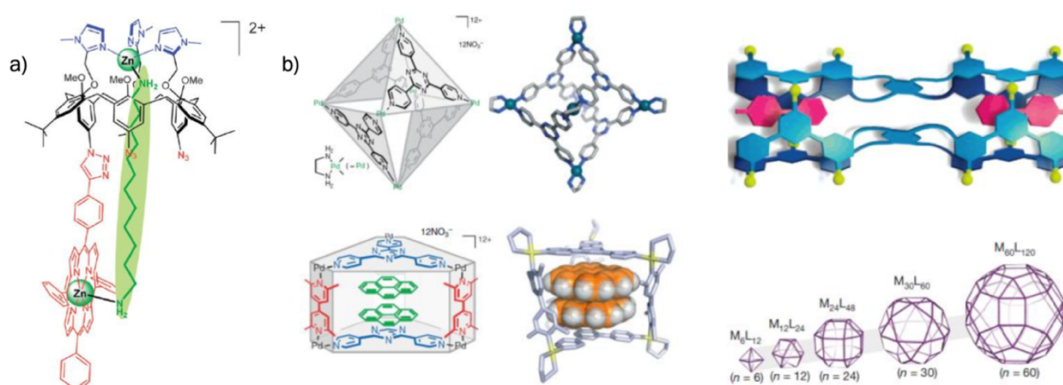
<sup>42</sup> W.B. Hu, W.J. Hu, Y. A. Liu, J.S. Li, B. Jiang, K. Wen, *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 12130-12142.

<sup>43</sup> C. Monnereau, J. N. Rebilly, O. Reinaud, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 166-175.

<sup>44</sup> D. L. Caulder, R. E. Powers, T. N. Parac, K. N. Raymond, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1840-1842.

<sup>45</sup> M. Yoshizawa, J. Nakagawa, K. Kumazawa, M. Nagao, M. Kawano, T. Ozeki, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1810-1813.

<sup>46</sup> D. Fujita, S. Sato, N. Mizuno, T. Kumasaka M. Fujita, *Nature*, **2016**, *540*, 563-566.



**Figura 4.** a) Ejemplos de análogos de metaloenzimas desarrollados por O. Reinaud para la encapsulación selectiva de ligandos.<sup>43</sup> b) Estructuras de algunas de las cajas de coordinación preparadas por el grupo de M. Fujita.<sup>45,46</sup> Figura adaptada con los permisos de la Ref. **43** Copyright 2011 John Wiley and Sons, de la Ref. **45** Copyright 2005 John Wiley and Sons y de la Ref **46** Copyright 2016 Springer Nature.

### 1.3 Herramientas de la química supramolecular: química covalente dinámica

En la construcción de moléculas mediante el uso de herramientas químicas, el enlace covalente une dos átomos o moléculas de una manera fuerte y permanente. Sin embargo, el uso de interacciones intermoleculares da lugar a enlaces más débiles que permiten un intercambio rápido. Entre ambas situaciones, existe una química covalente dinámica o reversible, es decir, un enlace fuerte pero que puede romperse usando las condiciones apropiadas, proporcionando una estrategia sintética para hacer ensamblajes supramoleculares complejos a partir de bloques de construcción moleculares discretos.<sup>47</sup> La química covalente dinámica se ha definido como la química adaptativa, y sus enlaces se pueden definir como enlaces fuertes, estables y permanentes en ciertas condiciones, que se rompen o intercambian en condiciones específicas.<sup>48,49</sup> Además, la restauración de las condiciones iniciales conduce a la recuperación de los productos de partida, lo que los hace especialmente atractivos. Las reacciones que implican enlaces covalentes se realizan generalmente bajo control cinético. En contraste, los procesos supramoleculares generalmente dan lugar a las especies termodinámicamente más estables. La química dinámica covalente se encuentra en el medio de ambas situaciones, combinando los conceptos de productos termodinámicamente más estables con la fuerza de los enlaces covalentes y su estabilidad cinética.<sup>50</sup>

#### 1.3.1 Formación de enlaces Carbono-Heteroátomo

Una construcción covalente dinámica común es la formación de enlaces entre un centro de carbono y un heteroátomo, ya que el enlace formado es menos estable que un enlace carbono-carbono, ofrecen más reversibilidad y alcanzan el equilibrio termodinámico más rápido que el enlace de carbono. En este contexto cabe destacar el intercambio de éster o transesterificación, la formación de iminas (**Fig. 5a-b**), y los tioésteres. Las reacciones de formación de enlaces entre carbono y nitrógeno son las más utilizadas en la química covalente dinámica. La formación de iminas tiene lugar por condensación entre un carbonilo y una amina primaria en

<sup>47</sup> Y. Jin, C. Yu, R. J. Denman, W. Zhang, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 6634-6654

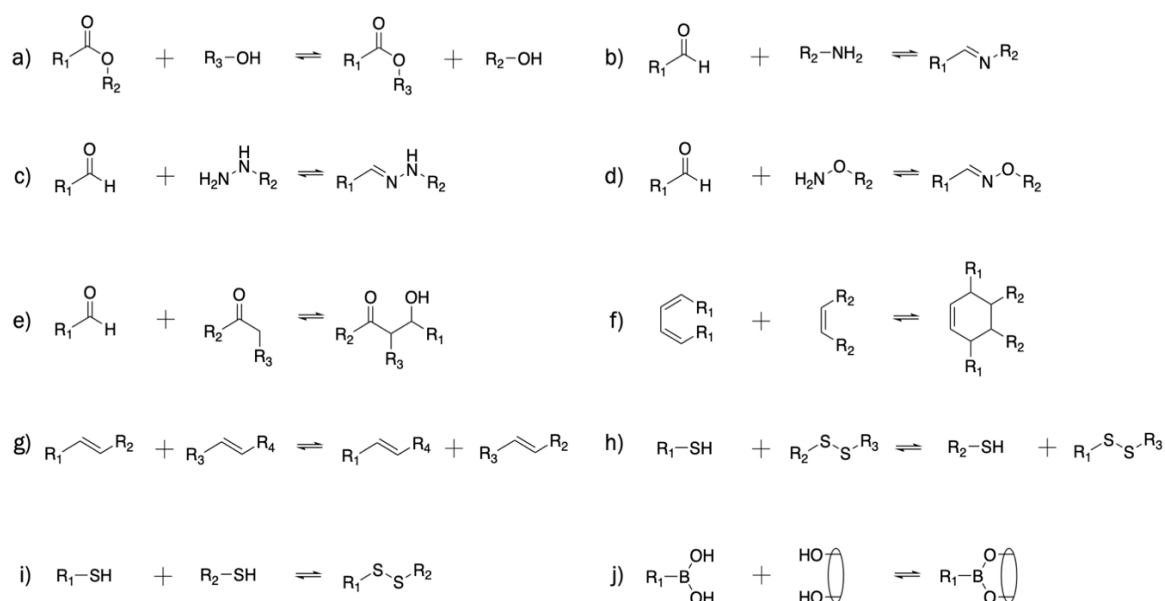
<sup>48</sup> J. Li, K. P. Nowa, S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 9222-9239.

<sup>49</sup> F. B. L. Cougnon, J. K. M. Sanders, *Acc. Chem. Res.*, **2012**, *45*, 2211-2221.

<sup>50</sup> S. J. Rowan, S.J. Cantrill, G. R. Cousins, J.K. Sanders, J.F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 898-952.

condiciones suaves. Estas conexiones han sido ampliamente utilizadas en la química de materiales para interruptores moleculares y estructuras orgánicas covalentes.<sup>47</sup> A diferencia de otras conexiones, no se usan en aplicaciones biomédicas debido a su lenta formación y su alta reactividad, dando lugar a la formación de subproductos.<sup>51</sup> En general, las iminas aromáticas o bases de Schiff, son las únicas que han tenido aplicaciones en este campo.<sup>52</sup>

Una mención especial requiere uno de los tipos de enlace más utilizados en estos sistemas dinámicos, las hidrazonas y las oximas (**Fig. 5c-d**). Los enlaces covalentes dinámicos más clásicos<sup>53</sup> y los más empleados en esta tesis doctoral, formados por condensación entre derivados de carbonilo (cetonas o aldehídos) e hidrazidas u O-alkilhidroxilaminas respectivamente, en condiciones ligeramente ácidas (pH = 4-6), con la liberación de una molécula de agua.<sup>54</sup> Desde el punto de vista sintético, esta estrategia de conjugación tiene características como una selectividad elevada y la eficiencia de las reacciones en condiciones leves y acuosas, algo casi obligatorio cuando se trabaja con compuestos biológicos. Teniendo en cuenta los grupos funcionales que participan en esta conjugación, hace posible que sea totalmente compatible con la mayoría de las biomoléculas. Sin embargo, presentan algunas limitaciones, como la inestabilidad en un medio acuoso, una cinética lenta a pH fisiológico y poca reactividad con sustratos como las cetonas.



**Figura 5.** Representación de los tipos de enlaces covalentes dinámicos más empleados. a) Transesterificación, b) Formación de imina, c) Formación de hidrazona, d) Oxima, e) Reacción aldólica, f) Cicloadición Diels-Alder, g) Metástesis de olefinas h) Intercambio y i) formación de disulfuro y j) Condensación de ácido borónico.

### 1.3.2 Formación de enlaces Carbono-Carbono y Heteroátomo-Heteroátomo

A pesar del amplio uso de los enlaces dinámicos Carbono-Heteroátomo, están lejos de ser las únicas conexiones dentro de la química dinámica covalente. En esta área, vale la pena

<sup>51</sup> J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *120*, 7633-7636.

<sup>52</sup> R. J. Sarma, S. Otto, J. R. Nitschke, *Chem. A. Eur. J.*, **2007**, *13*, 9542-9546.

<sup>53</sup> E. Fischer, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1888**, *21*, 984-988. W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 475-481.

<sup>54</sup> E. H. Cordes, P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, *84*, 832-837.

mencionar la formación de enlaces C-C, como las reacciones aldólicas, Diels-Alder o metátesis (**Fig. 5e-g**). Además, la formación dinámica de enlaces heteroátomo aporta otras reacciones útiles a la caja de herramientas de la química reversible. El intercambio de disulfuro y la condensación de ácido borónico constituyen las dos reacciones principales en esta categoría. Los disulfuros pueden sufrir reacciones de intercambio dinámico con tioles libres (**Fig. 5h-i**).<sup>47,55</sup> La aplicación de la química del disulfuro tiene la ventaja adicional de ser un motivo biológico. Esta unión juega un papel importante en la estructura terciaria y cuaternaria de múltiples proteínas para la estabilización de su conformación tridimensional.<sup>56,57</sup> Esta química se puede encontrar en los polidisulfuros de penetración celular desarrollados por el profesor S. Matile,<sup>58,59,60</sup> o en las bibliotecas dinámicas del grupo de J. K. Sanders.<sup>61</sup> La autocondensación de ácido borónico o la condensación con dioles representan las reacciones más populares utilizados en química dinámica en los últimos años (**Fig. 5j**).<sup>47</sup> La reacción entre el ácido borónico y el diol forma un producto con dos enlaces éster borónicos que forman un ciclo estable pero reversible bajo ciertas condiciones.<sup>62</sup> Características que presentan ciertas ventajas cuando se diseñan sistemas donde se desea una alta rigidez, como las cápsulas 3D y los COFs (Covalent Organic Frameworks).<sup>63</sup> Estas conexiones son frecuentes para realizar condensaciones con azúcares o catecoles<sup>64,65</sup> y ampliamente utilizadas para el desarrollo de sensores moleculares, preparar hidrogeles, sintetizar nanomateriales y en cultivos celulares.<sup>66</sup>

En las últimas décadas, los químicos han podido descubrir y desarrollar una amplia variedad de sistemas supramoleculares, así como aplicarlos para llevar a cabo procesos cada vez más complejos. Por lo tanto, se puede considerar que esta joven disciplina ha sido una de las áreas de más rápido crecimiento en el campo de la química en los últimos años, además de tener una inmensa proyección para el futuro. Los trabajos en el área de la química supramolecular fueron reconocidos en 2016 con el premio Nobel de química a B. L. Feringa,<sup>67</sup> J. P. Sauvage,<sup>68</sup> y J. F. Stoddart<sup>69</sup> en el desarrollo de las conocidas como máquinas moleculares.<sup>70</sup> Las posibilidades que ofrece este campo siguen siendo inmensas si consideramos cuán lejos estamos de las máquinas supramoleculares tremendamente complejas como son los seres vivos.

<sup>55</sup> J. Kim, K. Baek, D. Shetty, N. Selvapalam, G. Yun, N. H. Kim, Y. H. Ko, K. M. Park, I. Hwang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 2693–2697.

<sup>56</sup> T. E. Creighton, *J. Phys. Chem.*, **1985**, *89*, 2452-2459.

<sup>57</sup> J. M. Hornton, *J. Mol. Biol.*, **1981**, *151*, 261-287.

<sup>58</sup> G. Gasparini, E. K. Bang, G. Molinard, D. V. Tulumello, S. Ward, S. O. Kelley, A. Roux, N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 6069-6074.

<sup>59</sup> E. K. Bang, G. Gasparini, G. Molinard, A. Roux, N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 2088-2091.

<sup>60</sup> A. Carmine, Y. Domoto, N. Sakai, S. Matile, *Chemistry*, **2013**, *19*, 11558-11563.

<sup>61</sup> S. Otto, R. L. Furlan, J. K. Sanders, *Science*, **2002**, *297*, 590-593.

<sup>62</sup> S. D. Bull, M. G. Davidson, J. M. H. van den Elsen, J. S. Fossey, A. T. A. Jenkins, Y. B. Jiang, Y. Kubo, F. Marken, K. Sakurai, J. Zhao, T. D. James, *Acc. Chem. Res.*, **2013**, *46*, 312-326.

<sup>63</sup> R. Nishiyabu, Y. Kubo, T. D. James, J. S. Fossey, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 1124-1150

<sup>64</sup> N. Ni, S. Laughlin, Y. Wang, Y. Feng, Y. Zheng, B. Wang, *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 2957-2961.

<sup>65</sup> C. C. Deng, W. L. A. A. Brooks, K. A. Abboud, B. S. Sumerlin, *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*, 220-224.

<sup>66</sup> W. L. A. Brooks, B. S. Sumerlin, *Chemical Reviews*, **2016**, *116*, 1375-1397.

<sup>67</sup> W. R. Browne, B. L. Feringa, *Nature Nanotech.*, **2006**, *1*, 25–35.

<sup>68</sup> F. Durola, V. Heitz, F. Reviriego, C. Roche, J. P. Sauvage, A. Sour, Y. Trolez, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, 633–645.

<sup>69</sup> J. F. Stoddart, J. F. (2009). *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 1802–1820. A. Coskun, M. Banaszak, R. D. Astumian, J. F. Stoddart, B. A. Grzybowski, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 19–30.

<sup>70</sup> D. A. Leigh, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 14506-14508.

## 2. Péptidos penetrantes de células (CPPs)

La expansión hacia nuevas tecnologías terapéuticas requiere que los fármacos y compuestos biológicamente activos sean liberados en el interior celular para ejercer su función en el citoplasma, en el núcleo o en otros orgánulos específicos. Sin embargo, la membrana plasmática actúa como una barrera hidrofóbica semipermeable que impide el paso de las macromoléculas exógenas, como moléculas de gran peso molecular o moléculas polares o cargadas, asegurando la integridad de la célula.<sup>71</sup> No obstante, el desarrollo de novedosos sistemas de liberación y transporte de fármacos que aumentan su internalización y permiten que los agentes terapéuticos alcancen sus dianas intracelulares ha centrado grandes esfuerzos. Existen múltiples materiales sintéticos para la entrega intracelular de diferentes cargos: como los liposomas, polímeros o nanopartículas, sin embargo, en los últimos años, los Péptidos Penetrantes de Células (CPPs) han surgido como una alternativa prometedora para la internalización efectiva y el transporte al interior celular de biomacromoléculas como fármacos, agentes de imagen, ácidos nucleicos, proteínas, etc.<sup>72</sup>

Hasta hace varios años, la posibilidad de que existieran proteínas capaces de internalizar y dirigirse directamente hacia el citoplasma o núcleo celular no era una hipótesis seriamente considerada. La señalización clásica, requería de un agonista para su receptor específico, cuya interacción se traducía en una señal intracelular que desencadenaba una serie de procesos biológicos. Sin embargo, en los últimos treinta años, el número de proteínas translocantes ha incrementado de tal forma que ya no pueden ser consideradas simples curiosidades.<sup>72</sup>

### 2.1 Antecedentes históricos

#### 2.1.1 Proteína TAT del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1)

En 1988 los hallazgos de Green, Loewenstein,<sup>73</sup> Frankel y Pabo<sup>74</sup> documentaron de manera independiente que la proteína TAT (Trans-Activador de la Transcripción) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), a diferencia de la mayoría de las proteínas, se internalizaba de manera eficiente en el interior celular y se localizaba en el núcleo celular cuando se añadía al medio de cultivo.<sup>73,74</sup> La proteína TAT es un factor de activación de la transcripción, constituido por 86 aminoácidos, esencial para la replicación vírica. Dicha proteína contiene regiones hélice- $\alpha$  con características anfipáticas (TAT<sub>38-49</sub>) y un dominio de aminoácidos básicos (TAT<sub>49-57</sub>) que se encuentra desestructurado por la repulsión entre las cargas positivas (**Fig. 6a**) y que contiene una secuencia señal de localización nuclear (NLS).<sup>75,76</sup> En 1997, B. Lebleu, durante el estudio del comportamiento anómalo de la proteína TAT, supuso que la región anfipática hélice- $\alpha$  era la responsable de la internalización celular.<sup>77</sup> Sin embargo, posteriormente se descubrió que esta secuencia no era responsable de la internalización. La función con características penetrantes pertenecía al dominio catiónico adyacente, lo que se denominó péptido TAT (TAT<sub>49-57</sub>, RKKRRQRRR, **Fig. 6a**).<sup>77</sup>

<sup>71</sup> J. Lombard, *Biol. Direct*, **2014**, 9, 32-37.

<sup>72</sup> F. Heitz, M. C. Morris, G. Divita, *Br. J. Pharmacol.*, **2009**, 157, 195-206.

<sup>73</sup> M. Green, P. M. Loewenstein, *Cell*, **1988**, 55, 1179-1188.

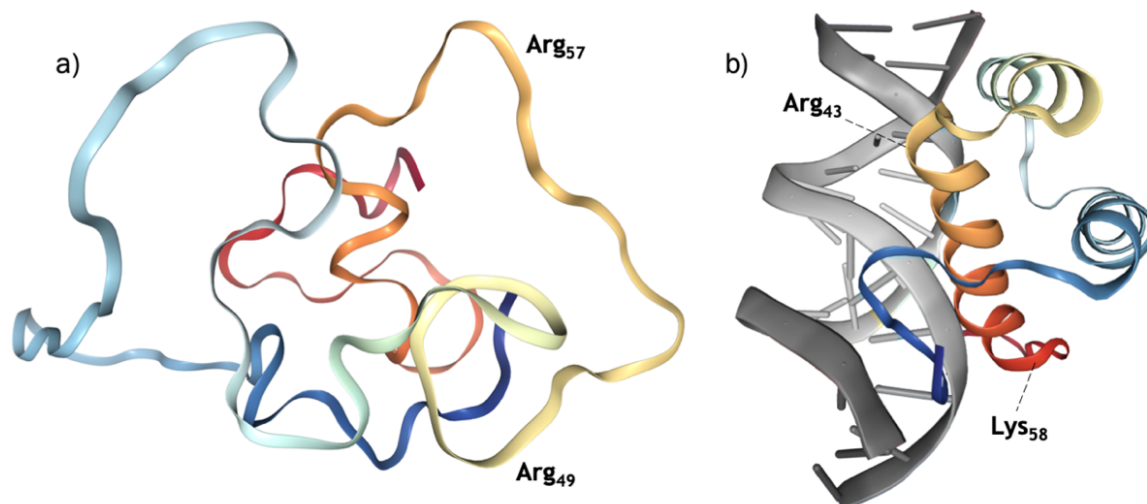
<sup>74</sup> A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell*, **1988**, 55, 1189-1193.

<sup>75</sup> S. Ruben, A. Perkins, R. Purcell, K. Joung, R. Sia, R. Burghoff, W. A. Haseltine, C. A. Rosen, *J. Virol.*, **1989**, 63, 1-8.

<sup>76</sup> E.P. Loret, E. Vives, P. S. Ho, H. Rochat, J. V. Rietschoten, W. C. Johnson, *Biochemistry*, **1991**, 30, 6013-6023.

<sup>77</sup> E. Vivès, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 16010-16017.

El grupo del profesor P. Wender centró sus esfuerzos en identificar las claves que concedían a TAT<sub>49-57</sub> la habilidad para atravesar las membranas celulares no polares, un comportamiento hasta el momento contradictorio para una molécula altamente cargada. Mediante sistemáticos cortes N- y C-terminal en el péptido TAT<sub>49-57</sub> demostraron que la cadena peptídica completa era necesaria para una óptima internalización; cualquier cambio producía una reducción de su capacidad para atravesar la membrana.<sup>78</sup>



**Figura 6.** a) Estructura de la proteína TAT del VIH-1, la región catiónica específica comprendida entre los residuos 49-57 recibe el nombre de péptido TAT<sub>49-57</sub> (RKKRRQRRR). PDB ID: 1TIV.<sup>79</sup> b) Complejo de ADN-Homeodominio de Antennapedia de *Drosophila*, los residuos comprendidos entre 43-58 de la tercera hélice- $\alpha$  es lo que se conoce como Penetratina-1 (RQIKIWFQNRRMKWKK). PDB ID: 1AHD.<sup>80</sup> Código de colores: **N-terminal** → **C-terminal**

### 2.1.2 Homeodominio de Antennapedia, una homeoproteína de *Drosophila*

A principios de los años 90, en el homeodominio de Antennapedia, descubierta por primera vez en *Drosophila*,<sup>81</sup> también se encontraron estas propiedades de translocación. A. H. Joliot en 1991, descubrió que esta proteína era capaz de internalizar en las células nerviosas.<sup>82,83</sup> Unos años más tarde, gracias a los esfuerzos de Bloch-Gallego<sup>84</sup> y I. Le Roux en 1993,<sup>85</sup> y especialmente de D. Derossi y A. Prochiantz en 1994,<sup>86,87</sup> identificaron la tercera hélice- $\alpha$  como la mínima secuencia responsable de la entrada celular del homeodominio de Antennapedia. Las homeoproteínas son una clase de factores de transcripción, involucrados en múltiples procesos de desarrollo y diferenciación, que se unen al ADN a través de secuencias específicas de 60

<sup>78</sup> P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, 97, 13003-13008.

<sup>79</sup> P. Bayer, M. Kraft, A. Ejchart, M. Westendorp, R. Frank, P. Rösch, *J. Mol. Biol.*, **1995**, 247, 529-535.

<sup>80</sup> M. Billeter, Y. Q. Qian, G. Otting, M. Müller, W. Gehring, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1993**, 234, 1084-1097.

<sup>81</sup> W. Gehring, *Science*, **1987**, 236, 1245-1252.

<sup>82</sup> A. H. Joliot, A. Triller, M. Volovitch, C. Pernelle, A. Prochiantz, *New Biol.*, **1991**, 3, 1121-1134.

<sup>83</sup> A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1991**, 88, 1864-1868.

<sup>84</sup> E. Bloch-Gallego, I. Le Roux, A. H. Joliot, M. Volovitch, C. E. Henderson, A. Prochiantz, *J. Cell Biol.*, **1993**, 120, 485-492.

<sup>85</sup> I. Le Roux, A. H. Joliot, E. Bloch-Gallego, A. Prochiantz, M. Volovitch, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1993**, 90, 9120-9124.

<sup>86</sup> D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 10444-10450.

<sup>87</sup> D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 18188-18193.

aminoácidos altamente conservadas denominadas homeodominios<sup>88</sup> y que están estructurados en tres hélices- $\alpha$  con un giro- $\beta$  entre la segunda y la tercera hélice- $\alpha$ .<sup>86,89</sup> Secuencias mutadas derivadas del homeodominio de Antennapedia,<sup>85</sup> junto con versiones más cortas de la tercera hélice- $\alpha$  o nuevas versiones modificadas estudiadas por D. Derossi<sup>86</sup> anularon por completo su translocación. La pérdida de los residuos hidrofóbicos afectaba a la estructura anfipática/anfifílica de la tercera hélice- $\alpha$ , sugiriendo que, junto con los residuos básicos, participan en el motivo estructural responsable de su internalización.<sup>85</sup> Estos resultados confirmaron las predicciones de I. Le Reux, asegurando inequívocamente que la fuerza penetrante residía en la tercera hélice- $\alpha$  del homeodominio de Antennapedia. Este motivo estructural era el responsable del proceso de translocación, y esta mínima secuencia penetrante que corresponde con los residuos comprendidos entre 43-58 se denominó Penetratina-1 (RQIKIWFQNRRMKWKK, **Fig. 6b**). Todo este conocimiento ha permitido el desarrollo de una familia de Penetratinas, que han sido utilizadas para la internalización de diversos cargos en el citoplasma y en el núcleo en diferentes tipos celulares.<sup>90,91</sup>

Los estudios con la proteína TAT del VIH-1 y el homeodominio de Antennapedia, sugirieron fuertemente que la internalización podría estar unida a la presencia de alta densidad de carga positiva dentro de cortas secuencias peptídicas. Además, se ha demostrado que la hidrofobicidad juega un papel fundamental en el proceso de translocación. Por lo tanto, la capacidad de penetración a través de la membrana se asignó a pequeñas secuencias peptídicas altamente ricas en residuos básicos catiónicos, combinadas, en algunas ocasiones, con características hidrofóbicas. Estas secuencias se denominaron Dominios de Transducción de Proteínas (PTDs) o Péptidos Penetrantes de Células (CPPs).

### 2.1.3 Otras proteínas con comportamientos atípicos

En relación con las inusuales características de internalización de ciertas proteínas, como TAT del VIH-1 o el homeodominio de Antennapedia, también se ha prestado especial atención al insólito comportamiento de varias proteínas capaces de ser secretadas al exterior celular sin secuencias señal específicas que promuevan su transporte a través de la membrana mediante mecanismos de secreción convencionales como la ruta RE/Golgi (**Fig. 12i**). Las secuencias señal o péptidos señal son pequeñas secuencias peptídicas que deciden sobre el destino, la ruta de transporte, o la eficacia de secreción de una proteína. Las proteínas sin secuencia señal pueden también ser secretadas por mecanismos no tradicionales, este proceso por el cual tales proteínas obtienen acceso al exterior de la célula se denominó secreción de proteínas no convencional (Unconventional Protein Secretion, UPS) o mecanismo de secreción de proteínas independiente de RE/Golgi.

El descubrimiento de las propiedades translocantes no convencionales del homeodominio de Antennapedia en *Drosophila*, sugirió la posibilidad de que otras homeoproteínas presentasen estas nuevas características. Dentro de esta familia, cabe destacar Engrailed-2 (En2), implicada en procesos de morfogénesis, y que interviene en importantes etapas del desarrollo del cerebro

<sup>88</sup> W. J. Gehring, Y. Q. Qian, M. Billeter, K. Furukubo-Tokunaga, A. F. Schier, D. Resendez-Perez, M. Affolter, G. Otting, K. Wüthrich, *Cell*, **1994**, 78, 211–223.

<sup>89</sup> Y. Q. Qian, M. Billeter, G. Otting, M. Müller, W. J. Gehring, K. Wüthrich, *Cell*, **1989**, 59, 573–580.

<sup>90</sup> D. Derossi, G. Chassaing, A. Prochiantz, *Trends Cell Biol*, **1998**, 8, 84–88.

<sup>91</sup> A. Prochiantz, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2000**, 12, 400–406.

así como en otras etapas del crecimiento.<sup>92,93</sup> Observaciones en mezclas de cultivos celulares de COS-7 con neuronas de rata E15<sup>92</sup> o fibroblastos de ratón 3T3<sup>93</sup>, constataron la secreción de la homeoproteína En2 desde COS-7 al medio de cultivo y su posterior internalización en las líneas celular colindantes con las que fueron co-sembradas. La gran conservación de la tercera hélice- $\alpha$  del homeodominio de las homeoproteínas sugiere que la translocación a través de membranas y la localización nuclear es una propiedad compartida de varios homeodominios. Del mismo modo, A. Joliot y A. Prochiantz encontraron estas propiedades en el homeodominio de Hoxa-5. Esta homeoproteína era capaz de ser absorbida por fibroblastos y neuronas en cultivo y transportada, intacta, a sus núcleos.<sup>94</sup>

La Interleucina-1 (IL-1) es una de las principales citoquinas,<sup>95,96</sup> proteínas que actúan como mensajeros químicos a corta distancia, sintetizadas principalmente por los linfocitos, cuya función principal es la regulación del sistema inmunitario.<sup>97</sup> Esta proteína carece de la secuencia señal típica.<sup>98,99</sup> Estudios realizados por I. Singer en 1988<sup>100</sup> y por K. Matsushima en 1986<sup>95</sup> fracasaron al intentar demostrar la localización de moléculas de IL-1 en el RE/Golgi, surgiendo la pregunta de como esta citoquina era capaz de ser liberada por las células que la producían. En 1990 A. Rubartelli y R. Sitia emplearon Brefeldina A (BFA), una lactona antiviral conocida por bloquear el tráfico vesicular a nivel del RE/Golgi, para demostrar como no resultaba impedida la secreción de IL-1 $\beta$ , a diferencia de lo ocurrido con otras proteínas clásicas. De esta manera, constataron como IL-1 $\beta$  era expulsada del interior celular por un nuevo procedimiento de secreción respecto a los mecanismos conocidos hasta el momento.<sup>101</sup>

Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) son una familia de proteínas de unión a heparina, que actúan como controladores externos del ciclo celular, favoreciendo la proliferación celular del tejido fibroso o de soporte. Entre sus miembros, destacan FGF ácido (aFGF o FGF-1)<sup>102</sup> y FGF básico (bFGF o FGF-2)<sup>103</sup>. Ambos factores de crecimiento carecen de la clásica secuencia señal para la secreción. Aunque la transducción de la respuesta al interior celular depende de su interacción con sus receptores con actividad tirosina quinasa, el mecanismo de la regulación de la secreción, así como el escape de los compartimentos intracelulares, es desconocido.<sup>102,103</sup> De esta forma, FGF-1 y FGF-2, se unen a una larga lista de proteínas, cuyas propiedades para trasladarse desde el interior o exterior celular o viceversa, se alejan de los comportamientos clásicos.<sup>104</sup>

<sup>92</sup> A. Joliot, A. Maizel, D. Rosenberg, A. Trembleau, S. Dupas, M. Volovitch, A. Prochiantz, *Curr. Biol.* **1998**, *8*, 856–863.

<sup>93</sup> A. Maizel, O. Bensaude, A. Prochiantz, A. Joliot, *Development*, **1999**, *126*, 3183–3190.

<sup>94</sup> L. Chatelin, M. Volovitch, A. H. Joliot, F. Perez, A. Prochiantz, *Mech. Dev.*, **1996**, *55*, 111–117.

<sup>95</sup> K. Matsushima, M. Taguchi, E. J. Kovacs, H. A. Young, J. J. Oppenheim, *J. Immunol.*, **1986**, *136*, 2883–2891.

<sup>96</sup> P. E. Auron, S. J. Warner, A. C. Webb, J. G. Cannon, H. A. Bernheim, K. J. McAdam, L. J. Rosenwasser, G. LoPrete, S. F. Mucci, C. A. Dinarello, *J. Immunol.*, **1987**, *138*, 1447–1456.

<sup>97</sup> J. J. Oppenheim, E. J. Kovacs, K. Matsushima, S. K. Durum, *Immunol. Today*, **1986**, *7*, 45–56.

<sup>98</sup> P. E. Auron, A. C. Webb, L. J. Rosenwasser, S. F. Mucci, A. Rich, S. M. Wolff, C. A. Dinarello, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1984**, *81*, 7907–7911.

<sup>99</sup> C. J. March, B. Mosley, A. Larsen, D. P. Cerretti, G. Braedt, V. Price, S. Gillis, C. S. Henney, S. R. Kronheim, K. Grabstein, P. J. Conlon, T. P. Hopp, D. Cosman, *Nature*, **1985**, *315*, 641–647.

<sup>100</sup> I. I. Singer, *J. Exp. Med.*, **1988**, *167*, 389–407.

<sup>101</sup> A. Rubartelli, F. Cozzolino, M. Talio, R. Sitia, *EMBO J.*, **1990**, *9*, 1503–1510.

<sup>102</sup> A. Jackson, S. Friedman, X. Zhan, K. A. Engleka, R. Forough, T. Maciag, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1992**, *89*, 10691–10695.

<sup>103</sup> R. Backhaus, C. Zehe, S. Wegehingel, A. Kehlenbach, B. Schwappach, W. Nickel, *J. Cell Sci.*, **2004**, *117*, 1727–1736.

<sup>104</sup> Y. Cao, M. Ekstrom, R. F. Pettersson, *J. Cell Sci.*, **1993**, *104*, 77–87.

G. Elliott y P. O'Hare, en 1997, encontraron estas características penetrantes en VP22, principal proteína del tegumento del virus del herpes simple 1 (VHS-1).<sup>105</sup> Esta proteína estructural ha mostrado una gran capacidad para translocar a través de la bicapa lipídica y acumularse en el núcleo celular.<sup>105</sup> A pesar de carecer de secuencia señal, no solo es capaz de ser secretada desde el interior de las células transfectadas en las que fue sintetizada, mediante un mecanismo independiente de la ruta RE/Golgi, sino que, una vez en el exterior celular, es capaz de reingresar en las células circundantes con un alto nivel de eficacia.<sup>105,106</sup> El comportamiento observado en todas estas proteínas muestra una pequeña representación de una larga lista de moléculas translocantes o cuyo comportamiento era inusual por aquel entonces.

## 2.2 Nuevas estructuras con características penetrantes

Estos hallazgos iniciales, comenzaban a demostrar el potencial de los CPPs, y permitieron el uso del conocimiento observado en estas moléculas o proteínas naturales para expandir este nuevo y prometedor campo hacia numerosas estructuras sintéticas con propiedades translocantes, desarrollando al máximo el alcance de esta estrategia de transporte y liberación. De esta forma, los químicos orgánicos comenzaron a explorar e investigar las características moleculares que gobernaban el comportamiento de los péptidos penetrantes de células.<sup>72</sup>

Estudios pioneros en la comprensión del funcionamiento de los CPPs llevados a cabo por N. Sakai y el profesor S. Matile demostraron la gran importancia del intercambio de contraiones de los aminoácidos positivos de arginina y las membranas negativas de las células.<sup>107,108</sup> Los grupos guanidino de las argininas se encuentran protonados a pH fisiológico, por lo que adquieren carga positiva y se repelen entre sí. Debido a que no consiguen desprotonarse parcialmente, dado su elevado valor de pKa, para poder minimizar las repulsiones electrostáticas, su única alternativa es complejarse con los aniones presentes en el medio que los rodea (**Fig. 7b**). De este modo, interactúan con diversos contraiones e intercambiarlos. Cuando este anión es hidrofóbico, como, por ejemplo, un lípido aniónico, el complejo electrostático formado adquiere un carácter anfifílico, es decir, hidrofílico e hidrofóbico simultáneamente, lo que favorece enormemente el proceso de translocación de membrana e internalización celular.<sup>107,108</sup> Esta necesidad de complejarse con contraiones cargados negativamente a pH fisiológico maximiza la interacción electrostática de las oligoargininas con los componentes aniónicos de la membrana celular y es la responsable del anclaje y posterior translocación de los CPPs a través de la membrana celular (**Fig. 7c**).

El péptido TAT<sub>49-57</sub> sirvió como inspiración natural para el desarrollo de oligómeros de arginina y de lisina llevados a cabo por el grupo del profesor P. Wender. Se observó como estos nuevos oligómeros sintéticos de arginina eran mucho más efectivos que TAT<sub>49-57</sub>,<sup>78</sup> y propusieron así, que esta diferencia se debía a que los grupos guanidino de las argininas, en contraste con los grupos amino de las lisinas, podían formar enlaces de hidrógeno bidentados con la superficie aniónica de los grupos fosfato de la membrana lipídica como antesala a la entrada celular.<sup>109</sup> Basándose en el modelo de S. Matile,<sup>107,108</sup> las oligolisinas, sí que podrían

<sup>105</sup> G. Elliott, P. O'Hare, *Cell*, **1997**, *88*, 223–233.

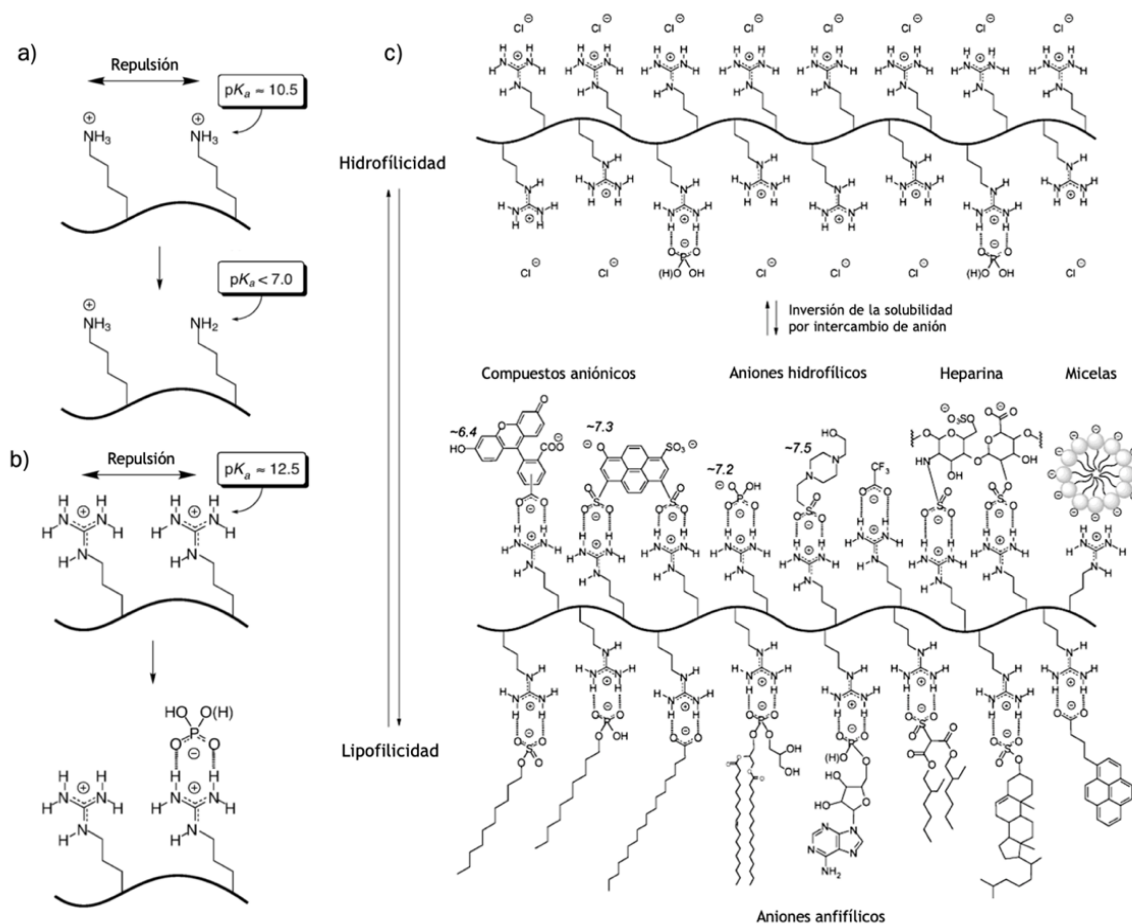
<sup>106</sup> G. Elliott, P. O'Hare, *Gene Ther.* **1999**, *6*, 149–151.

<sup>107</sup> N. Sakai, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 14348–14356.

<sup>108</sup> T. Takeuchi, M. Kosuge, A. Tadokoro, Y. Sugiura, M. Nishi, M. Kawata, N. Sakai, S. Matile, S. Futaki, *ACS Chem. Biol.*, **2006**, *1*, 299–303.

<sup>109</sup> J. B. Rothbard, T. C. Jessop, R. S. Lewis, B. A. Murray, P. A. Wender, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 9506–9507.

desprotonarse parcialmente a pH fisiológico para minimizar las repulsiones electrostáticas y por lo tanto perderían la carga positiva responsable de la interacción con los contraiones negativos presentes en la membrana plasmática (**Fig. 7a**). Estas aportaciones permitieron el desarrollo de poliargininas sintéticas ( $R_n$ ,  $n = 6-12$ ), las cuales se emplean hoy en día como CPPs de referencia y que internalizan en el interior celular de manera más eficiente que otros oligómeros policatiónicos.<sup>78,110</sup>

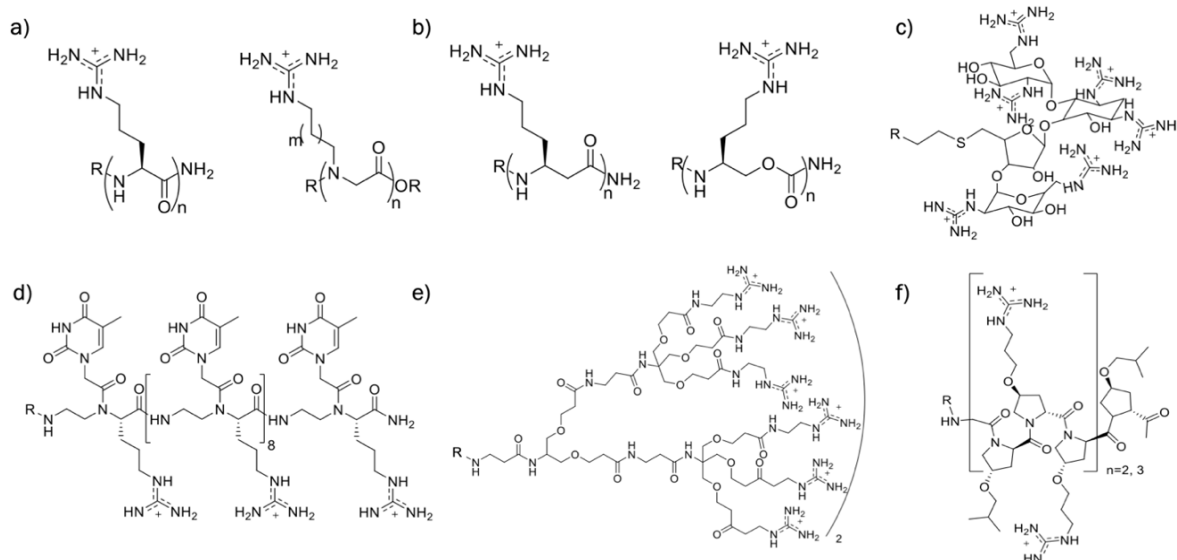


**Figura 7.** Estrategias del grupo a) amina de las lisinas y b) guanidino de las argininas para eliminar los efectos de repulsión entre cargas próximas mediante la desprotonación y por la complejación con un anión respectivamente. c) Concepto de la variabilidad de la carga y la solubilidad de los cationes de poliargininas mediada por el tipo de anión.<sup>107</sup> Figura adaptada con permisos de la Ref. **107** Copyright 2003 American Chemical Society.

El intercambio en TAT<sub>49-57</sub> de los L-aminoácidos por los D-aminoácidos y la inversión del orden demostró que las propiedades penetrantes se mantenían a pesar de los cambios estereo- y regio-químicos.<sup>78</sup> Estos estudios pusieron de manifiesto que el esqueleto peptídico no era absolutamente necesario para su función penetrante. Por este motivo, se sintetizaron diferentes peptoides, péptidos en los cuales las cadenas laterales se encuentran unidas al átomo de nitrógeno del esqueleto peptídico, con cadenas laterales de grupos guanidinio exhibiendo una internalización similar a las oligoargininas (**Fig. 8a**).<sup>78</sup> Se prepararon estructuras más espaciadas entre el esqueleto peptóide y los grupos guanidino, mejorando así la captación celular y sugiriendo que la flexibilidad es beneficiosa en las propiedades de translocación, aunque en este caso es posible que el aumento de la hidrofobicidad debido a los espaciadores también tuviese una repercusión en la capacidad de transporte del péptido penetrante (**Fig.**

<sup>110</sup> D. J. Mitchell, D. T. Kim, L. Steinman, C. G. Fathman, J. B. Rothbard, *J. Pept. Res.*, **2000**, *56*, 318-325.

**8a).**<sup>78</sup> Posteriores estudios exploraron el cambio de la amida de los péptidos y peptoides por grupos carbamato, exhibiendo una internalización igual de eficiente (**Fig. 8b**).<sup>111</sup> La translocación celular de estos carbamatos, así como otros transportadores ricos en grupos guanidino, pero con una estructura no natural ( $\beta$ -TAT<sub>49-57</sub>,  $\beta$ -poli-Arg o D-TAT<sub>49-57</sub>), demostraron que el esqueleto peptídico de los transportadores actuaba como un mero soporte donde se disponían los grupos catiónicos. Sin embargo, se demostró que el esqueleto peptídico puede jugar un papel muy importante al determinar la disposición y ordenamiento de los grupos catiónicos, lo que tiene consecuencias importantes para la internalización celular.<sup>112,113</sup>



**Figura 8.** Desarrollo de diferentes transportadores moleculares con estructuras ricas en grupos guanidino: a) péptidos y peptoides con espaciadores de diferente longitud ( $m=3-7$ ),<sup>78</sup> b)  $\beta$ -péptidos<sup>116</sup> y péptidos con grupos carbamato,<sup>111</sup> c) glicósidos,<sup>114,115</sup> d) ácidos peptidonucleicos (PNAs),<sup>117</sup> e) estructuras dendríticas no peptídicas<sup>118</sup> y f) foldámeros helicoidales artificiales.<sup>119</sup>

Además de las entidades penetrantes mencionadas anteriormente, se sintetizaron glicósidos guanidinilados de derivados de productos naturales como tobramicina y neomicina B, los cuales exhibieron una eficacia de translocación a través de la membrana excepcional y que compartían similares mecanismos de internalización que los péptidos de poliarginina (**Fig. 8c**).<sup>114,115</sup> Diferentes  $\beta$ -péptidos (**Fig. 8b**),<sup>116</sup> ácidos peptidonucleicos (PNAs, **Fig. 8d**),<sup>117</sup> estructuras dendríticas no peptídicas guanidiniladas (**Fig. 8e**),<sup>118</sup> foldámeros helicoidales artificiales (**Fig. 8f**),<sup>119</sup> o polímeros<sup>120</sup> poseían una eficiencia en la internalización similar a TAT<sub>49-57</sub>.

<sup>111</sup> P. A. Wender, J. B. Rothbard, T. C. Jessop, E. L. Kreider, B. L. Wylie, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 13382-13383.

<sup>112</sup> J. S. Appelbaum, J. R. La Rochelle, B. A. Smith, D. M. Balkin, J. M. Holub, A. Schepartz, *Chem. Biol.*, **2012**, *19*, 819-830.

<sup>113</sup> D. S. Daniels, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 14578-14579.

<sup>114</sup> N. W. Luedtke, P. Carmichael, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 12374-12375.

<sup>115</sup> K. K. Maiti, O. Jeon, W. S. Lee, D. Kim, K. Kim, T. Takeuchi, S. Futaki, S. Chung, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 2907-2912.

<sup>116</sup> N. Umezawa, M. A. Gelman, M. C. Haigis, R. T. Raines, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 368-369.

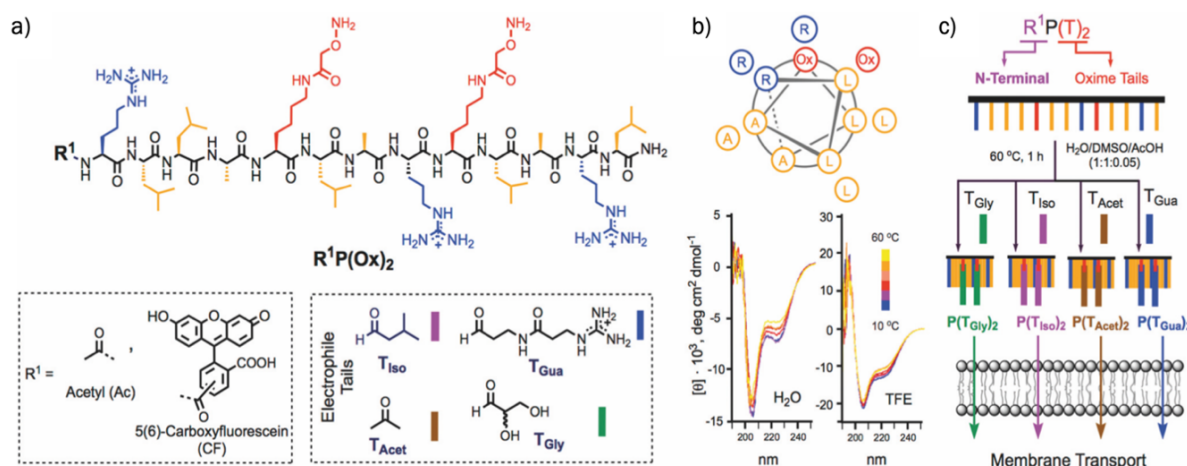
<sup>117</sup> P. Zhou, M. Wan, L. Du, G. W. Fisher, A. Waggoner, D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 6878-6879.

<sup>118</sup> H. H. Chung, G. Harms, C. M. Seong, B. H. Choi, C. Min, J. P. Taulane, M. Goodman, *Biopolymers*, **2004**, *76*, 83-96.

<sup>119</sup> E. R. Gillies, F. Deiss, C. Staedel, J. M. Schmitter, I. Huc, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 4081-4084.

<sup>120</sup> K. P. Milroy, M. H. Sonntag, A. H. A. M. van Onzen, L. Brunsveld, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 8086-8089.

Recientemente, en nuestro grupo de investigación, se han diseñado nuevas estructuras penetrantes de células que contienen enlaces dinámicos. Esta amplia gama de transportadores abarca desde estructuras catiónicas con grupos alcoxiamina que contienen anclados diferentes ligandos aldehídos hidrofóbicos,<sup>121</sup> hasta péptidos anfílicos pseudo-helicoidales que utilizan uniones oxima con distintos electrófilos hidrofóbicos, hidrofílicos (**Fig. 9**),<sup>122</sup> o ligandos tipo carbohidrato.<sup>123</sup> Siguiendo la misma metodología, también se ha empleado la química dinámica de los enlaces hidrazonas para la conexión de secuencias peptídicas penetrantes con diversas colas hidrofóbicas.<sup>124</sup>



**Figura 9.** a) Estructura química de un péptido anfílico con dos grupos dinámicos tipo alcoxiamina (rojo) donde se acoplan diferentes electrófilos aldehído. b) Diagrama en hélice y espectros de dicroísmo circular del péptido diseñado. c) Representación esquemática de la funcionalización peptídica con los distintos aldehídos con diferentes aplicaciones en el transporte a través de la membrana celular.<sup>122</sup> Figura adaptada con permisos de la Ref. 122 Copyright 2017 Georg Thieme Verlag KG.

Los péptidos ricos en prolina contribuyen a ampliar esta familia de estructuras con propiedades penetrantes. Se caracterizan por la presencia repetida de anillos de pirrolidina de los aminoácidos de prolina.<sup>125</sup> Se han podido emplear desde secuencias lineales ricas en prolina con aminoácidos naturales,<sup>126</sup> hasta agentes de liberación con estructuras dendríticas utilizando *cis*-4-amino-L-prolina como unidad de ramificación.<sup>127,128</sup> Esta familia de dendrímeros tienen las ventajas de ser solubles en agua y estar contruidos a partir de metabolitos naturales, por lo que pueden considerarse biodendrímeros. Por lo tanto, los péptidos ricos en prolina representan una clase potencialmente nueva de péptidos penetrantes de células para el suministro intracelular de diferentes cargos de interés. Dentro de este grupo, requieren una mención especial las familias de péptidos ricos en prolina anfipáticos, derivados del dominio N-terminal de  $\gamma$ -zeína, una proteína de almacenamiento de maíz,<sup>129,130</sup> en concreto de la secuencia octamérica (VHLPPP)<sub>8</sub> capaz de formar depósitos al interactuar con los lípidos de

<sup>121</sup> J. M. Priegue, J. Montenegro, J. R. Granja, *Small*, **2014**, *10*, 3613-3618.

<sup>122</sup> M. Pazo, H Fernández-Caro, J. Priegue, I. Lostalé-Seijo, J. Montenegro, *Synlett*, **2017**, *28*, 924-928.

<sup>123</sup> M. Juanes, I. Lostalé-Seijo, J. R. Granja, J. Montenegro, *Chem. Eur. J.*, **2018**, *24*, 10689-10698.

<sup>124</sup> I. Louzao, R. García-Fandiño, J. Montenegro, *J. Mater. Chem. B*, **2017**, *5*, 4426-4434.

<sup>125</sup> S. Pujals, E. Giralt, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, *60*, 473-484.

<sup>126</sup> K. Sadler, K. D. Eom, J. L. Yang, Y. Dimitrova, J. P. Tam, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 14150-14157.

<sup>127</sup> L. Crespo, G. Sanclimens, B. Montaner, R. P. Tomas, M. Royo, M. Pons, F. Albericio, E. Giralt, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 8876-8883.

<sup>128</sup> L. Crespo, G. Sanclimens, M. Pons, E. Giralt, M. Royo, F. Albericio, *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 1663-1681.

<sup>129</sup> M. D. Ludevid, M. Torrent, J. A. Izquierdo, P. Puigdoménech, J. Palau, *Plant Mol. Biol.*, **1984**, *3*, 227-234.

<sup>130</sup> J. F. Carneado, M. J. Kogan, S. Castel, E. Giralt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2004**, *43*, 1811-1814.

fosfatidilcolina de la membrana celular.<sup>131</sup> Estos péptidos anfipáticos ricos en prolina con estructuras tipo (VXLPPP)<sub>n</sub>, donde X = His, Arg y Lys y n = 1-3, han sido particularmente estudiados durante los últimos años debido a su gran efectividad, demostrando una excelente translocación celular junto con una baja citotoxicidad a altas concentraciones. Sin embargo, SAP (Sweet Arrow Peptide, (VRLPPP)<sub>3</sub>) el mejor candidato de esta familia era pobremente internalizado si se le comparaba con otros CPPs de referencia como TAT<sub>49-57</sub>, poliargininas o Penetratina-1. De esta forma se emplearon esfuerzos para mejorar su penetración celular, aumentando su hidrofobicidad y anfipaticidad mediante la incorporación de ácidos grasos<sup>132</sup> o la adición de silaprolinas, prolinas que contienen un grupo dimetilsilano en la posición  $\gamma$ .<sup>133</sup> En ambos casos, la internalización celular mejoraba drásticamente en comparación con SAP. Tal y como se ha descrito anteriormente, no solo la concentración de cargas positivas es clave para la absorción celular, sino que existen numerosos ejemplos de cómo la adición de restos hidrofóbicos a CPPs mejora drásticamente la entrada celular.<sup>134,135</sup>

Desde entonces, se han desarrollado una gran cantidad de estructuras con el objetivo de dotarlas con la capacidad de atravesar las membranas semipermeables de las células. Estas nuevas estructuras sintéticas penetrantes han sido caracterizadas y experimentalmente validadas para la entrega *in vitro* e *in vivo* de diversos cargos bioactivos en el interior celular.<sup>136</sup>

### 2.3 Clasificación de los CPPs

Hoy en día, el nombre de CPPs designa una gran superfamilia de péptidos que difieren en sus propiedades físicas, químicas o biológicas, así como en su longitud, carga, hidrofobicidad, flexibilidad y solubilidad. La alta diversidad natural de los péptidos penetrantes de células ha complicado la elaboración de una definición exacta y también de una clasificación precisa dependiente de sus características estructurales.<sup>136,137</sup>

En diferentes revisiones de bibliografía se han realizado detalladas taxonomías de las diferentes clases de péptidos penetrantes.<sup>136,137</sup> Según su **origen y naturaleza**, pueden ser péptidos naturales, sintéticos o quiméricos mediante la fusión de péptidos diferentes, los cuales podrían considerarse como un punto intermedio entre los naturales y los puramente sintéticos o artificiales. En la **Tabla 1** se muestra un resumen de estas y otras secuencias peptídicas con capacidad penetrante. La clasificación de los CPPs como naturales, quiméricos o sintéticos es una de las más utilizadas. Sin embargo, todavía resulta complicado relacionar la estructura y secuencia de los CPPs con su capacidad de internalización y localización intracelular. Según sus propiedades **físico-químicas**, los CPPs pueden clasificarse en función de su carga o hidrofobicidad. Esta división se realiza en catiónicos, hidrofóbicos y anfipáticos, es decir, aquellos que presentan dos regiones o dominios, una cara cargada, y una región hidrofóbica.<sup>136</sup>

<sup>131</sup> M. J. Kogan, O. Lopez, M. Cocera, C. L. Iglesias, A. De la Maza, E. Giralt, *Biopolymers*, **2004**, *73*, 258–268.

<sup>132</sup> J. F. Carneado, M. J. Kogan, N. V. Mau, S. Pujals, C. L. Iglesias, F. Heitz, E. Giralt, *J. Pept. Res.*, **2005**, *65*, 580–590.

<sup>133</sup> S. Pujals, J. F. Carneado, M. J. Kogan, J. Martinez, F. Cavelier, E. Giralt, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 8479–8483.

<sup>134</sup> S. Futaki, W. Ohashi, T. Suzuki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, H. Harashima, Y. Sugiura, *Bioconjug. Chem.*, **2001**, *12*, 1005–1011.

<sup>135</sup> I.A. Khalil, S. Futaki, M. Niwa, Y. Baba, N. Kaji, H. Kamiya, H. Harashima, *Gene Ther.*, **2004**, *11*, 636–644.

<sup>136</sup> Ü. Langel, *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols*, Langel, Ü., Ed., *Methods in Molecular Biology*, Springer New York: New York, NY, **2015**, Vol. 1324.

<sup>137</sup> C. Bechara, S. Sagan, *FEBS Lett.*, **2013**, *587*, 1693-1702.

Aunque la gran mayoría de los péptidos con propiedades penetrantes descritos hasta la fecha presentan algunas características comunes, entre ellas, una alta densidad de carga positiva, existen algunos péptidos aniónicos que contribuyen al aumento de la familia de los CPPs. Uno de sus integrantes es SAP(E), una versión modificada del péptido SAP en donde los aminoácidos de arginina fueron sustituidos por residuos de glutamato.<sup>138</sup> Esta variación da lugar a la secuencia peptídica (VELPPP)<sub>3</sub> con una carga neta negativa. Sorprendentemente, este primer CPP aniónico presentó la misma actividad de penetración celular que SAP (VRLPPP)<sub>3</sub>, su homólogo catiónico.<sup>138</sup> El descubrimiento de esta nueva clase de CPPs abre aun más el camino a la entrega intracelular de nuevas cargas moleculares.

Estas pautas iniciales de clasificación están sujetas a continuos cambios y modificaciones, dando lugar a la ampliación e introducción de nuevos péptidos penetrantes de células debido a constante aparición de péptidos de nueva generación con características mejoradas fruto de continuos esfuerzos investigadores.

**Tabla 1.** Selección de los péptidos penetrantes en células (CPPs) más representativos clasificados según su origen o naturaleza. Código de letras: natural (N), químico (Q) y sintético (S).

| Secuencia                                    | Nombre                    | Tipo |
|--|---------------------------|------|
| <b>Catiónicos</b>                            |                           |      |
| RKKRRQRRR                                    | pTAT <sub>49-57</sub>     | N    |
| RQIKIWFQNRRMKWKK                             | Penetratina-1             | N    |
| R <sub>n</sub> n=6-12                        | Poliargininas             | S    |
| LLIILRRRIRKQAHASK                            | pVEC                      | N    |
| RVIRVWFQNKRCCKDKK                            | Islet-1                   | N    |
| SQIKIWFQNKRAKIKK                             | Engrailed-2               | N    |
| <b>Anfipáticos</b>                           |                           |      |
| KETWWETWWTEWSQPKKRKY                         | Pep-1                     | Q    |
| GALFLGFLGAAGSTMGA                            | MPG                       | Q    |
| GWTLNSAGYKKGKINLKALAALAKKIL                  | Transportano              | Q    |
| KLALKALKALKAALKLA                            | MAP                       | S    |
| GLWRALWRLLRSLWRLLWRA                         | CADY                      | S    |
| NAATATRGRSAASRPTQRPRAPARSASRRPVQ             | VP22                      | N    |
| (VXLPPP) <sub>n</sub> X = H, R o K y n = 1-3 | Péptidos ricos en prolina | N    |
| SAP = (VRLPPP) <sub>3</sub>                  |                           |      |
| <b>Hidrofóbicos</b>                          |                           |      |
| AAVLLPVLLAAP                                 | K-FGF                     | N    |
| <b>Aniónicos</b>                             |                           |      |
| (VELPPP) <sub>3</sub>                        | SAP(E)                    | S    |

## 2.4 Mecanismos de translocación

Existe un gran interés en comprender las reglas generales que regulan la captación de los péptidos penetrantes de células. Por este motivo, se han llevado a cabo numerosas investigaciones para dilucidar el mecanismo de internalización de los CPPs, sin embargo, los detalles moleculares responsables de los diferentes métodos de translocación al interior celular

<sup>138</sup> I. Martín, M. Teixidó, E. Giralt, *ChemBioChem*, **2011**, *12*, 896-903

todavía son fuente de controversia.<sup>139</sup> Se han propuesto diversos modelos de transporte para la internalización de los CPPs, pero el mecanismo exacto todavía necesita ser esclarecido.<sup>140</sup> Sin embargo, múltiples evidencias apoyan que ambos mecanismos de internalización, translocación directa (independiente de energía) o endocitosis (dependiente de energía) están implicados en los procesos de internalización celular de los CPPs.<sup>141,142</sup> De forma clásica y general, para comprender los posibles caminos que utilizan estas cortas secuencias penetrantes, los mecanismos de transporte celular se dividen en transporte pasivo y en transporte activo.

#### 2.4.1 Transporte pasivo o independiente de energía

El transporte pasivo o independiente de energía hace referencia al movimiento de sustancias o moléculas aprovechando un gradiente electroquímico, de concentración o carga. Las cuatro clases principales de transporte pasivo son **filtración, ósmosis, difusión simple y difusión facilitada**.

En el proceso de difusión simple, una sustancia tiende a moverse de una zona de alta concentración o carga a un área de baja concentración o carga hasta que esta sea igual a lo largo de un espacio. Algunas moléculas, como el dióxido de carbono y el oxígeno, pueden difundir directamente a través de la membrana plasmática, pero otras moléculas, como las polares o cargadas, necesitan ayuda para cruzar su núcleo hidrofóbico. En la difusión facilitada, las moléculas difunden a través de la membrana plasmática con la ayuda de proteínas transmembrana, como son los canales y las proteínas transportadoras (**Fig. 10a-c**). Estas proteínas de transporte facilitado protegen estas moléculas del núcleo hidrofóbico de la membrana y proporcionan una ruta por la que pueden cruzar. Dentro de este tipo de mecanismos independiente de energía, se han descrito al menos tres modelos para la translocación de los CPPs: el modelo de micela invertida, que se da cuando existe un fuerte potencial de atracción entre el péptido y las cabezas lipídicas que provocan la deformación de la membrana,<sup>143</sup> la formación de poros o modelo de barril<sup>144</sup> y el modelo de “carpet-like o alfombra”<sup>145</sup> (**Fig. 11**).

#### 2.4.2 Transporte activo o dependiente de energía

El transporte activo o dependiente de energía celular tiene lugar en contra de un gradiente electroquímico, motivo por el cual necesita la energía de las células (**Fig. 10d**).<sup>146</sup> Una de las más importantes es la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  la cual utiliza la energía celular en forma de ATP. Especial mención requiere la **endocitosis**, otro de los mecanismos responsables de la internalización celular. La endocitosis incluye la **fagocitosis** y la **pinocitosis**, y es un proceso que utilizan las células para la internalización de solutos y fluidos del medio extracelular. Así, la endocitosis es el proceso de la ingestión celular con la cual la membrana plasmática se pliega

<sup>139</sup> K. M. Stewart, K. L. Horton, S. O. Kelley, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 2242–2255.

<sup>140</sup> J. Habault, J. L. Poyet, *Molecules*, **2019**, 24, 927.

<sup>141</sup> F. Madani, S. Lindberg, Ü. Langel, S. Futaki, A. Gräslund, *J. Biophys.*, **2011**, 2011, 414729.

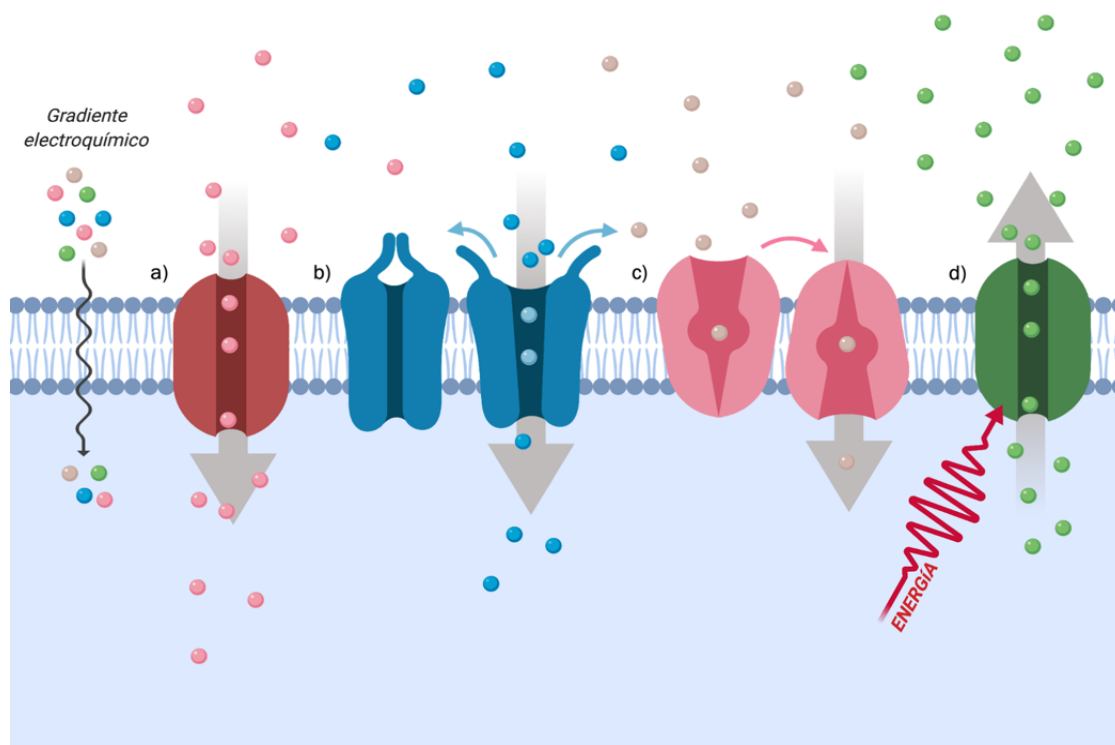
<sup>142</sup> S. Trabulo, A. L. Cardoso, M. Manom M. C. P. de Lima, *Pharmaceuticals*, **2010**, 3, 961-993.

<sup>143</sup> S. Kawamoto, M. Takasu, T. Miyakawa, R. Morikawa, T. Oda, S. Futaki, H. Nagao, *J. Chem. Phys.*, **2011**, 134, 095103.

<sup>144</sup> C. Allolio, A. Magarkar, P. Jurkiewicz, K. Baxová, M. Javanainen, P. E. Mason, R. Sachl, M. Cebecauer, M. Hof, D. Horinek, V. Heinz, R. Rachel, C. M. Ziegler, A. Schröfel, P. Jungwirth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2018**, 115, 11923-11928.

<sup>145</sup> K. Matsuzaki, K. Sugishita, K. Miyajima, *FEBS Lett.*, **1999**, 449, 221-224.

hacia el interior para aportar diferentes sustancias a la célula. La fagocitosis se lleva a cabo en células especializadas (macrófagos y neutrófilos) y permite la internalización de grandes partículas. En cambio, la pinocitosis tiene lugar en todo tipo de células para la absorción de material extracelular, líquido con posibles moléculas disueltas. La pinocitosis puede clasificarse en varios tipos de vías: **macropinocitosis**, tipo de pinocitosis que se caracteriza por la formación de grandes extensiones de la membrana plasmática, **endocitosis mediada por clatrina** o **endocitosis mediada por caveolina**.<sup>146</sup>



**Figura 10.** Proteínas implicadas en el mecanismo de difusión facilitada independiente de energía gracias al transporte a favor de un gradiente electroquímico: esquema de los tipos de proteínas canal de a) apertura constante o b) con “compuertas” y c) proteína transportadora capaces de transportar determinadas moléculas de un lado al otro de la membrana gracias a un cambio conformacional. d) Proteína implicada en el transporte activo dependiente de energía para el transporte de sustancias en contra del gradiente electroquímico. Figura creada con BioRender.com.

En el caso de estos mecanismos dependientes de energía, y en especial en el caso de la endocitosis, se han encontrado diferentes casos de internalización de CPPs empleando tanto rutas independientes o dependientes de clatrina<sup>147,148</sup> y/o caveolina,<sup>149</sup> así como mecanismos que implican macropinocitosis.<sup>150,151</sup> Un resumen de los modelos que implican la internalización de estas pequeñas secuencias con características penetrantes se muestra en la **Figura 11**. Es importante resaltar que muchos factores, como las condiciones experimentales, pH, temperatura, tipo celular, naturaleza o cantidad de los CPPs o del cargo, pueden influir en el proceso de translocación, así como en la eficacia del escape endosomal.<sup>141,142</sup>

<sup>146</sup> G. J. Doherty, H. T. McMahon, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 857-902

<sup>147</sup> S. Mayor, R. E. Pagano, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**, *8*, 603-612.

<sup>148</sup> J. P. Richard, K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu, L. V. Chernomordik, *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 15300-15306.

<sup>149</sup> A. Ferrari, V. Pellegrini, C. Arcangeli, A. Fittipaldi, M. Giacca, F. Beltram, *Mol. Ther.*, **2003**, *8*, 284-294.

<sup>150</sup> I. Nakase, K. Noguchi, A. Aoki, T. Takatani-Nakase, I. Fujii, S. Futaki, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1991

<sup>151</sup> X. Wu, W. Gehring, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2014**, *443*, 1136-1140.

Inicialmente se pensaba que la internalización de péptidos ricos en residuos de arginina como el péptido TAT<sub>49-57</sub> o las poliargininas parecían atravesar la membrana plasmática mediante mecanismos independientes de energía que no requerían un camino de internalización endocítico.<sup>77</sup> Posteriores investigaciones esclarecieron un posible artefacto debido al análisis de la internalización de los CPPs tras la fijación de las células.<sup>152</sup> Este proceso de fijación causaba rupturas y perturbaciones en las membranas afectando a la absorción de los péptidos de la superficie de la membrana plasmática o los cargados en endosomas, dando lugar a una difusión en el citosol e incluso una localización nuclear.<sup>148,153</sup> A partir de entonces todos los estudios se realizaron en célula vivas y sin fijación, encontrando predominantemente estructuras punteadas.<sup>152</sup>

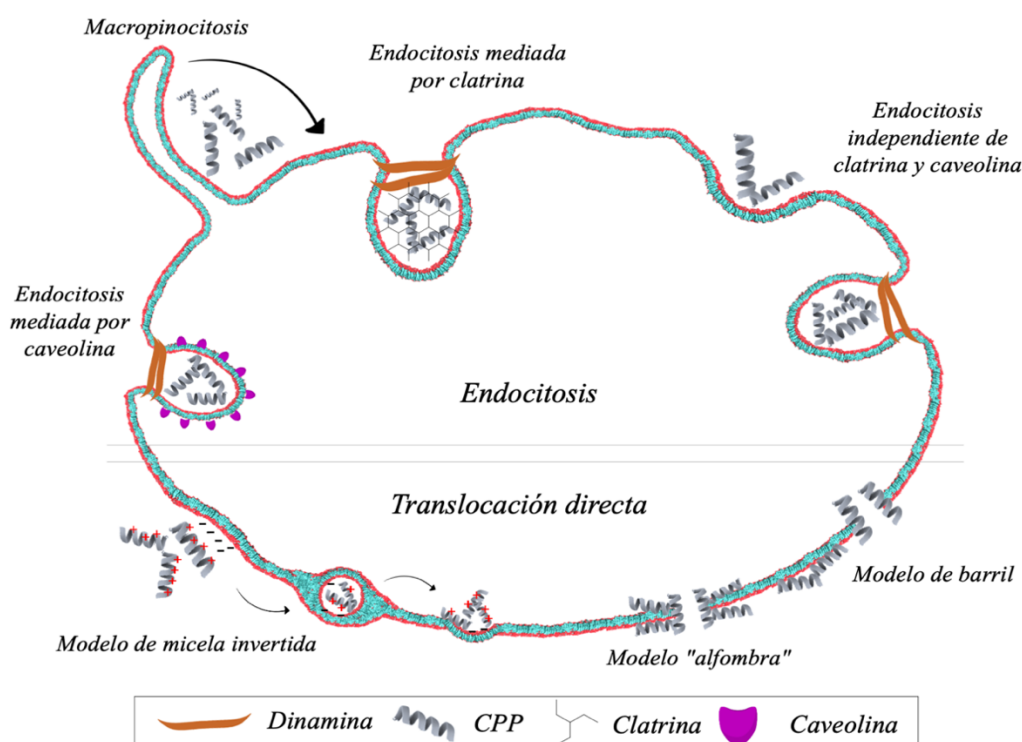


Figura 11. Posibles mecanismos de internalización celular de los CPPs. Figura creada con BioRender.com

El grupo de investigación del profesor S. F. Dowdy demostró como la internalización de péptidos como la octa-arginina (R<sub>8</sub>) o el péptido TAT<sub>49-57</sub> era bloqueada con el empleo de Amilorida, un inhibidor de los intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> el cual ha sido documentado por impedir el camino de la macropinocitosis.<sup>154</sup> Estos resultados sugieren que la macropinocitosis juega el rol más importante en la captación endocítica de péptidos ricos en residuos de arginina y sus derivados,<sup>155,156,157</sup> aunque también se ha observado la contribución de otros mecanismos de endocitosis como el mediado por clatrina<sup>148</sup> y/o caveolina.<sup>149</sup> El profesor S. Futaki observó una

<sup>152</sup> J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 585-590.

<sup>153</sup> I. Nakase, M. Niwa, T. Takeuchi, K. Sonomura, N. Kawabata, Y. Koike, M. Takehashi, S. Tanaka, K. Ueda, J. C. Simpson, A. T. Jones, Y. Sugjura, S. Futaki, *Mol. Ther.*, **2004**, 10, 1011-1022.

<sup>154</sup> J. S. Wadia, R. V. Stan, S.F. Dowdy, *Nat. Med.*, **2004**, 10, 310-315.

<sup>155</sup> S. Futaki, I. Nakase, A. Tadokoro, T. Takeuchi, A.T. Jones, *Biochem. Soc. Trans.*, **2007**, 35, 784-787.

<sup>156</sup> I. Nakase, A. Tadokoro, N. Kawabata, T. Takeuchi, H. Katoh, K. Hiramoto, M. Negishi, M. Nomizu, Y. Sugiura, S. Futaki, *Biochemistry*, **2007**, 46, 492-501.

<sup>157</sup> I. M. Kaplan, J. S. Wadia, S. F. Dowdy, *J. Control. Release*, **2005**, 102, 247-253.

internalización difusa y localización en el citoplasma y núcleo de este tipo de péptidos a 4°C, condiciones en las que se produce la inhibición del mecanismo de endocitosis, aunque con menos eficacia que a 37°C. Esto pone de manifiesto que, a pesar de que el camino mayoritario de internalización suele ser endocitosis, es posible que una fracción de péptido pueda acceder al citosol con ausencia del mecanismo endocítico.<sup>153</sup>

En cuanto a la Penetratina-1, tal y como se describió anteriormente, aunque se trata de un péptido básico, presenta una estructura anfifílica con un triptófano fundamental para su internalización.<sup>86</sup> Por esta razón se pensó, que los péptidos policatiónicos presentarían un mecanismo de internalización diferente a lo que ocurriría con la Penetratina-1. Diversos estudios sugirieron no solo diferentes mecanismos de entrada, sino también que el mismo CPP podría usar más de un mecanismo de internalización dependiendo de condiciones experimentales como la concentración, pH o temperatura.<sup>141,142</sup> Esto ocurre especialmente con péptidos anfipáticos los cuales tienden a interactuar con los lípidos y adoptar una estructura secundaria con la membrana, lo que modifica la integridad de la bicapa lipídica. De esta forma, en un principio, se propuso un modelo de internalización en donde la carga positiva interactuaba con la carga negativa de la membrana lipídica, generándose una estabilización en la superficie de las membranas por interacciones electrostáticas. El Trp<sub>48</sub> permitiría la acumulación y desestabilización de la membrana induciendo una invaginación local de la membrana plasmática, que desencadenaría la formación de una micela invertida con los péptidos encapsulados en su cavidad hidrofílica y la liberación final en el citoplasma.<sup>87</sup> Este modelo todavía sigue siendo estudiado y otras aproximaciones no pueden ser descartadas.<sup>140</sup>

En los mecanismos de internalización de los CPPs, es imprescindible mencionar el papel fundamental de los proteoglicanos, en concreto los que contienen heparán sulfato (HSPG).<sup>158</sup> Los proteoglicanos son una clase de glicoproteínas, formadas por un núcleo proteico unido covalentemente a un tipo especial de polisacáridos, los glucosaminoglicanos, que presentan la peculiaridad de encontrarse cargados negativamente bajo condiciones fisiológicas, debido a la presencia de grupos sulfato. Las interacciones electrostáticas entre los CPPs y estas proteínas aniónicas de membrana facilitan su acumulación sobre la superficie celular, desencadenando posteriormente diferentes mecanismos de entrada dependiendo del cada tipo de CPP. Por ello, la deficiencia de HSPG en algunas líneas celulares provoca una disminución de la internalización. Se observó como los proteoglicanos eran indispensables para la reorganización de actina y la captación por macropinocitosis.<sup>153</sup> Como uno de los hallazgos más recientes en cuanto a los mecanismos de internalización de los CPPs, cabe destacar el descubrimiento por parte del grupo de investigación del profesor S. Futaki del receptor Sindecán-4, el cual favorece la internalización de R<sub>8</sub> a través de un mecanismo de macropinocitosis.<sup>159</sup>

Aunque es difícil establecer un esquema general del mecanismo de captación de los CPPs y estos todavía siguen siendo discutidos, existe un consenso general en el que el primer contacto entre CPPs y la superficie celular tiene lugar a través de las interacciones electrostáticas con los proteoglicanos, y que posteriormente el camino de captación celular depende de varios parámetros incluyendo: la naturaleza y estructura secundaria de los CPPs, su habilidad para interactuar con la superficie celular y los componentes lipídicos de la membrana, la naturaleza, el tipo y la concentración activa del cargo o el tipo de célula y composición de la membrana. Se sabe que pequeñas diferencias estructurales causan considerables diferencias en

<sup>158</sup> T. Suzuki, S. Futaki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 2437-2443.

<sup>159</sup> I. Nakase, K. Osaki, G. Tanaka, A. Utani, S. Futaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2014**, 446, 857-862.

los mecanismos de internalización, eficiencia de su escape endosomal y localización celular de los CPPs. Es un hecho que, en la mayoría de los casos, los CPPs pueden ser internalizados gracias al trabajo conjunto de varios mecanismos simultáneos de internalización celular.<sup>141,142</sup>

## 2.5 Escape endosomal

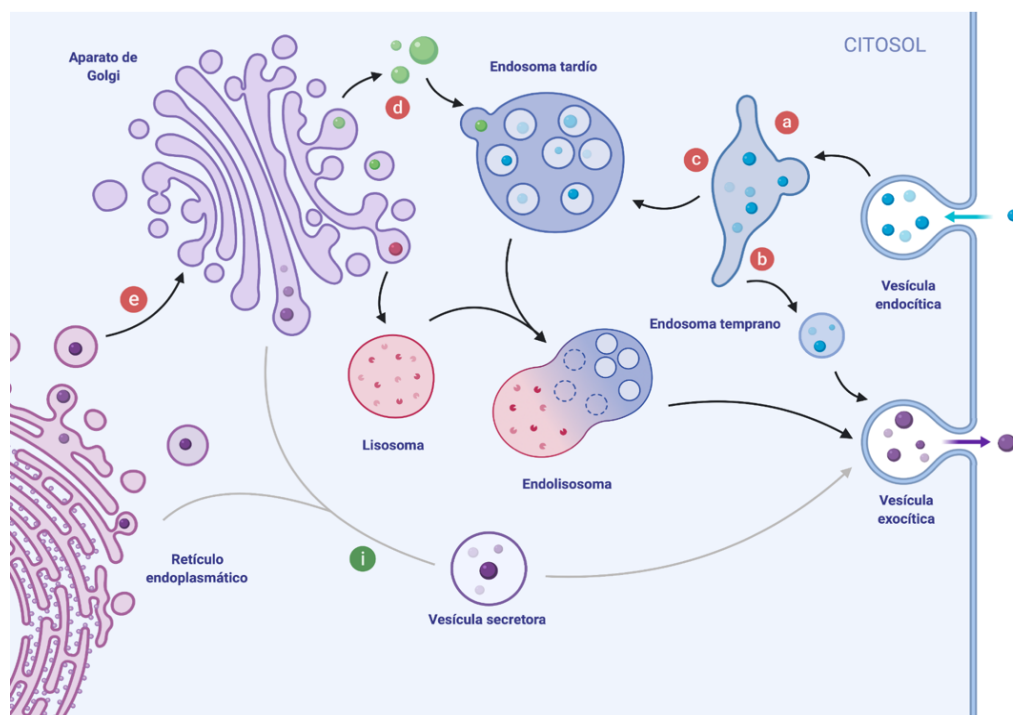
Además de la difícil tarea de atravesar la membrana plasmática, los CPPs cuentan con otra importante barrera que necesita ser superada para poder entregar con éxito el cargo correspondiente en el interior celular: **los endosomas**.<sup>160</sup> Estos compartimentos dentro del citoplasma se encargan de procesar moléculas internalizadas desde el exterior celular. Siendo la endocitosis una de las principales rutas de internalización celular que siguen los CPPs, es importante conocer las características biológicas para poder abordar el reto del escape endosomal.

Los endosomas sufren importantes transformaciones desde su creación en las membranas plasmáticas hasta su fusión con los lisosomas. Cada etapa cuenta con funciones y propiedades diferenciadas, dando lugar a una ruta de maduración endosomal claramente definida. Este proceso se inicia con la endocitosis, durante el cual las sustancias y el fluido ingerido se engloban en una depresión endocítica conocida como **vesícula endocítica** la cual se fusiona con **el endosoma temprano**. Estos endosomas tempranos se encuentran en la periferia celular y son los encargados de recibir el contenido procedente de las vesículas endocíticas. Se caracterizan por tener un pH entre 6,8 y 6,1 y por su baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además de una zona encargada de recibir las vesículas (**Fig. 12a**), dichos endosomas cuentan con otras regiones como la de reciclaje (**Fig. 12b**), que devuelve las vesículas a la membrana, o la vacuolar (**Fig. 12c**). Son precisamente estos dominios vacuolares los que, al madurar, se transforman en **endosomas tardíos**. Estos nuevos endosomas tardíos se forman con fragmentos de los endosomas tempranos, presentan un mayor tamaño, una forma ovalada, una superficie con alta carga negativa debido a la presencia de lípidos aniónicos y un pH de entre 6,0 y 4,8, bastante más ácido que el de los endosomas tempranos. Por otra parte, ya no se encuentran tan cerca de la membrana, presentan una ubicación más central dentro de la célula y al madurar ganan movilidad y avanzan hacia el núcleo celular. Las endosomas tardíos reciben vesículas e hidrolasas ácidas (**Fig. 12d**) del aparato de Golgi hasta que, finalmente, acaban fusionándose con los **lisosomas** y formando los **endolisosomas**. Los lisosomas son orgánulos formados en el aparato de Golgi con un pH muy bajo, alrededor de 4,5, y muy ricos en enzimas hidrolíticas y proteolíticas cuya función es degradar el material que reciben para, posteriormente, ser expulsado de nuevo al exterior celular.<sup>161</sup>

Mediante el análisis de este proceso de transformación y maduración de los endosomas (**Fig. 12**), es simple comprender que si los fármacos o cargos específicos que realizan su función en el citosol o en el núcleo celular no consiguen escapar de los endosoma antes de que este se fusione con los lisosomas, estarán condenados a degradarse sin llevar a cabo su función terapéutica. De esta forma, los péptidos penetrantes de células tienen por delante un reto de vital importancia, dotando, a los cargos o moléculas que transportan, con mecanismos que les permitan salir de los endosomas y llegar al citosol antes de que se produzca su degradación o exocitosis.

<sup>160</sup> C. C. Scott, F. Vacca, J. Gruenberg, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **2014**, *31*, 2-10.

<sup>161</sup> J. Huotari, A. Helenius, *EMBO J.*, **2011**, *30*, 3481-3500



**Figura 12.** Proceso de maduración de los endosomas. Región de a) recepción, b) reciclaje y c) vacuolar del endosoma temprano. d) Vesículas e hidrolasas ácidas sintetizadas en el aparato de Golgi que rebajan el pH del endosoma tardío. e) Transferencia de proteínas y enzimas mediante vesículas de transición desde el retículo endoplasmático donde fueron sintetizadas hasta el aparato de Golgi para su posterior modificación y maduración. El aparato de Golgi empaqueta, condensa, acumula y otorga una dirección a las proteínas sintetizadas hacia las vesículas de secreción, lisosomas o membrana celular. i) Mecanismo convencional de secreción a través de la ruta RE/Golgi para la secreción de proteínas, enzimas, receptores o transmisores al medio extracelular que contribuyen a la comunicación de la célula o a la respuesta a señales exógenas. Figura creada con BioRender.com.

En la naturaleza, los virus realizan esta función del escape endosomal de forma eficiente.<sup>162</sup> En primer lugar, son capaces de unirse a las proteínas o carbohidratos de la membrana celular para poder interactuar específica y multivalentemente con receptores de la superficie. Estas interacciones desencadenan su internalización mediante su fusión con la membrana celular. El descenso de pH en el interior de los endosomas provoca cambios en los virus que les permiten introducir en el citosol su cápside o partícula viral. Por último, ya en el citosol y tras avanzar hasta el núcleo, los virus replican su material genético utilizando la maquinaria celular.<sup>163</sup> Los virus sufren diversos cambios dependientes del pH en el que se encuentran. Uno de estos cambios ocurre en los virus que forman poros en la membrana del endosoma. Estos virus cuentan con ciertos péptidos que, al encontrarse a pH ácido, adoptan una estructura de hélice- $\alpha$  que interactúa con fosfolípidos y forma poros en la membrana para el escape del material genético del virus.<sup>164</sup>

Estos mecanismos biológicos han servido de inspiración para la síntesis de CPPs capaces de escapar de los endosomas.<sup>164</sup> Liposomas modificados con octa-arginina son capaces de fusionarse con la membrana de los endosomas a pH ácido gracias a interacciones electrostáticas.<sup>165</sup> Destacan por ejemplo los péptidos derivados de la subunidad HA2 del virus

<sup>162</sup> A. E. Smith, A. Helenius, *Science*, **2004**, 304, 237-242.

<sup>163</sup> J. Mercer, M. Schelhaas, A. Helenius, *Annu. Rev. Biochem.*, **2010**, 79, 803-833.

<sup>164</sup> A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, *J. Control. Release*, **2011**, 151, 220-228.

<sup>165</sup> A. El-Sayed, I. A. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima, *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 23450-23461.

influenza. Esta proteína viral cuenta con una región hidrofóbica en el extremo N-terminal que queda expuesta al descender el pH y permite la fusión con la membrana del endosoma. De esta forma, basándose en su secuencia, se han preparado diferentes péptidos impulsores de la fusión. Otro caso es el de los péptidos GALA. Estos péptidos cuentan con residuos de triptófano e histidina y contienen la secuencia que da lugar a su nombre, ácido Glutámico-Alanina-Leucina-Alanina repetida. Cuando el pH desciende en torno a 5, GALA sufre un cambio conformacional adoptando forma de hélice- $\alpha$  anfifílica que le permite interactuar con las membranas lipídicas del endosoma y generar poros por los que pueden escapar moléculas de pequeño tamaño.<sup>166</sup>

Otros ejemplos son los péptidos derivados de LAH4. Son péptidos catiónicos anfipáticos ricos en histidinas y aminoácidos hidrofóbicos. A pH neutro se encuentran en una posición transmembranal, pero al descender el pH, los residuos de histidina se protonan y provocan un cambio conformacional que modifica su posición y permiten la interacción electrostática con los aniones de la membrana, provocando la ruptura de los endosomas.<sup>167</sup> Un caso diferente es el de la internalización fotoquímica, donde se usan moléculas que generan una especie muy reactiva de oxígeno al ser irradiadas con luz, la cual rompe la membrana de los endosomas permitiendo el escape del contenido.<sup>168</sup> Además de estos péptidos con secuencias optimizadas para responder ante el cambio de pH, existen ejemplos de péptidos fusionados a otro tipo de moléculas encargadas de proporcionarles las capacidades del escape endosomal. Existe así, el caso de péptidos unidos a lípidos con capacidad para fusionarse con las membranas, como por ejemplo el R<sub>8</sub>-DOPE, que proporciona un vehículo eficaz de entrega citoplasmático.<sup>169</sup> A pesar de los avances hasta el momento, el escape endosomal sigue siendo un complejo reto por superar, sobre todo para aquellas macromoléculas que presentan un gran potencial en aplicaciones biológicas o médicas, como por ejemplo los anticuerpos o las nanopartículas inorgánicas.<sup>168</sup>

## 2.6 Cargos

Los CPPs son vectores con gran potencial para el transporte de cargos biológicamente activos gracias a su capacidad penetrante, convirtiéndose en una de sus principales aplicaciones.<sup>170,171</sup> Este hecho ha desencadenado la aparición de numerosos trabajos en los cuales se describen diferentes secuencias peptídicas penetrantes unidas a distintos cargos moleculares para su internalización celular.<sup>172</sup> Una de las ventajas de la utilización de los CPPs como moléculas transportadoras es su gran solubilidad en ambientes acuosos, lo que permite una buena compenetración a la hora de facilitar la entrega de cargos hidrofílicos.

En primer lugar, para que puedan actuar como transportadores de otras moléculas, es necesaria la formación de un complejo CPP-Cargo (**Fig. 13**). Estos complejos pueden presentar diversa naturaleza y, por lo tanto, los dotará de diferentes características. El caso más común, es el empleo de enlaces covalentes entre la estructura peptídica y el cargo de interés.<sup>170</sup> En esta

<sup>166</sup> W. Li, F. Nicol, F. C. Szoka, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, *56*, 967-985.

<sup>167</sup> J. K. W. Lam, W. Liang, Y. Lan, P. Chaudhuri, M. Y. T. Chow, K. Witt, L. Kudsova, A. J. Mason, *J. Control. Release*, **2012**, *158*, 293-303.

<sup>168</sup> A. El-Sayed, S. Futaki, H. Harashima, *AAPS J.*, **2009**, *11*, 13-22.

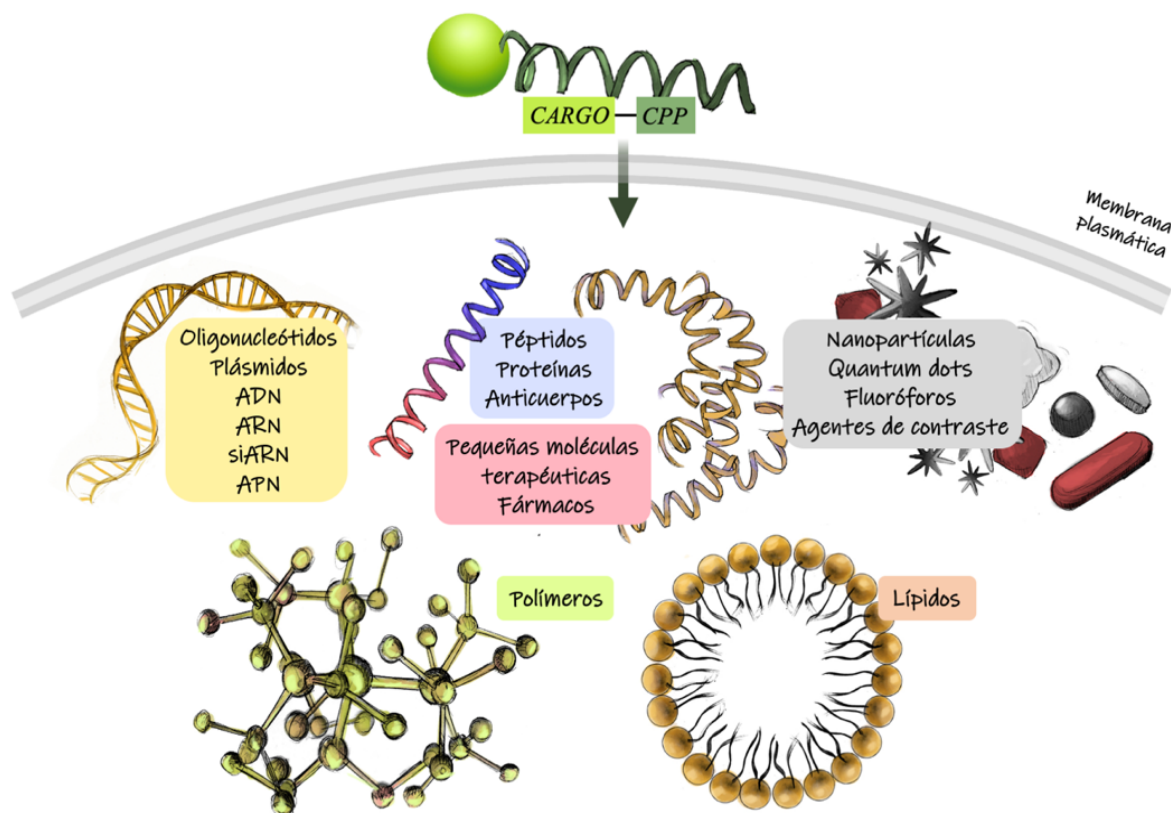
<sup>169</sup> A. Koshkaryev, A. Piroyan, V. P. Torchilin, *Cancer Lett.*, **2013**, *334*, 293-301.

<sup>170</sup> M. Mäe, Ü. Langel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2006**, *6*, 509-514.

<sup>171</sup> A. van den Berg, S. F. Dowdy, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2011**, *22*, 888-893.

<sup>172</sup> P. M. Fischer, *Med. Res. Rev.*, **2007**, *27*, 755-795.

situación, el cargo puede conectarse a la cadena lateral de uno de los aminoácidos de la estructura peptídica. Se usan ampliamente las cadenas laterales de las lisinas y las cisteínas, ya que sus grupos amina y tiol, respectivamente, cuentan con un gran carácter nucleófilo. Pequeñas moléculas bifuncionales espaciadoras se han empleado para aumentar la distancia entre ambas partes del complejo CPP-Cargo y de esta forma, disminuir los impedimentos estéricos y facilitar las interacciones de los CPPs con la membrana celular.<sup>173</sup> Entre las distintas conexiones para la formación del complejo CPP-Cargo que se han empleado, cabe destacar la formación de un enlace disulfuro entre las cisteínas del péptido y los grupos tioles del cargo a transportar. Este enlace presenta la capacidad de escindirse en el ambiente reductor intracelular, permitiendo la liberación del cargo una vez se encuentre en el interior. En concreto, el glutatión, un tripéptido presente en el interior de las células y que presenta el cometido de la reducción de especies oxidantes peligrosas para su supervivencia, es el principal encargado de esta ruptura S-S. Por este motivo, los enlaces disulfuro, son ampliamente empleados en el suministro de cargos que se vuelven activos una vez liberados.<sup>174</sup>



**Figura 13.** Aplicaciones de los péptidos penetrantes de células como vehículos de transporte celular.

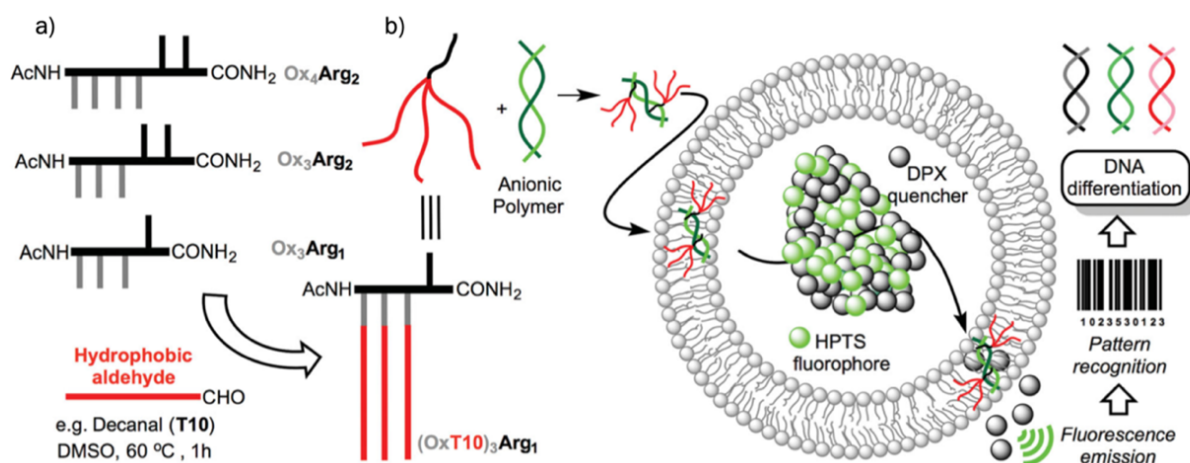
A pesar de la simplicidad y robustez de las estrategias con enlaces covalentes, estas cuentan con ciertas limitaciones desde el punto de vista químico. Una de estas desventajas es que la formación de enlaces covalentes con el cargo puede modificar su estructura química y causar posibles problemas por alteraciones de su actividad biológica. Por ese motivo han surgido alternativas basadas en enlaces no-covalentes que, a pesar de su naturaleza más débil, dan lugar a un gran número de interacciones (multivalencia) que permiten la formación de un complejo

<sup>173</sup> M. Zorko, Ü. Langel, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, 57, 529-545.

<sup>174</sup> L. R. Jones, E. A. Goun, R. Shinde, J. B. Rothbard, C. H. Contag, P. A. Wender, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 6526-6527.

estable. Además, la unión no-covalente entre la estructura peptídica y el cargo, permite en muchos casos la separación o destrucción del complejo una vez se encuentra en el interior celular. Esta aproximación ha sido empleada con péptidos como MPG y Pep-1, los cuales, debido a su naturaleza anfipática, presentan interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con ácidos nucleicos y proteínas respectivamente, lo que les permite formar nanopartículas estables capaces de ser internalizadas tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>175</sup>

Más allá del tipo de enlace utilizado en la formación de estos complejos, la naturaleza de los cargos transportados por CPPs es muy variada y existen numerosos ejemplos de cada uno de ellos (**Fig. 13**). Uno de los cargos más interesantes son las proteínas, sobre todo aquellas que presentan propiedades terapéuticas. La  $\beta$ -galactosidasa, enzima que cataliza la hidrólisis de ciertos carbohidratos, fue una de las primeras proteínas modelo transportada al interior celular empleando esta estrategia. El péptido TAT<sub>49-57</sub> fue el vector utilizado en este estudio en ratones que demostró la heterogénea distribución de este complejo en el organismo.<sup>176</sup> Desde entonces, los CPPs han sido utilizados como transportadores de decenas de proteínas para su entrega intracelular.<sup>177,178</sup>



**Figura 14.** a) Conjunto de diferentes esqueletos reactivos catiónicos Ox<sub>3</sub>Arg<sub>1</sub>, Ox<sub>3</sub>Arg<sub>2</sub>, Ox<sub>4</sub>Arg<sub>2</sub>. b) Formación de los complejos neutros activados (OxT10)<sub>3</sub>Arg<sub>1</sub>/ADN capaces de atravesar la membrana de las vesículas fluorogénicas.<sup>121</sup> Figura adaptada con los permisos de la Ref. 121 Copyright 2014 John Wiley and Sons.

De la misma forma, el transporte de ácidos nucleicos (ADN, ARN, siARN, APNs, plásmidos, oligonucleótidos), que presentan una internalización en muchos casos limitada por su alto peso molecular y carga negativa, han despertado gran entusiasmo en la comunidad científica gracias a las posibilidades que la terapia génica ofrece para reparar la expresión de proteínas.<sup>179,180</sup> Para el transporte de ácidos nucleicos, los vectores virales han resultado ser

<sup>175</sup> S. Deshayes, M. Morris, F. Heitz, G. Divita, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, *60*, 537-547.

<sup>176</sup> S. R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, S.F. Dowdy, *Science*, **1999**, *285*, 1569-1572.

<sup>177</sup> B. Gupta, T. S. Levchenko, V. P. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, *57*, 637-651.

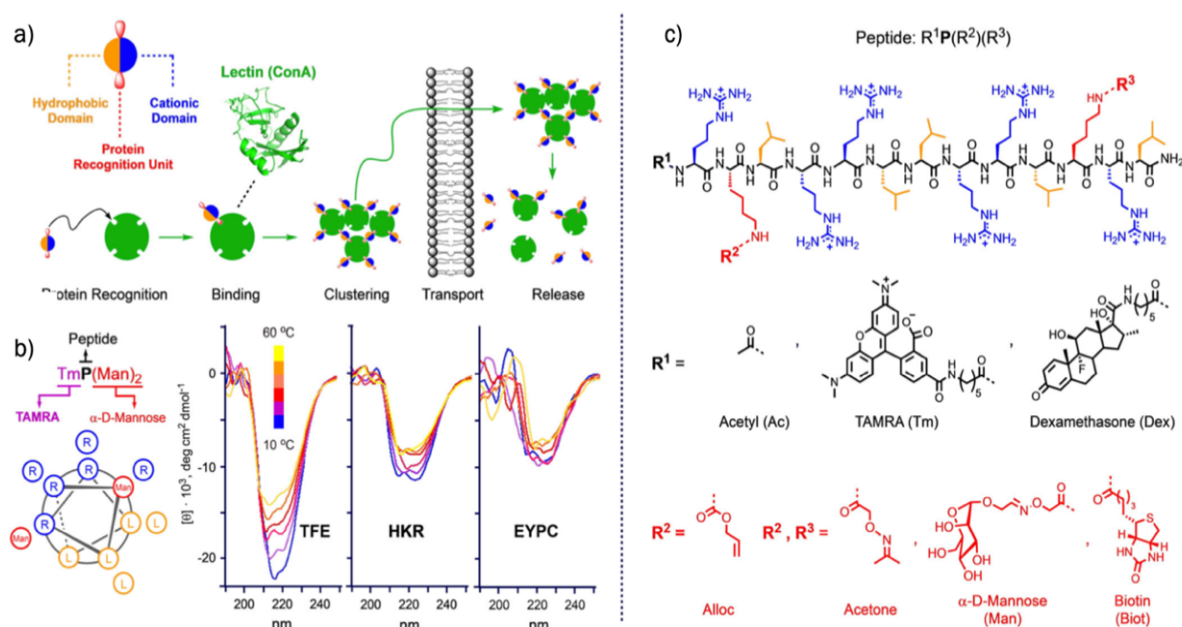
<sup>178</sup> A. Bolhassani, B. S. Jafarzade, G. Mardani, *Peptides*, **2017**, *87*, 50-63.

<sup>179</sup> J. M. Priegue, D. N. Crisan, J. Martínez-Costas, J. R. Granja, F. Fernández-Trillo, J. Montenegro, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 7492-7495.

<sup>180</sup> J. Priegue, I. Lostalé-Seijo, D. Crisan, J. Granja, F. Fernández-Trillo, J. Montenegro, *Biomacromolecules*, **2018**, *19*, 2638-2649.

efectivos, pero los problemas relacionados con la respuesta inmunológica han hecho que los CPPs se erigiesen como una alternativa más prometedora. Así, a lo largo de los años, se han descubierto numerosos péptidos capaces de favorecer el transporte de oligonucleótidos. Destacan en esta labor, los péptidos anfifílicos KALA<sup>181</sup> (variante del GALA), péptidos que cuentan en su extremo N-terminal con una unidad de ácido esteárico (péptidos estearilados),<sup>182</sup> TAT<sub>49-57</sub> y Antennapedia, o los casos más actuales de modificaciones de tetralisinas con grupos guanidiniocarbonilpirrol.<sup>183</sup>

En nuestro grupo de investigación se han sintetizado péptidos catiónicos que se unen a aldehídos hidrofóbicos mediante enlaces oxima<sup>121</sup> (**Fig. 14**) para dar lugar a péptidos anfifílicos pseudo-helicoidales, los cuales son capaces de transportar una variedad de moléculas de ADN aniónicas en experimentos en vesículas.<sup>122</sup> Además, se estudió la relación de la capacidad de estos péptidos para atravesar la membrana en función de su anfifilicidad.<sup>122</sup> En posteriores trabajos, se ha continuado explotando la química de los enlaces oxima para la síntesis de estructuras peptídicas ricas en aminoácidos de arginina que contienen ligandos carbohidrato para el transporte selectivo de determinadas proteínas como la Concanavalina A (**Fig. 15**).<sup>123</sup>



**Figura 15.** Estructura del péptido, dicroísmo circular y modelo propuesto para el mecanismo de transporte selectivo. a) Representación minimalista del péptido con los diferentes dominios anfifílicos segregados y esquema de los diferentes pasos que intervienen en el transporte intracelular selectivo de proteínas: reconocimiento, unión, transporte y liberación. b) Espectros de CD en diferentes condiciones: TFE (trifluoroetanol), tampón HKR (pH 7,4) y liposomas de fosfatidilcolina de huevo (EYPC). c) Estructura química del péptido con las cadenas laterales en diferentes colores unido a los diferentes ligandos haciendo uso de la química dinámica.<sup>123</sup> Figura adaptada con los permisos de la Ref. 123 Copyright 2018 John Wiley and Sons.

De igual forma, en nuestro grupo, se han sintetizado polihidrazonas también para el transporte de ácidos nucleicos,<sup>179,180</sup> así como, CPPs dinámicos con colas hidrofóbicas unidas mediante enlaces hidrazona para el transporte de plásmidos<sup>124</sup> (**Fig. 16a**) o de la proteína

<sup>181</sup> T. B. Wyman, F. Nicol, O. Zelphati, P. V. Scaria, C. Planck, F. C. Szoka, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 3008-3017.

<sup>182</sup> S. Futaki, W. Ohashi, T. Suzuki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, H. Harashima, Y. Sugiura, *Bioconjugate Chem.*, **2001**, *12*, 1005-1011.

<sup>183</sup> M. Li, S. Schlesiger, S. K. Knauer, C. Schmuck, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 2941-2944.



información al permitir la visualización de transportadores o agentes terapéuticos en el interior celular. Paralelamente, se han desarrollado estrategias para el transporte de liposomas, vesículas de tamaño nanométrico compuestas mayoritariamente por colesterol y fosfolípidos, fáciles de sintetizar y de funcionalizar en su exterior, además de destacar por su capacidad para encapsular agentes terapéuticos. La funcionalización de las superficies de liposomas con CPPs permite modificar su farmacocinética y favorecer su interacción con las membranas plasmáticas, necesaria para lograr con éxito la internalización celular. Esta estrategia del empleo de vesículas ha permitido el acceso a una gran variedad de células y tejidos, incluido bacterias, membranas de células de algas y mamíferos, y la difícil tarea de atravesar la barrera hematoencefálica.<sup>189,190</sup>

En líneas generales, la cantidad y variedad de cargos que se han transportado al interior celular gracias a los CPPs es enormemente amplia y aumenta día a día gracias a la activa investigación en este campo. Gracias a ellos, muchas moléculas de interés han podido ser internalizadas, lo que conlleva grandes beneficios para la comunidad científica y abre la puerta al futuro desarrollo de avances beneficiosos para la sociedad. Los CPPs se han consolidado como transportadores y, a pesar de su ya innegable y prometedor potencial, sus habilidades no dejan de sorprendernos.

## 2.7 Aplicaciones terapéuticas

El gran éxito de los CPPs en estudios *in vitro* ha permitido en algunos casos dar un paso hacia adelante en la realización de experimentos y pruebas *in vivo*. En este tipo de estudios los CPPs llevan a cabo dos funciones principales. Una de ellas, dadas sus ya tan conocidas propiedades penetrantes, es su papel como transportadores de cargos con actividad biológica a través de la membrana plasmática. Por otra parte, desempeñan una función de vectorización. Es decir, los CPPs también presentan, en ciertos casos, la capacidad de alterar la biodistribución de las moléculas que transportan al dirigir las a otras dianas o permitir su acceso a zonas antes inalcanzables. Por este motivo se han realizado estudios en animales e incluso en humanos, encontrándose ya varios de estos CPPs en diferentes fases clínicas.<sup>191</sup>

En el caso de estudios en animales, se han usado principalmente CPPs candidatos al tratamiento tanto tópico como sistémico de enfermedades neurológicas, cardíacas y oncológicas, así como fármacos contra el dolor y la inflamación.<sup>192,193</sup> Un ictus o infarto cerebral, es una enfermedad cerebrovascular caracterizada por la oclusión de una arteria, lo que conlleva la carencia de oxígeno en el cerebro, ocasionando enormes daños. Es muy importante poder transportar a través de la barrera hematoencefálica fármacos capaces de reducir los daños ocasionados,<sup>194</sup> lo cual resulta muy complejo dada la exhaustiva regulación del transporte molecular que presenta para proteger el sistema nervioso central. Sin embargo, algunos péptidos han logrado atravesarla, mostrando grandes propiedades al ser administrados por vía tanto intravenosa como intraperitoneal, es el caso del tetrapéptido fenilprolina (PhPro)<sub>4</sub> del profesor E. Giralt.<sup>195</sup> En el caso de tratamientos contra el cáncer, los CPPs se han utilizado

<sup>189</sup> E. G. Stanzl, B. M. Trantow, J. R. Vargas, P. A. Wender, *Acc. Chem. Res.*, **2013**, *46*, 2944–2954.

<sup>190</sup> V. P. Torchilin, R. Rammohan, V. Weissig, T. S. Levchenko, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2001**, *98*, 8786–8791.

<sup>191</sup> M.C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nat. Biotechnol.*, **2001**, *19*, 1173–1176.

<sup>192</sup> G. P. H. Dietz, M. Bähr, *Mol. Cell. Neurosci.*, **2004**, *27*, 85–131.

<sup>193</sup> S. B. Fonseca, M. P. Pereira, S. O. Kelley, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2009**, *61*, 953–964.

<sup>194</sup> D. Mochly-Rosen, *Science*, **1995**, *268*, 247–251.

<sup>195</sup> P. Arranz-Gibert, B. Guixer, M. Malakoutikhah, M. Muttenthaler, F. Guzmán, M. Teixidó, E. Giralt, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 7357–7364.

como transportadores de moléculas tóxicas, como la doxorrubicina, con el propósito de dirigirlas a las células tumorales.<sup>196</sup> De igual forma, han transportado inhibidores con el objetivo de cesar el crecimiento y expansión del tumor a las células sanas.<sup>136</sup>

Tras estos estudios preclínicos en animales, los CPPs comenzaron su andadura en los ensayos clínicos en humanos.<sup>197</sup> La mayoría de los casos están relacionados con el tratamiento de enfermedades de la piel y son administrados por vía tópica. El caso más reseñable es el del tratamiento de la hipersudoración.<sup>198</sup> Esta dolencia era típicamente tratada con la toxina botulínica (Botox), pero ello implicaba la administración de cientos de inyecciones por paciente. Así, la farmacéutica Revance Therapeutics propuso el empleo del gel tópico RT001 que cuenta con dicha toxina unida a un CPP, lo que facilita su absorción y evita el uso de agujas. Además, ha resultado también efectiva para el tratamiento de las arrugas y patas de gallo.<sup>197</sup> Similar a este caso, la farmacéutica Capstone Therapeutics ha desarrollado el fármaco AZX100 para cicatrizaciones.<sup>136</sup> Un caso para el tratamiento de la psoriasis es Psorban, de la compañía CellGate. Este fármaco consistía en ciclosporina A, un inmunosupresor típicamente administrado vía oral para el tratamiento de inflamaciones tópicas, fusionado con el péptido TAT<sub>49-57</sub>, lo que permitía su absorción.<sup>197</sup> Además de los tratamientos para enfermedades relacionadas con la piel, existen varios ejemplos relacionados con otro tipo de dolencias. Entre ellos destaca XG-102 de la farmacéutica XigenPharma que permite la administración de inhibidores de muerte celular que son utilizados para tratar secuelas en pacientes que han sufrido un ictus.<sup>199</sup> Asimismo, existen otros ejemplos de CPPs en fases clínicas para el tratamiento de cánceres de diversas naturalezas,<sup>136,199</sup> enfermedades del corazón<sup>200</sup> o el envejecimiento.<sup>201</sup>

## 2.8 Limitaciones de los CPPs

El éxito de los CPPs no solo se debe a su capacidad penetrante y su habilidad para transportar distintos cargos al interior celular, sino también a su versatilidad y sencillez a la hora de sintetizarlos, modificarlos o mejorarlos. Sin embargo, hoy en día, nuevas ideas, avances y estrategias se siguen desarrollando para superar algunas de las limitaciones que presentan.<sup>202,203</sup> De manera general cabe destacar su inestabilidad o baja resistencia frente a la digestión enzimática, su baja selectividad y una alta toxicidad debido a su carácter altamente catiónico.<sup>204</sup>

En cuanto a su falta de especificidad, los CPPs no suelen ser selectivos a un tipo concreto de células. Eso implica la necesidad de suministrar una mayor dosis, lo que hace que aumenten sus niveles de toxicidad.<sup>172,197</sup> La búsqueda de factores de diferenciación entre las células

<sup>196</sup> F. M. Losic, J. Quinonero, V. Dubois, B. Alluis, M. Dechambre, M. Michel, F. Callier, A. M. Fernandez, A. Trouet, J. Kearsy, *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 6908-6916.

<sup>197</sup> C. Foerg, H.P. Merkle, *J. Pharm. Sci.*, **2008**, *97*, 144-162.

<sup>198</sup> R. G. Glogau, *Dermatol. Surg.*, **2007**, *33*, S76-S80.

<sup>199</sup> S. R. Schmidt, *Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges*, Wiley Online Library, **2013**, *26*, 397-412.

<sup>200</sup> L. Jia, G. S. Gorman, L. U. Coward, P. E. Noker, D. McCormick, T. L. Hom, J. B. Harder, M. Muzzio, B. Prabhakar, B. Ganesh, *et. al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2011**, *68* 513-524.

<sup>201</sup> S. A. Nasrollahi, S. Fouladdel, C. Taghibiglou, E. Azizi, E. S. Farboud, *Int. J. Dermatol.*, **2012**, *51*, 923-929.

<sup>202</sup> D. Kalafatovic, E. Giralt, *Molecules*, **2017**, *22*, 1929.

<sup>203</sup> G. Guidotti, L. Brambilla, D. Rossi, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2017**, *38*, 406-424.

<sup>204</sup> E. Koren, V. P. Torchilin, *Trends Mol. Med.*, **2012**, *18*, 385-393.

normales y las cancerígenas para el tratamiento selectivo del cáncer haría despegar sus futuras aplicaciones biológicas y médicas.<sup>205</sup> Con el objetivo de superar la falta de selectividad innata de los CPPs, el grupo del profesor R. Tsien ha empleado estrategias supramoleculares y dinámicas en péptidos activables por enzimas. En este caso, las fuerzas electrostáticas entre un CPP catiónico y una cadena aniónica de oligoglutámicos es empleada para neutralizar la carga del CPP. Entre la parte catiónica y la aniónica se introduce una secuencia específica que puede ser degradada por proteasas que normalmente se sobreexpresan en los tumores. Esta enzima proteasa provoca la separación de ambas partes, recobrando su capacidad penetrante y dando lugar a la entrega efectiva y selectiva del cargo en cuestión.<sup>206,207</sup> Esta “joven” quimioterapia tiene mucho camino por recorrer para aproximarse a su campo más revolucionario, como es la quimioterapia dirigida, lo que permitirá explorar nuevas estrategias modernas para el tratamiento selectivo del cáncer, que reduzcan los efectos secundarios y limitaciones de la quimioterapia actual.

Una desventaja importante de la aplicación terapéutica de los CPPs es su susceptibilidad a la degradación proteolítica: una vez en el torrente sanguíneo, se degradan rápidamente y, por lo tanto, no pueden realizar su cometido como vectores de entrega de cargos. La eficacia *in vitro* de un CPP es irrelevante si *in vivo* es rápidamente degradado por proteasas. A esto se une también el desconocimiento sobre el mecanismo concreto de internalización para cada caso, el cual varía dependiendo de numerosos factores tal como se describió anteriormente.<sup>172,197</sup> A pesar de que los CPPs son capaces de cruzar las membranas celulares, existen evidencias que demuestran que muchos de ellos no son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE).<sup>140</sup> No se pueden olvidar los ya mencionados problemas a la hora de acceder al citosol debido a la incapacidad de escapar de los endosomas para entregar el cargo que transporta.<sup>140</sup>

A pesar de ello, desde su descubrimiento, los CPPs han dejado patente su gran potencial como transportadores de cargos biológicamente relevantes al interior celular. Este rol se ha visto cada vez más reforzado con las nuevas investigaciones y avances, convirtiéndose, hoy en día, en una de las vías para la introducción en células de moléculas y macromoléculas de interés biológico. Sus características y versatilidad los han convertido, entre otras cosas, en una novedosa herramienta para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, pues han supuesto el descubrimiento de estructuras sencillas capaces del transporte de numerosos cargos a través de membranas celulares. Pero a pesar de su enorme potencial, bien es cierto que los CPPs cuentan todavía con limitaciones a mejorar para poder explotar todas sus aplicaciones. Son todavía muchos los aspectos que desconocemos sobre su naturaleza y numerosos son los conceptos que debemos aprender a controlar y manipular para entenderlos. Es por ello que los CPPs son un campo de investigación puntera hoy en día en química, biología y medicina. Cada vez se sigue avanzando más en su estudio, cada vez son más los casos que llegan a fases clínicas y cada vez su gran potencial se vuelve más real y tangible.<sup>208</sup> Los nuevos avances conceptuales junto con los prometedores resultados de los ensayos clínicos auguran un futuro prometedor para las aplicaciones médicas de los péptidos penetrantes de células, que devuelvan a la sociedad todo el esfuerzo y trabajo de los investigadores.



<sup>205</sup> W. B. Kauffman, T. Fuselier, J. He, W. C. Wimley, *Trends Biochem. Sci.*, **2015**, *40*, 749-764.

<sup>206</sup> T. Jiang, E. S. Olson, Q. T. Nguyen, M. Roy, P. A. Jennings, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**, *101*, 17867-17872.

<sup>207</sup> R. Weinstain, E. N. Savariar, C. N. Felsen, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 874-877.

<sup>208</sup> W. Chen, Z. Sun, L. Lu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2021**, *60*, 5626-5643.

### 3. Reconocimiento de carbohidratos: receptores y glicoestructuras

La administración dirigida de medicamentos supone un gran desafío que pretende mejorar la eficacia terapéutica contra el cáncer al mismo tiempo que minimiza los efectos secundarios.<sup>209</sup> Las dificultades para la entrega selectiva de fármacos a sus objetivos diana, es uno de los principales problemas. Se han explorado muchos enfoques para mejorar los sistemas de transportes de fármacos, con mayor seguridad, estabilidad y eficiencia.<sup>210</sup>

Entre las distintas estrategias empleadas a lo largo de los años, destacan algunas importantes como las que utilizan el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD), una secuencia de unión celular que se identificó originalmente en la fibronectina, una proteína de la matriz extracelular que desempeña un papel fundamental en la adhesión celular.<sup>211</sup> Las integrinas, una familia de proteínas de membrana, actúan como receptores de este dominio RGD, suficiente e indispensable para la interacción integrina-RGD.<sup>212</sup> Esta estrategia en donde se incorpora el dominio RGD a distintos biomateriales se ha utilizado en la terapia dirigida hacia células cancerosas en las que las integrinas de la membrana celular están sobreexpresadas en comparación con las células sanas.<sup>213</sup> Igual importancia han tenido los receptores de folato (FRs), proteínas de alta afinidad por el ácido fólico (folato o vitamina B9) que lo transportan al interior celular vía endocitosis.<sup>214</sup> De esta forma, el uso de diferentes antagonistas del ácido fólico (antifolatos), análogos del folato que impiden que las células utilicen la vitamina B9, se han empleado para el tratamiento del cáncer y enfermedades inflamatorias.<sup>215</sup>

Con el mismo objetivo en mente, muchos esfuerzos se han dirigido hacia estrategias de glicosilación (**Fig. 17**).<sup>216,217</sup> Las interacciones reversibles entre los carbohidratos y sus receptores están ampliamente involucradas en muchos procesos biológicos y patológicos, que van desde la comunicación celular hasta la metástasis tumoral. Los cambios en la glicosilación asociados con las transformaciones oncogénicas se describieron por primera vez hace más de siete décadas (**Fig. 18**).<sup>218</sup> Las células tumorales muestran una amplia gama de alteraciones de glicosilación en comparación con sus equivalentes sanas.<sup>219</sup> La existencia de esta diferenciación en los patrones de glicosilación conduce a una regulación distinta de la segregación intracelular, la localización y el recambio de receptores, que tienen un papel importante en el reconocimiento celular, la comunicación y la señalización.<sup>220</sup> Por este motivo, la conjugación de carbohidratos a diferentes estructuras portadoras de fármacos dirigidos al cáncer ha recibido una atención creciente en los últimos años para la entrega celular selectiva. Los carbohidratos

<sup>209</sup> L. Cai, Z. Gu, J. Zhong, D. Wen, G. Chen, L. He, J. Wu, Z. Gu, *Drug Discovery Today*, **2018**, *23*, 1126–1138.

<sup>210</sup> N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O. C. Farokhzad, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2014**, *66*, 2–25.

<sup>211</sup> F. Danhier, A. Le Breton, V. Préat, *Mol. Pharm.*, **2012**, *9*, 2961–2973.

<sup>212</sup> E. Ruoslahti, *Ann. Rev. Biochem.*, **1988**, *57*, 375–413.

<sup>213</sup> E. Garanger, D. Boturyn, P. Dumy, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2007**, *7*, 552–558.

<sup>214</sup> A. S. Wibowo, M. Singh, K. M. Reeder, J. J. Carter, A. R. Kovach, W. Meng, M. Ratnam, F. Zhang, C. E. Dann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2013**, *110*, 15180–15188.

<sup>215</sup> B. Frigerio, C. Bizzoni, G. Jansen, C. P. Leamon, G. J. Peters, P. S. Low, L. H. Matherly, M. Figini, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **2019**, *38*, 125.

<sup>216</sup> S. V. Moradi, W. M. Hussein, P. Varamini, P. Simerska, I. Toth, *Chem. Sci.*, **2016**, *7*, 2492–2500

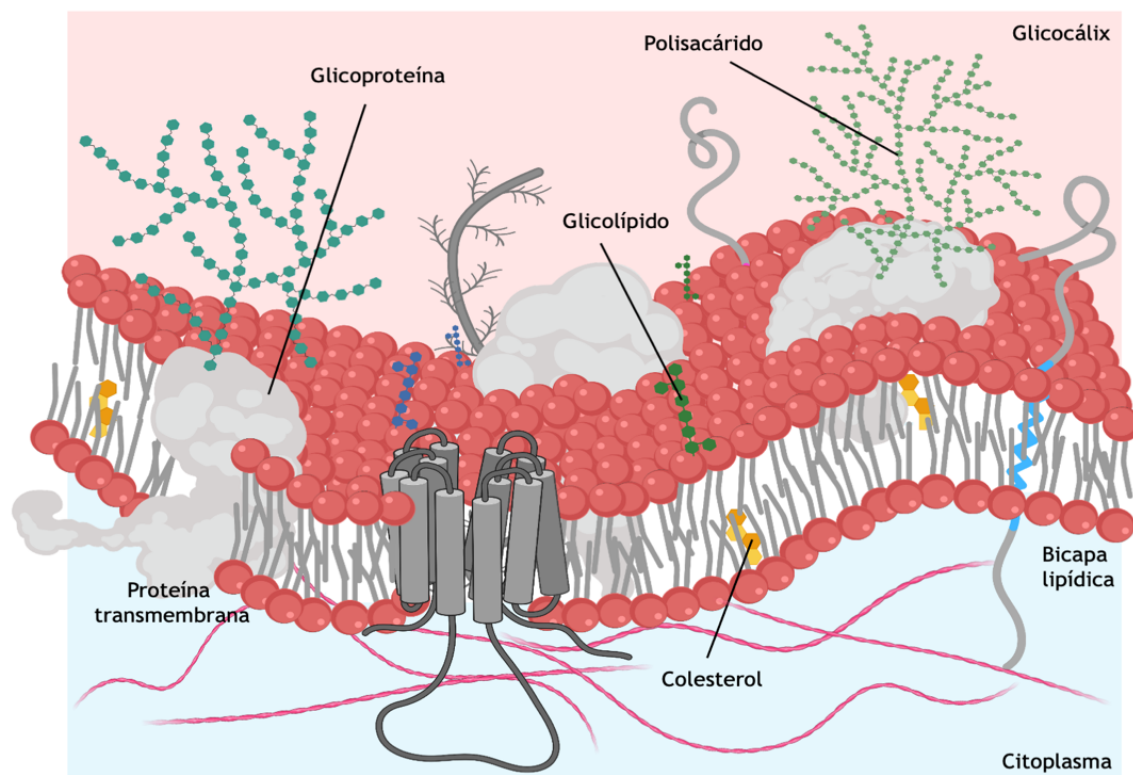
<sup>217</sup> N. C. Reichardt, M. M. Lomas, S. Penadés, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 4358–4376.

<sup>218</sup> R. P. Ladenson, S. O. Schwartz, A. C. Ivy, *Am. J. Med. Sci.*, **1949**, *217*, 194–197.

<sup>219</sup> Y. V. Kooyk, H. Kalay, J. J. Garcia-Vallejo, *Front. Immunol.*, **2013**, *4*, 451.

<sup>220</sup> H. L. Zhang, X. L. Wei, Y. Zang, J. Y. Cao, S. Liu, X. P. He, Q. Chen, Y. T. Long, J. Li, G. R. Chen, K. Chen, *Adv. Mater.*, **2013**, *25*, 4097–4101

se han incorporado a varias estructuras transportadoras para lograr grandes capacidades de direccionamiento tumoral debido a la sobreexpresión de receptores específicos en los tumores, así como al microambiente asociado al tumor, lo que genera una diferencia respecto a las características y condiciones de una célula sana.<sup>221</sup> De esta forma, la glicobiología proporciona un conjunto de objetivos para aplicaciones de diagnóstico y estrategias terapéuticas contra el cáncer.<sup>222,223</sup> Además, la posibilidad de contar con múltiples grupos glicósido en un mismo andamio estructural da lugar a una capacidad de unión mejorada con sus respectivos receptores diana, lo que se conoce como interacciones multivalentes o efecto clúster.<sup>224</sup>



**Figura 17.** Modelo de mosaico fluido. Vista esquemática de la estructura y componentes fundamentales de la membrana plasmática. El glicocáliz es una cobertura glicoproteica y glicolípida que envuelve la membrana celular. Esta sirve de protección mecánica, permite la adhesión, identificación y la comunicación celular e interviene en procesos como la fertilización, el desarrollo embrionario, la compatibilidad en los trasplantes y en la recepción hormonal. Los cambios en el glicocáliz de las células cancerosas sirven como defensa contra el cáncer y permiten al sistema inmunitario reconocerlas y destruirlas. Figura creada con Biorender.com

Las lectinas son una de las principales proteínas de unión a carbohidratos que pueden encontrarse expresadas en las membranas de la mayor parte de los tipos celulares, que sirven como objetivo para diferentes carbohidratos con una elevada especificidad. Se ha demostrado que la interacción lectina-carbohidrato participa en diversos procesos biológicos clave del cuerpo humano,<sup>225</sup> y presenta un papel fundamental en la metástasis y en la comunicación del

<sup>221</sup> M. Dalziel, M. Crispin, C. N. Scanlan, N. Zitzmann, R. A. Dwek, *Science*, **2014**, *343*, 1235681.

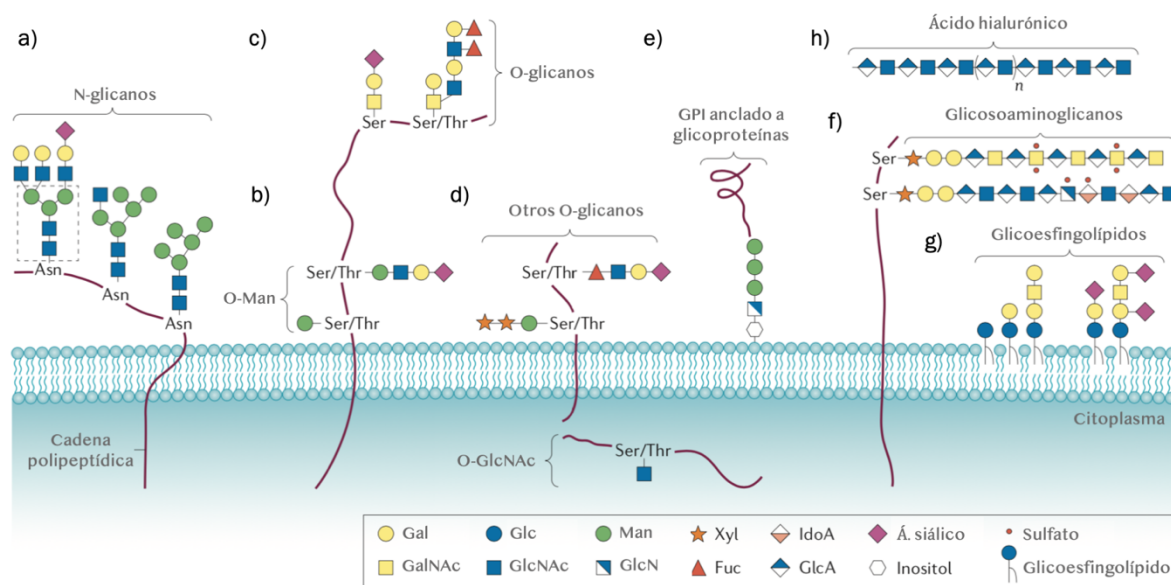
<sup>222</sup> S. S. Pinho, C. A. Reis, *Nat. Rev. Cancer*, **2015**, *15*, 540-555.

<sup>223</sup> B. Kang, T. Opatz, K. Landfester, F. R. Wurm, *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 8301-8325.

<sup>224</sup> R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 2013-2025.

<sup>225</sup> Y. H. Tan, K. Fujikawa, P. Pornsuriyasak, A. J. Alla, N. V. Ganesh, A. Demchenko, K. J. Stine, *New J. Chem.*, **2013**, *37*, 2150-2165

cáncer.<sup>226,227</sup> Además, las interacciones de los carbohidratos con lectinas endógenas desencadenan procesos endocíticos, de gran interés para superar la primera barrera de las células.<sup>228</sup>



**Figura 18.** Clases comunes de glicoconjugados en células de mamíferos. La glicosilación se define como el proceso enzimático que produce enlaces glicosídicos de sacáridos a otros sacáridos, proteínas o lípidos. Las proteínas se pueden glicosilar mediante la unión covalente de un sacárido a una cadena principal de polipéptidos, a) mediante enlaces a través del nitrógeno de los aminoácidos de Asn (N-glicano) y comparten una región central común de pentasacáridos (resaltada en la figura como un cuadro de línea punteada) que puede tener mayor diversificación o b) enlaces a través del oxígeno a aminoácidos como la Ser o Thr (O-glicano). c) Los O-glicanos de tipo mucina se inician mediante N-acetilgalactosamina (GalNAc) unida a Ser o Thr. d) Los O-glicanos pueden extenderse, produciendo varios "núcleos" y diferentes estructuras terminales que generalmente están fucosiladas y sialiladas. Otros tipos de O-glicanos incluyen la O-manosa, O-fucosa, O-galactosa y la  $\beta$ -N-acetilglucosamina. e) Algunas glicoproteínas también se pueden encontrar ancladas a fosfatidilinositol (GPI). Otras clases principales de glicoconjugados incluyen los f) proteoglicanos y g) los glicoesfingolípidos. Los proteoglicanos son glicoproteínas que se encuentran formadas por un núcleo proteico unido covalentemente a un tipo especial de polisacáridos denominados glicosaminoglicanos (GAG). Estos GAG son cadenas largas y no ramificadas de heteropolisacáridos, compuestas generalmente por una unidad repetitiva de disacárido con la fórmula general azúcar ácido-amino azúcar. h) Una excepción es el ácido hialurónico, que es un glicosaminoglicano que se encuentra libre en la matriz extracelular.<sup>222</sup> Figura adaptada con permisos de la Ref. 222 Copyright 2015 Springer Nature.

Debido a la cantidad de lectinas que integran esta gran familia, su clasificación resulta compleja, sin embargo, existen pequeñas subfamilias con características análogas. Entre algunos de estos subgrupos más representativos, caben destacar las lectinas de tipo C, cuya designación proviene de su requerimiento de iones de  $\text{Ca}^{+2}$  para la unión a los carbohidratos. Las proteínas que contienen dominios de lectina tipo C tienen una amplia gama de funciones, incluida la adhesión celular, la respuesta inmune a los patógenos y la apoptosis. Los mono- y oligosacáridos derivados de la manosa exhiben una fuerte unión a la lectina vegetal Concanavalina A<sup>229</sup> y DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-

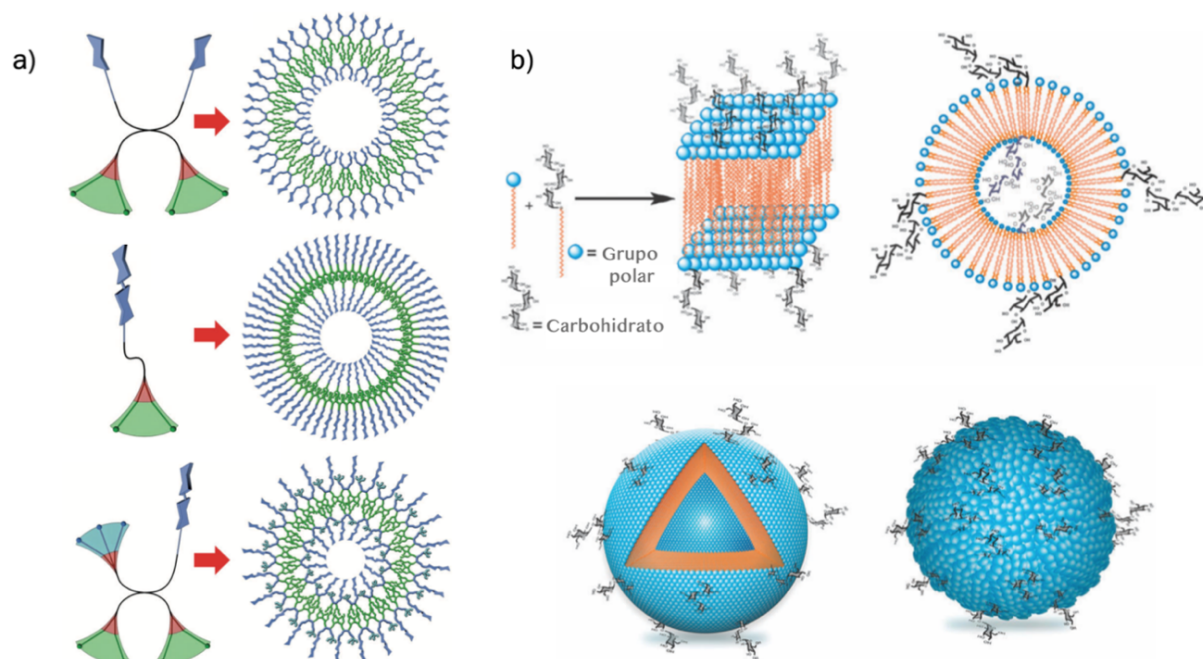
<sup>226</sup> S. Hakomori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 10231-10233.

<sup>227</sup> H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 637-674.

<sup>228</sup> T. B. Geijtenbeek, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, C. G. Figdor, *Cell*, **2000**, *100*, 575-585.

<sup>229</sup> S. Wu, X. Huang, X. Du, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 5580-5584.

Grabbing Non-integrin), una lectina de tipo C presente en la superficie de macrófagos<sup>230</sup> y células dendríticas.<sup>231</sup> La galactosa también puede unirse selectivamente a los receptores de lectina de tipo C en los macrófagos alveolares<sup>230</sup> y a los receptores de carbohidratos en las células de *Escherichia coli*.<sup>232</sup> Con el objetivo de utilizar los receptores de lectina tipo C para la estimulación de la respuesta inmune, se han sintetizado glicodendrimeros (**Fig. 19a**),<sup>233</sup> glicoliposomas (**Fig. 19b**)<sup>234</sup> y compuestos glicomiméticos<sup>235</sup> para el suministro dirigido de antígenos a células dendríticas y macrófagos, mejorando así las respuestas de las células T.<sup>236</sup>



**Figura 19.** Ejemplos de glicoestructuras: a) glicodendrimeros<sup>233</sup> y b) representación de la formación de una bicapa glicolipídica y glicoestructuras autoensambladas: glicoliposomas, glicovesículas y glicomicelas.<sup>234</sup> Figura adaptada con los permisos de la Ref. **233** Copyright 2014 John Wiley and Sons y la Ref. **234** Copyright 2013 Royal Society of Chemistry.

Las galectinas son un grupo de proteínas que pertenecen también a la familia de las lectinas que se unen específicamente a carbohidratos tipo  $\beta$ -galactosa, y juegan un importante papel en diferentes procesos relacionados con la respuesta inmunitaria, la adhesión y la endocitosis celular.<sup>237</sup> Se encuentran sobreexpresadas en células cancerosas,<sup>238,239</sup> y son indicadores de

<sup>230</sup> J. E. Ramírez, R. Roychoudhury, H. H. Habte, M. W. Cho, N. L. Pohl, B. Narasimhan, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **2014**, *25*, 1387–1406.

<sup>231</sup> O. Martínez-Avila, K. Hijazi, M. Marradi, C. Clavel, C. Champion, C. Kelly, S. Penadés, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 9874–9888.

<sup>232</sup> G. Yu, Y. Ma, C. Han, Y. Yao, G. Tang, Z. Mao, C. Gao, F. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 10310–10313.

<sup>233</sup> S. Zhang, R. O. Moussodia, H. J. Sun, P. Leowanawat, A. Muncan, C. D. Nusbaum, K. M. Chelling, P. A. Heiney, M. L. Klein, P. Doz, S. André, R. Roy, H. J. Gabius, V. Percec, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 10899–10903.

<sup>234</sup> N. Jayaraman, K. Maiti, K. Naresh, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 4640–4656

<sup>235</sup> S. Cecioni, A. Imberty, S. Vidal, *Chem. Rev.*, **2014**, *115*, 525–561

<sup>236</sup> B. Lepenies, J. Lee, S. Sonkaria, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2013**, *65*, 1271–1281

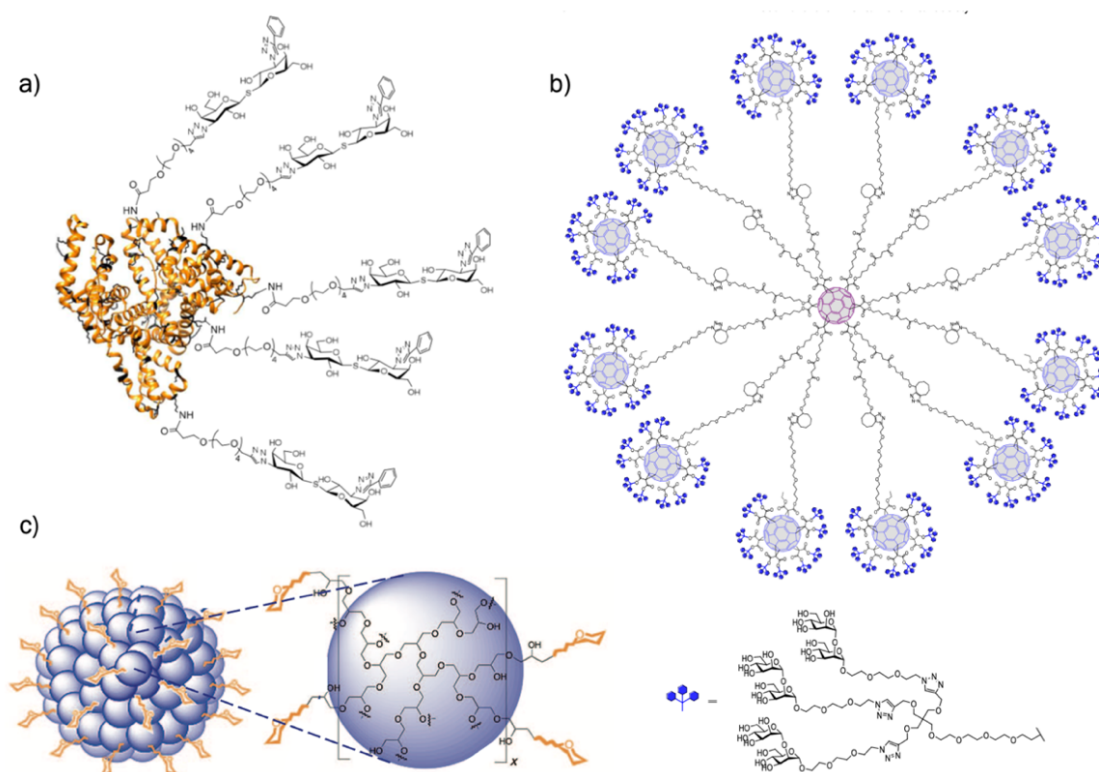
<sup>237</sup> H. Barrow, J. M. Rhodes, L. G. Yu, *Int. J. Cancer*, **2011**, *129*, 1–8

<sup>238</sup> A. Danguy, I. Camby, R. Kiss, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **2002**, *1572*, 285–293.

<sup>239</sup> F. T. Liu, G. A. Rabinovich, *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, *5*, 29–41.

neoplasias malignas en el estómago,<sup>240</sup> hígado,<sup>241</sup> y cáncer de colon.<sup>242</sup> Se han desarrollado estructuras proteicas multivalentes que utilizan albúmina de suero bovino (BSA) como moldes de construcción para la exposición de diferentes glicósidos y que funcionan como inhibidores de galectinas (**Fig. 20a**).<sup>243</sup>

Un receptor típico de la superficie celular es CD22, que pertenece a la familia de lectinas SIGLEC (sialic acid binding immunoglobulin type lectins) que se une específicamente al ácido siálico. Se encuentra en la superficie de las células B y previene la hiperactivación del sistema inmune y el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Las estructuras de carbohidratos naturales N-enlazados, se pueden usar como una alternativa a los anticuerpos para el suministro dirigido a las células que expresan el receptor CD22.<sup>244</sup>



**Figura 20.** Ejemplos de glicoestructuras: a) empleo de la proteína BSA como molde de construcción para la exposición de glicósidos<sup>243</sup> b) Representación esquemática de un tridecafullereno con 360 unidades de 1,2-manobiosidos,<sup>252</sup> c) nuevas glicoestructuras para la inhibición del virus influenza.<sup>254</sup> Figura adaptada con permisos de la Ref. **243** Copyright 2018 American Chemical Society, Ref. **252** Copyright 2019 American Chemical Society y de la Ref. **254** Copyright 2011 John Wiley and Sons.

Ciertos glicanos, que se encuentran exclusivamente en bacterias patógenas, también podrían ser explotados para el diagnóstico terapéutico dirigido.<sup>245,246</sup> Los nanomateriales y las estructuras supramoleculares que portan glicanos también pueden encontrar aplicaciones en

<sup>240</sup> P. Salvatore, C. Contursi, G. Benvenuto, C. B. Bruni, L. Chiariotti, *FEBS Lett.*, **1995**, 373, 159–163.

<sup>241</sup> D. K. Hsu, C. A. Dowling, K. C. Jeng, J. T. Chen, R. Y. Yang, F. T. Liu, *Int. J. Cancer*, **1999**, 81, 519–526.

<sup>242</sup> G. Benvenuto, M. L. Carpentieri, P. Salvatore, L. Cindolo, C. B. Bruni, L. Chiariotti, *Mol. Cell. Biol.*, **1996**, 16, 2736–2743.

<sup>243</sup> H. Zhang, D. Laaf, L. Elling, R. J. Pieters, *Bioconjugate Chem.*, **2018**, 29, 1266–1275.

<sup>244</sup> W. Peng, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139, 12450–12458.

<sup>245</sup> V. N. Tra, D. H. Dube, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 4659–4673.

<sup>246</sup> Y. F. Tan, L. L. Lao, G. M. Xiong, S. Venkatraman, *J. Controlled Release*, **2018**, 284, 39–48.

biomedicina, vacunas, infecciones bacterianas, tratamientos contra el cáncer, etc.<sup>247</sup> Se han administrado quantum dots recubiertos con carbohidratos en células epiteliales HeLa y virus como el SV40.<sup>248</sup> Los liposomas decorados con ligandos tipo glicano se han desarrollado para el reconocimiento de CD169/Sn para la entrega selectiva en macrófagos.<sup>249</sup> Los dendrímeros de glicopéptidos multivalentes también se han aplicado en inmunoterapia contra el cáncer, autoinmunidad y enfermedades infecciosas.<sup>250</sup> Además, los sistemas multivalentes, como los glicofullerenos globulares (**Fig. 20b**), mejoran el reconocimiento molecular hacia lectinas específicas,<sup>251</sup> con unos resultados indiscutibles en la inhibición del virus de Zika (ZIKV)<sup>252</sup>, Dengue<sup>252</sup> o del Ébola,<sup>253</sup> resultados similares se obtuvieron con otras glicoarquitecturas en la inhibición del virus influenza (**Fig. 20c**).<sup>254</sup>

Por otra parte, los transportadores de glucosa (GLUT) son un amplio grupo de proteínas de membrana que facilitan el transporte de glucosa a través de la membrana plasmática. En la BHE del cerebro, estos transportadores mantienen las altas demandas continuas de glucosa y energía del cerebro y, por lo tanto, la glucosa se puede utilizar para mejorar la translocación de nanopartículas a través de la barrera hematoencefálica.<sup>255</sup> La N-acetilglucosamina (GlcNAc) es un componente de las glicoproteínas, proteoglicanos, GAG y las paredes celulares de los hongos y las bacterias, y se puede aplicar para inducir respuestas de inmunidad.<sup>256</sup>

En resumen, la glicosilación se ha convertido en una herramienta prometedora para lograr una terapia y un diagnóstico efectivos a través de reconocimientos entre los carbohidratos y sus receptores diana. Con múltiples grupos hidroxilo y de fácil modificación, los carbohidratos son componentes versátiles de gran utilidad, sin embargo, deben tenerse en cuenta varias cuestiones para el diseño de sistemas de suministro glicosilados.<sup>257</sup> Muchas proteínas pueden reconocer múltiples ligandos lo que podría afectar la eficiencia de la selectividad. Además, las estrategias de bioconjugación basadas en la glicosilación pueden variar las propiedades físicoquímicas de los vehículos de entrega, como la carga superficial, la distribución del tamaño y la biocompatibilidad.<sup>258</sup> A pesar de algunas limitaciones, cada vez más pruebas indican que las estructuras glicosiladas y la combinación de estrategias de glicosilación y terapia inmunológica aportarán oportunidades con gran potencial para la terapia contra el cáncer.<sup>259</sup>

<sup>247</sup> E. Dosekova, J. Filip, T. Bertok, P. Both, P. Kasak, J. Tkac, *Med. Res. Rev.*, **2017**, *37*, 514–626.

<sup>248</sup> D. Benito-Alifonso, S. Tremel, B. Hou, H. Lockyear, J. Mantell, D. J. Fermin, P. Verkade, M. Berry, M. C. Galan, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 810–814.

<sup>249</sup> N. Kawasaki, J. L. Vela, C. M. Nycholat, C. Rademacher, A. Khurana, N. van Rooijen, P. R. Crocker, M. Kronenberg, J. C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, *110*, 7826–7831.

<sup>250</sup> J. J. García-Vallejo, M. Ambrosini, A. Overbeek, W. E. van Riel, K. Bloem, W. W. J. Unger, F. Chiodo, J. G. Bolscher, K. Nazmi, H. Kalay, Y. van Kooyk, *Mol. Immunol.*, **2013**, *53*, 387–397.

<sup>251</sup> M. Sánchez-Navarro, A. Muñoz, B. M. Illescas, J. Rojo, N. Martín, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 766–769.

<sup>252</sup> J. R. Soriano, J. J. Reina, B. M. Illescas, N. de la Cruz, L. R. Pérez, F. Lasala, J. Rojo, R. Delgado, N. Martín, *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*, *38*, 15403–15412.

<sup>253</sup> B. M. Illescas, J. Rojo, R. Delgado, N. Martín, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 6018–6025.

<sup>254</sup> I. Papp, C. Sieben, A. L. Sisson, J. Kostka, C. Böttcher, K. Ludwig, A. Herrmann, R. Haag, *ChemBioChem*, **2011**, *12*, 887–895.

<sup>255</sup> C. Saraiva, C. Praça, R. Ferreira, T. Santos, L. Ferreira, L. Bernardino, *J. Controlled Release*, **2016**, *235*, 34–47.

<sup>256</sup> Y. Shibata, I. Honda, J. P. Justice, M. R. Van Scott, R. M. Nakamura, Q. N. Myrvik, *Infect. Immun.*, **2001**, *69*, 6123–6130.

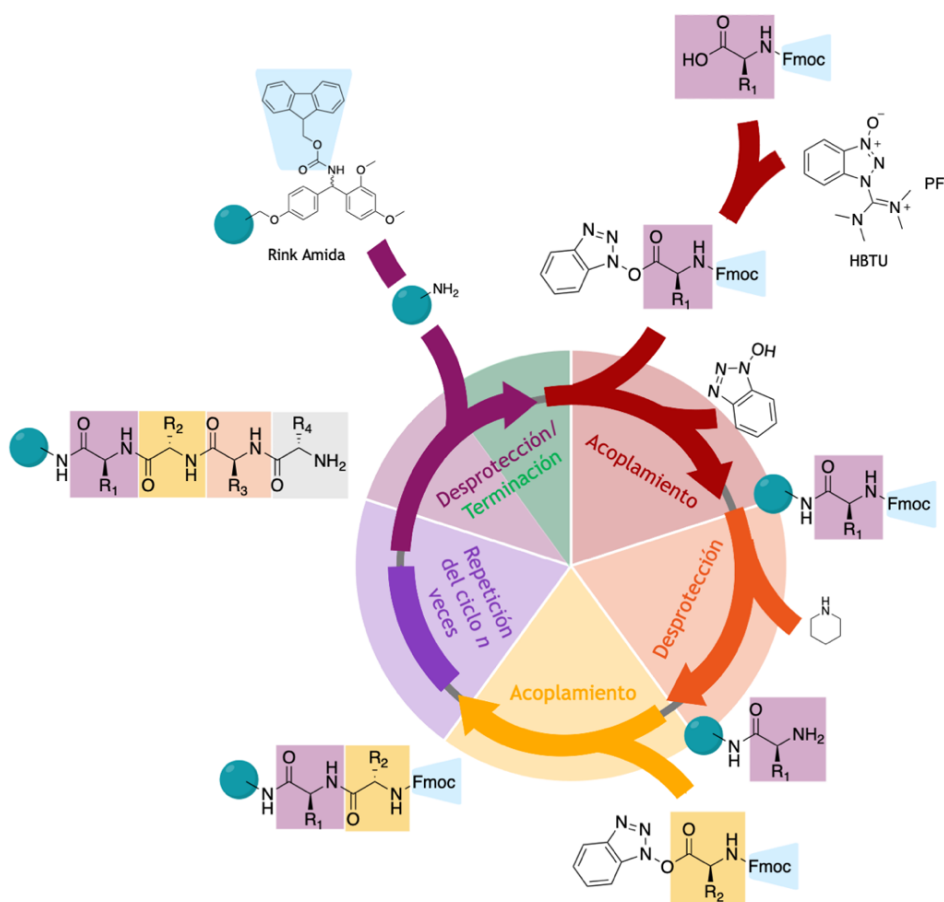
<sup>257</sup> C. Auriti, G. Prencipe, M. Moriondo, I. Bersani, C. Bertaina, V. Mondì, R. Inglese, *J. Immunol. Res.*, **2017**, *2017*, 7045630

<sup>258</sup> S. Kawakami, M. Hashida, *J. Control. Release*, **2014**, *190*, 542–555

<sup>259</sup> R. Jefferis, *Nat. Rev. Drug Dis.*, **2009**, *8*, 226–234.

## 4. Síntesis peptídica en fase sólida (SPPS)

La síntesis peptídica en fase sólida fue desarrollada por R. B. Merrifield en 1963.<sup>260,261</sup> Esta estrategia se basa en el uso de una resina, generalmente en forma de pequeñas esferas de poliestireno, que es insoluble en casi todos los disolventes. La utilización de disolventes adecuados provoca su solvatación, consiguiendo una buena exposición de los grupos químicos reactivos anclados en la superficie de la resina para su posterior funcionalización. Mientras que la síntesis orgánica en disolución involucra procesos laboriosos de purificación y aislamiento, la síntesis en fase sólida permite la utilización de un exceso de los reactivos, debido a su fácil eliminación por procesos simples de lavado y filtrado, dando lugar a una reducción del tiempo y un aumento en la producción.



**Figura 21.** Esquema detallado del proceso de síntesis peptídica empleando la metodología en fase sólida de R. B. Merrifield. Tras la exposición de los grupos funcionales de la resina, se llevan a cabo repetidas etapas de acoplamiento y desprotección hasta obtener la longitud deseada del péptido diseñado. Figura creada con BioRender.com.

La metodología más comúnmente empleada en la síntesis peptídica en fase sólida es la estrategia *Fmoc/Bu*<sup>262</sup> que emplea condiciones más suaves a las utilizadas en la estrategia *Boc/Bzl*, evitando el tratamiento continuado con TFA y el uso de un tratamiento de ácido muy

<sup>260</sup> R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154.

<sup>261</sup> R. B. Merrifield, *Science*, **1965**, 150, 178-185.

<sup>262</sup> W. C. Chang, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach*, Oxford University: New York, **2000**.

fuerte, generalmente con HF al final del proceso. Esto condujo a la introducción de un nuevo protector del grupo amino, el grupo Fmoc, que requiere una acción de desprotección más suave, normalmente piperidina al 20% en DMF, quedando el grupo amino libre y listo para reaccionar con un nuevo aminoácido activado. La etapa clave de la síntesis peptídica es la formación de los enlaces amida entre los aminoácidos. La formación eficiente de estos enlaces requiere la activación del grupo carboxilo, para ello se procede a la formación *in situ* de ésteres activos.

Los reactivos encargados de la activación se denominan agentes de acoplamiento; siendo el *N*-HBTU, *N*-HATU, PyOP, HOBt, HOAt y PyBOP algunos de los más utilizados.<sup>263</sup> Para comprobar que cada etapa se ha completado en su totalidad se han desarrollado diferentes metodologías, por ejemplo el test de Kaiser<sup>264</sup> o el test TNBS.<sup>265</sup> Los grupos protectores ortogonales de las cadenas laterales de los aminoácidos se basan en los grupos *tert*-butilo o Pbf. La separación del péptido de la resina y la eliminación de estos grupos protectores solo requiere del tratamiento con un medio ácido como el TFA. De este modo, el método Fmoc es ortogonal en dos direcciones, es decir, la desprotección del grupo amino y el desanclaje final de la resina. Finalmente, el producto deseado se desprende del soporte, y su purificación y caracterización se llevan a cabo en disolución.

Se han creado diversas resinas que pueden ser tratadas con TFA para la liberación de los péptidos anclados. Dependiendo de la funcionalización deseada en el extremo C-terminal, se emplean diferentes resinas. Por ejemplo, la resina Wang es la más usada para péptidos con ácidos carboxílicos C-terminales, mientras que se utiliza la resina Rink-amida si se desea una amida C-terminal.<sup>266,267</sup> La resina Rink-amida es la seleccionada para la síntesis de los productos desarrollados en esta memoria. En la **Figura 21** se representa un esquema sencillo del ciclo de síntesis peptídica en fase sólida.



<sup>263</sup> A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.

<sup>264</sup> E. Kaiser, R. L. Colecott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.

<sup>265</sup> W. S. Hancock, J. E. Battersby, *Anal. Biochem.*, **1976**, *71*, 260-264.

<sup>266</sup> G. B. Fields, R. L. Noble., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1990**, *35*, 161-214.

<sup>267</sup> J. Alsina, F. Albericio, *J. Pept. Science*, **2003**, *71*, 454-477.

# Capítulo I. Péptidos penetrantes de células glicosilados (GCPPs)

**Los resultados de este capítulo han sido publicados en:**

I. Gallego,<sup>[a]</sup> A. Rioboo,<sup>[a]</sup> J. J. Reina,<sup>[a]</sup> B. Díaz,<sup>[b,c]</sup> A. Canales,<sup>[c]</sup> F. J. Cañada,<sup>[b]</sup> J. Guerra-Varela,<sup>[d]</sup> L. Sánchez,<sup>[d]</sup> J. Montenegro\*<sup>[a]</sup>, *ChemBioChem*, **2019**, *20*, 1400-1409. DOI: 10.1002/cbic.201800720.

Factor de impacto ChemBioChem (2019) 2,576; Q1 en química orgánica.

Este artículo puede ser utilizado para propósitos no comerciales de acuerdo con John Wiley and Sons (Copyright 2019).

[a] Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS), Departamento de Química Orgánica, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela (España).

[b] Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del CSIC, C/Ramiro de Maetzu 9, 28040 Madrid (España).

[c] Departamento de Biología Estructural y Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avd/ Complutense s/n, Madrid (España).

[d] Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, 27002, Lugo (España).

## Contribución

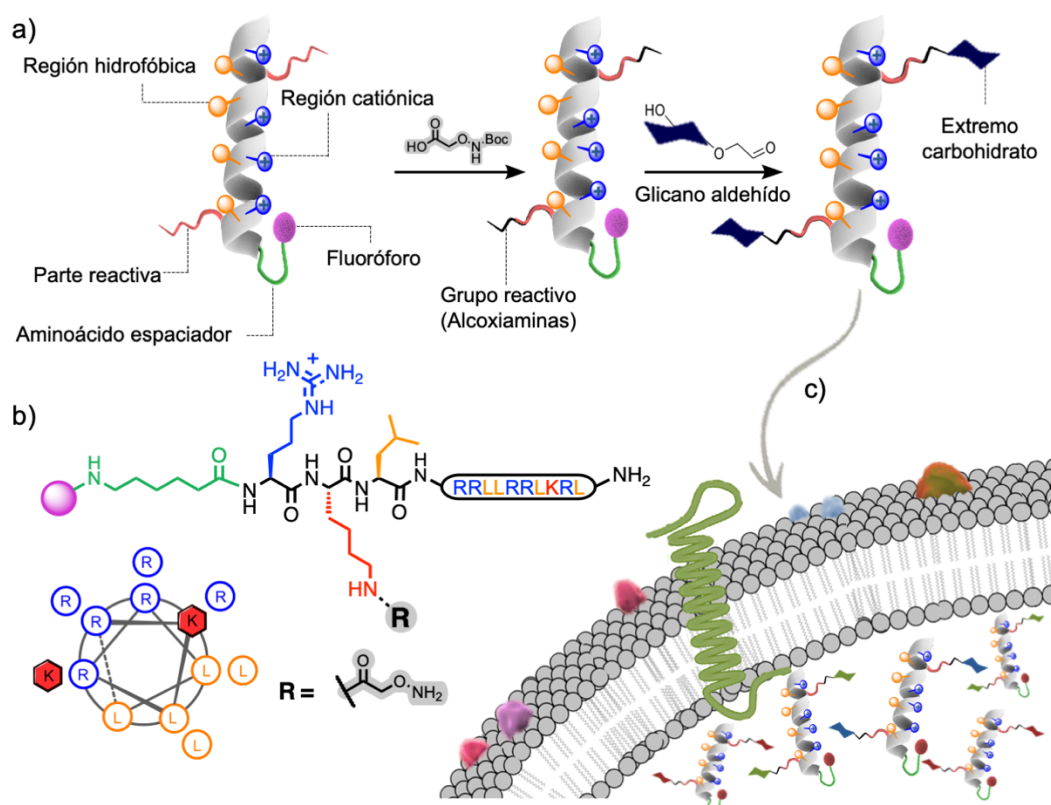
Diseño, síntesis y caracterización de las glicoestructuras, cuantificación de la capacidad de internalización mediante experimentos de microscopía y citometría de flujo, y ensayo MTT de viabilidad celular.





## 1. Objetivos

Los esfuerzos para equipar los CPPs con ligandos carbohidrato han demostrado una reducción de la eficiencia de penetración junto con una mayor viabilidad de las células objetivo.<sup>268</sup> Sin embargo, estos interesantes estudios con péptidos penetrantes de células glicosilados (GCPPs) se limitaron a ligandos de galactosa unidas mediante química “click” y a su estudio exclusivo en la línea celular de ovario de hámster chino (CHO). Recientemente, los polidisulfuros penetrantes también se han preparado con restos de glicano para mejorar la solubilidad de los conjugados resultantes.<sup>269</sup> Sin embargo, hasta la fecha, no se han realizado estudios sistemáticos sobre las propiedades de los GCPPs con diferentes residuos de azúcares.



**Figura 22.** Estructura peptídica y transporte a través de la membrana plasmática. a) El péptido congrega los diferentes dominios a lo largo de una estructura helicoidal. Los grupos reactivos (alcoxiaminas) apuntan en direcciones opuestas en la interfase de los dominios hidrofílicos e hidrofóbicos. La estructura peptídica primaria está equipada con alcoxiaminas reactivas para anclar diferentes aldehídos carbohidrato. Los híbridos finales de glicopéptidos contienen una sonda fluorescente (punto rojo) anclada en la región N-terminal del péptido para seguir y cuantificar su internalización celular. b) Secuencia primaria del péptido lineal y diagrama heptagonal en roseta que muestra la disposición helicoidal del péptido. c) La translocación de la membrana y la internalización celular es modulada por los residuos de carbohidrato.

En este capítulo, nos proponemos el desarrollo y estudio de una estrategia sintética adecuada para la preparación y evaluación sistemática de la eficacia de absorción y distribución intracelular de péptidos glicosilados en diferentes líneas celulares. Para este propósito, hemos diseñado un armazón de péptidos anfifílicos que incorporan dos conectores reactivos de alcoxiamina<sup>122,123</sup> para anclar aldehídos de carbohidrato (**Fig. 22**). Tras la formación de la

<sup>268</sup> L. Dutot, P. Lécorchyé, F. Burlina, R. Marquant, V. Point, S. Sagan, G. Chassaing, J. M. Mallet, S. Lavielle, *J. Chem. Biol.*, **2010**, 3, 51–65.

<sup>269</sup> P. Morelli, E. Bartolami, N. Sakai, S. Matile, *Helv. Chim. Acta*, **2018**, 101, e1700266.

conexión oxima entre la secuencia peptídica y los diferentes glicanos, es decir, una vez formados los glicopéptidos, y tras su debida caracterización, se estudiará el impacto sobre la estructura secundaria, así como la eficiencia de internalización de los glicopéptidos correspondientes. Por último, nos propusimos extender este estudio *in vitro* hacia modelos simples *in vivo*, y analizar la biodistribución y toxicidad de estas nuevas estructuras penetrantes glicosiladas.

## 2. Diseño y síntesis

Estudios recientes establecieron la influencia de la distribución de los grupos de guanidino en las propiedades de entrega de los péptidos penetrantes.<sup>112</sup> Por lo tanto, hemos diseñado una secuencia peptídica lineal que conduciría al plegamiento de un péptido anfifílico para la obtención de una estructura helicoidal.<sup>123,270</sup> En este diseño, hemos incluido las alcoxiaminas como grupos reactivos en la interfase entre los dominios catiónicos e hidrófobos para minimizar el impacto en la estructura secundaria del péptido resultante (**Fig. 22b**). El posicionamiento ortogonal de los extremos de carbohidrato se seleccionó para estudiar el impacto en la estructura secundaria del péptido y para maximizar el enmascaramiento de la anfifilicidad de la estructura peptídica.

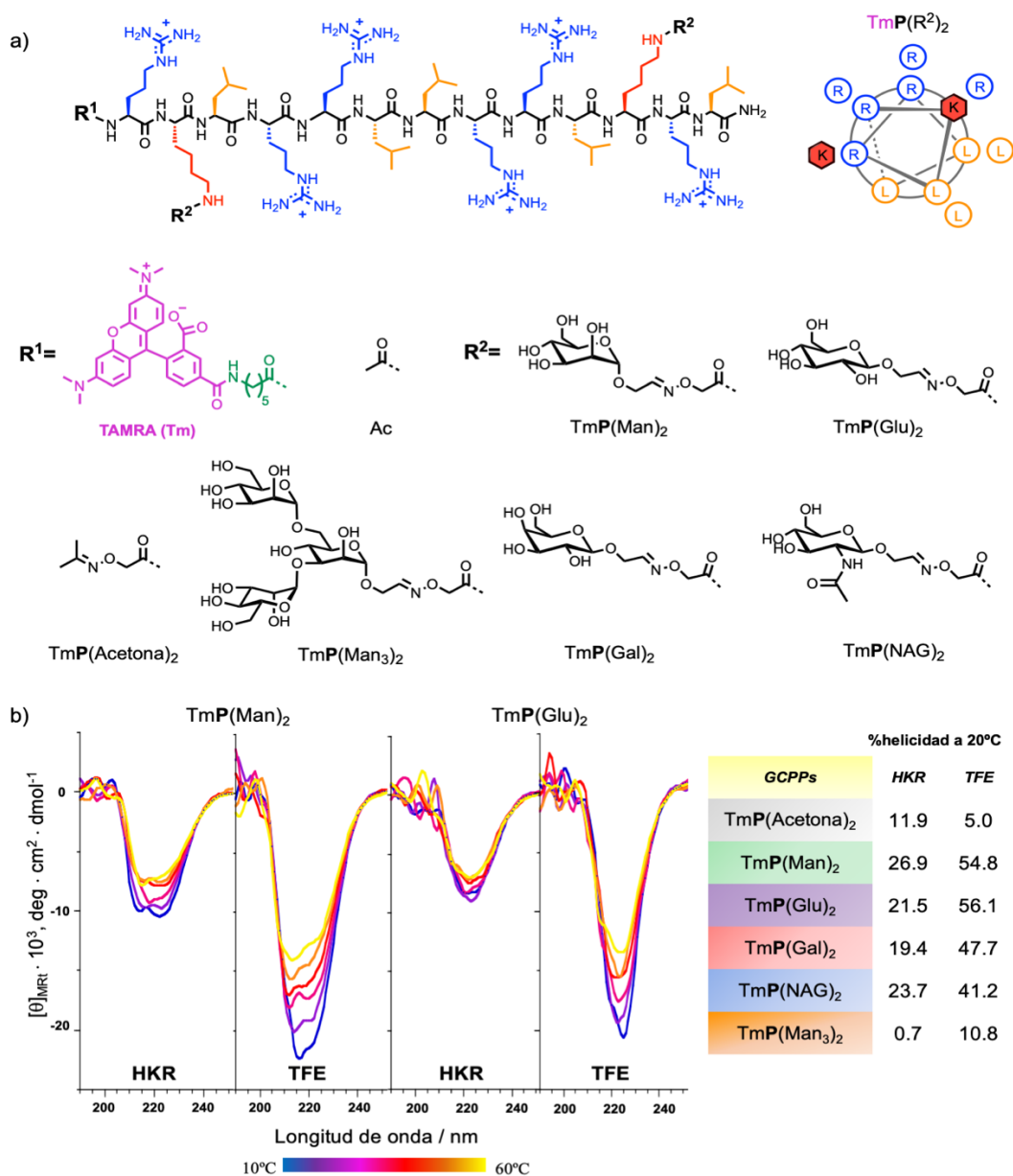
La secuencia peptídica correspondiente se sintetizó utilizando el método en fase sólida mediante el uso de grupos de protección ortogonales (**Fig. SE1**). Como se describió anteriormente,<sup>123</sup> empleamos residuos de lisina protegidos con el grupo metiltritilo (Mtt), que pueden desprotegerse selectivamente en condiciones débilmente ácidas; permitiendo así la posibilidad de modificar sintéticamente el péptido mientras aún se encuentra anclado a la resina.<sup>123</sup> Después de la ruptura del grupo Mtt y la incorporación de la alcoxiamina (**1**, ver sección experimental pág. 126) "sobre resina", los péptidos se marcaron con un fluoróforo (TAMRA) para permitir la evaluación de su internalización celular mediante microscopía y citometría (**Fig. SE1**). Los péptidos se escindieron del soporte sólido y se conjugaron inmediatamente con diferentes aldehídos de carbohidratos.<sup>271</sup> Es importante destacar que esta conjugación bio-ortogonal de formación de la oxima tuvo lugar en agua a temperatura ambiente y en cortos tiempos con rendimientos cuantitativos en la mayoría de los casos (**Fig. SE2**). La síntesis de los aldehídos de azúcar se realizó mediante una nueva ruta desarrollada previamente en nuestro grupo de investigación, que implicó una estrategia de glicosilación de Fischer modificada con un paso final de ozonólisis. Esta estrategia permitió la preparación de diferentes aldehídos de carbohidratos, tales como  $\alpha$ -D-manosa,  $\beta$ -D-glucosa,  $\beta$ -D-galactosa, *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina, y un aldehído trisacárido ramificado de  $\alpha$ -D-manosa (**Fig. 23a**).<sup>271</sup> Finalmente, después de la conexión péptido/carbohidrato mediante una oxima, la eliminación del exceso de azúcar aldehído se realizó por HPLC de fase reversa. Los glicopéptidos finales se caracterizaron mediante MS, HRMS, espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN y CD.

Los espectros de CD de los glicopéptidos resultantes se midieron en buffer HKR (pH 7,4) y trifluoroetanol (TFE) y mostraron bandas típicas de la hélice- $\alpha$  a  $\lambda = 208$  y  $222$  nm (**Fig. 23b** y **SE3**). Siguiendo la banda  $\lambda = 222$  nm y empleando la **ec. 1** y **2** (ver sección experimental pág. 129), estimamos un porcentaje de helicidad en el rango de 20-30% en condiciones tampón para los diferentes péptidos (**Fig. 23b**). Los valores de CD de los híbridos de glicopéptidos variaron

<sup>270</sup> M. Pazo, M. Juanes, I. Lostalé-Seijo, J. Montenegro, *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 6919–6922.

<sup>271</sup> J. Reina, A. Rioboo, J. Montenegro, *Synthesis (Stuttg.)*, **2018**, 50, 831–845.

ligeramente dependiendo del carbohidrato unido a la estructura peptídica, y la intensidad de las bandas indicó un comportamiento helicoidal modesto en condiciones acuosas. Sin embargo, esta helicidad se mantuvo, incluso a altas temperaturas (60°C); una observación interesante, considerando la corta longitud de estos conjugados de glicopéptidos (**Fig. 23b**). Además, en presencia del disolvente de TFE, que no compite por los enlaces de hidrógeno y que promueve la helicidad, aumentó fuertemente hasta 60% en los mejores casos (**Fig. 23b** y **SE3**).

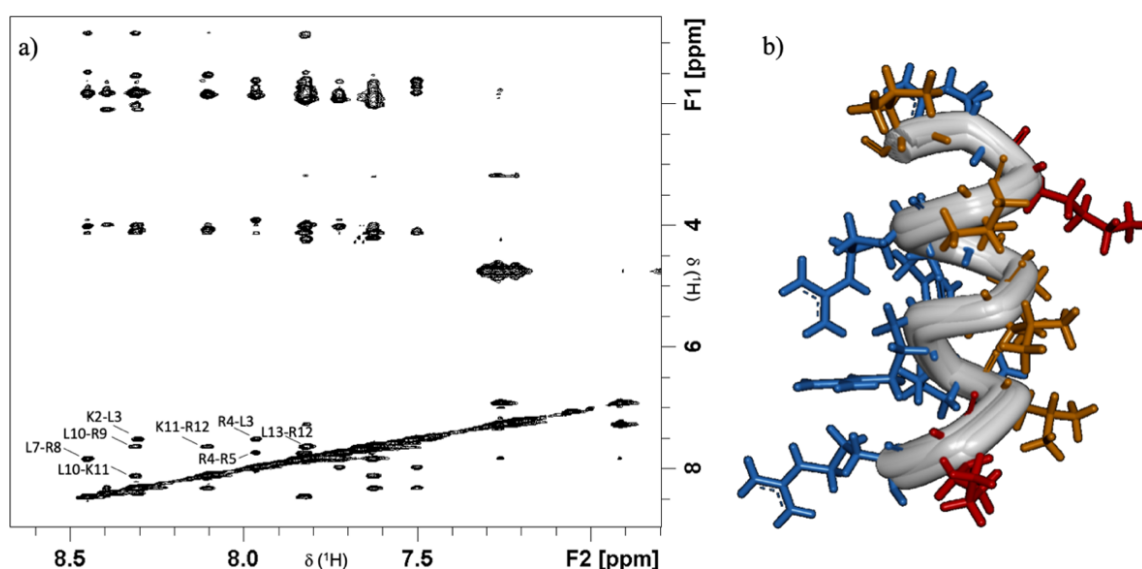


$$[\theta]_{MRT} = \left( \frac{100 \cdot \theta}{c \cdot l \cdot N^{\circ} \text{ de residuos}} \right) \quad [1]; \quad \%[\theta] = \left( \frac{|[\theta]_{MRT(222)}| - 2340}{30300} \right) \cdot 100 \quad [2]$$

**Figura 23.** Estructura peptídica y espectros de dicroísmo circular (CD): a) Estructura del péptido lineal con las cadenas laterales de aminoácidos en diferentes colores: catiónico (Arg) en azul, hidrofóbico (Leu) en naranja y residuos de lisina modificada (Lys-R<sup>2</sup>) en rojo. Sustituyentes en la posición R<sup>1</sup> N-terminal: fluoróforo TAMRA (Tm) y acetilo (Ac). Sustituyentes en los residuos de lisina R<sup>2</sup> modificada: acetona y derivados oximas de α-D-manosa TmP(Man)<sub>2</sub>, β-D-glucosa TmP(Glu)<sub>2</sub>, β-D-galactosa TmP(Gal)<sub>2</sub>, N-acetil-β-D-glucosamina TmP(NAG)<sub>2</sub>, y trisacárido de α-D-manosa TmP(Man)<sub>3</sub>2. b) Espectros de CD de TmP(Man)<sub>2</sub> y TmP(Glu)<sub>2</sub> en diferentes condiciones en buffer HKR (pH 7,4) y TFE. Abreviaciones peptídicas: TmP(X)<sub>2</sub> (Tm = TAMRA y X = Man, Glu, Gal, NAG, Man<sub>3</sub>, Acetona).

Sorprendentemente, el péptido control más hidrófobo funcionalizado con acetona sin ningún residuo carbohidrato, TmP(Acetona)<sub>2</sub>, mostró la menor helicidad de todos los péptidos reportados en este estudio tanto en buffer HKR acuoso y TFE, 11,9 y 5,0% respectivamente (**Fig. SE3**). Estos resultados sugirieron que, para este diseño peptídico particular, el aumento de la hidrofobicidad era perjudicial para el carácter helicoidal y que los residuos de carbohidrato podrían contribuir a la estabilización de la helicidad del péptido. Curiosamente, el péptido que lleva el aldehído trisacárido perdió helicidad; una observación que podría indicar que, altos niveles de glicosilación en estructuras peptídicas pequeñas podrían tener un fuerte impacto en su estructura secundaria (**Fig. SE3**). La banda a  $\lambda = 208$  nm de los espectros de CD estudiados mostró diferencias en intensidad e incluso desapareció y/o se fusionó con la banda a  $\lambda = 222$  nm (**Fig. 23b**). Esta observación se observó anteriormente para otros péptidos helicoidales y se relacionó con la longitud de la trayectoria de la cubeta de cuarzo y la orientación relativa de los péptidos helicoidales.<sup>272</sup> Para investigar aún más la tendencia helicoidal y la estructura secundaria en estos péptidos, empleamos espectroscopía de RMN en un péptido modelo en condiciones acuosas después de la adición de alícuotas de disolvente de TFE.

### 3. Medidas de espectroscopía RMN



**Figura 24.** a) Espectro 2D NOESY del péptido (AcP(Man)<sub>2</sub>) adquirido en buffer fosfato 20 mM que contiene un 10% D<sub>2</sub>O y un 30% TFE, a 600 MHz. b) Estructura del péptido AcP(Man)<sub>2</sub> obtenida mediante datos de espectroscopía de RMN aplicando el software CYANA. Código de colores: Arg (azul), Leu (naranja), y Lys (roja).

Estos experimentos se realizaron para estudiar, en detalle, la estructura secundaria de estos péptidos cortos altamente entrópicos y respaldar los datos de CD (**Fig. 24**). El espectro de RMN del derivado peptídico que contiene dos manosas y acetilado en su extremo *N*-terminal, AcP(Man)<sub>2</sub>,<sup>123</sup> se adquirió en tampón fosfato en presencia de TFE al 30%. Bajo estas condiciones, los espectros mostraron buena dispersión de señal y NOEs característicos, NH<sub>i</sub>-NH<sub>i-1</sub>, de estructuras helicoidales (**Fig. 24**). Se podrían asignar treinta y cinco NOEs entre residuos y convertirlos en restricciones de distancia para calcular la estructura peptídica con el software CYANA (consulte la sección experimental pág. 129). La **Fig. 24b** muestra la estructura helicoidal resultante con los dominios de arginina y leucina orientados en lados

<sup>272</sup> E. Biron, N. Voyer, J. C. Meillon, M.-E. Cormier, M. Auger, *Biopolymers*, **2000**, 55, 364–372.

opuestos del eje longitudinal helicoidal. La estructura del mismo péptido que contiene el fluoróforo, TAMRA, en R<sup>1</sup>, TmP(Man)<sub>2</sub>, también se obtuvo para su comparación (**Fig. SE4**). En ambos casos, los espectros de RMN aportan similares estructuras helicoidales.

#### 4. Estudios de internalización celular

Después de la síntesis y caracterización de los GCPPs, realizamos estudios de cuantificación de la internalización celular a diferentes concentraciones y en diferentes líneas celulares. Para esta evaluación, seleccionamos seis líneas celulares diferentes: HeLa (adenocarcinoma de cuello uterino humano), A549 (carcinoma de pulmón humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), RAW 264.7 (macrófago murino), Vero (riñón de mono) y HCT116 (carcinoma colorrectal humano). Aunque no teníamos la intención de realizar un estudio detallado de carbohidrato/receptor de GCPPs, varios receptores específicos de carbohidratos se sobreexpresan en las líneas celulares seleccionadas, por ejemplo, el receptor de asialoglicoproteína en células HepG2, que reconoce motivos tipo galactosa.<sup>273,274</sup> Los macrófagos RAW 264.7 han mostrado unión a glicoconjugados que contienen manosa, GlcNAc, glucosa<sup>275,276</sup> y L-fucosa.<sup>277,278</sup>

Inicialmente empleamos la citometría de flujo para cuantificar la captación celular.<sup>279</sup> En estos experimentos, los péptidos se incubaron con las células a diferentes concentraciones durante 30 minutos, se lavaron a fondo con buffer HKR y una disolución de heparina para eliminar todos los péptidos unidos a la membrana, las células se tripsinizaron y la fluorescencia total se cuantificó mediante citometría (ver la sección experimental pág. 130). Los resultados de estos experimentos de internalización se muestran en la **Fig. 25**. Como se esperaba, debido a la diferente actividad metabólica, la rigidez de la membrana y el volumen celular, las diferentes líneas celulares mostraron niveles muy diferentes de fluorescencia interna total. Por ejemplo, todos los glicopéptidos se internalizaron de manera muy eficiente en las células Vero y A549, mientras que en las células HeLa, RAW 264.7 y HCT116 la internalización fue intermedia, y en las células HepG2, difíciles de transfectar, el nivel de absorción fue el más bajo de la serie. En contraste, el patrón de internalización total en una línea celular particular siguió una tendencia similar, dependiendo del carbohidrato que contenga (**Fig. 25**).

En general, los péptidos con manosa y galactosa mostraron los niveles más altos de internalización en diferentes líneas celulares (**Fig. 25**). Estos fueron seguidos por glucosa y *N*-acetilglucosamina, que estaban en niveles comparables en la mayoría de los casos. Finalmente, el péptido que contiene el trisacárido de manosa mostró el nivel más bajo de transfección de todos ellos. El péptido control más hidrofóbico TmP(Acetona)<sub>2</sub> mostró la mayor eficiencia de penetración, aunque pudimos observar perturbaciones en la membrana celular y niveles más altos de toxicidad (**Fig. SE5**). Las imágenes de confocal de dosis-respuesta de TmP(Acetona)<sub>2</sub>

<sup>273</sup> S. Kawakami, M. Hashida, *J. Controlled Release*, **2014**, *190*, 542–555.

<sup>274</sup> Q. Wang, L. Zhang, W. Hu, Z.H. Hu, Y.Y. Bei, J.Y. Xu, W.J. Wang, X.N. Zhang, Q. Zhang, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, **2010**, *6*, 371–381.

<sup>275</sup> P. D. Stahl, J. S. Rodman, M. J. Miller, P. H. Schlesinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1978**, *75*, 1399–1403.

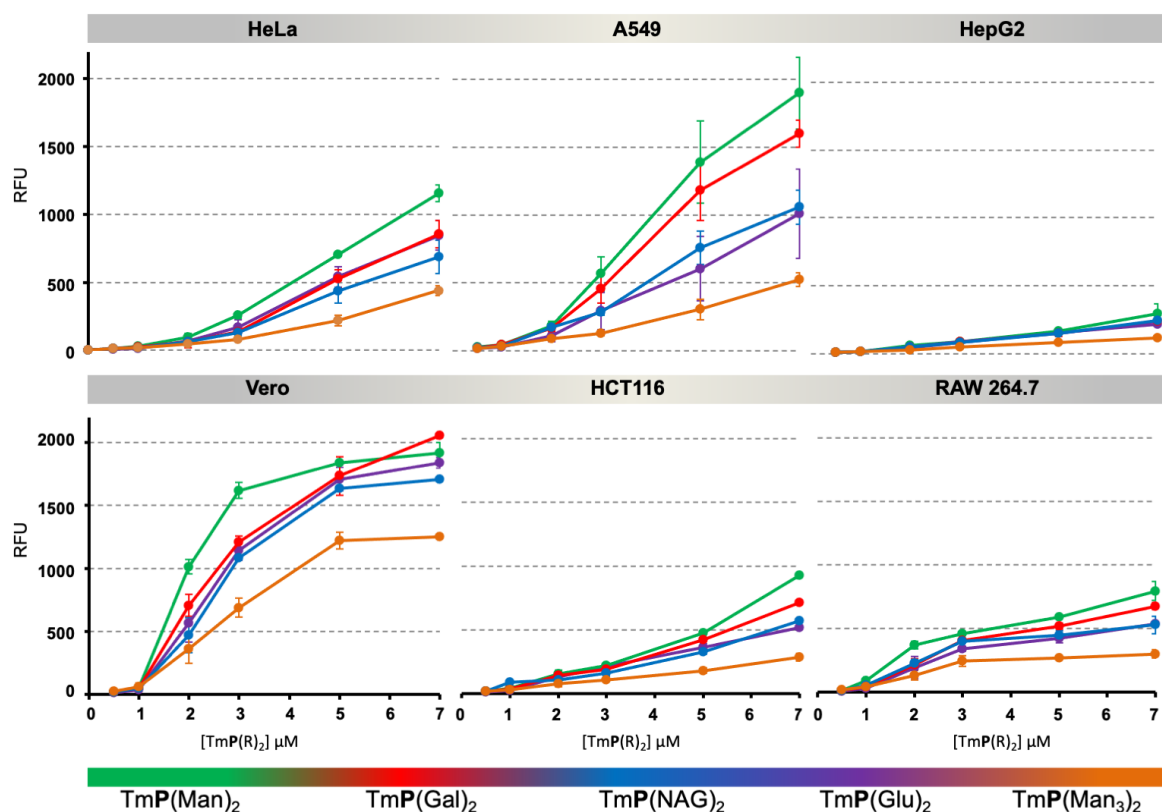
<sup>276</sup> B. L. Largent, K. M. Walton, C. A. Hoppe, Y. C. Lee, R. L. Schnaar, *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 1764–1769.

<sup>277</sup> J. C. Robbins, M. H. Lam, C. S. Tripp, R. L. Bugianesi, M. M. Ponpipom, T. Y. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, *78*, 7294–7298.

<sup>278</sup> S. A. Linehan, L. Martínez-Pomares, S. Gordon, *Microbes Infect.*, **2000**, *2*, 279–288.

<sup>279</sup> T. Holm, H. Johansson, P. Lundberg, M. Pooga, M. Lindgren, Ü Langel, *Nat. Protoc.*, **2006**, *1*, 1001–1005.

confirman estas primeras observaciones debido a que a 3  $\mu\text{M}$ ,  $\text{TmP}(\text{Acetona})_2$  ya mostraba núcleos celulares perfilados, lo que indica una toxicidad severa (**Fig. SE5**).

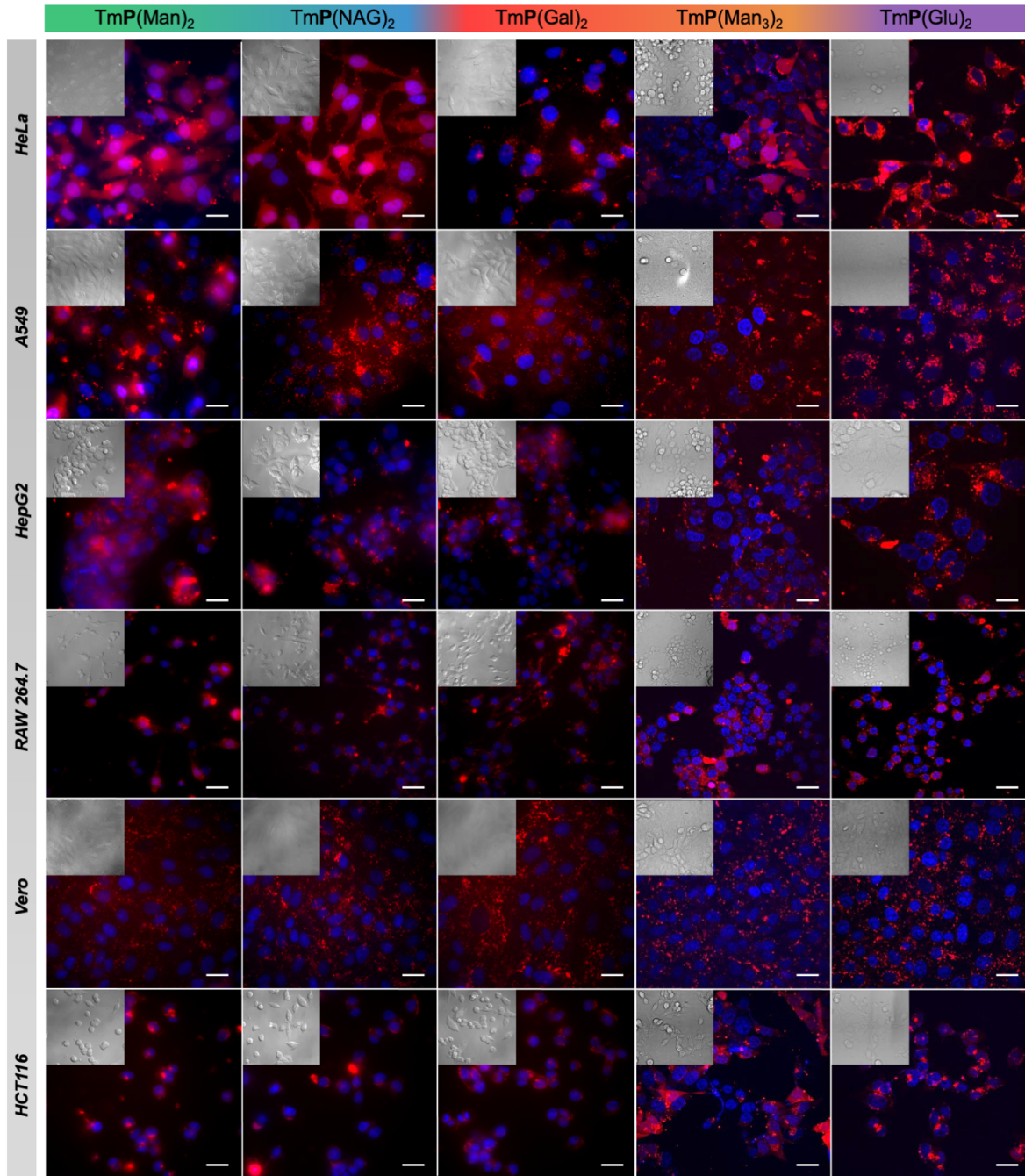


**Figura 25.** Eficiencia de internalización medida mediante citometría de flujo en diferentes líneas celulares con  $\text{TmP}(\text{Man})_2$  (verde),  $\text{TmP}(\text{Gal})_2$  (rojo),  $\text{TmP}(\text{NAG})_2$  (azul),  $\text{TmP}(\text{Glu})_2$  (violeta) y  $\text{TmP}(\text{Man}_3)_2$  (naranja) a diferentes concentraciones (0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7  $\mu\text{M}$ ). Unidades de fluorescencia relativa (RFU) en células HeLa a 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{TmP}(\text{acetona})_2$ :  $1731,8 \pm 432,8$ .

Para estudiar más en profundidad la internalización y la biodistribución final de los glicopéptidos, a continuación, realizamos una caracterización de microscopía de los diferentes glicopéptidos descritos en este documento. En estos experimentos, los glicopéptidos se incubaron en las células durante 30 minutos a 37°C, y, antes de la observación, las células se lavaron con una disolución de heparina para reducir la cantidad de glicopéptido unido a la membrana celular. Las células fueron observadas por medio de epifluorescencia y microscopía confocal (consulte la sección experimental pág. 130). Las micrografías fluorescentes coincidieron bien con los datos obtenidos en los estudios de internalización realizados mediante citometría (compárense las **Fig. 25** y **26**).

Los glicopéptidos se internalizaron con una eficiencia distintiva en las diferentes líneas celulares y se pudieron observar diferentes patrones de internalización para cada uno de ellos. (**Fig. 26**). Pudimos observar diferentes distribuciones de fluorescencia dentro de la misma línea celular para diferentes glicopéptidos. Por ejemplo,  $\text{TmP}(\text{NAG})_2$  mostró un patrón de internalización difuso en el citosol de las células HeLa, mientras que se observó un patrón de fluorescencia puntiforme en las células A549 a la misma concentración de glicopéptido (**Fig. 26**). Además, en las células HeLa, una comparación del patrón de fluorescencia de  $\text{TmP}(\text{NAG})_2$  y  $\text{TmP}(\text{Gal})_2$ , mostró un comportamiento de internalización claramente diferente. Mientras que  $\text{TmP}(\text{NAG})_2$  mostró una distribución citosólica difusa, el péptido  $\text{TmP}(\text{Gal})_2$  presentaba

pequeños agregados dentro de las células, lo que sugería una posible vía endocítica (**Fig. 26**). Por lo tanto, los glicanos conjugados a la estructura peptídica fueron capaces de modular el comportamiento de penetración y la eficiencia de la base de su estructura como CPP.

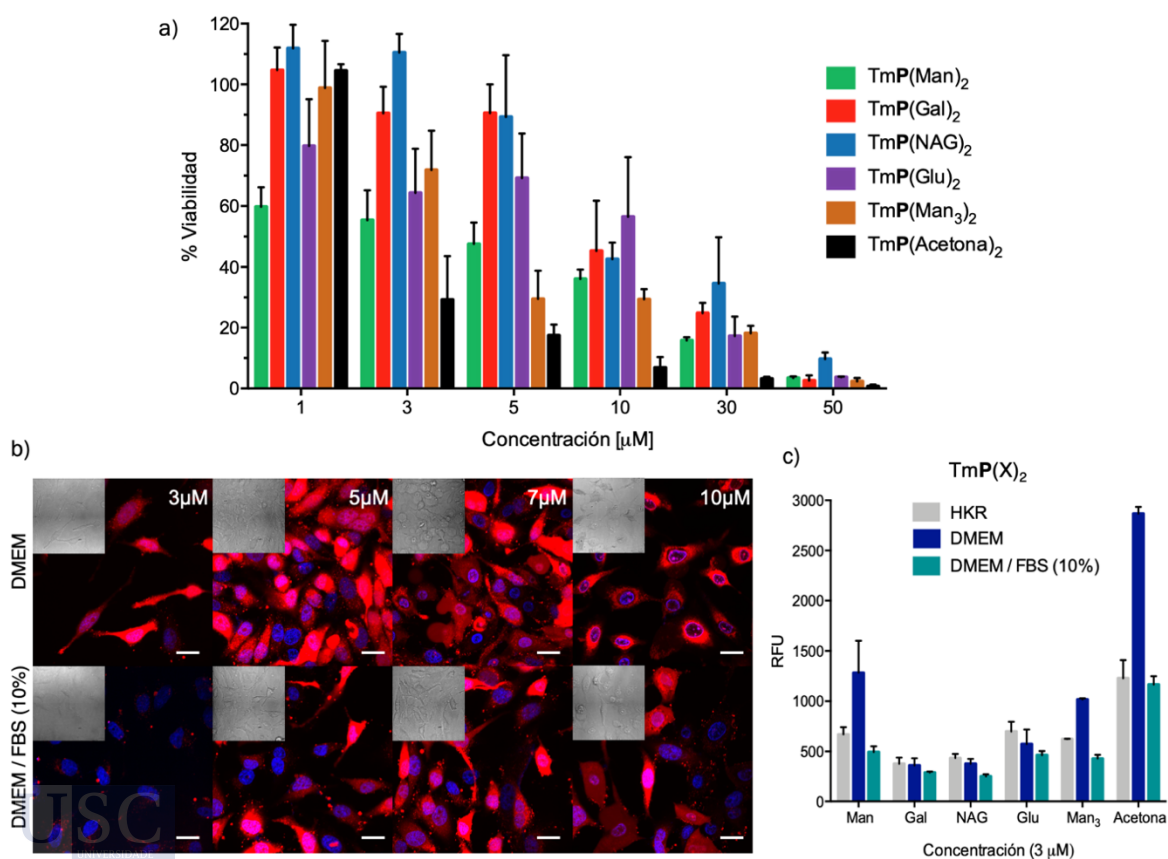


**Figura 26.** Comportamiento de internalización de cada glicopéptido. Imágenes de microscopía confocal de la eficacia de internalización. Las columnas verticales corresponden a los glicopéptidos y las líneas horizontales muestran las diferentes líneas celulares. Los glicopéptidos se incubaron a 3  $\mu$ M en buffer HKR durante 30 minutos a 37 °C. Barras de escala: 25  $\mu$ m.

Los ensayos de citotoxicidad del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) mostraron una mayor viabilidad celular para los glicopéptidos y un comportamiento tóxico mucho más fuerte en el caso del péptido control hidrofóbico TmP(Acetona)<sub>2</sub> (**Fig. 27a**).

Los péptidos TmP(NAG)<sub>2</sub> y TmP(Gal)<sub>2</sub> mostraron la toxicidad más baja de la serie, seguidos de TmP(Glu)<sub>2</sub>. Curiosamente, las estructuras peptídicas con los residuos de manosa mostraron una toxicidad ligeramente mayor que la de otros análogos glicosilados siendo el péptido que contiene el trisacárido de manosa TmP(Man<sub>3</sub>)<sub>2</sub> el más citotóxico (**Fig. 27a**). Esto es interesante porque revela que, aunque la glicosilación podría considerarse una estrategia de biocompatibilización, incluso con los modelos de carbohidratos más simples, la toxicidad de esta estructura glicosilada con baja eficiencia de penetración puede aumentar considerablemente. Por lo tanto, podríamos confirmar que la unión de los glicanos a estructuras tipo de CPP, redujo tanto la toxicidad celular como la eficacia de absorción de los diferentes híbridos de glicopéptidos.

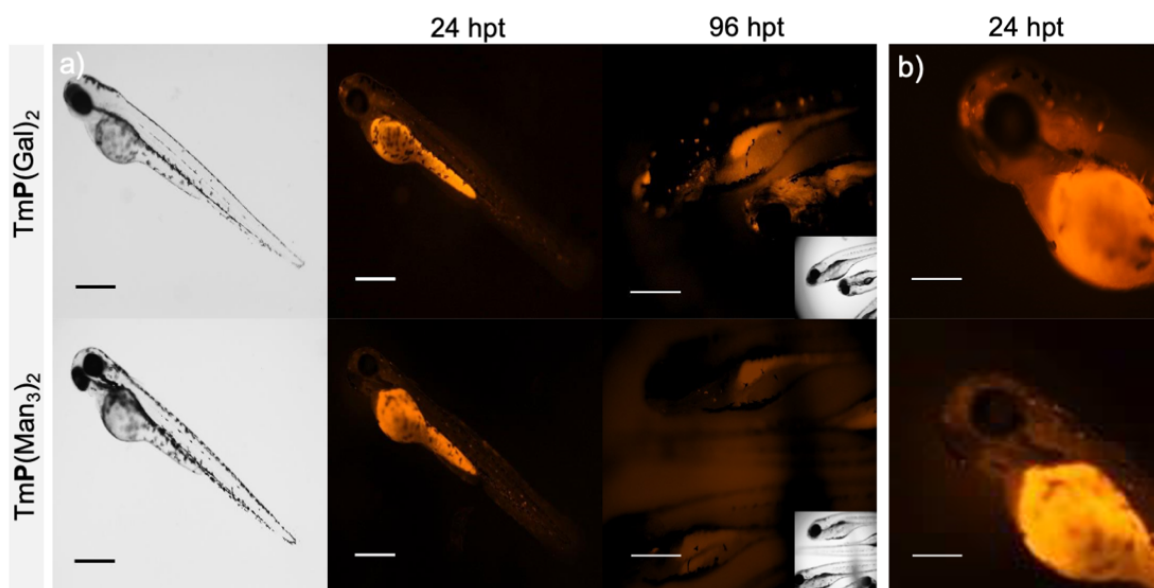
Además, utilizando citometría de flujo, hemos comparado los experimentos de internalización de todos los glicopéptidos anteriormente mencionados estudiados en buffer HKR, con experimentos similares en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) y en DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS). Estos experimentos mostraron que la presencia de suero redujo la eficacia de absorción de los híbridos peptídicos (**Fig. 27b-c**). Sin embargo, la microscopía confocal dosis-respuesta de TmP(Glu)<sub>2</sub> confirmó que un ligero aumento de la concentración fue suficiente para recuperar una captación celular eficiente y una distribución intracelular análoga (**Fig. 27b-c**).



**Figura 27.** a) Ensayo MTT de citotoxicidad de cada uno de los GCPPs y el péptido control TmP(Acetona)<sub>2</sub> en células HeLa incubados a diferentes concentraciones (1, 3, 5, 10, 30 y 50 μM) durante 30 minutos a 37°C. b) Experimentos de dosis-respuesta de la capacidad de internalización de TmP(Glu)<sub>2</sub> en células HeLa mediante microscopía confocal a (3, 5, 7, 10 μM) en DMEM y DMEM/FBS (10%). Barras de escala: 25 μm. c) Citometría de flujo de los compuestos TmP(X)<sub>2</sub> (X = Man, Gal, NAG, Glu, Man<sub>3</sub> y Acetona) incubados a 3 μM en células HeLa en diferentes medios: buffer HKR (gris), DMEM (azul) y DMEM suplementado con 10% de FBS (verde).

## 5. Estudios *in vivo* en modelos de peces cebra

Para finalizar, se investigó el comportamiento *in vivo* y la distribución de estos glicopéptidos en modelos de animales de peces cebra (**Fig. 28**). Seleccionamos dos ejemplos de péptidos diferentes, en términos de eficiencia de absorción en las células, el péptido con galactosa TmP(Gal)<sub>2</sub> (absorción elevada) y el glicopéptido que contiene al trisacárido de manosa TmP(Man<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (absorción baja). Por lo tanto, realizamos una incubación de los glicopéptidos anteriormente mencionados en larvas de pez cebra después de la fertilización durante 96 h a 28,5°C en condiciones estáticas (consulte la sección experimental pág. 131). Las disoluciones de péptidos se evaluaron para visualizaciones a 1 µM y se fotografiaron después de 24 y 96 h; los peces cebra fueron lavados antes de las observaciones. Se observó la internalización de los glicopéptidos a 1 µM sin efectos significativos sobre la supervivencia larval (**Fig. 28**). La señal más fuerte apareció a las 24 horas después del tratamiento (hpt), principalmente en la yema, mientras que se detectó fluorescencia débil a lo largo del cuerpo. Además, en la región de la cola, se pudieron observar puntos fluorescentes, tanto en los alrededores de la arteria y la vena caudal como en el tejido hematopoyético caudal (**Fig. 28**). A las 24 hpt, la fluorescencia se localizó principalmente en el tracto digestivo.



**Figura 28.** a) TmP(Man<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y TmP(Gal)<sub>2</sub> incubados a 1 µM *in vivo* en peces cebra. Las líneas horizontales muestran los dos glicopéptidos y las columnas verticales corresponden a las horas post-tratamiento (hpt). Después de 96h, no se puede detectar fluorescencia para TmP(Man<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, mientras que si se pueden detectar puntos rojos para TmP(Gal)<sub>2</sub>. Barras de escala: 500 µm. b) Ampliación de las imágenes de fluorescencia en a) después de 24h, se observa la localización específica de TmP(Gal)<sub>2</sub> en la cabeza del pez cebra y en la región olfativa, y una señal más baja para el trisacárido TmP(Man<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Barras de escala: 250 µm.

El fluoróforo puro TAMRA, no mostró ninguna internalización en los embriones de pez cebra (24 hpt; **Fig. SE6**). El péptido control hidrofóbico, TmP(Acetona)<sub>2</sub>, mostró una fuerte internalización en la yema del embrión en tiempos de incubación cortos de 24 hpt. Sin embargo, a la concentración de 1 µM, TmP(acetona)<sub>2</sub> no pudo abandonar la yema, incluso ni a 96 hpt (**Fig. SE6**). Las concentraciones más altas de este péptido (> 3 µM) mostraron una mortalidad muy fuerte del pez cebra, incluso en tiempos cortos.

Por otro lado, se distinguieron algunas diferencias en los patrones de fluorescencia entre TmP(Man<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (baja absorción en las células) y TmP(Gal)<sub>2</sub> (mayor absorción en las células). A las 24 hpt, el péptido con el trisacárido de manosa se detectó en la superficie larval en una distribución regular, que coincidió con los neuromastos (órgano mecano-receptivo que pertenece a la línea lateral del pez; **Fig. 28a**).<sup>280</sup> Sin embargo, el péptido con galactosa generalmente se transloca hacia el cuerpo larval y, específicamente, hacia la región olfativa del pez cebra (**Fig. 28b**). Además de la baja translocación, la señal de fluorescencia de TmP(Man<sub>3</sub>)<sub>2</sub> se eliminó rápidamente del animal (**Fig. 28a**, 96 hpt). Sin embargo, los puntos fluorescentes correspondientes a TmP(Gal)<sub>2</sub> fueron visibles incluso después de 96 hpt y se distribuyeron en la cavidad nasal y la musculatura del pez cebra. Por lo tanto, podemos concluir que el péptido con motivos de galactosa, además de presentar una mayor eficiencia de internalización en modelos celulares, también se absorbió y retuvo de manera más eficiente en diferentes lugares del cuerpo del pez cebra (**Fig. 28**).

Los híbridos de péptidos resultantes mostraron diferencias en sus estructuras secundarias y eficiencias de translocación de membrana, dependiendo del residuo de glicano y las diferentes líneas celulares analizadas. Los resultados descritos en este documento resaltan la importancia y el potencial de la glicosilación de péptidos para ajustar la eficacia de penetración y la citotoxicidad de los CPPs.



---

<sup>280</sup> A. B. Chitnis, D. Dalle Nogare, M. Matsuda, *Dev. Neurobiol.*, **2012**, 72, 234–255.

## 6. Conclusiones

En este capítulo, se ha demostrado el potencial de la conexión oxima para la preparación de conjugados de péptidos con diferentes motivos de glicanos y se ofrece una amplia visión de los efectos de su eficiencia de internalización y distribución en las células. Estos resultados constituyen el primer análisis sistemático y la comparación de las propiedades de internalización celular de los híbridos de glicopéptidos con diferentes glicanos biológicamente relevantes unidos a una plantilla CPP común.

En este primer capítulo:

- Fuimos capaces de conjugar diferentes glicanos de interés con una misma estructura catiónica con propiedades penetrantes mediante enlaces oxima dinámicos. De esta forma se obtuvieron los siguientes híbridos de CPPs: TmP(Man)<sub>2</sub>, TmP(Gal)<sub>2</sub>, TmP(NAG)<sub>2</sub>, TmP(Glu)<sub>2</sub>, TmP(Man<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.
- Una de las conclusiones más importantes que se observó es como los diferentes glicanos tienen un fuerte impacto en la internalización de estructuras peptídicas similares en una línea celular particular.
- De igual forma, este estudio ha demostrado que la tendencia de internalización de los híbridos de glicopéptidos no cambia con las líneas celulares analizadas. En otras palabras, no identificamos un híbrido de glicopéptido en particular que se internalizara selectivamente en una línea celular concreta.
- Aunque el objetivo de este trabajo no era investigar en detalle las posibles interacciones de los glicopéptidos con los receptores de la membrana celular ni realizar un análisis mecanístico de internalización de estos híbridos peptídicos, se demuestra que la capacidad de penetración de la estructura peptídica supera la internalización mediada por interacciones carbohidrato-receptor.
- También podemos concluir que los residuos de los glicanos modulan la eficiencia de captación y la citotoxicidad de una secuencia peptídica concreta en una línea celular determinada. Estos resultados demuestran que la glicosilación de un péptido concreto puede utilizarse para mejorar el equilibrio entre la eficiencia de captación y la toxicidad de los GCPP.



## Capítulo II. Escudos de carbohidratos para péptidos penetrantes de células

**Los resultados de este capítulo han sido publicados en:**

I. Gallego,<sup>[a]</sup> J. Montenegro,<sup>\*[a]</sup> *Chem. Commun.*, **2022**, 58, 1394-1397, DOI: 10.1039/D1CC06252B.

Factor de impacto *Chem. Commun.* (2020) 6,222; Q1 en química multidisciplinar.

Este artículo puede ser utilizado para propósitos no comerciales de acuerdo con Royal Society of Chemistry (Copyright 2022).

[a] Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS), Departamento de Química Orgánica, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela (España).

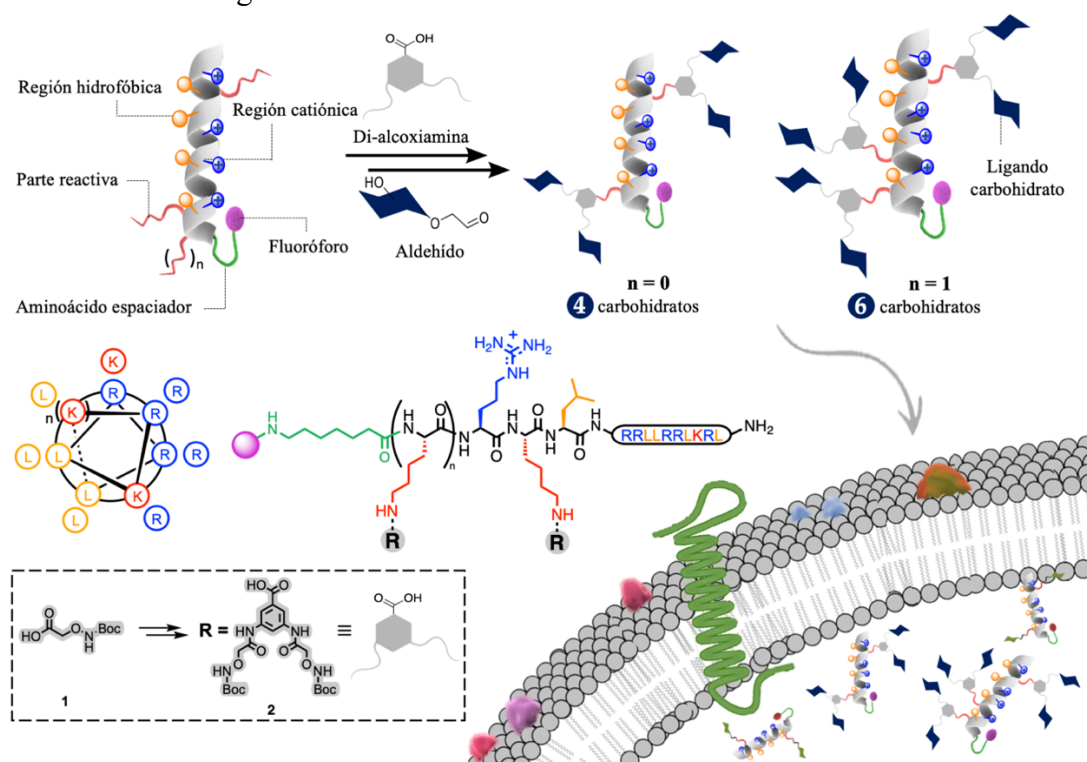
### Contribución

Diseño, síntesis y caracterización de los glicopéptidos, cuantificación de la capacidad de internalización mediante experimentos de microscopía y citometría de flujo, y ensayos MTT de viabilidad celular.



## 1. Objetivos

Teniendo en mente algunos de los problemas mencionados anteriormente asociadas a estas novedosas estructuras peptídicas penetrantes: una pobre selectividad o la alta toxicidad innata debido a su extraordinario poder de internalización, nos proponemos seguir aportando nuevas tácticas e ideas para superar estas limitaciones. De esta forma, con la finalidad de dotar a los CPPs con nuevas propiedades, decidimos ampliar y mejorar nuestra estrategia de glicosidación dinámica, manteniendo su versatilidad y sencillez a la hora de construir esta nueva generación o familia de glicopéptidos. Hoy en día, sigue siendo un gran reto, no solo para el campo de los péptidos penetrantes, sino para cualquier tipo de estructuras orgánicas, la búsqueda del candidato mejorado que presente una elevada viabilidad y una alta eficacia para la entrega celular de diferentes cargos moleculares.



**Figura 29.** Nueva generación de glicopéptidos y transporte eficiente a través de la membrana plasmática. El desarrollo de una di-alcoxiamina bencílica no solo ha permitido duplicar el número de ligandos carbohidrato por lisina, sino que conserva la sencillez sintética a pesar del aumento de la complejidad de las estructuras.

Con estas premisas, el primer objetivo concreto consiste en desarrollar nuevos conectores alcoxiamina que permitan multiplicar el número de ligandos azúcar a una misma estructura peptídica. De esta forma, describimos aquí la síntesis de un nuevo conector bencílico de alcoxiamina para construir una gran familia de CPPs glicosilados con un número variable (2, 4 y 6), así como, distinto tipo de ligando carbohidrato ( $\alpha$ -D-manosa,  $\beta$ -D-glucosa,  $\beta$ -D-galactosa), **Fig. 29**. El teórico aumento del número de motivos de azúcar pretende seguir mejorando problemas de toxicidad, así como, la búsqueda de interacciones proteína-carbohidrato de mayor fortaleza que permitan discriminar entre tipos celulares. Tras la debida caracterización de los glicopéptidos, se estudiará su estructura secundaria, así como sus propiedades de internalización y citotoxicidad. Por último, extendemos este estudio *in vitro* hacia modelos *in vivo* de ratón, para analizar la biodistribución y posible selectividad por algún tipo específico de células o tejido.

## 2. Diseño y síntesis

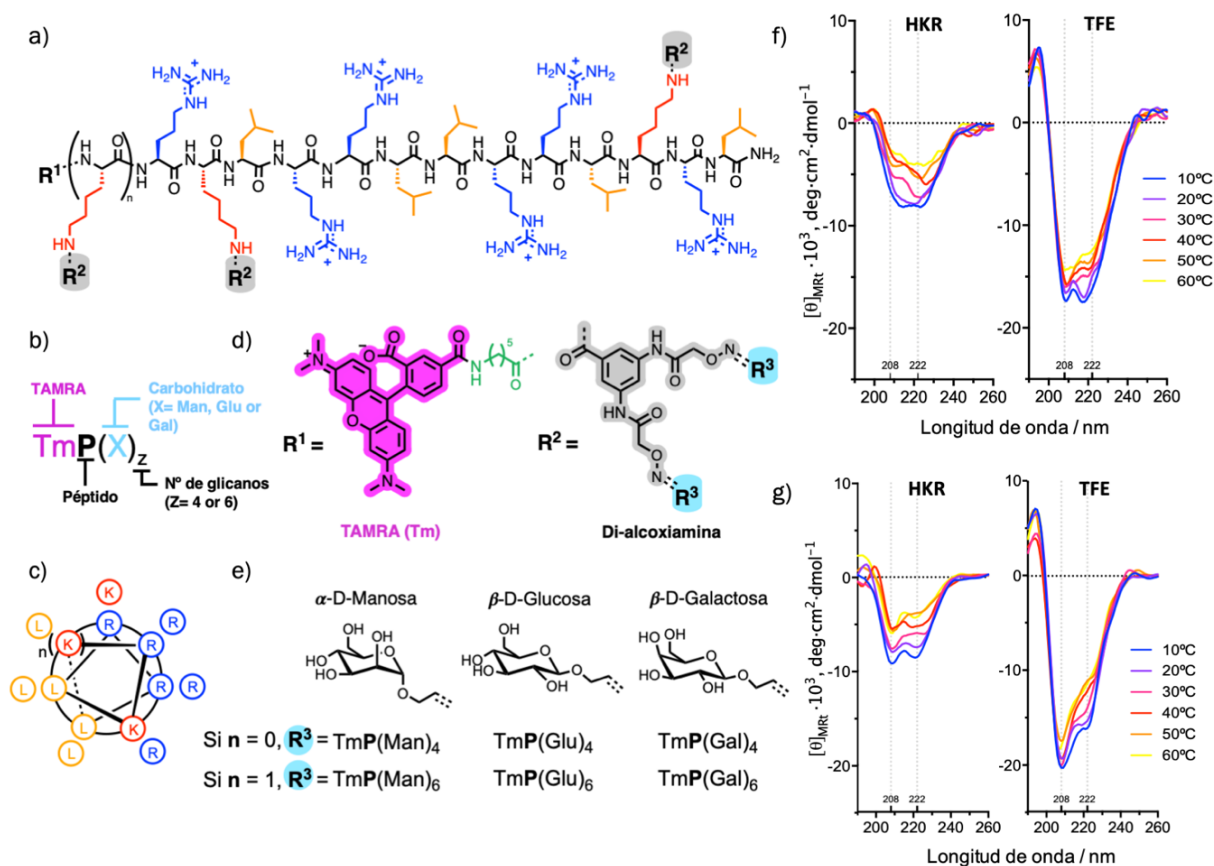
Aunque muchos campos de la química empiezan a reconocer y diseñar estructuras teniendo en cuenta cada vez más la importancia de las interacciones multivalentes,<sup>281</sup> la glicobiología hace décadas que ha reconocido el papel crucial que desempeñan en numerosos procesos biológicos, incluidas las interacciones lectina-carbohidrato.<sup>224</sup> Tal y como se ha descrito anteriormente, diversos estudios hablan de una mayor fortaleza en las uniones proteína-carbohidrato cuando se disponen numerosos ligando en un único andamio como es el caso de los glicofullerenos globulares<sup>251,252</sup> u otras glicoestructuras.

Con este objetivo en mente, y para la construcción de un escudo de carbohidratos de alta densidad entorno a una estructura peptídica penetrante, se ha diseñado un nuevo conector di-alcoxiamina (**Fig. 30** en gris, ver sección experimental pág. 145) que nos permite duplicar el número de carbohidratos por aminoácido de lisina sin alterar la estrategia glicopeptídica diseñada inicialmente y manteniendo la sencillez sintética que nos aporta la química de las oximas para dotar de ligandos la estructura peptídica. Para ello, el reactivo comercial 3,5-diaminobenzoato se expuso a una reacción de formación de amidas con el compuesto **1**, dando lugar a una di-alcoxiamina intermedia (**Fig. SE15**) la cual fue tratada con hidróxido de litio para hidrolizar el grupo éster y proporcionar el conector bencílico final tipo di-alcoxiamina (Compuesto **2**, Ácido 3,5-di-((Boc-aminooxi)acetamido)benzoico, **Fig. SE15**). Esta nueva familia de glicopéptidos esta constituida por la misma secuencia de aminoácidos que sus predecesores con dos ligandos azúcar descritos en el capítulo anterior, y que junto con este nuevo conector alcoxiamina **2**, serán capaces de generar estructuras con cuatro (TmP(X)<sub>4</sub>, n = 0, RK\*LRLLRRLK\*RL, **Fig. 30a**) y con seis carbohidratos, en este último caso se adicionó una lisina más en el extremo N-terminal (TmP(X)<sub>6</sub>, n = 1, K\*RK\*LRLLRRLK\*RL, **Fig. 30a**). De esta forma, siguiendo la misma ruta de síntesis, una vez que los péptidos se escinden del soporte sólido, se purificaron antes de conjugarlos con los diferentes aldehídos de carbohidratos: X = Man ( $\alpha$ -D-manosa), Glu ( $\beta$ -D-glucosa), Gal ( $\beta$ -D-galactosa). Es importante destacar que, una vez más, la formación bio-ortogonal de las oximas tuvo lugar en agua, a temperatura ambiente y en cortos tiempos con rendimientos cuantitativos en la mayoría de los casos (**Fig. SE13-SE14**). Finalmente, después de la conexión péptido/carbohidratos, la eliminación del exceso de azúcar aldehído se realizó por HPLC de fase reversa. Los glicopéptidos finales se caracterizaron mediante MS, HRMS y espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN.

A continuación, se estudió el impacto del aumento del número de carbohidratos sobre la estructura peptídica secundaria mediante CD. Para ello se seleccionaron los glicopéptidos que contienen  $\beta$ -D-glucosa: TmP(Glu)<sub>4</sub> y TmP(Glu)<sub>6</sub>. Los espectros de CD de los glicopéptidos resultantes se midieron en buffer HKR (pH 7,4) y trifluoroetanol (TFE) y mostraron bandas típicas de la hélice- $\alpha$  a  $\lambda = 208$  y  $222$  nm (**Fig. 30f** y **g**). Siguiendo la banda  $\lambda = 222$  nm a 20°C, estimamos un porcentaje de helicidad de 17,9% y 20,7%, en buffer HKR y en presencia del disolvente de TFE aumentó hasta 41,7% y un 46,9% para TmP(Glu)<sub>4</sub> y TmP(Glu)<sub>6</sub> respectivamente (**Fig. 30f** y **g**). En comparación con su homólogo con dos glucosas estudiado en el capítulo anterior, TmP(Glu)<sub>2</sub>, los valores de CD se mantuvieron en el mismo rango en condiciones tampón, pero descendieron ligeramente en TFE. Se puede concluir que el aumento

<sup>281</sup> C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksche, J. Dornedde, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 10472-10498.

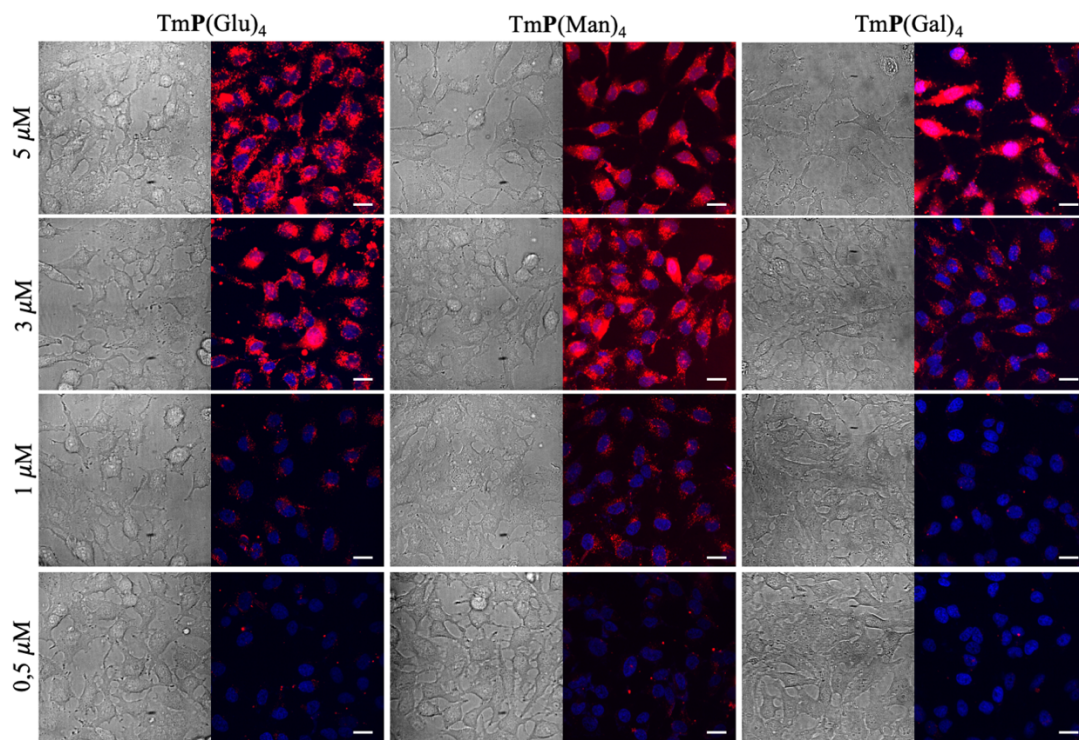
de la cantidad de carbohidratos tiene una pequeña influencia en la estructura secundaria de los glicopéptidos, aunque siguen manteniendo cierto plegamiento helicoidal.



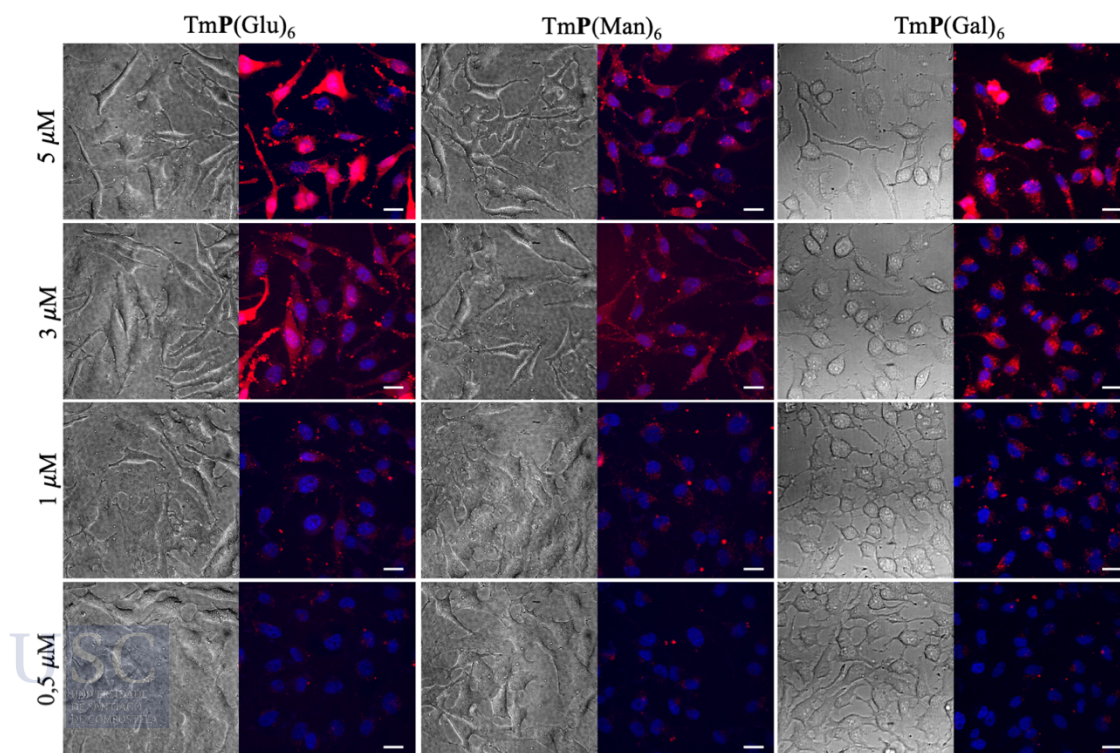
**Figura 30.** Estructura peptídica y espectros de dicroísmo circular (CD). a) Secuencia peptídica lineal con las cadenas laterales de los aminoácidos en colores: región catiónica de argininas (R) en azul, región hidrofóbica de leucinas (L) en naranja y residuos modificados de lisina (K-R<sup>2</sup>) en rojo. b) Nomenclatura de los glicopéptidos: TmP(X)<sub>Z</sub>, donde X representa al tipo de carbohidrato (X = Man, Glu o Gal) y Z corresponde al número de ligandos azúcar (Z = 4 o 6). c) Diagrama en roseta de la disposición espacial de los aminoácidos en la conformación helicoidal. d) Los péptidos se encuentran marcados fluorescentemente en el extremo N-terminal: R<sup>1</sup> corresponde al TAMRA (Tm). La sustitución R<sup>2</sup> unida a las lisinas corresponde al nuevo conector bencílico Di-alcoxiamina el cual cuenta con dos uniones oxima R<sup>3</sup>. Estas uniones R<sup>3</sup> son derivados oxima de α-D-manosa (Man), β-D-glucosa (Glu) y β-D-galactosa (Gal). Dependiendo de si la estructura peptídica contiene dos (n = 0) o tres lisinas (n = 1), la estructura final adquirirá en su superficie 4 o 6 ligandos de carbohidrato. Espectros de CD de f) TmP(Glu)<sub>4</sub> y g) TmP(Glu)<sub>6</sub> en diferentes condiciones en buffer HKR (pH 7,4) y TFE a diferentes temperaturas (10°C-60°C). Resultados del CD en porcentaje de helicidad a 20°C en buffer HKR para TmP(Glu)<sub>4</sub>: 17,9% y TmP(Glu)<sub>6</sub>: 20,7%, y en TFE para TmP(Glu)<sub>4</sub>: 41,7% y TmP(Glu)<sub>6</sub>: 46,9%.

### 3. Estudios de internalización celular y citotoxicidad

De nuevo, realizamos estudios de cuantificación de la internalización celular mediante citometría de flujo a diferentes concentraciones en células HeLa. En esta ocasión, se quieren comparar los glicopéptidos en función del número de carbohidratos para analizar el impacto del aumento de ligandos en la eficacia de internalización y la citotoxicidad. Los péptidos se incubaron con las células HeLa a diferentes concentraciones durante 30 minutos, se lavaron a fondo con buffer HKR y una disolución de heparina para eliminar el péptido unido a la membrana, por último, las células se observaron al microscopio y se cuantificó su fluorescencia total (ver la sección experimental pág. 151-152).

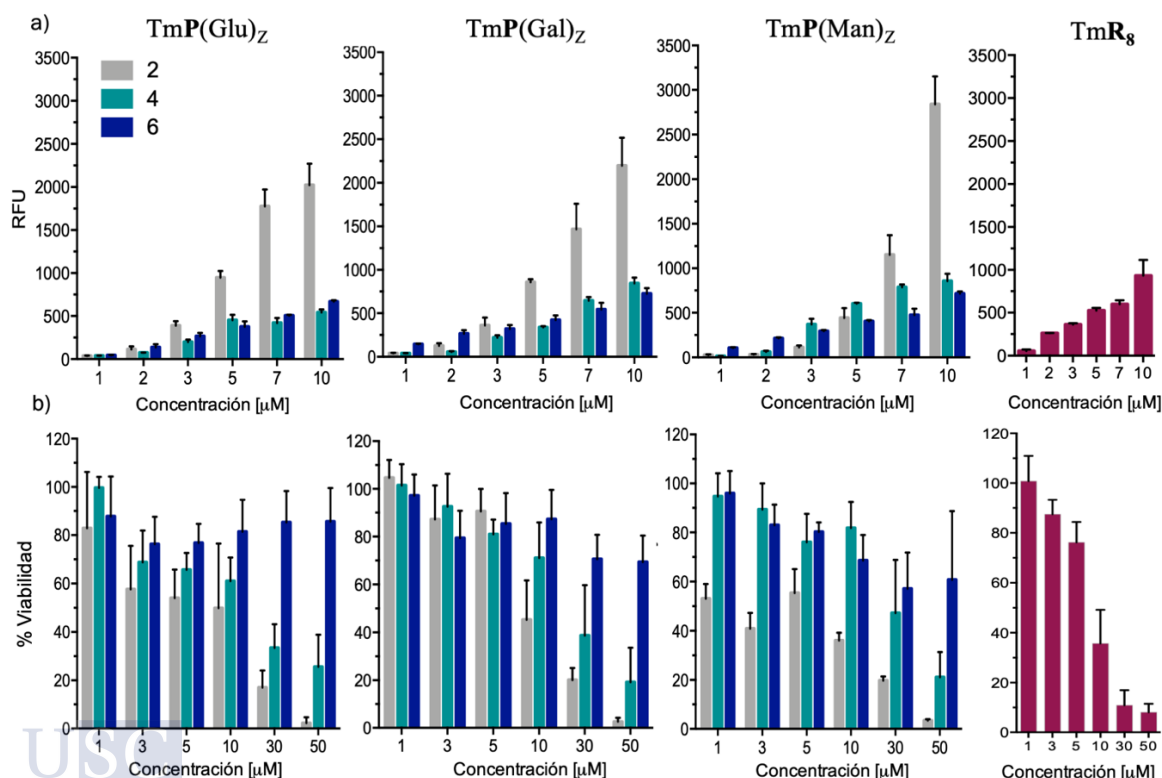


**Figura 31.** Comportamiento de internalización de los glicopéptidos con estructura TmP(X)<sub>4</sub>. Imágenes de microscopía confocal de la eficacia de internalización. Las columnas verticales corresponden a los glicopéptidos y las filas horizontales muestran las diferentes concentraciones empleadas. Los glicopéptidos se incubaron en buffer HKR durante 30 minutos a 37°C. Barras de escala: 25 μm.



**Figura 32.** Comportamiento de internalización de los glicopéptidos con estructura TmP(X)<sub>6</sub>. Imágenes de microscopía confocal de la eficacia de internalización. Las columnas verticales corresponden a los glicopéptidos y las filas horizontales muestran las diferentes concentraciones empleadas. Los glicopéptidos se incubaron en buffer HKR durante 30 minutos a 37°C. Barras de escala: 25 μm.

Las micrografías fluorescentes (**Fig. 31** y **32**) muestran diferentes distribuciones de fluorescencia. Se pueden observar patrones de fluorescencia puntiforme, lo que correspondería con un atrapamiento endosomal, así como un patrón de internalización difuso en el citosol que avalaría el uso de estas glicoestructuras como vehículos para la entrega citosólica de fármacos. Como era de esperar, en los derivados de manosa  $\text{TmP}(\text{Man})_{4,6}$  y galactosa  $\text{TmP}(\text{Gal})_{4,6}$ , las micrografías confocales ya sugieren una ligera disminución de la señal de fluorescencia total con el aumento del número de glicanos, desde los péptidos tetra- hasta los hexa-sustituídos (**Fig. 31** y **32**). Sin embargo, se observó una intensidad de señal similar, independiente del número de glicanos, para el derivado de glucosa, que además, mostró una señal citosólica difusa más fuerte para  $\text{TmP}(\text{Glu})_6$  que la del análogo tetra-sustituído  $\text{TmP}(\text{Glu})_4$  (comparar **Fig. 31** con **32**). Estos resultados para el derivado de la hexa-glucosa no se esperaban, ya que un aumento de dos residuos de glicanos hidrofílicos debería, en principio, reducir la interacción con la membrana y la internalización celular. Aunque se podría decir que la internalización es concentración-dependiente, la tendencia observada por microscopía confocal fue confirmada por citometría de flujo (**Fig. 33a**). La citometría dosis-respuesta validó la esperada disminución de la internalización de los péptidos equipados con hexa-manosa y hexa-galactosa, y confirmó el contraintuitivo aumento de la internalización del péptido modificado con seis glucosa  $\text{TmP}(\text{Glu})_6$  (comparar la internalización a  $10 \mu\text{M}$  de la **Fig. 33a**). Además, tal y como se observa en las gráficas de la **Fig. 33a**, donde se han incluido los homólogos con dos azúcares descritos en el capítulo I, las estructuras con dos ligandos  $\text{TmP}(\text{X})_2$  presentan un poder de penetración significativamente mayor que las estructuras  $\text{TmP}(\text{X})_4$  y  $\text{TmP}(\text{X})_6$ .



**Figura 33.** a) Eficiencia de internalización en células HeLa a diferentes concentraciones (1, 2, 3, 5, 7 y  $10 \mu\text{M}$ ) medida mediante citometría de flujo de cada una de las glicoestructuras agrupadas en función del número de carbohidratos, donde  $Z = 2$  (gris), 4 (verde) o 6 (azul). b) Ensayo MTT: Citotoxicidad de cada uno de los GCPPs en células HeLa a diferentes concentraciones (1, 3, 5, 10, 30 y  $50 \mu\text{M}$ ). Tanto la capacidad de internalización como la viabilidad celular de las diferentes glicoestructuras fueron comparadas con un CPP de referencia típico como la octa-arginina marcada fluorescentemente ( $\text{TmR}_8$ , granate).

A continuación, se realizaron estudios de citotoxicidad celular empleando el ensayo MTT (ver sección experimental pág. 151). En esta ocasión, el aumento del número de carbohidratos fue directamente proporcional a la viabilidad celular, es decir, a mayor número de carbohidratos mayor porcentaje de viabilidad. Se puede confirmar que el número de glicanos sí tiene un fuerte impacto en el perfil de toxicidad de los péptidos penetrantes (**Fig. 33b**). De esta forma, las estructuras con dos ligandos  $\text{TmP(X)}_2$  presentaron la toxicidad más elevada y se observó una mejora creciente y significativa cuando se iban incorporando nuevos ligandos a la estructura peptídica (**Fig. 33b**). Los péptidos modificados con seis glicanos  $\text{TmP(X)}_6$  mostraron una clara reducción de la toxicidad en comparación con los péptidos tetra-sustituidos, especialmente a altas concentraciones (**Fig. 33b**). Además del mínimo impacto en la eficiencia de internalización y la intrigante localización intracelular difusa del péptido hexa-glucosa  $\text{TmP(Glu)}_6$ , este derivado también mostró un excelente perfil de viabilidad con una mínima toxicidad aparente en todo el rango de concentración empleado (1-50  $\mu\text{M}$ , **Fig. 33b**). Estos resultados sugieren que la optimización del número y la naturaleza química de los residuos de los glicanos podría afectar significativamente y mejorar el perfil de toxicidad de los péptidos penetrantes sin comprometer la eficiencia de captación. Se empleó un CPP de referencia como es la octa-arginina marcada fluorescentemente con TAMRA ( $\text{TmR}_8$ ) como control para calibrar la internalización de estos péptidos penetrantes protegidos con escudos de carbohidratos. En contraste con el péptido control  $\text{TmR}_8$ , las estructuras glicopeptídicas mostraron una eficiencia de internalización ligeramente menor, pero un perfil tóxico fuertemente mejorado, en un rango de concentración similar (**Fig. 33**).

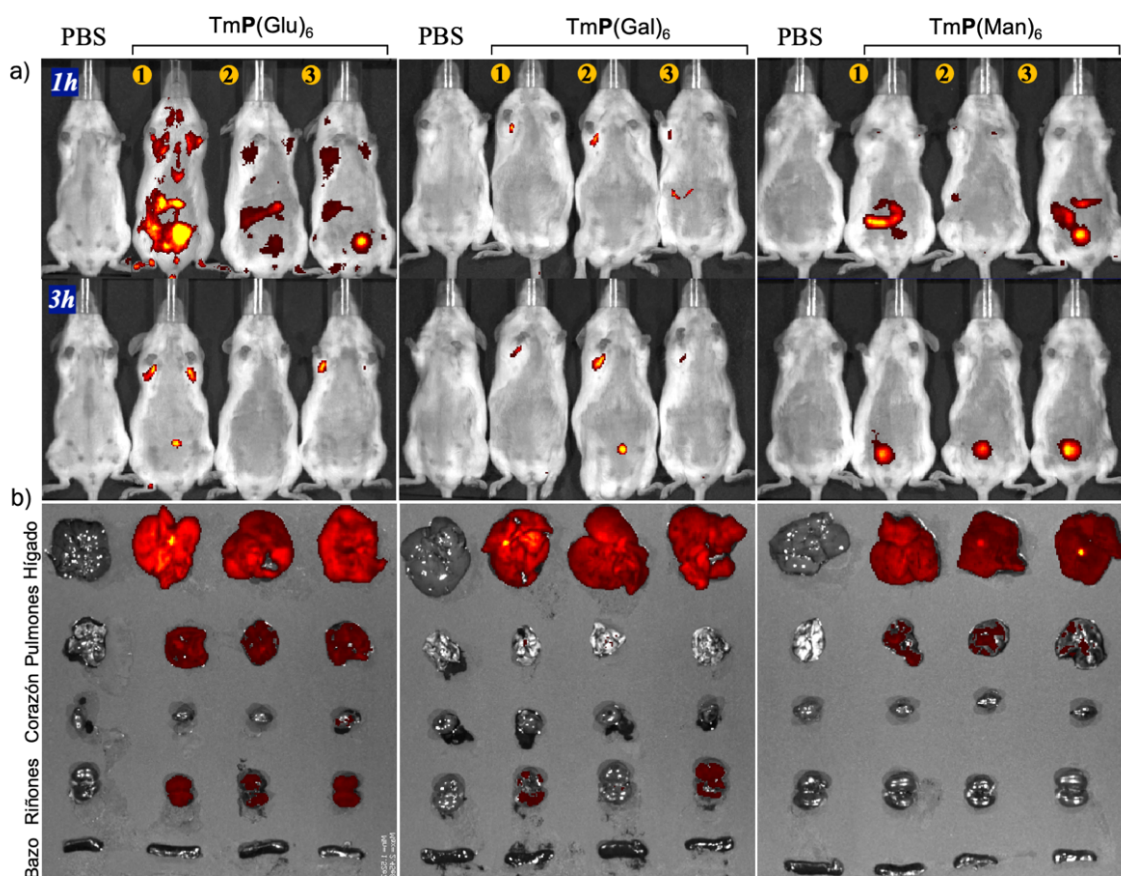
Se seleccionaron los homólogos de  $\beta$ -D-glucosa para estudiar su comportamiento de internalización a altas concentraciones (50  $\mu\text{M}$ ), estos experimentos mostraron una fuerte internalización para  $\text{TmP(Glu)}_2$  y  $\text{TmP(Glu)}_4$  unido con una importante toxicidad celular (**Fig. SE16**). Sin embargo,  $\text{TmP(Glu)}_6$  no mostró un comportamiento tan agresivo a estas concentraciones, observándose pequeñas cantidades de péptido en el interior de algunas células acompañado de una buena viabilidad (**Fig. SE16**).

#### 4. Experimentos de biodistribución *in vivo* en modelos de ratón

Impulsados por los excelentes resultados de viabilidad de la glicosilación de alta densidad, se investigó el comportamiento *in vivo* y biodistribución de los péptidos hexa-funcionalizados en modelos de ratón (**Fig. 34**). Estos estudios de biodistribución se llevaron a cabo mediante inyección intravenosa en la cola de 50  $\mu\text{g}$  de cada uno de los glicopéptidos con estructura  $\text{TmP(X)}_6$  en un volumen total de 50  $\mu\text{L}$  de PBS ( $\sim 220 \mu\text{M}$ ) a un total de 3 ratones, un cuarto ratón se empleó como control y se le inyectó el mismo volumen de PBS (**Fig. 34**). La expresión de los glicopéptidos se cuantifica a través de un mapa de intensidad utilizando una escala basada en colores que va desde el rojo (baja intensidad) al amarillo (alta intensidad).

Las imágenes de fluorescencia *in vivo* se adquirieron 1 y 3 horas después de la inyección (**Fig. 34a**, ver sección experimental pág. 152). En consonancia con los resultados *in vitro*, el mapa de intensidad de la fluorescencia indicó una mejor biodistribución del péptido con glucosas  $\text{TmP(Glu)}_6$ . Transcurridas 3h post-inyección los animales se sacrificaron para practicarles una necropsia y realizar un estudio *ex vivo* de los siguientes tejidos: pulmones, corazón, hígado, riñones y bazo (**Fig. 34b**). La cuantificación de la fluorescencia *ex vivo* confirmó, no solo una señal de fluorescencia mejorada, sino la capacidad de alcanzar más eficientemente el tejido pulmonar para el derivado de la hexa-glucosa (**Fig. 34b**). A pesar de

las pequeñas desviaciones en los valores medios del derivado de galactosa TmP(Gal)<sub>6</sub>, no se pudieron detectar rastros de toxicidad en los análisis hematológicos y bioquímicos de los ratones correspondientes en los que se administró TmP(Man)<sub>6</sub> y TmP(Glu)<sub>6</sub> (Tabla SE1- SE2).



**Figura 34.** Biodistribución con el tiempo de las estructuras con fórmula TmP(X)<sub>6</sub>: a) Imágenes *in vivo* a 1h y 3h desde la administración de 50 µg de cada uno de los glicopéptidos, b) *ex vivo* después de 3h post-inyección y observación de la cantidad de cada compuesto en los diferentes órganos estudiados (hígado, pulmones, corazón, riñones y bazo).

## 5. Conclusiones

En este capítulo, se ha descrito el potencial de una nueva estrategia para multiplicar el número de ligandos azúcar mediante el uso de un conector bencílico doble tipo alcoxiamina para la inserción directa de derivados aldehído de carbohidratos. Esta sencilla metodología permite la obtención de glicopéptidos derivados de CPPs en donde los carbohidratos actúan como barreras o escudos protectores que relajan/rebajan las elevadas propiedades penetrantes y citotoxicidad asociada a estas estructuras peptídicas.

En este segundo capítulo:

- Se empleó un nuevo conector bencílico de alcoxiamina para el acoplamiento de dos unidades de sacáridos en la cadena lateral de los aminoácidos de lisina de una secuencia peptídica. La formación del enlace oxima con los correspondientes aldehídos de los carbohidratos permitió la preparación de péptidos penetrantes altamente glicosilados con un mínimo esfuerzo sintético.
- Se obtuvieron diferentes glicopéptidos con fórmula general  $TmP(X)_Z$ : donde X corresponde al tipo de carbohidrato, Man ( $\alpha$ -D-manosa), Glu ( $\beta$ -D-glucosa) o Gal ( $\beta$ -D-galactosa) y Z al número de carbohidratos que contiene cada estructura peptídica (4 o 6). Todos ellos se encuentran marcados fluorescentemente con TAMRA (Tm).
- La transición desde dos a cuatro y seis sacáridos redujo significativamente la capacidad de internalización de las estructuras peptídicas estudiadas.
- Sorprendentemente, se descubrió que una sustitución de cuatro a seis sacáridos no produjo una fuerte reducción de la eficiencia de internalización, mientras que mejoraba significativamente el perfil de toxicidad de los andamios peptídicos.
- En particular, la sustitución por glucosa se confirmó como un escudo de carbohidratos óptimo con una excelente captación *in vitro* y localización intracelular, así como una excelente biodistribución *in vivo*. Estos resultados apoyan el potencial de la funcionalización de péptidos con glicanos, y en particular la inserción de glucosa, para la mejora del perfil de captación/toxicidad de péptidos penetrantes celulares cortos.

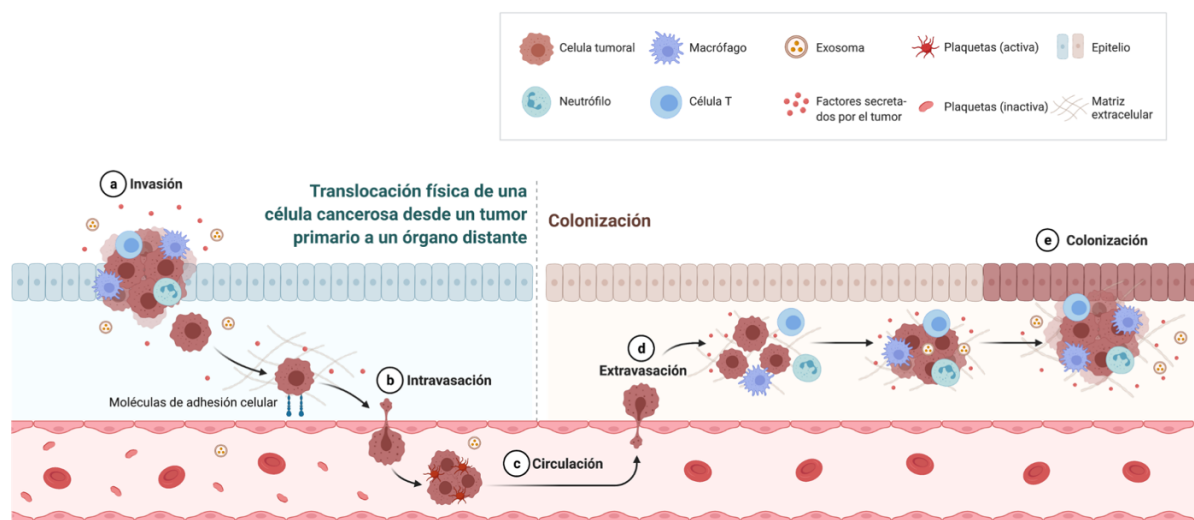
Los resultados descritos en este documento resaltan la importancia y el potencial de la glicosilación, en particular de la funcionalización de alta densidad con glucosas, para ajustar la internalización y la citotoxicidad de los CPPs.

# Introducción II



## 1. El cáncer y el proceso de metástasis

“Cáncer” es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo y en el que se observa la multiplicación rápida y descontrolada de las células del cuerpo. Una característica del cáncer es la capacidad de extensión de las células tumorales más allá de sus límites habituales, pudiendo invadir partes adyacentes del cuerpo o, en muchos casos, propagarse a otros órganos en un proceso conocido como metástasis.<sup>282</sup> La metástasis, es el proceso de propagación, reproducción, y extensión de un foco cancerígeno a otro tejido u órgano distinto de aquel en el que fue iniciado. En este proceso, las células cancerosas presentan la capacidad de penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos, viajar a través de la circulación sanguínea, y posteriormente, proliferar en tejidos sanos de otra parte del cuerpo. Esta compleja cascada metastásica puede organizarse conceptualmente en dos fases principales: la **translocación física de una célula cancerosa desde el tumor primario al microambiente de un tejido distante** y posteriormente la **colonización** (Fig. 35).<sup>282</sup>



**Figura 35.** La cascada metastásica. La metástasis puede concebirse como un proceso que se desarrolla en dos fases principales: la translocación física de las células cancerosas del tumor primario a un órgano distante y (ii) la colonización de las células translocadas. a) Las células cancerosas del tumor primario invaden la matriz circundante y b) se dirigen hacia los vasos sanguíneos, donde se produce la intravasación para entrar en la circulación, que sirve como su principal medio de paso hacia los órganos distantes. c) Las células cancerosas viajan por el torrente sanguíneo hasta que d) salen de la circulación e invaden el microambiente del nuevo tejido y una vez en adaptada al microambiente, e) inicia la proliferación y colonización celular. La metástasis de los tumores se ve favorecida por las interacciones con las plaquetas y los leucocitos, esta agregación puede defender a las células tumorales de la eliminación inmunitaria y favorecer su posterior propagación.<sup>282</sup> Figura creada con BioRender.com.

En esta primera etapa de diseminación, una célula cancerosa ejecuta la siguiente secuencia de pasos: invade localmente el tejido circundante (**Fig. 35a**), esta invasión, que inicia el proceso metastásico, consiste en cambios en la adherencia de las células tumorales a las células y a la matriz extracelular (MEC), acompañado de la degradación proteolítica del tejido circundante y la motilidad para impulsar físicamente una célula tumoral a través del tejido. En esta adhesión intervienen proteínas transmembrana como las integrinas o las cadherinas. El compromiso de estas proteínas y otras moléculas de fijación va acompañado del reclutamiento de proteasas para

<sup>282</sup> C. L. Chaffer, R. A. Weinberg, *Science*, **2011**, 331,559–564.

degradar la MEC, proporcionando una vía para la invasión.<sup>283</sup> A continuación, entra en la microvasculatura de los sistemas linfático y sanguíneo (intravasación, **Fig. 35b**), sobrevive y se desplaza a través del torrente sanguíneo hasta los microvasos de los tejidos distantes (**Fig. 35c**), y una vez sale del torrente sanguíneo (extravasación, **Fig. 35d**), comienza la segunda etapa, la colonización, donde sobrevive y se adapta al microambiente de los tejidos distantes de forma que facilita la proliferación celular y la formación de un tumor secundario macroscópico (**Fig. 35e**).<sup>283</sup> El término "colonización" refleja las influencias combinadas de la proliferación de células tumorales, la apoptosis, la latencia y la angiogénesis en la formación de una lesión de crecimiento progresivo en un lugar distante.

Los eventos de reconocimiento proteínas-ligandos están detrás de procesos biológicos críticos como la infección viral, la comunicación celular y el desarrollo metastásico.<sup>284</sup> Desgraciadamente, los mecanismos moleculares y celulares que tienen lugar durante el proceso de metástasis aún no se han elucidado por completo. Sin embargo, cada vez hay más pruebas que demuestran la contribución de las moléculas de adhesión celular en las diferentes etapas de la propagación metastásica. De esta forma, una de las etapas principales del proceso de metástasis es el reconocimiento molecular a través de interacciones multivalentes, altamente selectivas y con gran afinidad, entre células tumorales del flujo sanguíneo y células endoteliales de tejidos alejados del foco principal del tumor.<sup>285</sup> En concreto, a principios de los años 90 se descubrió la importancia de la interacción entre los oligosacáridos sialilados **Sialil Lewis X (sLe<sup>X</sup>)**<sup>286</sup> y **Sialil Lewis A (sLe<sup>A</sup>)**,<sup>287</sup> los cuales se sobreexpresan en células tumorales circulantes, y las proteínas de membrana de la familia de las **selectinas**, sobreexpresadas en células endoteliales, leucocitos y plaquetas. Por este motivo, estas interacciones son consideradas una diana clave para el diagnóstico de focos de metástasis en sus primeros estadios de colonización.<sup>285</sup>

## 1.1 Moléculas de adhesión celular: la familia de las selectinas

Las moléculas de adhesión celular (MAC) son proteínas transmembrana presentes en leucocitos y células endoteliales y que participan en la unión celular con otras células o con la matriz extracelular; esta unión por medio de las MACs es conocida como adhesión celular. Estas proteínas son típicamente receptores transmembrana y están formados por tres dominios: un dominio intracelular, que interacciona con el citoesqueleto, un dominio transmembrana, y un dominio extracelular que interacciona con los diferentes ligandos y células del medio exterior. La mayoría de las moléculas de adhesión celular pertenecen a cuatro grandes familias de proteínas: Las MACs independientes de Ca<sup>+2</sup> como son la superfamilia de las **immunoglobulinas** y las **integrinas**; y las MACs dependientes de Ca<sup>+2</sup>, como son las **cadherinas** y las **selectinas**.

Las selectinas son una familia de MACs dependientes de Ca<sup>+2</sup>, que se caracterizan por poseer una estructura muy conservada, la cual incluye a un dominio lectina de tipo C, es decir,

---

<sup>283</sup> P. S. Steeg, *Nat. Med.*, **2006**, *12*, 895-904.

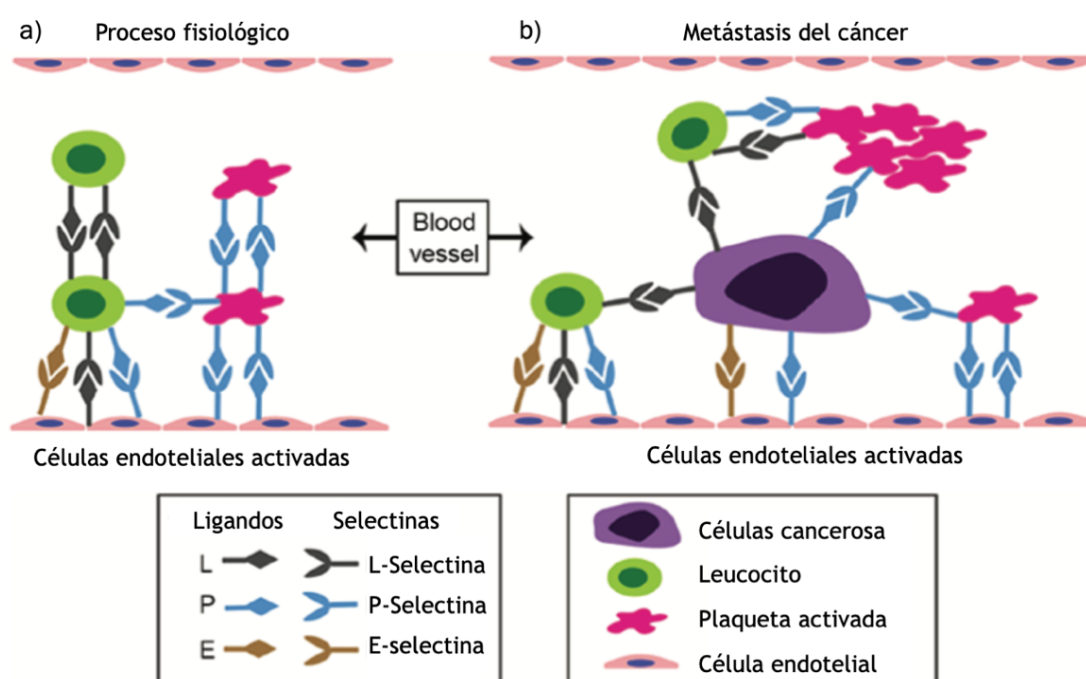
<sup>284</sup> B. A. H. Smith, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2021**, *20*, 217-243.

<sup>285</sup> D. Ding, Y. Yao, S. Zhang, C. Su, Y. Zhang, *Oncol. Lett.*, **2017**, *13*, 13-21.

<sup>286</sup> M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S. Hakomori, J. C. Paulson, *Science*, **1990**, *250*: 1130-1132.

<sup>287</sup> A. Takada, K. Ohmori, N. Takahashi, K. Tsuyuoka, K. Yago, K. Zenita, A. Hasegawa, R. Kannagi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1991**, *179*: 713-719.

un dominio de unión proteína-carbohidrato (Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos, CRD). Los tres miembros más representativos de esta familia son la **E-selectina** (endotelial), la **L-selectina** (leucocitaria) y la **P-selectina** (plaquetaria).<sup>288</sup> Estos receptores de membrana reconocen oligosacáridos sialilados como sLe<sup>X</sup> o su isómero sLe<sup>A</sup>, estos tetrasacáridos contienen el motivo de reconocimiento mínimo de los ligandos de selectinas. Primeramente, las selectinas fueron identificadas como proteínas de adhesión clave en procesos de hemostasia y tráfico de leucocitos y plaquetas en el torrente sanguíneo,<sup>289,290</sup> posteriormente, se descubrió que esta familia de lectinas está implicada en otras enfermedades, entre las que se encuentra el proceso de metástasis del cáncer.<sup>291,292</sup> Su implicación en estos procesos fisiopatológicos tiene que ver con la unión de las células cancerosas circulantes a las células endoteliales, a los leucocitos y a las plaquetas, lo que las defiende de la eliminación inmunitaria y facilita la fijación y propagación metastásica (**Fig. 36**).<sup>292,293</sup>



**Figura 36.** Interacciones entre las selectinas en los procesos fisiológicos y durante la metástasis del cáncer. a) Funciones fisiológicas en la sangre: Los diferentes tipos de selectinas intervienen de forma cooperativa en la adhesión de los leucocitos y las plaquetas al endotelio. b) Posible correlación entre las selectinas y células cancerosas durante el proceso de metástasis: Las L- y P-selectinas median en el reclutamiento de leucocitos y plaquetas hacia las células cancerosas que las protege de la eliminación inmunitaria. Las E-selectinas son críticas en la adhesión de las células cancerosas al endotelio activado y en el apoyo a la propagación metastásica.<sup>285</sup>

La sobreexpresión de la E-selectina en células endoteliales es activada directamente por citoquinas como IL-1, TNF $\alpha$  y INF $\gamma$ , secretadas por las células tumorales y que inducen mecanismos de respuesta de tipo Ras/raf/MAPK.<sup>292,294</sup> Estas vías de comunicación consisten en cadenas de proteínas que transportan una señal desde un receptor en la superficie de la célula

<sup>288</sup> G. S. Kansas, *Blood*, **1996**, *88*, 3259-3287.

<sup>289</sup> R. P. McEver, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2002**, *14*, 581-586

<sup>290</sup> K. Ley, *Trends Mol. Med.*, **2003**, *9*, 263-268.

<sup>291</sup> H. Läubli, L. Borsig, *Semin. Cancer Biol.*, **2010**, *20* 169-177.

<sup>292</sup> I. P. Witz, *Cancer Metastasis Rev.*, **2008**, *27*, 19-30.

<sup>293</sup> L. J. Gay, B. Felding-Habermann, *Nat. Rev. Cancer.*, **2011**, *11*, 123-134.

<sup>294</sup> J. Tomlinson, J. L. Wang, S. H. Barsky, M. C. Lee, J. Bischoff, M. Nguyen, *Int. J. Oncol.*, **2000**, *16*, 347-353.

hasta el núcleo de la misma, provocando la expresión de determinadas proteínas que generan diversos cambios en la célula, en este caso, la síntesis y aumento de la exposición de selectinas. Es decir, las células tumorales en metástasis pueden inducir un efecto de cascada de citoquinas, que da lugar a la activación y sobreexpresión de la E-selectina de las células endoteliales,<sup>295</sup> a continuación, los ligandos de carbohidrato de las células tumorales interactúan con estos receptores desencadenando la adhesión, fijación y propagación del tumor.<sup>296</sup> Existen numerosas pruebas sustanciales que demuestran como la E-selectina favorece la adhesión de las células tumorales al endotelio,<sup>297</sup> por ejemplo, cabe destacar su papel relevante en la metástasis del cáncer de colon al pulmón,<sup>298</sup> el aumento endotelial de este receptor facilita la metástasis de las células de cáncer de páncreas al hígado, resaltar su papel clave en la migración de células de cáncer de mama,<sup>299</sup> y en la interacción entre las células del cáncer de próstata metastásico y el endotelio de la médula ósea.<sup>300</sup> Por lo tanto, parece que la E-selectina es un mediador de la metástasis en numerosos tipos de cáncer. Por esta razón, es fácil comprender que estos receptores tipo selectina sean importantes dianas metastásicas. Entre algunas estrategias cabe destacar el uso de la cimetidina la cual ha demostrado clínicamente un efecto beneficioso en pacientes con cáncer colorrectal. Este fármaco interfiere en la interacción entre los antígenos Sialil Lewis y la E-selectina bloqueando la adhesión de las células tumorales colorrectales a la monocapa de células endoteliales y generando efectos antimetastásicos.<sup>301</sup> Con el mismo objetivo se han utilizado oligonucleótidos antisentido para inhibir la expresión de E-selectina o anticuerpos monoclonales para bloquear la progresión metastásica.<sup>295,302</sup>

Por otro lado, tal y como se mencionó anteriormente, la P-selectina, expresada en células endoteliales y plaquetas, favorece la metástasis tumoral al mediar en la agregación y adhesión de las plaquetas a las células tumorales, y en la formación de agrupados de plaquetas y células cancerosas.<sup>289</sup> La L-selectina suele favorecer la rodadura de los leucocitos por el endotelio y su reclutamiento en lugares donde se produce una señal inflamatoria. En consecuencia, la expresión de L-selectina en neutrófilos, monocitos y células NK (Natural Killer o células asesinas) facilita la progresión tumoral y la metástasis con el apoyo de las interacciones célula cancerosa-leucocito-endotelio.<sup>303,304</sup> De nuevo, ambos receptores resultan dianas clave en la lucha contra la metástasis del cáncer, por ejemplo, el potencial metastásico del cáncer gástrico *in vivo* se atenúa significativamente con el anticuerpo monoclonal de la P-selectina.<sup>305</sup> Estudios experimentales con heparina, un reactivo antimetastático, ha suprimido las interacciones de las plaquetas con las células de cáncer de colon y de pulmón mediadas por la P-selectina.<sup>306,307</sup>

<sup>295</sup> A. M Khatib, M. Kontogianea, L. Fallavollita, B. Jamison, S. Meterissian, P. Brodt, *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 1356-1361.

<sup>296</sup> P. Brodt, L. Fallavollita, R. S. Bresalier, S. Meterissian, C. R. Norton, B. A Wolitzky, *Int. J. Cancer.*, **1997**, *71*, 612-619.

<sup>297</sup> S. Gout, P. L. Tremblay, J. Huot, *Clin. Exp. Metastasis*, **2008**, *25*, 335-344.

<sup>298</sup> S. Köhler S, S. Ullrich, U. Richter, U. Schumacher, *Br. J. Cancer.*, **2010**, *102*: 602-609.

<sup>299</sup> V. S. Shirure, K. A. Henson, R. L. Schnaar, L. Nimrichter, M. M. Burdick, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2011**, *406*, 423-429.

<sup>300</sup> C. J. Dimitroff, M. Lechpammer, D. Long-Woodward, J. L. Kutok, *Cancer Res.*, **2004**, *64*, 5261-5269

<sup>301</sup> K. Kobayashi, S. Matsumoto, T. Morishima, T. Kawabe, T. Okamoto, *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 3978-3984.

<sup>302</sup> A. M. Khatib, L. Fallavollita, E. V. Wancewicz, B. P. Monia, P. Brodt, *Cancer Res.*, **2002**, *62*, 5393-5398.

<sup>303</sup> H. Läubli, J. L. Stevenson, A. Varki, N. M. Varki, L. Borsig, *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 1536-1542.

<sup>304</sup> L. Borsig, R. Wong, R. O. Hynes, N. M. Varki, A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 2193-2198.

<sup>305</sup> J. L. Chen, W. X. Chen, J. S. Zhu, N. W. Chen, T. Zhou, M. Yao, D. Q. Zhang, Y. L. Wu: *World J. Gastroenterol.*, **2003**, *9*, 1607-1610

<sup>306</sup> M. Wei, G. Tai, Y. Gao, N. Li, B. Huang, Y. Zhou, S. Hao, X. Zeng, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 29202-29210.

<sup>307</sup> Y. Gao, M. Wei, S. Zheng, X. Ba, S. Hao, X. Zeng, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2006**, *132*, 257-264.

Dado que las enfermedades neoplásicas siguen siendo uno de los retos más formidables de la medicina moderna, el esclarecimiento de la importancia de este tipo de lectinas, así como otros receptores clave en el proceso de metástasis del cáncer, puede aportar nuevos conocimientos sobre la terapia antimetastásica que permitan desarrollar diferentes sistemas diagnóstico y tratamientos más adecuados y efectivos para controlar y detener la propagación anormal y descontrolada de las células cancerígenas.

## 1.2 Ácidos siálicos: Sialil Lewis X (sLe<sup>X</sup>) y Sialil Lewis A (sLe<sup>A</sup>)

Una de las alteraciones más relevantes que sufren las células tumorales, es la modificación del patrón de glicosidación de la superficie celular, por este motivo la glicosilación anormal es una señal de advertencia de transformación maligna.<sup>308</sup> Los carbohidratos presentes en la membrana plasmática tienen una importante influencia en la habilidad de las células de interactuar con el microambiente que les rodea. Patrones alterados de glicosidación permiten a las células cancerígenas adquirir capacidades específicas para interactuar con todos los componentes de su microambiente, por ello, los procesos de adhesión, movilización y migración están alteradas en las células cancerígenas.<sup>309</sup> Este patrón de glicosidación de las células cancerígenas incluso cambia durante el progreso de la enfermedad, por ello, las células metastásicas presentan profundas diferencias en los patrones de glicosidación de la superficie celular, no solo con células normales, sino también con las células del tumor primario.<sup>310,311</sup>

Entre algunos de los cambios más importantes en el patrón de glicosidación de las células tumorales destacamos un incremento de los procesos de fucosilación,<sup>312</sup> así como un aumento de la presencia de oligosacáridos con residuos de ácido siálico.<sup>313</sup> El ácido siálico o ácido *N*-acetilneuramínico es un monosacárido derivado del ácido neuramínico mediante acetilación (Neu5Ac) que se encuentra fundamentalmente en los extremos exteriores no reductores de *N*-y *O*-glicanos conjugados a proteínas o lípidos. Este proceso de sialilación de los glicanos tiene lugar en el aparato de Golgi a través de una clase de glicosiltransferasas denominadas sialiltransferasas, sobreexpresadas por células tumorales.<sup>314,315</sup> La hipersialilación de células tumorales se ha asociado con los fenotipos metastásicos en pacientes con cáncer.<sup>316</sup> Debido a ello, muchas células tumorales sobreexpresan oligosacáridos sialilados en la superficie celular, entre los que se encuentran los ligandos de las selectinas, sLe<sup>X</sup> and sLe<sup>A</sup> (**Fig. 37**). La interacción de glicoproteínas o glicolípidos que contienen sLe<sup>X</sup> y sLe<sup>A</sup> con las selectinas es la responsable del proceso de expansión y colonización de órganos distantes durante la cascada metastásica.<sup>297,309</sup> Además, el aumento de los niveles de los oligosacáridos sLe<sup>X</sup> y sLe<sup>A</sup> se ha relacionado con la evolución y progresión de varios tipos de cáncer.<sup>317</sup>

<sup>308</sup> S. R. Stowell, T. Ju, R. D. Cummings, *Annu. Rev. Pathol.*, **2015**, *10*, 473–510.

<sup>309</sup> N. Reymond, B. B. d'Agua, A. J. Ridley, *Nat. Rev. Cancer*, **2013**, *13*, 858-870.

<sup>310</sup> I. Hauselmann, L. Borsig, *Front. Oncol.*, **2014**, *4*, 28.

<sup>311</sup> S. V. Glavey, D. Huynh, M. R. Reagan, S. Manier, M. Moschetta, Y. Kawano, A. M. Roccaro, I. M. Ghobrial, L. Joshi, M. E. O'Dwyer, *Blood Rev.*, **2015**, *29*, 269-279.

<sup>312</sup> P. L. Smith, J. T. Myers, C. E. Rogers, L. Zhou, B. Petryniak, D. J. Becker, J. W. Homeister, J.B. Lowe, *J. Cell. Biol.*, **2002**, *158*, 801–815.

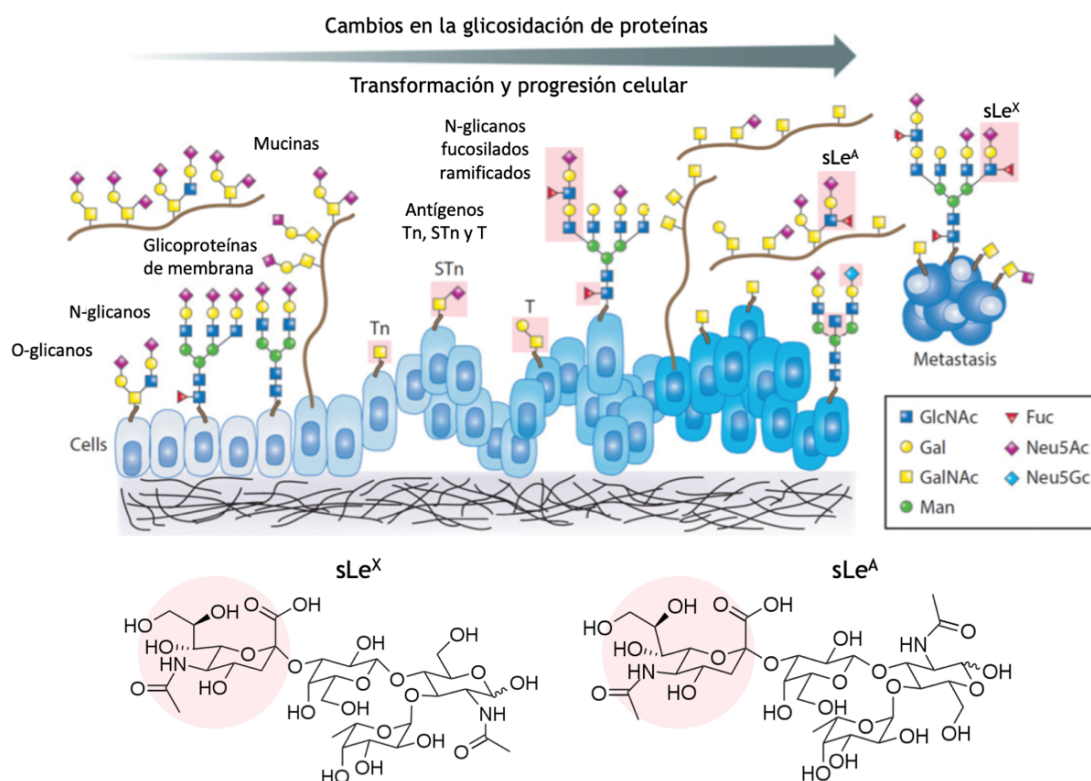
<sup>313</sup> C. Bull, M. A. Stoel, M. H. den Brok, G. J. Adema, *Cancer Res.*, **2014**, *74*, 3199-3204.

<sup>314</sup> F. Dall'Olio, N. Malagolini, M. Trinchera, M. Chiricolo, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2014**, *1840*, 2752-2764.

<sup>315</sup> O. M. Pearce, H. Laubli, *Glycobiology*, **2016**, *26*, 111-128.

<sup>316</sup> M. J. Schultz, A. F. Swindall, S. L. Bellis, *Cancer Metastasis Rev.*, **2012**, *31*, 501-518.

<sup>317</sup> R. Kannagi, M. Izawa, T. Koike, K. Miyazaki, N. Kimura, *Cancer Sci.*, **2004**, *95*: 377-384.



**Figura 37.** Cambios típicos en la glicosilación de las proteínas al principio y/o al final de la progresión del cáncer. Encuadrados en rosa destacan algunos cambios en los O-glicanos conjugados como los antígenos T, Tn, o STn, marcadores tumorales que en las células normales se encuentran enmascarados por la elongación de las cadenas de carbohidratos. También cabe resaltar la expresión alterada de N- y O-glicanos ramificados, sialilados y fucosilados, donde se encuentran las estructuras de los tetrasacáridos sLe<sup>X</sup> y sLe<sup>A</sup>.<sup>308</sup> Estructura del tetrasacárido Sialil Lewis X (sLe<sup>X</sup>): Neu5Ac $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4[Fuca1 $\rightarrow$ 3]GlcNAc $\beta$  y su isómero Sialil Lewis A (sLe<sup>A</sup>): Neu5Ac $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3[Fuca1 $\rightarrow$ 4]GlcNAc $\beta$ . En círculos rosa esta representada la estructura del ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico. Figura adaptada con permiso de la Ref. 308 Copyright 2015 ANNUAL REVIEWS.

Hace más de cuatro décadas que se atribuyeron características tumorales específicas al aumento de la expresión de azúcares de ácido siálico en la superficie de las células cancerosas, lo que llevó a definir los ácidos siálicos como posibles dianas terapéuticas. Los recientes avances en glicobiología e investigación sobre el cáncer han definido con mayor precisión los procesos clave que subyacen a la expresión aberrante de los ácidos siálicos en el cáncer, así como sus consecuencias. Estas consecuencias incluyen efectos sobre el crecimiento del tumor, la formación de metástasis y la resistencia a la terapia. Aunque la cirugía y la radioterapia controlan eficazmente muchos cánceres en estados primarios, el desarrollo de la enfermedad metastásica indica un mal pronóstico que no se trata con cirugía. En este contexto metastásico, la quimioterapia, la hormonoterapia y la radioterapia tienen fines paliativos y ofrecen una modesta pero estadísticamente significativa ampliación de la supervivencia.<sup>282,283</sup> A pesar de todo ello, la mayoría de los estudios de investigación realizados en cáncer no afrontan la metástasis como diana terapéutica *in vivo*,<sup>318</sup> fundamentalmente debido a que los tumores metastásicos son resistentes a las terapias convencionales y a su heterogeneidad biológica.<sup>319</sup> Estos datos ponen en evidencia la necesidad del desarrollo de nuevas tecnologías que permitan una mejor diagnosis y, posteriormente, una terapia más efectiva que mejoren los resultados de los pacientes.

<sup>318</sup> Y. Lazebnik, *Nat. Rev Cancer*, **2010**, *10*, 232–233.

<sup>319</sup> I. J. Fidler, *Semin. Cancer Biol.*, **2002**, *12*, 89-96.

## 2. Estructuras miméticas de los ligandos naturales sLe<sup>X</sup> y sLe<sup>A</sup>

En vista de que la interacción entre las selectinas y sus ligandos resulta un factor clave que impulsa la progresión tumoral, no es de extrañar que se hayan señalado como posibles objetivos para la terapia contra el cáncer, concretamente para detener y atenuar la cascada metastásica. A pesar de que los tetrasacáridos sLe<sup>X</sup> y sLe<sup>A</sup> son los ligandos naturales de las selectinas, la afinidad de estos oligosacáridos por sus receptores endoteliales es muy débil (en el rango bajo de mM).<sup>320</sup> Una alta afinidad en la interacción por las selectinas requiere de una presentación multivalente de sLe<sup>X</sup> y sLe<sup>A</sup>. La naturaleza resuelve este problema utilizando un soporte proteico o lipídico que permite la presentación simultánea de múltiples copias de los ligandos para dar lugar a interacciones multivalentes.<sup>289</sup> Estos tetrasacáridos se han probado como los primeros inhibidores de selectina, aunque la baja afinidad, los altos costes de producción debido a la complicada síntesis química de carbohidratos y las desfavorables propiedades farmacocinéticas hicieron imposible continuar con su desarrollo.<sup>290</sup> Otras estrategias utilizadas para inhibir selectinas han sido los anticuerpos,<sup>321,322</sup> tio-aptámeros<sup>323</sup> y glicomiméticos.<sup>324</sup>

Los recientes avances en el cribado y la optimización *in vitro* de potenciales ligandos selectivos basados en ácidos nucleicos, péptidos, anticuerpos o miméticos de anticuerpos constituyen un nuevo escenario muy prometedor.<sup>325</sup> A través de la técnica “phage-display”, que realiza un screening para reconocer secuencias que interactúan con la E-selectina, se logró identificar un péptido simple con una secuencia lineal de siete aminoácidos (Ile-Glu-Leu-Leu-Gln-Ala-Arg) denominado IELLQAR que interactúa específicamente con la E-selectina, demostrando que por sí solo, inhibe la metástasis dependiente de sLe<sup>X</sup>.<sup>326,327</sup> IELLQAR es una secuencia peptídica simple, que se puede sintetizar utilizando SPPS en gran escala y con excelentes rendimientos. Además, este ligando puede conjugarse fácilmente a nanosistemas para su presentación multivalente, como son los dendrones, dendrímeros, polímeros, nanogeles, nanopartículas, liposomas y fullerenos, entre otros.

A diferencia de las células tumorales, las células endoteliales constituyen un objetivo con receptores de membranas estables y no sometidos a modificaciones genéticas.<sup>328</sup> Estos receptores expresados en el revestimiento interior de los vasos sanguíneos son fácilmente accesibles a nuevos agentes de diagnósticos.<sup>329,330</sup> Además, la eliminación de una simple célula endotelial implica la muerte de cientos de células tumorales. Esta aproximación que utiliza

<sup>320</sup> R. P. McEver, *Glycoconj. J.*, **1997**, *14*, 585-591

<sup>321</sup> V. Bhaskar, D. A. Law, E. Ibsen, D. Breinberg, K. M. Cass, R. B. DuBridge, F. Evangelista, S. M. Henshall, P. Hevezi, J. C. Miller, M. Pong, R. Powers, P. Senter, D. Stockett, R. L. Sutherland, U. von Freeden-Jeffry, D. Willhite, R. Murray, D. E. Afar, V. Ramakrishnan, *Cancer Res.*, **2003**, *63*, 6387-6394.

<sup>322</sup> S. Kessner, A. Krause, U. Rothe, G. Bendas, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2001**, *1514*, 177-190.

<sup>323</sup> A. P. Mann, R. C. Bhavane, A. Somasunderam, B. LizMontalvo-Ortiz, K. B. Ghaghada, D. Volk, R. Nieves-Alicea, K. S. Suh, M. Ferrari, A. Annapragada, D. G. Gorenstein, T. Tanaka, *Oncotarget*, **2011**, *2*, 298-304.

<sup>324</sup> Y. Shamay, D. Paulin, G. Ashkenasy, A. David, *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 5906-5915.

<sup>325</sup> R. Simeon, Z. Chen, *Protein Cell*, **2018**, *9*, 3-14.

<sup>326</sup> M. N. Fukuda, C. Ohyama, K. Lowitz, O. Matsuo, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, M. Fukuda, *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 450-456.

<sup>327</sup> J. Zhang, J. Nakayama, C. Ohyama, M. Suzuki, A. Suzuki, M. Fukuda, M. N. Fukuda, *Cancer Res.*, **2002**, *62*, 4194-4198.

<sup>328</sup> J. Folkman, *Important Adv. Oncol.*, **1985**, 42-62.

<sup>329</sup> L. Borsi, E. Balza, M. Bestagno, P. Castellani, B. Carnemolla, A. Biro, A. Leprini, J. Sepulveda, O. Burrone, D. Neri, L. Zardi, *Int. J. Cancer*, **2002**, *102*, 75-85.

<sup>330</sup> T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink, G. Storm, *J. Control Release*, **2012**, *161*, 175-187.

como diana receptores de las células endoteliales ofrece un alto potencial, además, la diagnosis y el tratamiento es independiente del tipo de tumor o de la diferenciación de este, presentando además una alta aplicabilidad. Por ello, resulta de especial interés desarrollar ligandos que interaccionan con las selectinas para el diagnóstico y tratamiento de la metástasis. El diseño de nuevos sistemas de nanodiagnóstico basados en el péptido IELLQAR dará lugar a estructuras multivalentes con una alta afinidad y especificidad por las células endoteliales circundantes a los focos de metástasis, evitando la biodistribución poco específica por el organismo, aumentando la eficacia de la diagnosis y minimizando los efectos secundarios debido al uso de concentraciones elevadas de estos agentes.

### 3. Estructuras de carbono como moldes de construcción: La ciencia de los fullerenos

#### 3.1 Antecedentes históricos

Hasta hace unas décadas, el grafito y el diamante eran consideradas las únicas formas alotrópicas conocidas del carbono. Sin embargo, a este singular grupo de estructuras tienen que incluirse grandes hallazgos como los **fullerenos**, los **nanotubos de carbono** o uno de los materiales del momento, el **grafeno**<sup>331</sup>, con fascinantes propiedades como una gran elasticidad, una resistencia extrema y una estructura electrónica interna que le permite una conductividad eléctrica como ningún otro material. El revolucionario hallazgo del grafeno, entre una mezcla de serendipia y cinta adhesiva, permitió ser galardonados a sus descubridores, A. Geim y K. Novoselov con el Premio Noble de Física en 2010.<sup>331</sup> Sin ir más lejos, a principios de la década de los 2000, las propiedades químicas y físicas de los fullerenos y los nanotubos de carbono eran un tema de gran interés en el campo de la investigación y el desarrollo. Un fullereno, se encuentra compuesto por átomos de carbono conectados por enlaces simples y dobles para formar una malla cerrada o parcialmente cerrada con anillos fusionados de cinco a siete átomos y que puede adoptar diferentes formas geométricas: una esfera hueca, un elipsoide o un nanotubo entre otras muchas formas y tamaños.

Estas estructuras de carbono fueron descubiertas por primera vez en 1985 por H. Kroto, R. Curl y R. Smalley,<sup>332</sup> lo que les condujo a la concesión del Premio Nobel de Química en 1996. En sus investigaciones, se pudieron observar espectros de masas de picos discretos que correspondían a moléculas con un número exacto de átomos de carbono ( $C_n$ ), en concreto las moléculas  $C_{60}$  y  $C_{70}$ .<sup>332</sup> La familia de fullerenos cerrados se les conoce de manera informal como buckybolos. La estructura  $C_{60}$ , uno de los miembros más conocidos, también denominado futboleno o buckminsterfullereno, presenta una estructura similar a un balón de fútbol o a una cúpula geodésica y está constituido por 20 hexágonos y 12 pentágonos unidos mediante dos tipos de enlace: enlaces dobles entre dos hexágonos (uniones 6:6) y enlaces simples entre un hexágono y un pentágono (uniones 6:5).<sup>333</sup> Dentro de esta agrupación, por su renombre destacan también el fullereno  $C_{20}$ , el más pequeño de todos, no tiene hexágonos, sólo 12 pentágonos formando un dodecaedro, y el  $C_{70}$ , con 12 pentágonos y 25 hexágonos el cual presenta una forma que se asemeja a un balón de rugby. Los nanotubos de carbono o buckytubos

<sup>331</sup> A. Geim, K. S. Novoselov, *Nature Materials*, **2007**, 6, 183-191.

<sup>332</sup> H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *Nature*, **1985**, 318, 162-163.

<sup>333</sup> P. R. Buseck, S. J. Tsiপুরsky, R. Hettich, *Science*, **1992**, 257, 215-217.

se descubrieron por primera vez en 1991 gracias a las investigaciones de profesor S. Iijima.<sup>334</sup> Todas estas fechas fueron el punto de partida para que en los próximos años se descubrieran nuevas moléculas de fullerenos, lo que ha permitido expandir una ya conocida amplia lista de este tipo de estructuras de carbono.

### 3.2 La química de los fullerenos en la actualidad

La química de los fullerenos covalentes es un campo en constante crecimiento en la química orgánica sintética. En la década de los 90, se han conseguido muchos logros importantes y gracias a ello muchos principios de la reactividad del fullereno están ahora bien establecidos. Se han sintetizado numerosos aductos externamente funcionalizados y definidos estereoquímicamente que contienen entre una y seis adiciones. De estos productos de adición múltiple, los hexa-aductos simétricos con un patrón de adición octaédrico (Th) son de especial interés. En particular, los hexa-aductos del fullereno C<sub>60</sub> los cuales representan una clase única de estructuras macromoleculares tridimensionalmente simétricas (Th) con dimensiones de nanoescala y composiciones químicas definidas estequiométricamente.<sup>335</sup> Estos compuestos permiten una disposición globular de los sustituyentes alrededor del núcleo C<sub>60</sub> y han atraído mucha atención en los últimos años, tanto en las áreas de la ciencia de los materiales como en la biomedicina.<sup>336</sup> Algunos de ellos han sido empleados para el estudio de procesos electrónicos y de transferencia de energía,<sup>337</sup> como centros de conectividad para la síntesis de MOFs,<sup>338</sup> o como catalizadores.<sup>339</sup> Por otro lado, en el área de las aplicaciones biológicas, su actividad ha sido probada en diferentes campos mostrando interesantes propiedades y buena biocompatibilidad. Se han empleado como vectores de transfección de genes,<sup>340</sup> inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas,<sup>341</sup> sistemas antibacterianos<sup>342</sup> o antivirales eficientes.<sup>343</sup>

En 1991, P. J. Fagan presentó la primera síntesis de un hexa-aducto simétrico-Th haciendo reacciones un núcleo C<sub>60</sub> con un exceso de (Et<sub>2</sub>P)<sub>4</sub>M donde M = Pt, Pd, Ni obteniendo complejos metálicos de fórmula general [(Et<sub>2</sub>P)<sub>4</sub>M]<sub>6</sub>C<sub>60</sub> simétricos y con altos rendimientos.<sup>344</sup> En 1993, C. Bingel desarrolla una reacción de ciclopropanación entre el fullereno C<sub>60</sub> y Bromomalonato de dietilo en presencia de NaH. Sin embargo, estas condiciones de reacción originales resultaron ser generalmente ineficaces en la hexa-adición.<sup>345</sup> Por este motivo, A. Hirsch en 1995 propuso una modificación para dar lugar a una reacción de adición one-pot de malonatos pre-activos con la ayuda de 9,10-dimetilantraceno (DMA), DBU y CBr<sub>4</sub> en *o*-

<sup>334</sup> S. Iijima, *Nature*, **1991**, 354, 56-58.

<sup>335</sup> T. Suzuki, Q. Li, K. C. Khemani, F. Wudl, Ö. Almarsson, *Science*, **1991**, 254, 1186-1188.

<sup>336</sup> A. Hirsch, O. Vostrowsky, *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 2001, 829-848.

<sup>337</sup> F. Spänig, C. Kovacs, F. Hauke, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, D. M. Guldi, A. Hirsch, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 8180-8195.

<sup>338</sup> A. Kraft, P. Roth, D. Schmidt, J. Stangl, K. Müller-Buschbaum, F. Beuerle, *Chem. Eur. J.*, **2016**, 22, 5982-5987.

<sup>339</sup> H. A. Beejapur, V. Campisciano, F. Giacalone, M. Gruttadauria, *Adv. Synth. Catal.*, **2015**, 357, 51-58.

<sup>340</sup> D. Sigwalt, M. Holler, J. Iehl, J.-F. Nierengarten, M. Nothisen, E. Morin, J.-S. Remy, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 4640-4642.

<sup>341</sup> M. Durka, K. Buffet, J. Iehl, M. Holler, J.-F. Nierengarten, S. P. Vincent, *Chem. Eur. J.*, **2012**, 18, 641-651.

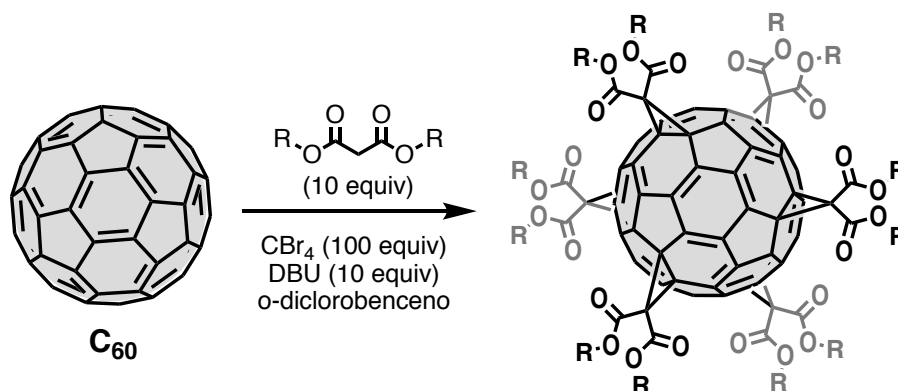
<sup>342</sup> S. Cecioni, V. Oerthel, J. Iehl, M. Holler, D. Goyard, J.-P. Praly, A. Imberty, J.-F. Nierengarten, S. Vidal, *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 3252-3261.

<sup>343</sup> A. Muñoz, D. Sigwalt, B. M. Illescas, J. Luczkowiak, L. Rodríguez-Pérez, I. Nierengarten, M. Holler, J.-S. Remy, K. Buffet, S. P. Vincent, J. Rojo, R. Delgado, J.-F. Nierengarten, N. Martín, *Nat Chem*, **2016**, 8, 50-57.

<sup>344</sup> P. J. Fagan, J. C. Calabrese, B. Malone, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 9408-9409.

<sup>345</sup> C. Bingel, *Chem. Ber.*, **1993**, 126, 1957-1959.

diclorobenceno (ODCB).<sup>346</sup> En conjunto, este método se conoce hoy en día como la Reacción de Bingel-Hirsch y ha sido generalmente eficaz para la obtención de hexa-aductos relativamente simples, como los de la adición de malonatos de dialquilo, con rendimientos de hasta el 50-60%. En el caso de los hexa-aductos estructuralmente más complicados, las condiciones de reacción de Bingel-Hirsch adolecen de rendimientos del producto generalmente bajos o incluso insignificantes en algunos casos. Años más tarde, Y.-P. Sun observa como una sencilla desviación de los parámetros clásicos de la reacción de Bingel-Hirsch mejoran sustancialmente los rendimientos. Esta modificación evita el uso de DMA y la reacción se lleva a cabo empleando un gran exceso de  $\text{CBr}_4$  ( $\text{C}_{60}:\text{CBr}_4$  1:100 equiv).<sup>347,348</sup> Esta alternativa mejoró sustancialmente los rendimientos y además permitió el acceso a otros hexa-aductos de  $\text{C}_{60}$  que no podían obtenerse mediante las condiciones clásicas de la reacción de Bingel-Hirsch (**Fig. 38**).



**Figura 38.** Condiciones de reacción de la estrategia Bingel-Hirsch-Sun para la funcionalización de núcleos de fullereno  $\text{C}_{60}$  y la obtención de hexa-aductos simétricos.

A pesar de todas las mejoras conseguidas a lo largo de los años, este procedimiento suele estar limitado por el tamaño de los reactivos de malonato ya que los aspectos estéricos limitan el rendimiento de la reacción. Para superar este inconveniente, en 2008, J.-F. Nierengarten propuso el empleo de un malonato con grupos azida en sus extremos para obtener un hexa-aducto de  $\text{C}_{60}$  que permitía su posterior funcionalización covalente haciendo uso de la química “click” mediante la reacción de cicloadición alquino-azida catalizada por  $\text{Cu(I)}$  o  $\text{CuAAC}$  (**Fig. 39**).<sup>349</sup> Un año después, el propio J.-F. Nierengarten<sup>350</sup> y el profesor N. Martín<sup>351</sup> describieron el hexa-aducto de  $\text{C}_{60}$  funcionalizado con 12 grupos alquino donde poder aplicar de nuevo la química “click” (**Fig. 39**). Sin embargo, estas reacciones requieren el uso de  $\text{Cu(I)}$ , lo que implica un paso posterior de purificación para la eliminación del cobre, especialmente con aquellos materiales para aplicaciones biomédicas, debido a su alta citotoxicidad, lo que limita sus aplicaciones biológicas.<sup>352</sup>

<sup>346</sup> I. Lamparth, C. Maichle-Mössner, A. Hirsch, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, *34*, 1607-1609.

<sup>347</sup> H. Li, A. Kitaygorodskiy, R. A. Carino, Y.-P. Sun, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 859-861.

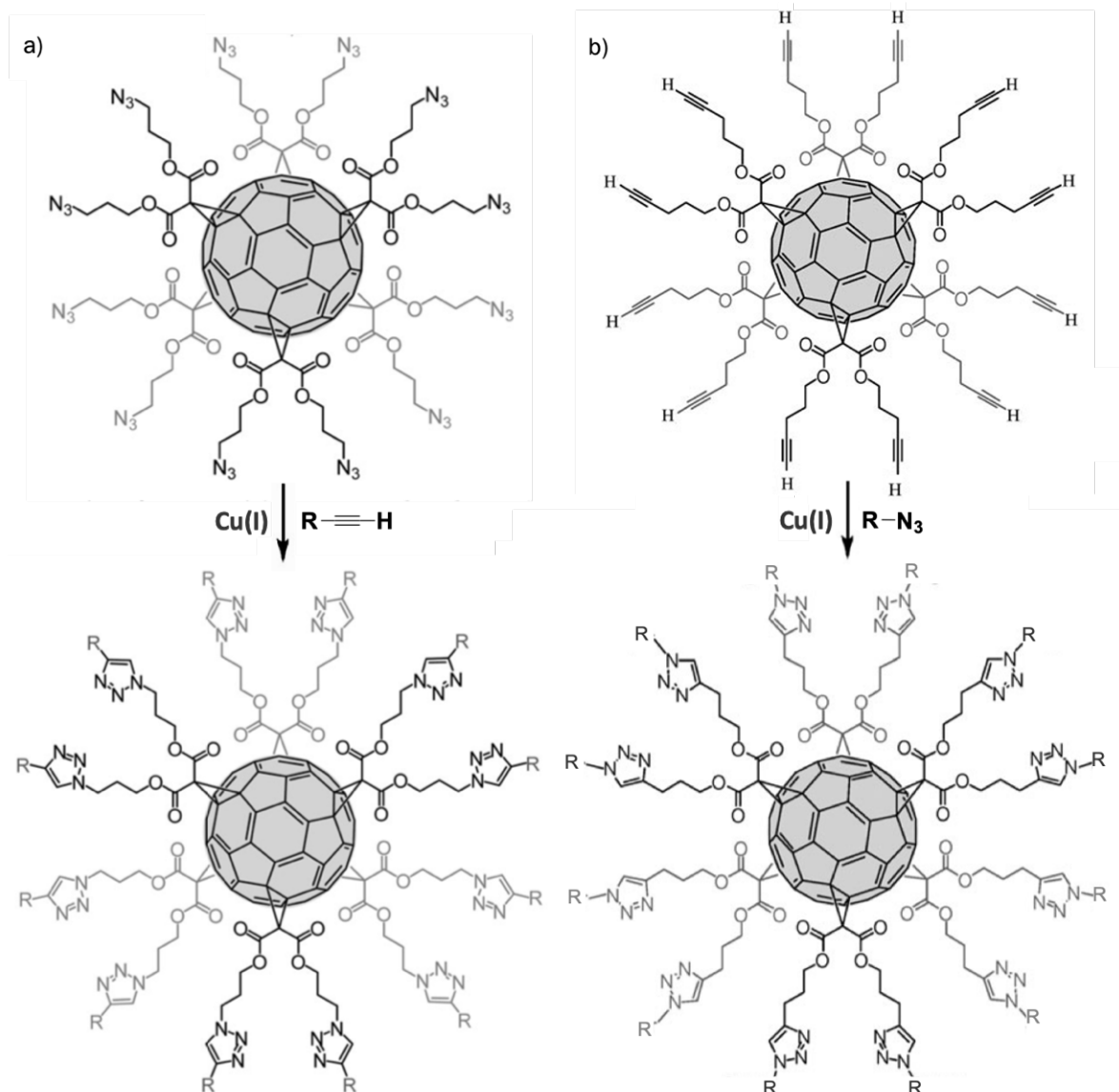
<sup>348</sup> H. Li, S. A. Haque, A. Kitaygorodskiy, M. J. Mezziani, M. Torres-Castillo, Y.-P. Sun, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 5641-5643.

<sup>349</sup> J. Iehl, R. Pereira de Freitas, B. Delavaux-Nicot, J.-F. Nierengarten, *Chem. Commun.*, **2008**, 2450-2452.

<sup>350</sup> J. Iehl, J.-F. Nierengarten, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 7306-7309.

<sup>351</sup> J.-F. Nierengarten, J. Iehl, V. Oerthel, M. Holler, B. M. Illescas, A. Munoz, N. Martín, J. Rojo, M. Sanchez-Navarro, S. Cecioni, S. Vidal, K. Buffet, M. Durka, S. P. Vincent, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 3860-3862.

<sup>352</sup> C. Ornelas, J. Broichhagen, M. Weck, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 3923-3931.

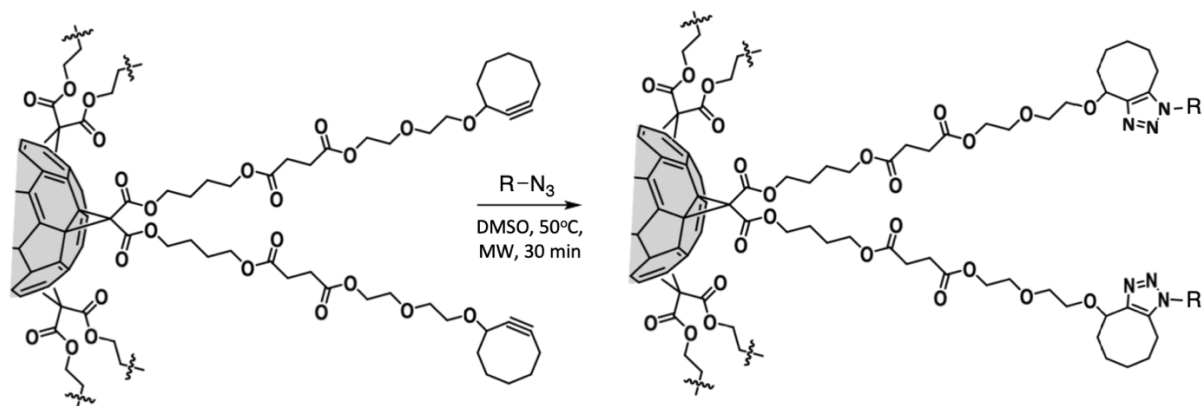


**Figura 39.** Núcleos de fullereno  $C_{60}$  funcionalizados a) con grupos azida<sup>349</sup> y b) con grupos alquino<sup>350,351</sup> que emplean la química “click” mediante la reacción de cicloadición alquino-azida catalizada por Cu(I) o CuAAC para reaccionar con ligandos R-alquino y R- $N_3$  respectivamente dando lugar a la fusión  $C_{60}$ -R unido mediante un enlace 1,2,3-triazol sustituido. Figura adaptada con los permisos de la Ref. **349** Copyright 2008 Royal Society of Chemistry y la Ref. **351** Copyright 2010 Royal Society of Chemistry.

En el año 2006, C. R. Bertozzi y sus colaboradores desarrollaron una nueva estrategia que evitaba el uso del catalizador de Cu(I) conocida como cicloadición alquino-azida promovida por la tensión o SPAAC (Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition).<sup>353</sup> Esta reacción tiene lugar entre un ciclooctino tensionado y un grupo azida y se caracteriza por su sencillez, rapidez y evita la catálisis metálica, de especial relevancia para aplicaciones biológicas o médicas. Estos nuevos conocimientos fueron adaptados a la química de los fullerenos por el grupo de N. Martín desarrollando hexa-aductos de  $C_{60}$  con 12 grupos ciclooctino donde llevar a cabo la reacción de SPAAC (Fig. 40), libre de Cu(I) y en condiciones suaves mediante el uso de irradiación con microondas y a 50°C para dar lugar a una funcionalización muy eficiente de los fullerenos en cortos tiempo de reacción. Esta nueva estrategia ha permitido obtener una amplia gama de

<sup>353</sup> N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.*, **2006**, *1*, 644-648.

funcionalizaciones dependiendo de los ligandos azida utilizados, por ejemplo: cadenas polares y no polares, productos naturales como la biotina, PNAs, o un aminoácido como la fenilalanina.<sup>354</sup> Desarrollos posteriores de las adiciones “click” ortogonales ha permitido la sustitución asimétrica de los fullerenos[60] para combinar ligandos multivalentes junto con sondas o agentes terapéuticos.<sup>252</sup>



**Figura 40.** Núcleo de fullereno  $C_{60}$  funcionalizados con grupos ciclooctinos tensionados que emplean la química “click” mediante la reacción de cicloadición alquino-azida promovida por la tensión o SPAAC para reaccionar con ligandos  $R-N_3$  y dar lugar a la fusión  $C_{60}$ -R unido mediante un enlace 1,2,3-triazol sustituido.<sup>252</sup> Figura adaptada con permisos de la Ref. 252 Copyright 2019 American Chemical Society

Por lo tanto, esta moderna química de fullerenos genera moldes de construcción sobre los que llevar a cabo reacciones “click” sencillas que permiten la fusión con numerosos ligandos y que evitan el uso de  $Cu(I)$ , de especial interés para diversas aplicaciones biológicas. Esta bioconjugación da lugar a una multi-presentación globular de estructuras como carbohidratos, u otros ligandos orgánicos de interés los cuales pueden presentar motivos de reconocimiento específicos en las células y que por lo tanto pueden ser dirigidos selectivamente hacia sus dianas biológicas.

<sup>354</sup> J. R. Soriano, J. J. Reina, A. P. Sánchez, B. M. Illescas, J. Rojo, N. Martín, *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 10544-10546

# Capítulo III. Híbrido 3D péptido/fullereno para el reconocimiento proteico multivalente

**El trabajo descrito en este capítulo se realizó en colaboración con la Universidad Complutense de Madrid con la participación de:**

Iván Gallego-Gómez,<sup>[a]</sup> Javier Ramos-Soriano,<sup>[b]</sup> Alejandro Méndez-Ardoy,<sup>[a]</sup> Irene Lostalé-Seijo,<sup>[a]</sup> Beatriz M. Illescas,<sup>[b]</sup> Jose J. Reina,<sup>[a]</sup> Nazario Martín,<sup>[b,c]</sup> Javier Montenegro.<sup>[a]</sup>

[a] Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS), Departamento de Química Orgánica, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela (España).

[b] Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.

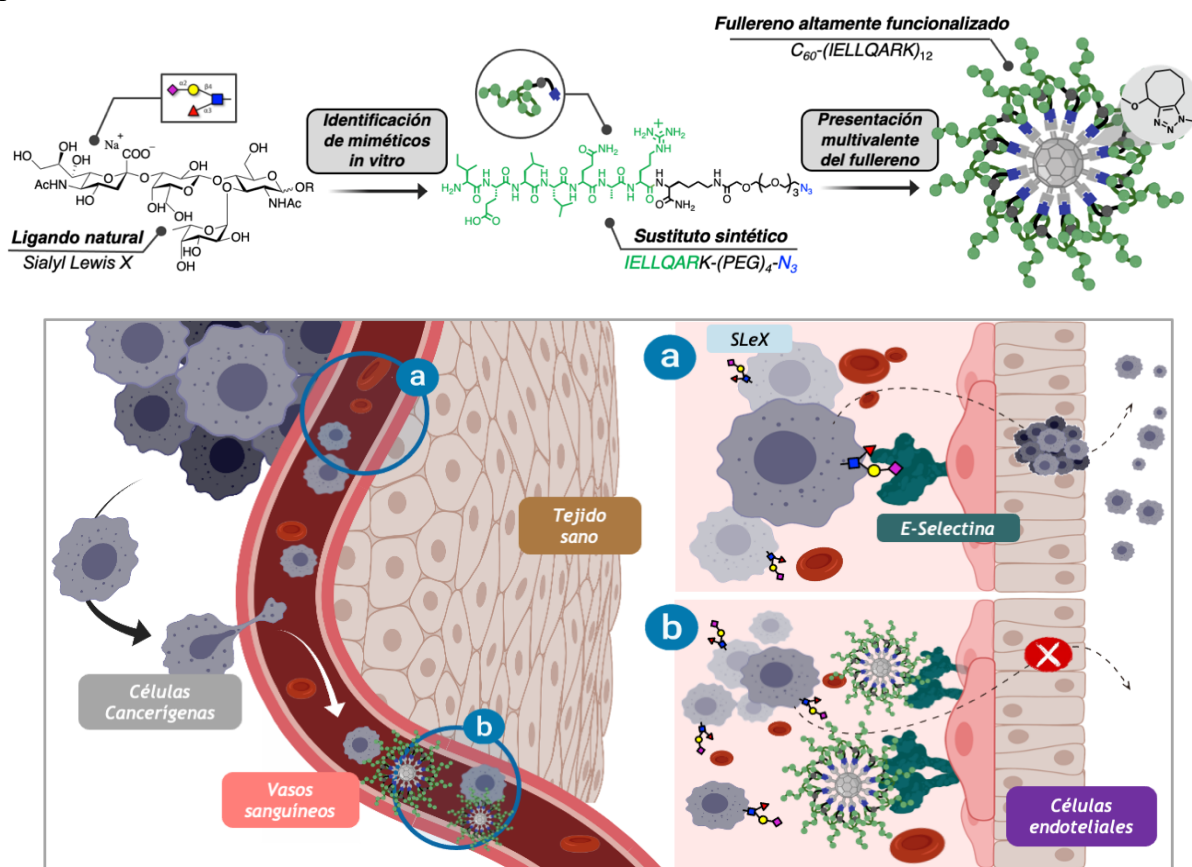
[c] IMDEA-Nanoscience, C/ Faraday 9, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, España

\*El trabajo se encuentra pendiente de publicar.



## 1. Objetivos

La elevada complejidad en la síntesis química de ligandos sacáridos dificulta su uso para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas. La búsqueda, cribado y optimización *in vitro* de potenciales ligandos selectivos miméticos de ligandos naturales biorelevantes constituye un nuevo escenario muy prometedor que acorta y simplifica, en gran medida, el proceso de obtención de nuevos agentes diagnósticos. Esta tecnología unida a los beneficios que aportan las plataformas monodispersas de tamaño nanométrico<sup>355,356</sup> para la presentación multivalente de estos ligandos mediante ingeniería artificial, ofrece una excelente alternativa para mejorar tanto las afinidades de unión como la distribución y estabilidad de los ligandos e inhibidores de proteínas.<sup>357,358</sup>



**Figura 41.** Diferentes pasos en la construcción de una plataforma molecular (parte superior): identificación *in vitro* de un sustituto peptídico sintético (IELLQAR) de un ligando natural (sLe<sup>x</sup>) y finalmente, el desarrollo de un híbrido péptido/[60]fullereno altamente funcionalizado para el reconocimiento proteico multivalente de la E-selectina. Representación esquemática del proceso de metástasis (parte inferior): a) Las células cancerígenas penetran y viajan a través de los vasos sanguíneos hasta los órganos o tejidos distantes. Durante esta etapa, la interacción de la E-selectina, sobreexpresada en las células endoteliales, y los carbohidratos sialilados como sLe<sup>x</sup>, expresados en células malignas, juega un papel fundamental en la fijación y propagación metastásica. b) La interacción entre la E-selectina y un nuevo sistema multivalente hexa-aducto péptido/[60]fullereno bloqueará la adhesión de las células tumorales generando efectos antimetastásicos. Figura creada con BioRender.com

<sup>355</sup> J. R.-Soriano, J. Rojo, *Chem. Commun.*, **2021**, 57, 5111–5126.

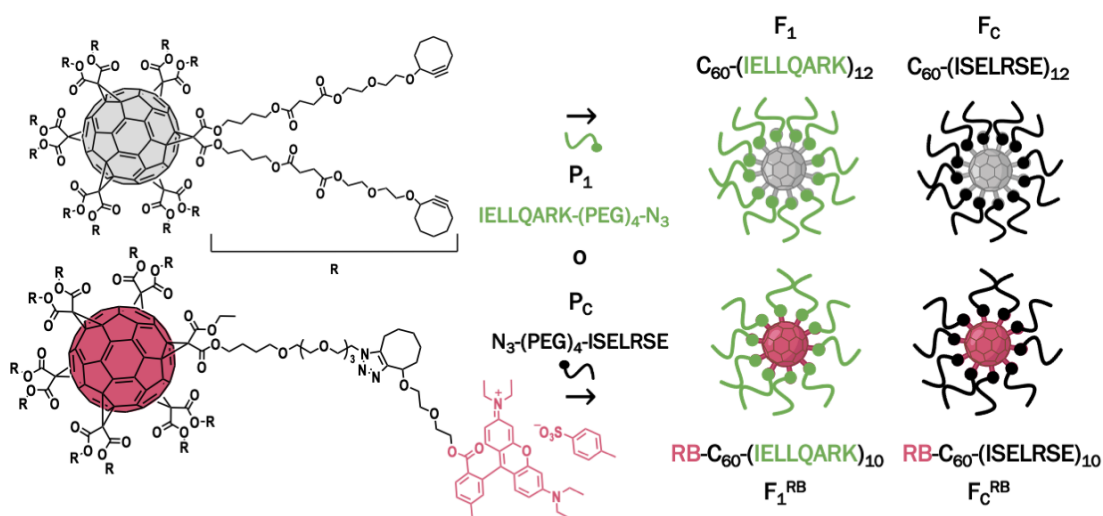
<sup>356</sup> J. L. J. Blanco, J. M. Benito, C. O. Mellet, J. M. G. Fernández, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2017**, 42, 18–37.

<sup>357</sup> Y. Xiang, S. Nambulli, Z. Xiao, H. Liu, Z. Sang, W. P. Duprex, D. S.-Duhovny, C. Zhang, Y. Shi, *Science*, **2020**, 370, 1479–1484.

<sup>358</sup> D. Budhadev, E. Poole, I. Nehlmeier, Y. Liu, J. Hooper, E. Kalverda, U. S. Akshath, N. Hondow, W. B. Turnbull, S. Pöhlmann, Y. Guo, D. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142, 18022–18034.

Este proyecto de investigación pretende desarrollar plataformas multivalentes híbridas con sustitutos peptídicos más sencillos y viables (IELLQAR) que mimetizan la función de los ligandos naturales (sLe<sup>X</sup> o sLe<sup>A</sup>) y que presentan la misma capacidad de interactuar con gran afinidad y selectividad con sus receptores proteicos correspondientes (Fig. 41). Entre las diferentes plataformas disponibles, el hexa-aducto del fullereno C<sub>60</sub> con geometría Th octaédrica ha mostrado un gran potencial como andamio nanocarbónico globular para la presentación tridimensional multivalente de diferentes ligandos. Su funcionalización puede lograrse eficazmente mediante la ciclopropanación directa de la adición Bingel-Hirsch-Sun de malonatos adecuadamente sustituidos.

Con estas premisas, en este tercer capítulo nos propusimos como objetivo describir la primera síntesis de un hexa-aducto 3D péptido/[60]fullereno altamente funcionalizado mediante la combinación de la síntesis de péptidos en fase sólida y la química de “click” tipo SPAAC (Fig. 42). Para ello se empleó un ligando peptídico específico, previamente identificado por “phage display” para dirigirse al dominio de unión de la E-selectina,<sup>326,327</sup> y demostrar como prueba de concepto experimental, la sinergia de la presentación multivalente de péptidos mediada por fullerenos y el reconocimiento de proteínas. El aducto de fullereno que presentamos en este capítulo III está dotado de 12 subunidades peptídicas que fueron reconocidas específicamente por el receptor proteico. También se sintetizaron los hexa-aductos de fullerenos[60] asimétricos A<sub>10</sub>B marcados fluorescentemente con una sonda de Rodamina B y se emplearon para estudiar el reconocimiento específico de los receptores de superficie de E-selectina en la membrana de células vivas (Fig. 42).



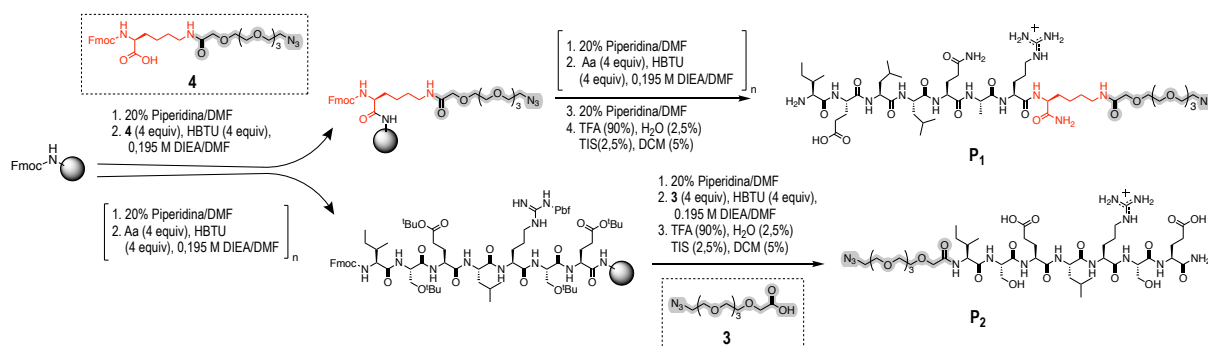
**Figura 42.** Análisis sintético de las plataformas péptido/[60]fullereno: Reacción de SPAAC entre los péptidos modificados con un grupo azida IELLQARK-(PEG)<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> (P<sub>1</sub>) y N<sub>3</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-ISELRSE (P<sub>c</sub>), y los grupos ciclooctino de los hexa-aductos de fullereno C<sub>60</sub>, para dar lugar a los híbridos simétricos C<sub>60</sub>-(IELLQARK)<sub>12</sub> (F<sub>1</sub>) y C<sub>60</sub>-(ISELRSE)<sub>12</sub> (F<sub>c</sub>) y los aductos asimétricos funcionalizados con Rodamina B, RB-C<sub>60</sub>-(IELLQARK)<sub>10</sub> (F<sub>1</sub><sup>RB</sup>) y RB-C<sub>60</sub>-(ISELRSE)<sub>10</sub> (F<sub>c</sub><sup>RB</sup>).

Hasta donde sabemos, éste es el primer ejemplo del uso de hexa-aductos de fullerenos C<sub>60</sub> para la presentación multivalente en las tres dimensiones del espacio de oligómeros peptídicos biológicamente relevantes, que pueden ser explotados para la orientación activa de proteínas en células vivas. Los resultados presentados aquí confirman el potencial de los fullerenos para la presentación multivalente de ligandos peptídicos robustos y fácilmente accesibles como alternativa viable a los sacáridos complejos. Este estudio establece una piedra angular para el acoplamiento directo de oligómeros funcionales biocompatibles con plantillas globulares de fullereno definidas con precisión.

## 2. Diseño, síntesis y estudio por SPR de los ligandos peptídicos

Para sintetizar los aductos IELLQAR péptido/[60]fullereno, el péptido IELLQAR debe conjugarse con la plataforma multivalente mediante un linker flexible. Para determinar la influencia de la ubicación de este enlazador en la afinidad de unión del péptido IELLQAR a la E-selectina, consideramos una conexión en la cabeza o en la cola del péptido por anclaje al: *i*) grupo amino libre del residuo de isoleucina situado en el extremo N-terminal del péptido, o *ii*) un grupo amino situado en un nuevo residuo de lisina adicional introducido en el extremo C-terminal del péptido. Este enlazador se basa en un corto motivo hidrofílico de tetraetilenglicol equipado con dos sitios de funcionalización ortogonales, un ácido carboxílico y un grupo azida terminal (**3**). Este compuesto permitió tanto la conjugación con el péptido mediante la formación de enlaces amida como la posterior unión a los grupos ciclooctino del fullereno[60] mediante la reacción “click” de SPAAC.

Para estudiar el punto de anclaje óptimo, se sintetizaron mediante fase sólida a través de la estrategia Fmoc, dos secuencias de péptidos diferentes (**Fig. 43**), denominados: IELLQARK-(PEG)<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> (**P**<sub>1</sub>) y N<sub>3</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-IELLQAR (**P**<sub>2</sub>). Para la síntesis del péptido funcionalizado en el extremo N-terminal **P**<sub>2</sub>, se conjugó con el linker de polietilenglicol (**3**) en el último paso de la síntesis en fase sólida (**Fig. 43** y **SE36**). Para preparar el péptido funcionalizado en su extremo C-terminal **P**<sub>1</sub>, fue necesario utilizar un nuevo aminoácido de lisina, previamente modificado con el correspondiente espaciador de oligoetilenglicol (**4**). Esta lisina modificada (**4**) se ancló a la resina como primer aminoácido durante la síntesis en fase sólida de **P**<sub>1</sub> (**Fig. 43** y **SE35**). Tras la purificación por HPLC, los péptidos finales modificados con el espaciador de oligoetilenglicol (**P**<sub>1</sub> y **P**<sub>2</sub>) mostraron una excelente pureza y solubilidad en agua.

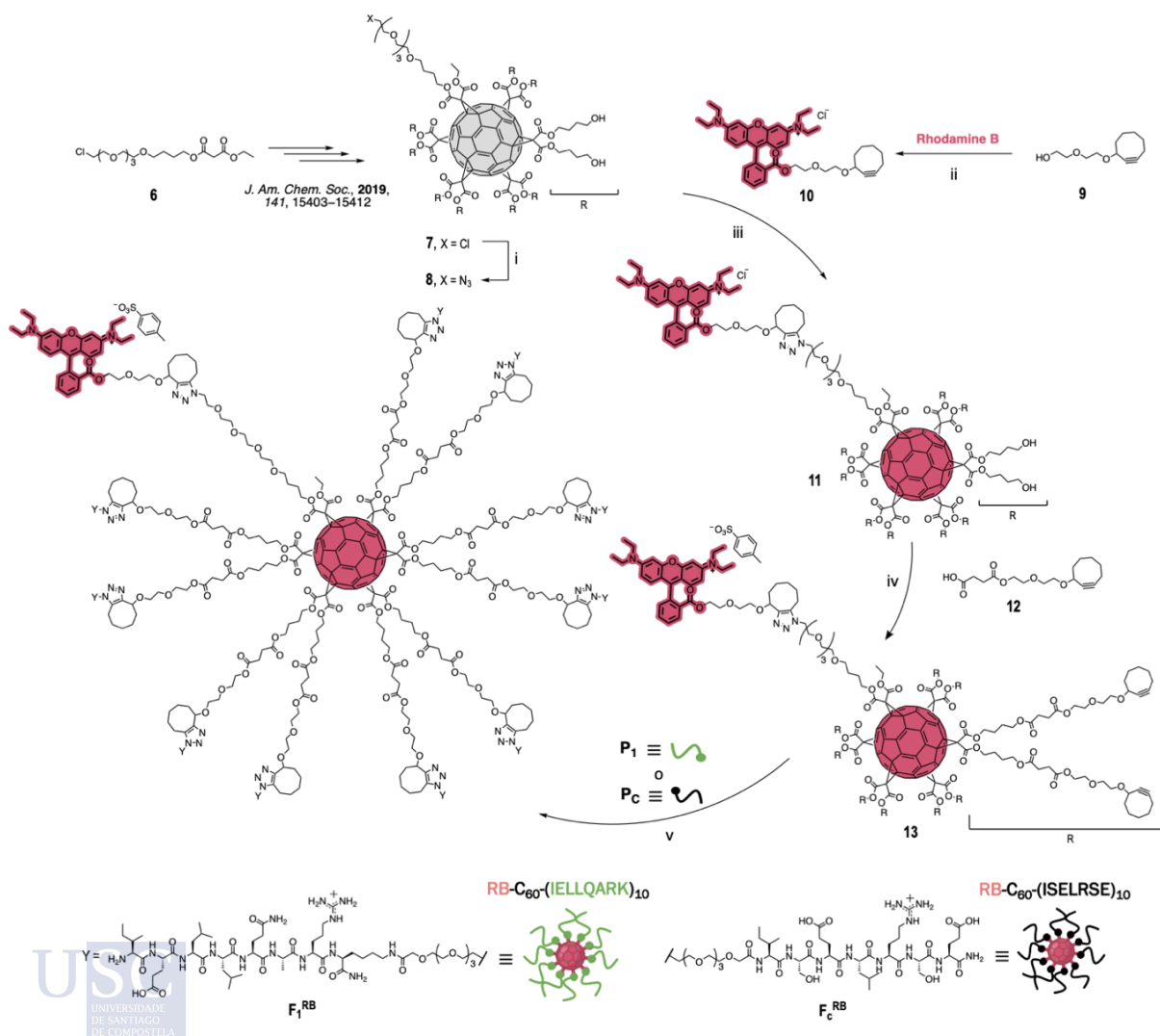


**Figura 43.** El péptido IELLQARK-(PEG)<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> (**P**<sub>1</sub>) se preparó añadiendo un nuevo aminoácido de lisina previamente modificado con el correspondiente enlazador de oligoetilenglicol (**4**) en el extremo C-terminal al principio de la síntesis. El péptido N<sub>3</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-IELLQAR (**P**<sub>2</sub>) se preparó incorporando el enlazador de polietilenglicol (**3**) en el extremo N-terminal al final de la síntesis en fase sólida (ver sección experimental pág. 164).

Para determinar cuál de los dos sitios de anclaje diferentes del péptido IELLQAR (enlazado por el extremo N- o C-terminal) ofrecería la geometría de presentación óptima, tratamos de estudiar inicialmente la interacción de estos péptidos monovalentes (**P**<sub>1</sub> y **P**<sub>2</sub>) con la proteína E-selectina mediante experimentos de SPR (Surface Plasmon Resonance) de unión directa (ver sección experimental pág. 191). Los datos de unión se recogieron a velocidades de flujo de 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  a concentraciones crecientes de los péptidos **P**<sub>1</sub> y **P**<sub>2</sub> y del ligando natural pentasacárido **sLe<sup>X</sup>** (**Fig. SE68**). Antes del análisis, se realizaron pruebas de unión con E-selectina a diferentes velocidades de flujo para descartar efectos de transporte de masa que pudieran influir en la forma de los sensogramas. Los sensogramas de SPR obtenidos se ajustaron a un modo de unión 1:1 de Langmuir, y se calcularon las constantes cinéticas y de unión ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) mediante



Con el fin de obtener los correspondientes híbridos péptido/[60]fullereno marcados fluorescentemente para posteriores estudios celulares, manteniendo la estrategia que evita el uso de cobre y siguiendo el procedimiento representado en la **Fig. 45**, se preparó un derivado asimétrico A<sub>10</sub>B [60]fullereno con 10 ciclooctinos y que contiene rodamina B como fluoróforo. A partir del hexa-aducto asimétrico **7**<sup>252</sup> se llevó a cabo la sustitución del átomo de cloro por un grupo azida, seguida de la reacción SPAAC con el derivado de rodamina B **10** bajo irradiación de MW, lo que permitió obtener el compuesto asimétrico **11** con un excelente rendimiento. El compuesto **10** se obtuvo eficazmente por esterificación de la rodamina B y el alcohol **9**<sup>354</sup>. La esterificación del derivado **11** con el ácido carboxílico **12**<sup>354</sup> dio lugar al compuesto **13**, que se empleó como bloque de construcción para reaccionar con los péptidos **P<sub>1</sub>** y **P<sub>C</sub>**, dando lugar a los híbridos péptido/[60]fullereno marcados fluorescentemente **F<sub>1</sub><sup>RB</sup>** y **F<sub>C</sub><sup>RB</sup>**, respectivamente, con un rendimiento cuantitativo. La purificación de los derivados obtenidos **F<sub>1</sub><sup>RB</sup>** y **F<sub>C</sub><sup>RB</sup>** se llevó a cabo siguiendo la metodología anterior descrita para los híbridos péptido/[60]fullereno **F<sub>1</sub>** y **F<sub>C</sub>**.



**Figura 45.** Síntesis de los híbridos péptido/[60]fullereno marcados fluorescentemente **F<sub>1</sub><sup>RB</sup>** y **F<sub>C</sub><sup>RB</sup>**. Reactivos y condiciones: i) NaN<sub>3</sub>, DMF, 60 °C, 3 días (cuant.); ii) EDAC, DMAP, DCM/DMF, t.a., toda la noche (cuant.); iii) **8** (1 equiv), **10** (2 equiv), DMSO, MW, 50 °C, 30 min (99%); iv) **11** (1 equiv), **12** (15 equiv), DCC, DPTS, DCM/DMF, t.a., toda la noche (99%); v) **13** (1 equiv), **P<sub>1</sub>** o **P<sub>C</sub>** (10 equiv), DMSO, MW, 50 °C, 30 min (para **F<sub>1</sub><sup>RB</sup>** de **P<sub>1</sub>**, 99%, y para la **F<sub>C</sub><sup>RB</sup>** de **P<sub>C</sub>**, cuant.)

La caracterización de los cuatro compuestos finales se realizó mediante RMN y XPS. Debido a la falta de regioselectividad en la cicloadición térmica a ciclooctinos asimétricos, se obtiene una mezcla de ambos regioisómeros en todos los casos, dando lugar a la duplicación de algunas señales en los espectros de RMN. En particular, la caracterización por  $^{13}\text{C}$ -RMN de los derivados de fullereno es útil para demostrar la completa funcionalización de los residuos de ciclooctino, así como la simetría octaédrica de la estructura. La ausencia de las señales típicas correspondientes al Csp del ciclooctino (a 100,1 ppm y 92,8 ppm) (por ejemplo, comparar la **Fig. SE59** con **SE63** y **SE66**) junto con la falta de la señal del  $\text{CH}_2$  unido al grupo azida a ~50 ppm indicaron que la cicloadición y los pasos de purificación posteriores se han realizado adecuadamente. Asimismo, se observan cuatro señales diferentes para los dos carbonos cuaternarios del anillo de triazol fusionado a los restos de ciclooctino correspondientes a los dos regioisómeros formados a  $\delta \sim 134$  y 144 ppm para el isómero mayoritario y  $\delta \sim 134$  y 143 ppm para el isómero minoritario. Además, sólo aparecen dos señales para los carbonos  $\text{sp}^2$  de la cápsula de  $\text{C}_{60}$  a  $\delta$  141 y 145, junto con una señal para el carbono  $\text{sp}^3$  (a ~69 ppm) del núcleo de  $\text{C}_{60}$ , lo que proporciona evidencia de la alta simetría  $T_h$  de los compuestos (**Fig. SE45, SE48, SE63** y **SE66**). Mientras que los espectros de MS de todos los hexa-adtos intermedios mostraron los picos de iones moleculares esperados, los de los compuestos finales **F<sub>1</sub>**, **F<sub>C</sub>**, **F<sub>1</sub><sup>RB</sup>** y **F<sub>C</sub><sup>RB</sup>** fueron difíciles de obtener, y el pico del ion molecular no pudo ser observado debido a la elevada masa molecular de los compuestos y al alto nivel de fragmentación.

**Tabla 2.** Abundancias relativas de C, N y O determinadas por XPS para los híbridos péptido/[60]fullereno **F<sub>1</sub>**, **F<sub>C</sub>**, **F<sub>1</sub><sup>RB</sup>** y **F<sub>C</sub><sup>RB</sup>**.

|                                   | Porcentaje atómico (%) <sup>a</sup> |             |             | Fórmula molecular   |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|---|
|                                   | C                                   | N           | O           |   |
| <b>F<sub>1</sub></b>              | 65,8 (66,0)                         | 13,7 (14,1) | 20,5 (19,9) | $\text{C}_{954}\text{H}_{1536}\text{N}_{204}\text{O}_{288}$         |
| <b>F<sub>C</sub></b>              | 64,3 (63,8)                         | 12,1 (12,7) | 23,5 (23,5) | $\text{C}_{846}\text{H}_{1308}\text{N}_{168}\text{O}_{312}$         |
| <b>F<sub>1</sub><sup>RB</sup></b> | 67,2 (66,8)                         | 13,1 (13,5) | 19,8 (19,7) | $\text{C}_{869}\text{H}_{1365}\text{N}_{175}\text{O}_{256}\text{S}$ |
| <b>F<sub>C</sub><sup>RB</sup></b> | 64,2 (64,9)                         | 11,8 (12,1) | 23,9 (23,0) | $\text{C}_{779}\text{H}_{1175}\text{N}_{145}\text{O}_{276}\text{S}$ |

<sup>a</sup>Valores teóricos aportados entre paréntesis.

Además, se utilizó adicionalmente el análisis XPS para confirmar la composición elemental de los conjugados péptido/[60]fullereno finales. Los espectros completos registrados nos dan información sobre los átomos presentes en su estructura molecular. Como era de esperar, las contribuciones procedentes de los niveles centrales de C 1s (284,6 eV), N 1s (398,6 eV) y O 1s (531,6 eV), fueron los únicos elementos presentes en el análisis. Sus abundancias relativas se recogen en la **Tabla 2** y están de acuerdo con los valores teóricos calculados para cada compuesto. El doblete S 2p ( $\text{S } 2\text{p}^{1/2}$  y  $\text{S } 2\text{p}^{3/2}$ ) para los fullerenos peptídicos marcados **F<sub>1</sub><sup>RB</sup>** y **F<sub>C</sub><sup>RB</sup>** no aparece en los espectros del estudio debido a la baja resolución de XPS para este átomo y a su escasa presencia atómica en la molécula. Además, se ha analizado el estado químico de C 1s y N 1s en un espectro de alta resolución. La deconvolución del C 1s en sus tres componentes principales simétricos (curvas Gaussianas-Lorentzianas) correspondientes a  $\text{C}=\text{C}/\text{C}-\text{C}$  a 283,9 eV,  $\text{C}-\text{O}/\text{C}-\text{N}$  a 285,2 eV y  $\text{N}-\text{C}=\text{O}/\text{C}=\text{O}/\text{O}-\text{C}=\text{O}/\text{C}=\text{N}$  a 287,0 eV, presentando un comportamiento similar en todos los compuestos (**Fig. SE46b, SE49b, SE64b**, y **SE67b**). Analizando la descomposición del pico N 1s, observamos tres componentes principales, como se representa en las **Fig. SE46c, SE49c, SE64c**, y **SE67c**. Un pico principal en torno a 399,0 eV, asignado a los grupos amida ( $\text{N}-\text{C}=\text{O}$ ) característicos de la cadena peptídica. A energías de unión más bajas (398,3 eV) se encontró el pico C-N asignado, entre

otros, a los dos átomos de N unidos al C del anillo de triazol. Finalmente, el tercer y menor componente (7%) con energía de enlace cercana a los 400 eV pertenece al tercer nitrógeno del anillo de triazol N-N-N. Nótese que, en todas las muestras analizadas, no se observa ningún pico de grupo azida (405,0 eV), lo que confirma la ausencia de molécula orgánica no enlazada y la formación cuantitativa del anillo triazol.

#### 4. Ensayo de afinidad mediante SPR

Se realizaron ensayos de unión directa por SPR para comparar la unión de los diferentes conjugados péptido/[60]fullereno a la E-selectina. En este caso, se funcionalizó un sensor-chip de alta capacidad con E-selectina siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, y los datos de unión se recogieron a una velocidad de flujo de 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  a concentraciones crecientes de fullereno (ver sección experimental pág. 191). Como se esperaba, los perfiles de unión más complejos de los sensogramas sugieren una naturaleza multivalente para la unión de los híbridos péptido/[60]fullereno a la proteína (**Fig. 46**). Tal y como se ha descrito previamente en la literatura,<sup>359,360</sup> se llevó a cabo un análisis cinético por separado de la unión del huésped multivalente a concentraciones diluidas para los eventos de unión de asociación inicial y disociación tardía. Los sensogramas de los conjugados péptido/[60]fullereno (**F<sub>1</sub>** y **F<sub>1</sub><sup>RB</sup>**) mostraron un proceso de disociación en dos fases ( $t > 240$  s), que consistía en una primera fase de disociación rápida seguida de una fase de disociación extremadamente lenta. También se encontró un alto grado de heterogeneidad en los primeros tiempos de disociación ( $t = 240\text{-}360\text{s}$ , **Fig. 46**), pero los tiempos de disociación tardíos ( $t > 600\text{s}$ ) mostraron un buen ajuste a un modelo de unión 1:1 de Langmuir. La evaluación cinética de la región de unión temprana ( $t < 50$  s) mostró una dependencia lineal durante la fase de asociación, que también pudo ajustarse a un modelo de unión de Langmuir 1:1. El perfil cinético de los sensogramas a tiempos cortos mostraba una asociación rápida a bajas concentraciones ( $< 12,5 \mu\text{M}$ ) que se reducía a mayores concentraciones de ligando, lo que era coherente con una unión multivalente del sistema híbrido péptido/[60]fullereno. Las fases de asociación y disociación se ajustaron mediante las siguientes ecuaciones:

$$R = R_e \cdot (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad [3]$$

$$R = R_o \cdot e^{-k_d(t-t_0)} \quad [4]$$

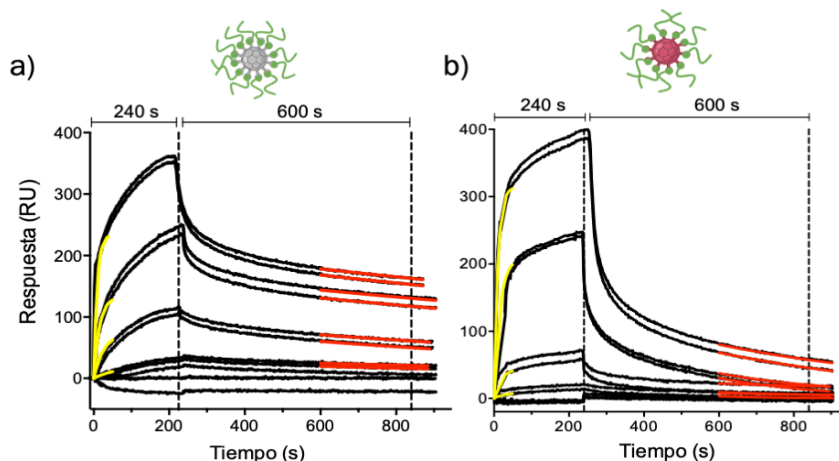
En la fase de asociación ( $t < 50$  s), la constante cinética de asociación de pseudo-primer orden del analito a la superficie se calculó utilizando la **ec. 3**, donde  $R_e$  es la respuesta en el equilibrio y  $k_{obs}$  es la constante cinética aparente ( $k_{obs} = k_a \cdot C + k_d$ , siendo  $C$  la concentración del analito). En la fase de disociación ( $t > 600\text{s}$ ), se empleó la **ec. 4**, donde  $R_o$  y  $t_0$  se tomaron como la respuesta y el tiempo global al inicio de la fase de disociación. El análisis de las curvas de SPR mostró que el conjugado **F<sub>1</sub>**, con doce unidades peptídicas en la superficie del fullereno, se une a la E-selectina con una constante de disociación en el rango nanomolar ( $K_D = 6,04 \cdot 10^{-8}$  M), lo que indica un efecto multivalente que da lugar a una mejora ( $\beta$ ) de 71 (ver sección experimental pág. 193).<sup>361</sup> La afinidad de este conjugado péptido/[60]fullereno **F<sub>1</sub>**

<sup>359</sup> E. M. Muñoz, J. Correa, R. Riguera, E. Fernandez-Megia, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 5966–5969.

<sup>360</sup> M. Salvadó, J. J. Reina, J. Rojo, S. Castellón, O. Boutoureira, *Chem. -A Eur. J.*, **2017**, *23*, 15790–15794.

<sup>361</sup> V. M. Krishnamurthy, L. A. Estroff, G. M. Whitesides, *Fragment-based Approaches in Drug Discovery*, **2006**, *34*, 11–53.

aumenta hasta 3 órdenes de magnitud en relación con su homólogo monomérico, lo que valida la capacidad funcional del hexa-aducto C<sub>60</sub>-fullereno para presentar múltiples copias de un ligando peptídico y establecer interacciones multivalentes con el correspondiente receptor proteico adecuado, como la E-selectina (**Fig. 46a**). A pesar de que también se observaron interacciones multivalentes para el fullereno asimétrico fluorescente F<sub>1</sub><sup>RB</sup>, se obtuvo una disminución de la constante de unión ( $K_D = 2,54 \cdot 10^{-7}$  M, **Fig. 46b**), en este conjugado dos copias del péptido se han sustituido por una sonda fluorescente de rodamina B (**Fig. 46**). Como se esperaba, los experimentos de control con los fullerenos modificados con péptidos hidrofílicos no específicos F<sub>C</sub> y F<sub>C</sub><sup>RB</sup> no mostraron ninguna unión aparente al receptor de E-selectina (**Fig. SE70**).



**Figura 46.** Gráficas de interacción de SPR de los híbridos péptido/[60]fullereno a) F<sub>1</sub> y b) F<sub>1</sub><sup>RB</sup> (12,5-0,78 μM) a la superficie funcionalizada con E-selectina (gráficos representativos para la funcionalización de baja densidad (LD), ver sección experimental pág. 191-193). Se muestran los tiempos de asociación inferiores a 50 s (líneas amarillas) y los tiempos de disociación superiores a 600 s (líneas rojas) utilizados para la determinación de las constantes (Tabla 3, y sección experimental pág. 191-193).

**Tabla 3.** Constantes cinéticas determinadas por SPR

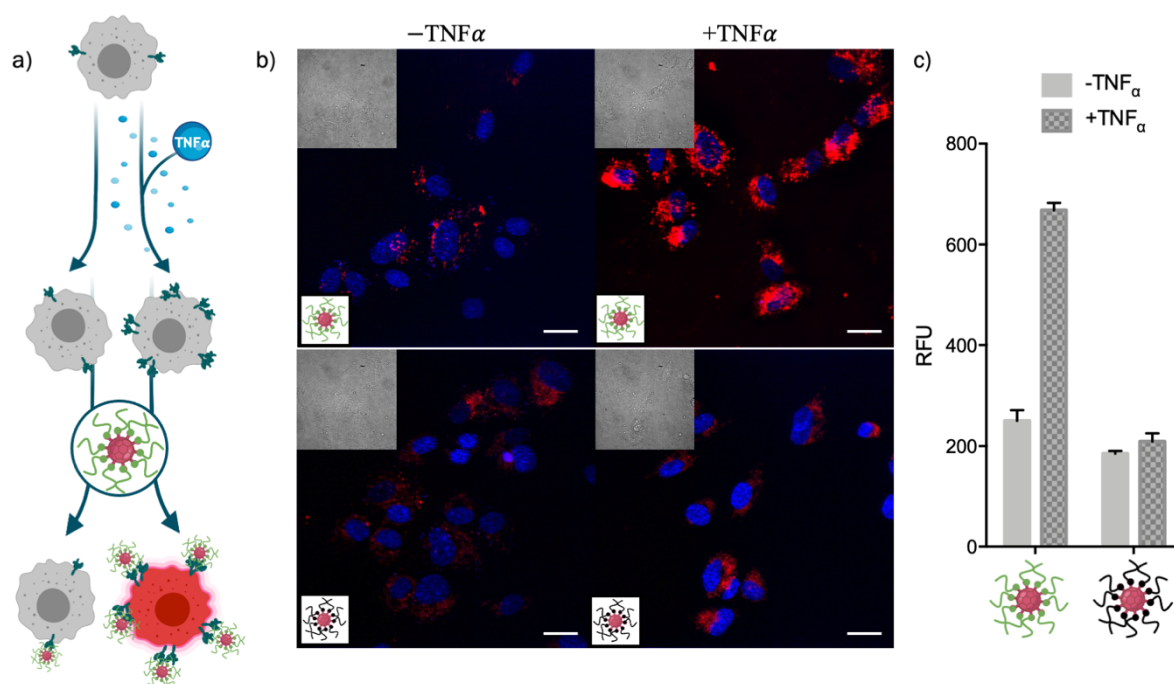
|                              | $k_a$ (1/Ms) <sup>a</sup>             | $k_d$ (1/s) <sup>a</sup>                    | $K_D = k_d/k_a$ (M) <sup>a</sup>            |
|------------------------------|---------------------------------------|---|---|
| sLe <sup>x</sup>             | $5,34 \cdot 10^6$                     | $9,33 \cdot 10^2$                           | $1,75 \cdot 10^{-4}$                        |
| P <sub>1</sub>               | $44,8 \pm 2,14$                       | $2,31 \cdot 10^{-3} \pm 4,91 \cdot 10^{-4}$ | $5,16 \cdot 10^{-5} \pm 1,22 \cdot 10^{-6}$ |
| P <sub>2</sub>               | $26,4 \pm 2,45$                       | $7,79 \cdot 10^{-2} \pm 3,81 \cdot 10^{-3}$ | $2,95 \cdot 10^{-3} \pm 1,97 \cdot 10^{-4}$ |
| F <sub>1</sub>               | $1,01 \cdot 10^4 \pm 1,87 \cdot 10^3$ | $5,85 \cdot 10^{-4} \pm 1,84 \cdot 10^{-4}$ | $6,04 \cdot 10^{-8} \pm 2,65 \cdot 10^{-8}$ |
| F <sub>1</sub> <sup>RB</sup> | $1,37 \cdot 10^4 \pm 6,28 \cdot 10^3$ | $3,34 \cdot 10^{-3} \pm 1,89 \cdot 10^{-3}$ | $2,54 \cdot 10^{-7} \pm 1,06 \cdot 10^{-7}$ |

<sup>a</sup>Las constantes cinéticas obtenidas corresponden a la media de las constantes cinéticas de cada una de las concentraciones para sLe<sup>x</sup>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, F<sub>1</sub> y F<sub>1</sub><sup>RB</sup>.

## 5. Estudio de interacción en células

Tras la síntesis y los estudios de afinidad de SPR al receptor de la E-selectina, se realizaron estudios celulares *in vitro* para confirmar el potencial de los nuevos conjugados péptido/[60]fullereno F<sub>1</sub><sup>RB</sup> y F<sub>C</sub><sup>RB</sup> para reconocer receptores de superficie en células vivas. Se seleccionó la línea celular HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) como modelo de

células endoteliales humanas que expresan la E-selectina.<sup>362</sup> Esta línea celular puede ser activada por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) que induce la sobreexpresión de moléculas de adhesión de membrana como el receptor de E-selectina (**Fig. 47a**). Tal y como se confirmó mediante SPR, la unión específica a la E-selectina del aducto fluorescente F<sub>1</sub><sup>RB</sup> está en un rango de concentración adecuado (0,78-12,5  $\mu$ M) para posibles ensayos de unión celular *in vitro*. De esta forma, se probó el potencial de adhesión celular selectiva del aducto fluorescente F<sub>1</sub><sup>RB</sup> frente al fullereno control F<sub>C</sub><sup>RB</sup> en células HUVEC activadas y no activadas (**Fig. 47b y c**). Dos conjuntos de células HUVEC se cultivaron en paralelo, en presencia o en ausencia de TNF $\alpha$ , para inducir selectivamente la sobreexpresión de E-selectina en uno de los grupos. A continuación, ambos grupos de HUVEC se incubaron con los conjugados de péptido/[60]fullereno marcados fluorescentemente F<sub>1</sub><sup>RB</sup> y el control F<sub>C</sub><sup>RB</sup> durante 30 minutos (ver sección experimental pág. 194). Las células se lavaron con heparina y tampón HKR para eliminar cualquier posible exceso de aductos de fullereno y se observaron mediante microscopía confocal (**Fig. 47b**). Las micrografías resultantes confirmaron una excelente selectividad de la interacción del conjugado F<sub>1</sub><sup>RB</sup> hacia las células HUVEC tratadas con TNF $\alpha$  (**Fig. 47b**). Se observó una fluorescencia residual en las células HUVEC no tratadas que no expresaban el receptor de E-selectina. Los correspondientes experimentos de control con el híbrido control F<sub>C</sub><sup>RB</sup> mostraron fluorescencia residual tanto en las células HUVEC no tratadas como en las tratadas con TNF $\alpha$ , lo que confirmó la selectividad del proceso de unión celular. La cuantificación por citometría de flujo validó estadísticamente la selectividad de la adhesión de los híbridos péptido/[60]fullereno (**Fig. 47c**).



**Figura 47.** Ensayo celular. a) Esquema representativo de la sobreexpresión de E-selectina en presencia de TNF $\alpha$  y posterior unión del correspondiente híbrido péptido/[60]fullereno. b) Imágenes de microscopía confocal de células HUVEC (columna izquierda) o de células HUVEC tratadas con TNF $\alpha$  (columna derecha) incubadas con 10  $\mu$ M de F<sub>1</sub><sup>RB</sup> (fila superior) o F<sub>C</sub><sup>RB</sup> (fila inferior). Barra de escala: 25  $\mu$ m. c) Ensayo de citometría de flujo de células HUVEC incubadas con 10  $\mu$ M de F<sub>1</sub><sup>RB</sup> o F<sub>C</sub><sup>RB</sup>, pre-tratadas (barras grises a cuadros) o no (barras grises lisas) con 10 ng/mL de TNF $\alpha$ .

<sup>362</sup> M. H. Thornhill, J. Li, D. O. Haskard, *Scand. J. Immunol.*, **1993**, 38, 279–286.

## 6. Conclusiones

En este capítulo, se ha sintetizado y demostrado experimentalmente el potencial de un hexa-aducto péptido/[60]fullereno para la presentación multivalente en 3D de oligómeros peptídicos para el reconocimiento de proteínas. Esta prueba de concepto está asegurada por una detallada colección de caracterización espectroscópica de los conjugados y los correspondientes experimentos de unión a la E-selectina en superficies modelo y células vivas.

En este tercer capítulo:

- Se sintetizaron con éxito los péptidos derivados de la secuencia IELLQAR modificados con grupos azida: IELLQAR-(PEG)<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> (**P**<sub>1</sub>) y N<sub>3</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-IELLQAR (**P**<sub>2</sub>). El péptido **P**<sub>1</sub> mostró la mejor afinidad de unión al receptor de la E-selectina ( $K_D = 5,16 \cdot 10^{-5}$  M).
- Fuimos capaces de combinar la síntesis de péptidos en fase sólida y una estrategia de química “click” tipo SPAAC sin cobre para la preparación eficiente de conjugados péptido/[60]fullereno altamente sustituidos. Se sintetizaron los aductos péptido/[60]fullereno simétricos **F**<sub>1</sub> (con 12 copias de **P**<sub>1</sub>) y asimétrico **F**<sub>1</sub><sup>RB</sup> (con 10 copias de **P**<sub>1</sub> y marcado con Rodamina B).
- La estructura globular de los aductos de [60]fullereno resultante permitió el máximo espaciado entre las copias de IELLQARK en una nanoplataforma multivalente para el reconocimiento de proteínas.
- También se sintetizó un péptido de control negativo, **P**<sub>C</sub>, con una secuencia hidrofílica aleatoria N<sub>3</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-ISELRSE, y se acopló al fullereno en las mismas condiciones, para preparar un aducto péptido/[60]fullereno simétrico **F**<sub>C</sub> y un híbrido asimétrico **F**<sub>C</sub><sup>RB</sup>.
- Los experimentos de SPR confirmaron la unión multivalente específica de **F**<sub>1</sub> y **F**<sub>1</sub><sup>RB</sup> a la E-selectina, que también fue validada en modelos de células vivas. Esta estrategia valida el potencial de los conjugados de [60]fullereno para la presentación multivalente de ligandos peptídicos con información específica para el reconocimiento de proteínas. Estos sustitutos péptido/[60]fullereno de oligosacáridos complejos aquí descritos constituyen una estrategia única y muy ventajosa en términos de simplicidad sintética, estabilidad y versatilidad hacia andamios biocompatibles multivalentes.

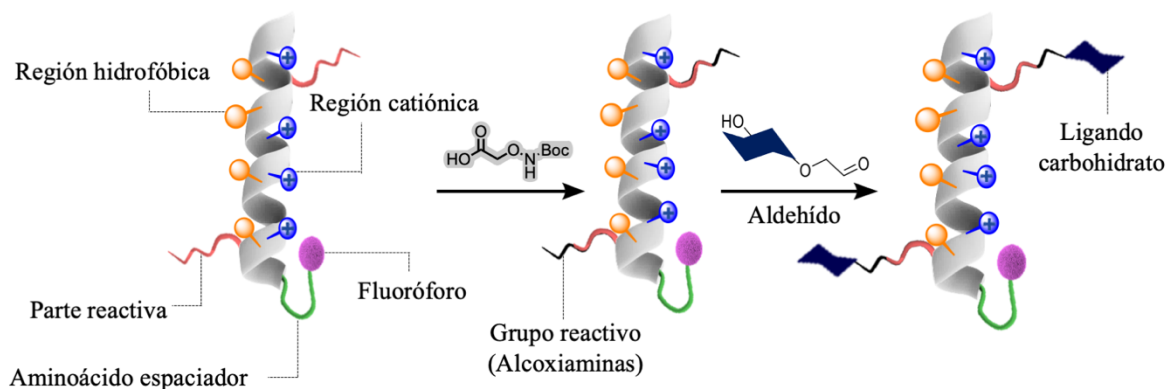
Esperamos que este trabajo allane el camino para la síntesis de una nueva gama de materiales híbridos prometedores con un futuro brillante en la orientación de proteínas y las aplicaciones biomédicas.

# Conclusiones generales



A lo largo de las líneas de esta Tesis doctoral se ha demostrado la importancia que cobran las interacciones proteína-carbohidrato en números procesos biológicos hasta tal punto que el desarrollo de arquitecturas que nos permitan dominar y controlar estas conexiones, aportará importantes avances en el campo del reconocimiento molecular, la química biológica o la medicina.

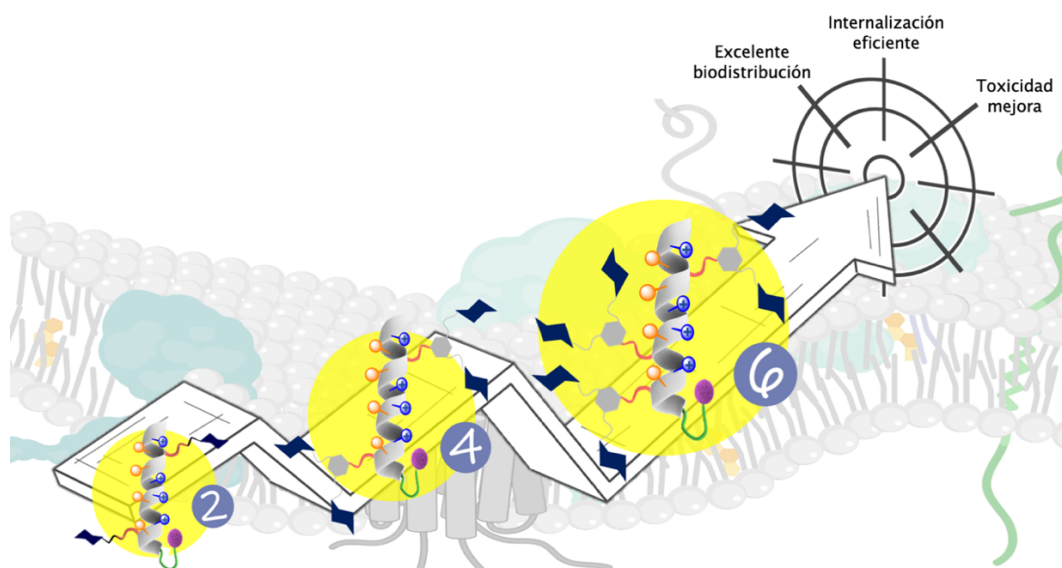
En el primer capítulo conectamos con éxito diferentes glicanos de interés a una misma estructura con propiedades penetrantes mediante enlaces oxima dinámicos. De esta forma se obtuvieron los siguientes híbridos de CPPs: TmP(Man)<sub>2</sub>, TmP(Gal)<sub>2</sub>, TmP(NAG)<sub>2</sub>, TmP(Glu)<sub>2</sub>, TmP(Man<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Estos carbohidratos mostraron un fuerte impacto en la internalización de estructuras peptídicas similares en una línea celular particular, observando, además, una tendencia de internalización que no cambia con las líneas celulares analizadas. Si embargo, la capacidad de penetración de la estructura peptídica supera la internalización mediada por interacciones carbohidrato-receptor. Por otro lado, es evidente como los residuos de los glicanos modulan la eficiencia de captación y la citotoxicidad de una secuencia peptídica concreta en una línea celular determinada. Estos resultados demuestran que la glicosilación de un péptido concreto puede utilizarse para mejorar el equilibrio entre la eficiencia de internalización y la toxicidad de los GCPP.



**Figura 48. Capítulo I.** Estructura común de los glicopéptidos sintetizados donde se muestran los diferentes dominios que contiene a lo largo de una estructura helicoidal. Además de una región catiónica, una parte hidrofóbica y una sonda fluorescente, cada andamio peptídico está equipado con dos alcoxiaminas reactivas para anclar diferentes ligandos carbohidrato.

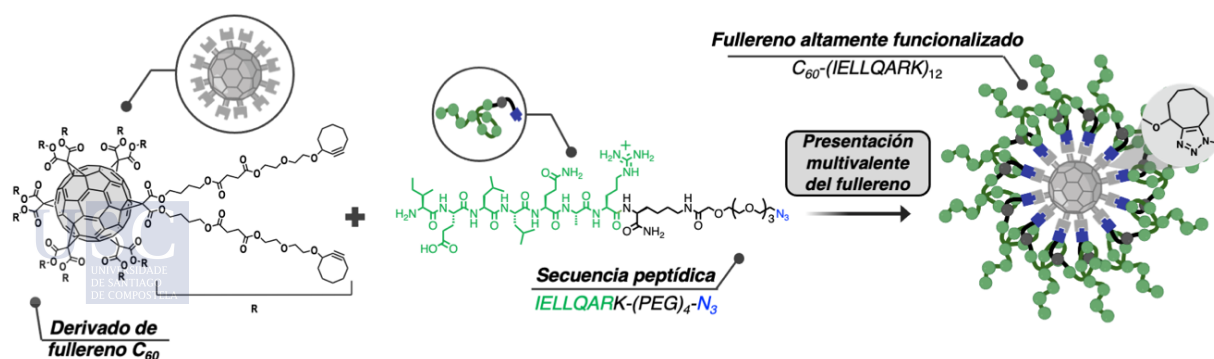
Una vez demostrado el potencial de las conexiones oxima para la preparación de conjugados de péptidos con diferentes carbohidratos y unido a la convicción del potencial del proceso de glicosidación para mejorar la internalización y la citotoxicidad de los CPPs, en el segundo capítulo de este manuscrito se ha descrito una nueva estrategia para multiplicar el número de ligandos azúcar unidos al mismo andamio peptídico. Esta aproximación emplea el uso de un conector bencílico doble tipo alcoxiamina para la inserción directa de derivados aldehído de carbohidratos lo que permitió la preparación de péptidos penetrantes altamente glicosilados con un mínimo esfuerzo sintético. Se obtuvieron glicopéptidos con 4 y con 6 carbohidrato y que contenían  $\alpha$ -D-manosa,  $\beta$ -D-glucosa o  $\beta$ -D-galactosa. Aunque estas nuevas estructuras, con el doble o el triple de ligandos azúcar que los glicopéptidos descritos en el capítulo I, perdieron capacidad de penetración celular, mejoraron significativamente el perfil de toxicidad de los andamios peptídicos. Además, el CPP con seis colgantes de  $\beta$ -D-glucosa, TmP(Glu)<sub>6</sub>, se postuló como un escudo de carbohidratos óptimo con una excelente captación *in vitro* y localización intracelular, así como una excelente biodistribución *in vivo*. Estos

resultados apoyan el potencial de la funcionalización de péptidos con glicanos, y en particular la inserción de glucosa, para la mejora del perfil de captación/toxicidad de péptidos penetrantes celulares cortos.



**Figura 49. Capítulo II.** Una nueva estrategia sintética que emplea el uso de un enlazador tipo alcóxamina ha permitido duplicar y triplicar el número de ligandos carbohidrato sobre la misma estructura peptídica.

El último y ambicioso objetivo completado con éxito en este proyecto de doctorado y descrito en el capítulo III de este manuscrito, ha sido desarrollar el primer hexa-aducto péptido/[60]fullereno completamente funcionalizado de manera precisa para la presentación multivalente en 3D de oligómeros peptídicos para el reconocimiento de proteínas. Para ello se ha combinado la síntesis de péptidos en fase sólida y una estrategia de química “click” tipo SPAAC sin cobre dando lugar a los aductos péptido/[60]fullereno simétricos  $F_1$  (con 12 copias de  $P_1$ ) y asimétrico  $F_1^{RB}$  (con 10 copias de  $P_1$  y marcado con Rodamina B). Como control negativo se empleó el péptido  $P_C$ , con una secuencia hidrofílica aleatoria  $N_3$ -(PEG) $_4$ -ISELRSE, y se acopló al fullereno en las mismas condiciones, para preparar un aducto péptido/[60]fullereno simétrico  $F_C$  y un híbrido asimétrico  $F_C^{RB}$ . Los experimentos de SPR confirmaron la unión multivalente de  $F_1$  y  $F_1^{RB}$  a la E-selectina, que también fue validada en modelos de células vivas. Estos sustitutos péptido/[60]fullereno de oligosacáridos complejos aquí descritos constituyen una estrategia única y muy ventajosa en términos de simplicidad sintética, estabilidad y versatilidad hacia andamios biocompatibles multivalentes.

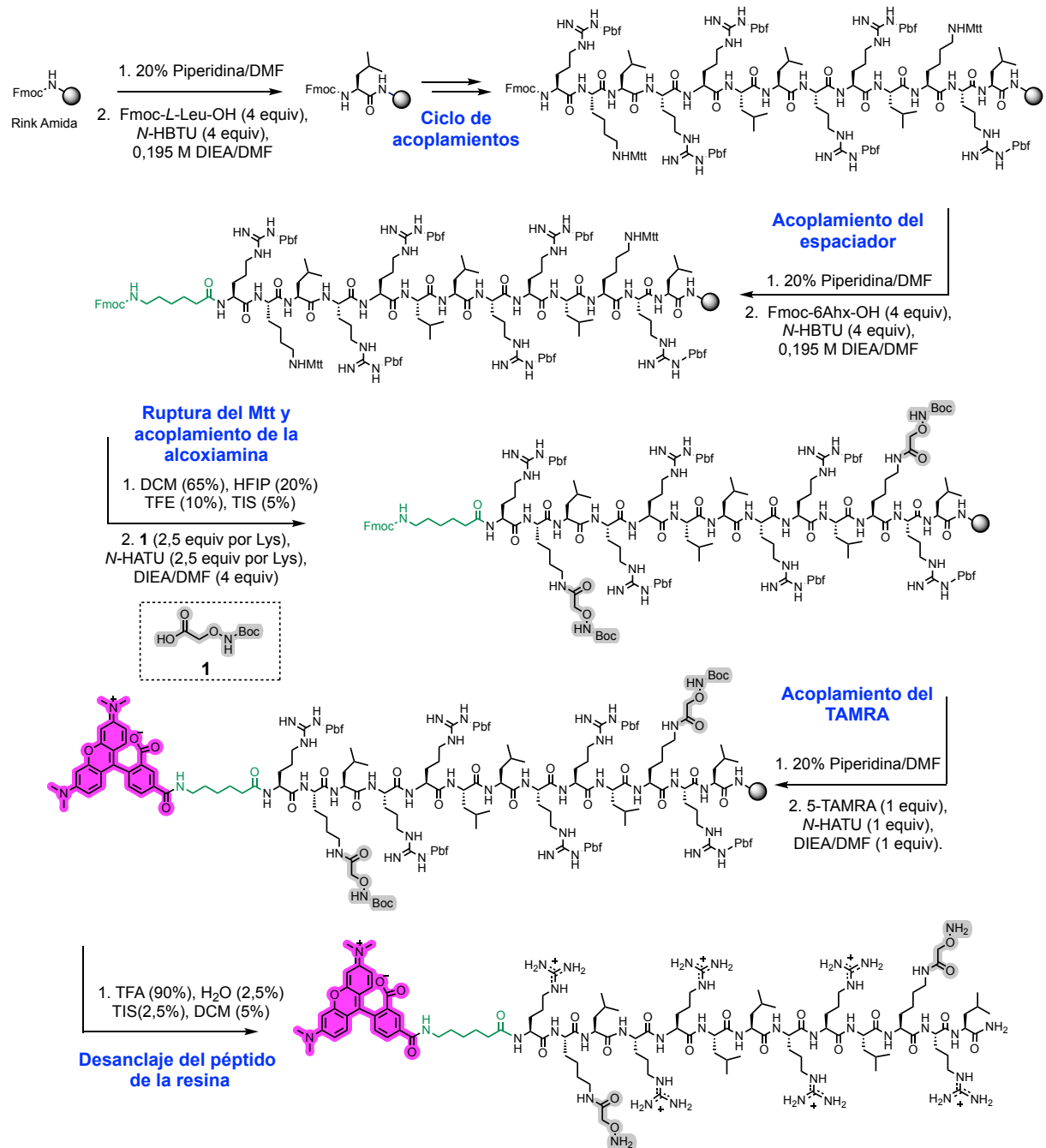


**Figura 50. Capítulo III.** La combinación de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) y una estrategia de química “click” tipo SPAAC que evita el uso de cobre con derivados de fullerenos  $C_{60}$  ha permitido obtener el primer hexa-aducto péptido/[60]fullereno altamente sustituido descrito hasta la fecha.

# Sección Experimental, Capítulo I



## 1. Figuras de apoyo



**Figura SE1.** Esquema sintético general para la síntesis de péptidos en fase sólida con dos lisinas, secuencia peptídica: RK\*LRLLLRLLK\*RL (K\* = lisina post-modificada)., estas estructuras serán las precursoras de los glicopéptidos con fórmula TmP(X)<sub>2</sub>.



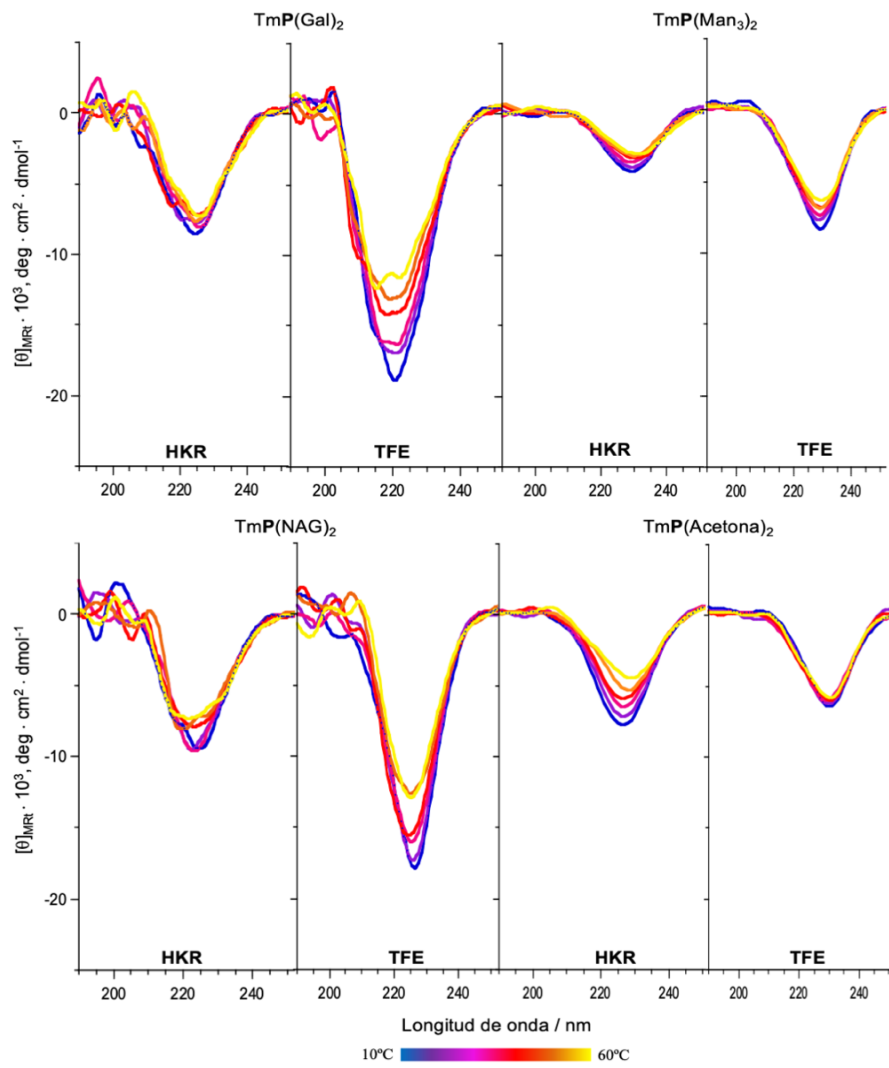


Figura SE3. Gráficas de dicroísmo circular de TmP(Gal)<sub>2</sub>, TmP(NAG)<sub>2</sub>, TmP(Man)<sub>3</sub><sub>2</sub> y TmP(Acetona)<sub>2</sub> en diferentes condiciones de temperatura y en dos disolventes: TFE y buffer HKR (pH=7,4).

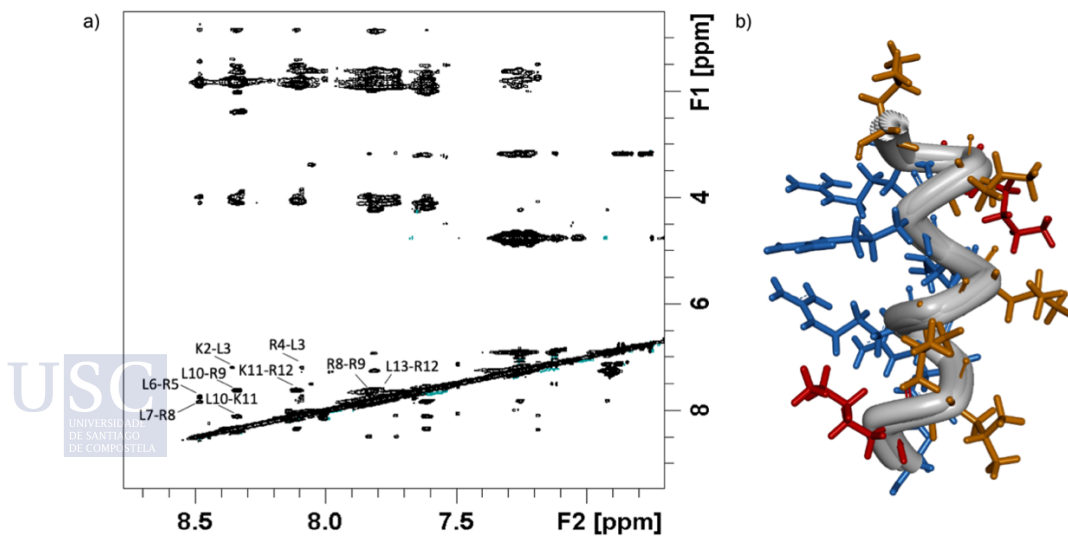
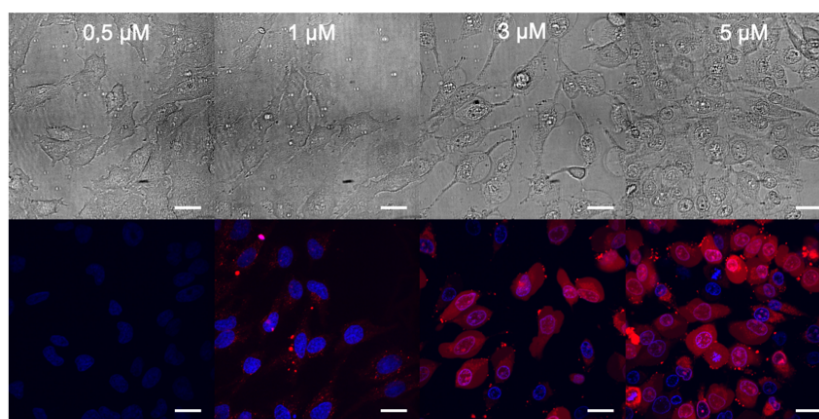
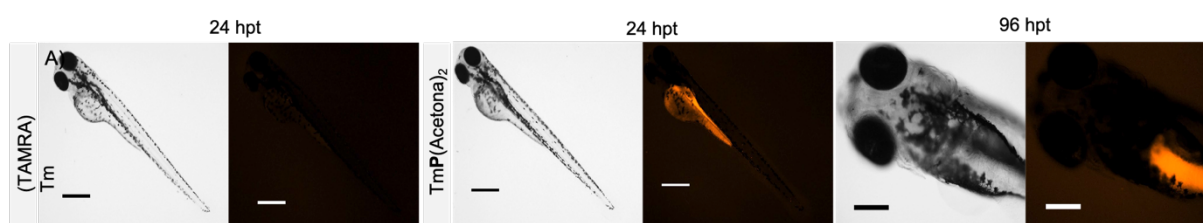


Figura SE4. Espectro NOESY 2D de TmP(Man)<sub>2</sub>, adquirido en tampón fosfato de 20 mM que contiene 10% de D<sub>2</sub>O y 30% de TFE, a 600 MHz. B) Estructura del péptido por RMN aplicando el software CYANA.



**Figura SE5.** Estudio de la capacidad de internalización del péptido control TmP(Acetona)<sub>2</sub>: imágenes de microscopia confocal en células HeLa obtenidas tras la incubación del péptido a diferentes concentraciones en buffer HKR durante 30 min a 37°C. Barras de escala: 25 μm.



**Figura SE6.** Imágenes de los individuos de peces cebra que no muestran fluorescencia en el caso del control de TAMRA y una fuerte internalización en la yema de TmP(Acetona)<sub>2</sub> 24 horas después del tratamiento. 96 horas después del tratamiento, TmP(Acetona)<sub>2</sub> no se distribuye fuera de la yema y concentraciones más altas de este péptido (> 3 μM) mostraron una fuerte toxicidad y una completa morbilidad para el pez cebra. Se realizaron experimentos *in vivo* a 1 μM con Tm (TAMRA) y el péptido de control TmP(Acetona)<sub>2</sub>. Barras de escala de 500 μm (24 hpt) y 250 μm (96 hpt).

## 2. Materiales, instrumentación y métodos

Abreviaciones peptídicas: TmP(X)<sub>2</sub> (Tm = TAMRA y X = Man, Glu, Gal, NAG, Man<sub>3</sub> y Acetona). Fmoc-Rink Amide resin, *N*-HBTU y Fmoc-*L*-Lys(Mtt)-OH fueron obtenidos comercialmente a través Iris Biotech GmbH. *N*-HATU se adquirió a Glenham life sciences. (Boc-aminooxy)acetic acid se compró a TCI Chemicals. Fmoc-*L*-Leu-OH, Fmoc-*L*-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-6Ahx-OH, Acetic anhydride, 2,6-Lutidine, DMEM, FBS, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) and Heparin sodium salt fueron adquiridos a Sigma-Aldrich®. 5(6)-Carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester fue comprado a Carbosynth. Hoechst 33342 Trihydrochloride Trihydrate se obtuvo en ThermoFisher. Gibco™ Penicillin-Streptomycin-Glutamine se adquirió a Fisher scientific. 96-well Glass Bottom Black Plate (P96-1.5H-N) fueron adquiridas a Cellvis. Los disolventes deuterados (D<sub>2</sub>O, TFE-d<sub>2</sub>) se adquirieron a EMD Millipore Corporation. *N,N*-Dimethylformamide, para la síntesis de péptidos fue comprada a Scharlau. Todos los demás disolventes son de grado HPLC, comprados a Sigma-Aldrich® o Fisher Scientific® y usados sin ninguna purificación adicional.

Se empleó la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la purificación de los compuestos, utilizando un JASCO LC-4000 con una columna de fase reversa Agilent Eclipse XDB-C18, 9,4x250 mm para la purificación semipreparativa mediante un gradiente de 95:5→5:95 (0→35 min) H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA).

El análisis mediante cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrómetro de masas (HPLC-MS) se llevó a cabo en un Agilent Technologies 1260 Infinity II asociado a un 6120 Quadrupole LC-MS utilizando una columna Agilent SB-C18 con un gradiente de 95:5→5:95 (0→12 min) H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA). Las determinaciones de masas exactas (HRMS), empleando un ESI-MS, se realizaron en un espectrómetro de masas Bruker MicroTof o en un Sciex QSTAR Pulsar y se notifican como relación masa por carga ( $m/z$ ).

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Varian Mercury (300 MHz para <sup>1</sup>H y 75 MHz para <sup>13</sup>C) y o en un Bruker AMX (500 MHz para <sup>1</sup>H y 125 MHz para <sup>13</sup>C). Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm ( $\delta$ ) referidos a las siguientes señales de disolventes: <sup>1</sup>H-RMN: D<sub>2</sub>O 4,79. Las multiplicidades de espín se reportaron como singlete (s), doblete (d), triplete (t), con constantes de acoplamiento ( $J$ ) dadas en Hz, o múltiplete (m).

El cálculo de las concentraciones de los péptidos marcados fluorescentemente se realizó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS Biochrom Libra S60.

Las medidas de dicroísmo circular (CD) se realizaron con un espectrómetro CD Jasco J-1100 equipado con un Jasco MCB-100 Mini Circulation Bath para el control de temperatura.

Las células se mantuvieron en un incubador INCO 108 (Mettler). Las imágenes de microscopía celular se adquirieron con un microscopio Dragonfly confocal spinning-disk en un Nikon Eclipse Ti-E equipado con una cámara digital Andor Sona sCMOS. Las imágenes fueron analizadas con Image J o Fiji.<sup>363</sup>

Los resultados de viabilidad celular o ensayo MTT se midieron en un lector de microplacas Infinite F200pro, Tecan.

Para la citometría de flujo se empleó un citómetro Guava EasyCyte™ (EMD Millipore) los datos fueron analizados con el software InCyte incluido en GuavaSoft 3.2 (Millipore).

Las fotografías *in vivo* de los peces cebras fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia Nikon AZ100 Zoom y analizadas con el software NIS Elements (Nikon).

### 3. Síntesis peptídica

#### 3.1 Protocolos generales

**Protocolo general para el acoplamiento de los aminoácidos:** Todos los péptidos fueron sintetizados manualmente a través de la síntesis de péptidos en fase sólida mediante el método Fmoc<sup>123,364</sup> utilizando la resina Fmoc-Rink Amida (con una carga de 0,71 mmol/g). Antes de comenzar la síntesis, 0,1 mmol de resina se hincharon con DMF (2 mL) durante 20 min. El ciclo de acoplamientos consistió en la eliminación del grupo protector Fmoc con una disolución de piperidina en DMF (20%, 2 mL, 20 min), seguidamente, la mezcla se filtró y la resina se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min). A continuación, los acoplamientos de los respectivos aminoácidos se realizaron mediante el tratamiento con una disolución de  $\alpha$ -aminoácidos (4

<sup>363</sup> J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak and A. Cardona, *Nat. Methods*, **2012**, 9, 676–682.

<sup>364</sup> R. Behrendt, P. White, J. Offer, *J. Pept. Sci.*, **2016**, 22, 4–27.

equiv), *N*-HBTU (4 equiv) en DMF (2 mL), que se mezcló con DIEA (0,195 M en DMF, 1,2 equiv) 1 min antes de la adición. La mezcla resultante se agitó mediante burbujeo de Ar durante 15 min. Finalmente, la resina se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min). La eficiencia de cada acoplamiento se comprobó empleando el test TNBS.

**Protocolos de terminación del péptido:** Una vez finalizada la secuencia lineal, los péptidos se completaron siguiendo alguno de los dos siguientes protocolos de terminación:

1. Acoplamiento del “espaciador”: Tras la eliminación del grupo Fmoc del último aminoácido acoplado con piperidina/DMF (20%, 2 mL, 20 min), el péptido lineal fue tratado con una disolución de ácido *N*-Fmoc-6-aminohexanoico (4 equiv), *N*-HBTU (4 equiv) y DIEA (0,195 M en DMF, 1,2 equiv) en DMF. La mezcla resultante se agitó mediante burbujeo de Ar durante 15 min. Finalmente, la mezcla se filtró y la resina se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min).
2. Acetilación: Este protocolo de terminación permite la acetilación del grupo amino del último aminoácido acoplado, para ello, una vez eliminado el grupo Fmoc con piperidina/DMF (20%, 2 mL, 20 min), se empleó una mezcla de anhídrido acético y 2,6-Lutidina (1:1, 2 mL) durante 30 min bajo agitación mediante el burbujeo de Ar. Transcurrido este tiempo, la suspensión se filtró y la resina se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min).

**Protocolo de eliminación selectiva del grupo Mtt:** La resina se solvató con DCM (3x2 mL, 1 min), y el grupo protector Mtt se eliminó selectivamente mediante la agitación mecánica con una mezcla de DCM/HFIP/TFE/TIS (65/20/10/5%, 3x2 mL, 2h cada ciclo). Entre cada ciclo la mezcla se lavó con DCM (3x2 mL, 1 min). Después del último ciclo, la mezcla se filtró y la resina se lavó con DCM (3x2 mL, 1 min) y DMF (3x2 mL, 5 min). A continuación, se añadió sobre la resina una disolución de la alcóxamina comercial Boc-aminooxy)acetic acid (compuesto **1**, 2,5 equiv por lisina) y *N*-HATU (2,5 equiv por lisina) en DMF (1 mL), seguida de la adición gota a gota de una disolución de DIEA (4 equiv). La suspensión resultante se agitó mediante el burbujeo de Ar durante 30 min, transcurrido este tiempo, la mezcla se filtro y la resina resultante se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min) y DCM (3x2 mL, 1 min).

**Protocolo general para el marcaje fluorescente:** Para aquellos péptidos que se terminaron con el “acoplamiento del espaciador”, después de solvatar la resina con DMF, el grupo protector Fmoc del espaciador previamente adherido se eliminó utilizando una disolución de piperidina en DMF (20%, 2 mL, 20 min), seguidamente, la resina se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min). El acoplamiento se llevó a cabo mediante la adición de una disolución de TAMRA (1 equiv), *N*-HATU (1 equiv) y DIEA (1 equiv) en DMF (2 mL) y la mezcla se agitó mediante el burbujeo de Ar durante 2h. La suspensión se filtró y la resina se lavó con DMF (3x3 mL, 5 min) y DCM (3x3 mL, 5 min). Finalmente, la resina se secó a vacío para realizar el posterior protocolo de rotura.

**Protocolo general para el desanclaje final del péptido:** Los péptidos se desprotegeron y se separaron de la resina a través de un protocolo estándar en TFA a temperatura ambiente utilizando TFA/DCM/H<sub>2</sub>O/TIS (90/5/2,5/2,5%, 1 mL por 70 mg de resina) durante 2h. La mezcla se filtró, la resina se lavó con TFA (1 mL) y el péptido se precipitó mediante el vertido de la mezcla sobre Et<sub>2</sub>O (25 mL) enfriado a 0°C. El precipitado resultante se centrifugó y se disolvió en H<sub>2</sub>O (3-5 mL).

**Protocolo general para el acoplamiento de los ligandos carbohidrato:** Los péptidos obtenidos en el paso anterior se trataron con los diferentes derivados carbonílicos de los carbohidratos sin previa purificación. Para ello, se hizo reaccionar una disolución de péptido en H<sub>2</sub>O (5 mM) con una disolución de los correspondientes aldehídos (2 equiv por alcoxiamina) en H<sub>2</sub>O (120 mM) durante 5 min. A continuación, los péptidos se purificaron mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→35 min)] las fracciones recogidas se liofilizaron y se almacenaron a -20°C. La pureza e identidad de las estructuras glicopeptídicas se determinó mediante HPLC-MS(ESI), <sup>1</sup>H-RMN y HRMS.

### 3.2 Péptido TmP(Man)<sub>2</sub>

Siguiendo el protocolo general para la SPPS de un péptido marcado fluorescentemente con TAMRA que contiene dos α-D-manosas, TmP(Man)<sub>2</sub> se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido rosa esponjoso, 17 mg (6% y 98% de pureza). Fue caracterizado mediante HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→12 min)], *t<sub>R</sub>* 7,62 min. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 8,21 (s, 1H), 7,92 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,58 (m, 1H), 7,36 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,11 (t, *J* = 9,9 Hz, 2H), 6,97 (m, 1H), 6,83 (d, *J* = 9,6 Hz, 2H), 6,75 (s, 2H), 4,80-4,73 (m, 2H), 4,68 (s, 4H), 4,40 (d, 4H), 4,28-3,96 (m, 13H), 3,87-3,24 (m, 12H), 3,13 (s, 12H), 3,10-2,95 (m, 16H), 2,91-2,80 (m, 2H), 2,25 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,79-1,11 (m, 57H), 0,87-0,67 (m, 30H). **MS** (ESI): 1656,7 (7, [M+2H+4TFA]<sup>+2</sup>), 1598,6 (17, [M+2H+3TFA]<sup>+2</sup>), 1541,9 (15, [M+2H+2TFA]<sup>+2</sup>), 1027,2 (100, [M+3H+2TFA]<sup>+3</sup>), 989,4 (99, [M+3H+TFA]<sup>+3</sup>), 952,8 (28, [M+3H]<sup>+3</sup>), 743,3 (62, [M+4H+TFA]<sup>+4</sup>), 715,6 (53, [M+4H]<sup>+4</sup>). **HRMS** (ESI): Calculada para C<sub>129</sub>H<sub>217</sub>N<sub>39</sub>O<sub>34</sub> ([M+2H]<sup>+2</sup>): 1428,3220; encontrada: 1428,3209. **Fig. SE7**

### 3.3 Péptido TmP(Gal)<sub>2</sub>

Siguiendo el protocolo general para la SPPS de un péptido marcado fluorescentemente con TAMRA que contiene dos β-D-galactosas, TmP(Gal)<sub>2</sub> se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido rosa esponjoso, 26 mg (9% y 97% de pureza). Fue caracterizado mediante HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→12 min)], *t<sub>R</sub>* 7,81 min. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 8,47 (s, 1H), 8,08-7,96 (m, 1H), 7,63-7,53 (m, 1H), 7,25 (s, 1H), 7,06-6,91 (m, 2H), 6,89-6,83 (m, 1H), 6,79-6,62 (m, 2H), 6,57 (s, 2H), 4,81-4,68 (m, 4H), 4,66-4,58 (m, 4H), 4,38 (s, 2H), 4,28-3,90 (m, 13H), 3,89-3,31 (m, 12H), 3,19-3,05 (m, 16H), 3,04 (s, 12H), 2,91-2,71 (m, 2H), 2,37-2,11 (m, 2H), 1,98-1,04 (m, 57H), 0,90-0,53 (m, 30H). **MS** (ESI): 1599,4 (7, [M+2H+3TFA]<sup>+2</sup>), 1543,1 (8, [M+2H+2TFA]<sup>+2</sup>), 1028,8 (75, [M+3H+2TFA]<sup>+3</sup>), 990,9 (100, [M+3H+TFA]<sup>+3</sup>), 953,3 (20, [M+3H]<sup>+3</sup>), 743,8 (35, [M+4H+TFA]<sup>+4</sup>). **HRMS** (ESI): Calculada para C<sub>129</sub>H<sub>218</sub>N<sub>39</sub>O<sub>34</sub> ([M+3H]<sup>+3</sup>): 952,5504; encontrada: 952,5499. **Fig. SE8.**

### 3.4 Péptido TmP(NAG)<sub>2</sub>

Siguiendo el protocolo general para la SPPS de un péptido marcado fluorescentemente con TAMRA que contiene dos *N*-acetil-β-D-glucosaminas, TmP(NAG)<sub>2</sub> se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido rosa esponjoso, 26 mg (9% y 98% de pureza). Fue caracterizado mediante HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→12 min)], *t<sub>R</sub>* 7,63 min. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 8,37 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,97-7,86 (m, 1H),

7,77 (s, 1H), 7,49 (t,  $J = 5,4$  Hz, 2H), 6,97-6,91 (m, 1H), 6,91-6,81 (m, 2H), 6,67-6,52 (m, 2H), 4,54-4,46 (m, 2H), 4,47-4,32 (m, 4H), 4,29-3,89 (m, 13H), 3,77-3,29 (m, 12H), 3,09 (s, 12H), 3,08-2,95 (m, 16H), 2,85-2,71 (m, 2H), 2,34-2,22 (m, 2H), 1,94-1,85 (m, 6H), 1,81-1,29 (m, 57H), 0,86-0,57 (m, 30H). **MS** (ESI): 1637,6 (10,  $[M+2H+3TFA]^{+2}$ ), 1581,4 (5,  $[M+2H+2TFA]^{+2}$ ), 1055,3 (100,  $[M+3H+2TFA]^{+3}$ ), 1016,4 (80,  $[M+3H+TFA]^{+3}$ ), 979,1 (15,  $[M+3H]^{+3}$ ), 762,2 (30,  $[M+4H+TFA]^{+4}$ ), 733,7 (25,  $[M+4H]^{+4}$ ), **HRMS** (ESI): Calculada para  $C_{133}H_{224}N_{41}O_{34}$  ( $[M+3H]^{+3}$ ): 979,9014; encontrada: 979,9011. **Fig. SE9.**

### 3.5 Péptido TmP(Glu)<sub>2</sub>

Siguiendo el protocolo general para la SPPS de un péptido marcado fluorescentemente con TAMRA que contiene dos  $\beta$ -D-glucosas, TmP(Glu)<sub>2</sub> se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [ $H_2O$  (0,1% TFA)/ $CH_3CN$  (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido rosa esponjoso, 42 mg (15% y 99% de pureza). Fue caracterizado mediante HPLC-MS [ $H_2O$  (0,1% TFA)/ $CH_3CN$  (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→12 min)],  $t_R$  7,59 min. **<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz,  $D_2O$ ,  $\delta$ ): 8,21 (s, 1H), 7,96-7,91 (m, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,69-7,57 (m, 1H), 7,19-7,12 (m, 2H), 7,09-7,00 (m, 1H), 6,75 (s, 2H), 6,65-6,57 (m, 2H), 4,46 (s, 2H), 4,41-4,33 (m, 4H), 4,27-4,00 (m, 13H), 3,86-3,27 (m, 12H), 3,13 (s, 12H), 3,10-3,02 (m, 16H), 2,76 (d,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 2,31-2,18 (m, 2H), 1,96-1,09 (m, 57H), 0,95-0,60 (m, 30H). **MS** (ESI): 1598,1 (10,  $[M+2H+3TFA]^{+2}$ ), 1544,3 (8,  $[M+2H+2TFA]^{+2}$ ), 1029,1 (50,  $[M+3H+2TFA]^{+3}$ ), 990,9 (100,  $[M+3H+TFA]^{+3}$ ), 952,8 (23,  $[M+3H]^{+3}$ ), 743,5 (47,  $[M+4H+TFA]^{+4}$ ), 715,0 (43,  $[M+4H]^{+4}$ ), **HRMS** (ESI): Calculada para  $C_{129}H_{218}N_{39}O_{34}$  ( $[M+3H]^{+3}$ ): 952,5504; encontrada: 952,5505. **Fig. SE10.**

### 3.6 Péptido TmP(Man)<sub>3</sub>

Siguiendo el protocolo general para la SPPS de un péptido marcado fluorescentemente con TAMRA que contiene dos trisacáridos de  $\alpha$ -D-manosa, TmP(Man)<sub>3</sub> se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [ $H_2O$  (0,1% TFA)/ $CH_3CN$  (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido rosa esponjoso, 38 mg (11% y 99% de pureza). Fue caracterizado mediante HPLC-MS [ $H_2O$  (0,1% TFA)/ $CH_3CN$  (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→12 min)],  $t_R$  7,73 min. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz,  $D_2O$ ,  $\delta$ ): 8,21 (s, 1H), 8,03-7,87 (m, 1H), 7,72-7,58 (m, 1H), 7,44-7,35 (m, 1H), 7,23-7,12 (m, 2H), 7,04-6,95 (m, 2H), 6,95-6,86 (m, 2H), 6,83 (s, 2H), 5,07-4,93 (m, 2H), 4,86-4,70 (m, 4H), 4,51-4,40 (m, 4H), 4,33-4,09 (m, 13H), 4,07-3,34 (m, 36H), 3,18 (s, 12H), 3,14-3,03 (m, 16H), 2,94-2,78 (m, 2H), 2,36-2,11 (m, 2H), 1,95-1,03 (m, 57H), 0,95-0,58 (m, 30H). **MS** (ESI): 1244,4 (100,  $[M+3H+2TFA]^{+3}$ ), 1206,6 (78,  $[M+3H+TFA]^{+3}$ ), 1168,6 (10,  $[M+3H]^{+3}$ ), 904,8 (55,  $[M+4H+TFA]^{+4}$ ), 604,4 (47,  $[M+6H+TFA]^{+6}$ ), **HRMS** (ESI): Calculada para  $C_{153}H_{258}N_{39}O_{54}$  ( $[M+3H]^{+3}$ ): 1168,6208; encontrada: 1168,6204. **Fig. SE11.**

### 3.7 Péptido TmP(Acetona)<sub>2</sub>

Siguiendo el protocolo general para la SPPS de un péptido marcado fluorescentemente con TAMRA bloqueada con dos moléculas de acetona, TmP(Acetona)<sub>2</sub> se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [ $H_2O$  (0,1% TFA)/ $CH_3CN$  (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido rosa esponjoso, 30 mg (12% y 98% de pureza). Fue caracterizado mediante HPLC-MS [ $H_2O$  (0,1% TFA)/ $CH_3CN$  (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→12 min)],  $t_R$  8,21 min. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz,  $D_2O$ ,  $\delta$ ): 8,07-7,89 (m, 2H), 7,55 (s, 1H), 7,03 (d,  $J =$

9,2 Hz, 2H), 6,89-6,69 (m, 4H), 4,34 (d,  $J = 7,9$  Hz, 4H), 4,27-3,93 (m, 13H), 3,40-3,22 (m, 2H), 3,10 (s, 12H), 3,07-2,98 (m, 16H), 2,31-2,11 (m, 2H), 1,89-1,63 (m, 12H), 1,60-1,10 (m, 57H), 0,88-0,64 (m, 30H). **MS** (ESI): 1491,8 (8,  $[M+2H+4TFA]^{+2}$ ), 1434,1 (10,  $[M+2H+3TFA]^{+2}$ ), 1376,3 (8,  $[M+2H+2TFA]^{+2}$ ), 918,2 (100,  $[M+3H+2TFA]^{+3}$ ), 881,4 (100,  $[M+3H+TFA]^{+3}$ ), 690,0 (18,  $[M+4H+2TFA]^{+4}$ ), 661,5 (40,  $[M+4H+TFA]^{+4}$ ), 632,2 (18,  $[M+4H]^{+4}$ ). **HRMS** (ESI): Calculada para  $C_{119}H_{201}N_{39}O_{22}$  ( $[M+2H]^{+2}$ ): 1264,2899; encontrada: 1264,2902. **Fig. SE12**

#### 4. Procedimiento general para el dicróismo circular

Las mediciones del dicróismo circular se llevaron a cabo utilizando los siguientes ajustes: rango de adquisición: 300-190 nm; ancho de banda: 1,0 nm; acumulación: 3 escaneos, escala de CD: 200 mdeg/1,0 dOD; D.I.T. (Data Integration Time): 1s; modo de escaneo: continuo; velocidad de escaneo: 200 nm/min. Las mediciones se hicieron de 10°C a 60°C (intervalo de datos: 10°C; gradiente de temperatura: 5°C/min) en una celda de cuarzo de 0,2 cm de longitud a un volumen final de 0,5 mL (buffer HKR o TFE) con una concentración final de los péptidos de 200  $\mu$ M. Los resultados se expresan como elipticidad molar ( $[\theta]_{MRt}$ ) con unidades de  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  y se calculan utilizando la ecuación **ec. 1**:

$$[\theta]_{MRt} = \frac{100 \cdot \theta}{C \cdot l \cdot N^{\circ} \text{ de residuos}} \quad [1]$$

Donde  $\theta$  es la elipticidad (deg), C es la concentración del péptido (M) y l es la longitud de la cubeta (cm).<sup>365,366</sup>

El porcentaje de helicidad ( $\%[\theta]$ ) se calcula usando la **ec. 2** donde se emplea la elipticidad a 222 nm y se computa como valor absoluto.<sup>367</sup>

$$\%[\theta] = \left( \frac{|[\theta]_{MRt(222)}| - 2340}{30300} \right) \cdot 100 \quad [2]$$

#### 5. Medidas de RMN

Los experimentos de RMN se adquirieron con muestras de péptidos de 1,5 mM preparadas en tampón fosfato de 20 mM que contiene un 30% de TFE deuterado (TFE- $d_2$ ) y un 10% de  $D_2O$ . Los espectros 2D-TOCSY y 2D-NOESY se adquirieron en un espectrómetro Bruker de 500 MHz a 298 K, con tiempos de mezcla de 75 ms y 500 ms, respectivamente. Ambos experimentos se registraron con 4096 puntos en F2 y 256 puntos en F1. La asignación de péptidos se llevó a cabo utilizando el software CARA<sup>368</sup> y los cálculos de estructura se realizaron utilizando CYANA 3.0 con restricciones de distancia derivadas de los experimentos NOEs.<sup>369</sup>



<sup>365</sup> S. Y. M. Lau, A. K. Taneja, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 13253-13261.

<sup>366</sup> N. E. Zhou, C. M. Kay, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 2664-2670.

<sup>367</sup> Y.-H. Chen, J. T. Yang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1971**, 44, 1285-1291.

<sup>368</sup> R. L. J. Keller, *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*.

<sup>369</sup> P. Güntert, in *Meth. Mol. Biol.*, Humana Press, New Jersey, 353-378.

## 6. Líneas celulares y cultivo

Las líneas celulares se mantuvieron en un incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad con DMEM (4500 mg/L de glucosa, L-glutamina, piruvato sódico y bicarbonato sódico), complementado con 10% de FBS y 1% de mezcla de Penicilina-Estreptomicina-Glutamina. Cada línea celular (100.000 células/mL) fue cultivada en platos de fondo de vidrio de cuatro pocillos y lavada con tampón HKR (5 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 2,05 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 7,4). Los núcleos fueron teñidos por incubación con 1 μM Hoechst 33342 en HKR durante 30 min. El péptido se diluyó en HKR, DMEM o DMEM/FBS (10%) para obtener las diferentes concentraciones calculadas mediante UV-Vis ( $\lambda = 555$ ,  $\epsilon = 91.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Las células se incubaron con el péptido durante 30 min y posteriormente se lavaron utilizando una solución de heparina en HKR (1x500 μL, 0,1 mg/ml) para eliminar el exceso de péptido y tampón HKR (2x500 μL) antes de ser observadas en el microscopio.

## 7. Viabilidad celular: Ensayo MTT

La viabilidad celular fue estudiada mediante un ensayo estándar de MTT. El día anterior al ensayo, se colocó una suspensión de células HeLa en placas de cultivo de 96 pocillos añadiendo 100 μL (100.000 células/mL) por pocillo. Al día siguiente, se aspiró el medio y se incubaron las células con diferentes concentraciones de péptido en HKR (50 μL/pocillo). Después de 1 hora de incubación a 37°C, se aspiró el medio y las células se lavaron con una disolución de heparina en HKR (1x100 μL, 0,1 mg/ml) y tampón HKR (2x100 μL/pocillo). A continuación, se añadió DMEM fresco que contiene un 10% de FBS (100 μL) durante 3h. Las células para el control al 100% de viabilidad fueron impregnadas con sólo medio de cultivo celular (100 μL medio final) y para el control al 0% con una solución de 1% de TRITON X-100. La viabilidad se midió cuantificando la capacidad de la actividad metabólica mitocondrial de las células para reducir el colorante soluble en agua MTT a su sal de formazán insoluble. Se añadió MTT (5 mg/mL en PBS, 10 μL/pocillo) a los pocillos y las células se siguieron incubando durante 4 h. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y la sal de formazán insoluble en agua se disolvió en DMSO (100 μL/pocillo). La absorbancia se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas. Los datos se recogieron por triplicado y se expresaron como valores normalizados para las células de control no tratadas (100% y 0%) de tres réplicas  $\pm$  la desviación estándar.

## 8. Protocolo general para la citometría de flujo

El día antes al ensayo, se colocaron diferentes líneas celulares en placas de cultivo de 96 pocillos añadiendo 100 μL (100.000 células/mL) por pocillo. Al día siguiente, se aspiró el medio y las células se incubaron con diferentes concentraciones de péptido (50 μL/pocillo) en buffer HKR. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, se aspiró el buffer y las células se lavaron con disolución de heparina (1x100 μL, 0,1 mg/mL) y tampón HKR (2x100 μL). A continuación, se añadió tripsina-EDTA 100 μL en cada pocillo y las células se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Finalmente, se añadieron a las células 100 μL de una solución de FBS al 2% y 5 mM de EDTA en PBS para neutralizar la tripsina. Por último, 2500 células de cada pocillo se analizaron mediante clitómetro de flujo. Se determinó la mediana del canal Yellow-G ( $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 575/25 \text{ nm}$ ) para esta población. Los datos se representan como la media de la mediana de la intensidad de fluorescencia de tres réplicas  $\pm$  la desviación estándar.

## 9. Experimentos *in vivo* en peces cebra

Los peces cebra adultos de un año (*Danio rerio*) fueron mantenidos en acuarios de 30 L con una tasa de 1 pez por litro de agua en un sistema de recirculación, en un ambiente controlado de 14h de luz/10h de ciclo oscuro a 28°C. Los embriones de pez cebra se obtuvieron mediante la depositación masiva de las poblaciones reproductoras de peces cebra adultos. 48 horas después de la fecundación (hpf) los embriones de pez cebra fueron expuestos a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  de los glicopéptidos TmP(Gal)<sub>2</sub> y TmP(Man<sub>3</sub>)<sub>2</sub> para evaluar su capacidad de absorción por el embrión y su biodistribución. Esto fue posible gracias a las características de fluorescencia de los glicopéptidos analizados y a la transparencia de los embriones de peces. La exposición tuvo lugar durante 96 h, siendo los peces controlados cada 24 h. Los protocolos utilizados en este estudio se realizaron de acuerdo con la normativa de experimentación animal de la UE (UE, 2010) y fueron aprobados por el Comité de Bioética para la Experimentación Animal CEEA-LU (Universidade de Santiago de Compostela). Cuando fue necesario, los embriones fueron eutanasiados por sobredosis de triclaína (MS-222)

## 10. Caracterización peptídica

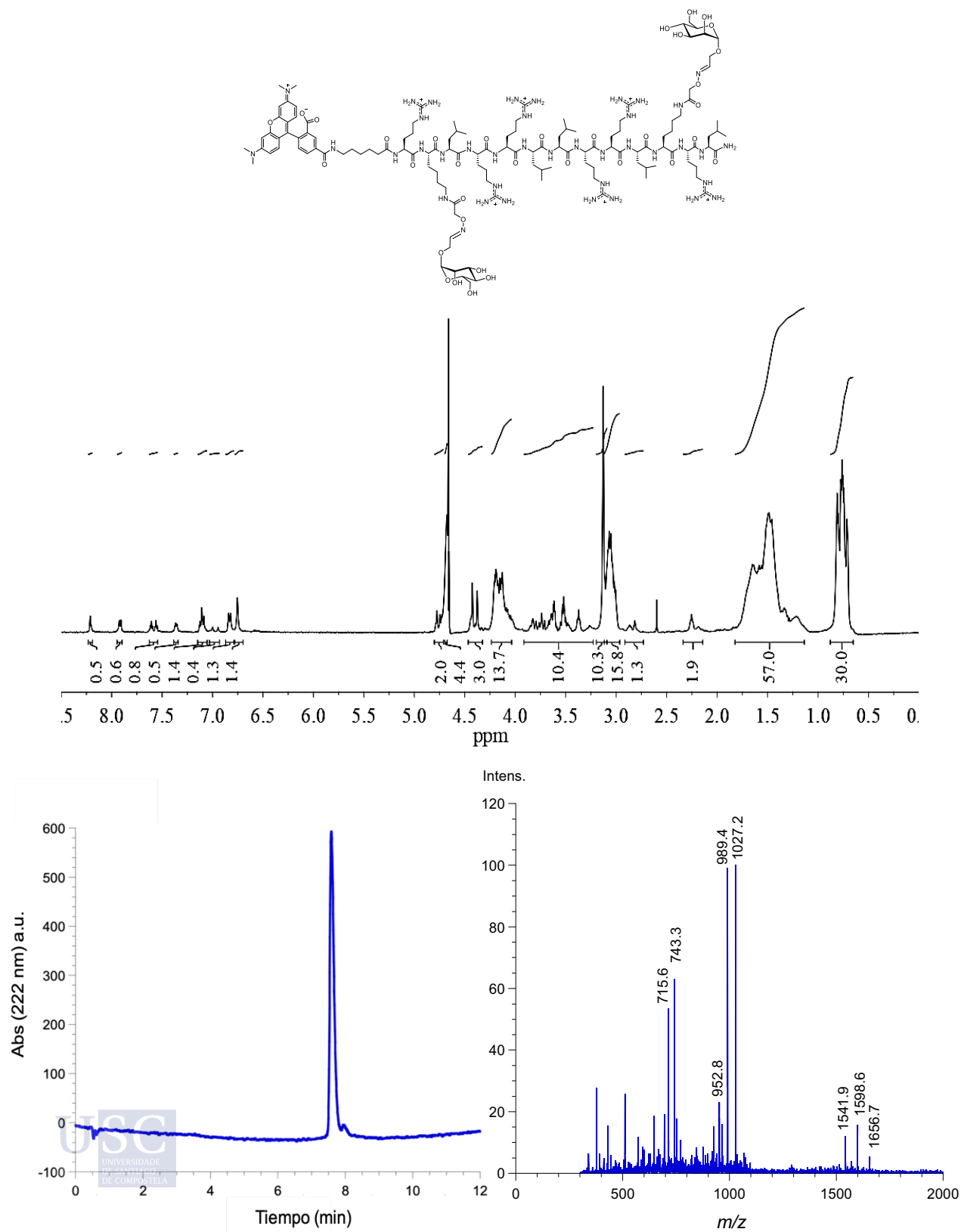


Figura SE7. Péptido TmP(Man)<sub>2</sub>: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O y HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>r</sub> 7,62 min.

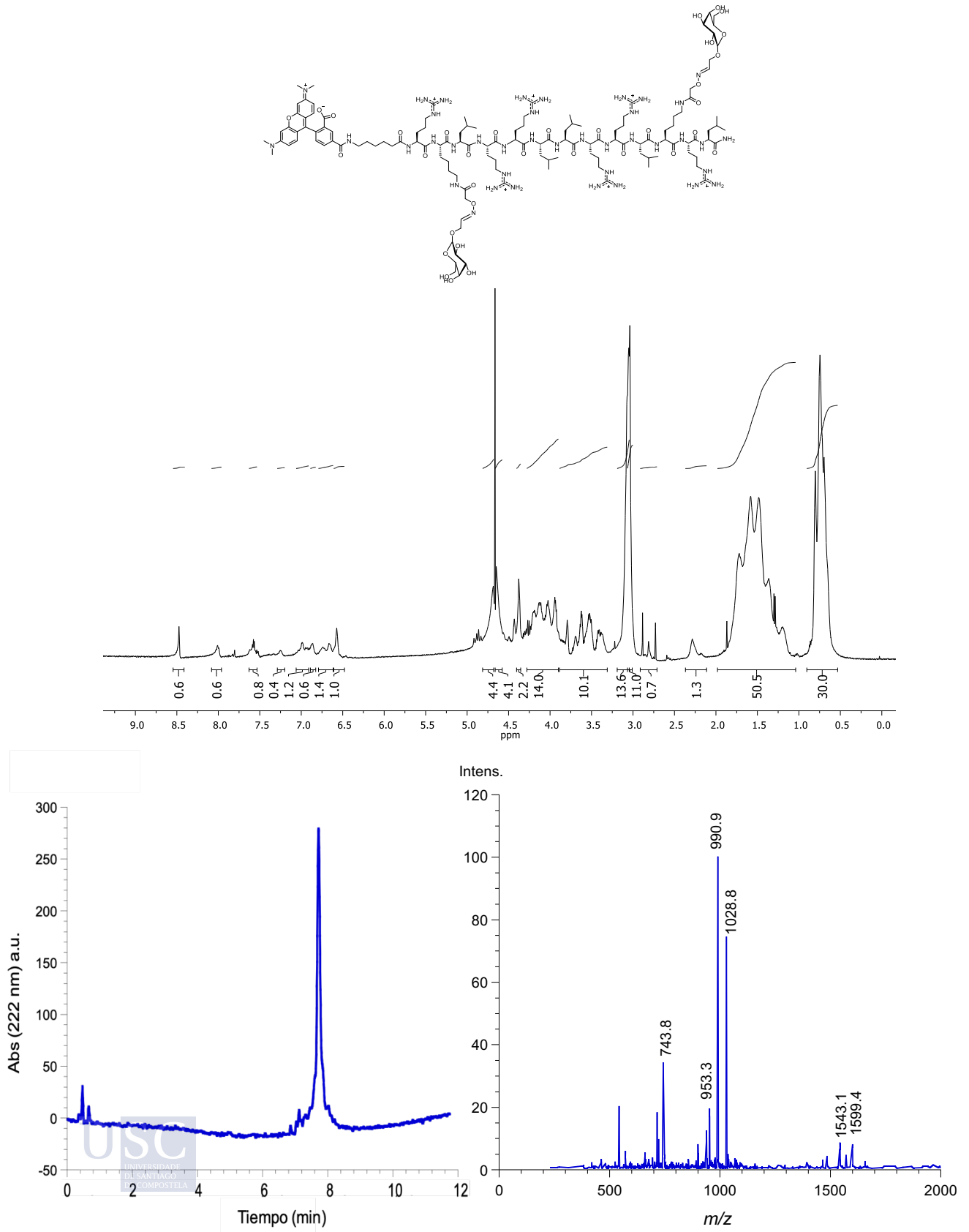


Figura SE8. Péptido TmP(Gal)<sub>2</sub>: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O y HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>R</sub> 7,81 min.

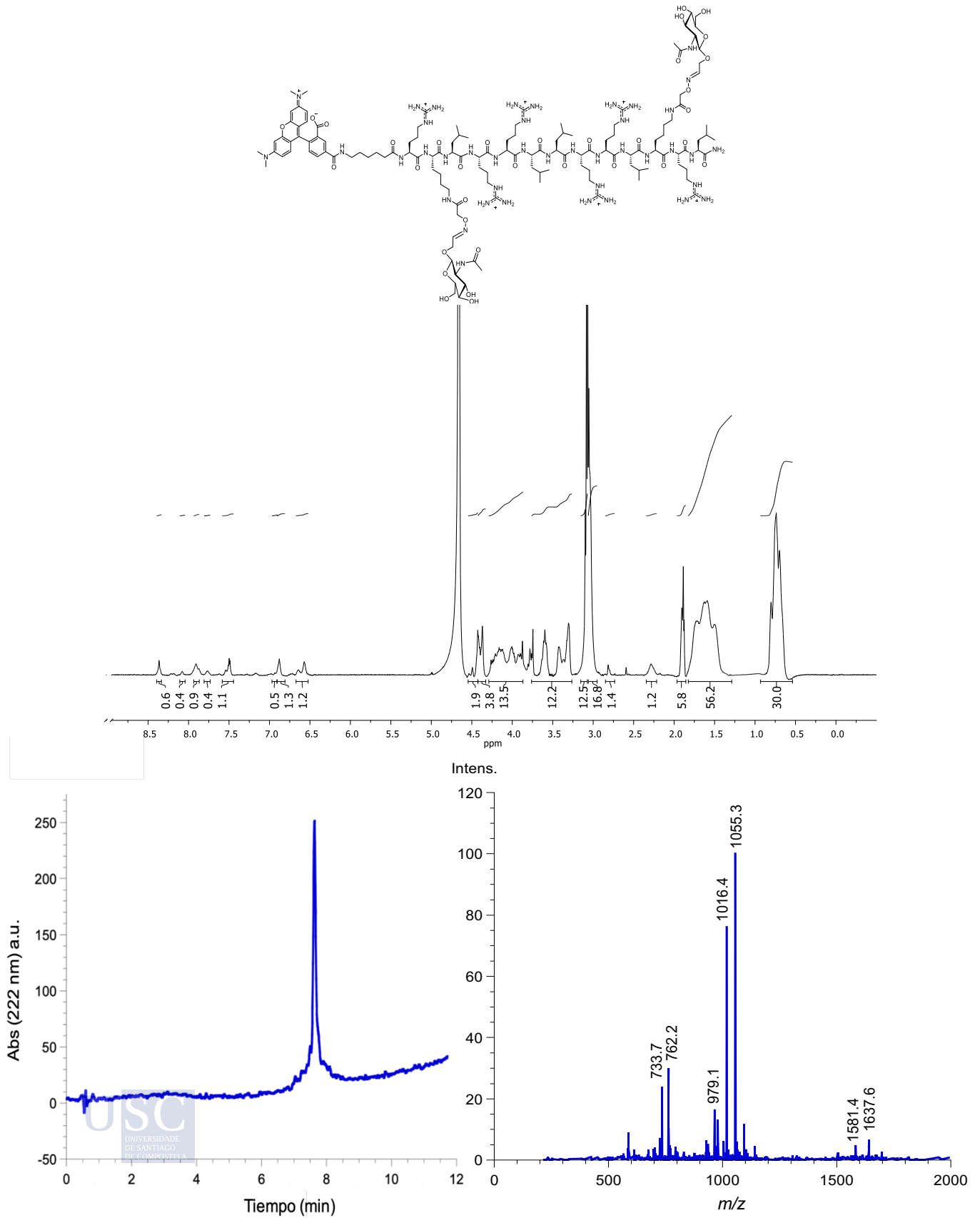


Figura SE9. Péptido TmP(NAG)<sub>2</sub>: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O y HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>R</sub> 7,63 min.

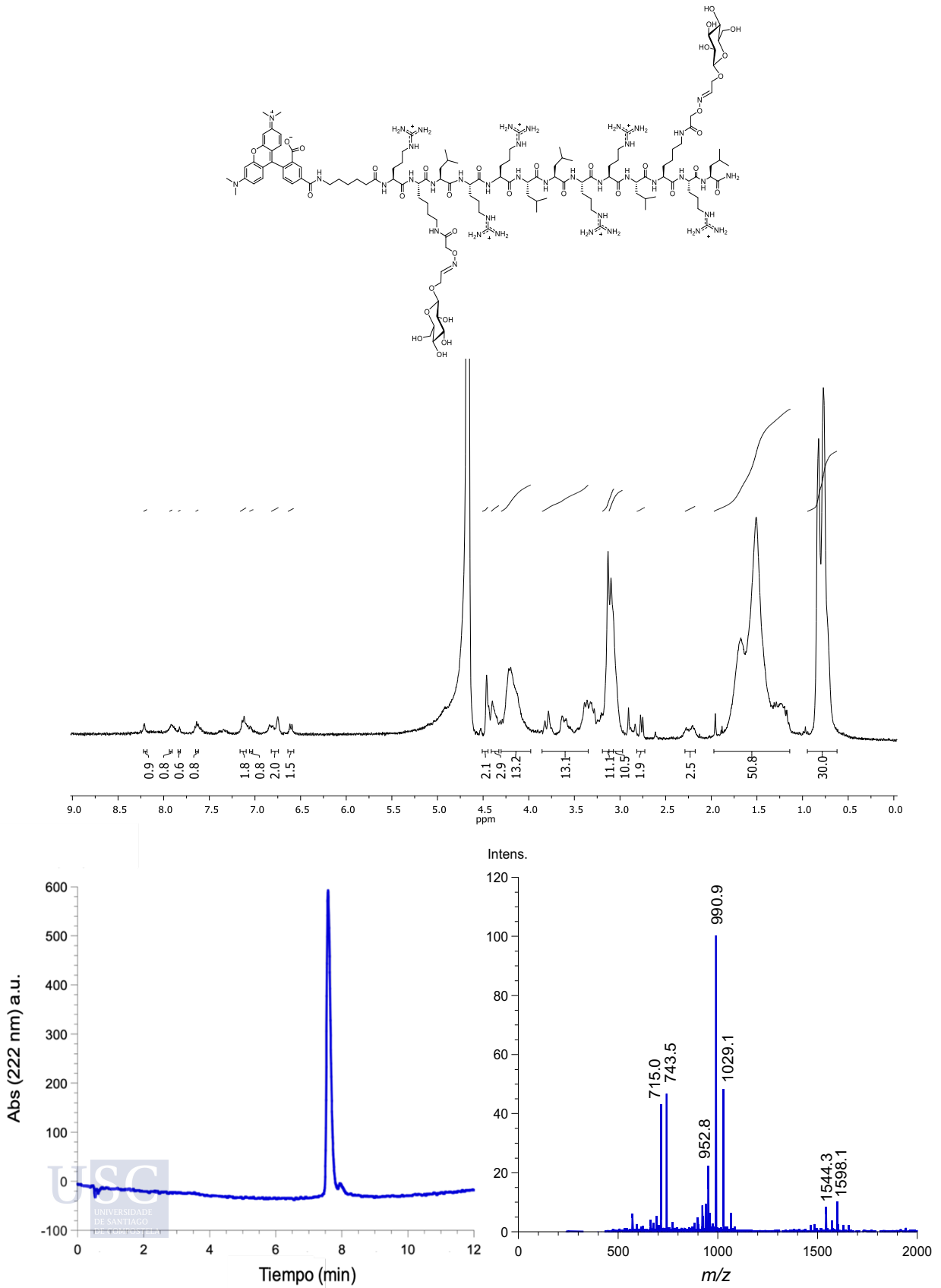


Figura SE10. Péptido Tmp(Glu)<sub>2</sub>: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O y HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>R</sub> 7,59 min.

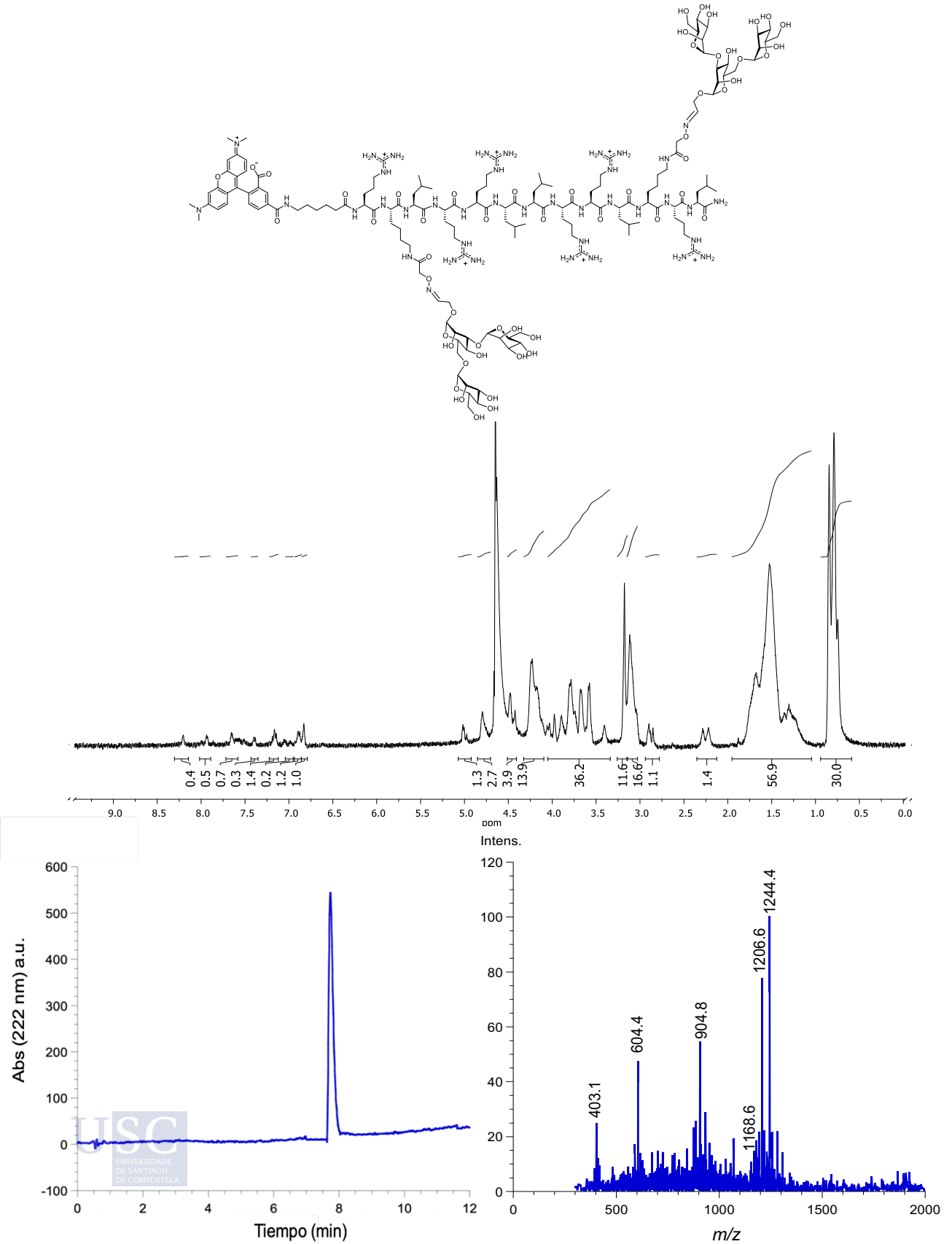


Figura SE11. Péptido TmP(Man)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O y HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>R</sub> 7,73 min.

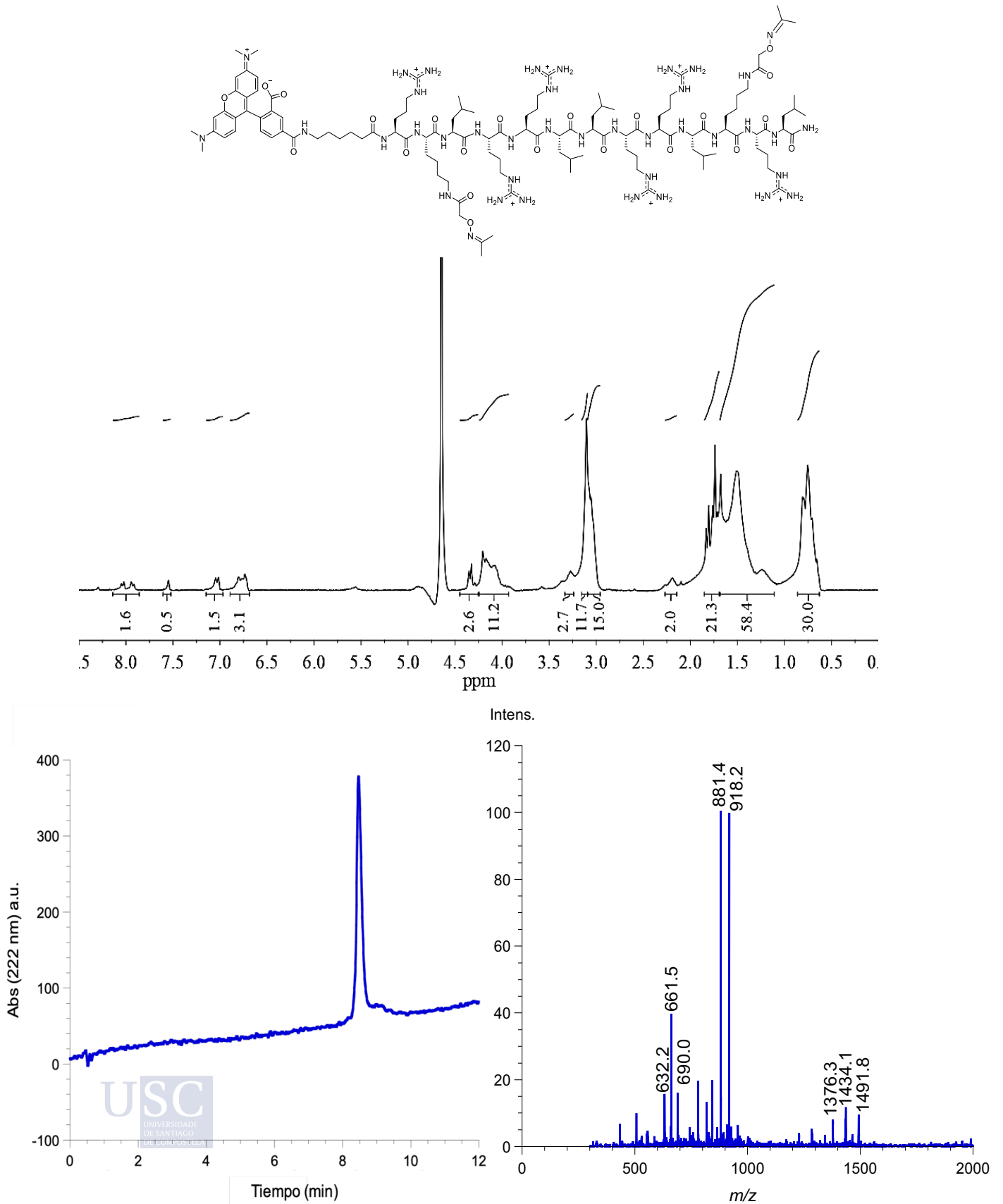


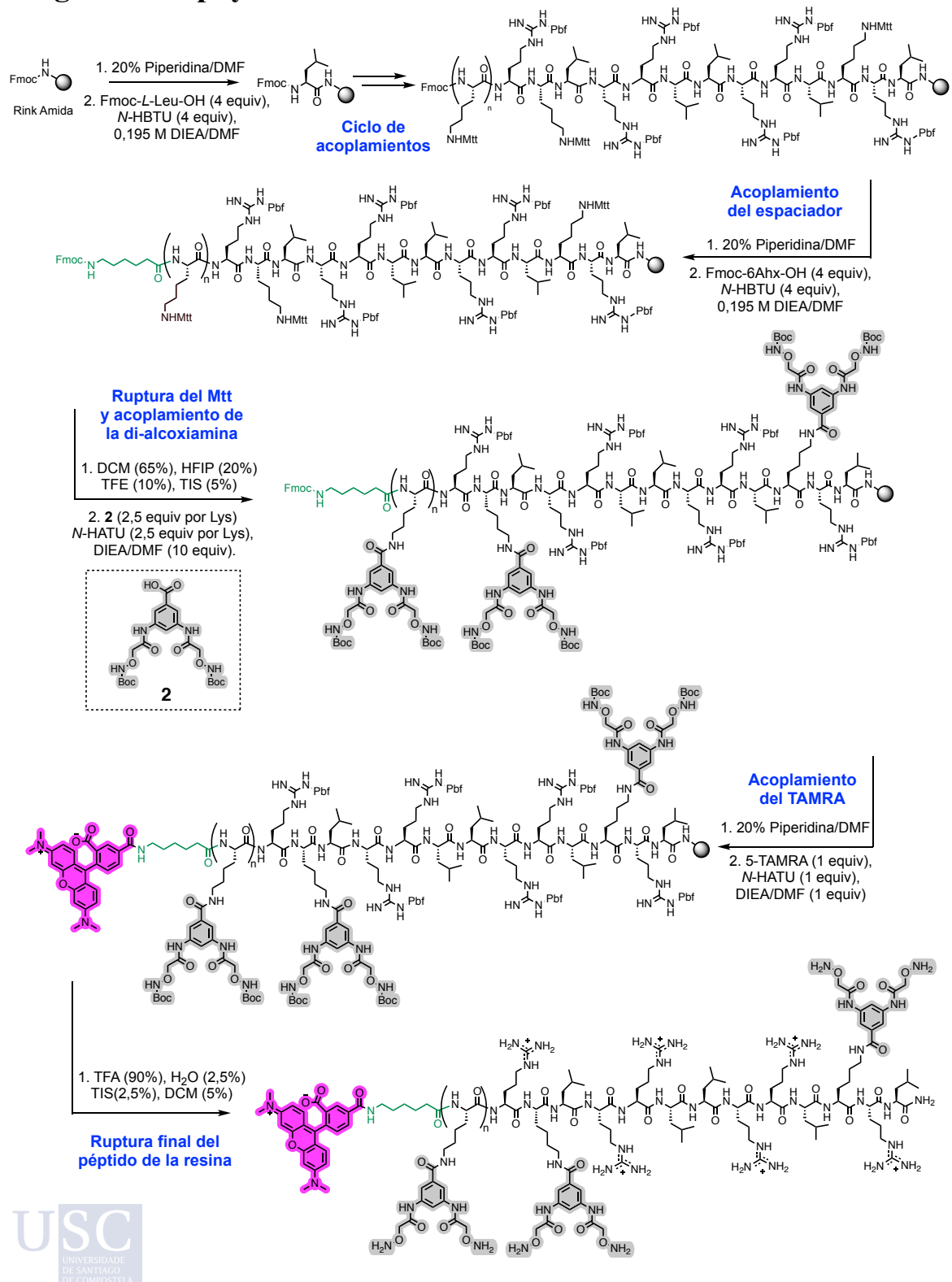
Figura SE12. Péptido TmP(Acetona)<sub>2</sub>: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O y HPLC-MS(EI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>R</sub> 8,21 min.



# Sección Experimental, Capítulo II



## 1. Figuras de apoyo



**Figura SE13.** Esquema sintético general para la síntesis de péptidos en fase sólida: con dos lisinas ( $n = 0$ ), secuencia peptídica:  $RK^*LRLLRRLK^*RL$ , estos péptidos serán los precursores de los glicopéptidos con fórmula  $TmP(X)_4$ , o con tres lisinas ( $n = 1$ ), secuencia peptídica:  $K^*RK^*LRLLRRLK^*RL$ , estos péptidos serán los precursores de los glicopéptidos con fórmula  $TmP(X)_6$ , ( $K^*$  = lisina post-modificada).



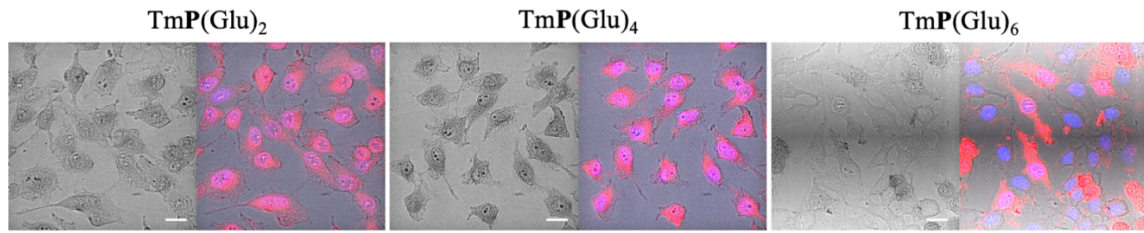


Figura SE16. Comportamiento de internalización a altas concentraciones (50  $\mu$ M). Los glicopéptidos que contienen 2, 4 o 6  $\beta$ -D-Glucosas se incubaron con células HeLa durante 30 minutos a 37°C. Barras escala: 25  $\mu$ m.

Tabla SE1. Análisis hematológico de la sangre de los ratones 3 h después de la administración i.v. de 50  $\mu$ g de los glicopéptidos TmP(X)<sub>6</sub> (X = Glu, Gal o Man) a un total de tres ratones y un ratón control con PBS. Para cada ratón, cada valor se midió por duplicado y se representa como la media  $\pm$  desviación estándar.

|  | PBS                  | TmP(Glu) <sub>6</sub> |                      |                      |                       | PBS                  | TmP(Gal) <sub>6</sub> |                       |                     |                        | PBS                   | TmP(Man) <sub>6</sub> |  |  |  |
|--|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|--|--|--|
| <b>Glóbulos blancos (10<sup>9</sup>/L)</b><br>[0,8-10,6] | 3,47<br>$\pm$ 0,02   | 5,89<br>$\pm$ 0,20    | 5,08<br>$\pm$ 0,19   | 4,42<br>$\pm$ 0,22   | 3,66<br>$\pm$ 0,62    | 3,64<br>$\pm$ 0,04   | 8,22<br>$\pm$ 0,23    | 12,15<br>$\pm$ 0,15   | 4,98<br>$\pm$ 0,26  | 6,21<br>$\pm$ 0,16     | 5,22<br>$\pm$ 0,13    | 5,85<br>$\pm$ 0,87    |  |  |  |
| <b>Neutrófilos (10<sup>9</sup>/L)</b><br>[0,23-3,6]      | 0,34<br>$\pm$ 0,04   | 1,69<br>$\pm$ 0,16    | 1,02<br>$\pm$ 0,07   | 1,28<br>$\pm$ 0,07   | 0,69<br>$\pm$ 0,06    | 1,59<br>$\pm$ 0,01   | 3,05<br>$\pm$ 0,24    | 3,62<br>$\pm$ 0       | 0,82<br>$\pm$ 0,13  | 1,85<br>$\pm$ 0        | 1,00<br>$\pm$ 0,05    | 1,23<br>$\pm$ 0,20    |  |  |  |
| <b>Linfocitos (10<sup>9</sup>/L)</b><br>[0,6-8,9]        | 2,92<br>$\pm$ 0,06   | 2,95<br>$\pm$ 0,1     | 3,01<br>$\pm$ 0,29   | 2,35<br>$\pm$ 0,21   | 2,64<br>$\pm$ 0,44    | 1,54<br>$\pm$ 0,10   | 4,02<br>$\pm$ 0,05    | 5,88<br>$\pm$ 0,13    | 3,95<br>$\pm$ 0,14  | 3,92<br>$\pm$ 0,07     | 3,80<br>$\pm$ 0,04    | 4,13<br>$\pm$ 0,57    |  |  |  |
| <b>Monocitos (10<sup>9</sup>/L)</b><br>[0,04-1,4]        | 0,18<br>$\pm$ 0,07   | 1,20<br>$\pm$ 0,06    | 0,93<br>$\pm$ 0,16   | 0,74<br>$\pm$ 0,08   | 0,28<br>$\pm$ 0,08    | 0,47<br>$\pm$ 0,06   | 1,09<br>$\pm$ 0,04    | 2,62<br>$\pm$ 0,01    | 0,15<br>$\pm$ 0     | 0,39<br>$\pm$ 0,05     | 0,39<br>$\pm$ 0,02    | 0,41<br>$\pm$ 0,08    |  |  |  |
| <b>Eosinófilos (10<sup>9</sup>/L)</b><br>[0-0,51]        | 0,03<br>$\pm$ 0      | 0,04<br>$\pm$ 0       | 0,11<br>$\pm$ 0,01   | 0,04<br>$\pm$ 0      | 0,06<br>$\pm$ 0,04    | 0,05<br>$\pm$ 0,01   | 0,07<br>$\pm$ 0,01    | 0,03<br>$\pm$ 0       | 0,07<br>$\pm$ 0,02  | 0,06<br>$\pm$ 0,03     | 0,04<br>$\pm$ 0,01    | 0,08<br>$\pm$ 0       |  |  |  |
| <b>Basófilos (10<sup>9</sup>/L)</b><br>[0-0,12]          | 0,00<br>$\pm$ 0      | 0,01<br>$\pm$ 0       | 0,005<br>$\pm$ 0,01  | 0,005<br>$\pm$ 0,01  | 0,00<br>$\pm$ 0       | 0,00<br>$\pm$ 0      | 0,00<br>$\pm$ 0       | 0,005<br>$\pm$ 0,01   | 0,00<br>$\pm$ 0     | 0,00<br>$\pm$ 0        | 0,01<br>$\pm$ 0       | 0,01<br>$\pm$ 0       |  |  |  |
| <b>Glóbulos rojos (10<sup>12</sup>/L)</b><br>[6,5-11,5]  | 10,10<br>$\pm$ 0,16  | 9,48<br>$\pm$ 0,08    | 10,56<br>$\pm$ 0,23  | 9,42<br>$\pm$ 0,20   | 8,98<br>$\pm$ 1,21    | 7,98<br>$\pm$ 0,16   | 8,94<br>$\pm$ 0,08    | 9,94<br>$\pm$ 0,23    | 10,01<br>$\pm$ 0,16 | 10,18<br>$\pm$ 0,21    | 11,00<br>$\pm$ 0,11   | 11,51<br>$\pm$ 0,63   |  |  |  |
| <b>Hemoglobina (g/dL)</b><br>[11,0-16,5]                 | 14,8<br>$\pm$ 0      | 15,2<br>$\pm$ 0,07    | 16,8<br>$\pm$ 0,21   | 14,7<br>$\pm$ 0,14   | 14,0<br>$\pm$ 1,98    | 12,1<br>$\pm$ 0,07   | 13,6<br>$\pm$ 0       | 14,0<br>$\pm$ 0       | 15,4<br>$\pm$ 0,71  | 14,6<br>$\pm$ 0,71     | 16,1<br>$\pm$ 0       | 15,3<br>$\pm$ 7,07    |  |  |  |
| <b>Plaquetas (10<sup>9</sup>/L)</b><br>[400-1600]        | 483,0<br>$\pm$ 33,94 | 1067,5<br>$\pm$ 13,44 | 1071,5<br>$\pm$ 0,71 | 1005,5<br>$\pm$ 4,95 | 887,0<br>$\pm$ 144,25 | 915,5<br>$\pm$ 28,99 | 1301,0<br>$\pm$ 4,24  | 1607,5<br>$\pm$ 20,51 | 489,0<br>$\pm$ 9,89 | 1551,5<br>$\pm$ 113,84 | 1425,0<br>$\pm$ 15,56 | 1556,5<br>$\pm$ 36,06 |  |  |  |

Tabla SE2. Análisis bioquímico de la sangre de los ratones 3 h después de la administración i.v. de 50  $\mu$ g de los glicopéptidos TmP(X)<sub>6</sub> (X = Glu, Gal o Man) a un total de tres ratones y un ratón control con PBS. Para cada ratón, cada valor se midió por duplicado y se representa como la media  $\pm$  desviación estándar.

|   | PBS               | TmP(Glu) <sub>6</sub> |                  |                  |                   | PBS               | TmP(Gal) <sub>6</sub> |                   |                   |                   | PBS               | TmP(Man) <sub>6</sub> |  |  |  |
|---|-------------------|-----------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|--|--|--|
| <b>Albúmina (g/dL)</b>                        | 5,2<br>$\pm$ 0,1  | 5,0<br>$\pm$ 0,1      | 5,1<br>$\pm$ 0,3 | 5,1<br>$\pm$ 0,3 | 4,2<br>$\pm$ 0,1  | 4,0<br>$\pm$ 0,1  | 4,4<br>$\pm$ 0,1      | 4,4<br>$\pm$ 0,1  | 4,5<br>$\pm$ 0,5  | 5,1<br>$\pm$ 0,6  | 4,6<br>$\pm$ 0,1  | 5,1<br>$\pm$ 0,4      |  |  |  |
| <b>Fosfatasa alcalina (U/L)</b>               | 110<br>$\pm$ 4    | 77<br>$\pm$ 5         | 126<br>$\pm$ 3   | 110<br>$\pm$ 6   | 109<br>$\pm$ 8    | 110<br>$\pm$ 11   | 190<br>$\pm$ 5        | 101<br>$\pm$ 6    | 112<br>$\pm$ 4    | 140<br>$\pm$ 6    | 152<br>$\pm$ 2    | 163<br>$\pm$ 7        |  |  |  |
| <b>Alanina aminotransferasa (U/L)</b>         | 56<br>$\pm$ 6     | 52<br>$\pm$ 9         | 85<br>$\pm$ 13   | 64<br>$\pm$ 3    | 48<br>$\pm$ 6     | 42<br>$\pm$ 9     | 69<br>$\pm$ 13        | 47<br>$\pm$ 3     | 65<br>$\pm$ 3     | 75<br>$\pm$ 2     | 59<br>$\pm$ 2     | 62<br>$\pm$ 6         |  |  |  |
| <b>Amilasa (U/L)</b>                          | 924<br>$\pm$ 16   | 1060<br>$\pm$ 25      | 1043<br>$\pm$ 33 | 1097<br>$\pm$ 41 | 1071<br>$\pm$ 12  | 1190<br>$\pm$ 13  | 1045<br>$\pm$ 21      | 1611<br>$\pm$ 9   | 1113<br>$\pm$ 8   | 1170<br>$\pm$ 15  | 1248<br>$\pm$ 27  | 1189<br>$\pm$ 23      |  |  |  |
| <b>Total Bilirrubina (mg/dL)</b>              | 0,3<br>$\pm$ 0,1  | 0,3<br>$\pm$ 0        | 0,3<br>$\pm$ 0,1 | 0,3<br>$\pm$ 0   | 0,3<br>$\pm$ 0,1  | 0,3<br>$\pm$ 0    | 0,4<br>$\pm$ 0        | 0,3<br>$\pm$ 0    | 0,3<br>$\pm$ 0    | 0,3<br>$\pm$ 0    | 0,3<br>$\pm$ 0    | 0,3<br>$\pm$ 0        |  |  |  |
| <b>N<sub>2</sub> ureico en sangre (mg/dL)</b> | 21<br>$\pm$ 2     | 19<br>$\pm$ 4         | 21<br>$\pm$ 1    | 22<br>$\pm$ 3    | 25<br>$\pm$ 0     | 23<br>$\pm$ 1     | 19<br>$\pm$ 6         | 23<br>$\pm$ 3     | 18<br>$\pm$ 3     | 18<br>$\pm$ 1     | 19<br>$\pm$ 6     | 18<br>$\pm$ 2         |  |  |  |
| <b>Total proteína (g/dL)</b>                  | 6,1<br>$\pm$ 0,6  | 6,3<br>$\pm$ 0,7      | 6,5<br>$\pm$ 0,3 | 6,4<br>$\pm$ 0,2 | 5,3<br>$\pm$ 0,5  | 5,1<br>$\pm$ 0    | 5,4<br>$\pm$ 0        | 5,6<br>$\pm$ 0    | 5,6<br>$\pm$ 0,7  | 6,6<br>$\pm$ 0,3  | 5,9<br>$\pm$ 0,6  | 6,4<br>$\pm$ 0,2      |  |  |  |
| <b>Globulina (g/dL)</b>                       | 0,9<br>$\pm$ 0,2  | 1,3<br>$\pm$ 0,3      | 1,4<br>$\pm$ 0,1 | 1,2<br>$\pm$ 0   | 1,1<br>$\pm$ 0,1  | 1,1<br>$\pm$ 0,1  | 1,0<br>$\pm$ 0,1      | 1,2<br>$\pm$ 0    | 1,1<br>$\pm$ 0,1  | 1,4<br>$\pm$ 0    | 1,3<br>$\pm$ 0    | 1,3<br>$\pm$ 0        |  |  |  |
| <b>Calcio (mg/dL)</b>                         | 12,8<br>$\pm$ 1,7 | 13,5<br>$\pm$ 0       | 14,6<br>$\pm$ 0  | 13,8<br>$\pm$ 0  | 11,5<br>$\pm$ 0,2 | 11,0<br>$\pm$ 0,5 | 11,3<br>$\pm$ 0,1     | 11,8<br>$\pm$ 0,3 | 12,8<br>$\pm$ 0,5 | 13,5<br>$\pm$ 0,9 | 12,6<br>$\pm$ 0,4 | 13,1<br>$\pm$ 1,1     |  |  |  |
| <b>Na<sup>+</sup> (mmol/dL)</b>               | 149<br>$\pm$ 2    | 154<br>$\pm$ 3        | 153<br>$\pm$ 0   | 156<br>$\pm$ 1   | 153<br>$\pm$ 2    | 156<br>$\pm$ 5    | 154<br>$\pm$ 4        | 160<br>$\pm$ 5    | 153<br>$\pm$ 1    | 156<br>$\pm$ 1    | 155<br>$\pm$ 0    | 158<br>$\pm$ 2        |  |  |  |
| <b>K<sup>+</sup> (mmol/dL)</b>                | 8,1<br>$\pm$ 0,1  | 8,0<br>$\pm$ 0,4      | 8,2<br>$\pm$ 0   | 8,5<br>$\pm$ 0,2 | 8,5<br>$\pm$ 0,2  | 8,5<br>$\pm$ 0    | 8,5<br>$\pm$ 0        | 8,5<br>$\pm$ 0    | 8,5<br>$\pm$ 0,5  | 8,5<br>$\pm$ 0,3  | 8,6<br>$\pm$ 0    | 8,1<br>$\pm$ 0,4      |  |  |  |

## 2. Materiales, instrumentación y métodos

Abreviaciones peptídicas: TmP(X)<sub>Z</sub> (Tm = TAMRA, X = Glu, Gal o Man y Z= 2, 4 o 6). Fmoc-Rink Amide resin, *N*-HBTU y Fmoc-*L*-Lys(Mtt)-OH fueron obtenidos comercialmente a través Iris Biotech GmbH. *N*-HATU se adquirió a Glentham life sciences. (Boc-aminoxy)acetic acid se compró a TCI Chemicals. Fmoc-*L*-Leu-OH, Fmoc-*L*-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-6Ahx-OH, DMEM, FBS, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), Lithium hydroxide y Heparin sodium salt fueron adquiridos a Sigma-Aldrich®. 5-Carboxytetramethyl rhodamine fue comprado a Carbosynth. Hoechst 33342 Trihydrochloride Trihydrate se obtuvo en ThermoFisher. El Methyl 3,5-diaminobenzoate se adquirió a Alfa Aesar. Gibco™ Penicillin-Streptomycin-Glutamine se adquirió a Fisher scientific. 96-well Glass Bottom Black Plate (P96-1.5H-N) fueron adquiridas a Cellvis. Los disolventes deuterados (D<sub>2</sub>O, CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>) se adquirieron a EMD Millipore Corporation. *N,N*-Dimethylformamide y TFA para la síntesis de péptidos fue comprada a Scharlau. Todos los demás disolventes son de grado HPLC, comprados a Sigma-Aldrich® o Fisher Scientific® y fueron utilizados sin ninguna purificación adicional.

Se empleó la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la purificación de los compuestos, utilizando un JASCO LC-4000 con una columna de fase reversa Agilent Eclipse XDB-C18, 9.4x250 mm para la purificación semipreparativa utilizando un gradiente de 95:5→5:95 (0→35 min) H<sub>2</sub>O (0.1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0.1% TFA).

El análisis mediante cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrómetro de masas (HPLC-MS) se llevó a cabo en un Agilent Technologies 1260 Infinity II asociado a un 6120 Quadrupole LC-MS utilizando una columna Agilent SB-C18 con un gradiente de 95:5→5:95 (0→12 min) H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA). Las determinaciones de masas exactas (HRMS) empleando un ESI-MS se realizaron en un espectrómetro de masas Bruker MicroTof o en un Sciex QSTAR Pulsar y se notifican como relación masa por carga (*m/z*).

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Varian Mercury (300 MHz para <sup>1</sup>H y 75 MHz para <sup>13</sup>C) y o en un Bruker AMX (500 MHz para <sup>1</sup>H y 125 MHz para <sup>13</sup>C). Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm ( $\delta$ ) referidos a las siguientes señales de disolventes:  $\delta$ H D<sub>2</sub>O 4,79, CD<sub>3</sub>OD, 3,31 o CDCl<sub>3</sub> 7,26. Las multiplicidades de espín se reportan como un singlete (s), doblete (d), triplete (t), doblete de dobletes (dd) con constantes de acoplamiento (*J*) dadas en Hz, o múltiplete (m).

El cálculo de las concentraciones de péptidos etiquetados se realizó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS Biochrom Libra S60.

Las mediciones del dicroísmo circular (CD) se realizaron con un espectrómetro CD Jasco J-1100 equipado con un Jasco MCB-100 Mini Circulation Bath para el control de temperatura.

Las células se mantuvieron en un incubador INCO 108 (Mettler). Las imágenes de microscopía celular se adquirieron con un microscopio Dragonfly confocal spinning-disk en un Nikon Eclipse Ti-E equipado con una cámara digital Andor Sona sCMOS. Las imágenes fueron analizadas con Fiji.<sup>363</sup>

Los resultados del ensayo de viabilidad celular MTT se midieron en un lector de microplacas Infinite F200pro, Tecan.

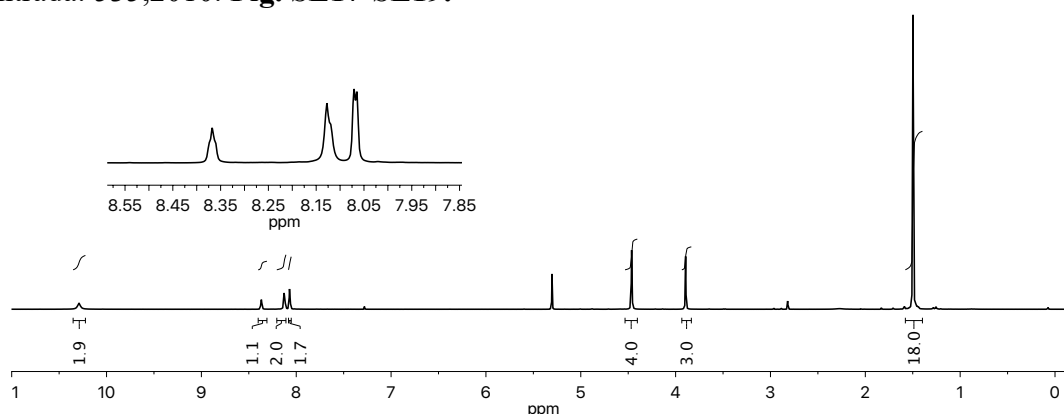
Se empleó para los experimentos de citometría de flujo un citómetro Guava EasyCyte™ (EMD Millipore), los datos fueron analizados con el software InCyte incluido en GuavaSoft 3.2 (Millipore).

En los ensayos con modelos de ratón se empleó un sistema de imagen “*in vivo*” IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences, Alameda, USA) y se cuantificaron con el software Image (Caliper Life Sciences).

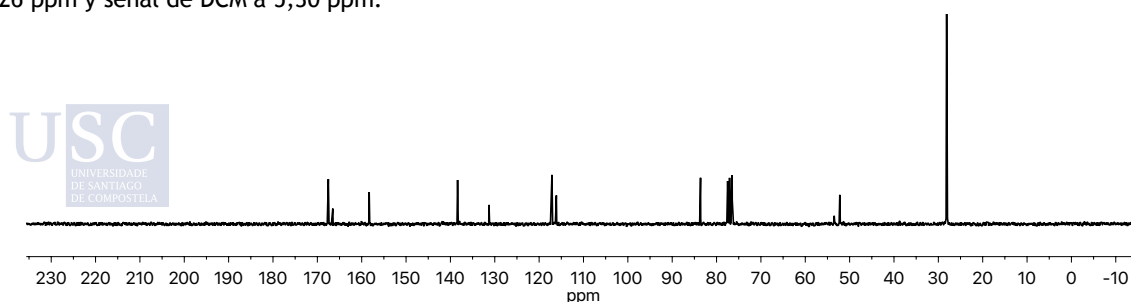
### 3. Síntesis y caracterización del conector di-alcoxiamina

#### 3.1 Compuesto 14

Siguiendo el esquema sintético de la **Fig. SE15**, el reactivo de partida comercial methyl 3,5-diaminobenzoate (100 mg, 0,6 mmol, 1 equiv) en DMF se hizo reaccionar con una mezcla preactivada de la alcoxiamina **1** (287 mg, 1,5 mmol, 2,5 equiv), *N*-HATU (570 mg, 1,5 mmol, 2,5 equiv) y DIEA (257  $\mu$ L, 1,5 mmol, 2,5 equiv) en DFM (10 mL) durante 1h. A continuación, se eliminó el exceso de DMF por evaporación en el rotavapor y el aceite obtenido se secó bajo alto vacío. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (40:60 AcOEt/Hexano) proporcionando el compuesto **14**. Rendimiento: 181 mg (59%).  $R_f = 0,68$  (80:20 AcOEt:Hex).  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) 10,29 (s, 2H), 8,37 (t,  $J = 2,0$  Hz, 1H), 8,12 (m, 2H), 8,07 (d,  $J = 1,9$  Hz, 2H), 4,46 (s, 4H), 3,89 (s, 3H), 1,50 (s, 18H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) 167,5 (HNCO), 166,5 (COO), 158,3 (HNCOO), 138,4 ( $\text{C}_{q-3,5}$ ), 131,3 ( $\text{C}_{q-1}$ ), 117,1 ( $\text{C}_{sp^2_4}$ ), 116,1 ( $\text{C}_{sp^2_{2,5}}$ ), 83,6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 77,6 ( $\text{CH}_2$ ), 52,22 ( $\text{COOCH}_3$ ), 28,1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ). **135-DEPT** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) 117,1 ( $\text{C}_{sp^2_4}$ ), 116,1 ( $\text{C}_{sp^2_{2,5}}$ ), 76,5 ( $\text{CH}_2$ ), 52,2 ( $\text{COOCH}_3$ ), 28,1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ). **HRMS** (ESI): Calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{Na}$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ): 535,2011; encontrada: 535,2010. **Fig. SE17-SE19**.



**Figura SE17.** Compuesto **14**: Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  en  $\text{CDCl}_3$ , señales de los disolventes: pico residual de  $\text{CDCl}_3$  a 7,26 ppm y señal de DCM a 5,30 ppm.



**Figura SE18.** Compuesto **14**: Espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  en  $\text{CDCl}_3$ , señal del disolvente: pico de  $\text{CDCl}_3$  a 77.1 ppm.

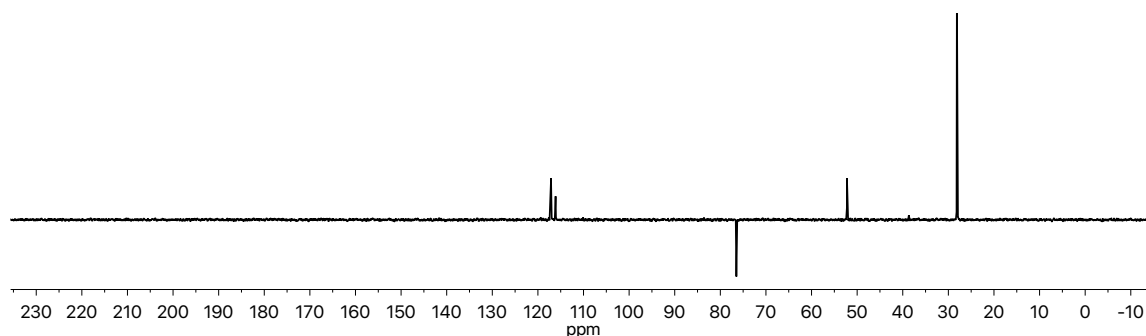


Figura SE19. Compuesto 14: Espectro 135-DEPT en  $\text{CDCl}_3$ ,  $-\text{CH}_3$  y  $-\text{CH}$  ( $\uparrow$ ),  $-\text{CH}_2$  ( $\downarrow$ ).

### 3.2 Compuesto 2

El compuesto **2** se obtuvo tras la desprotección del éster metílico de 180 mg del compuesto **14** por tratamiento con LiOH (20 mg) en  $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$  (1:1, 10 mL). La reacción se agitó magnéticamente durante 2h a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo el THF se evaporó en el rotavapor. La disolución acuosa restante se acidificó con HCl (5%) hasta un pH=3-4 observando la aparición de un precipitado blanco correspondiente al compuesto **2**. El producto final se extrajo a la fase orgánica con DCM (3x15 mL), se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtró y se concentró al rotavapor. Rendimiento: 110 mg (63%).  $R_f = 0,25$  (80:20 AcOEt:Hex).  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ )  $\delta$  10,60 (s, 1H), 8,40 (t,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 8,12 (d,  $J = 1,9$  Hz, 2H), 4,43 (s, 4H), 1,52 (s, 18H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ )  $\delta$  172,5 (HNCO), 171,5 (COOH), 162,9 (HNCOO), 142,4 ( $\text{C}_{q-3,5}$ ), 135,8 ( $\text{C}_{q-1}$ ), 120,7 ( $\text{C}_{\text{sp}^2_4}$ ), 119,3 ( $\text{C}_{\text{sp}^2_{2,5}}$ ), 86,0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 79,5 ( $\text{CH}_2$ ), 31,1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ). **135-DEPT** (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) 117,8 ( $\text{C}_{\text{sp}^2_4}$ ), 115,9 ( $\text{C}_{\text{sp}^2_{2,5}}$ ), 76,4 ( $\text{CH}_2$ ), 28,3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ). **HRMS** (ESI): Calculada para  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{Na}$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ): 521,1854; encontrada: 521,1854. **Fig. SE20-SE22.**

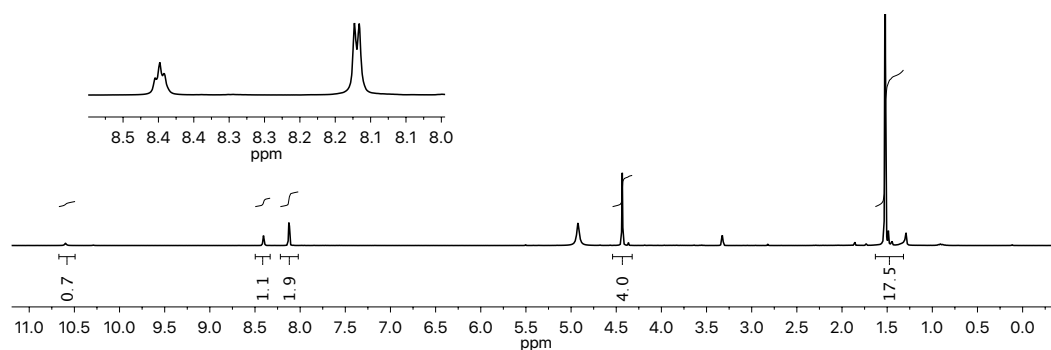


Figura SE20. Compuesto 2: Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , señales de los disolventes: pico residual de  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 3,31 ppm y señal de  $\text{H}_2\text{O}$  a 4,87 ppm.

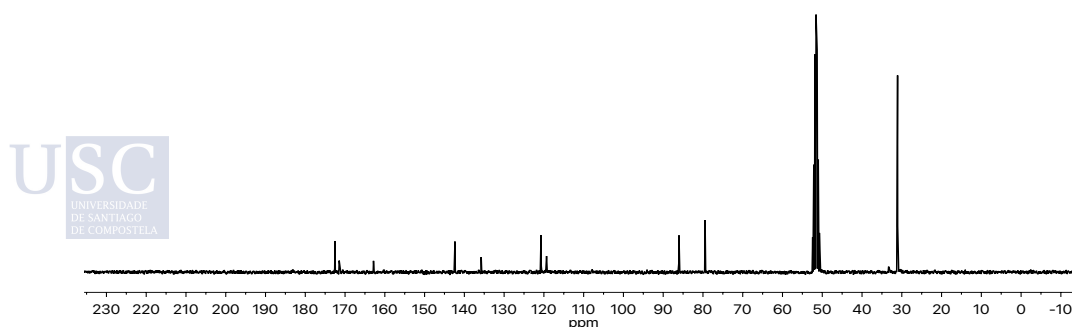


Figura SE21. Compuesto 2: Espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , señal del disolvente: pico de  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 49.0 ppm.

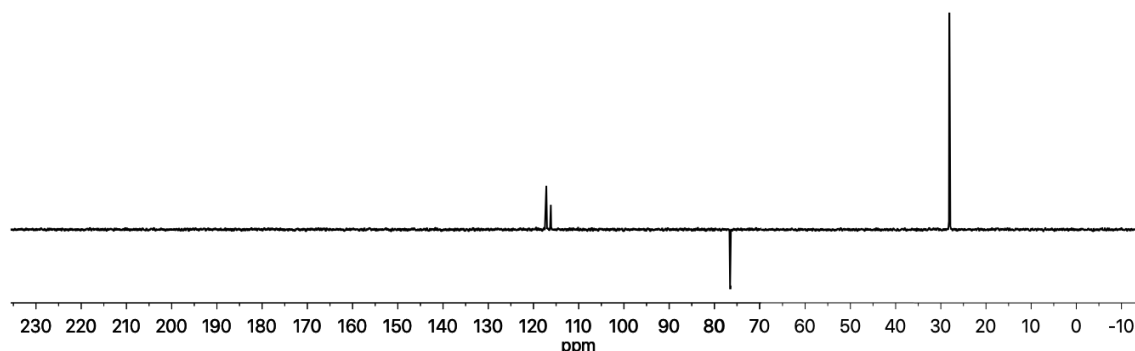


Figura SE22. Compuesto 2: Espectro 135-DEPT en CD<sub>3</sub>OD, -CH<sub>3</sub> y -CH (↑), -CH<sub>2</sub> (↓).

## 4. Síntesis peptídica

### 4.1 Protocolos generales

**Protocolo general para el acoplamiento de los aminoácidos:** Todos los péptidos fueron sintetizados manualmente a través de la síntesis de péptidos en fase sólida mediante el método Fmoc, utilizando la resina Fmoc-Rink Amida (con una carga de 0,19 mmol/g). 0,05 mmol de resina se hincharon en DMF (2 mL, 20 min) en un reactor de fase sólida antes de comenzar la síntesis. El ciclo de acoplamiento consistió en la eliminación del grupo protector Fmoc con una disolución de piperidina en DMF (20%, 2 mL, 20 min), seguidamente, la mezcla se filtró y la resina se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min). Los acoplamientos de los respectivos aminoácidos se realizaron mediante el tratamiento con una disolución de  $\alpha$ -aminoácidos (4 equiv), *N*-HBTU (4 equiv) en DMF (2 mL), que se mezcló con DIEA (0,195 M en DMF, 1,2 equiv) 1 min antes de la adición. La mezcla resultante se agitó mediante el burbujeo de Ar durante 20 min. Finalmente, la resina se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min). La eficiencia de cada acoplamiento se siguió empleando el test TNBS.

**Protocolo de terminación del péptido:** Una vez finalizada la secuencia peptídica lineal, el protocolo de terminación empleado es el acoplamiento del “espaciador”. Tras la eliminación del grupo Fmoc del último aminoácido acoplado mediante piperidina/DMF (20%, 2 mL, 20 min), el péptido lineal fue tratado con una solución de ácido *N*-Fmoc-6-aminohexanoico (4 equiv), *N*-HBTU (4 equiv) y DIEA (0,195 M en DMF, 1,2 equiv) en DMF. La mezcla resultante se agitó mediante burbujeo de Ar durante 15 min. Finalmente, la mezcla se filtró y la resina se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min).

**Protocolo general para la incorporación del conector di-alcoxiamina:** La resina se solvató con DCM (3x2 mL, 5 min), y el grupo protector de Mtt se eliminó selectivamente mediante la agitación mecánica con una mezcla de DCM/HFIP/TFE/TIS (65/20/10/5%, 3x2 mL, 2h cada ciclo). Entre cada ciclo la mezcla se lavó con DCM (3x2 mL, 1 min). Después del último ciclo, la mezcla se filtró y la resina se lavó con DCM (3x2 mL, 1 min) y DMF (3x2 mL, 5 min). A continuación, se añadió a la resina una disolución pre-activada del enlazador di-alcoxiamina (Compuesto 2, 2,5 equiv por amina libre), *N*-HATU (2,5 equiv) y DIEA (10 equiv) en DMF (2 mL). La resina se agitó mediante burbujeo de Ar durante 45 min y finalmente se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min) y DCM (3x2 mL, 1 min).

**Protocolo general para el marcaje fluorescente:** Después de solvatar la resina con DMF, el grupo protector Fmoc del espaciador previamente adherido se eliminó utilizando una solución de piperidina en DMF (20%, 2 mL, 20 min) y la resina se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min). El acoplamiento se llevó a cabo mediante la adición de una disolución de 5-TAMRA (1 equiv), *N*-HATU (1 equiv) y DIEA (1 equiv) en DMF (2 mL) y la mezcla se agitó mediante burbujeo de Ar durante 2h. La suspensión se filtró y la resina se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min) y DCM (3x2 mL, 1 min). Finalmente, la resina se secó a vacío.

**Protocolo general para el desanclaje final del péptido:** Los péptidos se desprotegeron y se separaron de la resina por un protocolo estándar en TFA a temperatura ambiente utilizando TFA/DCM/H<sub>2</sub>O/TIS (90/5/2,5/2,5%, 3 mL, 2h). Posteriormente, la mezcla se filtró, se lavó con TFA (1 mL) y el péptido se precipitó mediante el vertido de la mezcla sobre Et<sub>2</sub>O (25 mL) enfriado a 0°C. El precipitado resultante se centrifugó y se disolvió en H<sub>2</sub>O (3-5 mL). A continuación, la estructura peptídica se purificó mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→35 min)], las fracciones recogidas se concentraron y se trataron con diferentes ligandos carbohidrato.

**Protocolo general para el acoplamiento de los ligandos carbohidrato:** Una disolución del péptido en H<sub>2</sub>O (5 mM) se hizo reaccionar con una disolución de los correspondientes ligandos de aldehído (2 equiv por alcoxiamina) en H<sub>2</sub>O (120 mM) durante 5 min. A continuación, los péptidos fueron purificados por HPLC de fase reversa para eliminar el exceso de ligando [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA), 95:5→5:95 (0→35 min)], las fracciones recogidas fueron concentradas, liofilizadas y almacenadas a -20°C. La pureza y la identidad fueron confirmadas por HPLC-MS(ESI), <sup>1</sup>H-RMN y HRMS.

## 4.2 Péptido TmP(Glu)<sub>4</sub>

Siguiendo el protocolo general para la SPPS de un péptido marcado fluorescentemente con 5-TAMRA que contiene cuatro β-D-glucosas, TmP(Glu)<sub>4</sub> se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido rosa esponjoso, 14 mg (8% y 99% de pureza). Fue caracterizado en un HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min)], t<sub>R</sub> 7,44 min. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 8,28-8,19 (m, 1H), 7,99-7,96 (m, 1H), 7,84-7,75 (m, 1H), 7,76-7,66 (m, 4H), 7,57-7,49 (m, 2H), 7,46-7,41 (m, 1H), 7,43-7,35 (m, 1H), 7,17-7,09 (m, 1H), 7,13-7,06 (m, 1H), 7,08-7,00 (m, 2H), 6,79-6,67 (m, 1H), 6,59-6,52 (m, 4H), 4,39-4,01 (m, 13H), 3,86-3,76 (m, 8H), 3,65 (s, 8H), 3,55-3,19 (m, 24H), 3,13 (s, 12H), 3,10-2,99 (m, 18H), 2,32 (t, *J* = 7,4 Hz 2H), 1,81-1,14 (m, 57H), 0,88-0,72 (m, 30H). MS (ESI, H<sub>2</sub>O): 1954,1 (7, [M+2H+2TFA]<sup>2+</sup>), 1303,6 (55, [M+3H+2TFA]<sup>3+</sup>), 1265,1 (100, [M+3H+TFA]<sup>3+</sup>), 1226,7 (21, [M+3H]<sup>3+</sup>), 949,2 (95, [M+4H+TFA]<sup>4+</sup>), 920,7 (20, [M+4H]<sup>4+</sup>), 736,7 (25, [M+5H]<sup>5+</sup>). HRMS (ESI): Calculada para C<sub>163</sub>H<sub>260</sub>N<sub>45</sub>O<sub>52</sub> ([M+3H]<sup>3+</sup>): 1226,6356; encontrada: 1226,6355. **Fig. SE23.**

## 4.3 Péptido TmP(Gal)<sub>4</sub>

Siguiendo el protocolo general para la SPPS de un péptido marcado fluorescentemente con 5-TAMRA que contiene cuatro β-D-galactosas, TmP(Gal)<sub>4</sub> se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido rosa esponjoso, 16 mg (9% y 98% de pureza). Fue caracterizado mediante

HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min)], *t<sub>R</sub>* 7,50 min. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 8,28-8,21 (m, 1H), 7,99-7,91 (m, 1H), 7,83-7,76 (m, 1H), 7,74-7,66 (m, 4H), 7,54-7,45 (m, 1H), 7,49-7,38 (m, 1H), 7,43-7,37 (m, 1H), 7,13-7,10 (m, 1H), 7,11-7,08 (m, 1H), 7,08-6,95 (m, 2H), 6,78-6,61 (m, 1H), 6,60-6,49 (m, 4H), 4,46-3,94 (m, 13H), 3,89-3,71 (m, 8H), 3,64 (s, 8H), 3,54-3,19 (m, 24H), 3,12 (s, 12H), 3,11-2,89 (m, 18H), 2,37-2,29 (m, 2H), 1,92-1,13 (m, 57H), 0,91-0,70 (m, 30H). **MS** (ESI, H<sub>2</sub>O): 1303,3 (50, [M+3H+2TFA]<sup>+3</sup>), 1265,3 (78, [M+3H+TFA]<sup>+3</sup>), 1226,9 (32, [M+3H]<sup>+3</sup>), 949,2 (100, [M+4H+TFA]<sup>+4</sup>), 920,2 (33, [M+4H]<sup>+4</sup>), 736,5 (40, [M+5H]<sup>+5</sup>). **HRMS** (ESI): Calculada para C<sub>163</sub>H<sub>260</sub>N<sub>45</sub>O<sub>52</sub> ([M+3H]<sup>+3</sup>): 1226,6356; encontrada: 1226,6353. **Fig. SE24.**

#### 4.4 Péptido TmP(Man)<sub>4</sub>

Siguiendo el protocolo general para la SPPS de un péptido marcado fluorescentemente con 5-TAMRA que contiene cuatro α-D-manosas, TmP(Man)<sub>4</sub> se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido rosa esponjoso, 11 mg (6% y 99% de pureza). Fue caracterizado mediante HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min)], *t<sub>R</sub>* 7,46 min. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 8,25-8,17 (m, 1H), 7,94 (dd, *J* = 7,4, 1,3 Hz, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,72-7,64 (m, 4H), 7,54-7,43 (m, 1H), 7,45-7,36 (m, 1H), 7,38-7,34 (m, 1H), 7,13-7,06 (m, 1H), 7,11-7,04 (m, 1H), 7,06-6,98 (m, 2H), 6,77-6,67 (m, 1,7 Hz, 1H), 6,58-6,49 (m, 4H), 4,46-3,97 (m, 13H), 3,89-3,68 (m, 8H), 3,62 (s, 8H), 3,51-3,16 (m, 24H), 3,11 (s, 6H), 3,09 (s, 6H), 3,07-2,97 (m, 18H), 2,31 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 1,81-1,18 (m, 57H), 0,86-0,68 (m, 30H). **MS** (ESI, H<sub>2</sub>O): 1303,2 (78, [M+3H+2TFA]<sup>+3</sup>), 1265,1 (100, [M+3H+TFA]<sup>+3</sup>), 1227,3 (29, [M+3H]<sup>+3</sup>), 949,0 (86, [M+4H+TFA]<sup>+4</sup>), 920,6 (31, [M+4H]<sup>+4</sup>), 736,8 (20, [M+5H]<sup>+5</sup>). **HRMS** (ESI): Calculada para C<sub>163</sub>H<sub>260</sub>N<sub>45</sub>O<sub>52</sub> ([M+3H]<sup>+3</sup>): 1226,6356; encontrada: 1226,6353. **Fig. SE25.**

#### 4.5 Péptido TmP(Glu)<sub>6</sub>

Siguiendo el protocolo general para la SPPS de un péptido marcado fluorescentemente con 5-TAMRA que contiene seis β-D-glucosas, TmP(Glu)<sub>6</sub> se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido rosa esponjoso, 16 mg (7% y 99% de pureza). Fue caracterizado mediante HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min)], *t<sub>R</sub>* 7,40 min. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 8,33-8,26 (m, 1H), 8,08-7,94 (m, 1H), 7,80-7,74 (m, 1H), 7,74-7,69 (m, 6H), 7,56 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,39 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,34-7,26 (m, 1H), 7,12-7,08 (m, 2H), 7,04-6,93 (m, 3H), 6,72-6,57 (m, 1H), 6,49-6,39 (m, 6H), 4,34-4,06 (m, 14H), 3,95-3,86 (m, 12H), 3,81-3,53 (m, 36H), 3,11 (s, 12H), 3,09-3,04 (m, 20H), 2,29 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,88-1,09 (m, 63H), 0,90-0,71 (m, 30H). **MS** (ESI, H<sub>2</sub>O): 1575,7 (32, [M+3H+2TFA]<sup>+3</sup>), 1537,6 (47, [M+3H+TFA]<sup>+3</sup>), 1499,2 (17, [M+3H]<sup>+3</sup>), 1182,0 (21, [M+4H+2TFA]<sup>+4</sup>), 1153,3 (100, [M+4H+TFA]<sup>+4</sup>), 1124,8 (58, [M+4H]<sup>+4</sup>), 922,8 (25, [M+5H+TFA]<sup>+5</sup>). 900,0 (20, [M+5H]<sup>+5</sup>). **HRMS** (ESI): Calculada para C<sub>196</sub>H<sub>309</sub>N<sub>51</sub>O<sub>70</sub> ([M+4H]<sup>+4</sup>): 1124,3041; encontrada: 1124,3040. **Fig. SE26.**

#### 4.6 Péptido TmP(Gal)<sub>6</sub>

Siguiendo el protocolo general para la SPPS de un péptido marcado fluorescentemente con 5-TAMRA que contiene seis β-D-galactosas, TmP(Gal)<sub>6</sub> se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido rosa esponjoso, 13 mg (6% y 99% de pureza). Fue caracterizado mediante

HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min)], *t<sub>R</sub>* 7,59 min. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 8,33-8,26 (m, 1H), 8,00-7,95 (m, 1H), 7,80-7,74 (m, 1H), 7,74-7,67 (m, 6H), 7,58-7,49 (m, 1H), 7,44-7,37 (m, 2H), 7,35-7,30 (m, 1H), 7,12-7,05 (m, 3H), 7,01-6,90 (m, 1H), 6,65-6,55 (m, 1H), 6,49-6,39 (m, 6H), 4,32-4,00 (m, 14H), 3,96-3,83 (m, 12H), 3,84-3,51 (m, 36H), 3,12 (s, 12H), 3,09-3,00 (m, 20H), 2,37-2,28 (m, 2H), 1,88-1,16 (m, 63H), 0,90-0,67 (m, 30H). **MS** (ESI, H<sub>2</sub>O): 1575,8 (32, [M+3H+2TFA]<sup>+3</sup>), 1537,3 (43, [M+3H+TFA]<sup>+3</sup>), 1499,8 (14, [M+3H]<sup>+3</sup>), 1182,0 (22, [M+4H+2TFA]<sup>+4</sup>), 1153,2 (100, [M+4H+TFA]<sup>+4</sup>), 1124,6 (70, [M+4H]<sup>+4</sup>), 922,3 (43, [M+5H+TFA]<sup>+5</sup>), 900,6 (14, [M+5H]<sup>+5</sup>). **HRMS** (ESI): Calculada para C<sub>196</sub>H<sub>309</sub>N<sub>51</sub>O<sub>70</sub> ([M+4H]<sup>+4</sup>); encontrada: 1124,3039. **Fig. SE27**

#### 4.7 Péptido TmP(Man)<sub>6</sub>

Siguiendo el protocolo general para la SPPS de un péptido marcado fluorescentemente con 5-TAMRA que contiene seis α-D-manosas, TmP(Man)<sub>6</sub> se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido rosa esponjoso, 11 mg (5% y 99% de pureza). Fue caracterizado mediante HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min)], *t<sub>R</sub>* 7,36 min. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 8,31-8,19 (m, 1H), 8,06-7,93 (m, 1H), 7,79-7,73 (m, 1H), 7,72-7,66 (m, 6H), 7,53-7,49 (m, 1H), 7,37-7,33 (m, 1H), 7,32-7,26 (m, 1H), 7,10-7,05 (m, 3H), 7,01-6,89 (m, 1H), 6,64-6,53 (m, 1H), 6,48-6,37 (m, 6H), 4,36-3,97 (m, 14H), 3,96-3,82 (m, 12H), 3,81-3,49 (m, 36H), 3,10 (s, 12H), 3,08-3,02 (m, 20H), 2,31 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 1,87-1,09 (m, 63H), 0,93-0,64 (m, 30H). **MS** (ESI, H<sub>2</sub>O): 1575,7 (26, [M+3H+2TFA]<sup>+3</sup>), 1537,5 (52, [M+3H+TFA]<sup>+3</sup>), 1499,9 (24, [M+3H]<sup>+3</sup>), 1181,8 (23, [M+4H+2TFA]<sup>+4</sup>), 1153,3 (100, [M+4H+TFA]<sup>+4</sup>), 1125,1 (41, [M+4H]<sup>+4</sup>), 922,9 (25, [M+5H+TFA]<sup>+5</sup>). **HRMS** (ESI): Calculada para C<sub>196</sub>H<sub>309</sub>N<sub>51</sub>O<sub>70</sub> ([M+4H]<sup>+4</sup>); encontrada: 1124,3040 ([M+4H]<sup>+4</sup>). **Fig. SE28.**

#### 4.8 Péptido TmR<sub>8</sub>

Siguiendo el protocolo general para la SPPS de un péptido marcado fluorescentemente con 5-TAMRA, TmR<sub>8</sub> se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido rosa esponjoso, 15 mg (17% y 99% de pureza). Fue caracterizado mediante HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min)], *t<sub>R</sub>* 5,96 min. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 8,17 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 7,97 (dd, *J* = 8,5, 1,9 Hz, 1H), 7,45 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,27 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,22 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 6,94 (dd, *J* = 8,8, 2,4 Hz, 1H), 6,89 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 6,88 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 6,83 (dd, *J* = 8,3, 2,4 Hz, 1H), 4,28-3,97 (m, 4H), 3,52-3,36 (m, 4H), 3,21 (s, 12H), 3,16-2,97 (m, 20H), 2,30 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,81-1,43 (m, 38H). **MS** (ESI): 1124,7 (10, [M+2H+4TFA]<sup>+2</sup>), 1067,9 (18, [M+2H+3TFA]<sup>+2</sup>), 1011,0 (15, [M+2H+2TFA]<sup>+2</sup>), 712,3 (37, [M+3H+3TFA]<sup>+3</sup>), 674,2 (100, [M+3H+2TFA]<sup>+3</sup>), 636,3 (95, [M+3H+TFA]<sup>+3</sup>), 598,2 (38, [M+3H]<sup>+3</sup>), 534,5 (25, [M+4H+3TFA]<sup>+4</sup>), 506,0 (37, [M+4H+2TFA]<sup>+4</sup>), 477,5 (48, [M+4H+TFA]<sup>+4</sup>), 449,0 (62, [M+4H]<sup>+4</sup>), 382,3 (12, [M+5H+TFA]<sup>+5</sup>), 359,5 (30, [M+5H]<sup>+5</sup>). **HRMS** (ESI): Calculada para C<sub>79</sub>H<sub>133</sub>N<sub>36</sub>O<sub>13</sub> ([M+3H]<sup>+3</sup>): 598,0279; encontrada: 598,0277. **Fig. SE29.**

### 5. Procedimiento general para el dicroísmo circular

Las mediciones del dicroísmo circular se llevaron a cabo utilizando los siguientes ajustes: rango de adquisición: 300-190 nm; ancho de banda: 1,0 nm; acumulación: 3 escaneos, escala de CD: 200 mdeg/1,0 dOD; D.I.T. (Data Integration Time): 1s; modo de escaneo: continuo;

velocidad de escaneo: 200 nm/min. Las mediciones se hicieron de 10°C a 60°C (intervalo de datos: 10°C; gradiente de temperatura: 5°C /min) en una celda de cuarzo de 0,2 cm de longitud a un volumen final de 0,5 mL (buffer HKR o TFE) con una concentración final de los péptidos de 50 µM. Los resultados se expresan como elipticidad molar  $[\theta]_{MRT}$  con unidades de  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  y se calculan utilizando la ecuación **ec. 1**.

$$[\theta]_{MRT} = \frac{100 \cdot \theta}{C \cdot l \cdot N^{\circ} \text{ de residuos}} \quad [1]$$

Donde  $\theta$  es la elipticidad (deg), C es la concentración del péptido (M) y l es la longitud de la cubeta (cm).<sup>365,366</sup>

El porcentaje de helicidad ( $\%[\theta]$ ) se calcula usando la **ec. 2** donde se emplea la elipticidad a 222 nm y se computa como valor absoluto.<sup>367</sup>

$$\%[\theta] = \left( \frac{|[\theta]_{MRT(222)}| - 2340}{30300} \right) \cdot 100 \quad [2]$$

## 6. Líneas celulares y cultivos

Las células HeLa se mantuvieron en un incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad con DMEM (4500 mg/L de glucosa, L-glutamina, piruvato sódico y bicarbonato sódico), complementado con 10% de FBS y 1% de mezcla de Penicilina-Estreptomicina-Glutamina. Las células (100.000 células/mL) fueron cultivadas en platos de fondo de vidrio de cuatro pocillos y lavada con tampón HKR (5 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 2,05 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 7,4). Los núcleos se tiñeron por incubación con 1 µM Hoechst 33342 en HKR durante 30 min. El péptido se diluyó en HKR, y las diferentes concentraciones se calcularon por UV-Vis ( $\lambda = 555$ ,  $\epsilon = 91.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Las células se incubaron con el péptido durante 30 min y posteriormente se lavaron para eliminar el exceso de péptido utilizando una solución de heparina en HKR (1x500 µL, 0,1 mg/ml) y tampón HKR (2x500 µL) antes de ser observadas en el microscopio.

## 7. Viabilidad celular: Ensayo MTT

La viabilidad celular fue estudiada mediante un ensayo estándar de MTT. El día anterior al ensayo, se colocó una suspensión de células HeLa en placas de cultivo de 96 pocillos añadiendo 100 µL (100.000 células/mL) por pocillo. Al día siguiente, se aspiró el medio y se incubaron las células con diferentes concentraciones de péptido diluido en HKR (50 µL/pocillo). Después de 1 hora de incubación a 37°C, se aspiró el medio y se lavaron las células con una disolución de heparina en HKR (1x100 µL, 0,1 mg/ml) y con tampón HKR (2x100 µL/pocillo). A continuación, se añadió a las células medio DMEM fresco que contiene un 10% de FBS (100 µL) durante 3h. Las células para el control al 100% de viabilidad fueron impregnadas con sólo medio de cultivo celular (100 µL medio final) y para el control al 0% con una solución de 1% de TRITON X-100. La viabilidad se midió cuantificando la capacidad celular de reducir el MTT a su sal de formazán insoluble. Se añadió MTT (5 mg/mL en PBS, 10 µL/pocillo) a los pocillos y las células se siguieron incubando durante 4 h. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y la sal de formazán insoluble en agua se disolvió en DMSO (100 µL/pocillo). La absorbancia se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas. Se realizaron dos ensayos MTT con tres replicas por concentración para cada uno de los

experimentos. Los datos se expresaron como valores normalizados para las células de control no tratadas (100% y 0%) y se presentaron como la media del porcentaje de tres replicas  $\pm$  la desviación estándar.

## 8. Protocolo general para la citometría de flujo

Un día antes del ensayo, las células HeLa se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos añadiendo 100  $\mu$ L (100.000 células/mL) por pocillo. Al día siguiente, se aspiró el medio y se incubaron las células con diferentes concentraciones de péptido (50  $\mu$ L/pocillo) en buffer HKR. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, se aspiró el buffer y las células se lavaron con disolución de heparina (1x100  $\mu$ L, 0,1 mg/mL) y tampón HKR (2x100  $\mu$ L). A continuación, se añadió tripsina-EDTA 100  $\mu$ L en cada pocillo y las células se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Finalmente, se añadieron a las células 100  $\mu$ L de una solución de FBS al 2% y 5 mM de EDTA en PBS para neutralizar la tripsina. Por último, 2500 células de cada pocillo se analizaron mediante clitómetro de flujo. Se determinó la mediana del canal Yellow-G ( $\lambda_{\text{ex}} = 532$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 575/25$  nm) para esta población. Los datos se representan como la media de la mediana de la intensidad de fluorescencia de tres réplicas  $\pm$  la desviación estándar.

## 9. Experimentos *in vivo* en modelos de ratón

Los experimentos con animales se realizaron en el CEBEGA (USC) de acuerdo con la Directiva 2010/63/EU del Consejo de las Comunidades Europeas y el Real Decreto 53/2013, sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y fueron aprobados por el Comité Ético de la USC y la autoridad competente (Xunta de Galicia). La biodistribución de los compuestos TmP(X)<sub>6</sub> donde X = Glu, Gal, Man, se determinó en ratones ICR (Swiss) hembra de 7 semanas (CEBEGA, U.S.C, Santiago de Compostela, España) a través un sistema de imagen *in vivo* IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences, Alameda, USA). Los animales fueron anestesiados con isofluorano (2,5%) mediante un equipo de anestesia inhalatoria. Se administró 50  $\mu$ g en PBS de los diferentes glicopéptidos, mediante inyección intravenosa en un volumen total de 50  $\mu$ l a un total de 3 ratones y un ratón control al que se le inyectó el mismo volumen de PBS. Las imágenes *in vivo* fueron adquiridas a la 1 y 3 h de la inyección y posteriormente a punto final (3 h) se sacrificaron los animales para practicarles una necropsia y realizar un estudio *ex vivo* de los siguientes órganos: pulmones, corazón, hígado, riñones y bazo. La fluorescencia de los glicopéptidos se cuantificó a través de un mapa de intensidad obtenido usando el software Image (Caliper Life Sciences). El software utiliza una escala basada en colores para representar la intensidad de cada píxel que va del rojo (que representa baja intensidad) al amarillo (que representa alta intensidad).



## 10. Caracterización peptídica

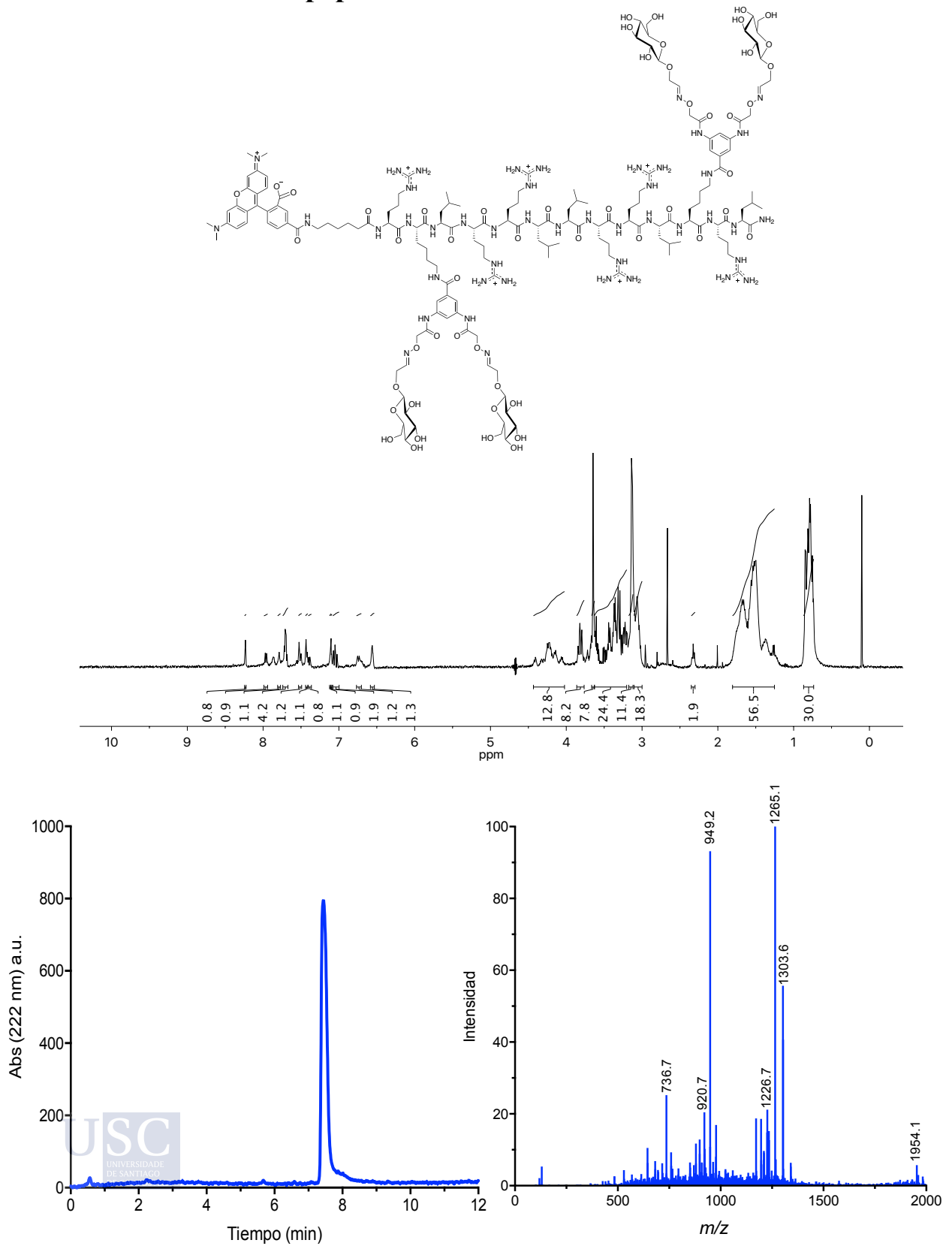


Figura SE23. Péptido Tmp(Glu)4: Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  y HPLC-MS(ESI) en  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1% TFA)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (0,1% TFA) 95:5 $\rightarrow$ 5:95 (0 $\rightarrow$ 12 min),  $t_{\text{R}}$  7,44 min.

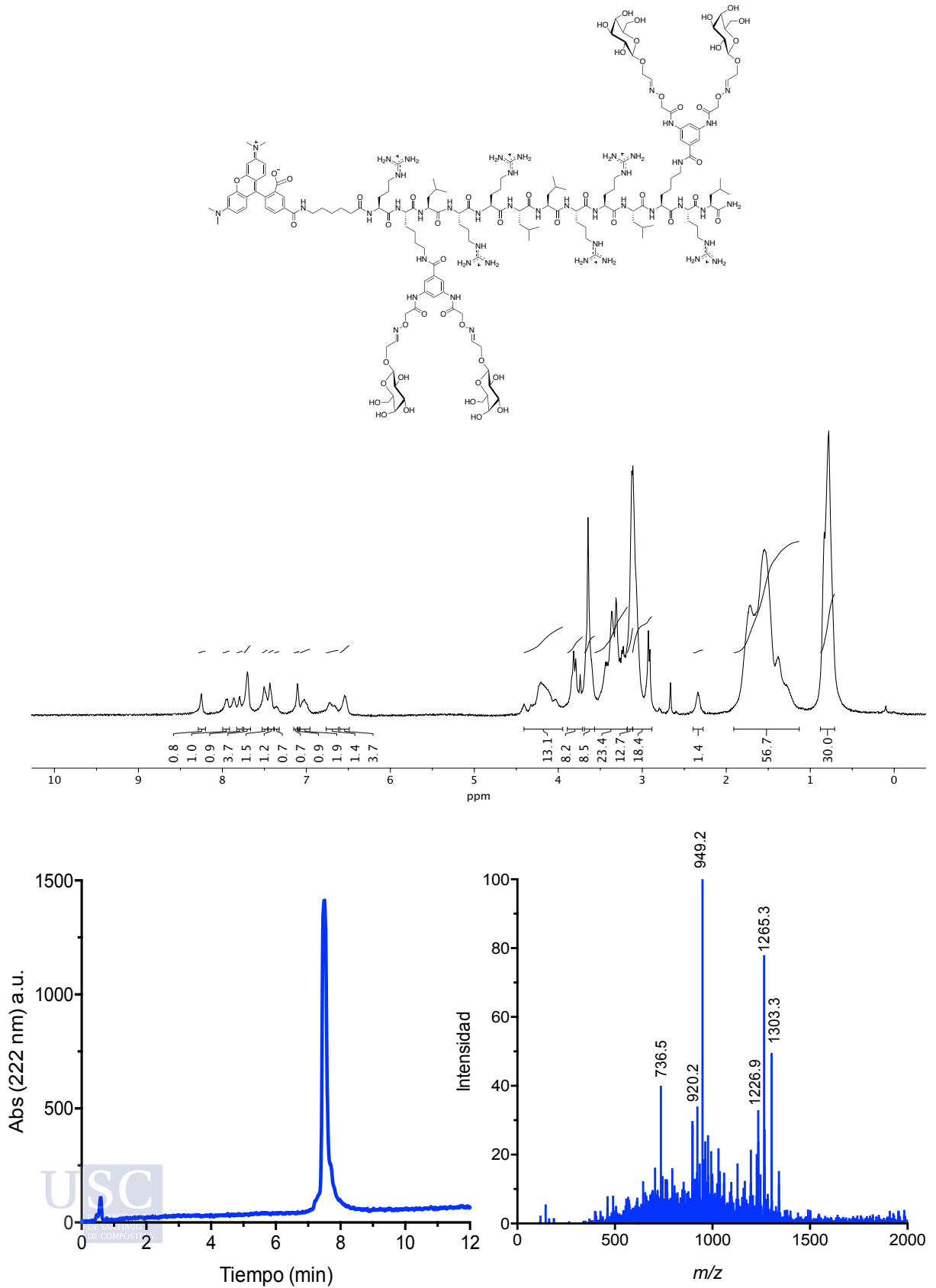


Figura SE24. Péptido TmP(Gal)<sub>4</sub>: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O y HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>r</sub> 7,50 min.

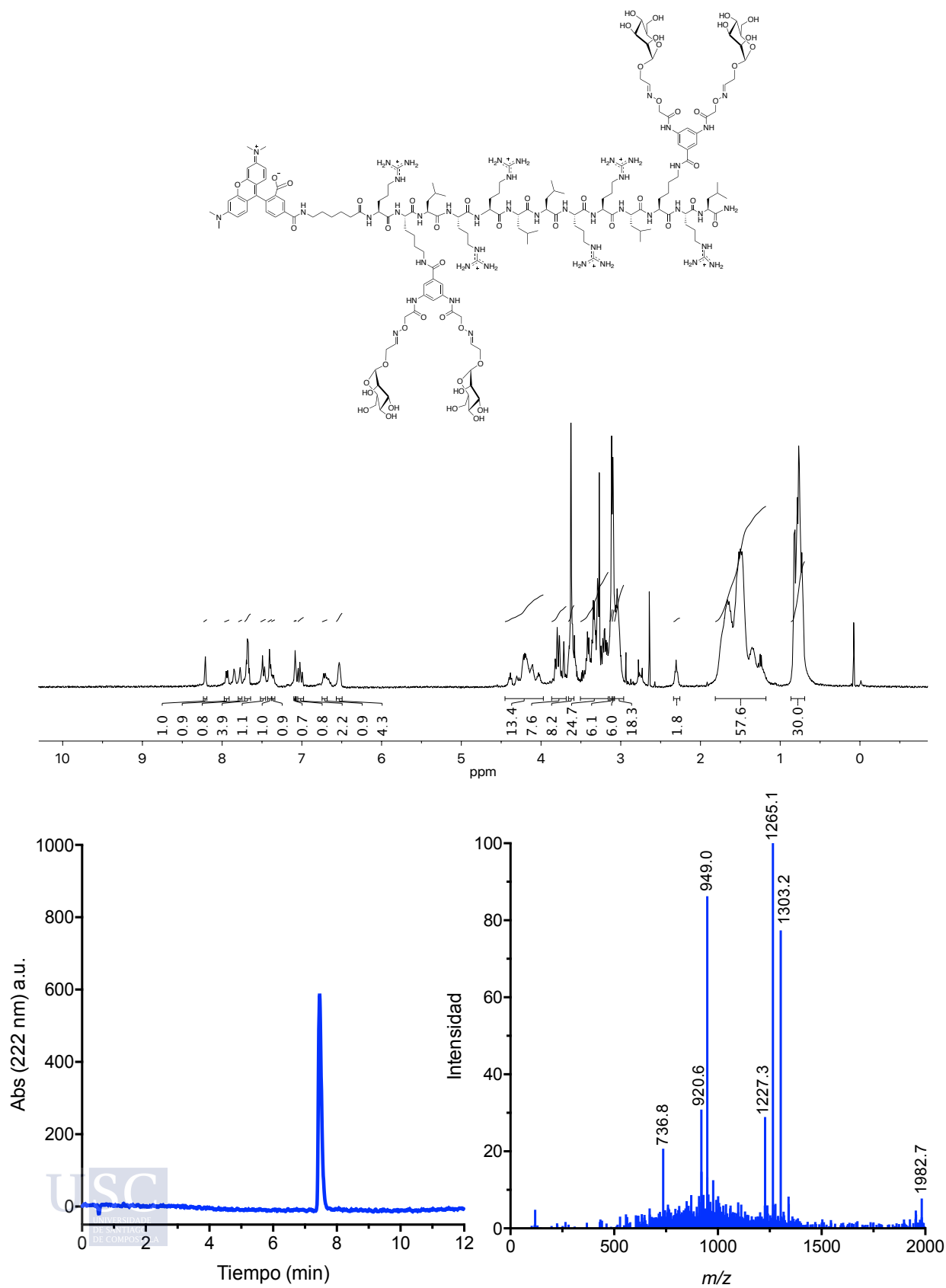


Figura SE25. Péptido TmP(Man)<sub>4</sub>: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O y HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>R</sub> 7,46 min.

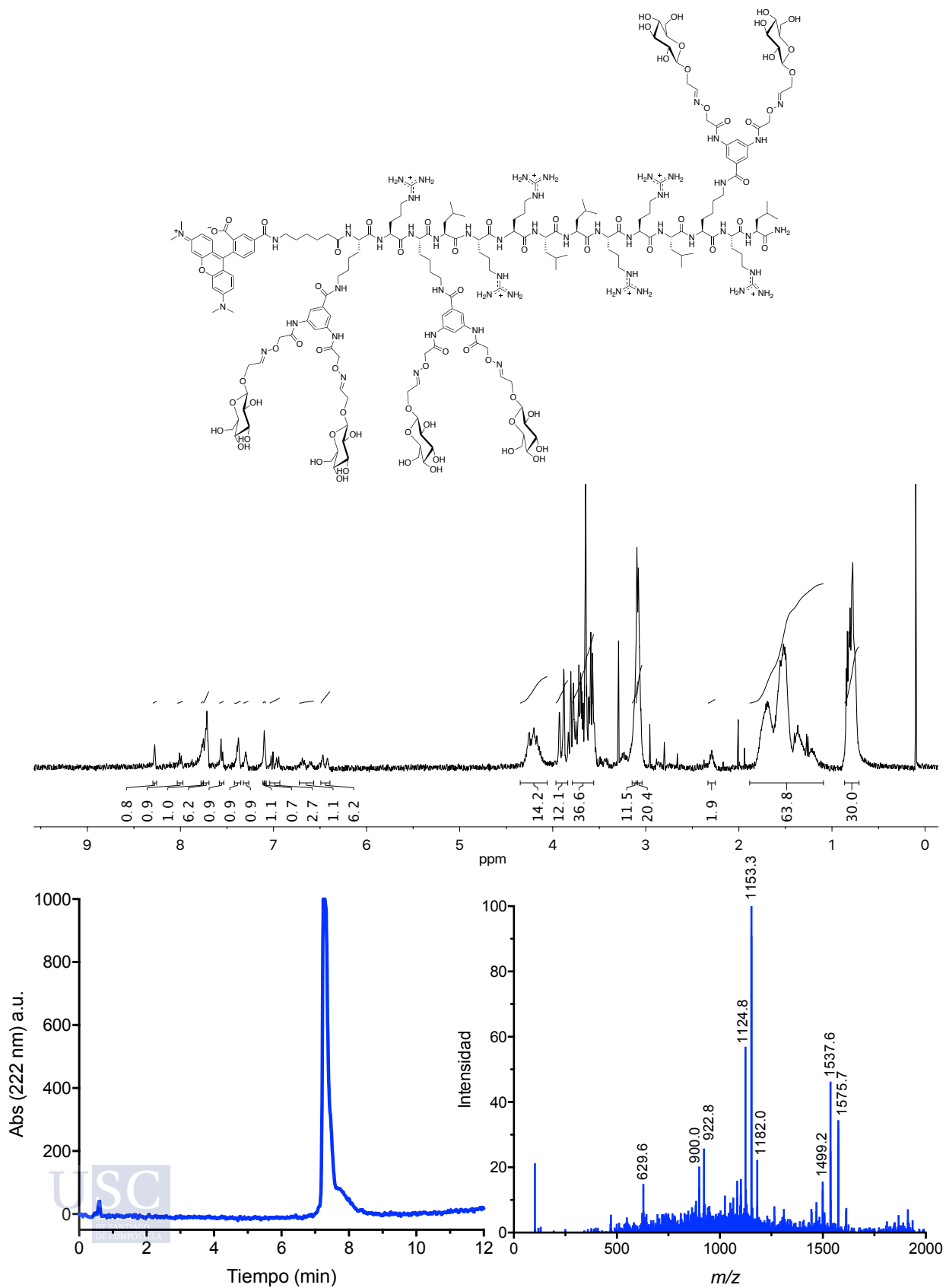


Figura SE26. Péptido TmP(Glu)<sub>6</sub>: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O y HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>R</sub> 7,40 min.

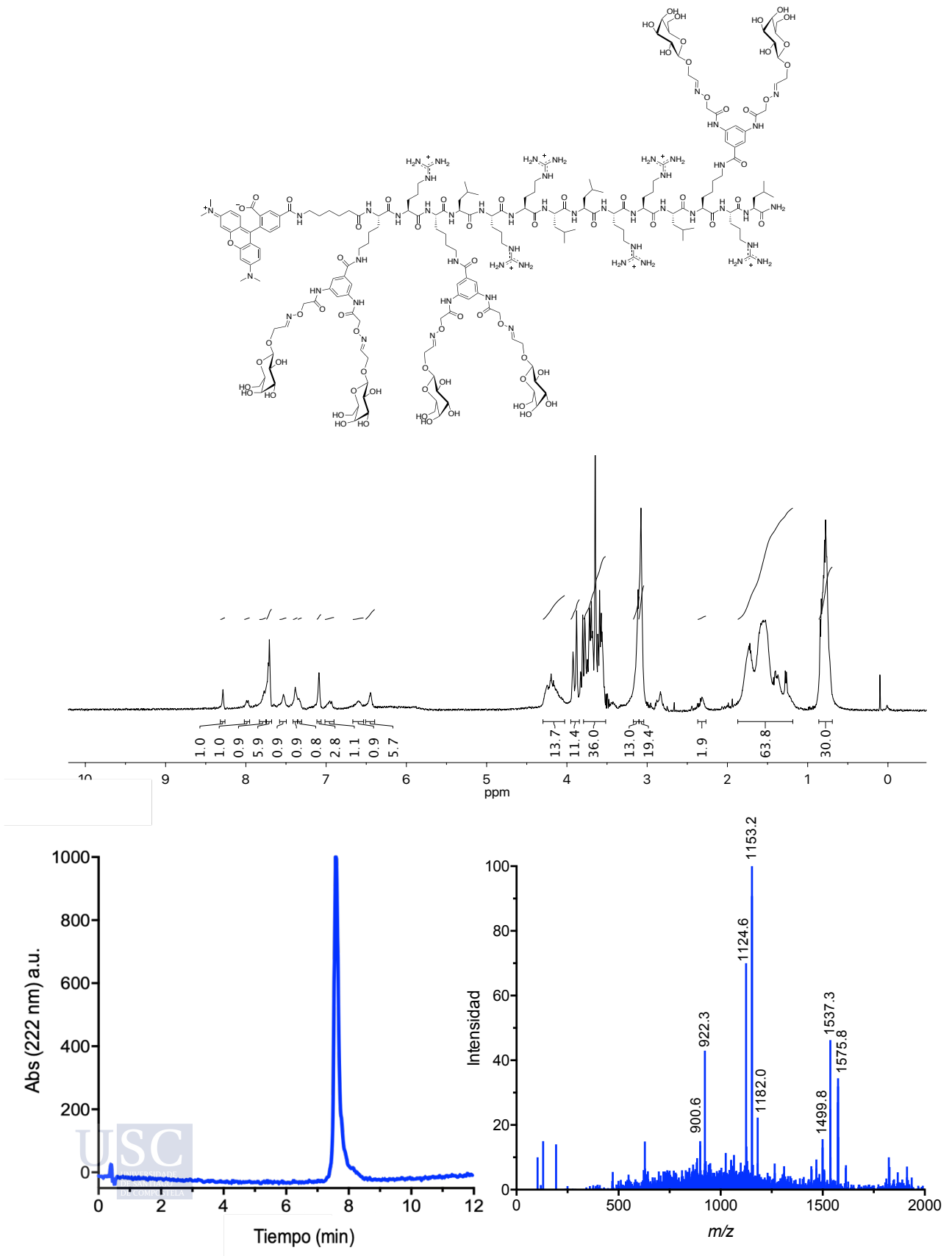


Figura SE27. Péptido TmP(Gal)<sub>6</sub>: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O y HPLC-MS(ESI), H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>r</sub> 7,59 min.

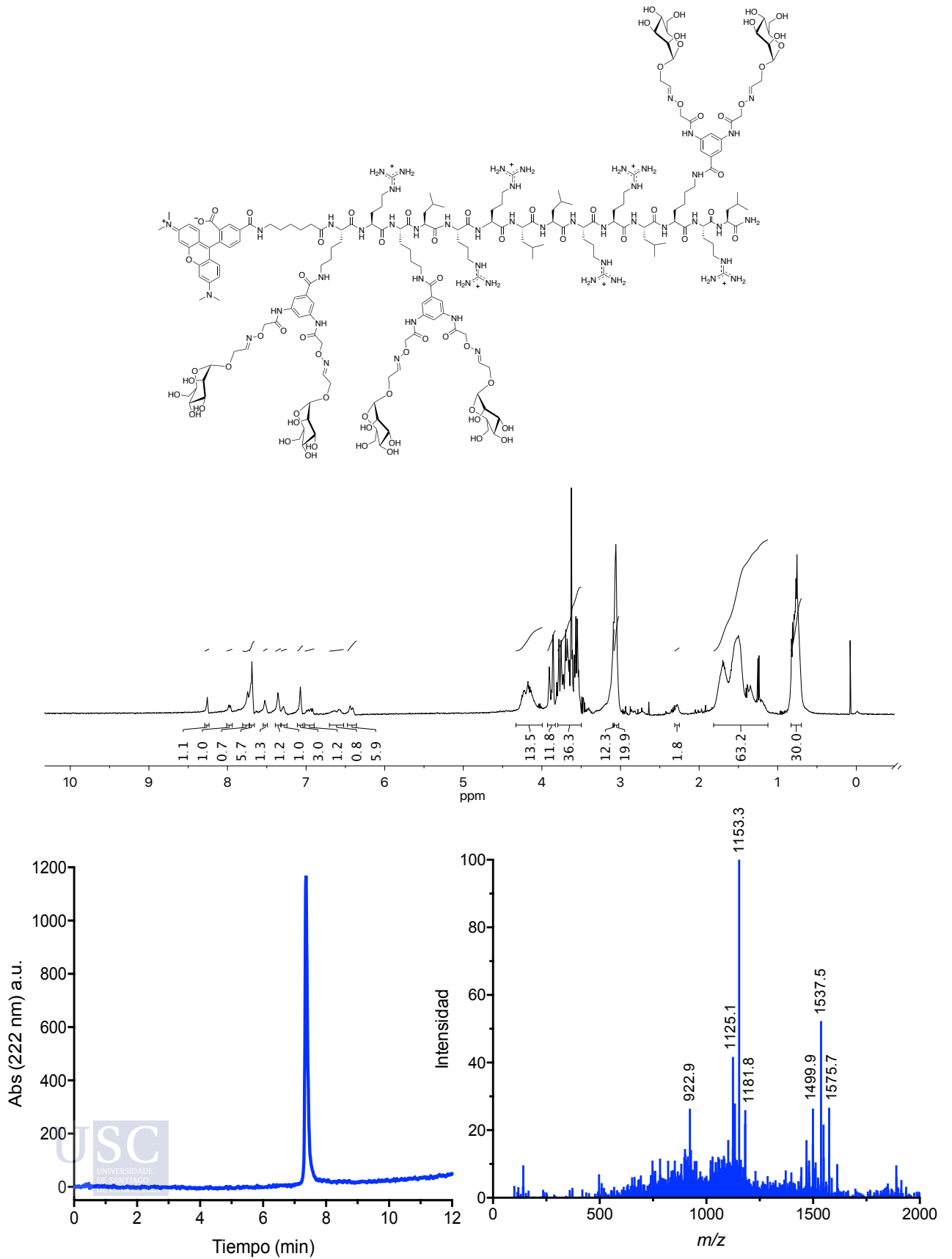


Figura SE28. Péptido Tmp(Man)<sub>6</sub>: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O y HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>R</sub> 7,36 min.

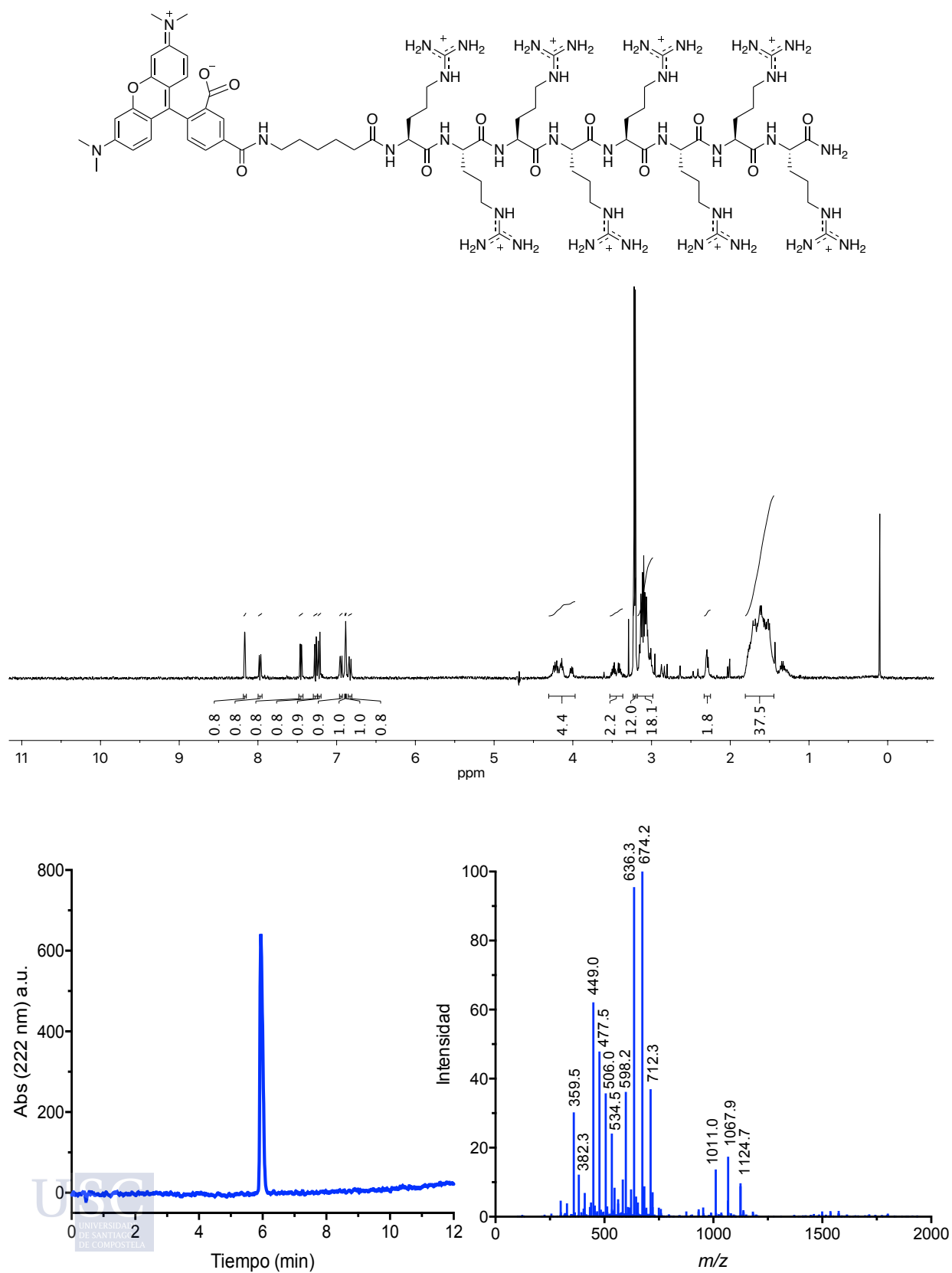


Figura SE29. Péptido TmR<sub>8</sub>: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O y HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>R</sub> 5,96 min.



# Sección Experimental, Capítulo III



## 1. Materiales, instrumentación y métodos

Disponible comercialmente, Fmoc-Rink Amide AM resin, *N*-HBTU fueron obtenidos en Iris Biotech GmbH. Fmoc-*L*-Leu-OH, Fmoc-*L*-Lys(Boc)-OH, Fmoc-*L*-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(O<sup>t</sup>Bu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-*L*-Ala-OH, Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH, 14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoic acid solution ~0,5 M in tert-butyl methyl ether ≥90%, 2,3,4,5,6-Pentafluorophenol, EDAC, Triisopropylsilane 98%, Dimethyl sulfoxide anhydrous ≥99,9% se compraron a Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC, neonatal, pooled (200P-05N) and Endothelial Cell Growth Medium (211-500) se adquirieron a Cell Applications, Inc. Human E-Selectin/CD62e (10335-H08H) fue adquirida a SinoBiological. Sialyl Lewis X (sLe<sup>X</sup>) pentaose Sodium salt (>90% NMR) (GLY053) fue obtenido a Elicityl. Heparin sodium salt, Hoechst 33342 Trihydrochloride Trihydrate, Sulfo-NHS and Gibco<sup>™</sup> TNF Recombinant Human Protein (PHC3015) fueron comprados a Thermo Fisher Scientific. ProteOn<sup>™</sup> GLH Sensor Chip (1765013) fue obtenido de BIO-RAD. 96-well Glass Bottom Black Plate (P96-1.5H-N) fueron adquiridas a Cellvis. Costar 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol se compraron a Corning. Disolventes deuterados (D<sub>2</sub>O, CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub>) fueron adquiridos a EMD Millipore Corporation. *N,N*-Dimethylformamide y TFA para síntesis peptídica se compraron Scharlau. El resto de los disolventes son de grado HPLC y fueron adquiridos a Sigma-Aldrich<sup>®</sup> or Fisher Scientific<sup>®</sup> y se emplearon sin ninguna purificación adicional. Los compuestos **5**<sup>354</sup>, **7**<sup>252</sup>, **9**<sup>354</sup> y **12**<sup>354</sup> fueron preparados de acuerdo con los procedimientos previamente descritos.

Para la cromatografía en columna, se adquirió gel de sílice 60 (malla 230-400, 0,040-0,063 mm) de Merck o se filtró en gel mediante Sephadex LH20 de GE Healthcare, Barcelona (España). La cromatografía en capa fina (TLC) se llevó a cabo en hojas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 F254 adquirido a Merck, con visualización mediante luz UV. Además se empleó la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la purificación de los compuestos, utilizando un JASCO LC-4000 con una columna de fase reversa Agilent Eclipse XDB-C18, 9.4x250 mm para la purificación semipreparativa utilizando un gradiente de 95:5→5:95 (0→35 min) H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA).

El análisis mediante cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrómetro de masas (HPLC-MS) se llevó a cabo en un Agilent Technologies 1260 Infinity II asociado a un 6120 Quadrupole LC-MS utilizando una columna Agilent SB-C18 o un DIONEX Ultimate 3000 U-HPLC<sup>+</sup> (Thermo Scientific) con una columna Acclaim RSLC 120-C18 con un gradiente de 95:5→5:95 (0→12 min) H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA). Las determinaciones de masas exactas (HRMS) empleando un ESI-MS se realizaron en un espectrómetro de masas Bruker MicroTof o en un Sciex QSTAR Pulsar y se notifican como relación masa por carga (*m/z*). Se realizaron espectros de masas MALDI-ToF (desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) en un espectrómetro de masas Bruker BIFLEX<sup>™</sup> utilizando DCTB como matriz.

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Varian Mercury (300 MHz para <sup>1</sup>H y 75 MHz para <sup>13</sup>C) y o en un Bruker AMX (500 MHz para <sup>1</sup>H y 125 MHz para <sup>13</sup>C), o también en un Bruker AC 300 o AC 500. Los espectros de <sup>1</sup>H- y <sup>13</sup>C-RMN se obtuvieron en disoluciones de D<sub>2</sub>O, CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub> o DMSO-*d*<sub>6</sub>. Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm (δ) referidos a las siguientes señales de disolventes, <sup>1</sup>H-RMN: D<sub>2</sub>O 4,79, CD<sub>3</sub>OD 3,31, CDCl<sub>3</sub> 7,26 o DMSO-*d*<sub>6</sub> 2,50; <sup>13</sup>C-RMN: CD<sub>3</sub>OD 49,0, CDCl<sub>3</sub> 77,2, o DMSO-*d*<sub>6</sub>

39,5. Las multiplicidades de espín se reportan como un singlete (s), doblete (d), triplete (t), br (broad signal, señal ampliada), doblete de dobletes (dd), triplete de dobletes (td) con constantes de acoplamiento ( $J$ ) dadas en Hz, o múltiplete (m). Las asignaciones de los conjugados péptido/[60]fullerenos se confirmaron mediante experimentos de RMN unidimensionales y bidimensionales (COSY, HSQC y DEPT). Algunas señales aparecen duplicadas debido a la mezcla de isómeros y se indican en la lista con mj. (mayoritario) y min. (minoritario).

Los análisis XPS se obtuvieron en un espectrómetro SPECS GmbH (PHOIBOS 150 9 MCD) trabajando en el modo de energía constante del analizador y con una fuente de rayos-X de magnesio no monocromática (1486,61 eV) alimentada a 200 W y un voltaje de 12 kV. Para el registro de los espectros de sondeo y de alta resolución se aplicaron energías de paso de 50 y 25 eV. Los datos de sondeo se adquirieron a partir de energías cinéticas de 1487-400 eV con un paso de energía de 0,1 eV y un tiempo de permanencia de 100 ms por punto. Los escaneos de alta resolución se registraron alrededor de las líneas de emisión significativas con pasos de 0,1 eV y 100 ms de tiempo de permanencia por punto. El control del espectrómetro y el manejo de los datos se supervisaron con el software Prodigy. Las energías de enlace se calibraron relativamente al pico de C 1s a 284,6 eV y las relaciones atómicas se calcularon a partir de las relaciones de intensidad experimentales. Las muestras se introdujeron en el aparato XPS como polvo recubierto sobre una membrana de policarbonato.

Los experimentos de irradiación de microondas se realizaron con un aparato Monowave 300 (Anton Pear). La temperatura se controló mediante un sensor de superficie externo.

Todos los ensayos de interacción SPR se realizaron a 25°C en un ProteOn™ XPR36 Protein Interaction Array System, un espectrómetro biosensor óptico, usando un chip GLH ProteOn™.

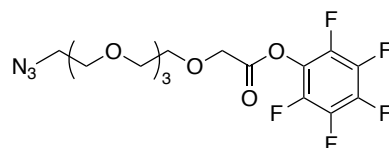
Las concentraciones de los conjugados péptido/[60]fullereno marcados fluorescentemente se calcularon midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS Biochrom Libra S60.

Las células se mantuvieron en un incubador INCO 108 (Mettler). Las micrografías se adquirieron con un microscopio Dragonfly confocal spinning-disk sobre un Nikon Eclipse Ti-E equipado con una cámara digital Andor Sona sCMOS. Las imágenes se analizaron con Fiji.<sup>363</sup>

Para los experimentos de citometría de flujo se empleó un citómetro Guava EasyCyte™ (EMD Millipore) y se analizaron con el software InCyte incluido en GuavaSoft 3.2 (Millipore).

## 2. Síntesis y caracterización peptídica

### 2.1 Compuesto 15



A una solución de 14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoic acid o  $N_3$ -(PEG)<sub>4</sub>-COOH (Compuesto 3, 100 mg, 0,36 mmol, 1 equiv) en DCM (5 mL), se añadieron EDAC (103 mg, 0,54 mmol, 1,5 equiv) y pentafluorofenol (PFP, 86 mg, 0,47 mmol, 1,3 equiv), la mezcla de reacción se agitó bajo atmósfera de Ar durante 3h. El crudo de la reacción se disolvió en DCM (20 mL) y se lavó con HCl 1M (2x20 mL) y H<sub>2</sub>O (2x20 mL). La fase orgánica se secó sobre

MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentró en el rotavapor. El crudo de la reacción se purificó por columna de gel de sílice utilizando DCM/MeOH (97:3) como fase móvil para dar el compuesto final con un aspecto de aceite incoloro. Rendimiento: 101 mg (63%).  $R_f = 0,76$  (95:5 DCM/MeOH); <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 4,55 (s, 2H), 3,85-3,79 (m, 2H), 3,76-3,70 (m, 2H), 3,70-3,63 (m, 10H), 3,38 (t,  $J = 5,1$  Hz, 2H). **Fig. SE30.** El compuesto se utilizó sin más caracterización.

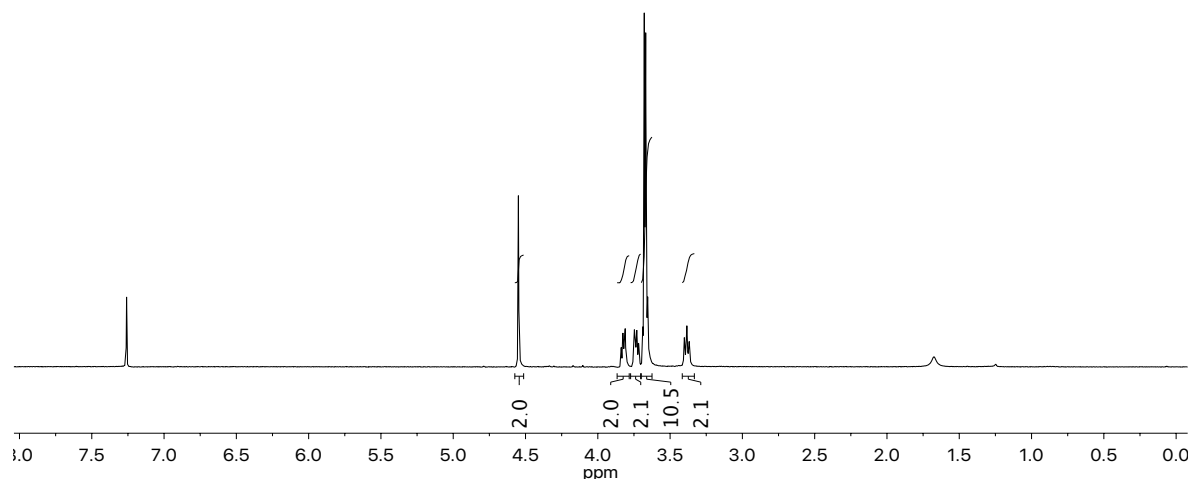
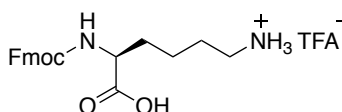


Figura SE30. Compuesto 15. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en CDCl<sub>3</sub>. Pico residual del disolvente: CDCl<sub>3</sub> a 7,26 ppm.

## 2.2 Compuesto 16



La sal de la Fmoc-Lys-OH (Compuesto 16) ha sido obtenida tras la desprotección del grupo amino del reactivo de partida Fmoc-Lys(Boc)-OH (100 mg, 0,21 mmol, 1 equiv) en una disolución de DCM/TFA (9:1) durante 1h a temperatura ambiente bajo agitación magnética. Tras este tiempo, se añadió ciclohexano, los disolventes se evaporan en el rotavapor y el producto final es obtenido cuantitativamente. Rendimiento: 101 mg (cuant.).  $R_f = 0,17$  (95:5 DCM/MeOH); <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 7,31 (br, s, 1H), 7,01 (dd,  $J = 7,3, 1,3$  Hz, 2H), 6,93 (dd,  $J = 6,4, 1,6$  Hz, 2H), 6,63 (td,  $J = 7,3, 1,1$  Hz, 2H), 6,48 (td,  $J = 7,7, 1,6$  Hz, 2H), 3,66 (d,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 3,63-3,54 (m, 1H), 3,43 (t,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 2,23 (t,  $J = 7,9$  Hz, 2H), 1,36-1,25 (m, 2H), 1,23-0,97 (m, 2H), 0,92-0,76 (m, 2H). **Fig. SE31.** El compuesto 16 se utilizó sin mayor caracterización.

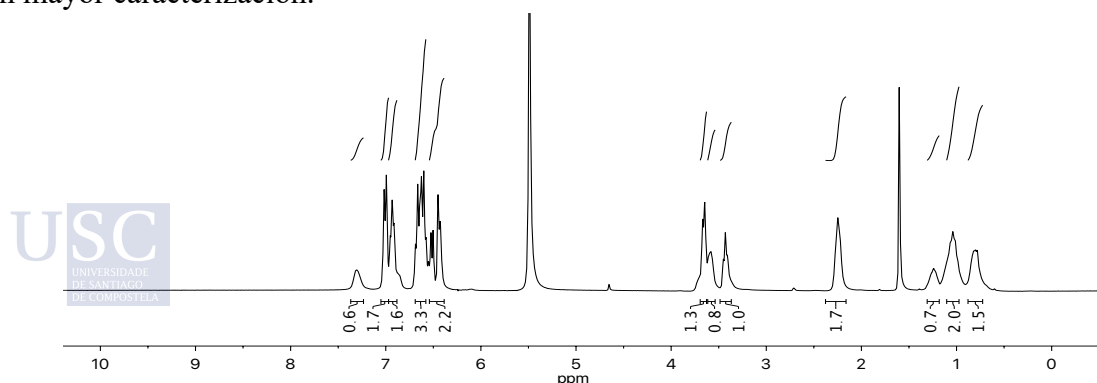
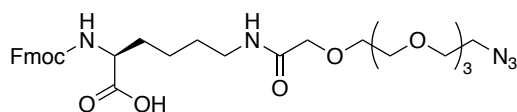


Figura SE31. Compuesto 16. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en CD<sub>3</sub>OD, señales de los disolventes: pico residual de CD<sub>3</sub>OD a 3,31 ppm, pico de DCM a 5,49 ppm y pico de ciclohexano a 1,45 ppm.

## 2.3 Compuesto 4



El compuesto **4** se sintetizó mediante la reacción entre el compuesto **15** (66 mg, 0,15 mmol, 1,1 equiv) y el compuesto **16** (68 mg, 0,14 mmol, 1 equiv) en presencia de DIEA (73  $\mu$ L, 0,42 mmol, 3 equiv) en DMF<sub>seco</sub>, a temperatura ambiente durante 1h con agitación constante. El producto final fue purificado por HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→35 min)]. Rendimiento: 69 mg (78%). El compuesto **4** se caracterizó mediante HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min)],  $t_R$  9,05 min. **<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ ): 7,80 (d,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 7,68 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 7,39 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 7,31 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 4,36 (d,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 4,22 (t,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 4,17-4,09 (m, 1H), 3,95 (s, 2H), 3,65-3,59 (m, 12H), 3,34 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 3,26 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 1,95-1,29 (m, 6H). **<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ ): 176,1 (COOH), 172,9 (CONH), 158,8 (HNCOO), 145,4 (C<sub>q-8a,9a</sub>), 142,8 (C<sub>q-4a,4b</sub>), 128,94 (C<sub>sp<sup>2</sup>3,6</sub>), 128,3 (C<sub>sp<sup>2</sup>2,7</sub>), 126,4 (C<sub>sp<sup>2</sup>1,8</sub>), 121,1 (C<sub>sp<sup>2</sup>4,5</sub>), 71,5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 71,4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 71,2 (HNCOCH<sub>2</sub>O), 68,1 (HNCOOCH<sub>2</sub>), 55,5 (CH $\alpha$ ), 51,9 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 39,9 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 32,6 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 30,1 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 24,4 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). **MS** (ESI, H<sub>2</sub>O): 628,4 (100, [M+H]<sup>+</sup>). **HRMS (ESI)**: Calculada para C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 628,2977; encontrada: 628,2974. **Fig. SE32-SE34.**

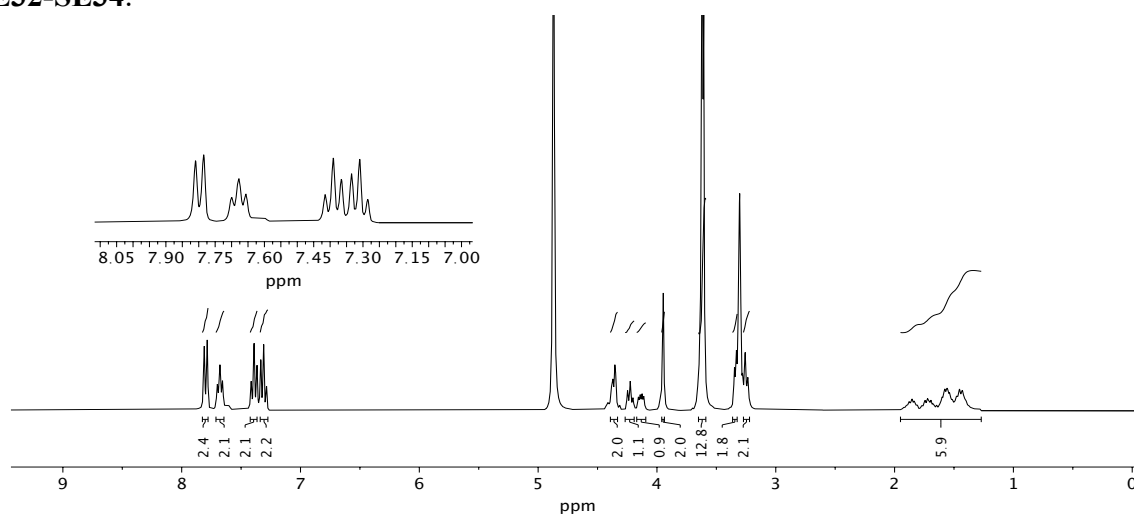


Figura SE32. Compuesto **4**. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en CD<sub>3</sub>OD, señales de los disolventes: pico residual de CD<sub>3</sub>OD a 3,31 ppm y H<sub>2</sub>O a 4,87 ppm.

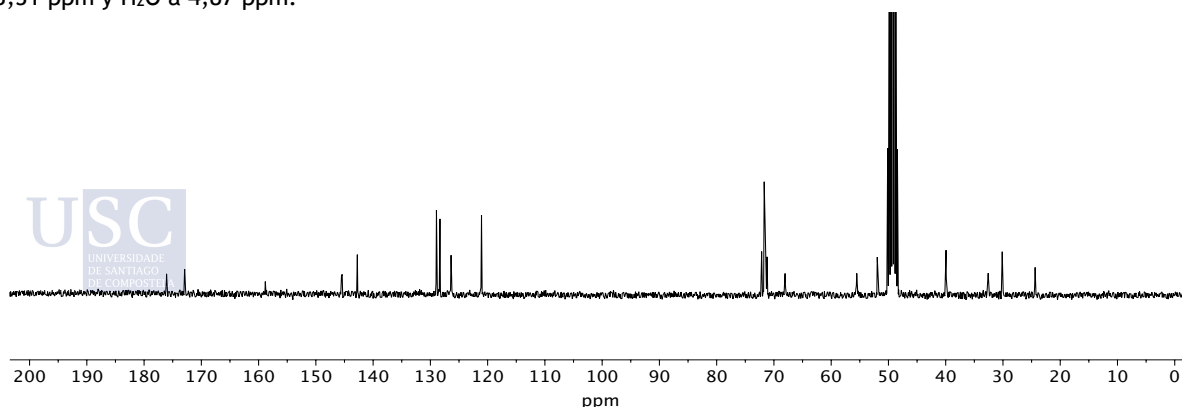


Figura SE33. Compuesto **4**. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN en CD<sub>3</sub>OD, pico residual del disolvente: CD<sub>3</sub>OD a 49,0 ppm.

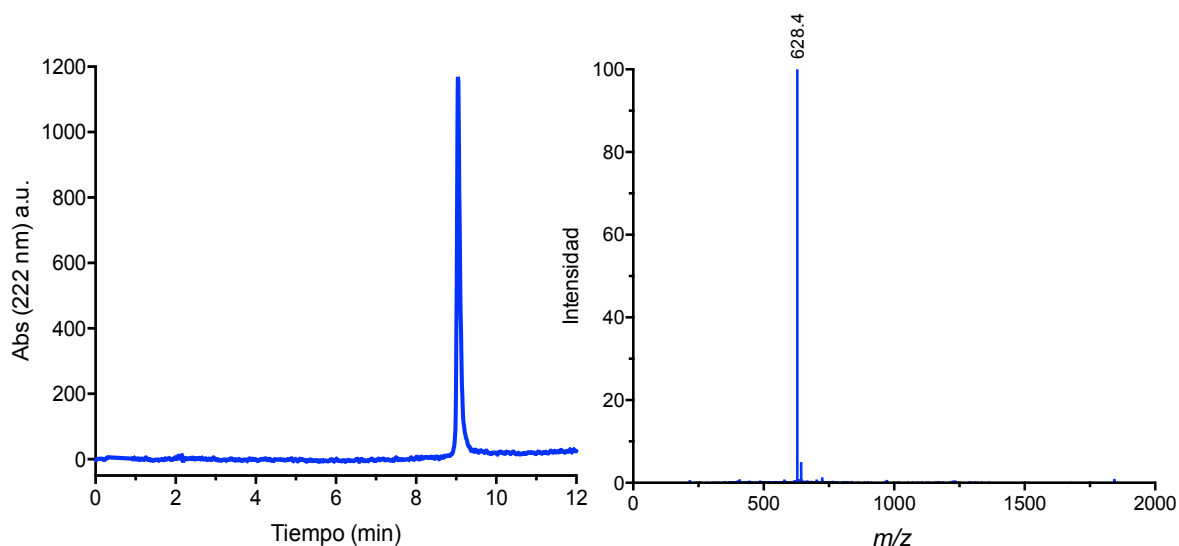


Figura SE34. Compuesto 4. HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O(0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN(0,1% TFA) 95:5→5:95(0→12 min), *t<sub>R</sub>* 9,05 min.

## 2.4 Protocolos generales para la SPPS para obtener los péptidos P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> y P<sub>C</sub>

**Protocolo general para la SPPS:** Todos los péptidos se sintetizaron manualmente mediante la síntesis peptídica en fase sólida por el método Fmoc utilizando la resina Fmoc-Rink Amida (carga: 0,74 mmol/g). 0,1 mmol de resina se hincharon con DMF (2 mL) durante 20 min en un reactor de fase sólida. El ciclo de acoplamiento comenzó con la eliminación del grupo protector Fmoc mediante la adición de piperidina (20% v/v en DMF, 2 mL) durante 20 min, luego la mezcla se filtró y la resina se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min). Los acoplamientos de los respectivos aminoácidos se realizaron mediante el tratamiento con una disolución de  $\alpha$ -aminoácidos (2 equiv), *N*-HBTU (2 equiv) en DMF (2 mL), que se mezcló con DIEA (0,195 M en DMF, 1,2 equiv) 1 min antes de la adición. La mezcla resultante se agitó mediante burbujeo de Ar durante 20 min. Finalmente, la resina se lavó con DMF (3x2 mL, 1 min).

**Incorporación del espaciador azida:** La incorporación del compuesto **3** (en el extremo *N*-terminal, **Fig. SE36**) o del compuesto **4** (en el extremo *C*-terminal, **Fig. SE35**) tuvo lugar como si se tratara de un acoplamiento de un aminoácido común adicionando a la resina una disolución del compuesto **3** o **4** (2 equiv), *N*-HBTU (2 equiv) DIEA (0,195 M en DMF, 1,2 equiv) en DMF (2 mL) durante 30 min.

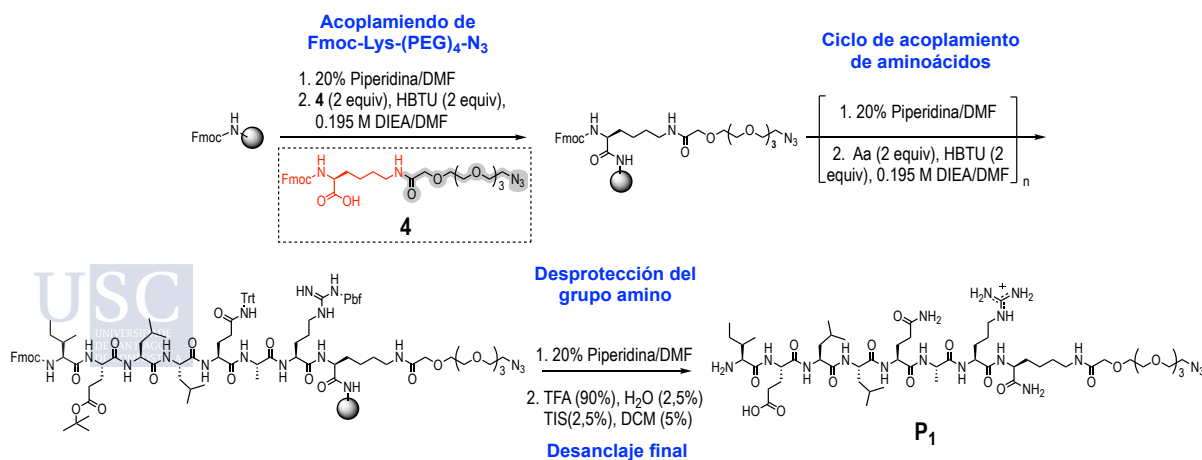
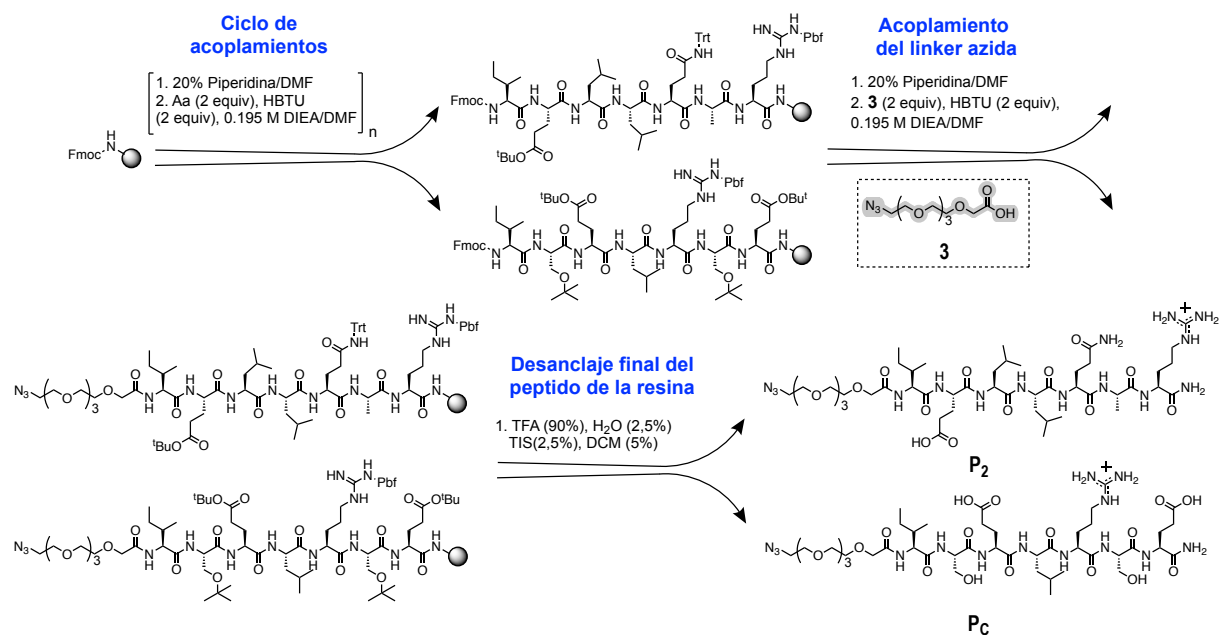


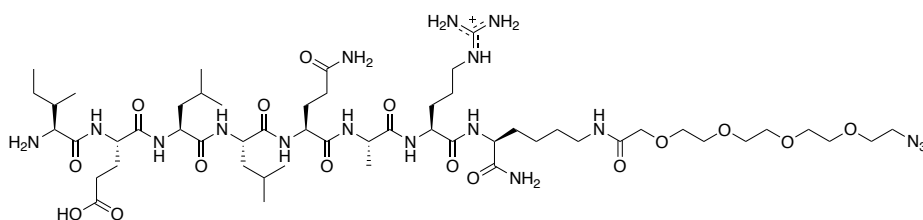
Figura SE35. Esquema general para la síntesis de péptidos en fase sólida que contienen el enlazador azida en el extremo *C*-terminal: IELLQARK-(PEG)<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> (P<sub>1</sub>).



**Figura SE36.** Esquema general para la síntesis de péptidos en fase sólida que contienen el conector azida en el extremo *N*-terminal: N<sub>3</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-IELLQAR (P<sub>2</sub>) y N<sub>3</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-ISELRSE (P<sub>3</sub>).

**Protocolo general para el desanclaje final del péptido:** Los péptidos se desprotegeron y se liberaron de la resina añadiendo el cóctel TFA/DCM/H<sub>2</sub>O/TIS (90/5/2,5/2,5%, 3 mL, 2h). Posteriormente, la mezcla se filtró, la resina se lavó de nuevo con TFA (1 mL) y las fases combinadas de TFA se añadieron gota a gota sobre Et<sub>2</sub>O (25 mL) enfriado a 0°C. El precipitado se centrifugó y el sólido separado se disolvió en H<sub>2</sub>O (3-5 mL). El péptido se purificó por HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→35 min)] las fracciones recogidas se concentraron, se liofilizaron y se almacenaron a -20°C.

## 2.5 Péptido P<sub>1</sub>: IELLQARK-(PEG)<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>



Siguiendo el protocolo general para la SPPS con una funcionalización en el extremo *C*-terminal, IELLQARK-(PEG)<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> (P<sub>1</sub>) se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido blanco esponjoso, 21 mg (17% y 99% de pureza). Fue caracterizado en un HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min)]. *t<sub>R</sub>* 6,32 min. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 4,50-4,21 (m, 8H), 4,12 (s, 2H), 3,87-3,68 (m, 14H), 3,55 (t, *J* = 4,9 Hz, 2H), 3,37-3,18 (m, 4H), 2,60-2,33 (m, 4H), 2,28-1,52 (m, 23H), 1,45 (d, *J* = 7,3 Hz, 3H), 1,14-0,79 (m, 18H). **MS** (ESI, H<sub>2</sub>O): 1228,7 (42, [M+H]<sup>+</sup>), 615,4 (100, [M+2H]<sup>2+</sup>), 410,1 (20, [M+3H]<sup>3+</sup>). **HRMS** (ESI): Calculada para C<sub>53</sub>H<sub>99</sub>N<sub>17</sub>O<sub>16</sub> ([M+2H]<sup>2+</sup>): 614,8723; encontrada: 614,8720. **Fig. SE37-SE38.**

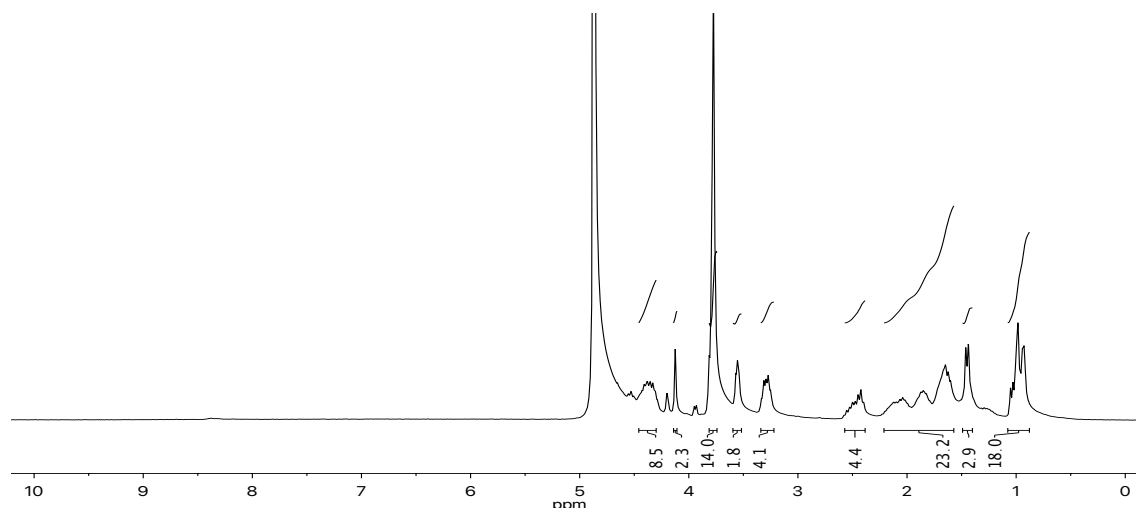


Figura SE37. Péptido P<sub>1</sub>. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O, Pico residual del disolvente: D<sub>2</sub>O a 4,79 ppm.

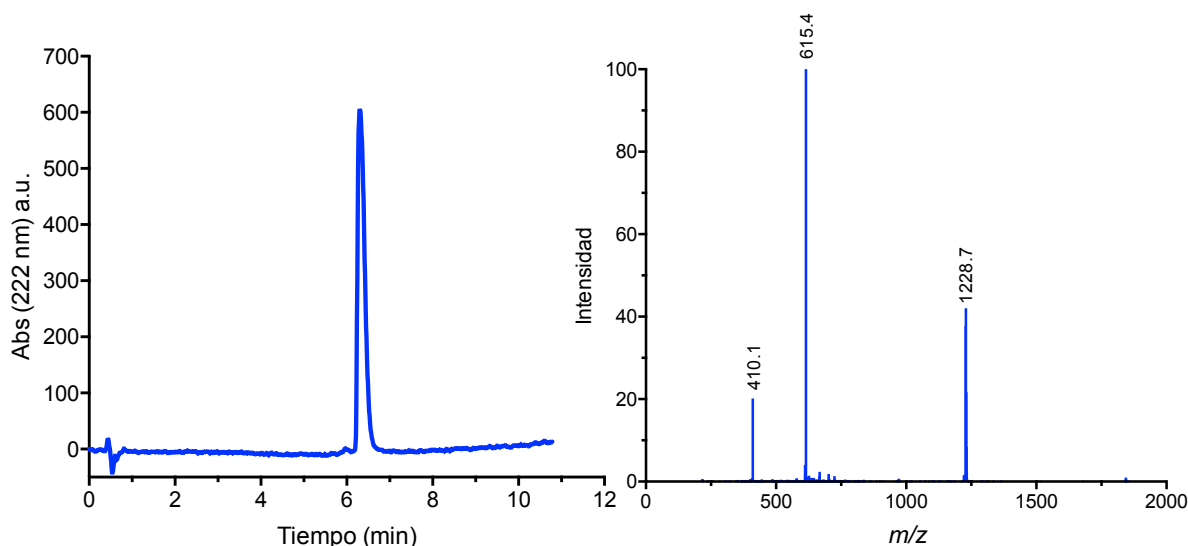
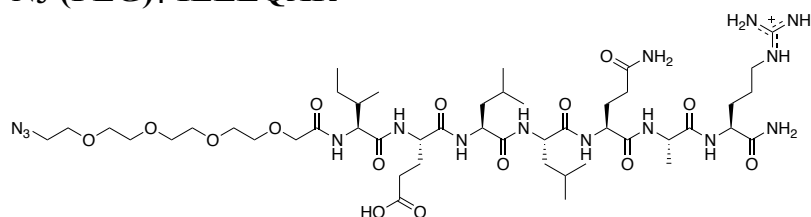


Figura SE38. Péptido P<sub>1</sub>. HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>R</sub> 6,32 min.

## 2.6 Péptido P<sub>2</sub>: N<sub>3</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-IELLQAR



Siguiendo el protocolo general para la SPPS con una funcionalización en el extremo *N*-terminal, N<sub>3</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-IELLQAR (P<sub>2</sub>) se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido blanco esponjoso, 32 mg (29% y 99% de pureza). Fue caracterizado mediante HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min)], t<sub>R</sub> 7,49 min. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 4,42-4,19 (m, 7H), 4,13 (s, 2H), 3,81-3,63 (m, 14H), 3,48 (t, 2H), 3,20 (t, 2H), 2,53-2,28 (m, 4H), 2,17-1,50 (m, 17H), 1,39 (d, 3H), 1,02-0,76 (m, 18H). MS (ESI, H<sub>2</sub>O): 1100,6 (70, [M+H]<sup>+</sup>), 551,0 (100, [M+2H]<sup>2+</sup>). HRMS (ESI): Calculada para C<sub>47</sub>H<sub>87</sub>N<sub>15</sub>O<sub>15</sub> ([M+2H]<sup>2+</sup>): 550,8248; encontrada: 550,8246. Fig. SE39-SE40.

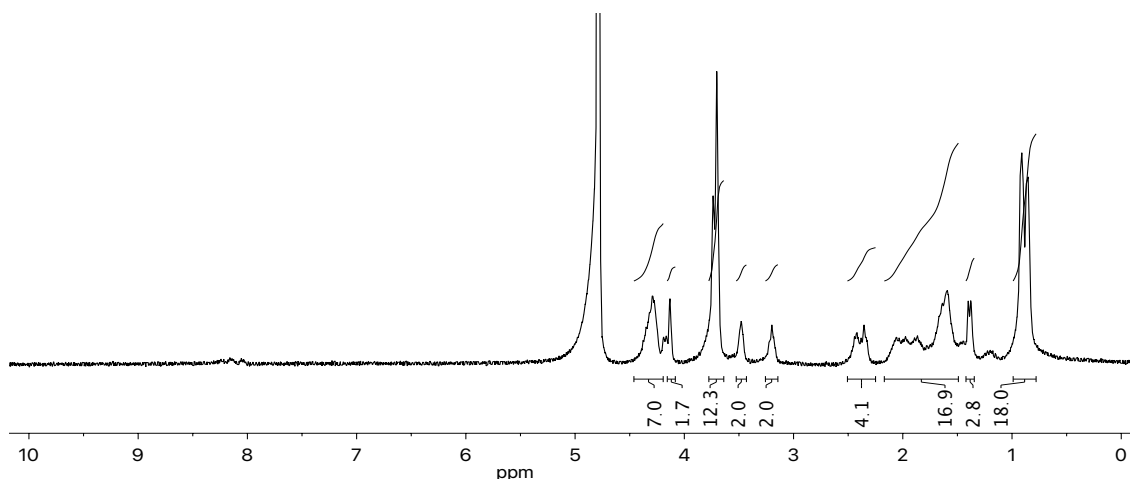


Figura SE39. Péptido P<sub>2</sub>. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O, pico residual del disolvente: D<sub>2</sub>O a 4,79 ppm.

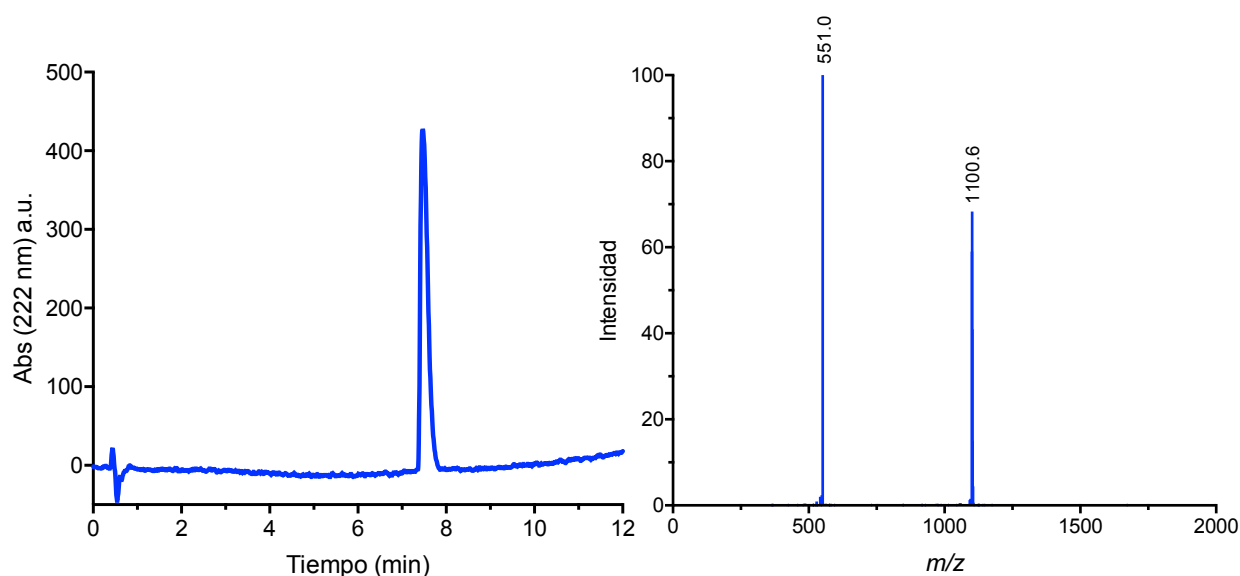
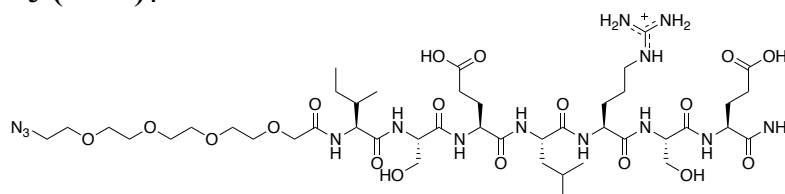


Figura SE40. Péptido P<sub>2</sub>. HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>R</sub> 7,49 min.

## 2.7 Péptido P<sub>C</sub>: N<sub>3</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-ISELRSE



Siguiendo el protocolo general para la SPPS con una funcionalización en el extremo N-terminal, N<sub>3</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-ISELRSE (P<sub>C</sub>) se obtuvo tras su purificación mediante HPLC de fase reversa [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→35 min)] como un sólido blanco esponjoso, 27 mg (25% y 99% de pureza). Fue caracterizado mediante HPLC-MS [H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min)]. t<sub>R</sub> 6,48 min. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O, δ): 4,24-4,06 (m, 7H), 3,99 (s, 2H), 3,92-3,76 (m, 4H), 3,66-3,46 (m, 14H), 3,34 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,06 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 2,41-2,13 (m, 4H), 1,98-1,13 (m, 14H), 0,85-0,63 (m, 12H). MS (ESI, H<sub>2</sub>O): 1091,3 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 546,5 (95, [M+2H]<sup>2+</sup>). HRMS (ESI): Calculada para C<sub>44</sub>H<sub>80</sub>N<sub>14</sub>O<sub>18</sub> ([M+2H]<sup>2+</sup>): 546.2882; encontrada: 546,2885. Fig. SE41-SE42.

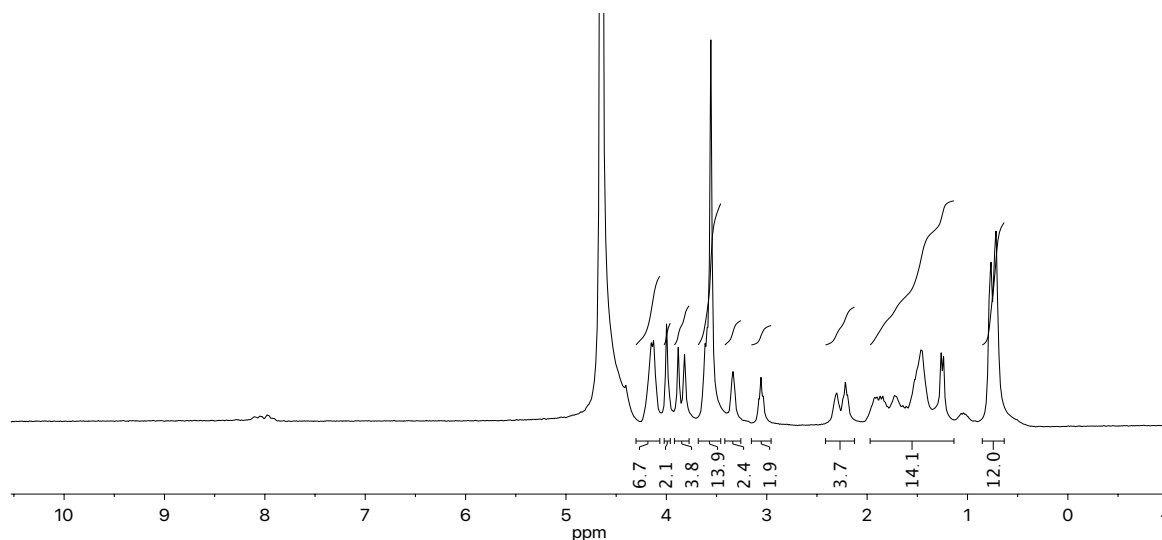


Figura SE41. Péptido P<sub>C</sub>. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O, pico residual del disolvente: D<sub>2</sub>O a 4,79 ppm.

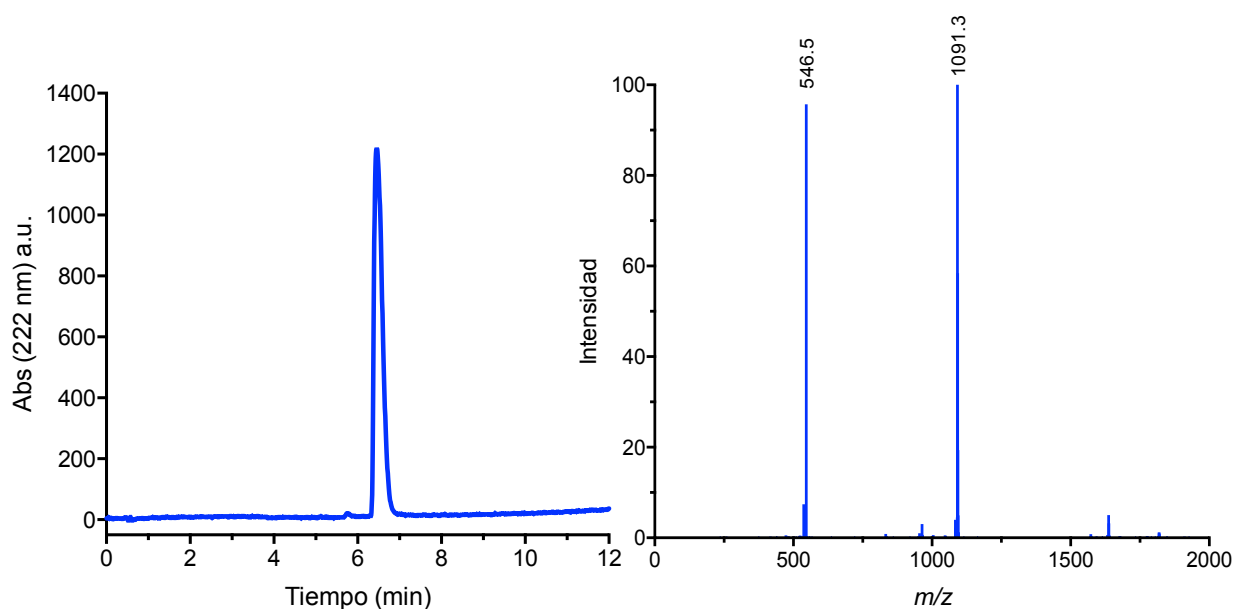


Figura SE42. Péptido P<sub>C</sub>. HPLC-MS(ESI) en H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/CH<sub>3</sub>CN (0,1% TFA) 95:5→5:95 (0→12 min), t<sub>R</sub> 6,48 min.

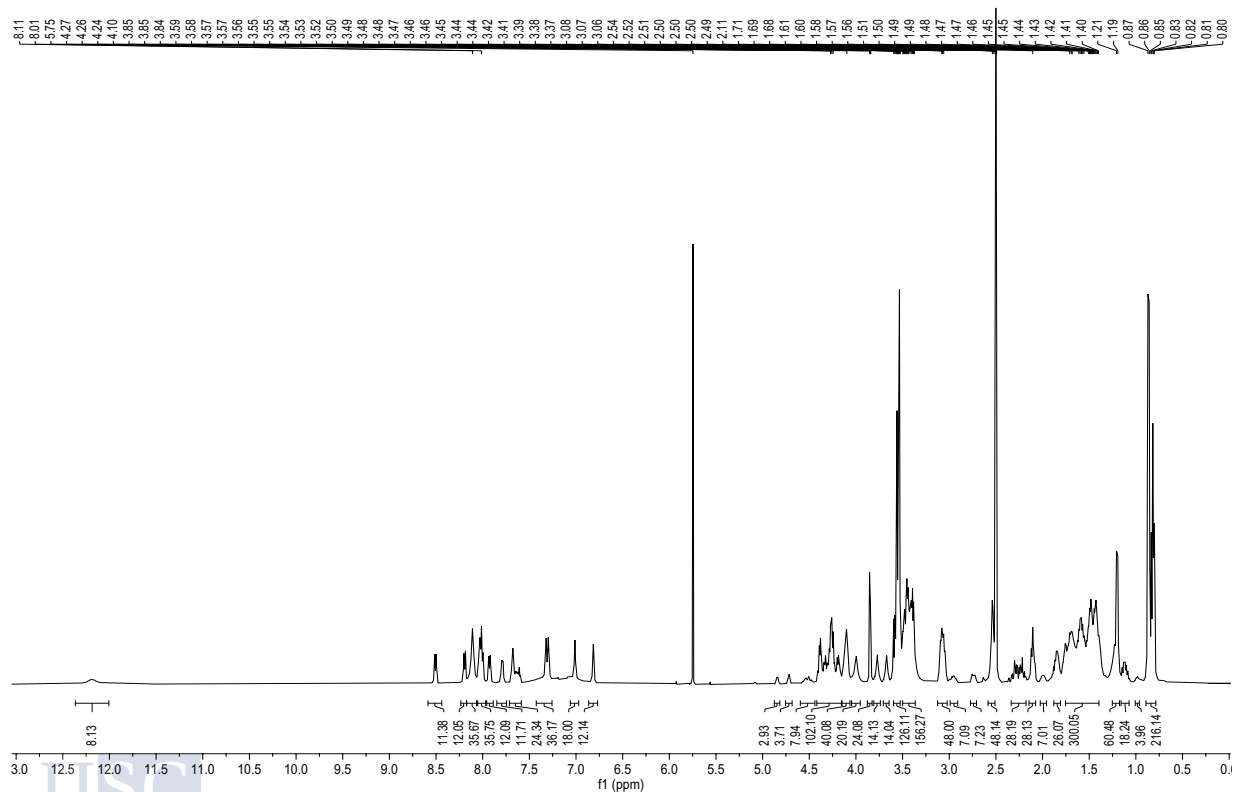
### 3. Síntesis y caracterización de los conjugados péptido/[60]fullereno

#### 3.1 Procedimiento general para la reacción “click” tipo SPAAC para obtener los hexa-aductos simétricos F<sub>1</sub> y F<sub>C</sub>

El hexa-aducto **5**<sup>354</sup> (1 equiv) y los péptidos **P**<sub>1</sub> o **P**<sub>C</sub> (12 equiv), se disolvieron en DMSO (0,6 mL) en un vial de microondas sellado. La solución se calentó a 50°C en un horno de microondas durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, la disolución se precipitó con una mezcla de DCM/Hexano o CHCl<sub>3</sub>/Hexano (1:1, 6000 rpm, 8 min) y se liofilizó, obteniendo los compuestos **F**<sub>1</sub> o **F**<sub>C</sub> (Fig. SE43).



Seguendo el procedimiento general de la **Fig. SE43** y utilizando el péptido **P<sub>1</sub>** (26 mg, 20,96 μmol), se obtuvo el péptido/[60]fullereno **F<sub>1</sub>** (36 mg, cuant.) como un sólido rojo amorfo. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ): 12,19 (s, 12H), 8,51 (d, *J* = 7,8 Hz, 12H), 8,19 (d, *J* = 8,1 Hz, 12H), 8,11 (br s, 36H), 8,07-7,96 (m, 36H), 7,93 (d, *J* = 7,5 Hz, 12H), 7,79 (d, *J* = 7,8 Hz, 12H), 7,71-7,59 (m, 24H), 7,42-7,26 (m, 36H), 7,01 (s, 18H), 6,82 (s, 12H), 4,84 (d, *J* = 7,9 Hz, 3H), 4,72 (s, 4H), 4,59-4,45 (m, 8H), 4,42-4,16 (m, 102H), 4,15-4,06 (m, 40H), 4,05-3,96 (m, 20H), 3,88-3,83 (m, 24H), 3,81-3,74 (m, 14H), 3,71-3,65 (m, 14H), 3,60-3,53 (m, 126H), 3,50-3,36 (m, 156H), 3,12-3,02 (m, 48H), 2,99-2,91 (m, 7H), 2,77-2,71 (m, 7H), 2,59-2,51 (m, 48H), 2,34-2,18 (m, 28H), 2,11 (t, *J* = 8,2 Hz, 28H), 2,02-1,96 (m, 7H), 1,88-1,81 (m, 26H), 1,75-1,40 (m, 300H), 1,25-1,17 (m, 60H), 1,16-1,07 (m, 18H), 1,00-0,96 (m, 4H), 0,89-0,79 (m, 216H); **<sup>13</sup>C-RMN** (125,8 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ): 174,1, 174,1, 173,9, 173,4, 172,3, 172,0, 171,9, 171,8, 171,0, 170,4, 169,1, 169,0, 167,5, 158,3, 158,1, 156,8, 156,8, 145,0, 143,8, 143,5, 140,6, 134,4, 133,8, 73,9, 71,9, 70,7, 70,2, 70,2, 70,0, 69,8, 69,8, 69,8, 69,7, 69,7, 69,7, 69,6, 69,5, 69,4, 69,3, 68,7, 68,2, 67,9, 67,3, 67,0, 63,5, 56,3, 54,9, 52,3, 52,2, 52,0, 51,7, 51,0, 50,8, 50,0, 48,2, 47,9, 47,0, 41,9, 40,6, 40,4, 38,0, 36,2, 35,0, 33,8, 31,7, 31,5, 30,4, 30,1, 29,3, 29,0, 28,5, 28,5, 27,9, 27,6, 26,4, 25,9, 25,3, 24,9, 24,6, 24,1, 24,0, 23,9, 23,6, 23,1, 22,7, 22,1, 21,4, 21,4, 20,8, 20,0, 19,5, 18,0, 17,9, 14,3, 11,1; **XPS** (C<sub>954</sub>H<sub>1536</sub>N<sub>204</sub>O<sub>288</sub>): % atómico: C (284,6 eV) = 65,8, O (531,6 eV) = 20,5, N (398,6 eV) = 13,7; **MALDI-ToF**: *m/z* calculada para C<sub>954</sub>H<sub>1536</sub>N<sub>204</sub>O<sub>288</sub>: 20459,2, encontrada: el alto nivel de fragmentación existente evita la observación del pico de ion molecular esperado. **Fig. SE44-SE46**.



**Figura SE44.** Compuesto **F<sub>1</sub>**. Espectro de **<sup>1</sup>H-RMN** en DMSO-*d*<sub>6</sub>, pico residual del disolvente: DMSO-*d*<sub>6</sub> a 2,50 ppm.





Calculada para:  $C_{846}H_{1308}N_{168}O_{312}$ : 18813,2, encontrada: el alto nivel de fragmentación existente evita la observación del pico de ion molecular esperado. **Fig. SE47-SE49.**

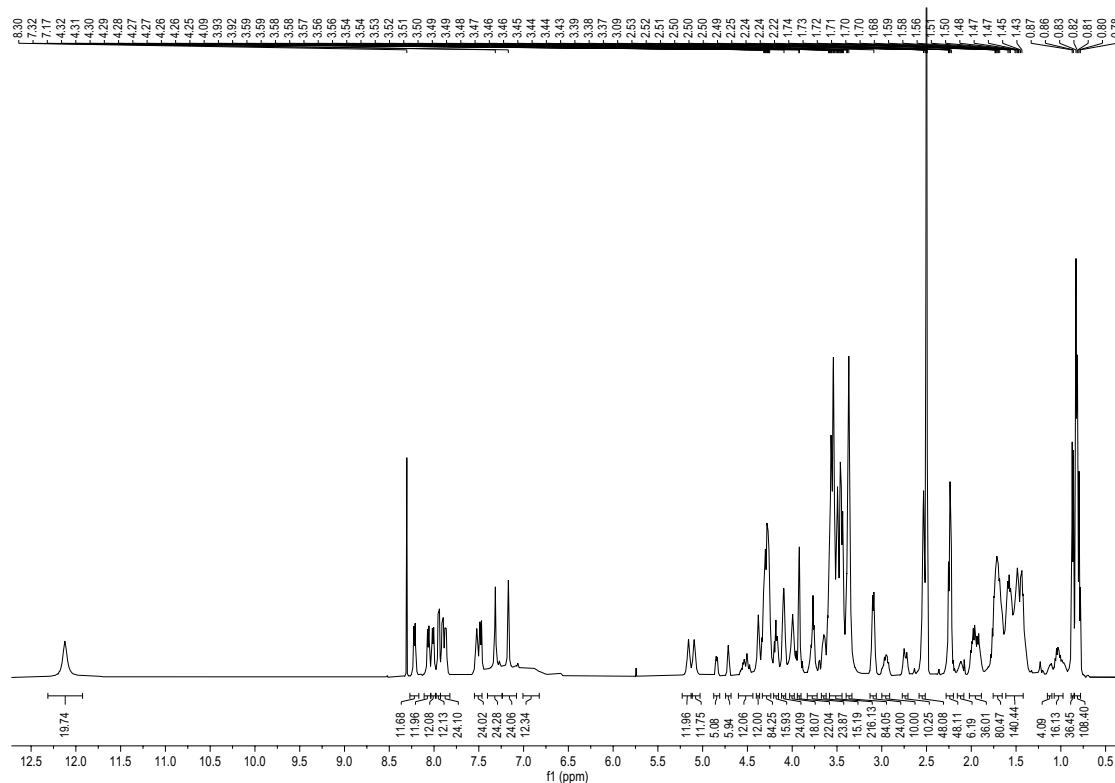


Figura SE47. Compuesto Fc. Espectro de  $^1H$ -RMN en  $DMSO-d_6$ , pico residual del disolvente:  $DMSO-d_6$  a 2,50 ppm y señal de  $CHCl_3$  a 8,27 ppm.

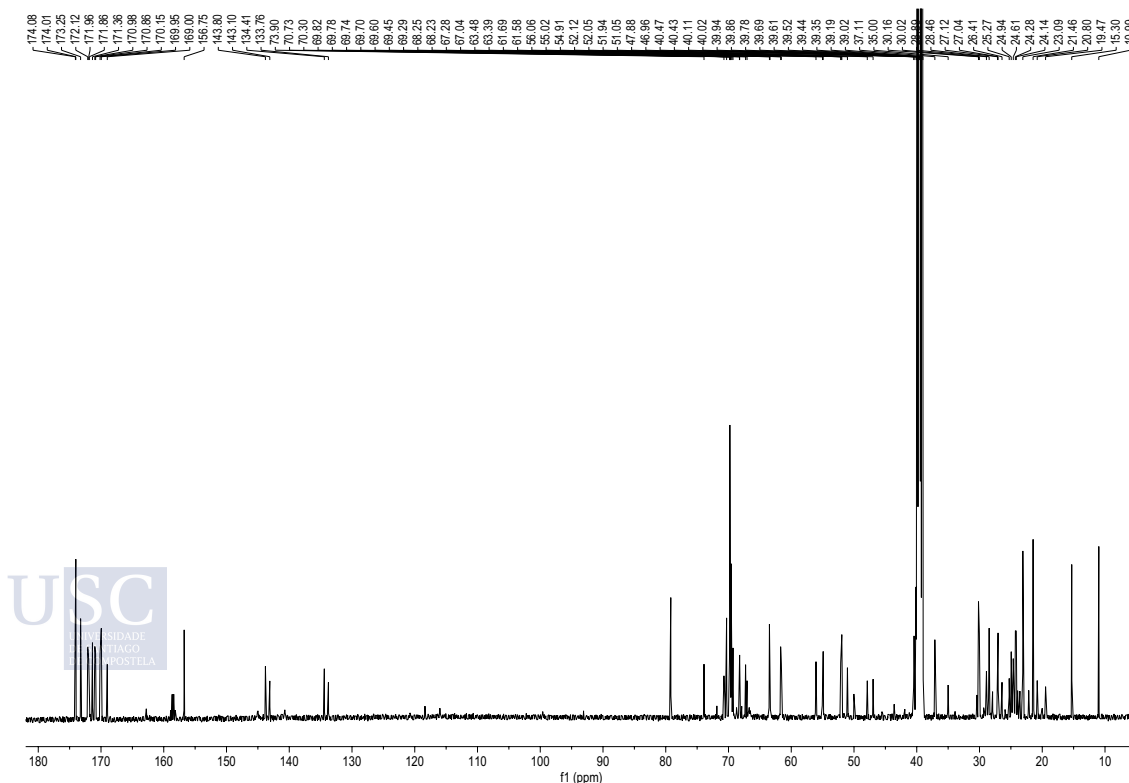


Figura SE48. Compuesto Fc. Espectro de  $^{13}C$ -RMN en  $DMSO-d_6$ , pico residual del disolvente:  $DMSO-d_6$  a 39,5 ppm.

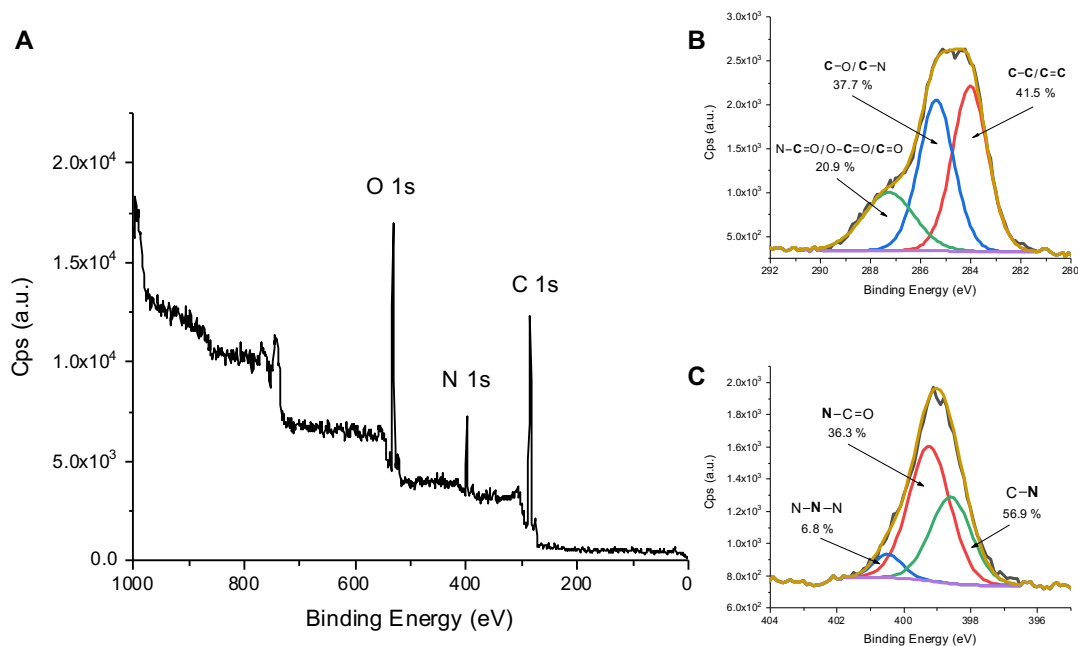
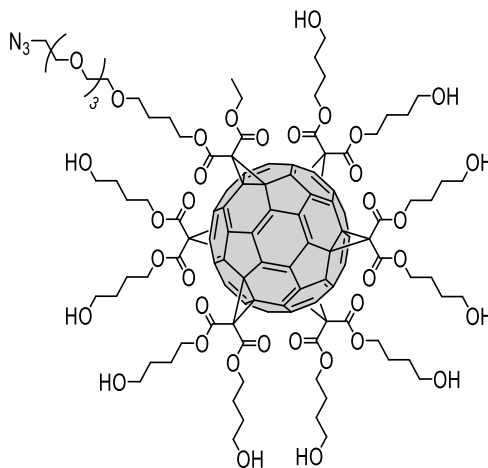


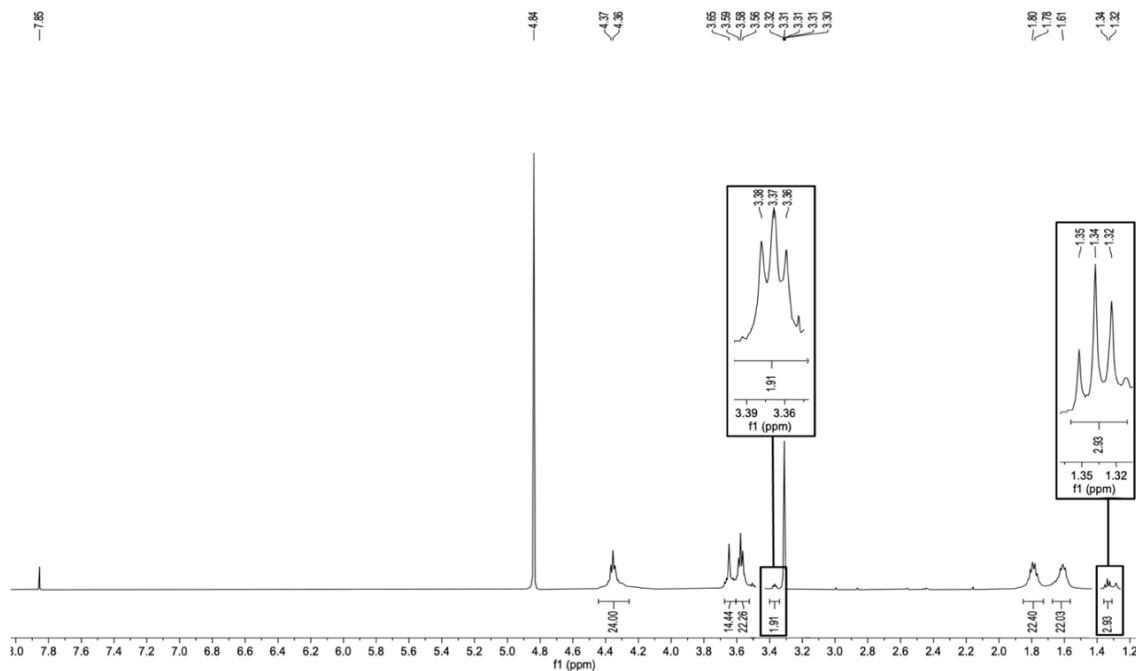
Figura SE49. A) Espectro XPS del compuesto Fc, con las componentes B) C 1s y C) N 1s descompuestas.

### 3.4 Compuesto 8

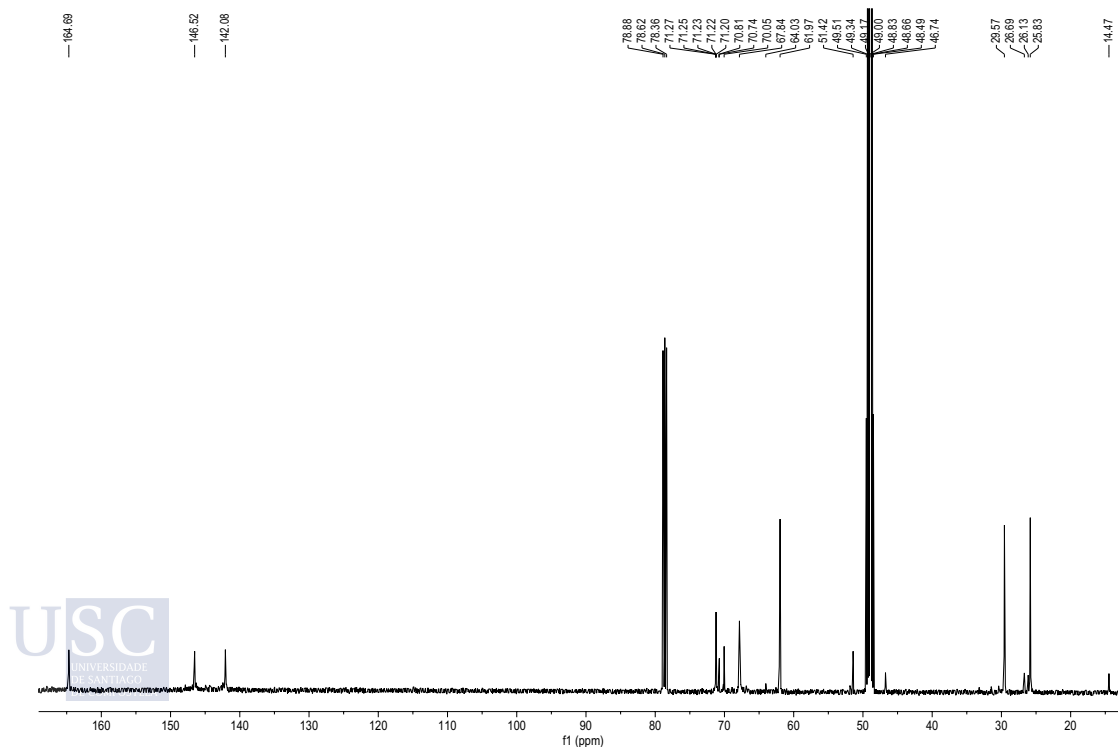


A una solución del hexa-aducto  $7^{252}$  (120 mg, 51,13  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (4 mL) se añadió azida sódica (17 mg, 0,26 mmol). La mezcla se agito a  $60^\circ\text{C}$  durante 3 días. Después de este tiempo, se concentró el disolvente y se purificó el crudo por cromatografía de exclusión por tamaños (Sephadex LH-20, MeOH/DCM 1:1), dando lugar al hexa-aducto **8** (120 mg, cuant.) como un sólido rojo amorfo. FTIR (KBr,  $\nu\text{ cm}^{-1}$ ) 3401, 2925, 2856, 2104, 1741, 1261, 1219;  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD} + \varepsilon\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 4,44-4,26 (m, 24H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,linker,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3,67-3,61 (m, 14H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 3,61-3,52 (m, 22H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,linker), 3,37 (t, 2H,  $J = 4,9$ ,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 1,85-1,73 (m, 22H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,linker), 1,68-1,56 (m, 22H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,linker), 1,34 (t, 3H,  $J = 7,1$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-RMN}$  (125,8 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD} + \varepsilon\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 164,7 (CO), 146,5 ( $\text{C}_{\text{sp}2}$ ,fullerene), 142,1 ( $\text{C}_{\text{sp}2}$ ,fullerene), 71,3 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 71,2 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 71,2 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 71,2 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 71,2 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 70,8 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 70,7 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 70,0 ( $\text{C}_{\text{sp}3}$ ,fullerene), 67,8 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,linker), 64,0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,linker), 62,0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), 51,4

(CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 46,7 (C<sub>q,bridge</sub>), 29,6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 26,7 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O<sub>linker</sub>), 26,1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2,linker</sub>), 25,8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 14,5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); **MALDI-ToF**: *m/z* calculada para C<sub>132</sub>H<sub>119</sub>N<sub>3</sub>O<sub>38</sub>: 2354,6, encontrada: 2377,7 [M+Na]<sup>+</sup>. **Fig. SE50-S52.**



**Figura SE50.** Compuesto **8**. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en CD<sub>3</sub>OD + εCDCl<sub>3</sub>, señales de los disolventes: pico de CDCl<sub>3</sub> a 7,85 ppm, señal de H<sub>2</sub>O a 4,84 ppm y pico residual de CD<sub>3</sub>OD a 3,31 ppm.



**Figura SE51.** Compuesto **8**. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN en CD<sub>3</sub>OD + εCDCl<sub>3</sub>, señales de los disolventes: pico residual de CDCl<sub>3</sub> a 79,4 ppm y CD<sub>3</sub>OD a 49,0 ppm.

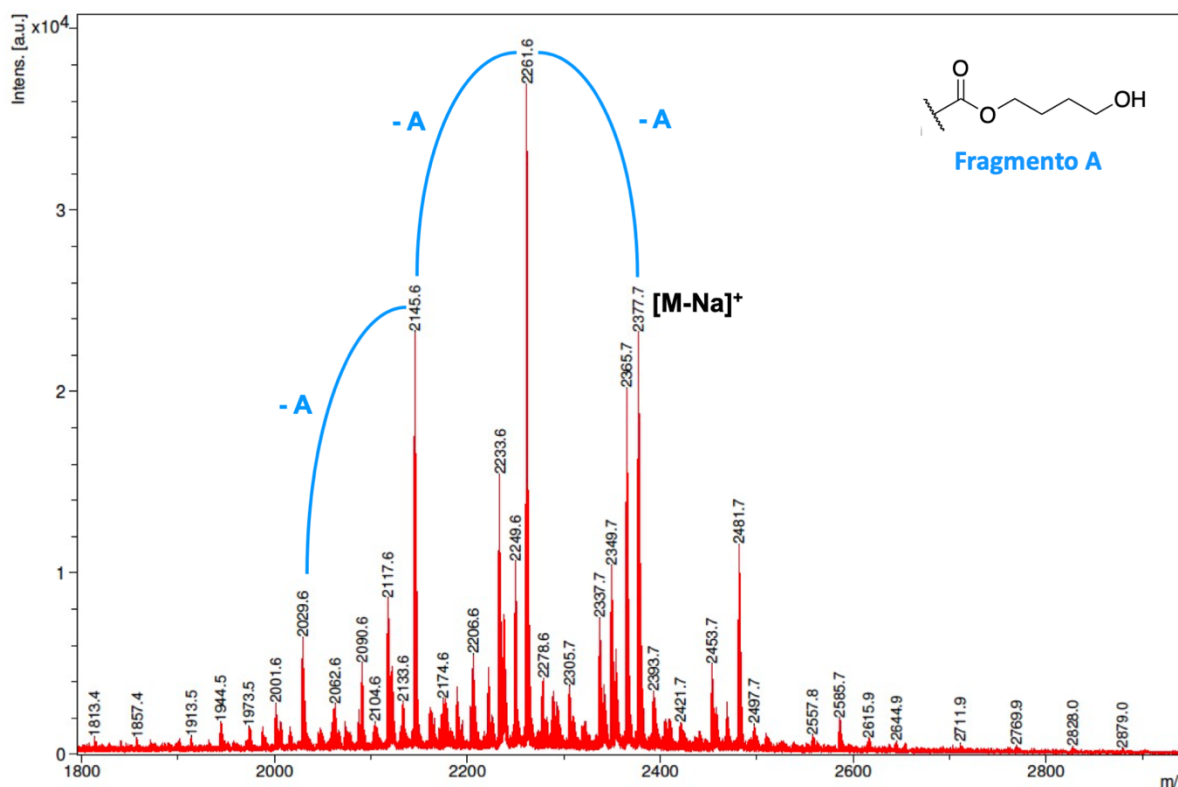
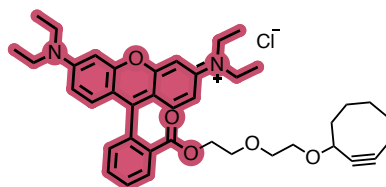


Figura SE52. Compuesto 8. Espectro de MALDI-ToF (matriz: DCTB).

### 3.5 Compuesto 10



A una disolución de Rhodamine B (100 mg, 0,21 mmol) y el derivado de ciclooctino **9**<sup>354</sup> (66 mg, 0,31 mmol) en una mezcla seca de DCM/DMF (5,5 mL, 10:1) bajo atmósfera de Ar, se añaden secuencialmente DMAP (41 mg, 0,33 mmol) y EDAC (60 mg, 0,31 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Una vez completada la reacción, se evaporó el disolvente. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 15:1  $\rightarrow$  8:1) para obtener el compuesto **10** (140 mg, cuant.) como un aceite rosa. **FTIR** (KBr,  $\nu \text{ cm}^{-1}$ ) 3402, 2929, 2856, 1719, 1590, 1341, 1182, 682; **<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 8,32 (dd,  $J = 7,7, 1,5$  Hz, 1H, H-Ar), 7,80 (td,  $J = 7,6, 1,5$  Hz, 1H, H-Ar), 7,71 (td,  $J = 7,7, 1,4$  Hz, 1H, H-Ar), 7,28 (dd,  $J = 7,5, 1,4$  Hz, 1H, H-Ar), 7,07 (s, 1H, H-Ar), 7,03 (s, 1H, H-Ar), 6,89 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H, H-Ar), 6,86 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H, H-Ar), 6,80 (s, 1H, H-Ar), 6,79 (s, 1H, H-Ar), 4,22-4,10 (m, 3H, H-1,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3,62 (m, 9H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CHHO}$ ), 3,56-3,47 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3,40 (m, 1H,  $\text{CHHO}$ ), 2,21-2,01 (m, 3H, H-2a, H-6), 1,97-1,93 (m, 2H, H-2b, H-5a), 1,84-1,72 (m, 2H, H-4a, H-5b), 1,69-1,52 (m, 2H, H-3a, H-4b), 1,41 (m, 1H, H-3b), 1,31 (t,  $J = 7,1$  Hz, 12H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); **<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 164,8 (CO), 158,7 (C-Ar), 157,6 (2 x C-Ar), 155,4 (2 x C-Ar), 133,5 (C-Ar), 133,1 (CH-Ar), 131,4 (CH-Ar), 131,2 (2 x CH-Ar), 130,3 (CH-Ar), 130,1 (CH-Ar), 129,6 (C-Ar), 114,1 (2 x CH-Ar), 113,4 (2 x C-Ar), 100,1 (C-7), 96,1 (2 x CH-Ar), 92,5 (C-8), 72,7 (C-1), 70,1 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 68,5 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 68,2 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 64,5 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 46,0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 42,1 (C-2), 34,1 (C-5), 29,6 (C-4),

26,2 (C-3), 20,6 (C-6), 12,5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); **MALDI-ToF:** *m/z* calculada para C<sub>40</sub>H<sub>49</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 672,3, encontrada: 637,3 [M-Cl]<sup>+</sup>, **MALDI-ToF-HRMS:** *m/z* calculada para C<sub>40</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M-Cl]<sup>+</sup>: 637,3636, encontrada: 637,3653. **Fig. SE53-SE54.**

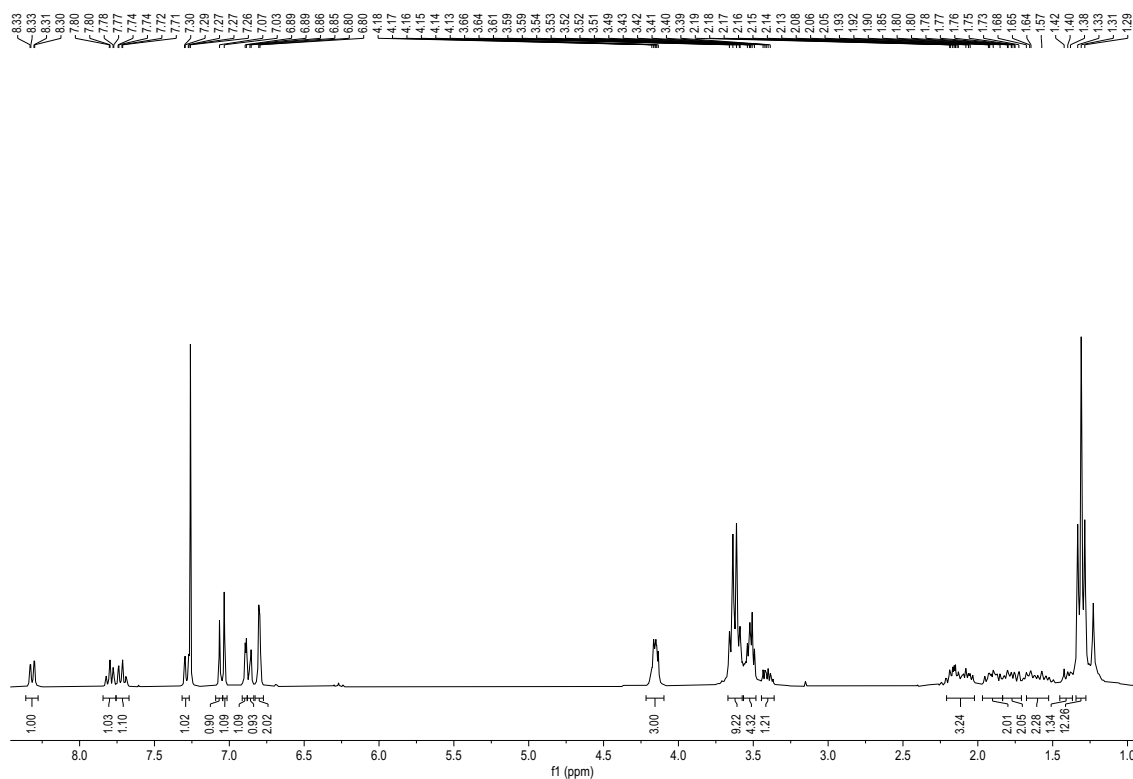


Figura SE53. Compuesto 10. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en CDCl<sub>3</sub>, señal residual de CDCl<sub>3</sub> a 7,26 ppm.

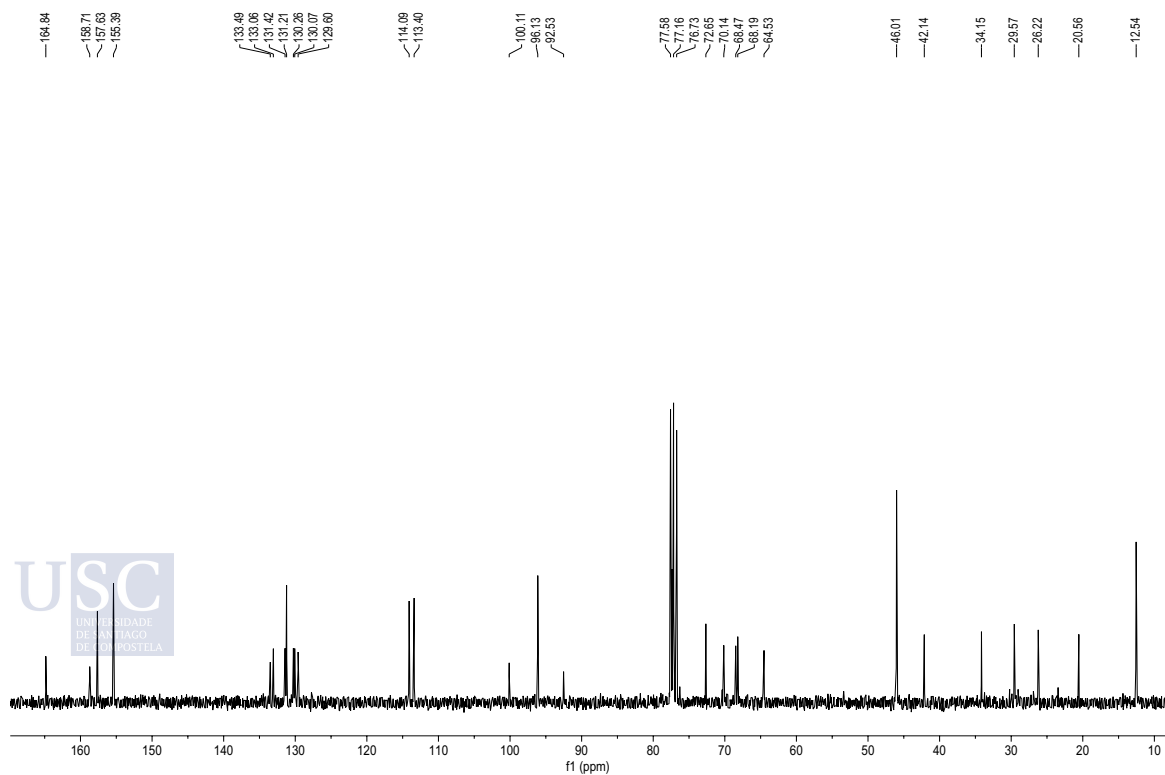
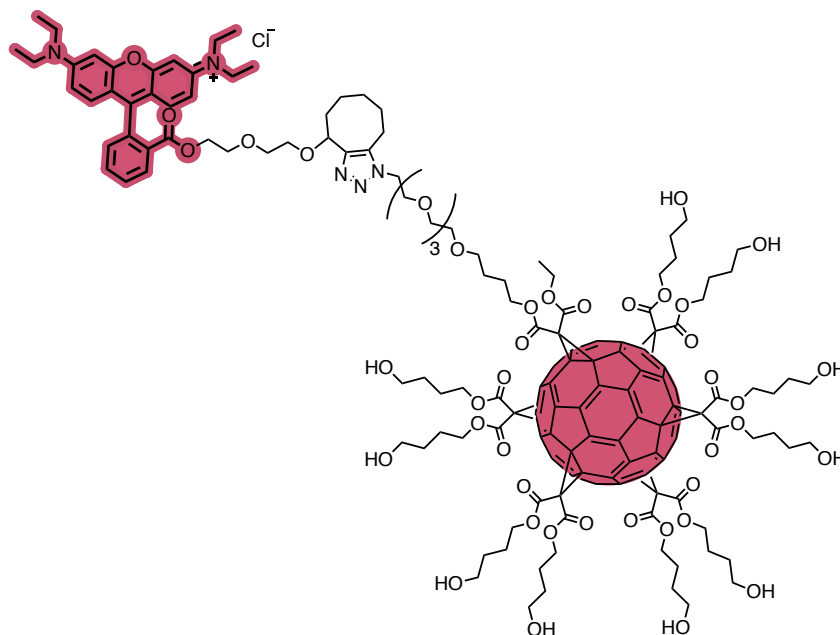


Figura SE54. Compuesto 10. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN en CDCl<sub>3</sub>, señal residual de CDCl<sub>3</sub> a 77,2 ppm.

## 3.6 Compuesto 11



El derivado de Rodamina B **10** (23 mg, 33,99  $\mu\text{mol}$ ) y el hexa-aducto **8** (40 mg, 16,99  $\mu\text{mol}$ ), fueron disueltos en DMSO (2 mL) en un vial de microondas sellado. La disolución se calentó a 50°C en un horno de microondas durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, la solución se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño (Sephadex LH-20, MeOH/DCM 1:1), dando lugar al hexa-aducto **11** (51 mg, 99%) como un sólido amorfo rojo. **FTIR** (KBr,  $\nu\text{ cm}^{-1}$ ) 3404, 2925, 2857, 1740, 1589, 1262, 1219, 713;  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD} + \epsilon\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 8,34 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H, H-Ar), 7,84 (t,  $J = 6,9$  Hz, 1H, H-Ar), 7,78 (t,  $J = 7,1$  Hz, 1H, H-Ar), 7,38 (m, 1H, H-Ar), 7,15-7,04 (m, 2H, H-Ar), 7,02-6,90 (m, 2H, H-Ar), 6,93-6,85 (m, 2H, H-Ar), 4,86 (m, 1H, H-1<sub>mi.</sub>), debajo del agua (1H, H-1<sub>mj.</sub>), 4,58 (d,  $J = 10,5$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}_{\text{mi.}}$ ), 4,44-4,13 (m, 27H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2$ ,<sub>Et</sub>,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,<sub>linker</sub>,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}_{\text{mj.}}$ ), 3,88 y 3,79 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}_{\text{both isomers}}$ ), 3,73-3,39 (m, 46H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}_{\text{linker}}$ ,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 3,04 y 2,76 (m, 2H, H-6<sub>both isomers</sub>), 2,23 (m, 1H, H2<sub>ami.</sub>), 2,04 (m, 2H, H2<sub>amj.</sub>, H2<sub>bmi.</sub>), 1,78 (m, 25H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,<sub>linker</sub>, H2<sub>bmj.</sub>, H-3), 1,68-1,50 (m, 26H,  $\text{HOCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,<sub>linker</sub>, H-4, H-5), 1,31 (m, 12H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 0,88 (t,  $J = 6,8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ,<sub>Et</sub>);  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125,8 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD} + \epsilon\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 166,1 (CO), 164,7 (CO<sub>fullerene</sub>), 159,8 (C-Ar), 158,9 (2xC-Ar), 156,7 (2xC-Ar), 146,6 (C<sub>sp2,fullerene</sub>), 145,3 (C-7<sub>mj.</sub>), 144,9 (C-8<sub>min</sub>), 142,2 (C<sub>sp2,fullerene</sub>), 136,5 (C-8<sub>mj.</sub>), 135,6 (C-7<sub>min</sub>), 134,6 (C-Ar), 134,0 (CH-Ar), 132,3 (CH-Ar), 132,2 (2xCH-Ar), 131,3 (CH-Ar), 131,0 (CH-Ar), 130,9 (C-Ar), 115,2 (2xCH-Ar), 114,5 (2xC-Ar), 97,1 (2xCH-Ar), 75,5 (C-1<sub>mj.</sub>), 72,6 (C-1<sub>min</sub>), 71,4, 71,3, 71,3, 71,2, 71,2, 71,1 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 70,9, 70,6 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ <sub>both isomers</sub>), 70,1 (C<sub>sp3,fullerene</sub>), 69,5, 69,4 ( $\text{CH}_2\text{O}_{\text{both isomers}}$ ), 68,8, 68,5 ( $\text{CH}_2\text{O}_{\text{both isomers}}$ ), 67,9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,<sub>linker</sub>), 65,6, 65,5 ( $\text{CH}_2\text{O}_{\text{both isomers}}$ ), 64,1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}_{\text{linker}}$ ), 62,0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), 49,6 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ,<sub>min</sub>), debajo del  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ,<sub>mj.</sub>), 46,9 (C<sub>q,bridge</sub>), 46,7 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 36,3 (C-2<sub>mj.</sub>), 32,7 (C-2<sub>min</sub>), 30,1 (C-5<sub>min</sub>), 29,8 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}_{\text{linker}}$ ), 29,6 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), 27,7 (C-5<sub>mj.</sub>), 26,8 (C-4<sub>mj.</sub>), 26,2 (C-4<sub>min</sub>), 26,0 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,<sub>linker</sub>), 25,9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 25,1 (C-6<sub>min</sub>), 23,4 (C-3<sub>min</sub>), 21,9 (C-3<sub>mj.</sub>), 20,9 (C-6<sub>mj.</sub>), 14,5 ( $\text{CH}_3$ ,<sub>Et</sub>), 12,9 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ); **MALDI-ToF**:  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{172}\text{H}_{168}\text{ClN}_5\text{O}_{43}$ : 3027,4, encontrada: 2992,0  $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ . **Fig. SE55-SE57.**

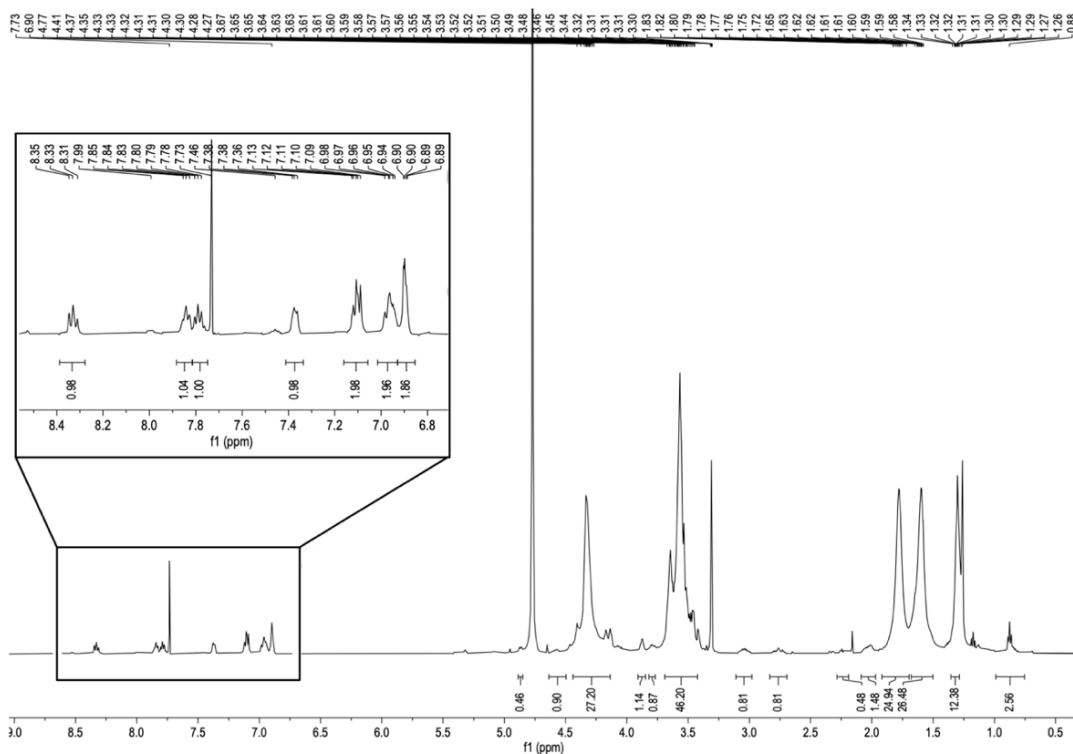


Figura SE55. Compuesto 11. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CD}_3\text{OD} + \epsilon\text{CDCl}_3$ , señales de los disolventes: pico de  $\text{CDCl}_3$  a 7,73 ppm, señal de  $\text{H}_2\text{O}$  a 4,87 ppm y pico residual de  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 3,31 ppm.

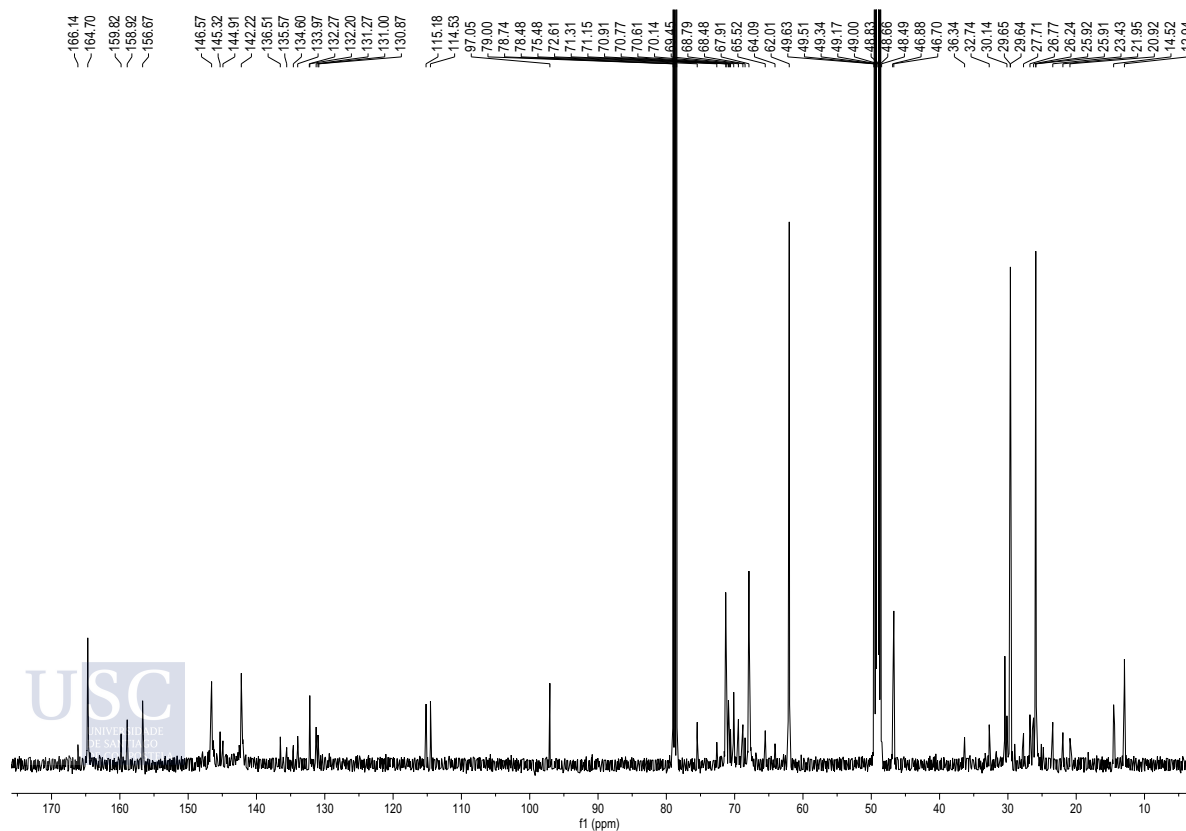


Figura SE56. Compuesto 11. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN en  $\text{CD}_3\text{OD} + \epsilon\text{CDCl}_3$ , señales de los disolventes: pico residual de  $\text{CDCl}_3$  a 77,2 ppm y  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 49,0 ppm.

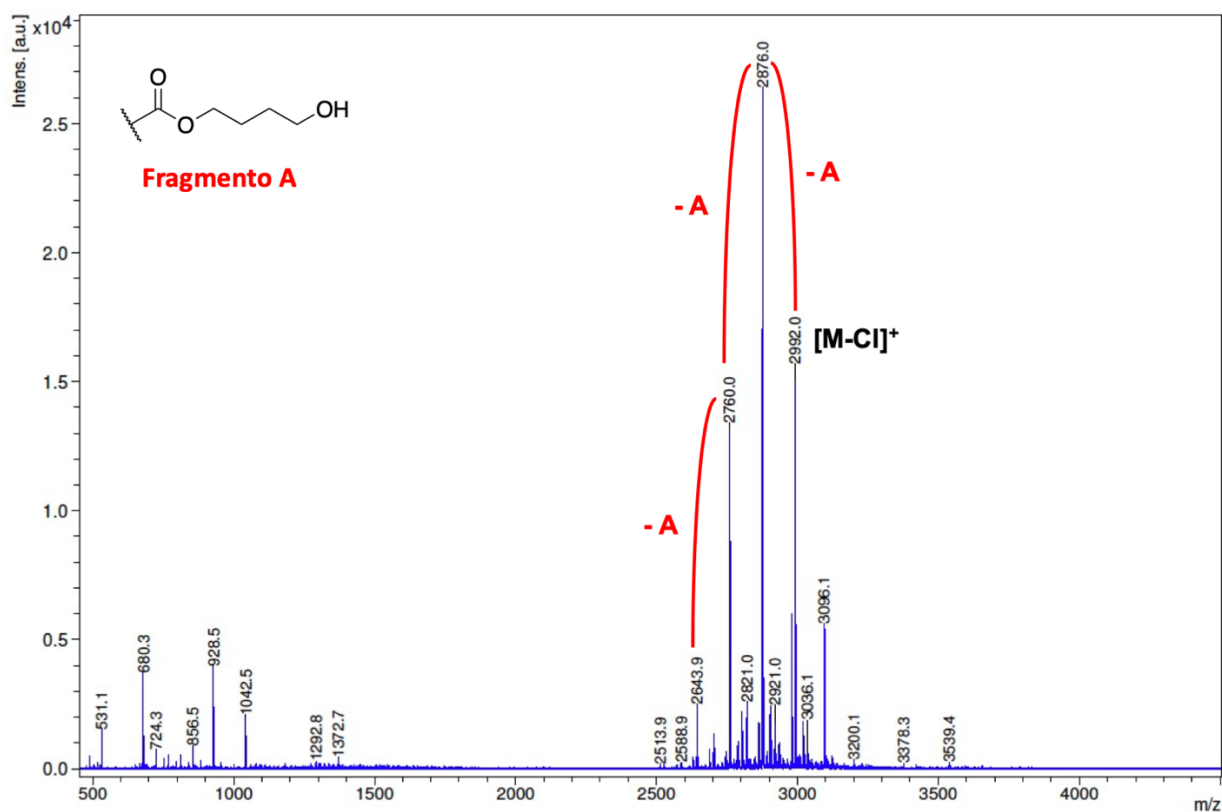
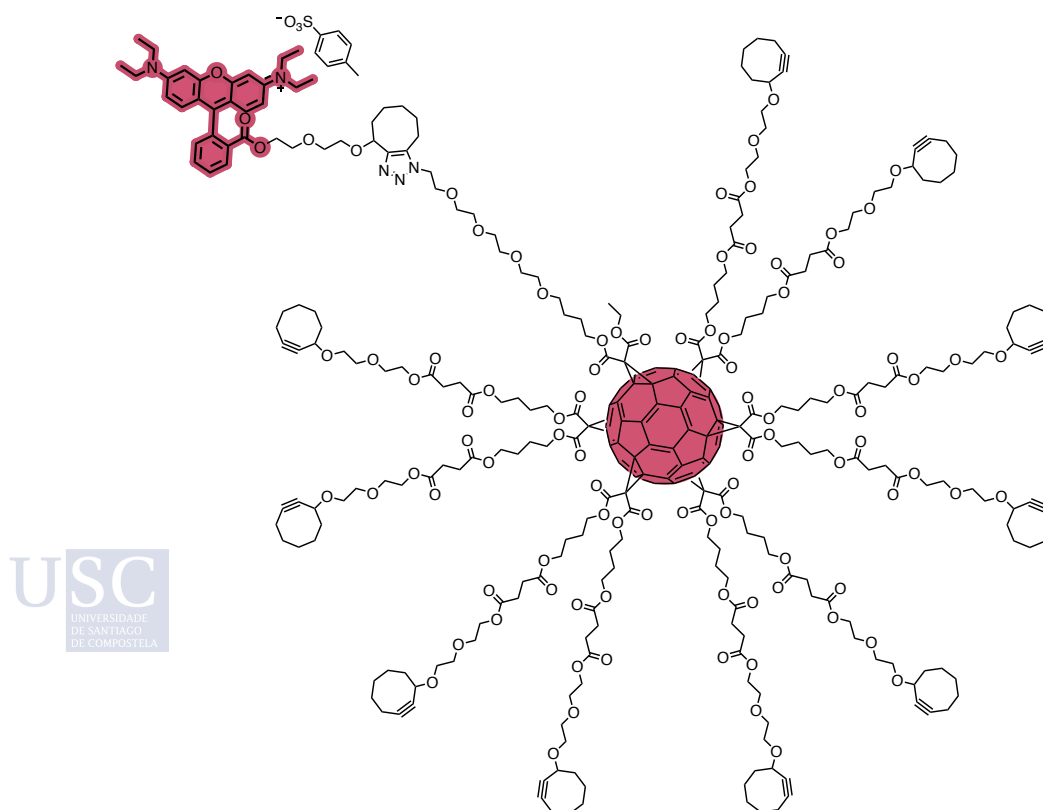
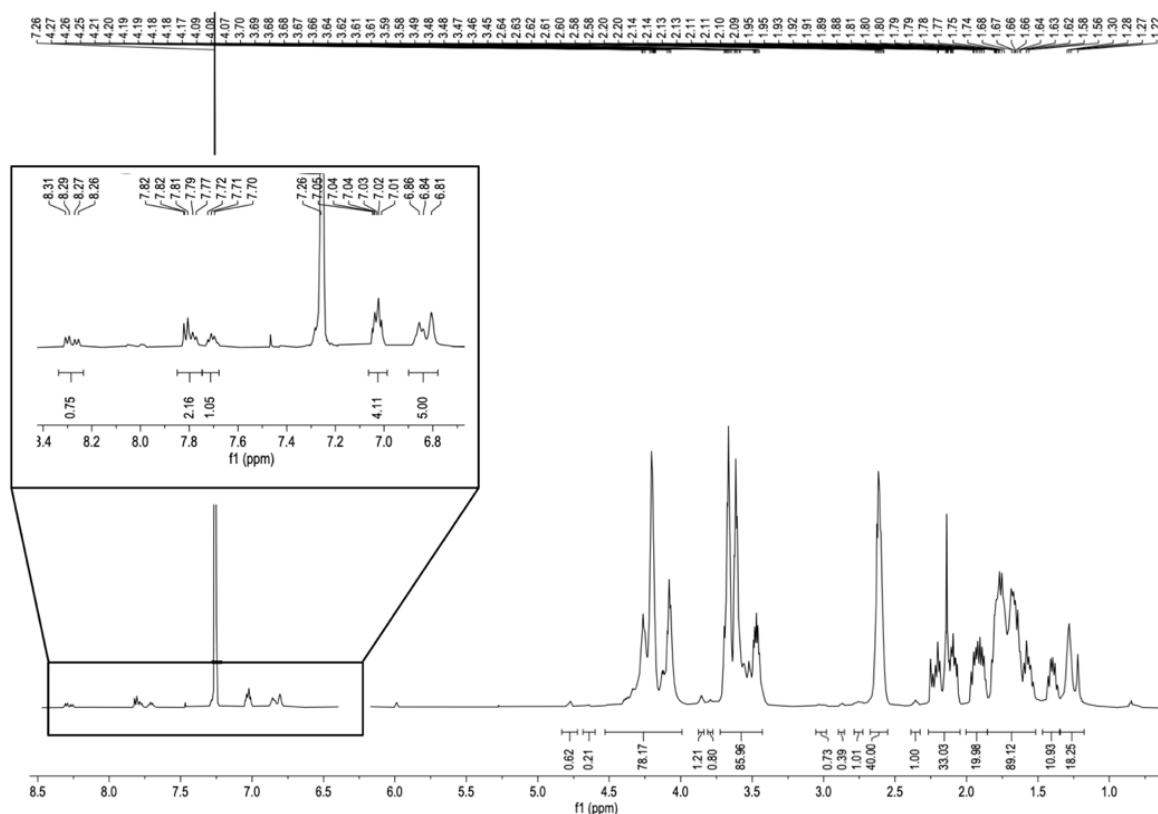


Figura SE57. Compuesto 11. Espectro de MALDI-ToF (matriz: DCTB).

### 3.7 Compuesto 13



A una disolución del compuesto **11** (40 mg, 13,22  $\mu\text{mol}$ ), junto con el derivado de ciclooctino **12**<sup>354</sup> (62 mg, 0,20 mmol) y DPTS (20 mg, 66,10  $\mu\text{mol}$ ) en una mezcla seca de DCM/DMF (1,7 mL, 7,5:1) bajo atmosfera de Ar, se añadió DCC (41 mg, 0,20 mmol) en DCM<sub>seco</sub> (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Una vez completada la reacción, se filtró la la diciclohexilurea en un filtro de vidrio y se lavó con DCM. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaños (Sephadex LH-20, MeOH/DCM 1:1), para obtener **13** (80 mg, 99%) como un aceite rosa. **FTIR** (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ) 2926, 2857, 2208, 1731, 1590, 1210, 1159, 1096, 764; **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 8,28 (m, 1H), 7,85-7,75 (m, 2H), 7,71 (t,  $J = 7,0$  Hz, 1H), debajo del  $\text{CDCl}_3$  (m, 1H), 7,06-6,99 (m, 4H), 6,90-6,78 (m, 5H), 4,78 y 4,64 (m, ambos isómeros, 1H), 4,53-3,99 (m, 78H), 3,86 and 3,79 (m, ambos isómeros, 2H), 3,72-3,43 (m, 86H), 3,01, 2,98 y 2,76 (m, ambos isómeros, 2H), 2,61 (m, 40H), 2,35 (m, 1H), 2,27-2,04 (m, 33H), 2,00-1,85 (m, 20H), 1,85-1,52 (m, 89H), 1,40 (m, 11H), 1,35-1,18 (m, 18H); **<sup>13</sup>C-RMN** (125,8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 172,3, 172,2, 165,0, 163,7, 157,8, 155,6, 152,0, 145,8, 141,1, 134,9, 134,8, 131,3, 128,2, 128,0, 126,4, 114,3, 113,6, 100,1, 98,4, 96,5, 92,8, 88,6, 72,8, 70,7, 70,7, 70,6, 70,4, 69,1, 69,0, 68,8, 68,5, 68,3, 66,5, 63,9, 55,5, 46,2, 43,7, 42,3, 34,3, 33,9, 33,2, 32,1, 31,0, 30,9, 30,5, 30,0, 29,8, 29,2, 29,0, 27,1, 26,4, 25,2, 23,7, 21,3, 20,7, 12,7; **MALDI-ToF**:  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{339}\text{H}_{395}\text{O}_{96}\text{N}_5\text{S}$ : 6107,9, encontrada: 5936.5  $[\text{M-anion}]^+$ . **Fig. S58-S60.**



**Figura SE58.** Compuesto **11**. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en  $\text{CDCl}_3$ , señal residual del  $\text{CDCl}_3$  a 7,26 ppm.

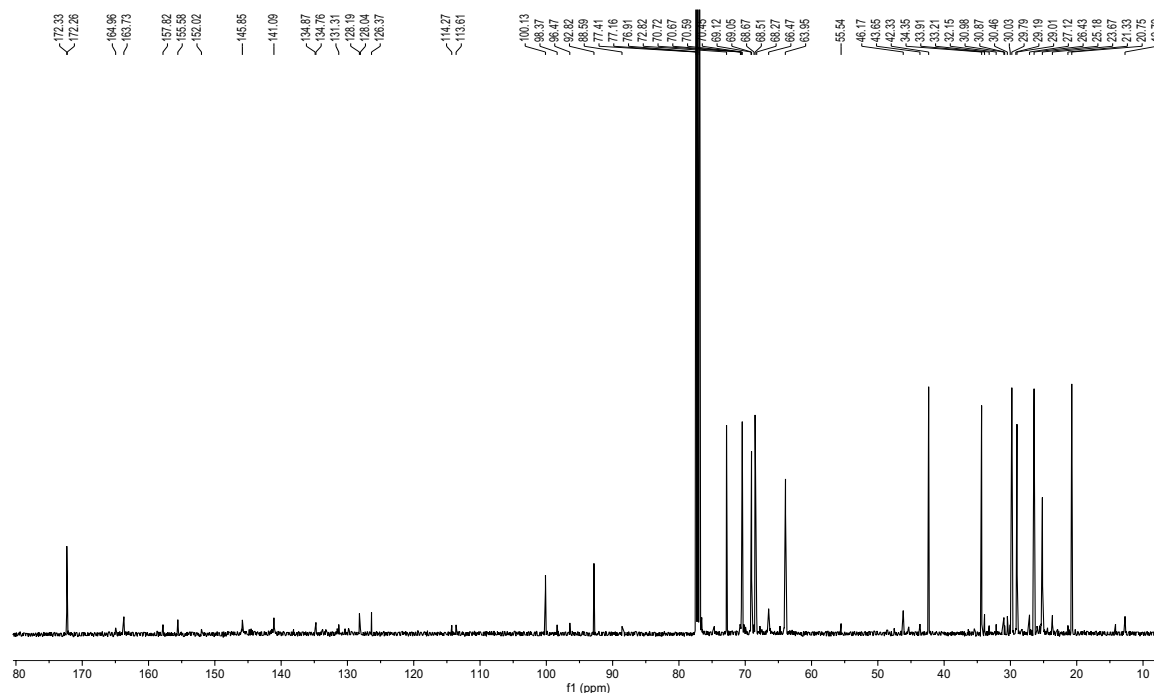


Figura SE59. Compuesto 13. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$ , señal residual de  $\text{CDCl}_3$  a 77,2 ppm.

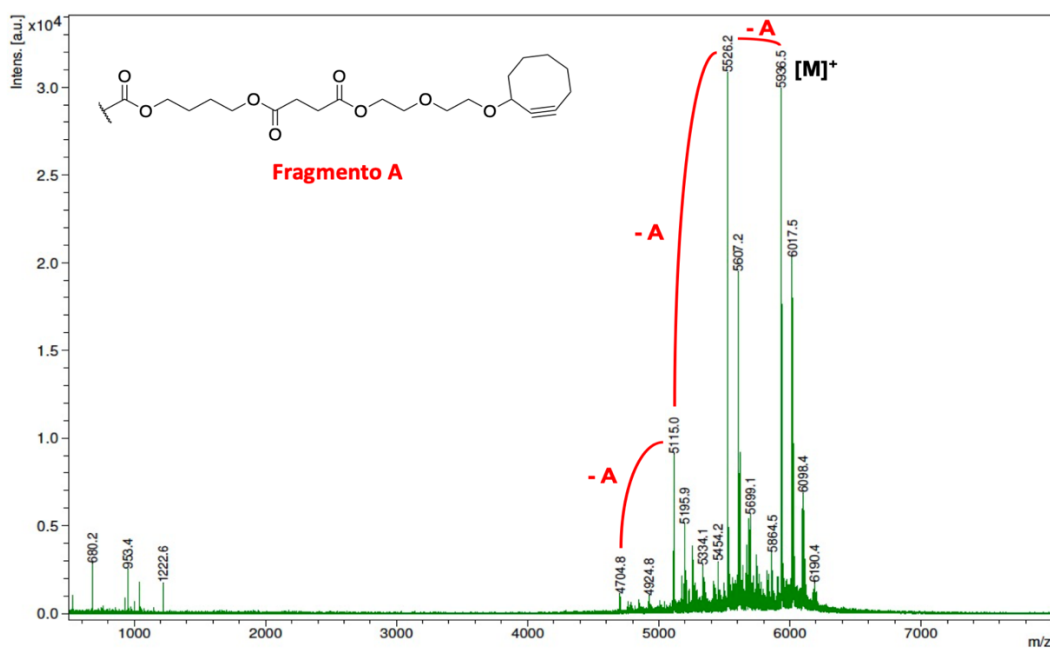


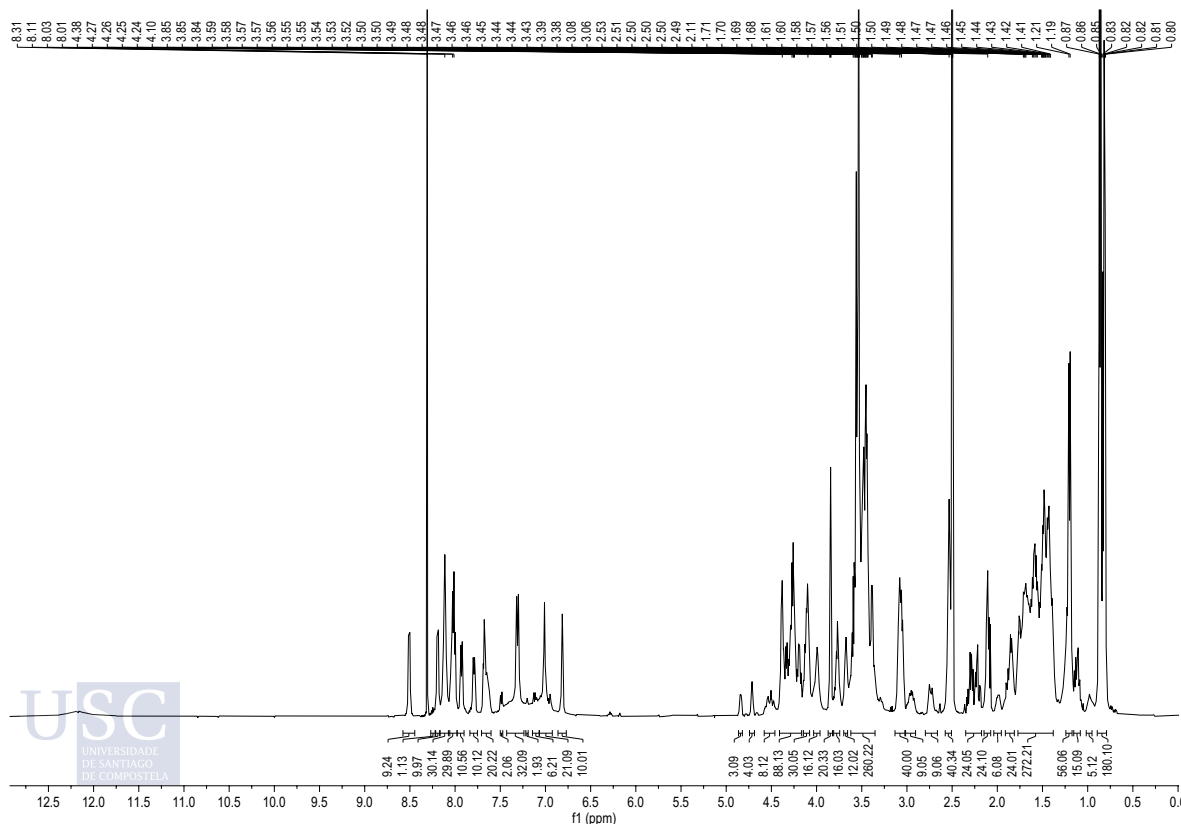
Figura SE60. Compuesto 13. Espectro de MALDI-ToF (matriz: DCTB).

### 3.8 Procedimiento general para la reacción “click” tipo SPAAC para obtener los hexa-adtos asimétricos $\text{F}_1^{\text{RB}}$ y $\text{F}_C^{\text{RB}}$

El derivado de ciclooctino **13** (1 equiv) y los péptidos **P<sub>1</sub>** o **P<sub>C</sub>** (10 equiv), se disolvieron en DMSO (0,6 mL) en un vial de microondas sellado. La disolución se calentó a 50°C en un horno de microondas durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, la solución se precipitó con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ /Hexano (1:1, 6000 rpm, 8 min) y se liofilizó, obteniendo los compuestos  $\text{F}_1^{\text{RB}}$  o  $\text{F}_C^{\text{RB}}$  (Fig. SE61).



Siguiendo el procedimiento general de la **Fig. SE61** y empleando el péptido **P<sub>1</sub>** (31 mg, 25,25  $\mu$ mol), se obtuvo el conjugado péptido/[60]fullereno **F<sub>1</sub><sup>RB</sup>** (46 mg, 99%) como un sólido rosa amorfo. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 12,17 (br s, 10H), 8,51 (d, *J* = 7,9 Hz, 10H), 8,24 (m, 1H), 8,19 (d, *J* = 8,1 Hz, 10H), 8,11 (br s, 30H), 8,06-7,98 (m, 30H), 7,93 (d, *J* = 7,6 Hz, 10H), 7,84-7,75 (m, 10H), 7,71-7,60 (m, 20H), 7,49 (m, 2H), 7,43-7,24 (m, 32H), 7,20 (m, 2H), 7,14-7,07 (m, 6H), 7,06-6,93 (m, 21H), 6,81 (s, 10H), 4,86-4,82 (m, 3H), 4,71 (m, 4H), 4,58-4,46 (m, 8H), 4,41-4,17 (m, 88H), 4,15-4,08 (m, 30H), 4,03-3,96 (m, 16H), 3,87-3,82 (m, 20H), 3,81-3,74 (m, 16H), 3,70-3,66 (m, 12H), 3,62-3,35 (m, 260H), 3,13-3,02 (m, 40H), 3,02-2,91 (m, 9H), 2,78-2,66 (m, 9H), 2,57-2,51 (m, 40H), 2,35-2,17 (m, 24H), 2,11 (t, *J* = 8,2 Hz, 24H), 2,04-1,96 (m, 6H), 1,91-1,81 (m, 24H), 1,77-1,38 (m, 272H), 1,20 (d, *J* = 7,0 Hz, 56H), 1,15-1,08 (m, 15H), 1,02-0,95 (m, 5H), 0,89-0,79 (m, 180H); **<sup>13</sup>C-RMN** (125,8 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 174,1, 174,0, 173,4, 172,3, 172,0, 172,0, 171,8, 171,0, 170,4, 169,1, 169,0, 167,6, 162,8, 158,8, 158,6, 158,5, 158,3, 158,1, 156,8, 156,8, 155,1, 145,0, 143,8, 143,1, 140,6, 134,4, 133,7, 130,9, 128,1, 127,9, 125,5, 120,7, 118,3, 115,9, 113,6, 75,4, 73,9, 71,9, 70,7, 70,3, 70,2, 70,0, 69,9, 69,8, 69,8, 69,8, 69,7, 69,7, 69,7, 69,6, 69,5, 69,4, 69,3, 68,2, 68,2, 67,9, 67,5, 67,3, 67,0, 63,5, 63,4, 56,3, 52,3, 52,2, 52,0, 51,8, 51,0, 50,8, 50,0, 48,2, 47,9, 47,0, 45,3, 43,0, 41,9, 40,6, 40,4, 38,0, 36,3, 35,0, 33,9, 33,5, 33,2, 31,7, 31,5, 30,7, 30,4, 30,1, 29,3, 29,0, 28,5, 27,9, 27,6, 26,4, 25,9, 25,3, 24,9, 24,6, 24,1, 24,0, 23,9, 23,6, 23,3, 23,1, 22,7, 22,2, 21,4, 21,4, 20,8, 20,0, 19,5, 18,0, 17,9, 14,3, 12,2, 11,1; **XPS** (C<sub>869</sub>H<sub>1365</sub>N<sub>175</sub>O<sub>256</sub>S): % atómico: C (284,6 eV) = 67,2, O (531,6 eV) = 19,8, N (398,6 eV) = 13,1; **MALDI-ToF**: *m/z* calculada para C<sub>869</sub>H<sub>1365</sub>N<sub>175</sub>O<sub>256</sub>S: 18380,9, encontrada: el alto nivel de fragmentación existente evita la observación del pico de ion molecular esperado. **Fig. SE62-SE64.**



**Figura SE62.** Compuesto **F<sub>1</sub><sup>RB</sup>**. Espectro de **<sup>1</sup>H-RMN** en DMSO-*d*<sub>6</sub>, señales de los disolventes: pico residual de DMSO-*d*<sub>6</sub> a 2,50 ppm y señal de CHCl<sub>3</sub> a 8,32 ppm.

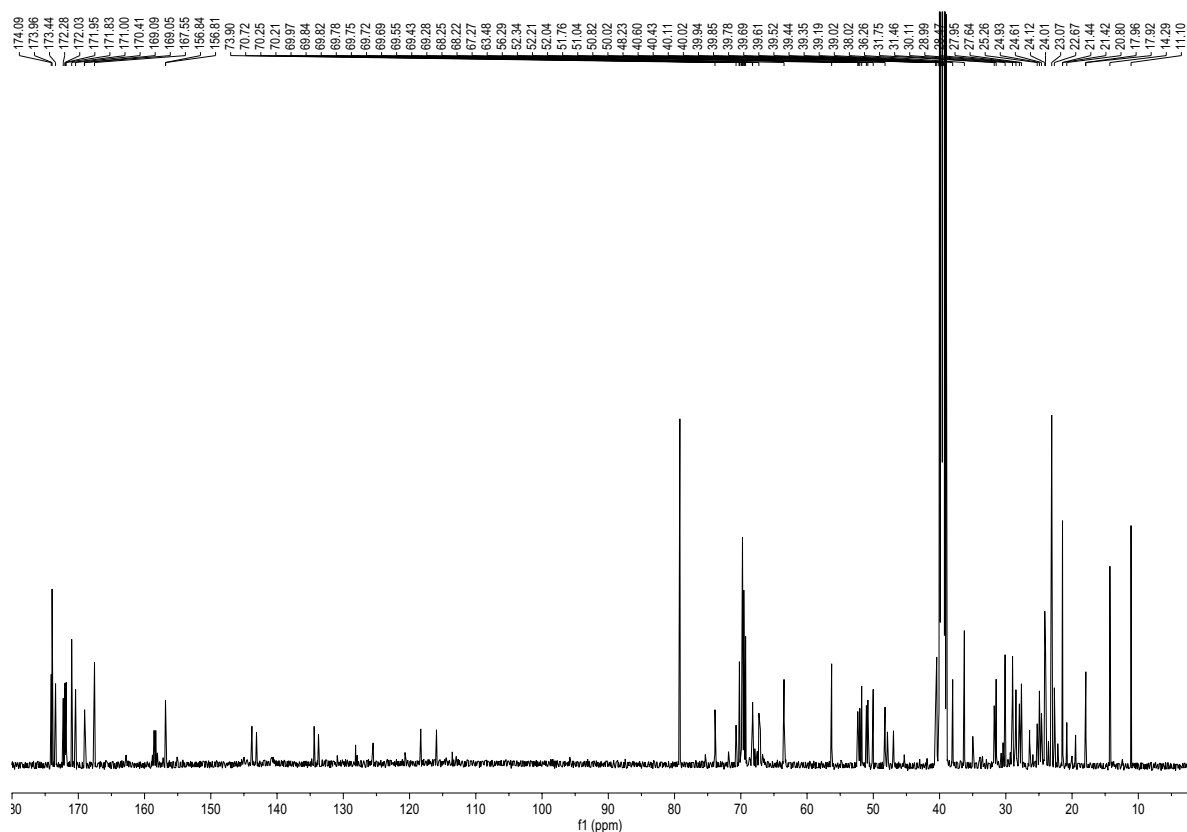


Figura SE63. Compuesto F<sub>1</sub><sup>RB</sup>. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN en DMSO-*d*<sub>6</sub>, señales de los disolventes: pico residual de DMSO-*d*<sub>6</sub> a 39,5 ppm y señal de CHCl<sub>3</sub> a 79,2 ppm.

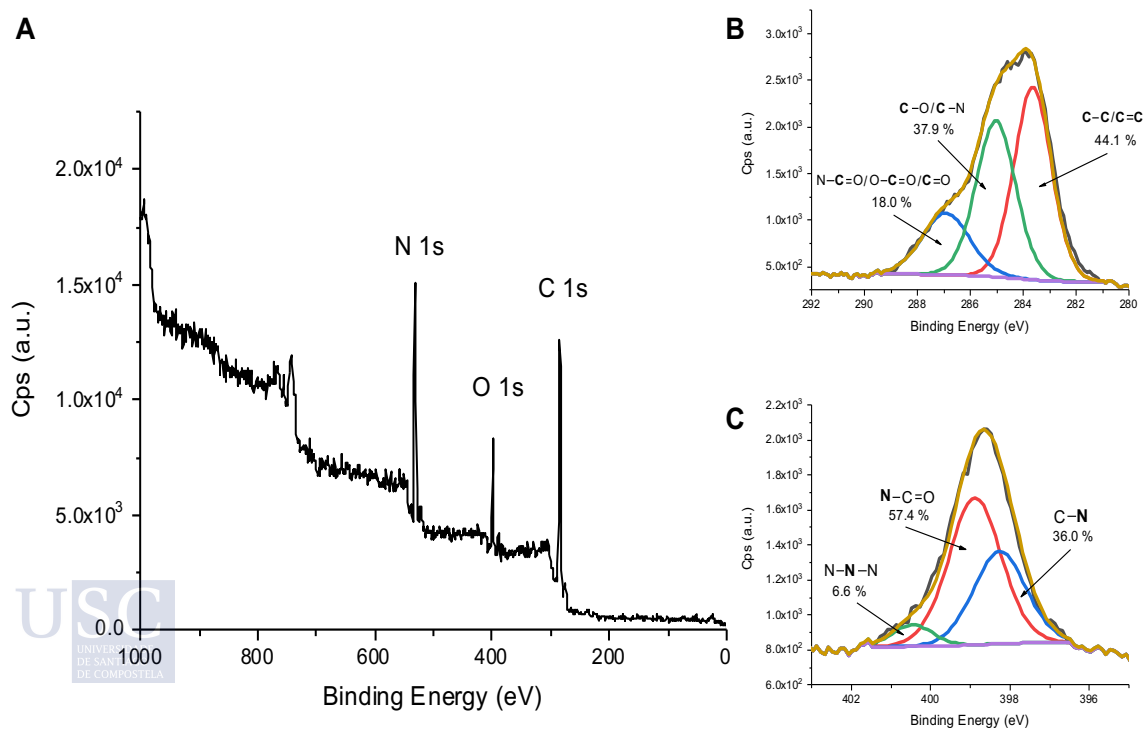


Figura SE64. A) Espectro XPS del compuesto F<sub>1</sub><sup>RB</sup> con las componentes B) C 1s y C) N 1s descompuestas.



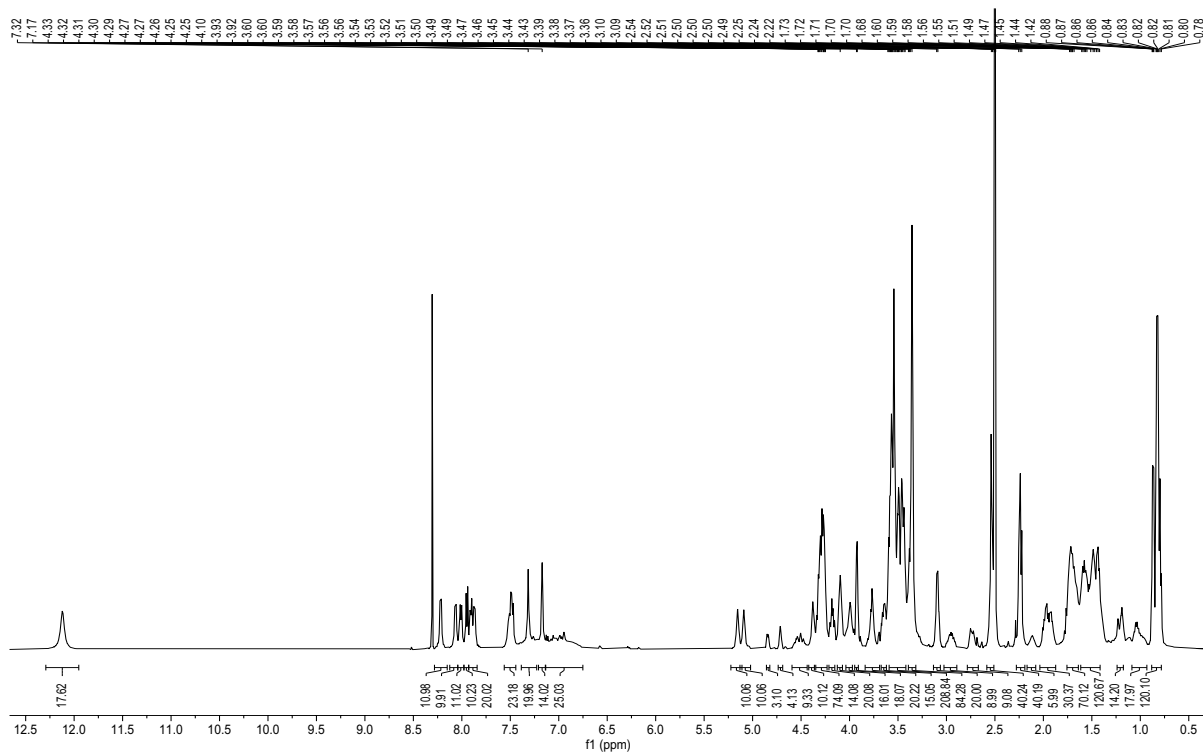


Figura SE65. Compuesto  $F_c^{RB}$ . Espectro de  $^1H$ -RMN en  $DMSO-d_6$ , señales de los disolventes: pico residual de  $DMSO-d_6$  a 2,50 ppm y señal de  $CHCl_3$  a 8,32 ppm.

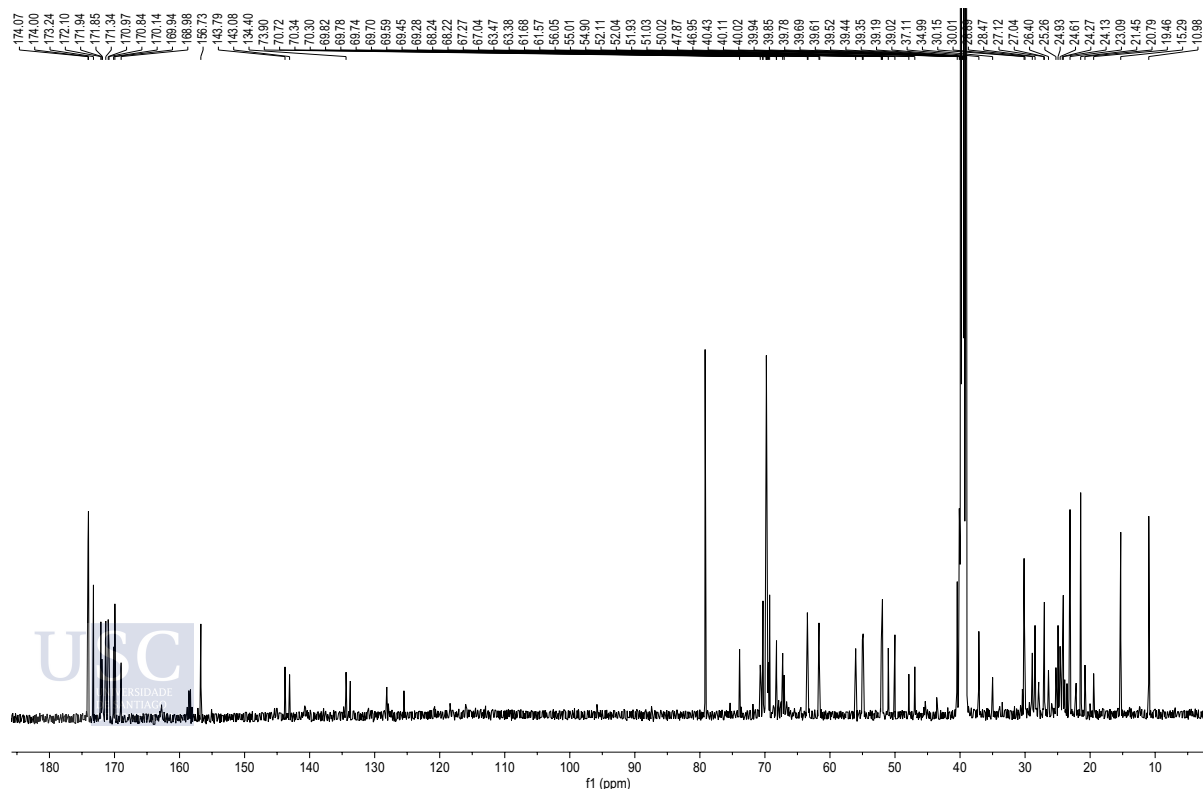


Figura SE66. Compuesto  $F_1^{RB}$ . Espectro de  $^{13}C$ -RMN en  $DMSO-d_6$ , señales de los disolventes: pico residual de  $DMSO-d_6$  a 39,5 ppm y señal de  $CHCl_3$  a 79,2 ppm.

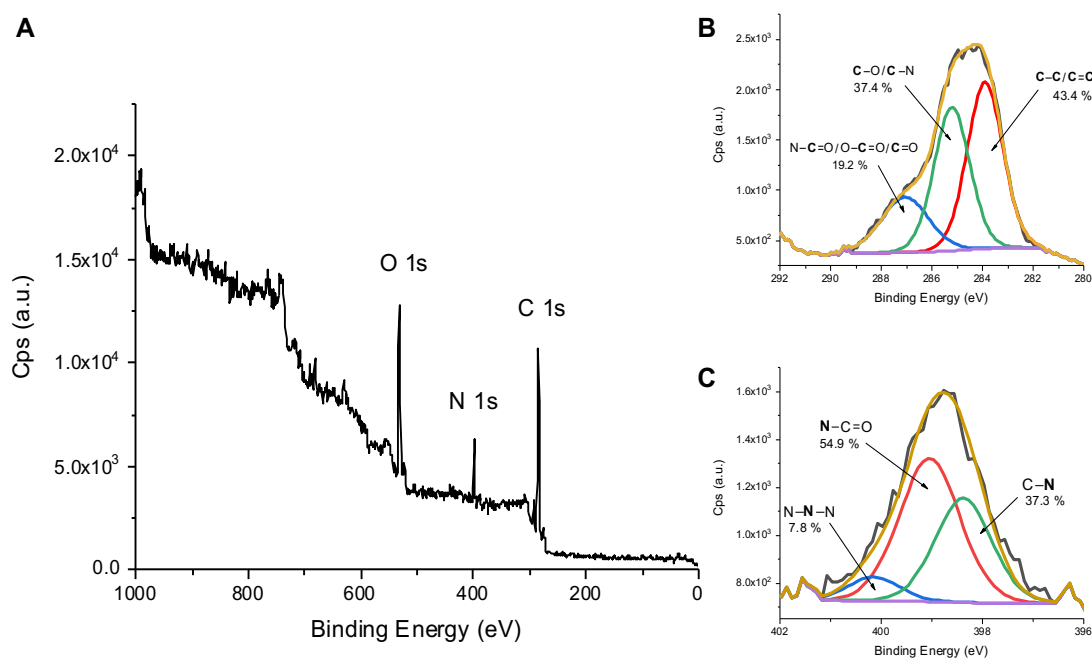


Figura SE67. A) Espectro XPS del compuesto  $Fc^{RB}$  con las componentes B) C 1s y C) N 1s descompuestas.

## 4. Procedimiento general para los experimentos de SPR

### 4.1 Preparación de la superficie del sensor recubierta de E-selectina

En primer lugar, el chip ProteOn GLH se activó haciendo fluir una mezcla 1:1 de 0,1 M de Sulfo-NHS y 0,4 M de EDAC en agua (5 min, 25°C, 30  $\mu$ L/min de flujo). A continuación, se inmovilizó la E-Selectina en diferentes canales haciendo fluir soluciones de 25, 35 o 50  $\mu$ g/mL en tampón de acetato 10 mM pH 4/5, dando como resultado valores de 4000, 8000 y 12000 unidades de respuesta (RUs), que corresponden a coberturas de baja densidad (LD), media densidad (MD) y alta densidad (HD) respectivamente. Posteriormente, los grupos reactivos restantes se desactivaron haciendo fluir una solución de clorhidrato de etanolamina 1M a pH 8,5 (3 min, 25°C, 30  $\mu$ L/min). Se preparó un canal que actuará como blanco mediante la activación con Sulfo-NHS/EDAC, y posterior flujo de clorhidrato de etanolamina 1M, utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente. El tampón de análisis empleado fue 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween 20, pH = 7,4.

### 4.2 Ensayos de interacción

Se prepararon diferentes disoluciones en el buffer de análisis mencionado anteriormente de  $sLe^X$  (5-0,31) mM y los péptidos  $P_1$  y  $P_2$  (4-0,25) mM. Las disoluciones de los fullerenos  $F_1$ ,  $F_C$ ,  $F_1^{RB}$  y  $F_C^{RB}$  (12,5-0,78)  $\mu$ M se prepararon añadiendo primero DMSO y luego el buffer de análisis hasta obtener una concentración final de 2% de DMSO v/v en buffer. Los sensogramas para cada ligando se registraron a 30  $\mu$ L/min en todos los canales con una inyección de 240s (periodo de asociación) seguida de 600s de buffer de análisis (periodo de disociación). Después de cada ciclo de unión, la superficie del chip se regeneró con glicerol al 50% en agua durante 30s a 25°C y 100  $\mu$ L/min. Se realizaron inyecciones duplicadas de cada concentración.

### 4.3 Análisis cinético de la unión de sLe<sup>X</sup> y los péptidos, P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> a la E-selectina

Los sensogramas de SPR se ajustaron a un modelo de unión 1:1. En la fase de asociación, la constante cinética de asociación de pseudo-primer orden del analito a la superficie se calculó utilizando la ec. 3.

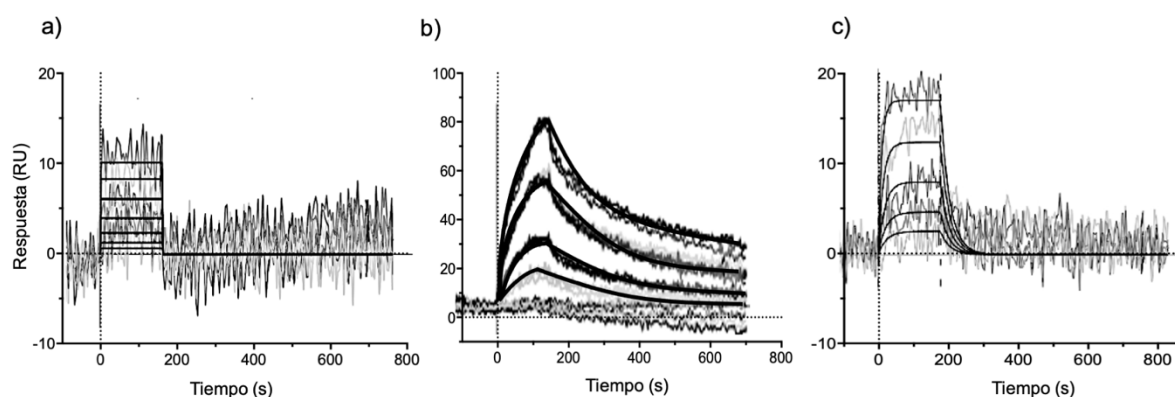
$$R = R_e \cdot (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad [3]$$

Donde  $R_e$  es la respuesta en el equilibrio y  $k_{obs}$  es la constante cinética aparente ( $k_{obs} = k_a \cdot C + k_d$ , siendo  $C$  la concentración del analito).

En la fase de disociación, se empleó la ec. 4:

$$R = R_o \cdot e^{-k_d(t-t_0)} \quad [4]$$

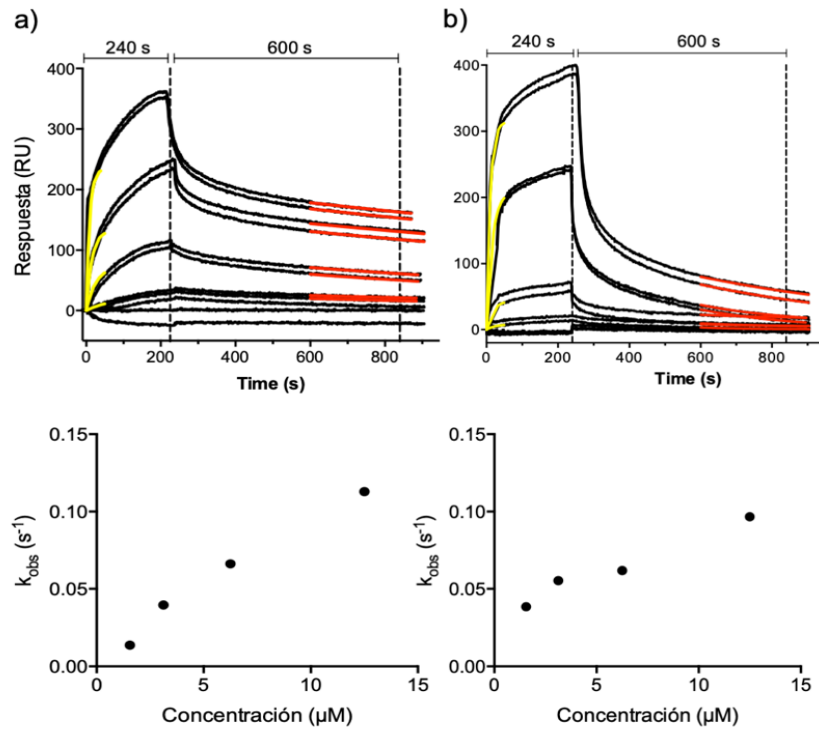
Donde  $R_o$  y  $t_0$  se tomaron como la respuesta y el tiempo global al inicio de la fase de disociación.



**Figura SE68.** Sensogramas de SPR de la unión de a) sLe<sup>X</sup> (5-0,31) mM, b) P<sub>1</sub> c) P<sub>2</sub> (4-0,25) mM, a las superficies funcionalizadas con E-selectina. Gráficos representativos para la funcionalización LD. Las constantes cinéticas obtenidas ( $k_a$ ,  $k_d$  y  $K_D$ , **Tabla 3**) corresponden a la media de las constantes cinéticas para cada una de las concentraciones en la superficies de LD de E-selectina.

### 4.4 Análisis cinético de la unión de los fullerenos F<sub>1</sub> y F<sub>1</sub><sup>RB</sup> a la E-selectina

Para evitar los complejos perfiles de unión típicos de las interacciones multivalentes, llevamos a cabo un análisis cinético de la unión del huésped multivalente a concentraciones diluidas con tiempos de asociación cortos o de disociación largos, como se describe en la literatura.<sup>359</sup> En particular, se consideraron tiempos de asociación inferiores a 50 s y tiempos de disociación superiores a 360 s contando desde el inicio de la fase de disociación, es decir tiempo  $> 600$  s (ver **Fig. SE69**, líneas amarillas y rojas respectivamente). Se utilizaron modelos cinéticos de primer orden como se ha descrito anteriormente. Los ajustes no lineales se realizaron en R utilizando el algoritmo de minimización de Levenberg-Marquardt.<sup>359</sup>



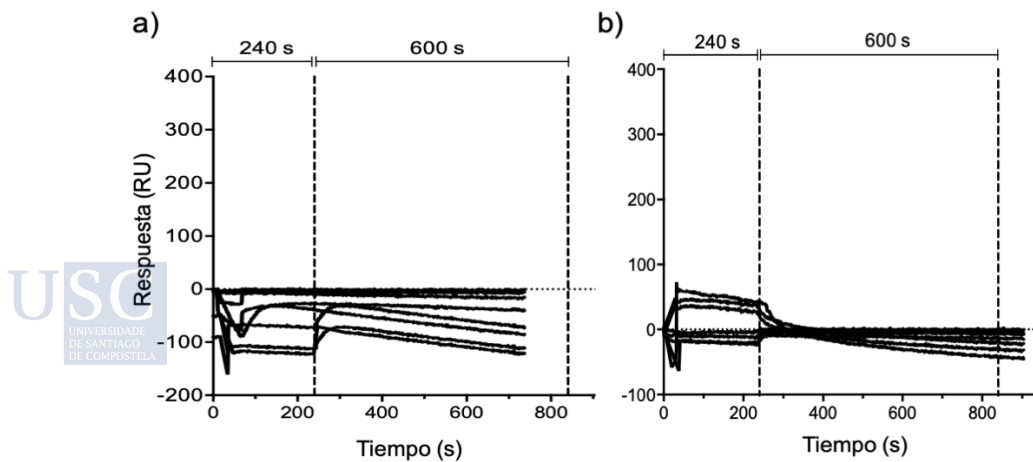
**Figura SE69.** Sensogramas de SPR (arriba) y representación de  $k_{obs}$  vs. concentración (abajo) de a) F<sub>1</sub> y b) F<sub>1</sub><sup>RB</sup> (12,5-0,78) µM, uniéndose a la superficie funcionalizada con E-selectina. Gráficos representativos de la funcionalización de LD. Las constantes cinéticas obtenidas ( $k_a$ ,  $k_d$  y  $K_D$ , Tabla 3) corresponden a la media de las constantes cinéticas para cada una de las concentraciones. Paneles a y b también forman parte de la Fig. 47.

### 4.5 Factor de mejora

El factor de mejora ( $\beta$ )<sup>361</sup> debido a la multivalencia del conjugado péptido/[60]fullereno F<sub>1</sub> se calculó utilizando la ec. 5:

$$\beta = \frac{K_D (monovalent)}{K_D (multivalent) \cdot \text{Número de ligandos}} \quad [5]$$

### 4.6 Sensogramas de los conjugados control péptido/[60]fullereno F<sub>C</sub> y F<sub>C</sub><sup>RB</sup>



**Figure SE70.** Sensogramas de SPR de la interacción de a) F<sub>C</sub> y b) F<sub>C</sub><sup>RB</sup> (12,5-0,78) µM a la superficie funcionalizada con E-selectina. Gráficos representativos para la funcionalización de baja densidad (LD).

## 5. Líneas celulares y cultivos

La línea celular HUVEC se incubó en un incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad con medio de crecimiento celular endotelial. Las células HUVEC (100.000 células/mL) se sembraron en una placa negra de fondo de cristal de 96 pocillos. Un día antes del ensayo, una fracción de las células fue tratada con 10 ng/mL de TNF $\alpha$  durante 12h para inducir la sobreexpresión de E-selectina. Al día siguiente, las células se lavaron con tampón HKR (5mM HEPES, 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 2,05 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 7,4) y los núcleos se tiñeron por incubación con 1  $\mu$ M Hoechst 33342 en HKR durante 30 min. Cada conjugado de fullereno se disolvió añadiendo primero DMSO y luego H<sub>2</sub>O hasta una concentración final del 2% de DMSO en agua para obtener un stock concentrado. La concentración se determinó mediante la absorción UV-Vis de la rodamina B ( $\lambda=555$ ,  $\epsilon=91674$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). De este stock concentrado se extrajo el volumen necesario de compuesto para obtener una solución de 10  $\mu$ M en HKR. Las células se incubaron con cada conjugado (F<sub>1</sub><sup>RB</sup> o F<sub>C</sub><sup>RB</sup>) durante 30 minutos y luego se lavaron para eliminar el exceso de fullereno utilizando una solución de heparina en HKR (1x100  $\mu$ L, 0,1 mg/ml) y buffer HKR (2x100  $\mu$ L). A continuación, se procedió a la obtención de las micrografías mediante el microscopio confocal. Las imágenes fueron analizadas con Fiji.<sup>363</sup>

## 6. Protocolo general para la citometría de flujo

Un día antes del ensayo, las células se sembraron en placas de cultivo de poliestireno de 96 pocillos añadiendo 100  $\mu$ L (100.000 células/mL) por pocillo. Una fracción de las células se trató con 10 ng/mL de TNF $\alpha$  durante 12h para inducir la sobreexpresión de E-selectina. Al día siguiente, se aspiró el medio y se incubaron las células con cada conjugado (F<sub>1</sub><sup>RB</sup> o F<sub>C</sub><sup>RB</sup>) a 10  $\mu$ M en tampón HKR. Tras 30 minutos de incubación a 37°C, se aspiró el tampón; las células se lavaron con solución de heparina (1x100  $\mu$ L, 0,1 mg/mL) y tampón HKR (2x100  $\mu$ L). Por último, se añadió 100  $\mu$ L tripsina-EDTA en cada pocillo y se incubaron las células durante 15 min a 37°C. Seguidamente, se añadieron a las células 100  $\mu$ L de una solución de 2% de FBS y 5 mM de EDTA en PBS para neutralizar la tripsina. A continuación, se analizaron 2500 células de cada pocillo por citometría de flujo. Se seleccionó la población de células con parámetros FSC/SSC típicos y se identificaron los singletes mediante SSC-H/SSC-W. Se determinó la mediana de fluorescencia del canal Orange-G ( $\lambda_{ex} = 532$  nm,  $\lambda_{em} = 620/52$  nm) para esta población. Los datos se presentan como la media de la mediana de la intensidad de fluorescencia de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar.





La membrana celular regula el intercambio de moléculas e información con el entorno externo, en donde las interacciones proteína-carbohidrato cobran especial importancia y están involucradas en muchos procesos biológicos y patológicos, desde la comunicación celular hasta la metástasis tumoral. Sin embargo, la membrana plasmática, también actúa como una barrera semipermeable que impide el paso de macromoléculas exógenas. El desarrollo de nuevos materiales orgánicos híbridos que alcancen sus dianas intracelulares y que sean capaces de controlar los eventos de reconocimiento molecular ligando-receptor dotándolos de una alta selectividad y especificidad, representa un gran reto para el desarrollo de la próxima generación de terapias y métodos de diagnóstico.