

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**CONJUGADOS OLIGONUCLEÓTIDO-PÉPTIDO  
PARA EL RECONOCIMIENTO DE  
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y ADN**

Memoria que, para optar al grado de Doctora por la  
Universidad de Santiago de Compostela, presenta

**Cecilia Portela Pallares**

Santiago de Compostela, Octubre de 2007





D. JOSÉ LUIS MASCAREÑAS CID, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA,

CERTIFICA:

Que la memoria adjunta titulada "Conjugados oligonucleótido-péptido para el reconocimiento de factores de transcripción y ADN", que, para optar al grado de Doctora en Química, presenta D<sup>a</sup> Cecilia Portela Pallares, ha sido realizada bajo mi dirección en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica.

Considerando que constituye trabajo de Tesis, autorizo su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Santiago de Compostela, a 10 de julio de 2007.

Fdo.: Cecilia Portela Pallares

Fdo.: José Luis Mascareñas Cid



## **Agradecimientos**

Al Prof. José Luis Mascareñas, director de esta tesis, por la confianza depositada en mí para realizarla, por su orientación, su permanente disposición y su apoyo constante y entusiasta.

Al Prof. Luis Castedo, orientador inicial de mi trabajo.

Al Prof. Fernando Albericio y al Dr. Ramón Eritja, por permitirme realizar una estancia en sus grupos y por su atención y ánimo durante el desarrollo de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio. A los de mi grupo, por sus consejos: Vero D., Eugenio, Juan B., María, Olalla, Adrián, Elena y a los "sintéticos", Fernando, Moisés, Bea y Juan D. A los demás compañeros, César, Rebeca, Roberto, Manuel, Carmen, Chus, Emilio y, especialmente, a Cris, Zaida, Iago, Sonia y Vero P., por su amistad y alegría.

A mis compañeros de Barcelona, especialmente Marta y Anna y Jesús y Martina, por su gran amabilidad y ayuda.

A Esteban e Isa, de la Unidade de Masas.

A los profesores Javier Benavente y José Martínez Costas, por permitirme utilizar las instalaciones radiactivas de su laboratorio y a la gente de su grupo, por su amabilidad.



*A mi madre y a mi padre*

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>1. La Química Biológica</b>	<b>9</b>
<b>2. La expresión genética</b>	<b>10</b>
<b>3. La transcripción genética</b>	<b>11</b>
3.1. Características generales	11
3.2. La iniciación de la transcripción en células procariotas	11
3.3. La iniciación de la transcripción en células eucariotas	12
<b>4. Factores de transcripción (FTs)</b>	<b>14</b>
4.1. Regulación de la actividad de los factores de transcripción en organismos eucariotas	14
4.2. Oncogenes y genes supresores de tumores: factores de transcripción y cáncer	16
<b>5. Interacciones entre factores de transcripción y ADN</b>	<b>19</b>
5.1. Características estructurales del ADN	19
5.2. Familias de factores de transcripción	20
5.3. Conclusiones generales sobre las interacciones entre FTs y ADN	25
<b>6. Miniproteínas para el reconocimiento de secuencias específicas de ADN</b>	<b>27</b>
6.1. Consideraciones generales	27
6.2. Dímeros artificiales de la región básica de proteínas bZIP	27
6.3. Interacción con el ADN de monómeros derivados de la región básica de GCN4	30
<b>7. Fos y Jun. Relevancia biológica y características estructurales</b>	<b>33</b>
<b>8. Estrategias para inhibir la actividad de factores de transcripción. Antecedentes sobre el desarrollo de antagonistas de Jun</b>	<b>35</b>
<b>II. OBJETIVO</b>	<b>39</b>
<b>III. ANTECEDENTES EN LA SÍNTESIS DE CONJUGADOS OLIGONUCLEÓTIDO-PÉPTIDO</b>	<b>43</b>
<b>1. Conjugación post-sintética (método convergente)</b>	<b>46</b>
<b>2. Síntesis lineal en fase sólida (método divergente)</b>	<b>48</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
<b>1. Conjugados oligonucleótido-péptido para la interacción selectiva con la oncoproteína Jun</b>	<b>53</b>
1.1. Objetivo	53
1.2. Diseño de los conjugados y planteamiento sintético	54
1.3. Estudios iniciales para la síntesis convergente del conjugado oligonucleótido-péptido objetivo	57
1.4. Obtención de los híbridos utilizando condiciones de conjugación diferentes	77
1.5. Preparación de conjugados oligonucleótido-péptido hibridados a la cadena oligonucleotídica complementaria	86
1.6. Ensayos de interacción con Jun de los híbridos sintéticos preparados	90

1.7. Síntesis de conjugados oligonucleótido-péptido con una parte oligonucleotídica más larga	101
1.8. Estudios de interacción con Jun	107
1.9. Estudios de desplazamiento de los complejos entre Jun-Jun y Fos-Jun con su secuencia consenso de ADN	108
1.10. Conjugados oligonucleótido-péptido con mayor separación entre la secuencia TCAT y la zona de unión del péptido	111
<b>2. Síntesis lineal de un conjugado oligonucleótido-péptido diseñado para interactuar con Jun</b>	<b>115</b>
2.1. Objetivo, diseño y planteamiento	115
2.2. Síntesis	115
<b>3. Conjugados oligonucleótido-péptido cuya dimerización puede controlarse mediante oligonucleótidos externos</b>	<b>121</b>
3.1. Objetivo	121
3.2. "Three way Junction"	122
3.3. Planteamiento	123
3.4. Síntesis de los conjugados oligonucleótido-péptido	123
3.5. Estudios de formación del cruce 3H	130
3.6. Estudios de interacción con ADNs	132
<b>V. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>141</b>
<b>1. General</b>	<b>143</b>
1.1. Materiales y métodos	143
1.2. Técnicas y aparatos	143
1.3. Ensayos cualitativos para la determinación de aminas libres en la síntesis peptídica en fase sólida	144
1.4. Desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos y desanclaje de la resina en la síntesis de péptidos	146
1.5. Determinación de las concentraciones de las disoluciones de oligonucleótidos y conjugados oligonucleótido-péptido mediante espectroscopia de UV	146
1.6. Experimentos de electroforesis en gel de poliacrilamida	147
<b>2. Reacciones</b>	<b>150</b>
<b>VI. ANEXOS</b>	<b>213</b>
<b>Anexo I: Síntesis de péptidos en fase sólida</b>	<b>215</b>
<b>Anexo II: Síntesis de oligonucleótidos en fase sólida</b>	<b>219</b>

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

$\delta$	desplazamiento químico
$\epsilon$	coeficiente de extinción
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
$^{\circ}\text{C}$	grado centígrado
aa	aminoácido
Ac	acetilo
AcOEt	acetato de etilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
AEDT	ácido etilendiaminotetraacético
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNpol	ARN polimerasa
ATP	adenosíntrifosfato
BPB	azul de bromofenol
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
BSA	seroalbúmina bovina
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -butilo
Bzl	benciloxicarbonilo
$\text{CDCl}_3$	cloroformo deuterado
$\text{CH}_3\text{CN}$	acetonitrilo
CPG	soporte de vidrio de tamaño de poro controlado
dh	doble hebra
DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
DIPCDI	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DMAP	<i>N,N'</i> -dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
D-N	dominante negativo
DTT	1,4-ditiotreitol
EM	espectrometría de masas
EMSA	ensayos de desplazamiento en gel de poliacrilamida
equiv	equivalente
ESI	espectrometría de masas de electrospray
Et	etilo
$\text{Et}_3\text{N}$	triethylamina
$\text{Et}_2\text{O}$	éter dietílico
FT	factor de transcripción
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo

h	hora
HATU	hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-tiazolo[4,5- <i>b</i> ]piridin-1-il-metilen]- <i>N</i> -metilmetanaminio
HBTU	hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)dimetilamino metilen]- <i>N</i> -metilmetanaminio
HOAt	7-aza-1-hidroxibenzotriazol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPA	ácido 3-hidroxipicolínico
HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia
<i>J</i>	constante de acoplamiento
$K_a$	constante de afinidad
$K_d$	constante de disociación
LNA	ácido nucleico bloqueado conformacionalmente
M	molar
m	multiplete
MALDI	(ionización mediante) desorción por láser asistida mediante matriz
MBHA	<i>p</i> -metilbenzohidrilamina
MBS	3- <i>N</i> -maleimidobenzoato de <i>N</i> -succinimidilo
Me	metilo
mg	miligramo
MHz	megahertzio
min	minuto
mL	mililitro
mmol	milimol
nm	nanómetro
nM	nanomolar
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
NP-40	octiletóxipoliétoxietanol
Npys	3-nitro-2-piridiniosulfenil
O.D.	unidad de densidad óptica
ODN	oligonucleótido sintético
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PEG	polietilenglicol
PNA	ácido nucleico peptídico
ppm	partes por millón
PS	poliestireno
PyAOP	hexafluorofosfato de fosfonio de 7-azabenzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)
PyBOP	hexafluorofosfato de fosfonio de benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)
q	cuadruplete
RMN	resonancia magnética nuclear
r.p.m.	revoluciones por minuto

s	singlete
t	triplete
TBE	disolución de tris-borato-AEDT
TBTU	tetrafluoroborato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metilen]- <i>N</i> -metilmetanaminio
TCA	ácido tricloroacético
TEAA	acetato de trietilamonio
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamina
$T_m$	temperatura de fusión
TMS	trimetilsililo
TNBSA	ácido trinitrobencenosulfónico
TOF	analizador de tiempo de vuelo
$t_R$	tiempo de retención
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Trt	trifenilmetilo (tritilo)
UV	ultravioleta



# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. La Química Biológica

En el territorio en que la Química y la Biología entran en contacto, se ha creado un área de investigación de gran importancia y en creciente desarrollo. Esta disciplina, que puede definirse como **Química Biológica**, busca la comprensión, y en su caso modificación, de los procesos biológicos desde el nivel molecular.

La posibilidad de estudiar la célula en detalle es debida a los recientes avances en la investigación genómica y proteómica, a la mayor eficiencia de los métodos de síntesis y a las posibilidades que ofrecen las nuevas técnicas de análisis de biomoléculas.

La Química Biológica se caracteriza por ser una rama de la ciencia de carácter interdisciplinar que abarca materias tan diversas como el reconocimiento biomolecular, la catálisis enzimática, la señalización celular, la síntesis de biomoléculas, etc. Sobre la base de los conocimientos adquiridos en dichas materias, el objetivo consiste fundamentalmente en desarrollar herramientas químicas que proporcionen información detallada sobre los procesos celulares y que puedan permitir su modificación de manera programada y selectiva.

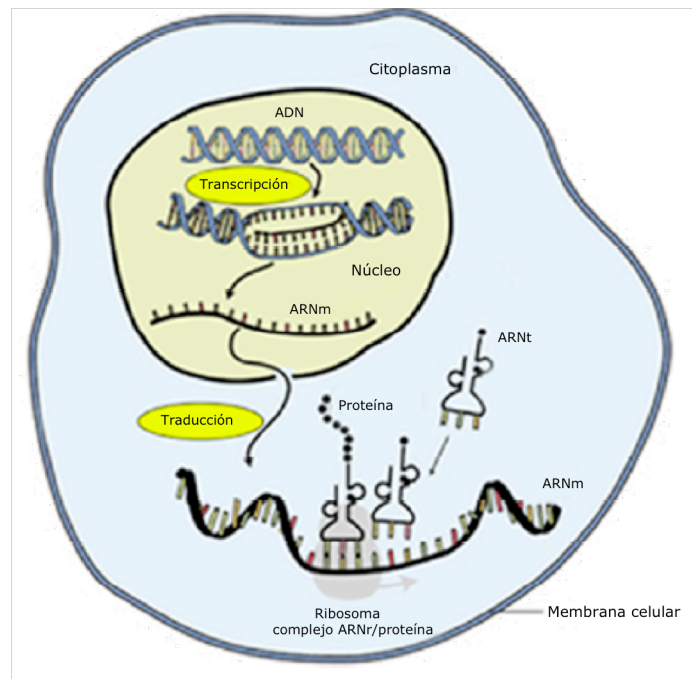
El impacto de este nuevo campo de la ciencia se pone de manifiesto en la aparición en la década de los noventa de varias revistas especializadas tales como "Chemistry and Biology", "ChemBioChem", "Current Opinion in Chemical Biology" y otras más recientes como "ACS Chemical Biology" y "Nature Chemical Biology". Asimismo, ha habido un repunte muy notable de nuevos programas de formación en departamentos universitarios que integran las distintas áreas constitutivas de la Química Biológica. Incluso algunos departamentos de gran relevancia, como el Departamento de Química de la Universidad de Harvard, han sido modificados para incluir en su nombre el término "Química Biológica" (denominándose ahora "Department of Chemistry and Chemical Biology").

## 2. La expresión genética

La expresión genética es el proceso mediante el cual la célula descodifica la información contenida en la secuencia de nucleótidos de un gen para generar una proteína. La expresión genética incluye el proceso de **transcripción**, en el que la secuencia de nucleótidos de una porción apropiada de la molécula de ADN se copia para dar lugar a una molécula de ARN y el de **traducción**, mediante el cual el ARN se utiliza como molde para la síntesis de proteínas.

En algunos casos, el producto final de la expresión genética es el propio ARN, pero en la mayoría de los casos los genes especifican la secuencia de aminoácidos de las proteínas. El ARN copiado de estos últimos se denomina *ARN mensajero* (ARNm). En células eucariotas, los transcritos de ARN (pre-ARNm) están sujetos a un procesamiento en el núcleo (modificaciones, corte y empalme) antes de dar lugar al ARNm maduro que será transportado al citosol para su traducción.<sup>1</sup> El flujo de información genética en las células se produce, por tanto, desde el ADN al ARN, y de éste a la proteína.<sup>2</sup>

La expresión genética es un proceso perfectamente regulado en el espacio y en el tiempo y sigue un patrón específico en cada célula que determina su morfología y función. Este control puede producirse en cualquiera de sus etapas, pero en la mayor parte de los casos la regulación de la expresión genética se produce en la etapa de la transcripción.<sup>3</sup>



**Figura 1.** Resumen esquemático del proceso de expresión genética.

<sup>1</sup> a) Mathews, C. K.; Van Holde, K. E. *Bioquímica* **1998** McGraw-Hill/Interamericana, Madrid, cap. 28. b) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell* **2002** Garland Science, Nueva York, cap. 6.

<sup>2</sup> Alberts *et al.*, *vid.* nota 1b, cap. 4 y 6.

<sup>3</sup> *Ibidem*, cap. 7.



### 3. La transcripción genética

#### 3.1. Características generales

Como se ha señalado anteriormente, la transcripción genética es el proceso de transmisión de la información genética del ADN al ARN. Una de las cadenas sencillas del ADN actúa como hebra molde (*hebra codificante*), determinando el orden en que los monómeros de ribonucleósido trifosfato se incorporan para formar la cadena de ARN complementaria. Las bases de dichos monómeros se aparean con las bases de la hebra molde del ADN y se unen en una reacción de polimerización catalizada por el enzima **ARN polimerasa**.<sup>4</sup>

La transcripción puede subdividirse en las siguientes etapas:<sup>5</sup>

La iniciación, en la que la ARN polimerasa se une al ADN en la zona promotora, migra a un lugar de iniciación e incorpora los primeros nucleótidos.

La elongación, en la que el enzima se desplaza a lo largo del ADN molde y tiene lugar el crecimiento de la cadena de ARN. Este proceso se produce en la dirección 5'→3'.

La terminación, que tiene lugar cuando finaliza la síntesis de ARN y el complejo de la ARN polimerasa se disocia y separa de la unidad de transcripción.

La regulación del proceso de transcripción genética se produce fundamentalmente durante la etapa de iniciación,<sup>6</sup> por lo que a continuación se describe en mayor detalle dicha etapa en organismos eucariotas y procariotas.

#### 3.2. La iniciación de la transcripción en células procariotas

En células procariotas existe un único tipo de ARN polimerasa formado por varias subunidades polipeptídicas. La síntesis del ARN comienza con el reconocimiento de secuencias definidas del ADN denominadas **promotores** por parte de dicha ARN polimerasa en combinación con el factor  $\sigma$ . A esta combinación se le denomina *holoenzima*. El factor  $\sigma$  es responsable de los contactos específicos con el promotor y de la separación de las cadenas del ADN, disociándose de la ARN polimerasa después de la síntesis de los primeros nucleótidos de ARN. Las zonas promotoras en procariotas se identifican por dos secuencias de consenso cortas situadas a -35 y -10 nucleótidos con respecto al punto de inicio de la transcripción.<sup>7</sup>

La regulación de la transcripción en procariotas se produce, en la mayoría de los casos, por la acción de **proteínas activadoras** o de **proteínas represoras**. Las primeras favorecen la unión de la ARN polimerasa al ADN y de esta forma estimulan la transcripción.

---

<sup>4</sup> Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Zipursky, S. L.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology* **2004** W. H. Freeman and Company, Nueva York, cap. 4.

<sup>5</sup> a) Mathews y Van Holde, *vid.* nota 1a, cap. 26. b) Lodish *et al.*, *vid.* nota 4, cap. 4.

<sup>6</sup> Lodish *et al.*, *vid.* nota 4, cap. 11.

<sup>7</sup> a) Mathews y Van Holde, *vid.* nota 1a, cap. 26. b) Alberts *et al.*, *vid.* nota 1b, cap. 6.

La actividad de estas proteínas está a su vez regulada por moléculas pequeñas; los represores se unen a secuencias del ADN en zonas próximas o solapadas al promotor (operadores) y bloquean la acción de la ARN polimerasa.<sup>8</sup>

### 3.3. La iniciación de la transcripción en células eucariotas

El mecanismo de la transcripción en organismos eucariotas es más complejo que en organismos procariotas. Para que pueda llevarse a cabo la transcripción de un gen eucariota debe producirse la descompactación de la **cromatina**, un complejo de ADN y proteínas que se encuentra en el núcleo celular y que está formado por subunidades de nucleosomas en los que el ADN se enrolla alrededor de un octámero de histonas. La estructura de la cromatina puede alterarse por la acción de complejos proteicos (dependiente de ATP), por la modificación covalente de las histonas del nucleosoma (acetilación, fosforilación, metilación y ubiquitinación) o por la sustitución de las histonas por variantes de las mismas. Estas modificaciones tienen por objeto facilitar el acceso de la maquinaria transcripcional al ADN.<sup>9</sup>

En eucariotas existen tres tipos de ARN polimerasa, denominadas *ARNpol I*, *ARNpol II* y *ARNpol III*. Estos enzimas son grandes complejos multiméricos que catalizan la formación de distintos ARNs. La ARNpol II, enzima formado por 10-14 subunidades,<sup>10</sup> transcribe todos los genes que codifican proteínas, es decir, produce el ARNm, responsable de producir dichas proteínas.

La actividad de la ARNpol II requiere su interacción con unos complejos proteicos denominados **factores de transcripción generales (FTGs)**, que se combinan con el enzima en un orden regulado y definido, formando el complejo transcripcional denominado aparato de transcripción basal o **complejo de preiniciación**.<sup>11</sup> Los FTGs se unen al promotor creando una plataforma que permite la unión de la ARNpol II, que posteriormente iniciará la transcripción. Los promotores de los genes eucariotas están situados antes del sitio de inicio de la transcripción (hacia el extremo 5') y en muchos genes contienen la llamada caja TATA (secuencia rica en los nucleótidos A y T), típicamente situada en la posición -25 con respecto al lugar de inicio de la transcripción.<sup>12</sup>

Además de las zonas promotoras, en los genes eucariotas también existen unas regiones de ADN localizadas en zonas distintas al lugar de formación del complejo de preiniciación denominadas **secuencias reguladoras**. En la mayoría de los casos, para que se forme el complejo de preiniciación y pueda iniciarse la transcripción, es necesaria la interacción previa de unas proteínas denominadas **factores de transcripción (FTs)** con estas regiones

---

<sup>8</sup> Lodish *et al*, *vid.* nota 4, cap. 4.

<sup>9</sup> a) Strahl, B. D.; Allis, D. "The language of covalent histone modifications" *Nature* **2000**, *403*, 41. b) Wu, J.; Grunstein, M. "25 years after the nucleosome model: chromatin modifications" *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 619. c) Felsenfeld, G.; Groudine, M. "Controlling the double helix" *Nature* **2003**, *421*, 448.

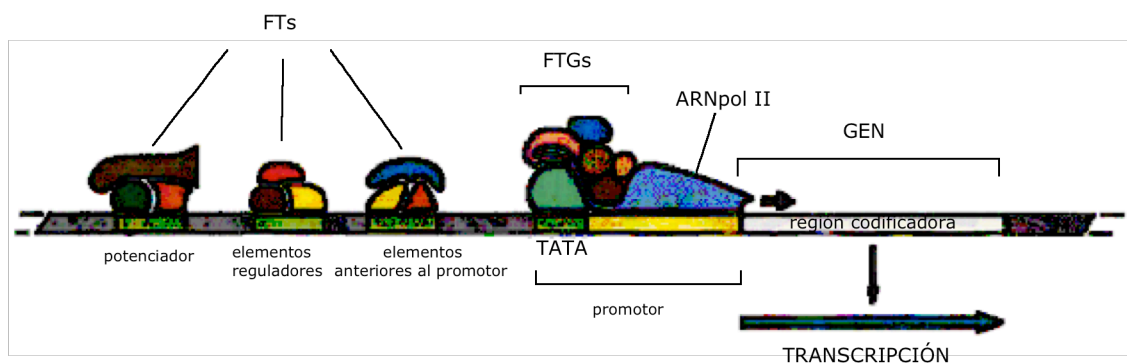
<sup>10</sup> La estructura de la ARNpol II ha sido resuelta por cristalografía de rayos X: Cramer, P.; Bushnell, D. A.; Fu, J.; Gnatt, A. L.; Maier-Davis, B.; Thompson, N. E.; Burgess, R. R.; Edwards, A. M.; David, P. R.; Kornberg, R. D. "Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism" *Science* **2000**, *288*, 640.

<sup>11</sup> Conaway, R. C.; Conaway, J. W. "General initiation factors for RNA polymerase II" *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 161.

<sup>12</sup> a) Alberts *et al.*, *vid.* nota 1b, cap. 6. b) Latchman, D. S. *Eukaryotic transcription factors* **1998** Academic Press, Londres, cap. 1.

específicas de los genes.<sup>13</sup> Aparentemente, esta interacción favorece el reclutamiento de las proteínas que forman el complejo de preiniciación a través de una interacción directa entre una región activadora de los FTs con alguna de las proteínas de dicho complejo. Debe destacarse la enorme especificidad de los FTs, capaces de reconocer de forma selectiva secuencias de 8-16 pares de bases entre los millones presentes en el genoma. Dicha especificidad es fundamental para el correcto funcionamiento de la célula.

Existen tres tipos de zonas reguladoras: los *elementos anteriores al promotor*, localizados junto al promotor y fundamentales para que la transcripción sea eficiente; los *elementos reguladores adyacentes al promotor*, que pueden estar mezclados con los anteriores y que activan genes en tejidos especiales o en respuesta a estímulos concretos, y los *potenciadores*, que pueden estar situados muy lejos del promotor e incrementan o inhiben la expresión de manera regulada (Figura 2).<sup>14</sup>



**Figura 2.** Estructura de un sitio de iniciación de transcripción de un gen eucariota típico.

Aunque en la mayoría de los casos la unión de factores de transcripción con estas secuencias activa la iniciación de la transcripción, algunas secuencias actúan de manera inversa inhibiendo la transcripción del gen que regulan. Estas secuencias se denominan *potenciadores negativos* o *silenciadores*.<sup>15</sup> El balance de la acción de los factores de transcripción positivos y negativos unidos a las regiones reguladoras determina el grado de transcripción de cada gen y, por tanto, el comportamiento celular.

<sup>13</sup> Latchman, *vid.* nota 12b, cap. 3.

<sup>14</sup> *Ibidem*, cap. 1.

<sup>15</sup> Ogbourne, S.; Antalis, T. M. "Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes" *Biochem. J.* **1998**, *331*, 1.

## 4. Factores de transcripción (FTs)

### 4.1. Regulación de la actividad de los factores de transcripción en organismos eucariotas

Las regiones de control de la transcripción de la mayoría de los genes contienen sitios de unión para múltiples factores de transcripción. La transcripción de dichos genes varía en función del conjunto de factores de transcripción que se expresan y se activan en cada tipo de célula en cada momento. Esto implica que los factores de transcripción, reguladores de la expresión genética, deben estar, a su vez, estrictamente regulados.<sup>16</sup>

Existen dos mecanismos básicos por los que la acción de los factores de transcripción puede regularse: el **control de la síntesis** del factor de transcripción, de modo que se obtenga sólo cuando sea necesario, y el **control de la actividad**, por el que la proteína preexistente en la célula se active solamente cuando se requiera.<sup>17</sup>

Las concentraciones de los factores de transcripción pueden regularse en cualquiera de las etapas de obtención de la proteína a partir del ADN, esto es, en la transcripción, en el procesado de ARN, en la degradación del ARNm y en la traducción.<sup>18</sup> Se trata de un mecanismo de regulación lento, a diferencia del control de la actividad, el cual tiene un tiempo de respuesta muy corto ante una necesidad celular. La actividad de los factores de transcripción puede modularse de distintas maneras, incluyendo modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, fosforilación), unión a ligandos o interacciones con proteínas. En muchos casos, esta regulación de la actividad se consigue mediante la inducción de cambios conformacionales en el factor de transcripción, de modo que la proteína pasa de una forma incapaz de unirse al ADN a otra que sí lo es.

A continuación, se describen algunos de estos procesos mediante los que se regula la actividad de los factores de transcripción.

Los factores de transcripción son destinos importantes de muchas de las rutas de **señalización celular**, en las que las señales generadas por estimulación de los receptores en la superficie celular se transmiten al núcleo a través de cascadas de fosforilación. La fosforilación puede regular el bloqueo del factor de transcripción en un complejo inactivo, modular la unión del factor de transcripción al ADN o modificar su potencial de *trans*-activación.<sup>19</sup> De forma más indirecta, la fosforilación puede bloquear o desencadenar la acción de proteasas y de proteínas transportadoras que facilitan la entrada de los factores de transcripción en el núcleo.

---

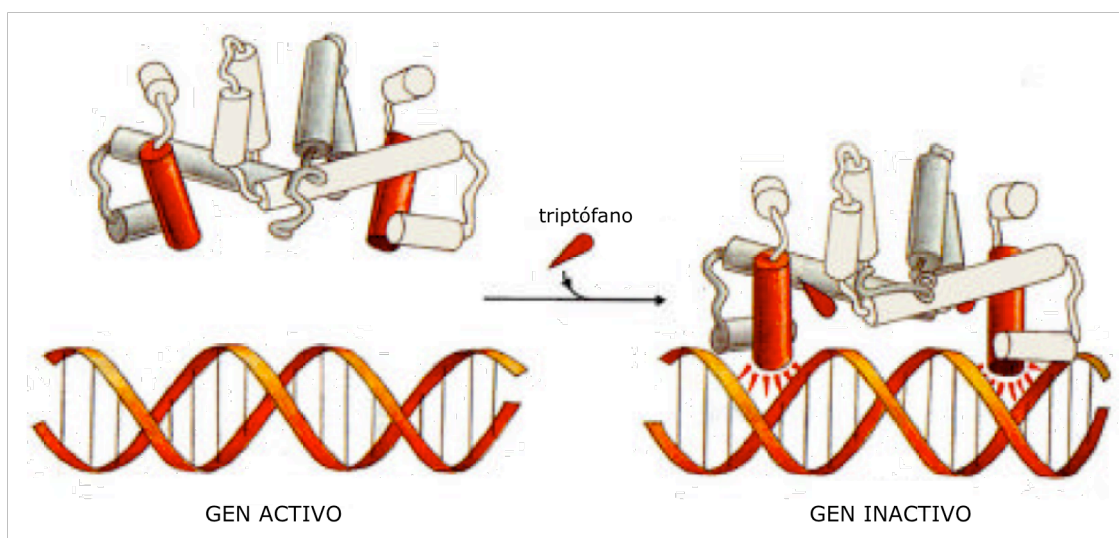
<sup>16</sup> Para una revisión de los mecanismos de regulación de factores de transcripción, véase: a) Calkhoven, C. F.; Geert, A. B. "Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity" *Biochem. J.* **1996**, *317*, 329. b) Kornberg, R. D. "Eukaryotic transcriptional control" *Trends in Cell Biol.* **1999**, *9*, M46. c) Lemon, B.; Tjian, R. "Orchestrated response: a symphony of transcriptional factors for gene control" *Genes Dev.* **2000**, *14*, 2551.

<sup>17</sup> Latchman, *vid.* nota 12b, cap. 3.

<sup>18</sup> Calkhoven y Geert, *vid.* nota 16a.

<sup>19</sup> *Ibidem.*

La actividad de los factores de transcripción y, en concreto, su capacidad para reconocer el ADN con suficiente afinidad puede regularse por la **interacción directa con ligandos** como hormonas, metales (Cu, Zn, Cd)<sup>20</sup> o aminoácidos. Por ejemplo, el *repressor del triptófano* (Trp) es un factor de transcripción que controla la expresión de los enzimas responsables de la biosíntesis del Trp y su actividad depende de la concentración de Trp en la célula.<sup>21</sup> Así, si el nivel de Trp es bajo, el repressor se une al promotor del gen con baja afinidad, permitiendo el acceso de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción para generar Trp. Por el contrario, si la concentración de Trp en la célula es alta, el Trp se une al repressor induciendo un cambio conformacional en su estructura que conlleva un aumento de la afinidad del repressor por la secuencia promotora de ADN, inhibiendo la unión de la ARN polimerasa y con ello la transcripción del gen.



**Figura 3.** La unión del Trp al repressor de Trp modifica la conformación de la proteína: la unión de dos moléculas de Trp incrementa la distancia entre las dos hélices de reconocimiento del homodímero, permitiendo a la proteína insertarse adecuadamente en el surco mayor del ADN y reconocer su secuencia diana.

En muchos casos, la capacidad de los factores de transcripción para unirse a secuencias específicas de ADN depende de su interacción con otras proteínas, que pueden ser proteínas que se unen al ADN o proteínas accesorias que no se unen al ADN. Este control de los procesos de transcripción celular a través de la acción cooperativa de diferentes proteínas se conoce como **regulación combinatoria** de la transcripción. Uno de los mecanismos de control combinatorio utilizados se basa en la **homo-** o **heterodimerización** entre diferentes FTs.<sup>22</sup> Dicha dimerización permite asegurar buenas afinidades por el ADN y al mismo tiempo sirve para regular la selectividad de secuencia. Otra de las ventajas de la oligomerización de FTs deriva de las posibilidades que surgen para el reconocimiento de un gran número de secuencias genéticas con un número relativamente pequeño de proteínas. Asimismo, esta estrategia permite que cada una de esas proteínas pueda participar en la regulación de varios genes.<sup>23</sup>

<sup>20</sup> Thiele, D. J. "Metal-regulated transcription in eukaryotes" *Nuc. Acid Res.* **1992**, *20*, 1183.

<sup>21</sup> Haran, T. E.; Joachimiak, A.; Sigler, P. B. "The DNA target of the Trp repressor" *Embo J.* **1992**, *11*, 3021.

<sup>22</sup> Lamb, P.; Mcknight, S. L. "Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization" *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 417.

<sup>23</sup> Tjian, R.; Munatis, T. "Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces" *Cell* **1994**, *77*, 5.

Dada la enorme importancia de los factores de transcripción, es fundamental comprender las bases moleculares de su interacción con otras proteínas y con el ADN. La creciente información sobre el genoma humano permite disponer cada vez de más datos sobre la relación entre errores transcripcionales y los distintos tipos de enfermedades, por lo que es obvio que tendría una gran relevancia **diseñar estrategias para modificar procesos transcripcionales específicos de forma programable y selectiva.**<sup>24</sup>

#### 4.2. Oncogenes y genes supresores de tumores: factores de transcripción y cáncer

De la discusión anterior se deduce que los factores de transcripción son proteínas que ejercen un papel determinante en el comportamiento y desarrollo celular. Cuando se producen errores en los procesos de transcripción genética, debido por ejemplo a un comportamiento aberrante de los factores de transcripción, pueden originarse un gran número de enfermedades, como el cáncer.<sup>25</sup>

El **cáncer** es una enfermedad genética que tiene su origen en la generación de mutaciones en células somáticas. Ocasionalmente, alguna de esas mutaciones altera la función de genes críticos, proveyendo a la célula en la que ha tenido lugar de una ventaja de crecimiento, lo que resulta en una proliferación descontrolada que determina el comienzo de la formación de un tumor. Mutaciones adicionales en otros genes relevantes, y series sucesivas de expansión clonal pueden producir células que invaden tejidos circundantes y dar lugar a metástasis.<sup>26</sup>

La identificación de genes cuyas mutaciones contribuyen a la oncogénesis es un objetivo central de la investigación sobre el cáncer. Hasta el momento, han sido identificados más de 100, que se pueden agrupar en dos clases: **proto-oncogenes**, en los que la mutación produce una ganancia de función que deriva en el comportamiento canceroso de la célula, y cuyas formas mutadas sobreactivas se denominan **oncogenes**, y **genes supresores de tumores**, en los que la mutación causa una pérdida de función clave en la detección y corrección de las lesiones que llevan a la hiperproliferación celular. Ambos tipos de genes están implicados en el control del crecimiento y división celulares, y por ello sus mutaciones pueden tener como consecuencias el aumento de la proliferación y supervivencia celulares.<sup>27</sup> La inhibición de las oncoproteínas o la reactivación de genes supresores de tumores es, por tanto, un objetivo claro en el desarrollo de fármacos anticáncer.

El gen supresor de tumores más importante es el *p53*, regulador negativo del ciclo celular. En células normales su expresión se produce como consecuencia de daños en el ADN

---

<sup>24</sup> a) Dervan, P. B. "Molecular recognition of DNA by small molecules" *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2215. b) Vázquez, E. M.; Caamaño, A. M.; Mascareñas, J. L. "From transcription factors to designed sequence-specific DNA-binding peptides" *Chem. Soc. Rev.* **2003**, 32, 338.

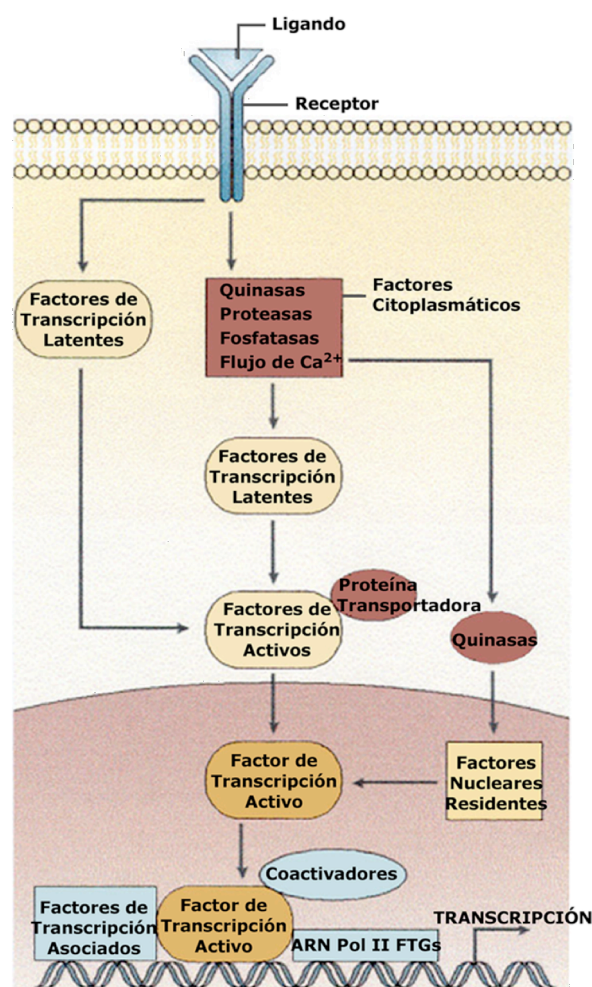
<sup>25</sup> Latchman, *vid. nota* 12b, cap. 7.

<sup>26</sup> Futreal, P. A.; Kasprzyk, A.; Birney, E.; Mullikin, J. C.; Wooster, R.; Stratton, M. R. "Cancer and genomics" *Nature* **2001**, 409, 850.

<sup>27</sup> a) Hartwell, L. H.; Kastan, M.B. "Cell cycle control and cancer" *Science* **1994**, 266, 1821. b) Baserga, R. "Oncogenes and the strategy of growth factors" *Cell* **1994**, 79, 927.

y su función consiste en detener el crecimiento celular de las células dañadas o incluso inducir su muerte por *apoptosis*.<sup>28</sup>

El estudio de los oncogenes ha permitido descubrir diferentes tipos de proteínas implicadas en los procesos de señalización celular. Algunas de estas proteínas están implicadas en la transmisión de señales desde la superficie celular al núcleo y por ello ejercen un papel crucial en el control de la transcripción genética (Figura 4). Muchas de estas proteínas aparecen a menudo mutadas o sobreexpresadas en el cáncer.



**Figura 4.** Diagrama de las principales rutas de señalización intracelular.

Otro de los tipos de proteínas que suelen aparecer mutados en procesos cancerosos son los propios factores de transcripción oncogénicos. Existen tres grupos principales de factores de transcripción de importancia en el cáncer humano: receptores de esteroides, factores citoplasmáticos latentes y proteínas nucleares residentes.<sup>29</sup> Estas últimas entran en el núcleo automáticamente después de la síntesis y su activación para el inicio de la transcripción se produce por la acción en cascada de serinaquinas. Una de las proteínas con implicación

<sup>28</sup> Levine, A. J., Momand, J.; Finlay, C. A. "The p53 tumour suppressor gene" *Nature* **1991**, 351, 453.

<sup>29</sup> Darnell, J. E. Jr. "Transcription factors as targets for cancer therapy" *Nature* **2002**, 2, 740.

más frecuente en cánceres humanos es el factor de transcripción **Jun**, cuya activación se inicia con la fosforilación de las serinas en las posiciones 63 y 73.<sup>30</sup> **Se ha demostrado que Jun esta sobreexpresado en distintos tipos de cáncer, por lo que ha sido y es una molécula objetivo para el desarrollo de estrategias terapéuticas anticáncer.** La caracterización de **Jun** como una proteína oncogénica constituyó uno de los primeros ejemplos que relacionaban el cáncer con el control transcripcional.<sup>31</sup>

Otro ejemplo de un factor de transcripción sobreexpresado en el cáncer es **Myc**, que interacciona con el ADN formando un heterodímero con la proteína **Max**. La inhibición de esta dimerización podría ser útil en la terapia del cáncer. Sin embargo, las múltiples propiedades de **Myc**, que constituye un nexo en múltiples rutas de señalización de crecimiento,<sup>32</sup> sugieren que tal inhibición podría ser tóxica.<sup>33</sup>

En todo caso, por lo anteriormente expuesto, parece claro que el **bloqueo de la función de los factores de transcripción sobreactivos en el cáncer** es un objetivo terapéutico de gran alcance y relevancia. Un modo posible para abordar dicho objetivo podría consistir en la inhibición específica de su unión al ADN. A pesar de la dificultad que esto conlleva, en los últimos años se ha trabajado en el desarrollo de compuestos o estrategias para conseguir dicha inhibición.<sup>34</sup>

---

<sup>30</sup> a) Smeal, T.; Binetruy, B.; Mercola, D. A.; Birrer, M.; Karin, M. "Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73" *Nature* **1991**, *354*, 494. b) Smeal, T.; Binetruy, B.; Mercola, D.; Grover-Bardwick, A.; Heidecker, G.; Rapp, U. R.; Karin, M. "Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73" *Mol. Cell Biol.* **1992**, *12*, 3507. c) Adler, V.; Franklin, C. C.; Kraft, A. S. "Phorbol esters stimulate the phosphorylation of c-Jun but not v-Jun: regulation by the N-terminal delta domain" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5341.

<sup>31</sup> Curran, T., Franza B. R. Jr. "Fos and Jun: the AP-1 connection" *Cell* **1988**, *55*, 395.

<sup>32</sup> Grandori, C.; Cowley, S. M.; James, L. P.; Eisenman, R. N. "The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behaviour" *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2000**, *16*, 653.

<sup>33</sup> Darnell, *vid.* nota 29.

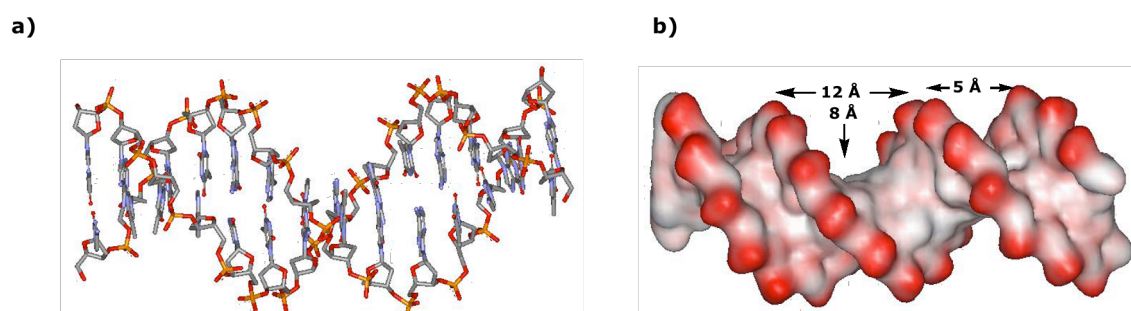
<sup>34</sup> Gibbs, J. B. "Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer" *Science* **2000**, *287*, 1969.

## 5. Interacciones entre factores de transcripción y ADN

### 5.1. Características estructurales del ADN

Para una mejor comprensión de las características estructurales de las interacciones entre los factores de transcripción y el ADN, se resumen a continuación aspectos básicos de la estructura del ADN<sup>35</sup> en su forma B, que es la conformación mayoritaria del ADN en condiciones fisiológicas.

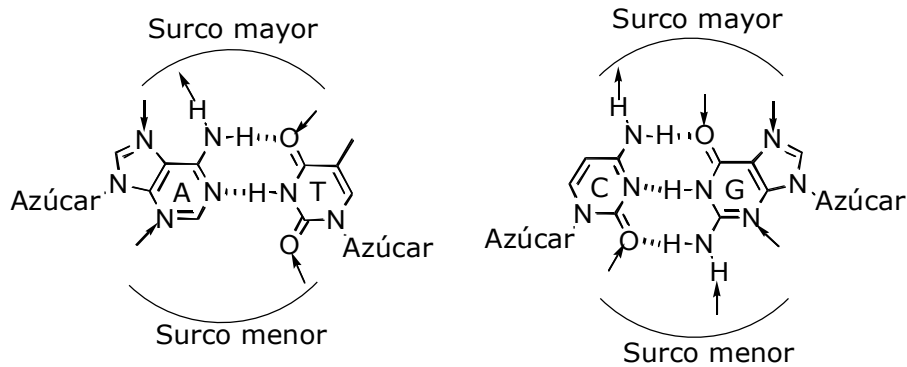
La forma B del ADN consiste en una hélice dextrógira de polidesoxinucleótidos con un diámetro aproximado de 20 Å. Las bases son casi perpendiculares al eje de la hélice y cada base se une a su complementaria en la cadena opuesta, formando un par de bases. Hay unos 10 pares de bases por vuelta de hélice, la distancia entre pares de bases consecutivos es de 3.4 Å y la rotación por residuo es de 36°. Como se puede observar en la Figura 5, el ADN en forma B contiene dos surcos de diferente tamaño, denominados *surco mayor* (con una anchura de 12 Å) y *surco menor* (con una anchura de 5 Å). El surco mayor es ligeramente más profundo que el menor (8.5 Å frente a 7.5 Å).



**Figura 5.** a) Estructura de la forma B del ADN. b) Modelo de superficies en el que se observan claramente los surcos mayor y menor.

En la mayoría de los casos, la unión de los factores de transcripción al ADN no afecta a la interacción entre los pares de bases. El proceso de reconocimiento tiene lugar a través de los grupos funcionales expuestos por las bases en los surcos, presentando un patrón distintivo de grupos que pueden actuar como dadores o como aceptores en los enlaces de hidrógeno (Figura 6).

<sup>35</sup> Lavery, R.; Zardecki, C.; Westbrook, J. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure* **1999**, Oxford Science Pub., Oxford.



**Figura 6.** Representación del apareamiento de bases A-T y G-C en una molécula de ADN. Se indican con flechas las posibilidades de actuación como aceptores o donadores de enlaces de hidrógeno de los átomos situados en las zonas externas de los surcos mayor y menor.

La variabilidad funcional es mayor en el surco mayor que en el surco menor, lo que ofrece más posibilidades combinatorias para el reconocimiento. Esto, unido al menor tamaño del surco menor, concuerda con la observación experimental de la preferencia de las proteínas para interactuar con el ADN a través del surco mayor.

## 5.2. Familias de factores de transcripción

El creciente número de estructuras de complejos proteína-ADN resuelto mediante cristalografía de rayos X y RMN ha permitido comprender mejor las bases estructurales de las interacciones entre los factores de transcripción y el ADN. Para llevar a cabo el reconocimiento, los factores de transcripción utilizan distintos motivos estructurales, lo que permite clasificarlos en distintas familias.<sup>36</sup>

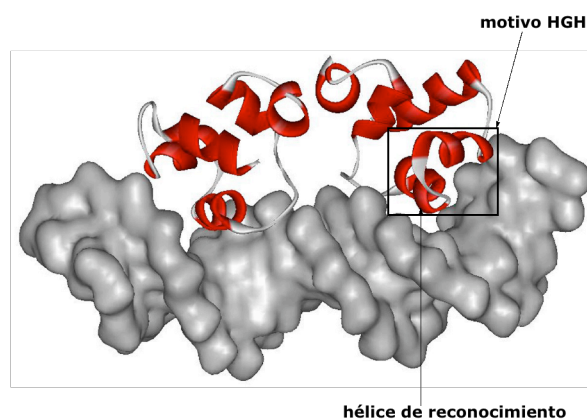
### Hélice-giro-hélice (HGH)

La mayoría de las proteínas pertenecientes a esta familia se encuentran en organismos procariotas.<sup>37</sup> Suelen interactuar con el ADN en forma de dímeros, en los que cada uno de los monómeros utiliza el motivo HGH para contactar con el ADN. Este motivo, de unos 22 aminoácidos, consiste en una hélice  $\alpha$ , un giro y una segunda hélice  $\alpha$ . Una de ellas, denominada *hélice de reconocimiento*, se inserta en el surco mayor del ADN y contiene la mayoría de los aminoácidos responsables de la especificidad de la unión. Estos aminoácidos contactan con las zonas expuestas de las bases en el surco mayor. Las dos hélices forman un ángulo de  $120^\circ$  y, aunque una de ellas no se inserta en el surco, puede establecer contactos con los grupos fosfato que permiten aumentar la afinidad del reconocimiento. El motivo HGH

<sup>36</sup> a) Pabo, C. O.; Sauer, R. T. "Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition" *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 1053. b) Luscombe, N. M.; Austin, S. E.; Berman, H. M.; Thornton, J. M. "An overview of the structures of protein-DNA complexes" *Genome Biol.* **2000**, *1*, 1. c) Garvie, C. W.; Wolberger, C. "Recognition of specific DNA sequences" *Mol. Cells* **2001**, *8*, 937

<sup>37</sup> a) Harrison, S. C.; Aggarwal, A. K. "DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif" *Ann. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 933. b) Wintjens, R.; Rooman, M. "Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes" *J. Mol. Biol.* **1996**, *262*, 294.

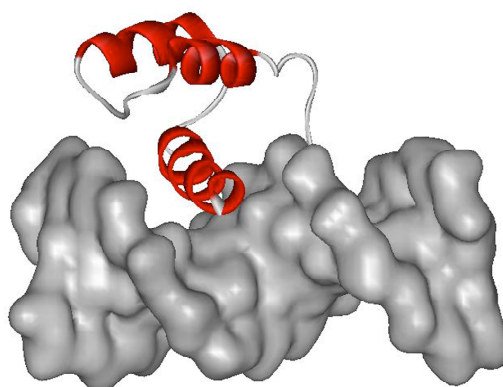
aislado del resto de la proteína es incapaz de unirse al ADN, necesita estar estabilizado por hélices adicionales para plegarse adecuadamente y llevar a cabo el reconocimiento.



**Figura 7.** Estructura de rayos X del complejo entre el dominio de unión al ADN del fago represor 434 y el sitio operador OR3. En la figura se representa el dominio N-terminal de la proteína (residuos del 1 al 69).<sup>38</sup>

### Homeodominio

El homeodominio es el motivo estructural de eucariotas equivalente al HGH procarionta.<sup>39</sup> Una diferencia importante con respecto al HGH es que la hélice de reconocimiento es más larga, por lo que puede establecer más contactos con el ADN. Además, muchas de estas proteínas establecen contactos adicionales a través de los extremos C- o N-terminales con posiciones adyacentes del surco menor. Por ello, estos factores de transcripción son capaces de interactuar de forma específica con el ADN incluso como monómeros.<sup>40</sup>



**Figura 8.** Estructura del homeodominio de la proteína *MAT*  $\alpha$  2 complejada al ADN.<sup>41</sup>

<sup>38</sup> Rodgers, D. W.; Harrison, S. C. "The complex between phage 434 repressor DNA-binding domain and operator site OR3: structural differences between consensus and non-consensus half sites" *Structure* **1993**, *1*, 227.

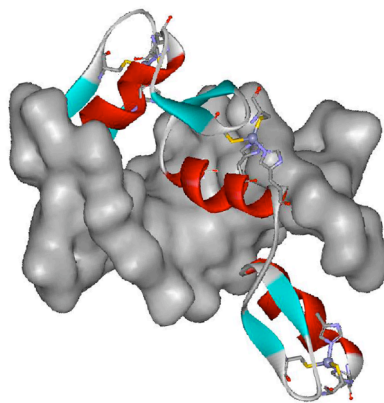
<sup>39</sup> Affolter, M.; Percival-Smith, A.; Muller, M.; Leupin, W.; Gehring, W. J. "DNA binding properties of the purified Antennapedia homodomain" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4093. b) Gehring, W. J.; Muller, M.; Affolter, M.; Percival-Smith, A.; Billeter, M.; Qian, Y. Q.; Otting, G.; Wuthrich, K. "The structure of the homodomain and its functional implications" *Trends Genet.* **1990**, *6*, 323.

<sup>40</sup> Khorasanizadeh, S; Rastinejad, F. "Transcription factors: the right combination for the DNA lock" *Curr. Biol.* **1999**, *9*, R456.

<sup>41</sup> Wolberger, C.; Vershon, A. K.; Liu, B.; Johnson, A. D.; Pabo, C. O. "Crystal structure of a MAT alpha 2-homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions" *Cell* **1991**, *67*, 517.

### Dedos de cinc

Es uno de los motivos estructurales más utilizados por las proteínas, sobre todo en eucariotas, para interactuar con el ADN.<sup>42</sup> Este motivo se caracteriza por contener un catión  $Zn^{2+}$  complejoado con cuatro residuos de Cys y/o His. Dependiendo de la estequiometría del complejo de coordinación, se pueden distinguir dedos de cinc del tipo Zn-Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>,<sup>43</sup> Zn-Cys<sub>4</sub><sup>44</sup> y Zn<sub>2</sub>-Cys<sub>6</sub>. El átomo de Zn ejerce una función estructural que permite mantener empaquetadas una hélice  $\alpha$ , que reconoce el surco mayor (hélice de reconocimiento) y una lámina  $\beta$ . De este modo, se consigue la estabilización y correcta orientación de la hélice. La mayor parte de estas proteínas contienen en su secuencia varios dedos de cinc unidos de forma covalente, pues los motivos monoméricos por sí solos presentan una afinidad muy baja.



**Figura 9.** Estructura de rayos X del complejo entre el factor Zif268 y el ADN.<sup>45</sup>

### Motivos bZIP

Es uno de los motivos de reconocimiento de ADN más sencillos. Consiste en homo- o heterodímeros no covalentes de hélices  $\alpha$ , cuyas unidades monoméricas constan de dos regiones bien diferenciadas:<sup>46</sup>

- la **cremallera de leucinas**, compuesta por unos 30 aminoácidos y situada en el extremo C-terminal. Es la encargada de la dimerización y se caracteriza por la repetición del residuo de leucina cada 7 aminoácidos, lo que genera una cara hidrofóbica que posibilita la interacción entre las dos cremalleras de cada monómero.
- la **región básica**, así denominada por la presencia de aminoácidos cargados positivamente, está situada en el extremo N-terminal y contiene unos 20 aminoácidos. Es la encargada del reconocimiento del ADN, se inserta en el surco

---

<sup>42</sup> Klug, A.; Schwabe, J. W. R. "Protein motifs 5. Zinc fingers" *FASEB J.* **1995**, 9, 597.

<sup>43</sup> Wolfe, S. A.; Neklodova, L.; Pabo, C. O. "DNA recognition by Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger proteins" *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, 29, 183.

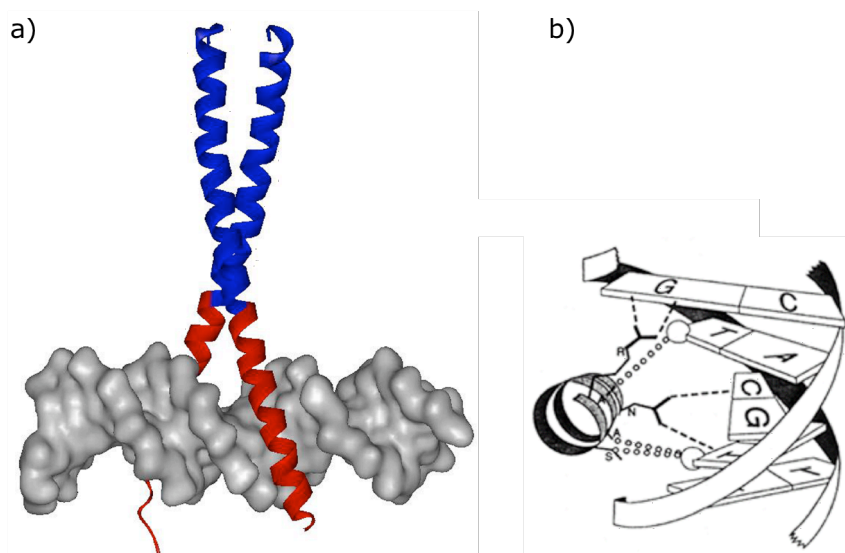
<sup>44</sup> Rastinejad, F.; Perlmann, T.; Evans, R. M.; Sigler, P. B. "Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats" *Nature* **1995**, 375, 203.

<sup>45</sup> Elrod-Erickson, M.; Benson, T. E.; Pabo, C. O. "High-resolution structures of variant Zif268-DNA complexes: implications for understanding zinc finger-DNA recognition" *Structure* **1998**, 6, 451.

<sup>46</sup> a) Kerppola, T. K.; Curran, T. "Transcription factors interactions: basics on zippers" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, 1, 71. b) Hu, J. C.; Sauer, R. T. "The basic-region leucine-zipper family of DNA binding proteins" *Nucleic Acids Mol. Biol.* **1992**, 6, 82. c) Hurst, H. C. "Transcription factors 1: bZIP proteins" *Protein Profile* **1994**, 2, 105.

mayor estableciendo contactos electrostáticos, hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno con las bases del ADN.

Ambas regiones están separadas por un espaciador de seis aminoácidos cuya longitud, aunque no secuencia, se conserva en toda la familia.



**Figura 10.** a) Estructura cristalina del complejo entre el FT *GCN4* y el sitio de unión AP1 [5'-d(ATGACTCAT)-3']. En azul se representa la cremallera de leucinas y en rojo, la región básica. b) Contactos llevados a cabo por la región básica de reconocimiento a través del eje longitudinal de la hélice  $\alpha$ . Se representan las cadenas laterales de los residuos más importantes que contactan directamente con las bases del ADN [Asparagina 235 (N235), Alanina 238 (A238), Alanina 239 (A239), Serina 242 (S242), Arginina 243 (R243)]; (°°°°) contactos hidrofóbicos, (----) contactos por enlace de hidrógeno.<sup>47</sup>

Un aspecto relevante de las interacciones bZIP-ADN es que en disolución y en ausencia del ADN diana la región básica carece de una estructura secundaria clara y sólo se pliega para formar una hélice  $\alpha$  en presencia del ADN que contiene la secuencia correcta de reconocimiento.<sup>48</sup>

Aunque la dimerización de estas proteínas es un proceso que puede ocurrir en ausencia de ADN, se ha comprobado que es probable que la unión al ADN se produzca de forma secuencial, de forma que primero se ensambla un monómero y, luego, se produce la dimerización.<sup>49</sup> Dado que el intermedio monómero-ADN es inestable cinéticamente en relación con el complejo dímero-ADN final, el factor de transcripción puede discriminar entre distintos ADNs diana posibles sin quedarse atrapado en secuencias no específicas.

Las proteínas bZIP pueden formar heterodímeros. El hecho de que pueda o no formarse un heterodímero depende de la capacidad de dimerización de las hélices  $\alpha$  de las dos

<sup>47</sup> a) Ellenberg, T. E.; Brandl, C. J.; Struhl, K.; Harrison, S. C. "The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex" *Cell* **1992**, *71*, 1223. b) Köning, P.; Richmond, T. J. "The X-ray structure of the GCN4-bZIP bound to ATF/CREB site DNA shows the complex depends on DNA flexibility" *J. Mol. Biol.* **1993**, *233*, 139.

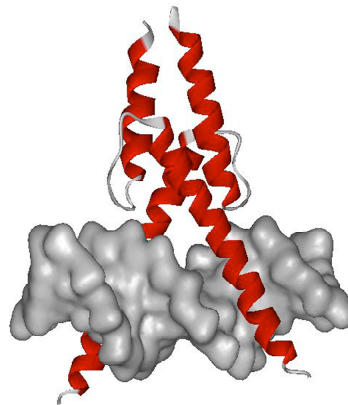
<sup>48</sup> a) Weiss, M. A.; Ellenberger, T.; Wobbe, C. R.; Lee, J. P.; Harrison, S. C.; Struhl, K. "Folding transition in the DNA-binding domain of GCN4 on specific binding to DNA" *Nature* **1990**, *347*, 575. b) O'Neil, K. T.; Shuman, J. D.; Ampe, C.; DeGrado, W. F. "DNA-induced increase in the alpha-helical content of C/EBP and GCN4" *Biochemistry* **1991**, *30*, 9030.

<sup>49</sup> a) Kohler, J. J.; Schepartz, A. "Effects of nucleic acids and polyanions on dimer formation and DNA binding by bZIP and bHLHZip transcription factors" *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2435. b) Kohler, J. J.; Schepartz, A. "Kinetic studies of Fos-Jun-DNA complex formation: DNA binding prior to dimerization" *Biochemistry* **2001**, *40*, 130.

cremalleras de leucina, es decir, de la secuencia concreta de aminoácidos de ambas regiones.

#### Hélice-Lazo-Hélice (bHLH)

Este motivo es muy similar al bZIP, con la salvedad de que en el motivo bHLH las dos regiones de hélice  $\alpha$  de cada monómero se encuentran separadas por un lazo polipeptídico no helicoidal. Al igual que ocurre con el motivo bZIP, la región básica carece de estructura en ausencia de un ADN que contenga la secuencia correcta de unión. Los factores de transcripción que contienen el motivo bHLH pueden unirse al ADN en forma de homo o heterodímeros.



**Figura 11.** Estructura de rayos X del complejo entre MyoD y el ADN. Están representados los residuos 102-162.<sup>50</sup>

Existe una familia de factores de transcripción, b/HLH/zip, que contiene tanto el motivo de dimerización HLH como la cremallera de leucinas. A esta familia pertenece la proteína **Myc**, que puede unirse al ADN formando un heterodímero con la proteína **Max**, estando ambas implicadas en procesos de diferenciación celular. La proteína Max también forma fácilmente un homodímero que se une con alta afinidad al ADN,<sup>51</sup> mientras que Myc es incapaz de homodimerizar.

Otro ejemplo de factor de transcripción que combina varios motivos estructurales distintos para interactuar con el ADN es **Skn-1**,<sup>52</sup> que posee una región básica helicoidal en el extremo C-terminal que reconoce la misma secuencia que la proteína bZIP GCN4, pero no posee una cremallera de leucinas. El extremo N-terminal interactúa con el surco mayor de manera análoga a los homeodominios.

---

<sup>50</sup> Ma, P. C.; Rould, M. A.; Weintraub, H.; Pabo, C. O. "Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation" *Cell* **1994**, *77*, 451.

<sup>51</sup> Ferre-D'Amare, A. R.; Prendergast, G. C.; Ziff, E. B.; Burley, S. K. "Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain" *Nature* **1993**, *363*, 38.

<sup>52</sup> a) Blackwell, T. K.; Bowerman, B.; Priess, J. R.; Weintraub, H. "Formation of a monomeric DNA binding domain by Skn-1 bZIP and homeodomain elements" *Science* **1994**, *266*, 621. b) Pal, S.; Lo, M-C.; Schmidt, D.; Pelczer, I.; Thurber, S.; Walker, S. "Skn-1: evidence for a bipartite recognition helix in DNA binding" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 5556.

### 5.3. Conclusiones generales sobre las interacciones entre FTs y ADN

A partir de lo expuesto anteriormente se puede deducir que no existen unas reglas sencillas que rijan el reconocimiento del ADN por parte de los factores de transcripción. Sin embargo, es posible extraer una serie de principios generales.

La mayoría de los factores de transcripción se unen a secuencias específicas de ADN como **homo-** o **heterodímeros**.

El reconocimiento se produce mediante la interacción de determinadas zonas de la proteína (enlace amida o cadenas laterales, a menudo situadas en una hélice  $\alpha$ ) con los fosfatos o con los grupos funcionales expuestos por las bases, fundamentalmente en el **surco mayor**.<sup>53</sup> En algunos casos, las proteínas establecen contactos adicionales con el **surco menor** en zonas contiguas del ADN.

Las interacciones proteína-ADN con una afinidad dentro del rango de  $K_a \sim 10^8$ - $10^{11}$  M<sup>-1</sup> se consideran **específicas**, mientras que interacciones más débiles con constantes de afinidad del orden  $10^3$ - $10^5$  M<sup>-1</sup> se consideran **inespecíficas**.<sup>54</sup>

Como en cualquier proceso de reconocimiento intermolecular, los factores responsables de la interacción se pueden agrupar según su origen entálpico o entrópico. Dentro de los **factores entálpicos**, contribuyen favorablemente a la formación del complejo proteína-ADN los enlaces de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones electrostáticas; contribuyen desfavorablemente la desolvatación de los grupos polares y la desviación de los parámetros geométricos ideales en el complejo. En cuanto a los **factores entrópicos**, favorecen la interacción proteína-ADN la deshidratación de regiones no polares (efecto hidrofóbico), y la redistribución iónica del complejo, mientras que desfavorecen la interacción la pérdida de grados de libertad rotacionales, vibracionales y traslacionales, así como el plegamiento de las cadenas peptídicas.<sup>55</sup>

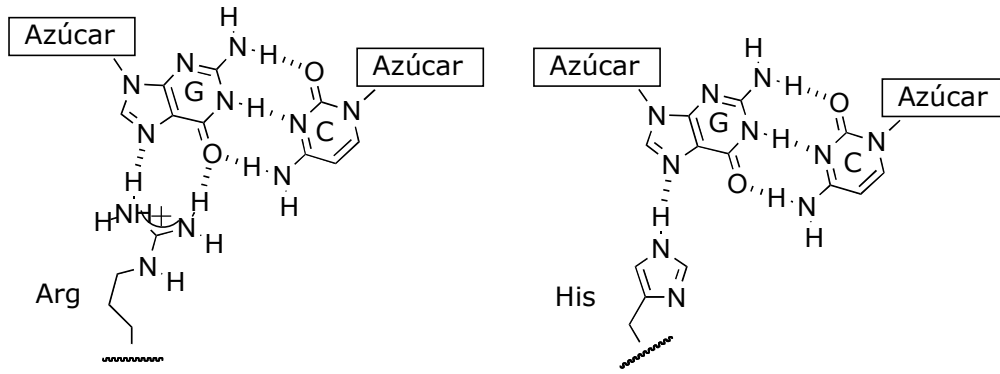
Los contactos directos entre proteínas y ácidos nucleicos se producen mediante las siguientes interacciones intermoleculares:

- **Enlaces de hidrógeno.** Son muy importantes para la especificidad y son más favorables energéticamente cuanto mayor sea la linealidad entre el H-donante y el H-aceptor. Existe una gran variedad de aminoácidos cuyas cadenas laterales pueden actuar como dadoras oceptoras de enlaces de H: Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, Glu, Asp, Arg, Lys, His y Cys. En cuanto al ADN, los heteroátomos y grupos funcionales de la desoxirribosa y de las bases que no están implicados en los enlaces de hidrógeno de la doble hélice pueden actuar como dadores o aceptores de enlaces de hidrógeno. En muchos casos, estos enlaces de hidrógeno están mediados por moléculas de H<sub>2</sub>O. Son particularmente importantes los enlaces de hidrógeno bidentados entre Arg y guanina, y entre Gln y adenina.

<sup>53</sup> a) Seeman, N. C.; Roseberg, J. M.; Rich, A. "Sequence specific recognition of double helical nucleic acids by proteins" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 804. b) Luscombe, N. M.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M. "Amino acid-base interactions: a three dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level" *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2860.

<sup>54</sup> Vázquez *et al*, *vid.* nota 24b.

<sup>55</sup> Jen-Jacobson, L.; Engler, L. E.; Jacobson, L. A. "Structural and thermodynamic strategies for site-specific DNA binding proteins" *Structure* **2000**, *8*, 1015.



**Figura 12.** Ejemplos de enlaces de hidrógeno entre algunos aminoácidos y zonas expuestas de G·C.

- Puentes salinos. Son interacciones electrostáticas que se producen entre el esqueleto fosfodiéster y los residuos de aminoácidos con cadenas laterales básicas (Lys, Arg o His). A diferencia de los enlaces de hidrógeno no son direccionales y son efectivos a larga distancia. Por tanto, no confieren especificidad a la interacción, aunque contribuyen a la estabilidad termodinámica del complejo proteína-ADN.
- Interacciones no polares. Son interacciones de corto alcance, por lo que tienen un menor peso en el reconocimiento específico, aunque son un componente importante de la unión proteína-ADN. Se producen entre residuos de aminoácidos con cadenas laterales no polares (Ala, Leu, Ile) y grupos no polares de las bases. Destacan las interacciones llevadas a cabo con el grupo metilo de la timina.

Existen además otros **factores indirectos** que también influyen en las interacciones proteína-ADN, como los cambios conformacionales locales en el ADN, en particular en determinadas secuencias como (dA)<sub>5-6</sub>, que causan curvaturas en la estructura de la macromolécula y facilitan así la unión del FT.<sup>56</sup>

<sup>56</sup> Allemann, R. K.; Egli, M. "DNA recognition and bending" *Chem. & Biol.* **1997**, *4*, 643.

## 6. Miniproteínas para el reconocimiento de secuencias específicas de ADN

### 6.1. Consideraciones generales

Tomando como base los principios de reconocimiento del ADN por parte de los factores de transcripción, uno de los objetivos de mayor interés en el campo de la Química Biológica es el diseño y síntesis de derivados peptídicos (**miniproteínas**) que de alguna forma sean capaces de reproducir las características de las proteínas naturales en cuanto a afinidad y especificidad de reconocimiento de secuencias de ADN. Dichos compuestos tienen una doble utilidad potencial: por una parte, pueden servir como sondas para obtener información acerca de los procesos de reconocimiento biomolecular y, por otra parte, pueden tener aplicaciones biomédicas, ya que esas moléculas permitirían modular de forma programada la expresión de genes específicos.<sup>57</sup>

En el diseño de este tipo de compuestos deberían considerarse, además de las características estructurales de los complejos ADN-factores de transcripción, factores termodinámicos que pueden influir en ese reconocimiento. En la práctica, la determinación tanto experimental como teórica de estos factores resulta difícil, de forma que el diseño racional es complicado y se requieren pruebas de ensayo y error.

En primer lugar, debe valorarse en qué medida se puede reducir el tamaño del factor de transcripción natural,<sup>58</sup> ya que en la mayoría de los casos el truncamiento de secuencias de la proteína conlleva una reducción importante o incluso la desaparición de la afinidad por secuencias específicas de ADN.<sup>59</sup> La mayoría de los trabajos realizados hasta el momento para la síntesis de miniproteínas funcionales de este tipo se basa en el modo de reconocimiento de factores de transcripción de la familia bZIP.<sup>60</sup>

### 6.2. Dímeros artificiales de la región básica de proteínas bZIP

En 1990, el grupo de Peter Kim demostró que la eliminación de la cremallera de leucinas de la proteína bZIP GCN4 y la dimerización de las regiones básicas a través de un enlace covalente disulfuro, da lugar a péptidos capaces de unirse a las secuencias diana de la proteína natural (5'-ATGAcTCAT-3' y 5'-ATGAcgTCAT-3') con afinidades de orden nanomolar

---

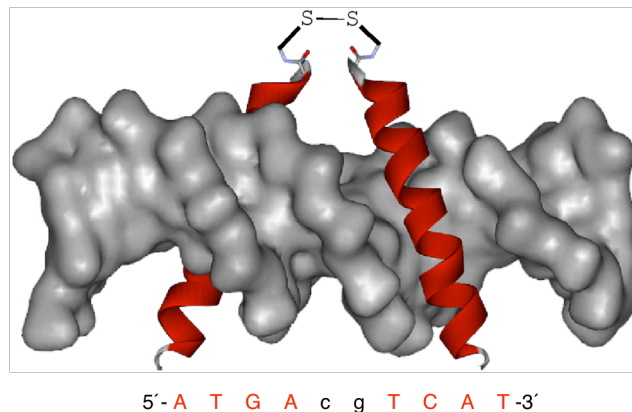
<sup>57</sup> Vázquez *et al*, *vid.* nota 24b.

<sup>58</sup> DeGrado, W. F.; Sosnick, T. R. "Protein minimization: downsizing through mutation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5680.

<sup>59</sup> a) Ghosh, I.; Yao, S.; Chmielewski en *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Eds: D. Barton y K. Nakanishi, Pergamon, cap. 7.13, **1999**. b) Pabo, C.O.; Peisach, E.; Grant, R. A. "Design and selection of novel Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger proteins" *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 313. c) Pedone, P. V.; Ghirlando, R.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.; Felsenfeld, G.; Omichinski, J. G. "The single Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> zinc finger domain of the GAGA protein flanked by basic residues is sufficient for high-affinity specific DNA binding" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2822.

<sup>60</sup> Vázquez *et al*, *vid.* nota 24b.

a 4 °C (Figura 13).<sup>61</sup> El dímero sintetizado conserva 31 residuos de la proteína natural y contiene tres aminoácidos adicionales (GGC) en el extremo C-terminal. En estudios posteriores se comprobó que era posible acortar la región básica hasta 23 aminoácidos, siendo el dímero resultante todavía capaz de reconocer específicamente las secuencias consenso con afinidades en torno a 10 nM a 4 °C.<sup>62</sup>



**Figura 13.** Modelo hipotético de interacción con el ADN del dímero disulfuro diseñado por el grupo de Peter Kim.

El grupo de William Goddard demostró más adelante que dicha dimerización puede realizarse también a través del extremo N-terminal, lo que permite reconocer secuencias de ADN inversas. En concreto, prepararon un dímero disulfuro de las regiones básicas de la proteína v-Jun y comprobaron que reconocía con notable afinidad la secuencia TCATcgATGA.<sup>63</sup> El mismo grupo demostró que la estrategia se puede extender para sintetizar heterodímeros o incluso trímeros que reconozcan una composición de secuencias de ADN.<sup>64</sup>

Diversos grupos de investigación demostraron después que las regiones básicas se pueden dimerizar utilizando otro tipo de conectores covalentes o no covalentes. El grupo de Alanna Schepartz publicó el primer ejemplo de dimerización no covalente basada en la utilización de metales como elementos de dimerización. Para ello acoplaron una unidad de terpiridina en el extremo C-terminal del péptido, de tal forma que en presencia de Fe(II) se forma un complejo octaédrico dimérico (Figura 14a).<sup>65</sup>

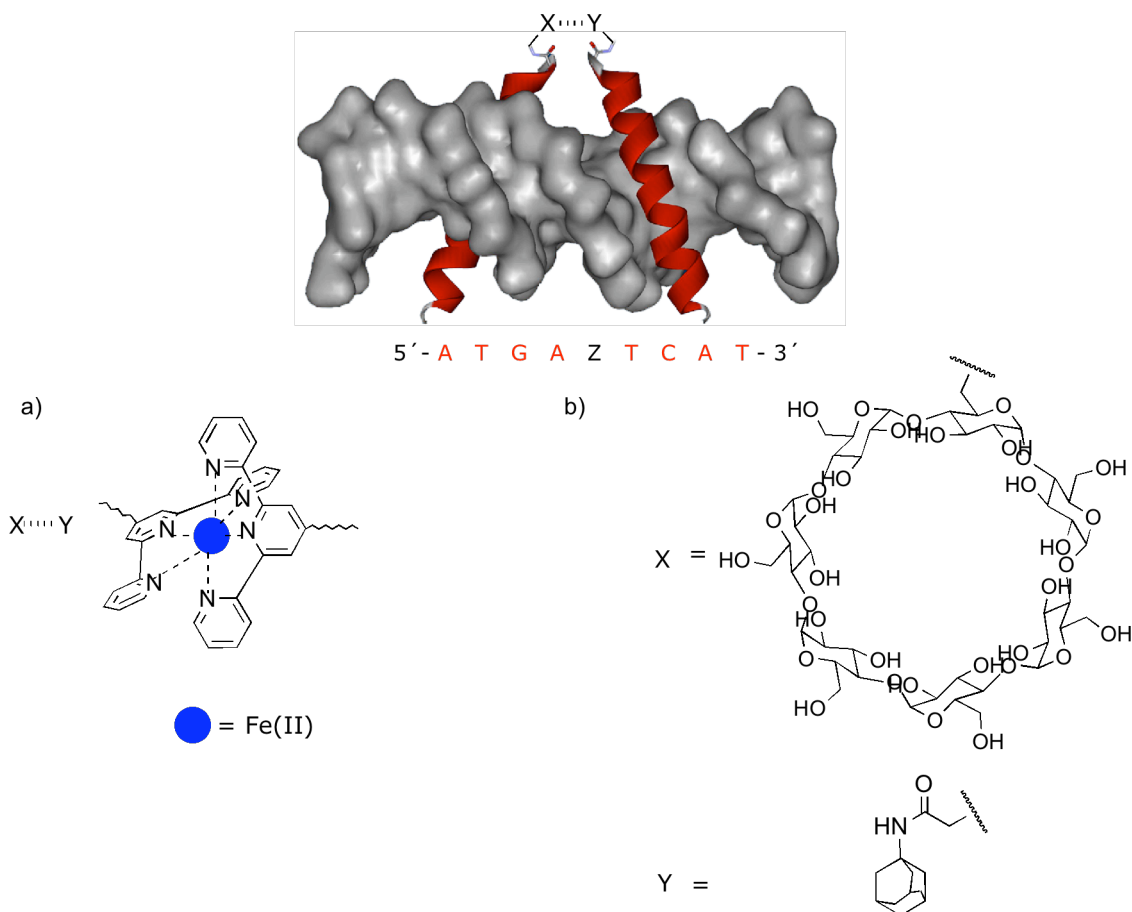
<sup>61</sup> Talanian, R. V.; McKnight, C. J.; Kim, P. S. "Sequence-specific DNA binding by a short peptide dimer" *Science* **1990**, 249, 769.

<sup>62</sup> Talanian, R. V.; McKnight, C. J.; Rutkowski, R.; Kim, P. S. "Minimum length of a sequence-specific DNA binding peptide" *Biochemistry* **1992**, 31, 6871.

<sup>63</sup> a) Park, C.; Campbell, J. L.; Goddard III, W. A. "Protein stitchery: design of a protein for selective binding to a specific DNA sequence" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 9094. b) Park, C.; Campbell, J. L.; Goddard III, W. A. "Design superiority of palindromic DNA sites for site-specific recognition of proteins: tests using protein stitchery" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 4892.

<sup>64</sup> Park, C.; Campbell, J. L.; Goddard III, W. A. "Design and synthesis of a new peptide recognizing a specific 16-base-pair site of DNA" *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6287.

<sup>65</sup> Cuenoud, B.; Schepartz, A. "Altered specificity of DNA-binding proteins with transition metal dimerization domains" *Science* **1993**, 259, 510.



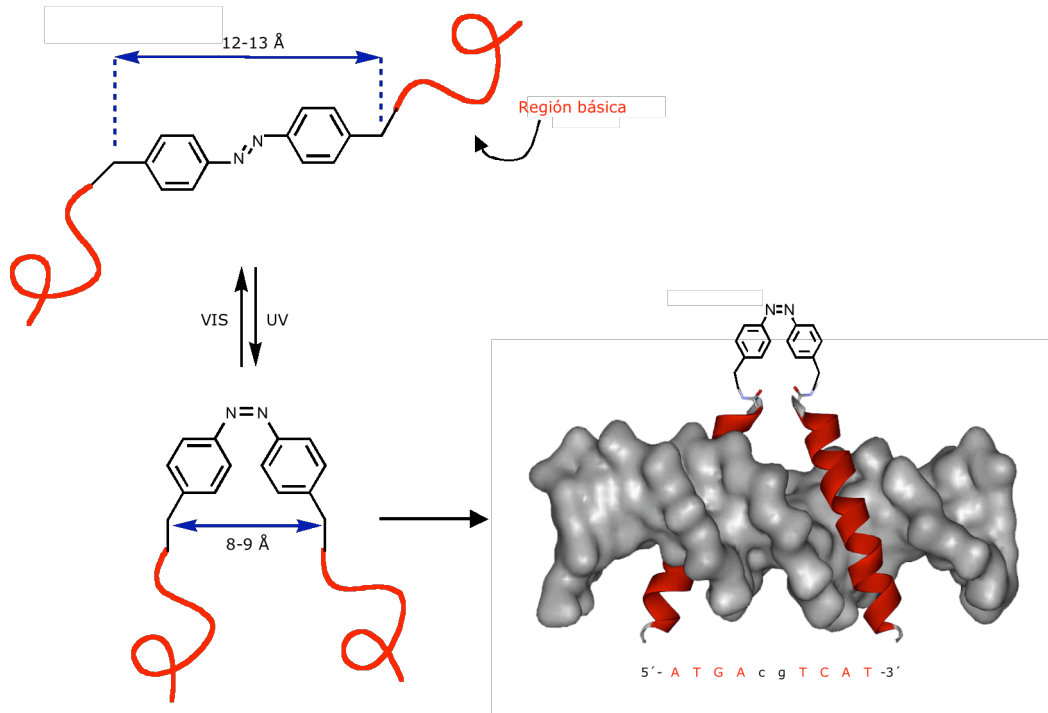
**Figura 14.** Modelo cualitativo de unión al ADN: a) dimerización mediante un complejo de coordinación, b) dimerización mediante un complejo de inclusión ciclodextrina-adamantano.

Otro ejemplo de dimerización no covalente lo presentó el grupo de Morii. La estrategia se basa en realizar una dimerización a través del extremo C-terminal mediante la formación de un complejo de inclusión ciclodextrina-adamantano (Figura 14b).<sup>66</sup>

En el año 2000 nuestro grupo de investigación publicó el diseño y síntesis de un híbrido derivado del factor de transcripción bZIP GCN4 en el que se eliminaron las cremalleras de leucinas y los fragmentos resultantes se dimerizaron a través del extremo C-terminal mediante un grupo *azobenceno*. Dado que este grupo es fotomodulable, es posible el control de la afinidad de unión al ADN del dímero resultante (Figura 15). Así, mientras el isómero *cis* posee una elevada afinidad por su secuencia de ADN diana, el isómero *trans* interacciona con dicha secuencia unas 60-80 veces peor.<sup>67</sup>

<sup>66</sup> a) Ueno, M.; Murakami, A.; Makino, K.; Morii, T. "Arranging quaternary structure of peptides by cyclodextrin-guest inclusion complex: sequence-specific DNA binding by a peptide dimer with artificial dimerization module" *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12575. b) Ueno, M.; Makino, K.; Morii, T. "Recognition of nonpalindromic DNA sequence by a peptide heterodimer with artificial dimerization module" *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11137.

<sup>67</sup> Caamaño, A. M.; Vázquez, M. E.; Martínez-Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. "A light-modulated sequence specific DNA-binding peptide" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3104.



**Figura 15.** La menor distancia en el conformero *cis* favorece una mayor afinidad por el ADN que en el caso del isómero *trans*.

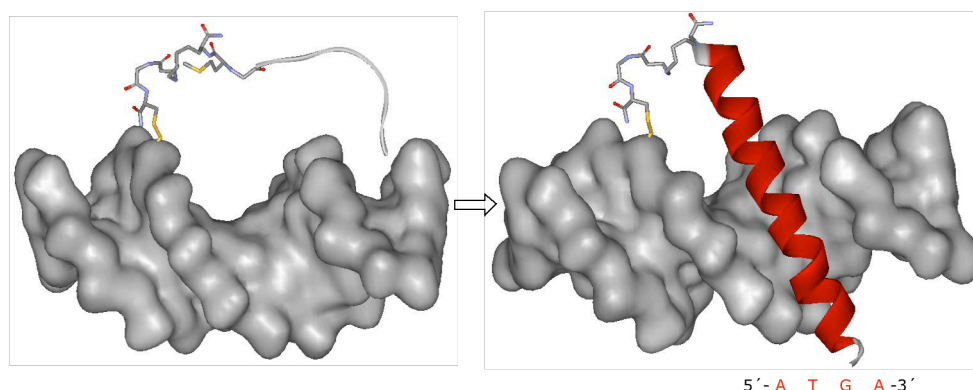
### 6.3. Interacción con el ADN de monómeros derivados de la región básica de GCN4

Los monómeros de la región básica de GCN4 no son capaces, por sí solos, de reconocer con alta afinidad la secuencia consenso 5'-ATGA-3' (su afinidad a 4 °C se ha calculado en torno a 1-10  $\mu\text{M}$ )<sup>68</sup>.

En 1995 el grupo de Verdine demostró que uniendo covalentemente la región básica de la proteína GCN4 al ADN a través de un enlace disulfuro, era posible que este pequeño fragmento peptídico reconociese su secuencia diana de ADN.<sup>69</sup> El proceso de interacción entre el ADN y el péptido pasa a ser intramolecular, por lo que el coste entrópico es mucho menor que en el reconocimiento bimolecular (Figura 16).

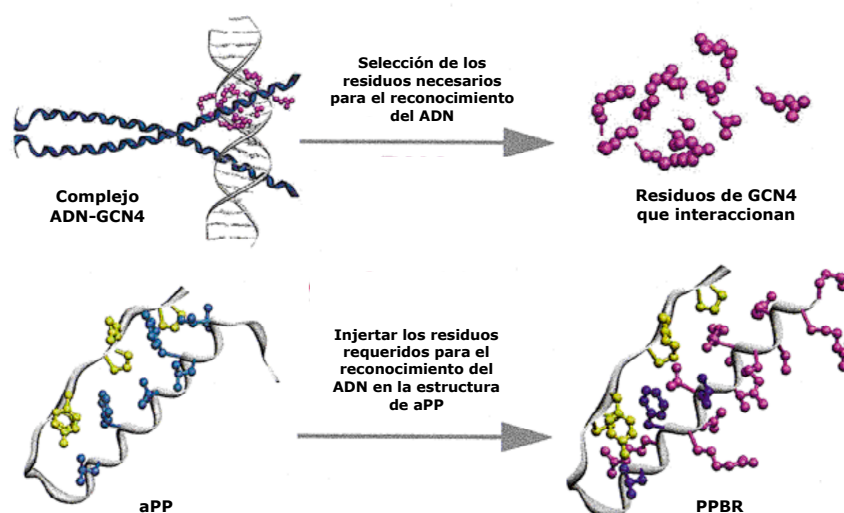
<sup>68</sup> Zhang, M.; Zhao, H.; Taylor, J. W. "The effect of C-terminal helix stabilization on specific DNA binding by monomeric GCN4 peptides" *J. Pept. Sci.* **2002**, *8*, 125.

<sup>69</sup> Stanojevic, D.; Verdine, G. L. "Deconstruction of GCN4/GCRE into a monomeric peptide-DNA complex" *Nature Struct. Biol.* **1995**, *2*, 450.



**Figura 16.** Modelo que esquematiza el proceso de reconocimiento del híbrido de Verdine.

El grupo de Alanna Schepartz describió la síntesis de un híbrido en el que se injertaron los residuos de la región básica de GCN4 claves para el reconocimiento del ADN en las posiciones adecuadas del polipéptido pancreático de ave (aPP). Esta proteína consiste en una hélice  $\alpha$  unida mediante un giro a otra hélice de poliprolinas. Los aminoácidos de GCN4 se colocaron en la hélice expuesta al disolvente y los residuos encargados de mantener la estructura helicoidal quedan empaquetados en la hélice (Figura 17).<sup>70</sup> De esta forma consiguieron péptidos de 42 aminoácidos capaces de interactuar con la secuencia consenso ATGA con elevadas afinidades. Posteriormente, optimizaron las secuencias N-terminales para facilitar el plegamiento peptídico, logrando afinidades a temperatura ambiente en el mismo rango que el factor de transcripción natural sin la necesidad de la dimerización.<sup>71</sup>

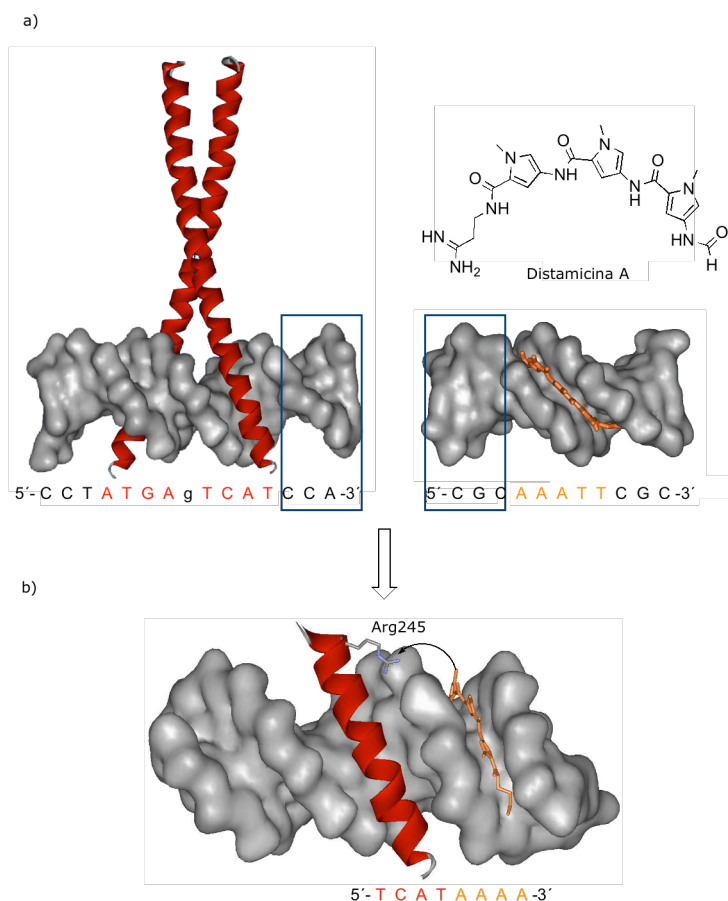


**Figura 17.** Esquema del diseño de Schepartz. El péptido PPBR de 46 aa se une a la secuencia CRE<sup>hs</sup> con una constante de disociación de 1.6 nM.

<sup>70</sup> Zondlo, N. J.; Schepartz, A. "Highly specific DNA recognition by a designed miniature protein" *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6938.

<sup>71</sup> Chin, J. W.; Schepartz, A. "Concerted evolution of structure and function in a miniature protein" *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2929.

En nuestro grupo de investigación se demostró que si se une covalentemente la región básica de GCN4 a una molécula pequeña capaz de reconocer con una afinidad moderada una secuencia adyacente al lugar de unión de la región básica, es posible el reconocimiento específico. En concreto, se conjugó la región básica de GCN4 con un polipirrol de tipo distamicina capaz de unirse a través del surco menor del ADN a secuencias ricas en A y T. El polipirrol, una vez unido al surco menor, actúa como anclaje y permite el reconocimiento específico de la región básica de la proteína bZIP, de forma que el híbrido realiza un reconocimiento simultáneo a través de los surcos mayor y menor del ADN (Figura 18).<sup>72</sup>



**Figura 18.** a) Estructura de rayos X de los complejos del FT GCN4 y de la distamicina. b) Modelo cualitativo de interacción simultánea en surcos vecinos.

<sup>72</sup> a) Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Martínez-Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. "Design and synthesis of a peptide that binds specific DNA sequences through simultaneous interaction in the major and in the minor groove" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4723. b) Blanco, J. B.; Dodero, V. I.; Vázquez, M. E.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. "Sequence-specific DNA binding by noncovalent peptide-tripyrrole conjugates" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8210.

## 7. Fos y Jun. Relevancia biológica y características estructurales

La familia de oncoproteínas de **Jun** forma parte, junto con la familia de oncoproteínas de **Fos**, del complejo proteico AP-1,<sup>73</sup> cuya secuencia de reconocimiento del ADN se encuentra en una gran variedad de regiones promotoras de genes que controlan la división celular.<sup>74</sup> Las proteínas Fos y Jun participan en la regulación de numerosos procesos celulares, entre los que se incluyen la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y oncogénesis. Los miembros de sus familias, c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, Fra-1, Fra-2 y FosB -siendo prototípicos c-Fos y c-Jun- aparecen ampliamente expresados en distintos tipos de células y tejidos.<sup>75</sup>

Como se ha comentado con anterioridad (página 18) se ha demostrado que la generación y propagación de muchos cánceres esta relacionada con una desregulación en los niveles de expresión de Jun, lo que lo convierte en un **objetivo terapéutico de gran interés**.<sup>76</sup>

Tanto Fos como Jun pertenecen al grupo de factores de transcripción que utilizan el motivo bZIP en su interacción con el ADN. Se unen diméricamente al denominado *TRE* - elemento de respuesta de TPA (tetradecanoil forbolacetato). La comparación de varias secuencias de TRE permitió averiguar que la secuencia diana consenso consiste en TGA(C/G)TCA.<sup>77</sup> La proteína Jun puede homodimerizar y, preferentemente, heterodimerizar con la proteína Fos. La cremallera de leucinas de Fos forma un homodímero relativamente inestable, lo que conduce a la formación preferente del heterodímero.<sup>78</sup> Dentro de los miembros de las familias de Fos y Jun, la identidad de secuencia de aminoácidos es muy similar en el dominio de unión al ADN, pero es más limitada fuera de ese dominio. Esto puede verse reflejado en distintas actividades transcripcionales.<sup>79</sup>

La estructura resuelta por difracción de rayos X (Figura 19) del heterodímero formado por c-Fos y c-Jun unidos al ADN muestra que ambas proteínas forman hélices  $\alpha$  continuas. La dimerización implica al dominio de cremallera de leucinas que forma un *coiled-coil* asimétrico en el que la subunidad Jun se enrolla alrededor de la subunidad Fos. Las dos subunidades se separan para unirse independientemente al surco mayor del sitio de unión AP-1.<sup>80</sup>

<sup>73</sup> Curran y Franza, *vid.* nota 31.

<sup>74</sup> Angel, P.; Karin, M. "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation" *Biochimica et Biophysica Acta* **1991**, *1072*, 129.

<sup>75</sup> Chinenov, Y.; Kerppola, T. K. "Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity" *Oncogene* **2001**, *20*, 2438.

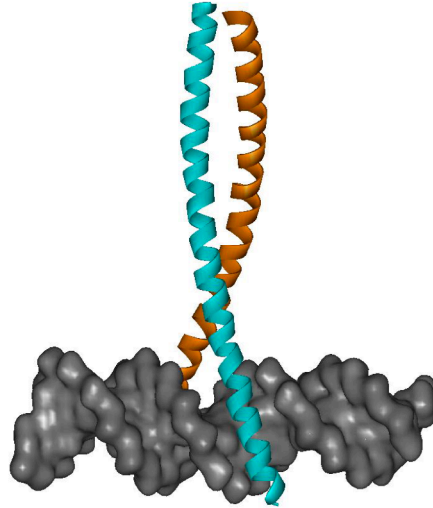
<sup>76</sup> Angel y Karin, *vid.* nota 74.

<sup>77</sup> *Ibidem*.

<sup>78</sup> a) O'Shea, E. K.; Rutkowski, R.; Stafford, W. F. III; Kim, P. S. "Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from Fos and Jun" *Science* **1989**, *245*, 646. b) O'Shea, E. K.; Rutkowski, R.; Kim, P. S. "Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer" *Cell* **1992**, *68*, 699.

<sup>79</sup> Chiu, R.; Angel, P.; Karin, M. "Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun" *Cell* **1989**, *59*, 979.

<sup>80</sup> Glover, J. N. M.; Harrison, S. C. "Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA" *Nature* **1995**, *373*, 257.



**Figura 19.** Estructura de rayos X del complejo de c-Fos (verde) y c-Jun (naranja) y el sitio de unión AP1 [5'-d(ATGAcTCAT)-3'].

La versatilidad funcional de las familias de proteínas de Fos y Jun se debe a que a menudo actúan en combinación con otros factores de transcripción, lo que da lugar a complejos nucleoproteicos con elevada especificidad de secuencia. Los siete miembros de las familias de Fos y Jun pueden formar 18 homo o heterodímeros diferentes. Fos y Jun también pueden interactuar con otras proteínas bZIP (como ATF, C/EBP, Maf...). Asimismo, pueden interactuar con proteínas de otras familias estructurales que reconocen sitios de unión del ADN adyacentes al sitio AP-1, como por ejemplo factores de transcripción de las familias de NFAT, Ets, Smad y bHG. Los complejos multiproteicos así formados son más estables y su especificidad de reconocimiento puede extenderse a elementos reguladores a los que no se unen las proteínas individuales. La unión cooperativa de Fos-Jun y proteínas NFAT (implicadas en la regulación de genes inducidos durante la activación de células T) aumenta en gran medida la afinidad en la unión al ADN<sup>81</sup> y la actividad transcripcional en comparación con las proteínas individuales.<sup>82</sup>

**Las proteínas bZIP Fos y Jun, en suma, están relacionadas con los mecanismos de control del ciclo celular, con la consiguiente implicación en el cáncer y otras enfermedades proliferativas. Por todo ello existe un gran interés en interferir de forma programada en su actividad, por ejemplo inhibiendo su capacidad para unirse a sus secuencias diana de ADN.**

---

<sup>81</sup> La estructura del complejo NFAT-Fos-Jun-ADN ha sido resuelto por cristalografía de rayos X: Chen, L.; Glover, J. N. M.; Hogan, P. G.; Rao, A.; Harrison, S. C. "Structure of the DNA binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA" *Nature* **1998**, 392, 42.

<sup>82</sup> Chinenov y Kerppola, *vid.* nota 75.

## 8. Estrategias para inhibir la actividad de factores de transcripción. Antecedentes sobre el desarrollo de antagonistas de Jun

El desarrollo de estrategias para la regulación artificial de la expresión genética ha sido y es un tema de investigación prioritario en biología celular y biomedicina. Una estrategia general para la represión de genes específicos consiste en el **secuestro e inactivación de factores de transcripción** responsables de inducir la transcripción de dichos genes, sobre todo de aquellos que, operando de forma errónea, están en el origen de enfermedades como el cáncer.

En las últimas décadas, se han desarrollado diversas estrategias para lograr dicha inactivación. Una de ellas se basa en utilizar ácidos nucleicos que puedan funcionar como **cebos codificados (DNA decoys)** para interactuar con dichas proteínas. Estos cebos consisten en oligonucleótidos sintéticos (ODN) de doble cadena que contienen la secuencia consenso de unión del factor de transcripción que se desea secuestrar.<sup>83</sup> Así, cuando el cebo ODN alcanza el núcleo celular puede unirse a factores de transcripción libres e impedir su interacción con las regiones promotoras del gen.

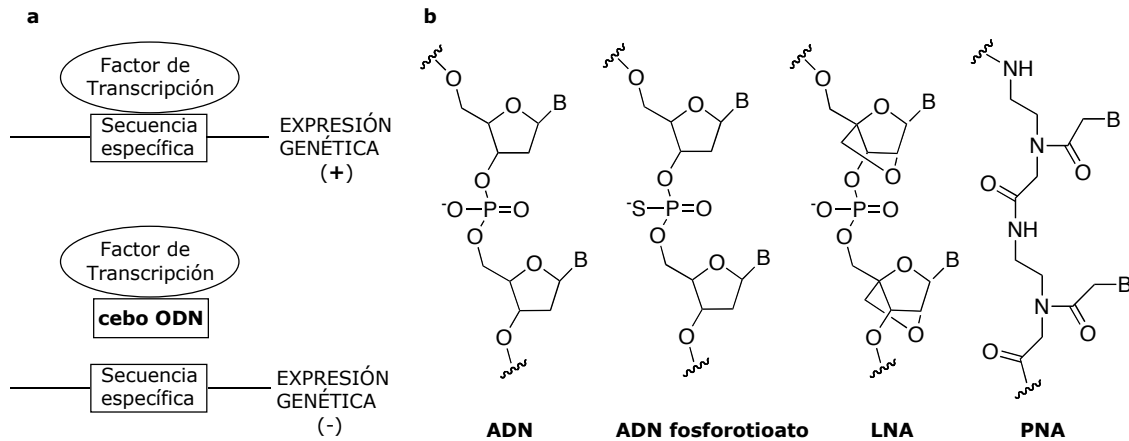
Además de ADNs de doble cadena también se han ensayado *in vivo* análogos de ácidos nucleicos modificados en su estructura, tales como los **ODN fosforotioato**,<sup>84</sup> en los que un oxígeno no puente de los grupos fosfato se ha sustituido por un azufre, y los **PNAs**,<sup>85</sup> ácidos nucleicos peptídicos en los que el esqueleto de ribosa-fosfato está reemplazado por un esqueleto pseudopeptídico formado por unidades de N-(2-aminoetil)glicina. También se han sintetizado ácidos nucleicos bloqueados conformacionalmente (**LNA**) –análogos de nucleótidos que contienen un grupo metileno entre el oxígeno en 2' y el carbono en 4' del anillo de ribosa- con el objeto de proteger los residuos internos del cebo sin comprometer la eficiencia de unión al factor de transcripción.<sup>86</sup> El problema fundamental de esta estrategia, además de las dificultades relacionadas con estabilidad y transporte, es que es necesario utilizar grandes excesos de los cebos nucleotídicos para competir de forma efectiva con los cebos naturales existentes en el promotor del gen. Además, en muchos casos los cebos de ADN son poco selectivos en la distinción de factores de transcripción debido a que muchos de estos, aun siendo diferentes, son capaces de interactuar con buenas afinidades con secuencias similares, sobre todo aquellos que actúan de forma homo- o heterodimérica.

<sup>83</sup> a) Mann, M. J.; Dzau, V. J. "Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides" *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*, 1071. b) Nakamura, H; Morishita, R.; Kaneda, Y. "Molecular therapy via transcriptional regulation with double-stranded oligodeoxynucleotides as decoys" *In vivo* **2002**, *16*, 45. c) Tomita, N.; Ogihara, T.; Morishita, R. "Transcription factors as molecular targets: molecular mechanisms of decoy ODN and their design" *Curr. Drug Targets* **2003**, *4*, 603.

<sup>84</sup> Bielinska, A.; Shivdasani, R. A.; Zhang, L.; Nabel, G. J. "Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides" *Science* **1990**, *250*, 997.

<sup>85</sup> Mischiati, C.; Borgatti, M; Bianchi, N.; Rutigliano, C.; Tomassetti, M.; Feriotto, G.; Gambari, R. "Interaction of the human NF-kappaB p52 transcription factor with DNA-PNA hybrids mimicking the NF-kappaB binding sites of the human immunodeficiency virus type 1 promoter" *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33114.

<sup>86</sup> Crinelli, R.; Bianchi, M.; Gentilini, L.; Palma, L.; Magnani, M. "Locked nucleic acids (LNA): versatile tools for designing oligonucleotide decoys with high stability and affinity" *Curr. Drug Targets* **2004**, *5*, 745.



**Figura 20.** a) Representación esquemática de la estrategia de inhibición con oligonucleótidos sintéticos. b) Análogos modificados de oligonucleótidos naturales.

Otra estrategia que se ha utilizado para bloquear la actividad de determinados factores de transcripción se basa en su **heterodimerización con variantes no activas de las proteínas** con las que suele interactuar. Así, en el caso del factor de transcripción oncogénico Jun se ha demostrado que es posible secuestrarlo en una forma no activa mediante proteínas que mantienen su capacidad de heterodimerización con Jun pero no permiten la interacción con las secuencias consenso de ADN sino que fuerzan la unión a otro tipo de secuencias (Figura 21a). Este tipo de estrategia, que se ha denominado **dominante negativo (D-N)**, ha dado buenos resultados en algunos casos, pero la interacción del complejo con otras zonas del ADN puede tener efectos secundarios no deseados.

Es posible realizar la heterodimerización con **proteínas o péptidos que no contienen el dominio de unión al ADN**.<sup>87</sup> Tales D-Ns heterodimerizan con factores de transcripción endógenos y previenen su unión al ADN (Figura 21b). Para que estos D-Ns puedan ser efectivos deben ser sobreexpresados para contrarrestar la estabilización que se produce cuando el dominio nativo se une al ADN.<sup>88</sup> El grupo de Chmielewski utilizó para la inhibición de c-Jun fragmentos peptídicos de la cremallera de leucinas de Fos. Llevaron a cabo experimentos de desplazamiento de la unión de c-Jun a un oligonucleótido de doble cadena que contenía el sitio de unión AP-1 y obtuvieron valores de interacción **entre débiles y moderados** (IC<sub>50</sub> de 11-12  $\mu$ M) con péptidos derivados de Fos de 15, 25 y 32 aminoácidos.<sup>89</sup>

Otra variante del método del dominante negativo consiste en la eliminación del dominio de transactivación del agente que interacciona con el FT,<sup>90</sup> de modo que el D-N resultante se une al ADN *in vivo*, pero no puede activar la transcripción (Figura 21c). En el caso del complejo AP-1, se han utilizado D-Ns de este tipo, tanto para miembros de la familia de

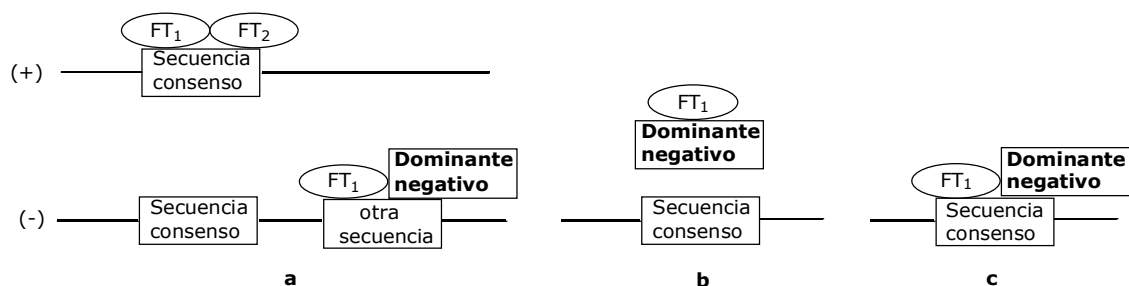
<sup>87</sup> MacGregor, D.; Li, L. H.; Ziff, E. B. "Dominant negative mutants of Myc inhibit cooperation of both Myc and adenovirus serotype-5 E1a with Ras" *J Cell Physiol* **1996**, *167*, 95.

<sup>88</sup> a) Shuman, J. D.; Vinson, C. R.; MacKnight, S. L. "Evidence of changes in protease sensitivity and subunit exchange rate on DNA binding by C/EBP" *Science* **1990**, *249*, 771. b) Patel, L. R.; Curran, T.; Kerppola, T. K. "Energy transfer analysis of Fos-Jun dimerization and DNA binding" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7360.

<sup>89</sup> Yao, S.; Brickner, M.; Pares-Matos, E. I.; Chmielewski, J. "Uncoiling c-Jun coiled-coils: inhibitory effects of truncated Fos peptides on Jun dimerization and DNA *in vitro*" *Biopolymers* **1998**, *47*, 277.

<sup>90</sup> a) Clark, A. R.; Docherty, K. "Negative regulation of transcription in eukaryotes" *Biochem J.* **1993**, *296*, 521. b) Ransone, L. J.; Visvader, J.; Wamsley, P.; Verma, I. M. "Trans-dominant negative mutants of Fos and Jun" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 3806.

Jun,<sup>91</sup> como para los de la familia de Fos.<sup>92</sup> La desventaja de este método radica en la necesidad de sobreexpresar el D-N para superar las interacciones estabilizadoras que tienen lugar entre el dominio de transactivación del factor de transcripción endógeno y otros componentes del aparato transcripcional.



**Figura 21.** Representación esquemática de tres estrategias (a, b y c) para la inhibición de factores de transcripción utilizando dominantes negativos.

El grupo de Vinson ha descrito un método muy interesante de preparación de D-Ns de factores de transcripción que impiden la unión al ADN en una competición equimolar. En el caso de los factores de transcripción de tipo bZIP, estos D-Ns están formados por el dominio de dimerización de la cremallera de leucinas y una extensión acídica proteica anfipática que sustituye a la región básica nativa, crítica para la unión al ADN.<sup>93</sup> Así, se diseñó y preparó un D-N del complejo AP-1 en el que una extensión acídica de 28 aminoácidos se añade a 43 aminoácidos de la cremallera de leucinas de Fos. Dicha extensión forma un "coiled-coil" heterodimérico con la región básica de Jun e impide su unión al ADN (Figura 22).<sup>94</sup>

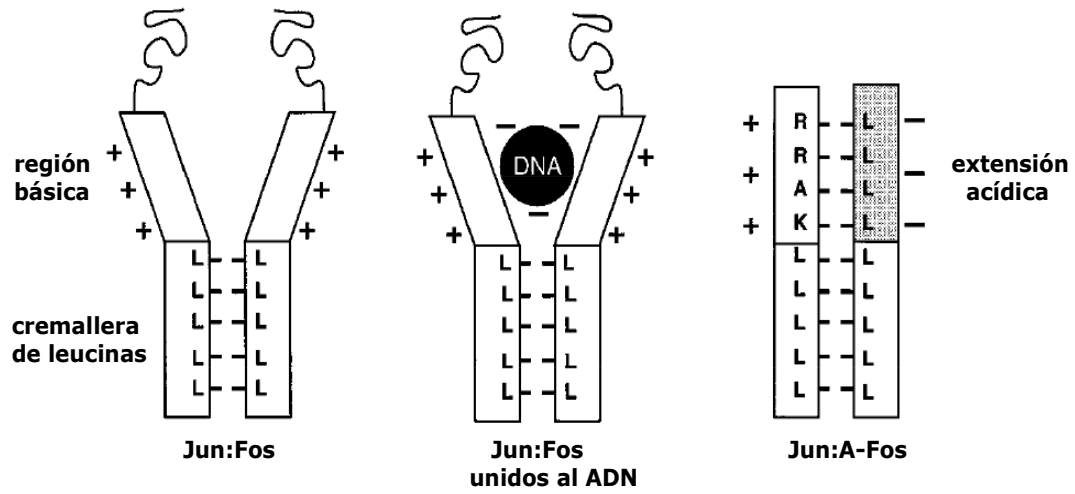
La mayor dificultad de la estrategia de Vinson radica en que los agentes secuestradores son demasiado largos para poder ser preparados de forma sintética y, por otra parte, en la ausencia de especificidad en el reconocimiento de la región básica, al fundamentarse en una interacción de tipo electrostático.

<sup>91</sup> a) Lloyd, A.; Yancheva, N.; Wasylyk, B. "Transformation suppressor activity of a Jun transcription factor lacking its activation domain" *Nature* **1991**, 352, 635. b) Brown, P. H.; Alani, R.; Preis, L. H.; Szabo, E.; Birrer, M. J. "Suppression of oncogene-induced transformation by a deletion mutant of c-jun" *Oncogene* **1993**, 8, 877.

<sup>92</sup> Wick, M.; Lucibello, F. C.; Muller, R. "Inhibition of Fos- and Ras- induced transformation by mutant Fos proteins with structural alterations in functionally different domains" *Oncogene* **1992**, 7, 859.

<sup>93</sup> Krylov, D.; Olive, M.; Vinson, C. "Extending dimerization interfaces: the bZIP basic region can form a coiled-coil" *EMBO J.* **1995**, 14, 5329.

<sup>94</sup> Olive, M.; Krylov, D.; Echlin, D. R.; Gardner, K.; Taparowsky, E.; Vinson, C. "A dominant negative to activation-protein-1 (AP1) that abolishes DNA binding and inhibits oncogenesis" *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 18586.



**Figura 22.** Estrategia de D-N para la inhibición de Jun desarrollada por el grupo de Vinson. A-Fos es la cremallera de leucinas de Fos unida a la extensión acídica.

## **II. OBJETIVO**



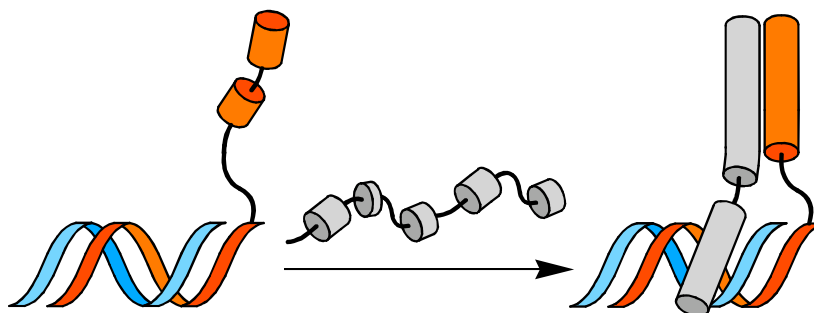
Tal como se ha señalado en la Introducción de esta memoria, uno de los objetivos de interés general en el campo de la Química Biológica y Biomedicina consiste en la obtención de moléculas sintéticas que puedan **interferir de forma programada en diferentes aspectos supramoleculares de la transcripción genética**.

Dentro de este contexto, en este trabajo nos hemos propuesto diseñar y preparar **híbridos oligonucleótido-péptido** que, aprovechando las propiedades que presentan cada uno de sus componentes, permitan el acceso a nuevos tipos de sondas químicas para estudios biomoleculares o a nuevos agentes para el reconocimiento selectivo de factores de transcripción.

En concreto, el trabajo se planteó para abordar los siguientes objetivos:

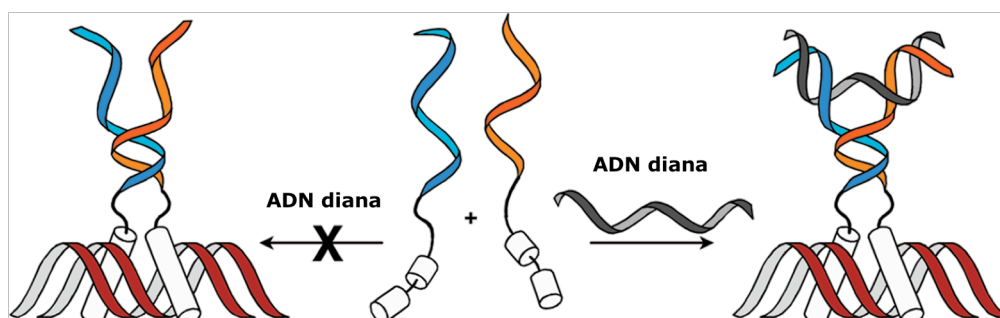
- 1) **Desarrollo de conjugados sintéticos entre regiones ricas en leucina de factores de transcripción tipo bZIP y determinadas secuencias de ADN de doble cadena** con el fin de secuestrar de forma específica factores de transcripción relevantes desde el punto de vista biológico. En concreto, los trabajos que se presentan en la memoria se han centrado en desarrollar sistemas para reconocer y secuestrar el factor oncogénico Jun.

El concepto general que se quiere estudiar se esquematiza en la siguiente figura:



**Figura 23.** Representación esquemática del objetivo 1.

- 2) **Desarrollo de híbridos entre cadenas sencillas de ADN y regiones de reconocimiento de proteínas bZIP (regiones básicas)** con el fin de que pueda codificarse su dimerización mediante ligandos externos, y en su caso controlar las propiedades de reconocimiento de ADN. Este objetivo se esquematiza en la siguiente figura:



**Figura 24.** Representación esquemática del objetivo 2.



### **III. ANTECEDENTES EN LA SÍNTESIS DE CONJUGADOS OLIGONUCLEÓTIDO-PÉPTIDO**



Los **conjugados oligonucleótido-péptido** son híbridos constituídos por oligonucleótidos unidos covalentemente a secuencias peptídicas. Los conjugados de este tipo presentes en la naturaleza se denominan *nucleopéptidos*. En una gran parte de los casos, los conjugados oligonucleótido-péptido se han sintetizado con objeto de añadir algunas de las propiedades biológicas o biofísicas de los péptidos a los oligonucleótidos, por ejemplo para aumentar su estabilidad frente a exonucleasas o para facilitar el transporte de los oligonucleótidos a través de la membrana celular. En otras ocasiones, se han sintetizado para conferir a los péptidos características ventajosas, por ejemplo en el caso de nucleasas artificiales, péptidos a los que se les ha unido un oligonucleótido de modo que tengan especificidad de secuencia.<sup>95</sup>

Existen distintos tipos de conjugados oligonucleótido-péptido,<sup>96</sup> que se pueden clasificar en función del sitio de unión del oligonucleótido al péptido. La conjugación puede producirse a través de la base, de las posiciones 3'- ó 5'- del azúcar o a través del esqueleto fosfatídico del oligonucleótido. En cuanto al péptido, la unión se puede realizar bien a través de los extremos C- o N-terminal, bien a través de las cadenas laterales. Se han empleado conectores de gran variedad química, y su elección está fundamentalmente determinada por la accesibilidad sintética.

La preparación de este tipo de híbridos constituye un reto interesante, ya que los esquemas de protección estándar utilizados en la síntesis de péptidos y en la de oligonucleótidos no son compatibles. Existen dos tipos distintos de estrategias para la síntesis de conjugados oligonucleótido-péptido, una basada en la **conjugación post-sintética** (método convergente) y otra que implica técnicas de **síntesis lineal en fase sólida** (método divergente).

---

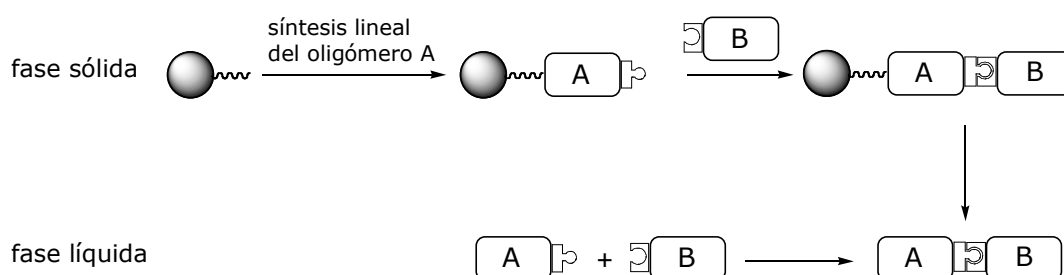
<sup>95</sup> a) Eritja, R. "Synthesis of oligonucleotide-peptide conjugates and nucleopeptides" en *Solid-phase synthesis. A practical guide*; Eds: Kates, S. A. y Albericio, F., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, cap. 12, **2000**. b) Venkatesan, N.; Kim, B. H. "Peptide conjugates of oligonucleotides: synthesis and applications" *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3712.

<sup>96</sup> Venkatesan y Kim, *vid.* nota 95b.

## 1. Conjugación post-sintética (método convergente)

En este método de conjugación, el péptido y el oligonucleótido se sintetizan en soportes sólidos diferentes empleando técnicas estándar. Los productos tienen que funcionalizarse después convenientemente para que sea posible la unión selectiva y específica entre las dos moléculas.<sup>97</sup>

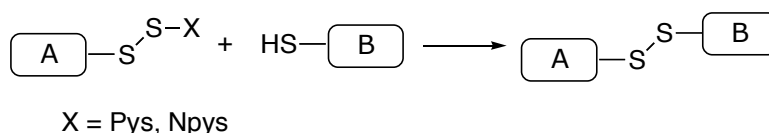
La conjugación puede realizarse en fase sólida o en disolución. Si la conjugación post-sintética tiene lugar con uno de los oligómeros todavía unido al soporte sólido, entonces se denomina **conjugación convergente en fase sólida**, mientras que si la conjugación se efectúa después del aislamiento del péptido y del oligonucleótido se denomina **conjugación convergente en fase líquida**.<sup>98</sup>



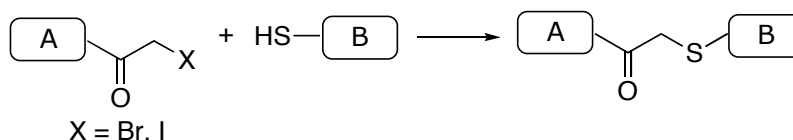
**Figura 25.** Representación esquemática de los métodos de conjugación convergente, siendo A y B cada uno de los oligómeros.

A continuación, se enumeran los protocolos sintéticos más comunes en la síntesis convergente de conjugados oligonucleótido-péptido:

- formación de un disulfuro<sup>99</sup>



- formación de un tioéter<sup>100</sup>



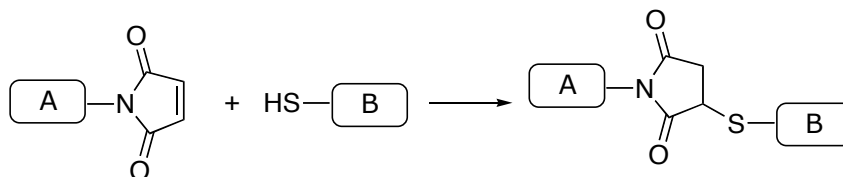
<sup>97</sup> Zubin, E. M.; Romanova, E. A.; Orestskaya, T. S. "Modern methods for the synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates" *Russ. Chem. Rev.* **2002**, *71*, 239.

<sup>98</sup> Venkatesan y Kim, *vid.* nota 95b.

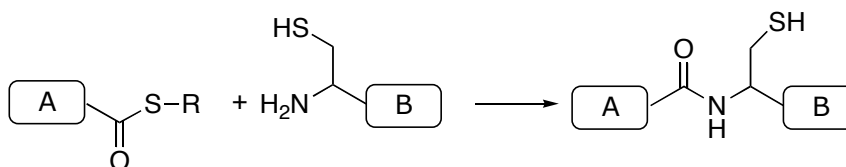
<sup>99</sup> a) Zatspein, T. S.; Turner, J. J.; Orestskaya, T. S.; Gait, M. J. "Conjugates of oligonucleotides and analogues with cell penetrating peptides as gene silencing agents" *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 3639. b) Corey, D. R. "Synthesis of oligonucleotide-peptide and oligonucleotide-protein conjugates" *Methods Mol. Biol.* **2004**, *283*, 197.

<sup>100</sup> a) Wei, Z.; Tung, C.-H.; Zhu, T.; Stein, S. "Synthesis of oligoarginine-oligonucleotide conjugates and oligoarginine-bridged oligonucleotide pairs" *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 468. b) Arar, K.; Aubertin, A.-M.; Roche, A.-C.; Monsigny, M.; Mayer, R. "Synthesis and antiviral activity of peptide-oligonucleotide conjugates prepared by using N<sub>ε</sub>-(Bromoacetyl)peptides" *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 573.

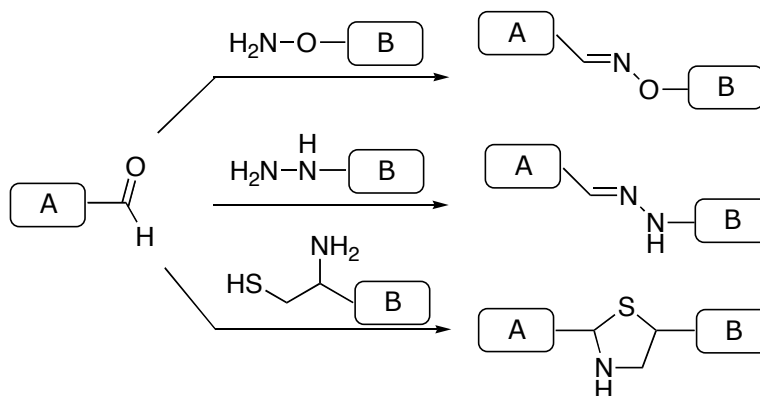
- formación de un maleimido tioéter<sup>101</sup>



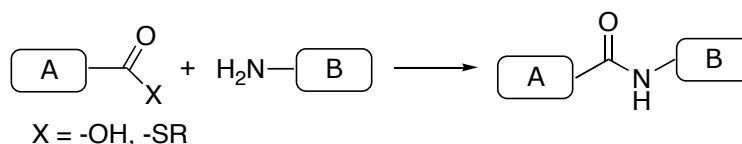
- acoplamiento nativo<sup>102</sup>



- formación de una oxima, hidrazona o tiazolidina<sup>103</sup>



- formación de una amida<sup>104</sup>



<sup>101</sup> a) Tung, C.-H.; Rudolph, M. J.; Stein, S. "Preparation of oligonucleotide-peptide conjugates" *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 464. b) Eritja, R.; Pons, A.; Escarceller, M.; Giralt, E.; Albericio, F. "Synthesis of defined peptide-oligonucleotide hybrids containing a nuclear transport signal sequence" *Tetrahedron* **1991**, *47*, 4113.

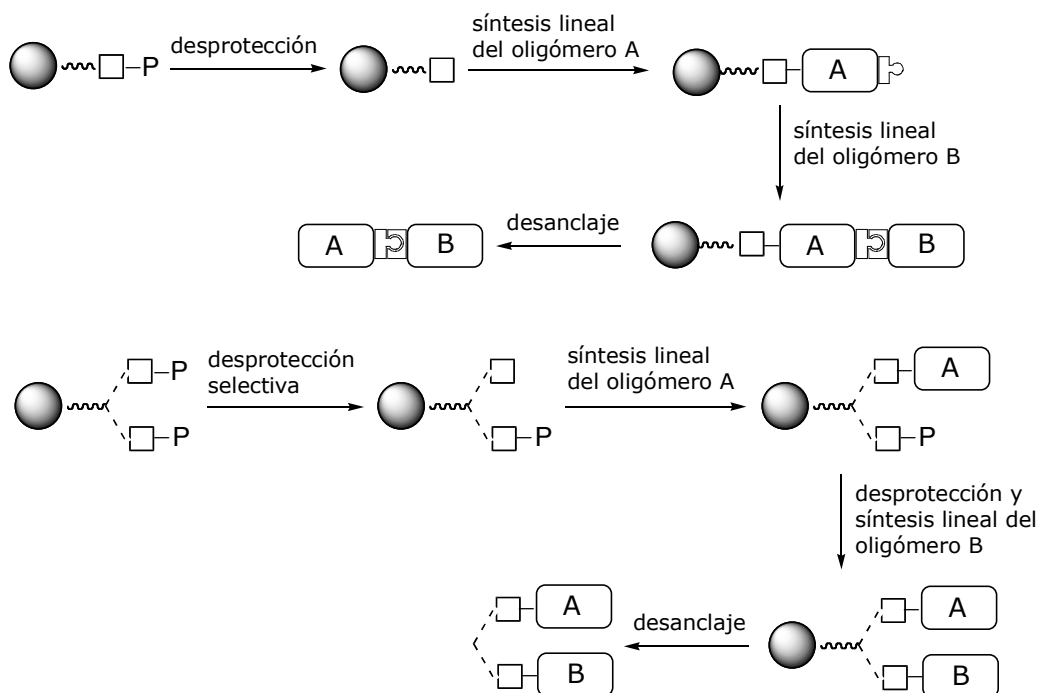
<sup>102</sup> Stetsenko, D. A.; Gait, M. J. "A new 'native ligation' procedure for peptide-oligonucleotide conjugation" *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids* **2001**, *20*, 801.

<sup>103</sup> a) Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. "Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates: chemoselective oxime and thiazolidine formation" *Chem.-Eur. J.* **2001**, *20*, 801. b) Ollivier, N.; Olivier, C.; Gouyette, C.; Tam, H.-D.; Gras-Masse, H.; Melnyk, O. "Synthesis of oligonucleotide-peptide conjugates using hydrazone chemical ligation" *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 997.

<sup>104</sup> a) Bruick, R. K.; Dawson, P. E.; Kent, S. B. H.; Usman, N.; Joyce, G. F. "Template-directed ligation of peptides to oligonucleotides" *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 49. b) McMinn, D. L.; Matray, T. J.; Greenberg, M. M. "Efficient solution phase synthesis of oligonucleotide conjugates using protected biopolymers containing 3'-terminal alkyl amines" *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7074. c) Kachalova, A., V.; Stetsenko, D. A.; Romanova, E. A.; Tashlitsky, V. N.; Gait, M. J.; Oretskaya, T. S. "A new and efficient method for synthesis of 5'-conjugates of oligonucleotides through amide-bond formation on solid phase" *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 2409.

## 2. Síntesis lineal en fase sólida (método divergente)

En este caso, el péptido y el oligonucleótido se sintetizan secuencialmente en un único soporte, usándose grupos protectores especiales. Existen dos posibles estrategias,<sup>105</sup> resumidas de forma esquemática en la Figura 26.



**Figura 26.** Estrategias utilizadas en la síntesis lineal de conjugados oligonucleótido-péptido.

Una de las mayores dificultades del método divergente deriva de la incompatibilidad de las condiciones de reacción empleadas en la síntesis de péptidos y de oligonucleótidos. Las cadenas peptídicas se obtienen bien utilizando grupos protectores lábiles en medios ácidos de distinta fuerza (en la estrategia Boc/Bzl), bien utilizando una combinación de grupos protectores temporales lábiles en medio básico y grupos protectores permanentes lábiles en medio ácido (en la estrategia Fmoc/<sup>t</sup>Bu). Por otra parte, la síntesis de oligonucleótidos combina el uso de condiciones acídicas muy suaves para eliminar los grupos protectores temporales y el tratamiento con amoníaco para la eliminación de grupos protectores permanentes.

En el caso de que se sintetice en primer lugar el oligonucleótido, pueden tener lugar reacciones de despurinización y desanclaje en las posteriores condiciones (ácidas) de síntesis del péptido. Si se sintetiza el péptido en primer lugar, debe tenerse en cuenta que éste no es siempre estable en las condiciones de desprotección con amoníaco y, además, los agentes de acoplamiento y condiciones de protección temporal no son válidos para la síntesis del oligonucleótido. Predominantemente, se sintetiza el péptido en primer lugar siguiendo las estrategias Fmoc o Boc (véase Anexo I) y a continuación se sintetiza el oligonucleótido

<sup>105</sup> Venkatesan y Kim, *vid.* nota 95b.

utilizando el método del fosforamidito (véase Anexo II). En la mayoría de las síntesis descritas, el péptido se une al extremo 3' del oligonucleótido, aunque también se han preparado oligonucleótidos con péptidos pequeños en su extremo 5'.<sup>106</sup> En cualquier caso, es crítica la elección de grupos protectores y condiciones de reacción.<sup>107</sup>

En cuanto a los soportes sólidos, en la síntesis peptídica se usan soportes de poliestireno (PS) y en la síntesis de oligonucleótidos, soportes CPG. En la mayoría de las síntesis de conjugados oligonucleótido-péptido, se describe el uso de soportes CPG. Sin embargo, en algunos casos se han observado bajos rendimientos, por lo que se han descrito soportes alternativos como polímeros de PS, PEG-PS y Teflón. En estos casos, las reacciones de acoplamiento son menos dependientes del método de activación durante la síntesis del péptido, pero la síntesis del oligonucleótido es menos eficiente, lo que se compensa con mayores tiempos de acoplamiento y el uso de distintos disolventes para los fosforamiditos.<sup>108</sup> Asimismo, se han utilizado una variedad de espaciadores mono y bifuncionalizados, generalmente lábiles en medio básico e inspirados en el campo de la síntesis de oligonucleótidos.<sup>109</sup>

En cuanto a los grupos protectores de los aminoácidos y suponiendo que en primer lugar se sintetiza la parte peptídica, su elección debe estar determinada por los siguientes criterios:

- deben permitir el ensamblaje de la cadena peptídica sin interferir en las reacciones de acoplamiento
- su eliminación no debe requerir condiciones acídicas fuertes (TFA, etc), sino condiciones básicas o acídicas suaves
- es preferible la utilización de aminoácidos comerciales

Para unir la parte peptídica y la oligonucleotídica, se han descrito diferentes conectores. Estas moléculas poseen un ácido carboxílico para reaccionar con el extremo N-terminal del péptido y un grupo hidroxilo para ensamblar el oligonucleótido. El ejemplo más sencillo de estos conectores son los aminoácidos cuyas cadenas laterales tienen grupos hidroxilo.

A partir de los antecedentes en la síntesis de conjugados oligonucleótido-péptido, se puede concluir que no existe un método versátil único válido para la preparación de cualquier híbrido. Los dos métodos reseñados poseen limitaciones. En el caso de la síntesis divergente, éstas derivan de la incompatibilidad en los esquemas de protección, lo que no permite la incorporación de determinados aminoácidos. La síntesis convergente, por otra parte, es ventajosa en términos de versatilidad, pero presenta problemas derivados de la solubilidad de determinados péptidos, de la precipitación derivada de posibles interacciones no

---

<sup>106</sup> a) Zaramella, S.; Yeheskiely, E.; Strömberg, R. "A method for solid-phase synthesis of oligonucleotide 5'-peptide-conjugates using acid-labile  $\alpha$ -amino protections" *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14029. b) Ocampo, S. M.; Albercio, F.; Fernández, I.; Vilaseca, M.; Eritja, R. "A straightforward synthesis of 5'-peptide oligonucleotide conjugates using N<sup>o</sup>-Fmoc-protected amino acids" *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4349.

<sup>107</sup> a) Grandas, A.; Marchán, V.; Debéthune, L.; Pedroso, E. "Stepwise solid-phase synthesis of nucleopeptides" *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* **2004**, pp 4.22.1-4.22.54. b) Venkatesan y Kim, *vid.* nota 95b (pág. 45)

<sup>108</sup> a) Robles, J.; Pedroso, E.; Grandas, A. "Stepwise solid-phase synthesis of the nucleopeptide Phac-Phe-Val-Ser(p3'ACT)-Gly-OH" *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2482. b) de la Torre, B. G.; Aviñó, A.; Tarrasón, G.; Piulats, J.; Albercio, F.; Eritja, R. "Stepwise solid-phase synthesis of oligonucleotide-peptide hybrids" *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2733. c) Robles, J.; Maseda, M.; Beltrán, M.; Concernau, M.; Pedroso, E.; Grandas, A. "Synthesis and enzymatic stability of phosphodiester-linked peptide oligonucleotide hybrids" *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 785.

<sup>109</sup> Eritja, *vid.* nota 95a.

específicas entre el oligonucleótido y el péptido, y de reactividad entre ambas macromoléculas.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



# 1. Conjugados oligonucleótido-péptido para la interacción selectiva con la oncoproteína Jun

## 1.1. Objetivo

Como se ha señalado anteriormente (sección 8 de la Introducción), las estrategias de inhibición de factores de transcripción utilizadas hasta el momento se fundamentan en sistemas que utilizan bien derivados oligonucleotídicos o bien peptídicos. Muchas de estas estrategias presentan problemas derivados de la escasa afinidad y limitada selectividad de acción. Sin duda, uno de los factores de transcripción más atractivos para el desarrollo de agentes que puedan interferir con su actividad es la **oncoproteína Jun**, pues, como se ha comentado en la Introducción (página 18), está sobreexpresada en un gran número de cánceres. Los esfuerzos realizados para desarrollar inhibidores de esta oncoproteína se han basado fundamentalmente en el uso de fragmentos truncados o modificados de c-Fos (páginas 36 y 37).

Dado que la mayoría de los factores de transcripción, entre ellos Jun, forman complejos ternarios con otras proteínas (Jun o Fos en el caso de Jun) y con el ADN, nosotros pretendemos aprovechar este tipo de reconocimiento bivalente para el desarrollo de un nuevo tipo de agentes secuestradores de Jun que podrían prepararse mediante métodos sintéticos. Estos nuevos agentes consistirían en híbridos covalentes oligonucleótido-péptido, en los que ambas partes son necesarias para obtener un reconocimiento eficiente. En principio, deberían ser más ventajosos que los sistemas previamente estudiados en varios aspectos:

- podrían abordarse mediante síntesis química
- tendrían muchas posibilidades de ser muy selectivos al presentar dos superficies de reconocimiento específico
- podrían dar lugar a nuevas opciones de reconocimiento dinámico derivadas de las posibles conmutaciones entre el oligonucleótido de hebra simple y de hebra doble
- la estrategia podría extenderse al desarrollo de agentes atrapadores de un amplio número de factores de transcripción

Por todo ello, nos hemos propuesto como objetivo la síntesis de conjugados oligonucleótido-péptido en los que la parte peptídica derive de la cremallera de leucinas de Fos y la parte oligonucleotídica de doble cadena incluya el sitio de unión de Jun (5'-TCAT-3'). En principio, la conjugación podría hacerse a través del extremo 5' ó 3' del oligonucleótido (Figura 27). Una vez resueltos los aspectos sintéticos para preparar los conjugados, se llevarían a cabo los correspondientes estudios de interacción con Jun.

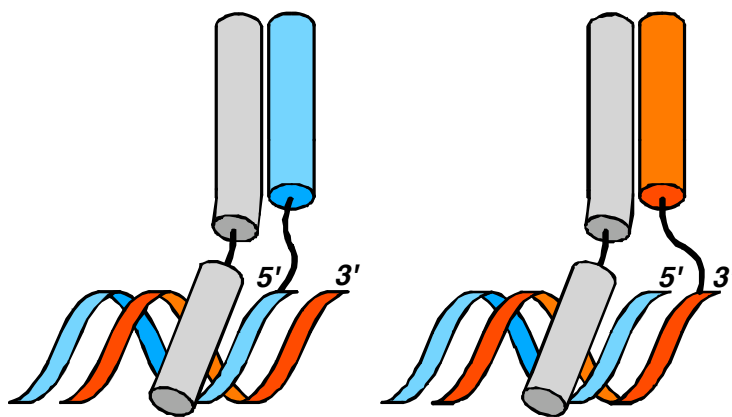


Figura 27. Representación esquemática del objetivo.

## 1.2. Diseño de los conjugados y planteamiento sintético

Para elegir la secuencia adecuada de aminoácidos y de nucleótidos y ajustar el lugar de conexión entre ellos se llevaron a cabo estudios de modelización cualitativos mediante manipulación de la estructura de rayos X de c-Fos y c-Jun unidos a AP-1 (ATGAcTCAT).<sup>110</sup>

En primer lugar, pensamos en llevar a cabo la conjugación de la parte peptídica al oligonucleótido uniendo el extremo N-terminal del péptido y el extremo 5' del oligonucleótido. Para obtener el modelo, se eliminaron los residuos 139-157 de la región básica de Fos, por lo que la parte peptídica estaría constituida por 35 aa (2 Arg de la región básica, 5 aa de la región espaciadora y 28 aa de la cremallera de leucinas). La parte oligonucleotídica incluiría el sitio de unión de Jun TCAT.

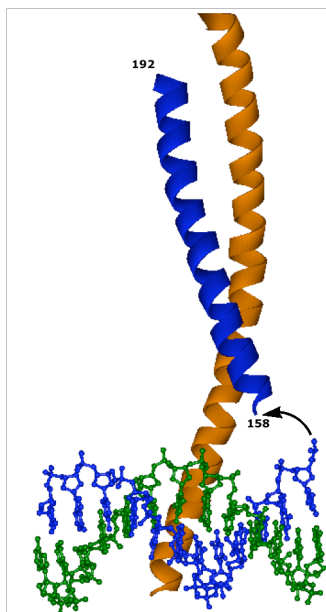
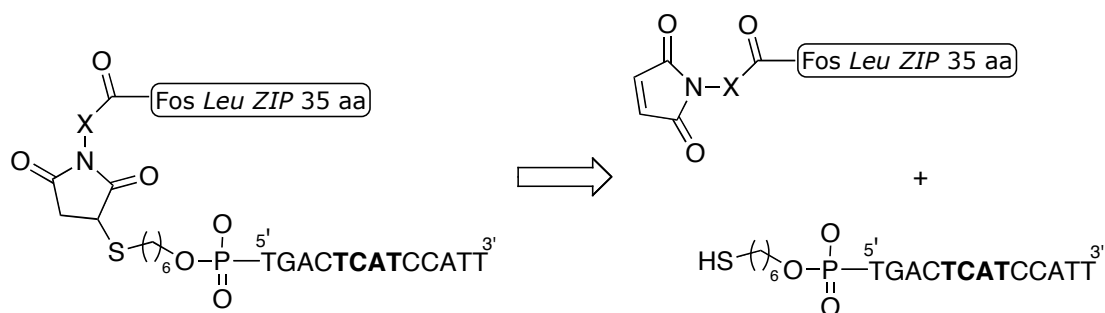


Figura 28. Modelo obtenido a partir de la estructura de rayos X de c-Fos y c-Jun unidos a AP-1.

<sup>110</sup> Glover y Harrison, *vid.* nota 80.

Los datos obtenidos de la modelización reflejan una distancia de 7 Å entre los puntos de conexión. Teniendo en cuenta esta distancia y los antecedentes de síntesis de conjugados oligonucleótido-péptido, nos planteamos investigar la construcción de los híbridos mediante técnicas de conjugación convergente en disolución, por ser en principio el método más adecuado para la preparación de pequeñas cantidades de conjugados en los que la parte peptídica es un péptido de gran tamaño y con un gran número de aminoácidos trifuncionales.<sup>111</sup> En principio, los escasos precedentes sobre la construcción de híbridos oligonucleótido-péptido de tamaño similar al que se pretende obtener<sup>112</sup> y con un péptido provisto de una gran variedad de aminoácidos, nos hacían prever que los aspectos sintéticos del trabajo suponían en sí mismos un reto considerable.

En concreto, se optó por la estrategia tiol-maleimido, una de las más utilizadas por implicar una reacción selectiva que no suele dar lugar a productos laterales.<sup>113</sup> Teniendo en cuenta los precedentes sintéticos de esta estrategia,<sup>114</sup> nos pareció preferible incorporar el grupo tiol en el oligonucleótido y el grupo maleimido en el péptido.



Fos Leu ZIP 35 aa: RRELDTLQAETDQLEDEKSALQTEIANLLKEKEK

**Figura 29.** Esquema retrosintético de la estrategia de síntesis del conjugado oligonucleótido-péptido objetivo.

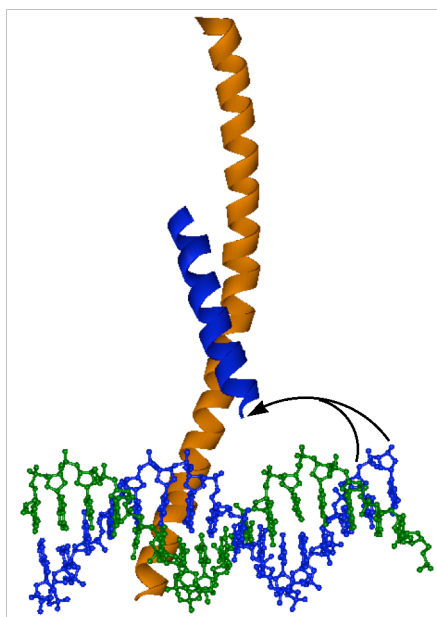
Por otra parte también consideramos la posibilidad de llevar a cabo la unión de la parte peptídica (de 22 aminoácidos) con el extremo 3' del oligonucleótido, con lo que la unión se llevaría a cabo en la cadena complementaria a la del caso anterior, comenzando en la guanina 16 ó 17 e incluyendo el sitio de unión de Jun (Figura 30). La modelización indica que esta conexión no es tan adecuada como la anterior; sin embargo, no era descartable que pudiera dar lugar a híbridos funcionales. Además, nos pareció de interés investigar la posibilidad de preparar este tipo de híbridos de gran tamaño y provistos de aminoácidos trifuncionales en la parte peptídica mediante técnicas en fase sólida.

<sup>111</sup> Eritja, *vid.* nota 95a.

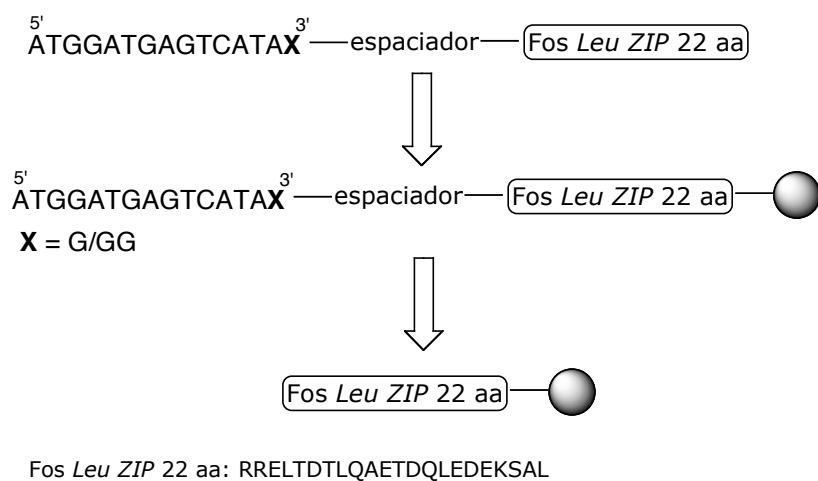
<sup>112</sup> Se ha publicado la síntesis de un conjugado oligonucleótido-péptido con una parte peptídica de 26 aminoácidos: Antopolsky, M.; Tengvall, U.; Aureola, S.; Jääskeläinen, I.; Rönkkö, S.; Honkakoshi, P.; Urtti, A.; Lönnberg, H.; Azharyev, A. "Peptide-oligonucleotide phosphorothioate conjugates with membrane translocation and nuclear localization properties" *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 598.

<sup>113</sup> Venkatesan y Kim, *vid.* nota 95b.

<sup>114</sup> Zubin, E. M.; Romanova, E. A.; Oretskaya, T. S. "Modern methods for the synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates" *Russian Chemical Reviews* **2002**, *71*, 239.



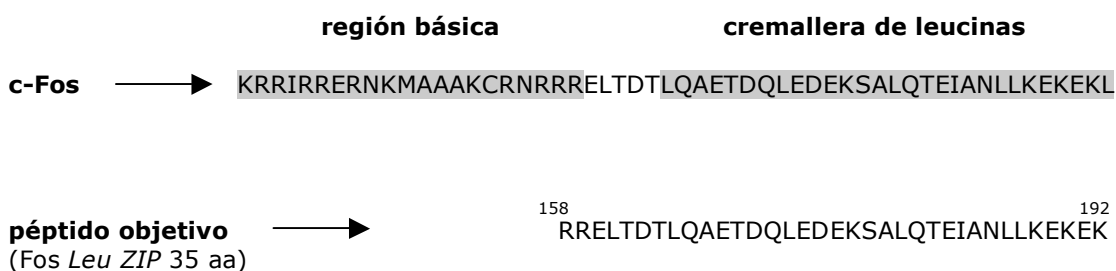
**Figura 30.** Modelo obtenido a partir de la estructura de rayos X de c-Fos y c-Jun unidos a AP-1.



**Figura 31.** Esquema retrosintético para la síntesis lineal del conjugado oligonucleótido-péptido objetivo.

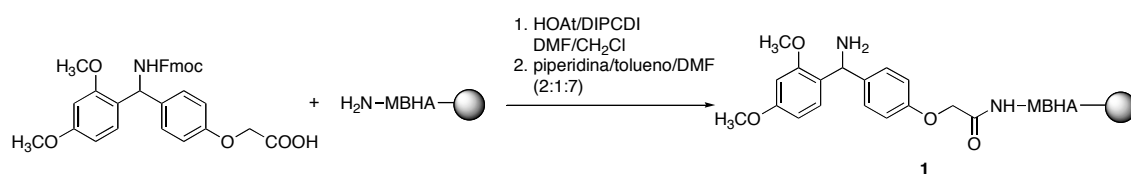
### 1.3. Estudios iniciales para la síntesis convergente del conjugado oligonucleótido-péptido objetivo

En primer lugar, se abordó la síntesis del **péptido** derivado de la cremallera de leucinas de Fos e incluyendo también algún aminoácido de la región básica. En la Figura 32 se muestra la secuencia de aminoácidos de este péptido, comparándola con la secuencia del factor de transcripción natural.



**Figura 32.** Comparación de la secuencia de c-Fos con la elegida para nuestro péptido objetivo. Los residuos de aminoácidos están escritos desde el extremo N- al C-terminal.

Para la obtención del péptido objetivo se siguió la metodología Fmoc/<sup>t</sup>Bu en fase sólida sobre una resina MBHA amida con una carga teórica inicial de 0,66 mmol/g. Tras neutralizar la resina, se incorporó el espaciador Rink como se indica en el Esquema 1.

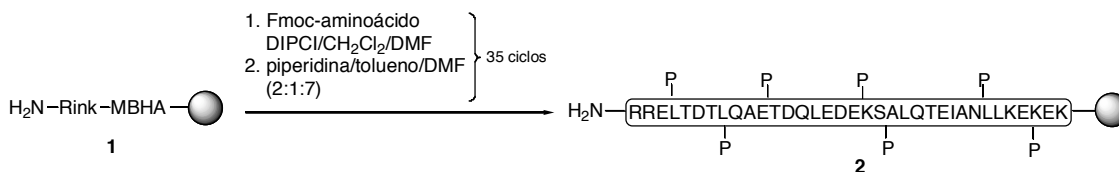


**Esquema 1**

Los acoplamientos de los aminoácidos se llevaron a cabo en DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mezclando la resina con el aminoácido correspondiente previamente activado con DIPCDI para preformar el anhídrido simétrico y así obtener acoplamientos más efectivos (Esquema 2).<sup>115</sup> Los acoplamientos se siguieron mediante los tests de Kaiser y NF-31 de pequeñas alícuotas de resina lavadas con metanol. Los aminoácidos se incorporaron protegidos en sus cadenas laterales con los grupos protectores habituales.<sup>116</sup>

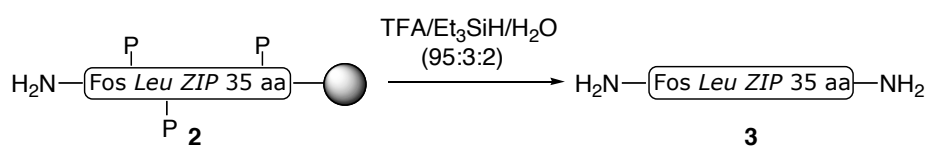
<sup>115</sup> Albericio, F.; Kates, S. A. "Coupling Methods: Solid-Phase Formation of Amide and Ester Bonds" en *Solid-phase synthesis. A practical guide*; Eds: Kates, S. A. y Albericio, F., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, cap. 6, **2000**.

<sup>116</sup> Asn(Trt), Arg(Pbf), Asp(<sup>t</sup>Bu), Gln(Trt), Glu(<sup>t</sup>Bu), Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu), Thr(<sup>t</sup>Bu)



Esquema 2<sup>117</sup>

La etapa de desprotección y separación del péptido del soporte se ensayó por tratamiento de una pequeña parte de la resina con TFA/Et<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O (95:3:2) durante 1 h (Esquema 3).



Esquema 3

El análisis por HPLC de fase reversa del residuo obtenido dio lugar al cromatograma que se muestra en la Figura 33. El compuesto mayoritario se aisló y el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF confirmó que se trataba del péptido de 35 aminoácidos deseado: ([MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>172</sub>H<sub>295</sub>N<sub>50</sub>O<sub>64</sub>: 4087.6, encontrada: 4086.6).

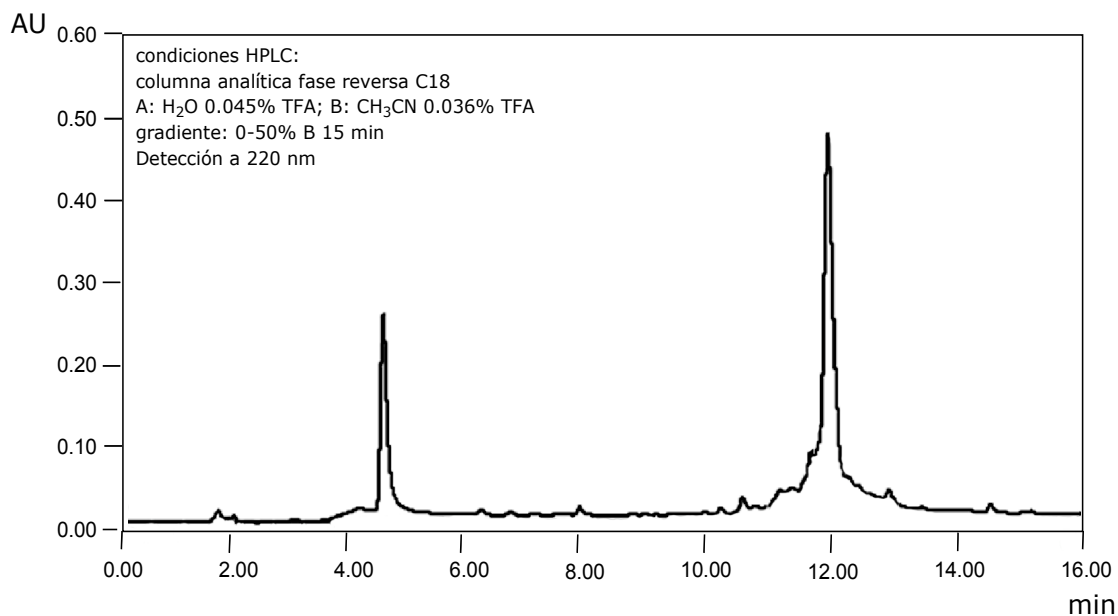
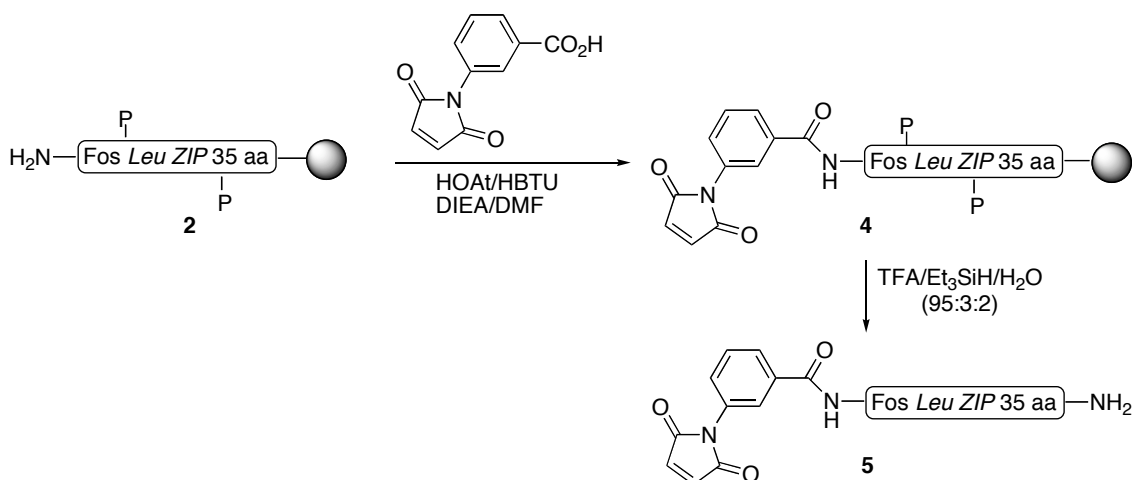


Figura 33. Cromatograma de HPLC del residuo de reacción para la obtención del péptido 3.

Con el fin de introducir en el extremo N-terminal del péptido un grupo adecuado para realizar la conjugación con el oligonucleótido, ensayamos en primer lugar la introducción de

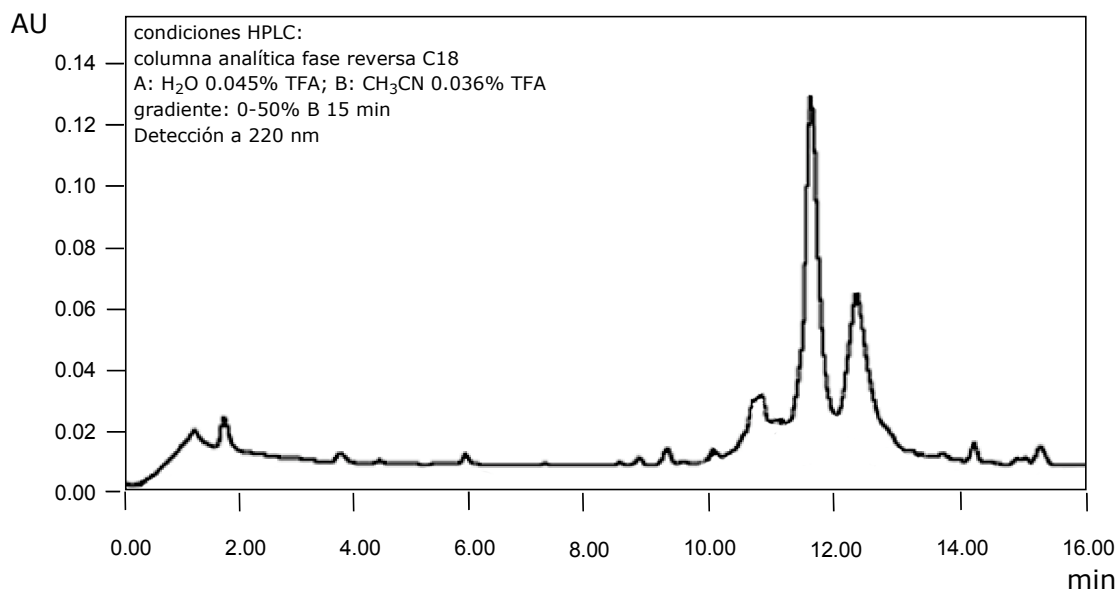
<sup>117</sup> A lo largo de la memoria se indicará específicamente el grupo NH<sub>2</sub> del extremo N-terminal del péptido para facilitar la comprensión.

un grupo N-maleimidobenzoico.<sup>118</sup> Para ello, una parte de la resina suspendida en DMF/DIEA se trató con ácido *m*-N-maleimidobenzoico previamente activado con HBTU/HOAt. La desprotección y separación del péptido resultante de la resina se realizó usando la mezcla TFA/Et<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O (95:3:2, 300 µL/10 mg de resina, 2 horas) (Esquema 4).



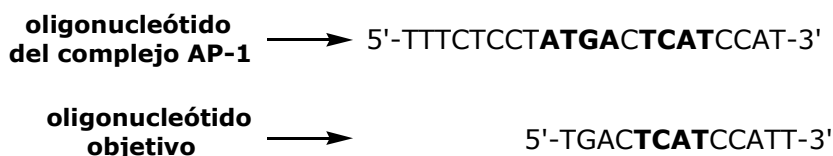
Esquema 4

El análisis por HPLC de fase reversa del residuo obtenido dio lugar al cromatograma que se muestra en la Figura 34. El producto mayoritario, una vez purificado y liofilizado, se identificó por espectrometría de masas de MALDI-TOF como el péptido deseado **5** ([MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>183</sub>H<sub>300</sub>N<sub>51</sub>O<sub>67</sub> 4286.8, encontrada 4287.5). Teniendo en cuenta la carga teórica de la resina, el rendimiento aproximado de la síntesis de **5** a partir de la resina inicial es del 16%.

Figura 34. Cromatograma de HPLC del residuo de reacción para el péptido **5**.

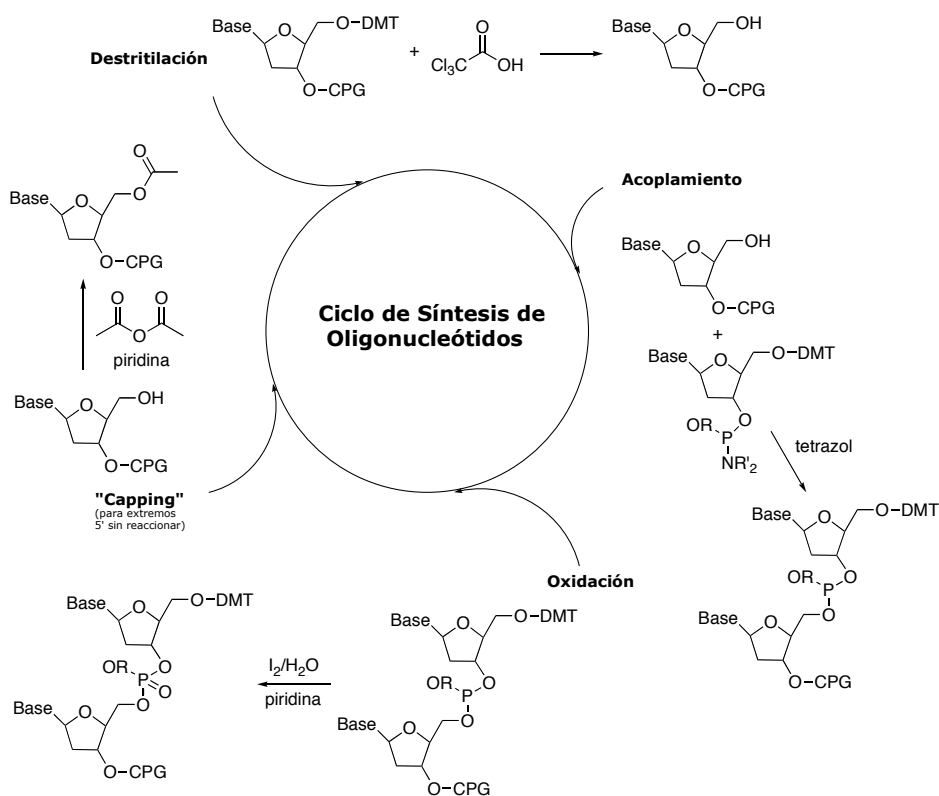
<sup>118</sup> Eritja, R.; Pons, A.; Escarceller, M.; Giralt, E.; Albericio, F. "Synthesis of defined peptide-oligonucleotide hybrids containing a nuclear transport signal sequence" *Tetrahedron* **1991**, *47*, 4113.

A continuación, se procedió a la síntesis del **oligonucleótido** de cadena sencilla, cuya secuencia se muestra en la Figura 35, comparada con la secuencia de una de las cadenas de oligonucleótido del complejo de cristalización AP-1.<sup>119</sup>



**Figura 35.** Comparación de la secuencia del oligonucleótido del complejo AP-1 con la elegida para nuestro oligonucleótido objetivo. En el primer caso se destacan en negrita los sitios de unión de Fos y Jun; en el segundo caso, el sitio de unión de Jun.

La síntesis del oligonucleótido se llevó a cabo en un sintetizador de ADN sobre un soporte sólido CPG con una funcionalización de 44  $\mu\text{mol/g}$  y usando 2-cianoetilfosforamiditos estándar en escala 1  $\mu\text{mol}$ .<sup>120</sup> El ciclo de síntesis (Esquema 5, véase también Parte Experimental) se realizó hasta obtener la secuencia deseada.<sup>121</sup>



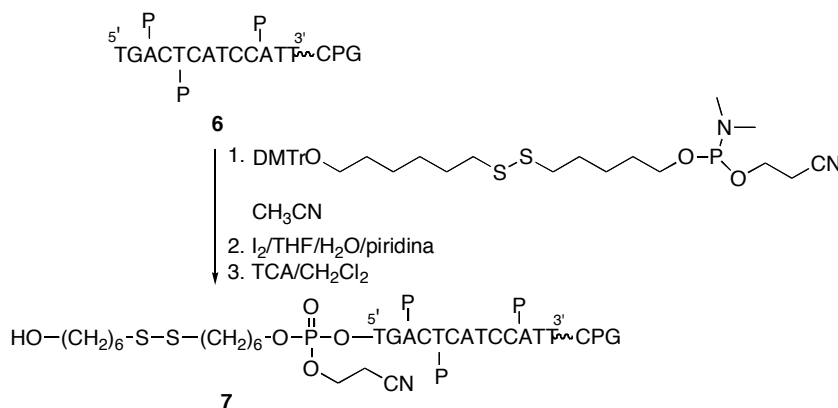
**Esquema 5**

<sup>119</sup> Glover y Harrison, *vid.* nota 80.

<sup>120</sup> Caruthers, M. H.; Barone, A. D.; Beaucage, S. L.; Doods, D. R.; Fisher, E. F.; McBride, L. J.; Matteuci, M.; Stabinsky, Z.; Tang, J. Y. "Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method" *Methods in Enzymology* **1987**, 154, 287.

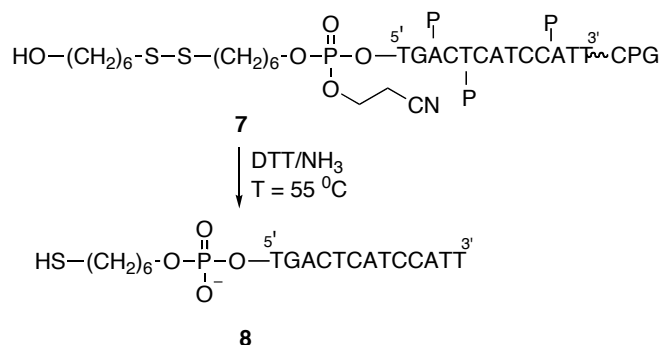
<sup>121</sup> Brown, T.; Brown, D. J. S. "Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis" en *Oligonucleotides and analogues: a practical approach*; Ed. Eckstein, F., Oxford University Press, Nueva York, cap. 1, **1991**.

En este momento se debía introducir un grupo adecuado en el extremo 5' para poder realizar los acoplamiento con el péptido y, en primer lugar, nos planteamos la incorporación de un grupo tiol, que se podría llevar a cabo por adición de un fosforamido provisto de una cadena alquílica terminada en un disulfuro.<sup>122</sup> (Esquema 6).



Esquema 6

La desprotección y desanclaje del oligonucleótido del soporte se llevó a cabo por tratamiento de la resina con una disolución de DTT en amoníaco concentrado a 55 °C (Esquema 7).<sup>123</sup>



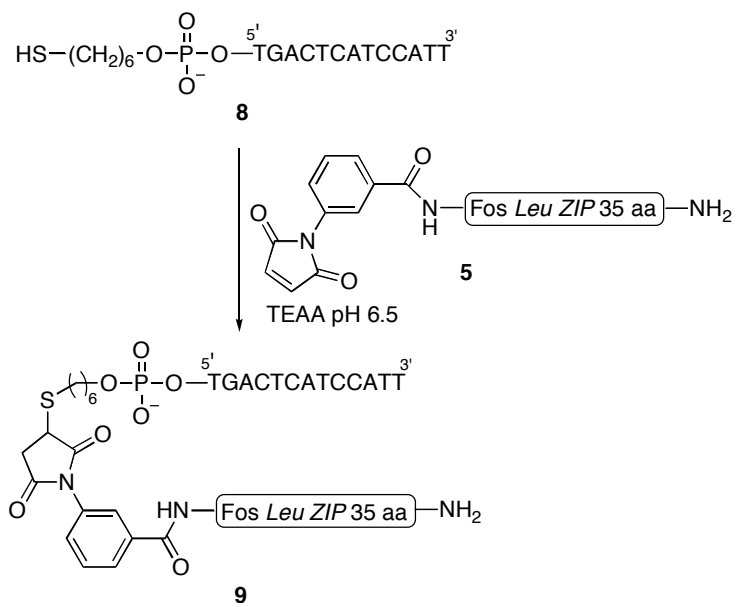
Esquema 7

Disponiendo de un oligonucleótido-tiol y del péptido con un grupo maleimido en su extremo N-terminal, procedimos a ensayar su acoplamiento utilizando condiciones descritas para acoplamiento relacionados.<sup>124</sup> Para ello, la disolución conteniendo el oligonucleótido **8** se filtró, se concentró a sequedad y se disolvió en 1 mL de H<sub>2</sub>O. El DTT se eliminó con una columna *NAP-10* (*Sephadex G-25*) y el residuo se eluyó con 1.5 mL de H<sub>2</sub>O. Sobre esta disolución se añadieron 3 equivalentes del péptido-maleimido **5** disuelto en 150 µL de H<sub>2</sub>O. Para ajustar el pH a 6.5 se añadieron algunas gotas de disolución acuosa de TEAA (Esquema 8).

<sup>122</sup> De la Torre, B. G.; Albericio, F.; Saison-Behmoaras, E.; Bachi, A.; Eritja, R. "Synthesis and binding properties of oligonucleotides carrying nuclear localization sequences" *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1005.

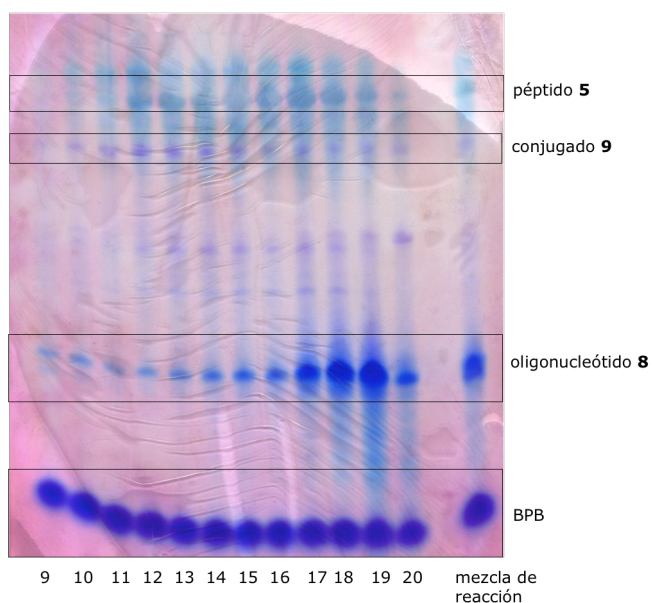
<sup>123</sup> Gottschling, D.; Seliger, H.; Tarrasón, G.; Piulats, J.; Eritja, R. "Synthesis of oligodeoxynucleotides containing N<sup>4</sup>-mercaptoethylcytosine and their use in the preparation of oligonucleotide-peptide conjugates carrying c-myc Tag-sequence" *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 831.

<sup>124</sup> *Ibidem*.



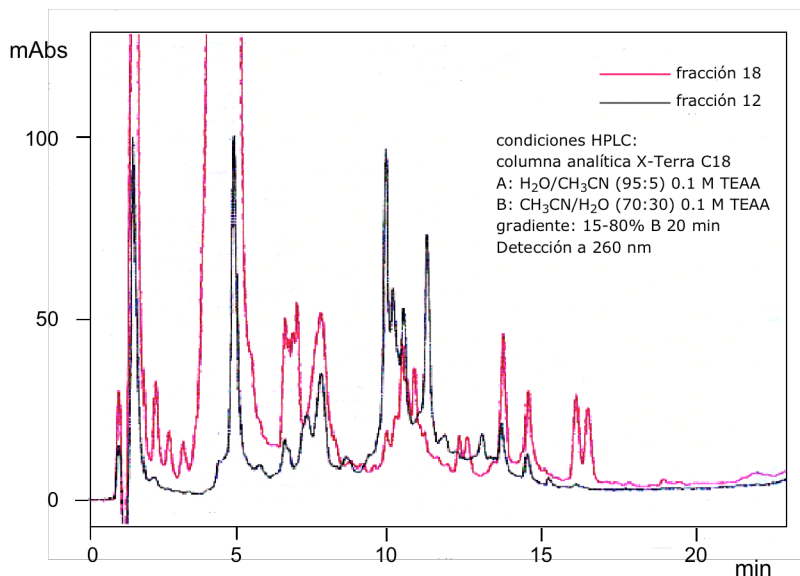
Esquema 8

Después de 12 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se trató de purificar en primer lugar por filtración a través de una columna de exclusión por tamaños de *Sephadex G-50*. En la Figura 36 se muestra un análisis por gel de electroforesis de poliacrilamida de las distintas fracciones recolectadas. Este análisis indicó que la reacción daba un resultado poco claro, aunque por el desplazamiento en el gel asumimos que sí se formaba una pequeña proporción de conjugado, tal como se señala en la figura. En todo caso, resultó muy difícil su aislamiento, pues el rendimiento de la reacción era muy pobre.



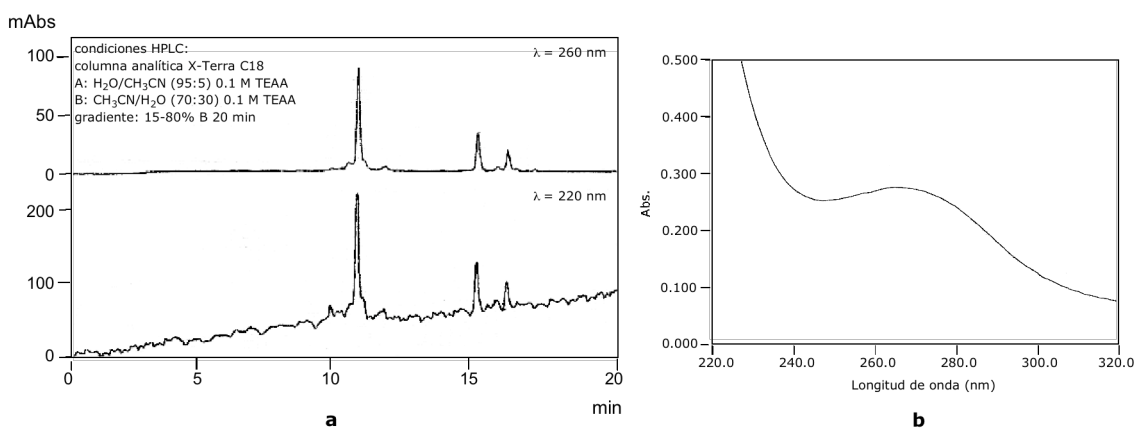
**Figura 36.** PAGE 8% (revelado con "stains-all", véase Parte Experimental) de las fracciones 9-20 eluidas de la columna de Sephadex G-50.

En la siguiente figura se muestra el cromatograma de HPLC de las fracciones 12 y 18, obtenido utilizando una columna de alta resolución (X-Terra). Puede observarse que hay una mezcla compleja de productos. En la fracción 18 hay un pico mayoritario que se corresponde con el oligonucleótido **8** y en la fracción 12 se observa un pico de mayor intensidad con un tiempo de retención de 9.8 min que podría corresponderse con el híbrido deseado.



**Figura 37.** Cromatograma de HPLC de las fracciones 12 y 18 eluidas de la columna de Sephadex G-50.

El compuesto correspondiente a ese pico pudo aislarse al realizar una purificación por gel de electroforesis de poliacrilamida mediante el método de "crush and soak"<sup>125</sup> y llevando a cabo una posterior purificación por HPLC (Figura 38). Aunque el tiempo de retención, el desplazamiento en el gel y el espectro de UV (con dos máximos a 220 y a 260 nm) sugerían que podía tratarse del híbrido deseado, en ese momento no se encontraron las condiciones adecuadas para realizar una identificación por masas.

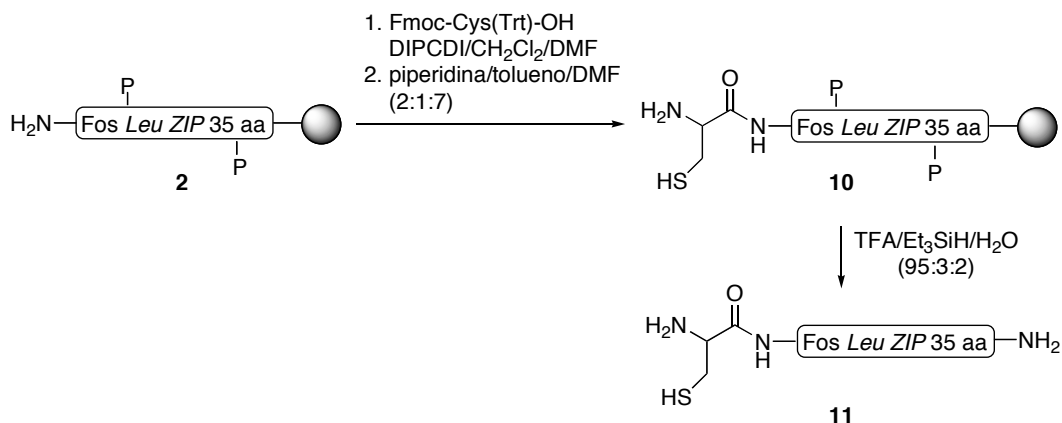


**Figura 38.** a) Cromatograma de HPLC del residuo obtenido tras cortar la banda del gel de electroforesis de poliacrilamida. El pico mayoritario probablemente corresponde al conjugado obtenido. b) Espectro de UV del compuesto mayoritario.

<sup>125</sup> Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual* **1989** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, pág. 6.46.

El resultado de la reacción de conjugación no varió significativamente cuando ésta se llevó a cabo purificando previamente el péptido **5** y el oligonucleótido **8**, ni tampoco al realizar la conjugación a 37 °C.

En este momento de la investigación pensamos que el problema del acoplamiento podía estar relacionado con la elección del método de conjugación, y por ello decidimos explorar otras posibilidades. En primer lugar, estudiamos la opción de llevar a cabo la reacción de conjugación invirtiendo la posición de los grupos reactivos, o sea, introduciendo el tiol en el péptido y el grupo maleimido en el oligonucleótido. Para ello incorporamos una cisteína en el extremo N-terminal de la resina peptídica **2** según se indica en el Esquema 9.



Esquema 9

El análisis por HPLC de fase reversa del residuo obtenido dio lugar al cromatograma que se muestra en la Figura 39. El péptido se identificó por espectrometría de masas de MALDI-TOF ( $[MH]^+$  calculada para C<sub>175</sub>H<sub>300</sub>N<sub>51</sub>O<sub>65</sub>S<sub>1</sub>: 4190.7, encontrada: 4190.2).

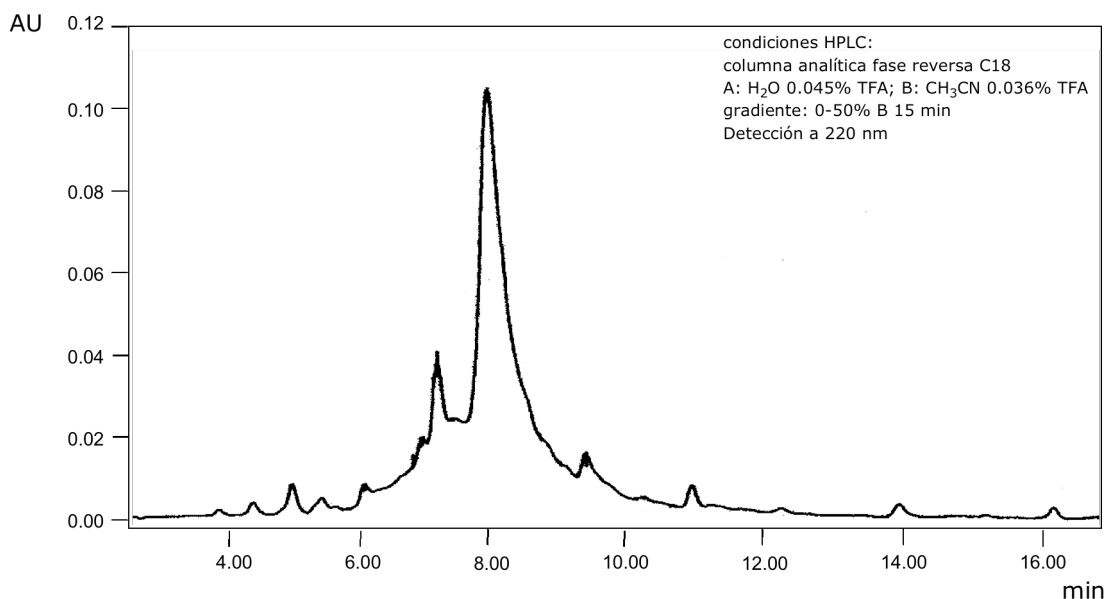
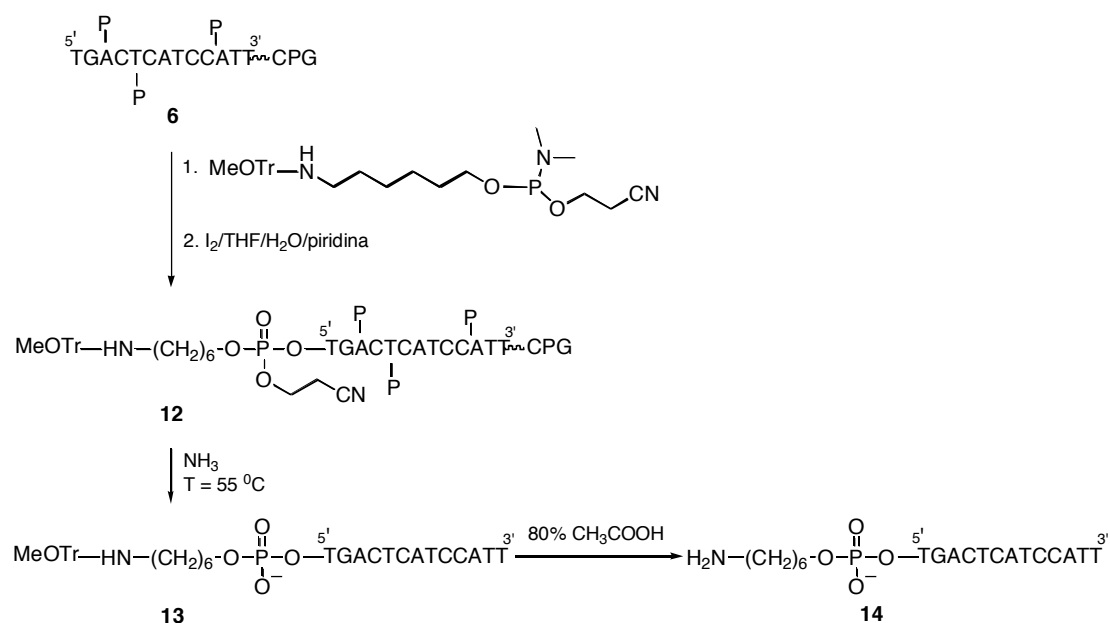


Figura 39. Cromatograma de HPLC del residuo de reacción para dar el péptido **11**.

Para incorporar el grupo maleimido en el extremo 5' del oligonucleótido, sobre el soporte oligonucleotídico **6** (0.02  $\mu\text{mol}$ ) se incorporó un fosforamidito derivado de 6-aminohexan-1-ol para así obtener el soporte **12** con un grupo amino en su extremo 5' (Esquema 10).<sup>126</sup>

El soporte oligonucleotídico **12** se desprotegió por tratamiento con amoníaco concentrado a 55 °C durante 12 horas dando lugar al oligonucleótido **13**, que se purificó por HPLC. El oligonucleótido **13** se filtró y se concentró a sequedad. Se añadió 1 mL de disolución al 80% de ácido acético en  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q para eliminar el grupo monometoxitritilo del amino terminal. La mezcla se agitó durante 30 min, se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  y se concentró a sequedad.

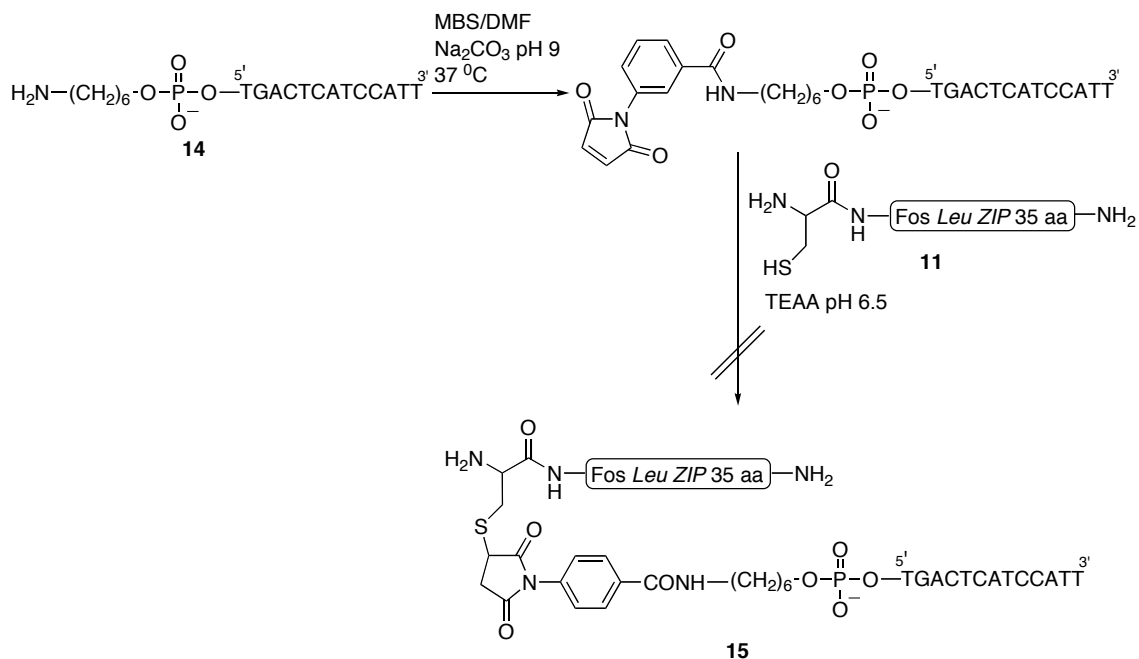


El residuo obtenido se pasó a través de una columna *Dowex 50x4* para intercambiar iones amonio por iones  $\text{Na}^+$ . Con el fin de incorporar el grupo maleimido en el amino-oligonucleótido supuestamente obtenido anteriormente, el oligonucleótido se disolvió en 0.2 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y se mezcló con 0.2 mL de disolución acuosa 1 M de  $\text{NaHCO}_3$  pH 9. Se añadieron 20 equivalentes de MBS disuelto en 0.1 mL de DMF.<sup>127</sup> La mezcla se agitó 12 h a 37 °C y se desalinizó en una columna *NAP-10 (Sephadex G-25)*. La disolución del oligonucleótido-maleimido que supuestamente se ha eluído se concentró hasta un volumen de 1 mL. Aunque no teníamos confirmación de que se hubiera formado el derivado deseado, decidimos proceder con la etapa de acoplamiento al péptido, y analizar luego el resultado. Para ello sobre la disolución anterior se añadió el péptido-tiol **11** (exceso de 3 veces) disuelto en 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Para ajustar el pH a 6.5 se añadieron algunas gotas de disolución acuosa de TEAA (Esquema 11).

<sup>126</sup> Connolly, B. A. "The synthesis of oligonucleotides containing a primary amino group at the 5' terminus" *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 3131.

<sup>127</sup> a) Zhu, T.; Wei, Z.; Tung, C.-H.; Dickerhof, W. A.; Breslauer, K. J.; Georgopoulos, D. E.; Leibowitz, M. J.; Stein, S. "Oligonucleotide-poly-L-ornithine conjugates: binding to complementary DNA and RNA" *Antisense Res. Dev.* **1993**, *3*, 265. b) Eritja, R. "Synthesis and properties of oligonucleotides carrying cryptolepine derivatives" *Chem. Biodiv.* **2004**, *1*, 289.

Desafortunadamente, al realizar un gel de electroforesis de poliacrilamida de la mezcla de reacción no se observaron bandas que pudieran corresponderse con el conjugado esperado.



Esquema 11

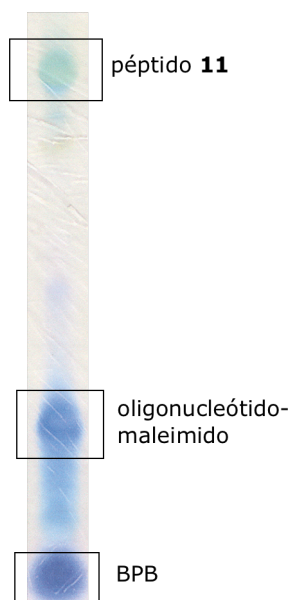
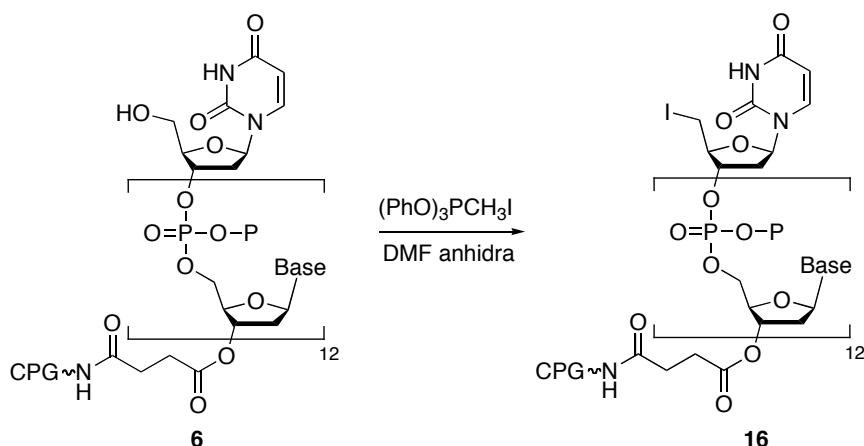


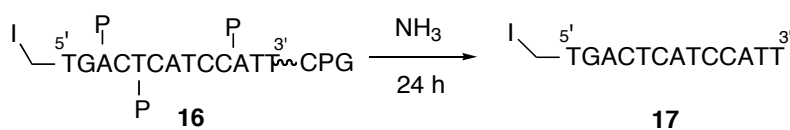
Figura 40. PAGE 8% de la mezcla de reacción para la obtención de 15.

Disponiendo del oligonucleótido 6, pensamos que sería interesante probar la posibilidad de realizar el acoplamiento del péptido-tiol sobre un derivado del oligonucleótido provisto de un átomo de yodo en el extremo 5'. Se procedió entonces a la transformación del grupo

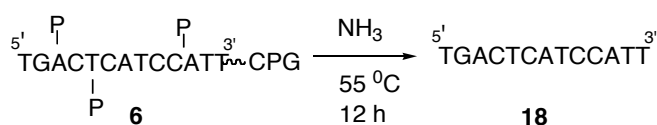
hidroxilo en 5' del oligonucleótido (protegido y unido al soporte sólido) en un yoduro.<sup>128</sup> Para ello se pasó una disolución de yodación previamente preparada (yoduro de metiltrifenoxifosfonio 0.5 M en DMF anhidra) a través de una columna de síntesis de ADN conteniendo 0.2  $\mu\text{mol}$  del oligonucleótido protegido (Esquema 12).



El oligonucleótido yodado que debe resultar del proceso se desprotegió y separó del soporte sólido por tratamiento con amoníaco concentrado durante 24 h a temperatura ambiente.

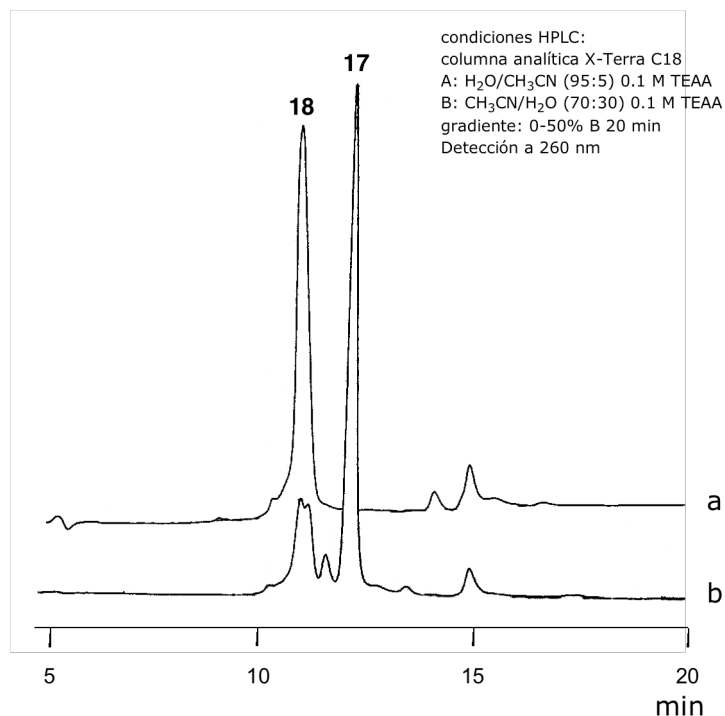


El residuo obtenido se filtró, se concentró a sequedad y se analizó por HPLC. Asimismo, como muestra control, se desprotegió una pequeña parte de la resina **6** por el procedimiento habitual:



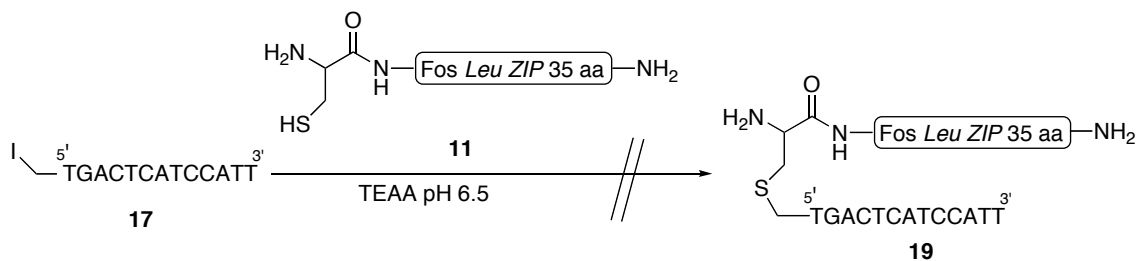
En la Figura 41 se muestran los cromatogramas de HPLC del oligonucleótido con el grupo hidroxilo en 5' y del oligonucleótido resultante de la reacción de yodación. Los datos son congruentes con la formación mayoritaria del yododerivado **17**.

<sup>128</sup> Miller, G. P.; Kool, E. T. "A simple method for electrophilic functionalization of DNA" *Org. Lett.* **2002**, *21*, 3599.

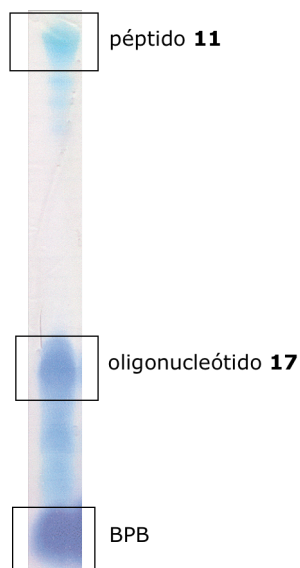


**Figura 41.** Cromatogramas de HPLC de los residuos **18** (a) y **17** (b).

El oligonucleótido **17** se desalinizó en una columna *NAP-10* (*Sephadex G-25*) y se eluyó con 2 mL de H<sub>2</sub>O y sobre esta disolución se añadió el péptido-tiol **11** en exceso, disuelto en 150  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. Para ajustar el pH a 6.5 se añadieron algunas gotas de disolución acuosa de TEAA (Esquema 15). Al realizar un gel de electroforesis de poliacrilamida de la mezcla de reacción se comprobó que no se observaban bandas que pudieran corresponder al híbrido deseado.

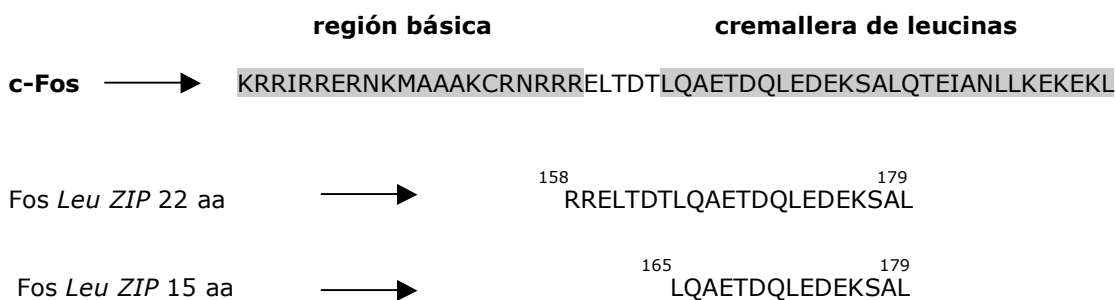


**Esquema 15**



**Figura 42.** PAGE 8% de la mezcla de reacción para la obtención de **19**.

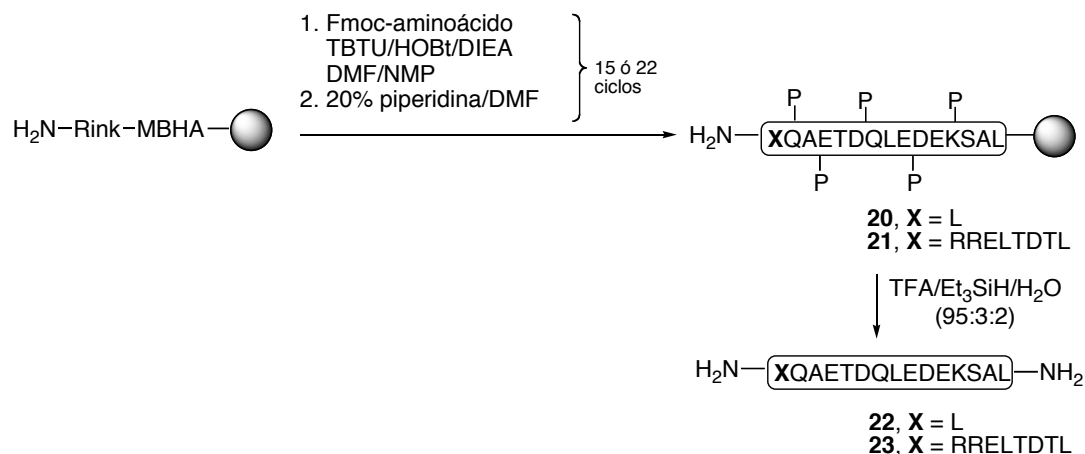
Dadas las dificultades para llevar a cabo las reacciones de conjugación en las condiciones previamente descritas, pensamos que quizás el problema derivase del gran tamaño del péptido y decidimos proceder a la obtención de conjugados con una **parte peptídica más pequeña**. Tomando como base los estudios llevados a cabo por el grupo de Chmielewski,<sup>129</sup> en los que se utilizan péptidos truncados de Fos como inhibidores de Jun, pensamos en sintetizar dos péptidos de 22 y de 15 aminoácidos derivados de la cremallera de leucinas de Fos. En la Figura 43 se muestran sus secuencias comparadas con las de la proteína natural.



**Figura 43.** Comparación de la secuencia de c-Fos con las secuencias de los nuevos péptidos objetivo.

La síntesis de estos péptidos se llevó a cabo en un sintetizador automático sobre una resina Rink-MBHA amida con una carga teórica inicial de 0.66 mmol/g y siguiendo la metodología Fmoc-<sup>t</sup>Bu. Los acoplamientos se realizaron en DMF usando como agentes acoplantes TBTU/HOBt y como base DIEA 2 M en N-metilpirrolidona. Con el fin de comprobar que la síntesis había sido correcta se desprotegió una pequeña parte de cada resina con TFA/Et<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O (95:3:2) durante 1 h (Esquema 16).

<sup>129</sup> Yao *et al.*, *vid.* nota 89.



Esquema 16

Los cromatogramas de HPLC de los residuos obtenidos (Figuras 44 y 45) confirmaron la presencia de sendos productos mayoritarios cuyo análisis por espectrometría de MALDI-TOF confirmó la identidad de los péptidos esperados **22** y **23**:  $[\text{MH}]^+$  calculada para  $\text{C}_{70}\text{H}_{118}\text{N}_{19}\text{O}_{29}$  1689.8, encontrada 1688.9;  $[\text{MH}]^+$  calculada para  $\text{C}_{105}\text{H}_{179}\text{N}_{32}\text{O}_{42}$  2561.8, encontrada 2561.4. En el caso del péptido **23** el proceso fue menos eficiente, observándose varios productos además del péptido deseado.

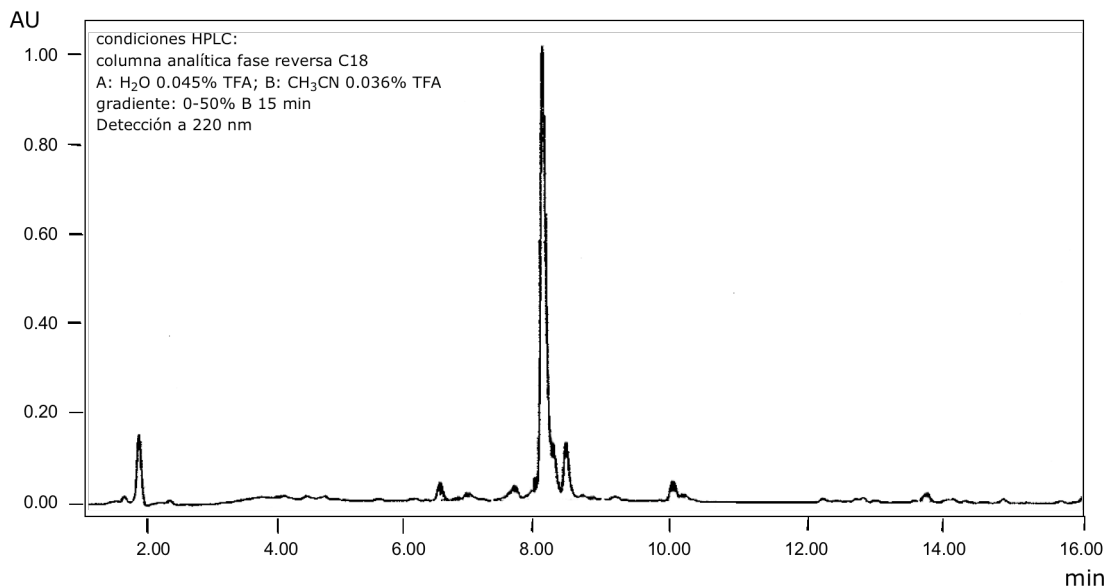
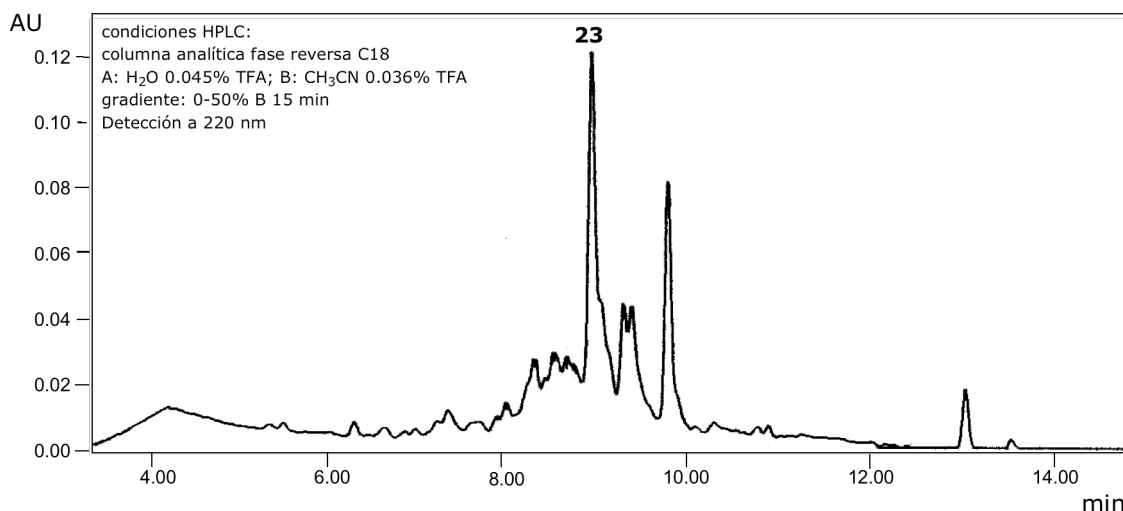
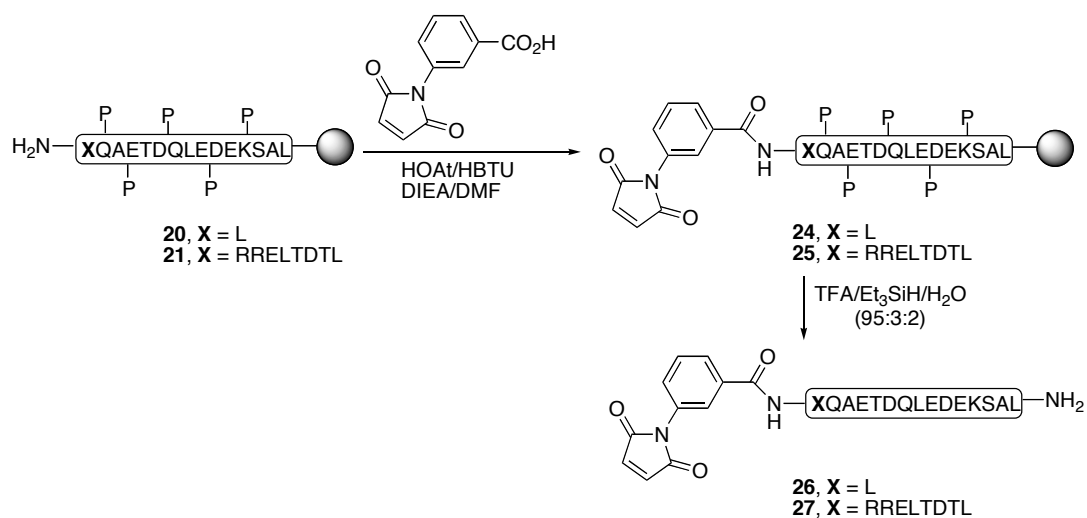


Figura 44. Cromatograma de HPLC del residuo de reacción para obtener el péptido **22**.



**Figura 45.** Cromatograma de HPLC del residuo de reacción para obtener el péptido **23**.

Las reacciones de conjugación de estos péptidos se ensayarían en primer lugar siguiendo la estrategia con la que se obtuvieron resultados más positivos en el caso del híbrido con el péptido de 35 aminoácidos (grupo tiol en el extremo 5' del oligonucleótido y grupo maleimido en el extremo N-terminal del péptido). Por ello, se procedió a la incorporación de un grupo maleimido en el extremo N-terminal de los péptidos sintetizados, mediante el acoplamiento en DMF/DIEA de una parte de las peptidilresinas **20** y **21** con el ácido *m*-N-maleimidobenzoico previamente activado con HBTU/HOAt. La desprotección y separación de la resina de los péptidos así obtenidos se realizó usando la mezcla TFA/Et<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O (95:3:2, 300 µL/10 mg de resina, 2 horas).



**Esquema 17**

Los cromatogramas de HPLC de los residuos obtenidos (Figuras 46 y 47) confirmaron la presencia de sendos productos mayoritarios cuyo análisis por espectrometría de MALDI-TOF confirmó la identidad de los péptidos esperados **26** y **27** (20% y 11% de rendimiento,

respectivamente):  $[MH]^+$  calculada para  $C_{81}H_{123}N_{20}O_{32}$  1889.0, encontrada 1887.8;  $[MH]^+$  calculada para  $C_{116}H_{184}N_{33}O_{45}$  2761.0, encontrada 2760.4.

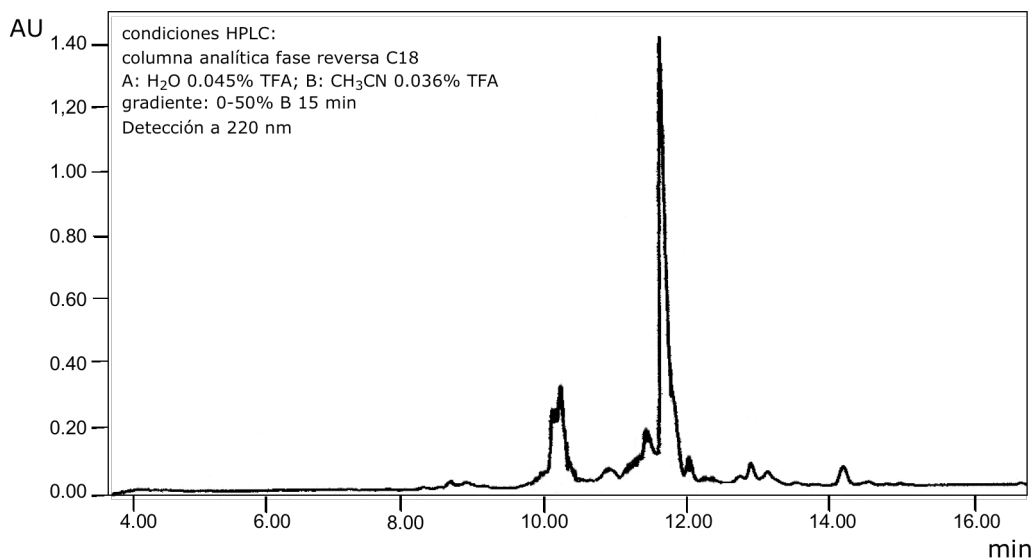


Figura 46. Cromatograma de HPLC del residuo de reacción para la obtención del péptido 26.

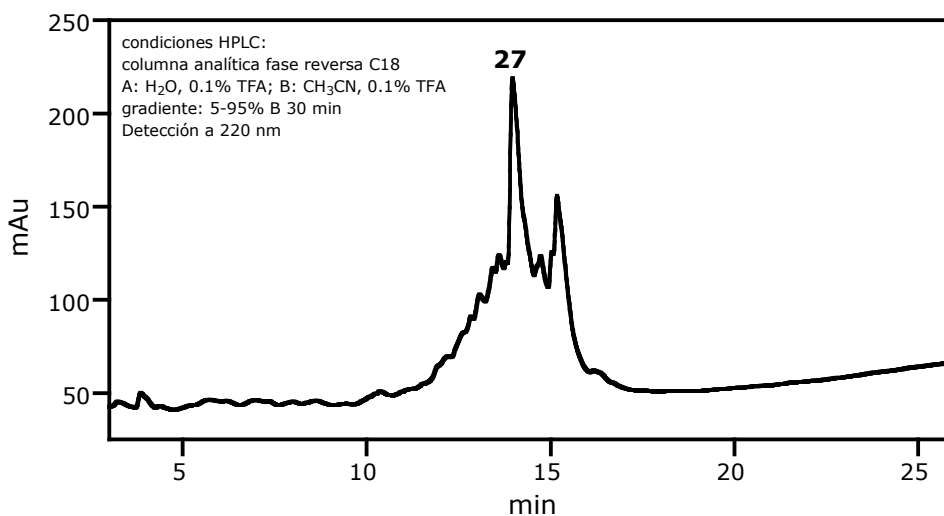
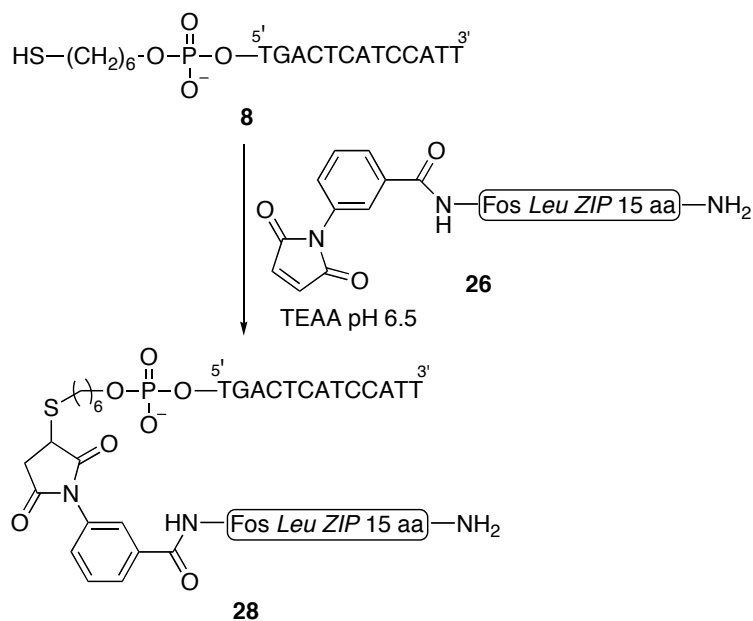


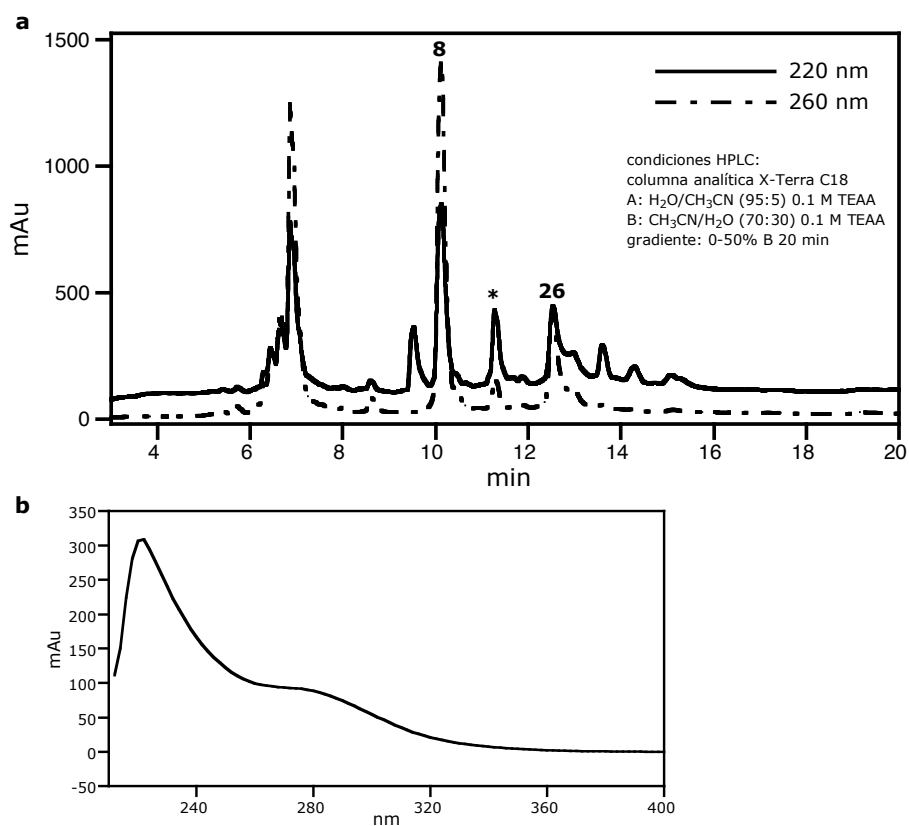
Figura 47. Cromatograma de HPLC del residuo de reacción para la obtención del péptido 27.

A continuación, se ensayó la reacción de conjugación entre el oligonucleótido tiol **8** y el péptido **26**. Sobre el oligonucleótido eluído de la columna *NAP-10* (*Sephadex G-25*) y disuelto en 1,5 mL de  $H_2O$  se añadieron 5 equivalentes del péptido-maleimido y sobre la mezcla se añadieron unas gotas de TEAA para ajustar el pH a 6.5 (Esquema 18).



Esquema 18

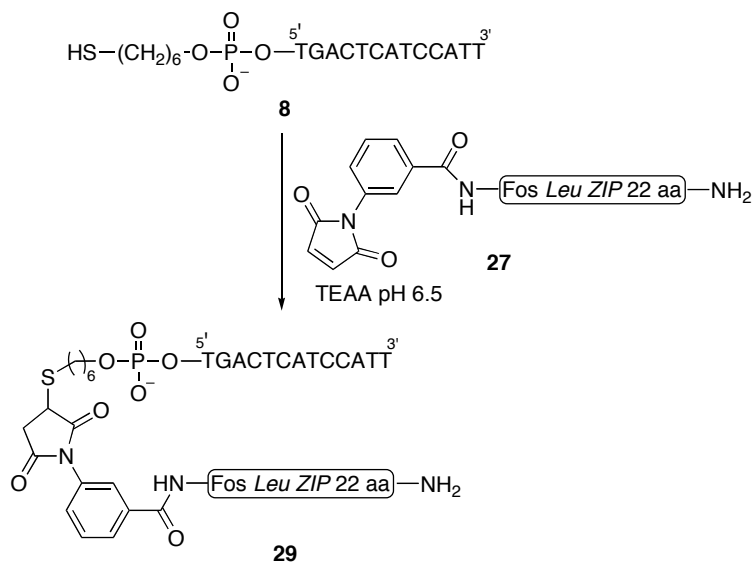
En la siguiente figura se muestra el cromatograma de HPLC de la mezcla después de 12 h de reacción.



**Figura 48.** a) Cromatograma de HPLC de la mezcla de reacción después de 12 h. b) Espectro de UV del compuesto con  $t_R$  11.3 min (\*).

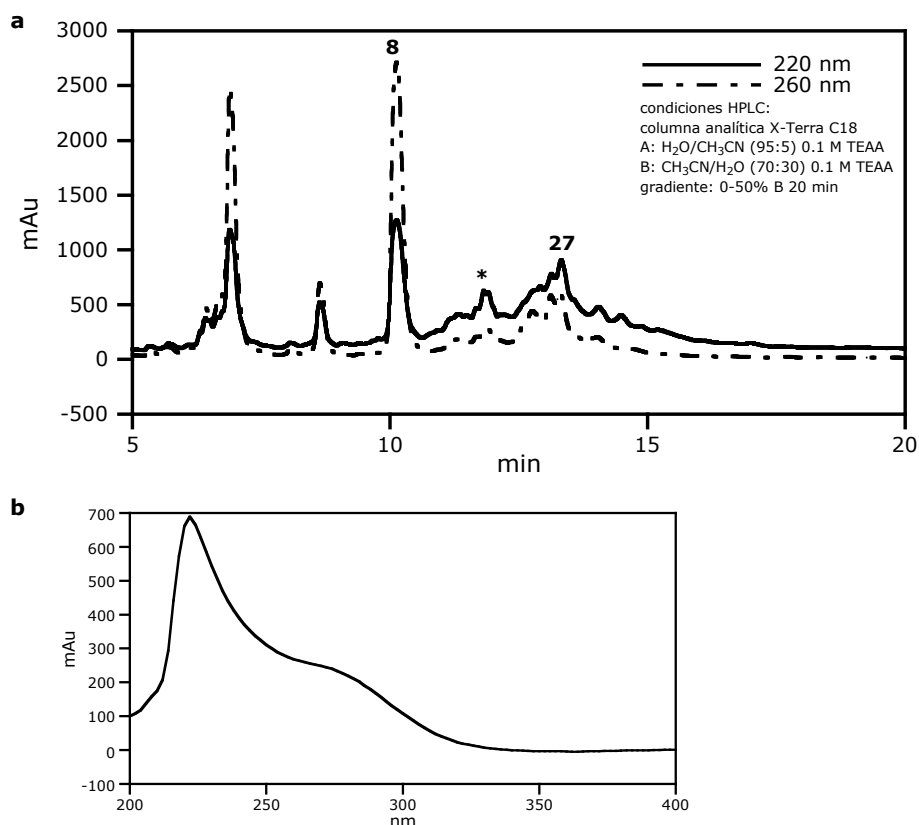
El espectro de UV del compuesto que eluye a 11.3 min (Figura 48b, \*) muestra las bandas esperadas para el conjugado oligonucleótido-péptido (220 nm correspondiente a los enlaces amida del péptido y 260 nm correspondiente a las bases nitrogenadas del oligonucleótido), por lo que probablemente se corresponda con el híbrido deseado. Después de su purificación por HPLC, se calculó un rendimiento aproximado del 3% para el acoplamiento.

De forma análoga, se llevó a cabo la reacción entre el oligonucleótido tiol **8** y el péptido **27** (Esquema 19).



Esquema 19

En la Figura 49 se muestra el cromatograma de la mezcla tras 12 horas de reacción. Se purificó el compuesto que eluye a 11.8 min (\*), cuyo espectro de UV se corresponde con el de un conjugado oligonucleótido-péptido y que por tanto debe tratarse del híbrido **29**, calculándose un rendimiento aproximado del 5% para el acoplamiento.

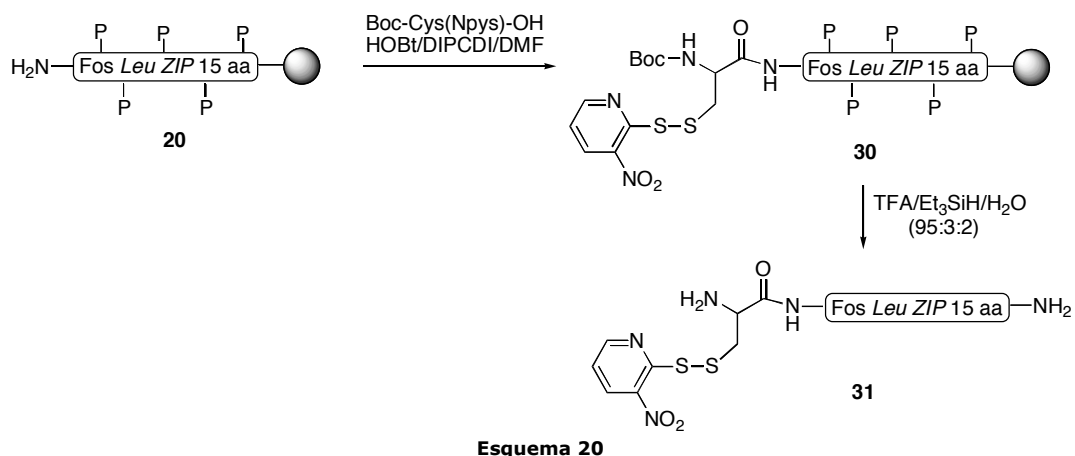


**Figura 49.** a) Cromatograma de HPLC de la reacción después de 12 h. b) Espectro de UV del compuesto con  $t_R=11.8$  min (\*).

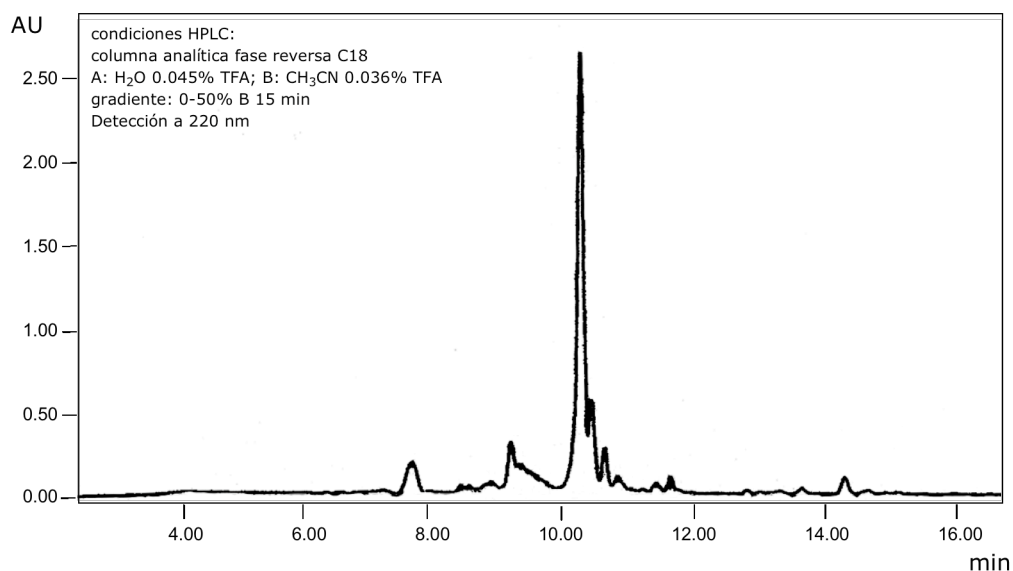
Estas reacciones de conjugación se realizaron también con los péptidos y con los oligonucleótidos después de ser purificados por HPLC, pero no se observó una mejora de los rendimientos de reacción.

Dado que uno de los métodos de bioconjugación más establecidos se basa en la formación de enlaces disulfuro, también decidimos ensayar esta posibilidad. Para ello, en una parte de la peptidilresina de 15 aminoácidos **20** se incorporó una cisteína protegida con un grupo 3-nitro-2-piridinosulfenilo (Npys),<sup>130</sup> mediante acoplamiento con Boc-Cys(Npys) en DMF previamente activado con HOBt/DIPCDI. La desprotección del péptido y separación de la resina se realizó usando la mezcla TFA/Et<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O (95:3:2, 300  $\mu$ L/10 mg de resina, 2 horas, Esquema 20).

<sup>130</sup> a) Eritja *et al.* **1991**, *vid.* nota 117 (pág. 58). b) Galande, A. K.; Spatola, A. F. "Solid-phase synthesis of disulphide heterodimers of peptides" *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3431.

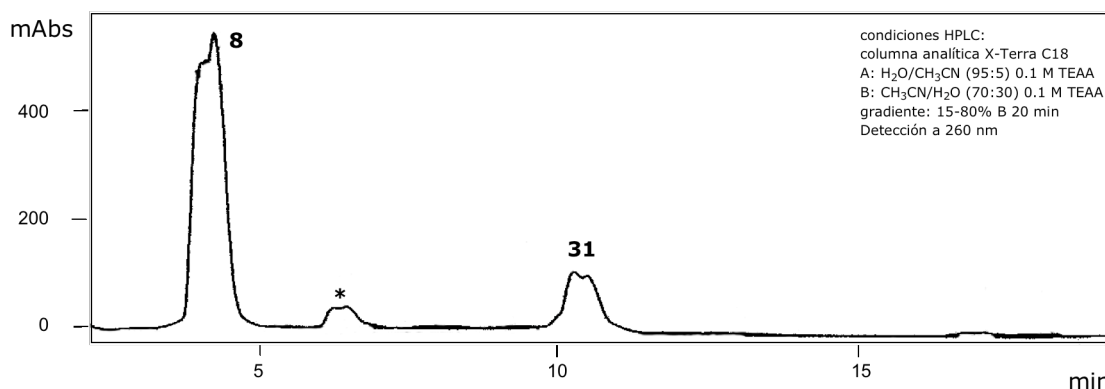
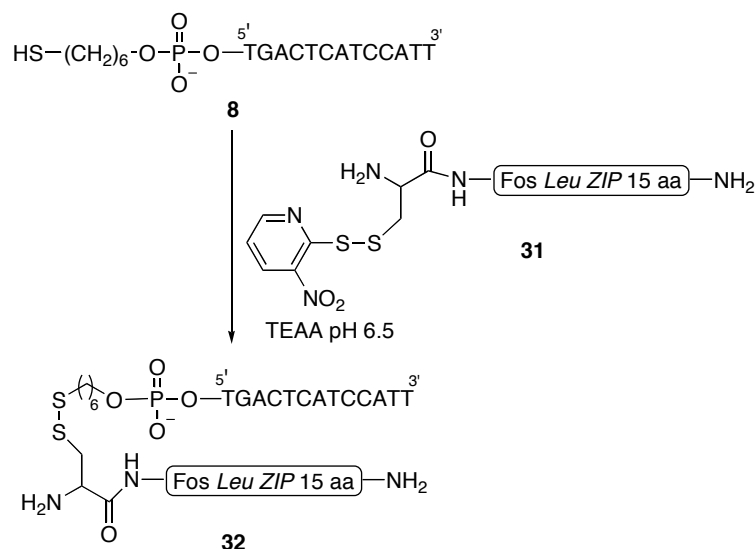


En la Figura 50 se muestra el cromatograma de HPLC correspondiente al péptido **31**, cuyo análisis por espectrometría de MALDI-TOF confirmó su identidad:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{81}H_{123}N_{20}O_{32}$  1946.1, encontrada 1946.2.



**Figura 50.** Cromatograma de HPLC del residuo de reacción para obtener el péptido **31**.

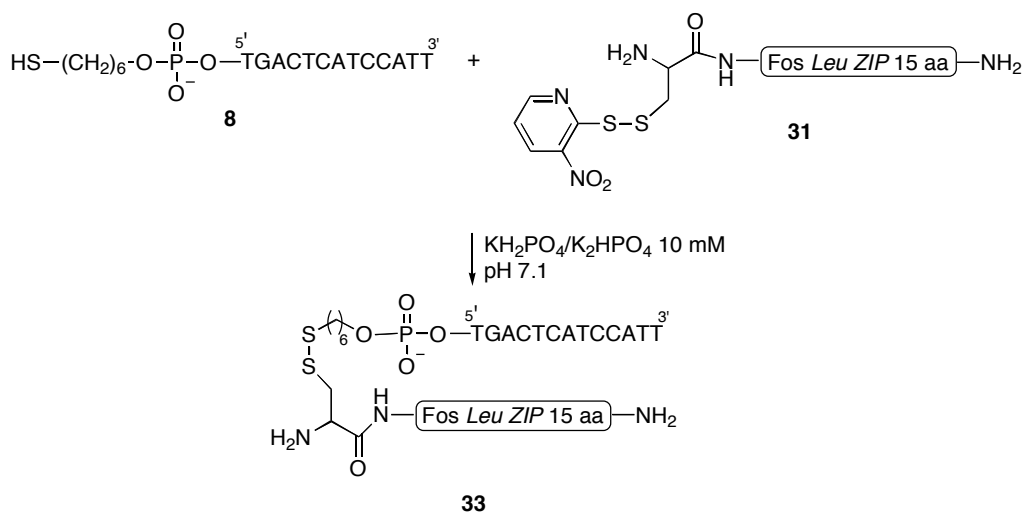
La conjugación del péptido **31** y el oligonucleótido **8** en condiciones análogas a las previamente descritas (Esquema 21) no condujo a mejores resultados que en el caso de la conjugación tiol-maleimido (Figura 51), obteniéndose sólo pequeñas proporciones de productos aparentemente derivados del acoplamiento.



**Figura 51.** Cromatograma de HPLC de la mezcla tras 12 horas de reacción. El pico señalado (\*) probablemente corresponde al híbrido **32**.

#### 1.4. Obtención de los híbridos utilizando condiciones de conjugación diferentes

El estudio realizado sobre las diferentes posibilidades de acoplamiento indicaba que quizás el problema de la reacción radicaba en las condiciones de los ensayos, más que en el tipo de acoplamiento o incluso en el tamaño del péptido. Por ello, decidimos estudiar nuevas condiciones para la reacción de acoplamiento entre el oligonucleótido-tiol **8** y los péptidos activados en el extremo N-terminal. Así, pudimos encontrar que la formación de los conjugados con enlaces disulfuro mejoraba notablemente cuando se hacía reaccionar el oligonucleótido tiol **8** puro (concentración 50  $\mu$ M) con el péptido **31** puro (concentración 250  $\mu$ M) en una disolución tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM a pH 7.1. Durante la reacción se observa que la disolución adquiere una coloración amarillo tenue debida a la liberación del grupo Npys.



Esquema 22

Según se muestra en los cromatogramas de la Figura 52, en este caso se observa una reacción limpia y relativamente rápida, como lo indica la aparición inmediata de un pico mayoritario con retención intermedia y la desaparición total del oligonucleótido de partida después de 30 min.

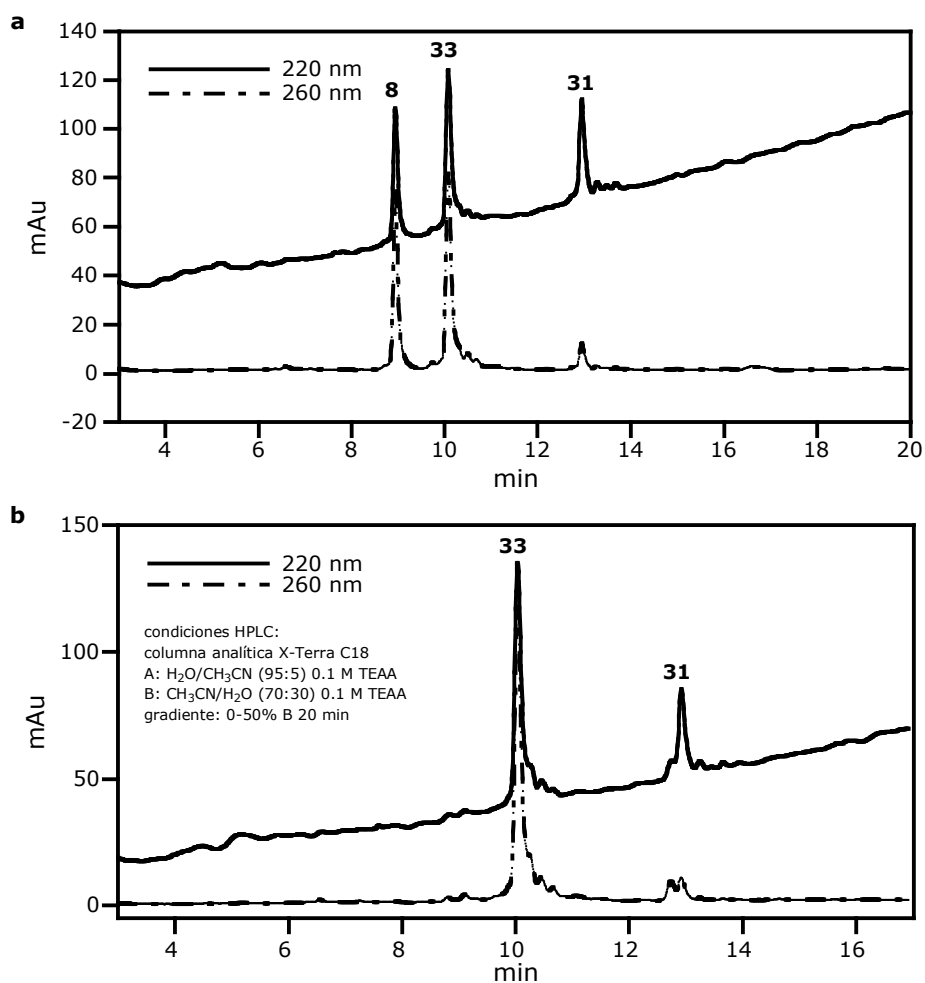
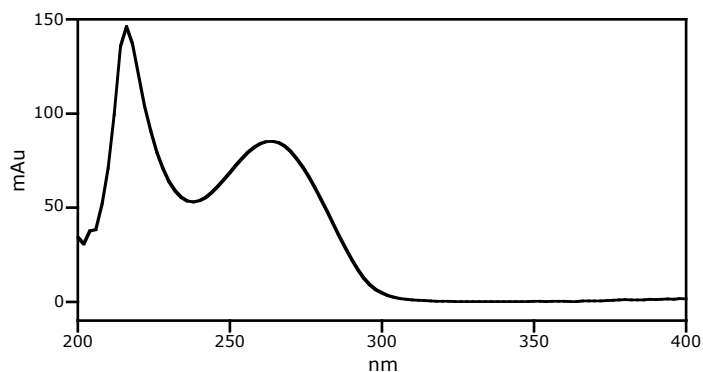


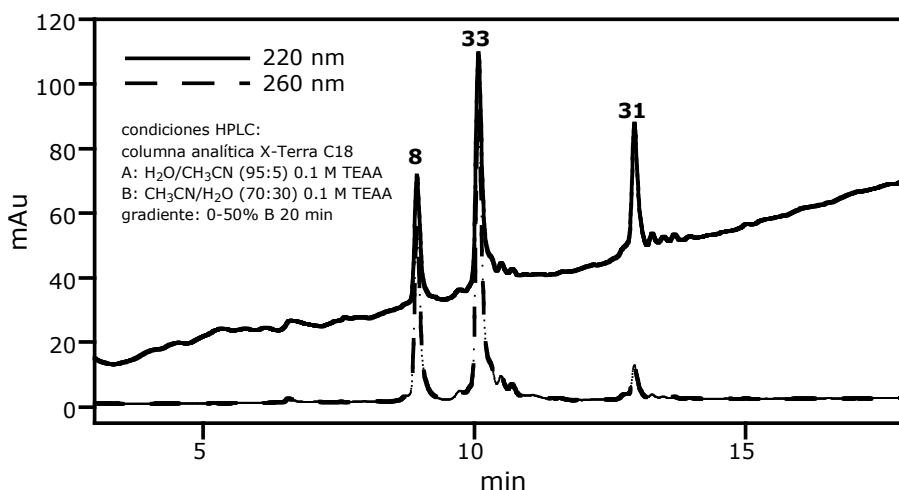
Figura 52. Cromatogramas de HPLC de la reacción de conjugación al cabo de 5 min (a) y de 30 min (b).

En la siguiente figura se muestra el UV del compuesto que eluye a 10.0 min. Como se puede observar, tiene un máximo a 220 nm y otro a 260 nm, como corresponde a un conjugado oligonucleótido-péptido.



**Figura 53.** Espectro de UV del compuesto con  $t_r=10$  min.

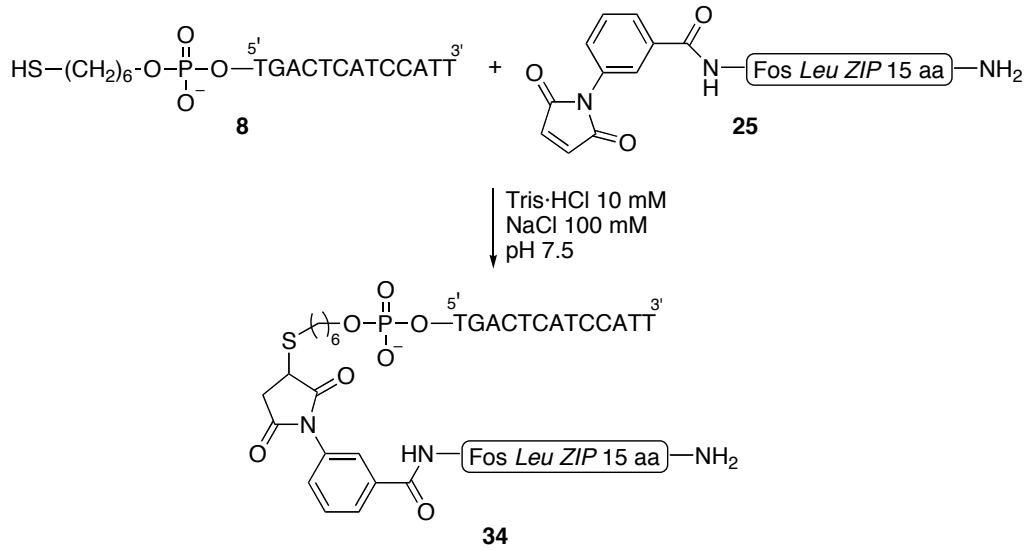
La reacción se acelera incluso más cuando se lleva a cabo en el tampón conteniendo Tris·HCl 10 mM y NaCl 100 mM a pH 7.5:



**Figura 54.** Cromatograma de HPLC de la reacción de conjugación con tampón Tris·HCl 10 mM y NaCl 100 mM a pH 7.5 al cabo de 5 min.

La purificación por HPLC del compuesto que eluye a 10.1 min permitió aislar el producto con un rendimiento del 56%, que se identificó como el híbrido deseado **33** por espectrometría de MALDI-TOF (matriz de HPA):  $[MH]^+$  calculada para  $C_{205}H_{295}N_{62}O_{111}P_{13}S_2$  5869.8, encontrada 5867.9.

Posteriormente, pudimos comprobar que utilizando condiciones de reacción similares, es posible realizar la conjugación del oligonucleótido-tiol con el péptido de 15 aminoácidos que contiene el grupo maleimidobenzoílo en el extremo N-terminal.



Esquema 23

En la siguiente figura se muestran los cromatogramas de HPLC correspondientes al seguimiento de la reacción.

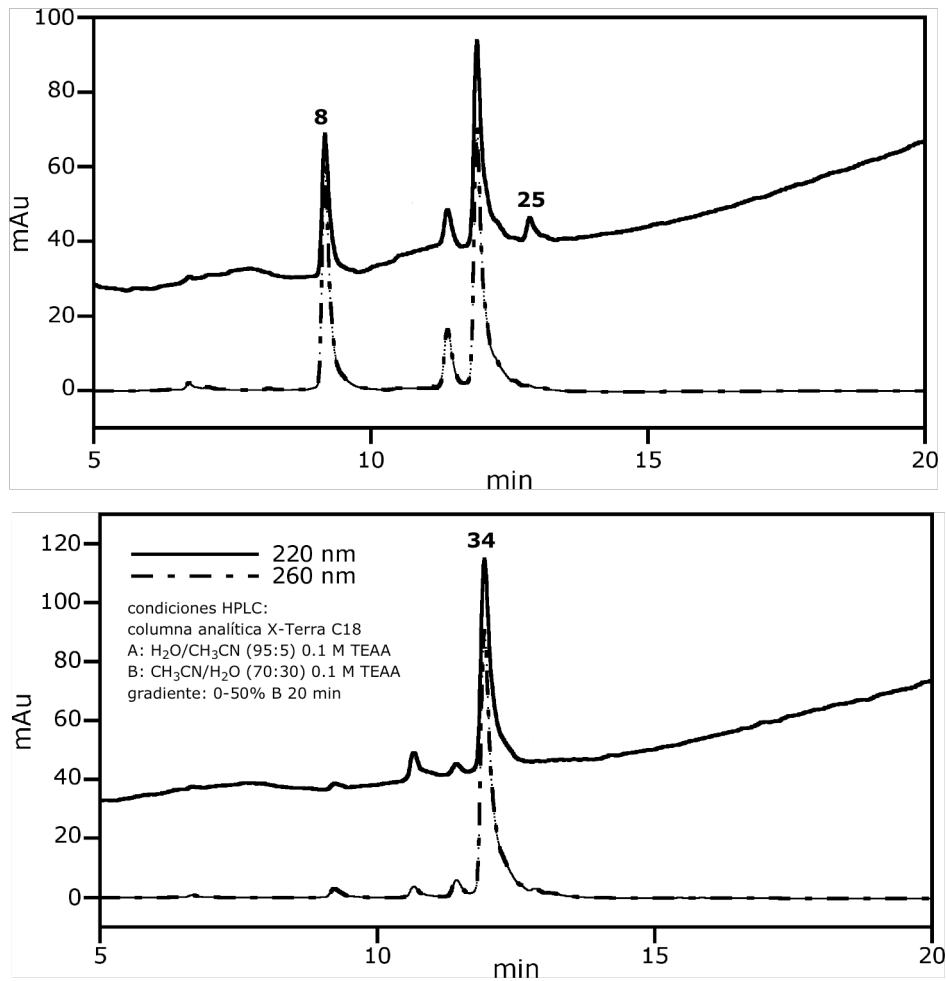
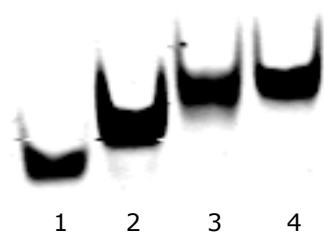


Figura 55. Cromatograma de HPLC de la reacción de conjugación tras 5 min de reacción (a) y después de 30 min (b).

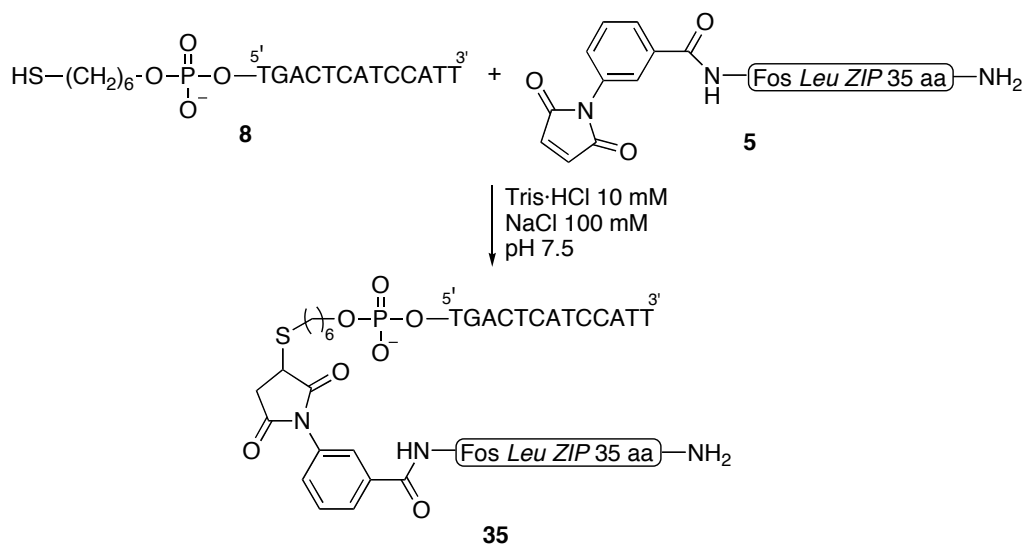
Después de 30 min de reacción se observa la desaparición total del oligonucleótido-tiol de partida (Figura 55b). El compuesto con tiempo de retención 11.9 min se purificó e identificó como el híbrido **34** (56% de rendimiento) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{213}H_{297}N_{62}O_{113}P_{13}S_1$  5967.9, encontrada 5962.5.

Estas conjugaciones también se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), utilizando *SYBR Gold* como agente de revelado, lo que permite detectar oligonucleótidos a bajas concentraciones (véase también Parte Experimental, pág. 149). Como se muestra en la Figura 56, se observa que las bandas correspondientes a los conjugados oligonucleótido-péptido sintetizados migran más lentamente que el oligonucleótido de partida.



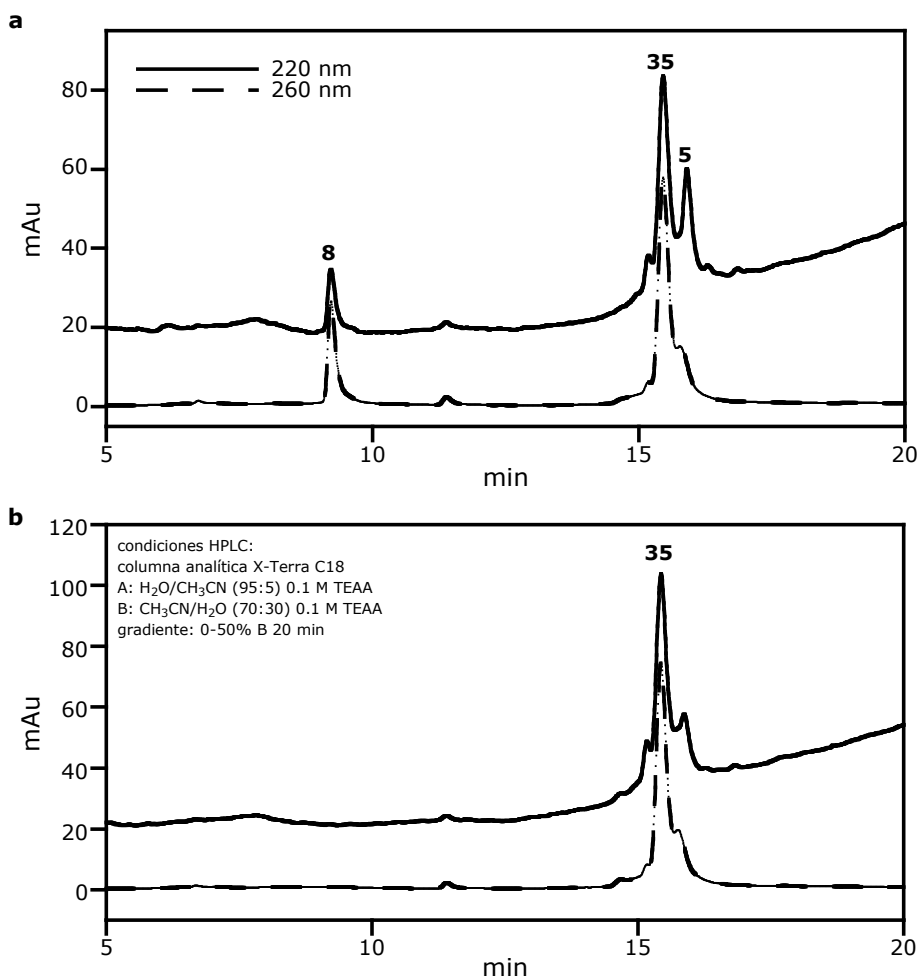
**Figura 56.** PAGE 15%. Calle 1: **8** (~400 nM), calle 2: **8**-dh (~200 nM), calle 3: **33** (~500 nM), calle 4: **34** (~500 nM).

La eficiencia del proceso de conjugación anterior nos indujo a ensayar estas condiciones para sintetizar el híbrido con el péptido de 35 aminoácidos. Así, se hizo reaccionar el oligonucleótido-tiol **8** purificado (concentración 50  $\mu$ M) con 3 equivalentes del péptido-maleimido **5** (concentración 150  $\mu$ M) en tampón conteniendo Tris·HCl 10 mM y NaCl 100 mM a pH 7.5.



**Esquema 24**

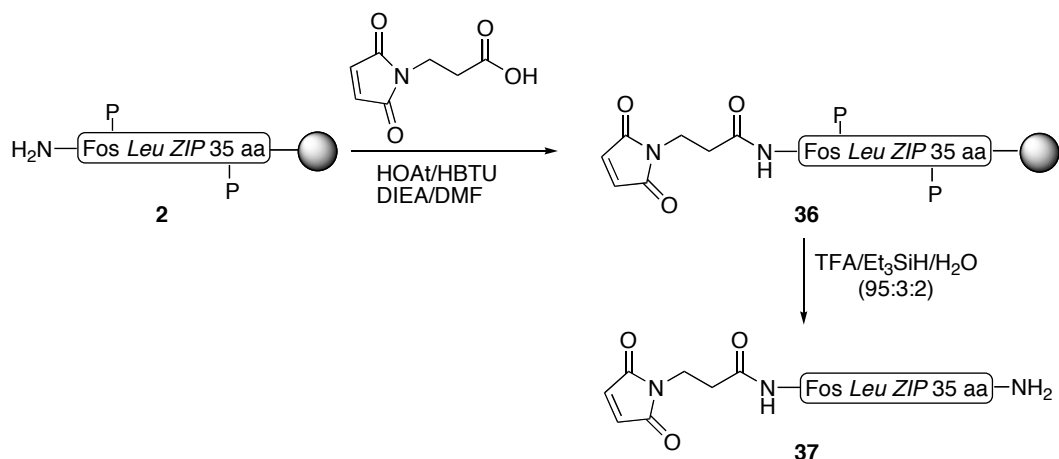
En el cromatograma de HPLC se puede observar la aparición de un nuevo pico y la desaparición del oligonucleótido **8** al cabo de 30 min. Se purificó el compuesto que eluye a 16.1 min, obteniéndose un producto que se identificó como el híbrido esperado **35** (48% de rendimiento) por espectrometría de MALDI-TOF:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{315}H_{474}N_{93}O_{148}P_{13}S_1$  8365.4, encontrada 8355.1.



**Figura 57.** Cromatograma de HPLC de la conjugación después de 5 min (a) y 30 min (b).

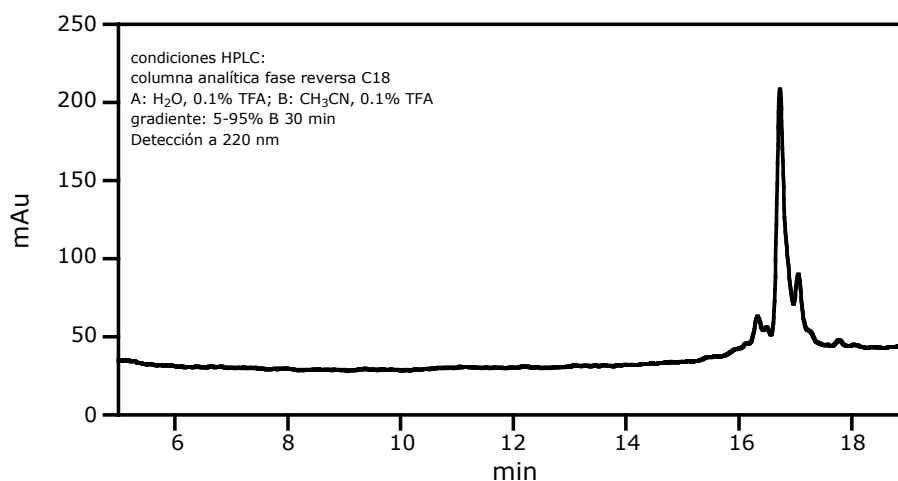
La reacción de conjugación en las mismas condiciones, pero llevándose a cabo con 1 equivalente del péptido **5** en lugar de 3 equivalentes, también dio lugar a la formación del híbrido, pero no a la desaparición total del oligonucleótido **8**.

Por otra parte, también se preparó un análogo del péptido de 35 aminoácidos con un grupo maleimido unido al péptido a través de un etilo en lugar de un grupo fenilo, con el fin de sintetizar un conjugado oligonucleótido-péptido con un conector de mayor flexibilidad. Para ello, una parte de la peptidilresina **2** se mezcló en DMF/DIEA con N-maleoílo-β-alanina previamente activado con HBTU/HOAt. La desprotección del péptido y separación de la resina se realizó por tratamiento con TFA/Et<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O (95:3:2, 300 μL/10 mg de resina, 2 horas).

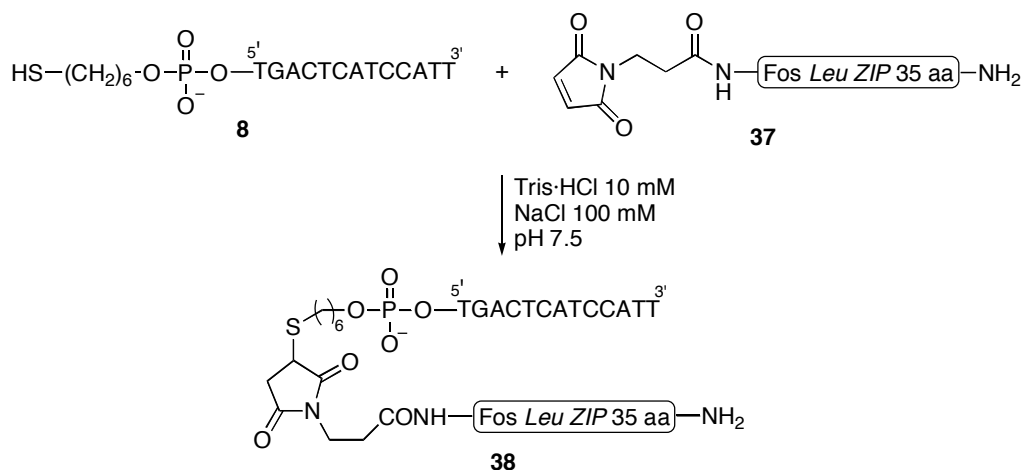


Esquema 25

El residuo obtenido se purificó por cromatografía de HPLC en fase reversa (Figura 58) y se identificó como el péptido buscado **37** (~12% de rendimiento) por espectrometría de MALDI-TOF: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>179</sub>H<sub>300</sub>N<sub>51</sub>O<sub>67</sub> 4238.7, encontrada 4240.4.

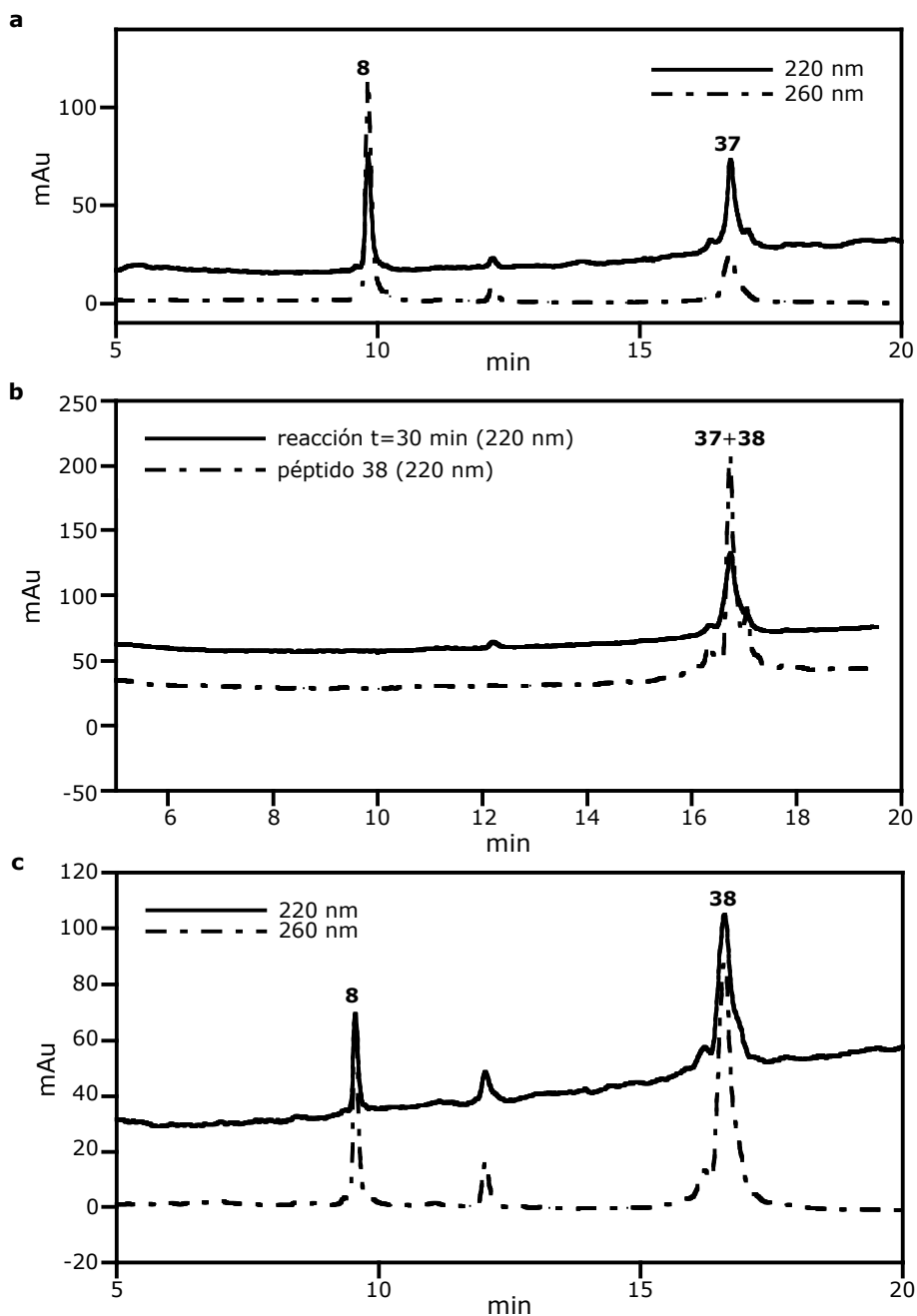
Figura 58. Cromatograma de HPLC del crudo de desprotección de **37**.

A continuación se llevó a cabo la reacción de conjugación del péptido obtenido con el oligonucleótido-tiol. Para ello se hizo reaccionar el oligonucleótido **8** purificado (concentración 50 μM) con el péptido maleimido **37** purificado (concentración 150 μM) en tampón Tris·HCl 10 mM y NaCl 100 mM a pH 7.5.



Esquema 26

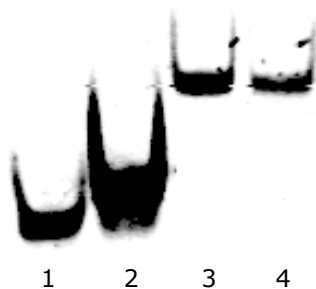
Como se puede observar en el cromatograma de HPLC (Figura 59), después de 30 min de reacción, el oligonucleótido de partida desaparece completamente, pero el híbrido **38** eluye con el mismo tiempo de retención que el péptido **37**. No se consiguieron separar ambos compuestos con otras condiciones de HPLC, por lo que se añadió oligonucleótido **8** en exceso hasta que dejó de consumirse (1.5 equiv más).



**Figura 59.** Cromatogramas de HPLC de la reacción después de 5 min (a), después de 30 min (b) y después de añadir 1.5 eq más de oligonucleótido **8** (c). Condiciones de HPLC: columna X-Terra, 0→50% B en 20 min [A: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (95:5), 0.1 M TEAA; B: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (70:30), 0.1 M TEAA].

El compuesto que eluye a 16.6 min se purificó por HPLC, presumiendo que se había consumido todo el péptido de partida. Dicho compuesto se identificó como el híbrido esperado **38** (~65% de rendimiento) por espectrometría de MALDI-TOF: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>311</sub>H<sub>374</sub>N<sub>93</sub>O<sub>148</sub>P<sub>13</sub>S<sub>1</sub> 8317.7, encontrada 8320.9.

En la siguiente figura se muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida en el que se observan las bandas correspondientes a los conjugados sintetizados **35** y **38** en comparación con el oligonucleótido de partida.

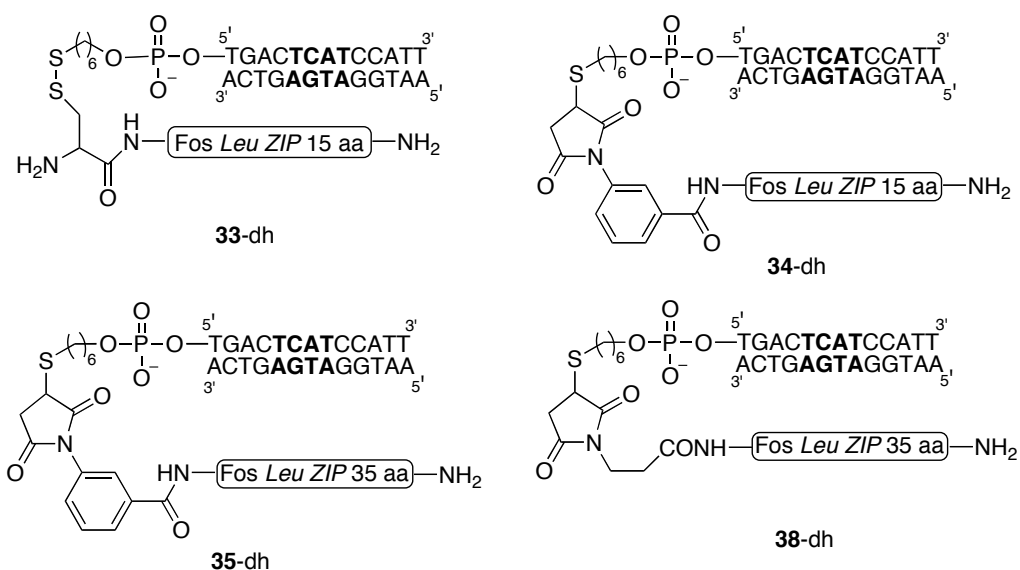


**Figura 60.** PAGE 15%. Calle 1: **8** (~400 nM), calle 2: **8-dh** (~200 nM), calle 3: **35** (~500 nM), calle 4: **39** (~500 nM).

Así pues, todos los datos discutidos en este apartado indican que en las nuevas condiciones de reacción es posible obtener diferentes tipos de conjugados en buenos rendimientos.

### 1.5. Preparación de conjugados oligonucleótido-péptido hibridados a la cadena oligonucleotídica complementaria

A continuación se procedió a la obtención de los conjugados de doble cadena, necesarios para realizar los estudios de interacción con la proteína Jun. En concreto, se abordó la preparación de los híbridos oligonucleótido-péptido de doble cadena indicados en la siguiente figura.



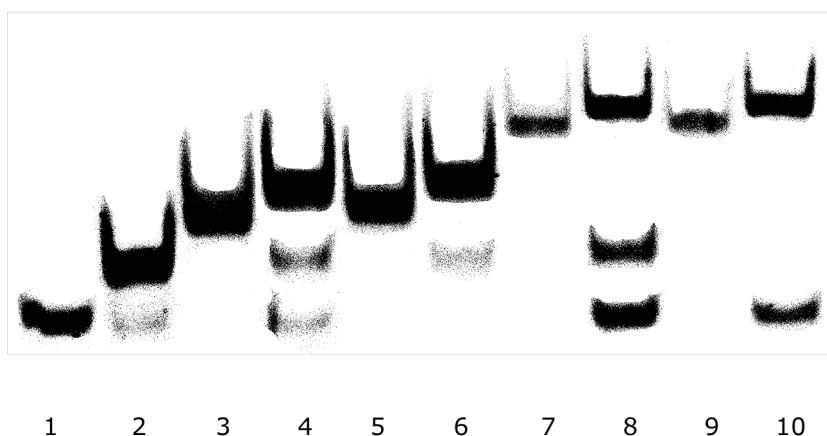
**Figura 61.** Conjugados oligonucleótido-péptido de doble cadena que se desea obtener. Se indica en negrita la secuencia consenso de unión a Jun.

Para ello se mezclaron cantidades equimoleculares de los conjugados de cadena sencilla con su oligonucleótido complementario en tampón fosfato 10 mM conteniendo NaCl 100 mM a pH 7.5. Las disoluciones resultantes se calentaron a 90 °C durante 10 min y se dejaron enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

El análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de las mezclas resultantes corroboró la formación de los híbridos de doble hebra deseados (Figura 62). Como se mostró anteriormente (página 81), el conjugado **34** (calle 3) migra más lentamente que el oligonucleótido de doble cadena resultado de hibridar el oligonucleótido **8** con su complementario (calles 1 y 2). La hibridación del conjugado **34** con ese ADN complementario da lugar a una banda que migra algo más lentamente y que debe corresponder al híbrido de doble cadena **34-dh** (calle 4). La observación de una banda adicional similar a la banda de la calle 2 se puede explicar por la formación secundaria del oligonucleótido de doble cadena sin el péptido, probablemente debido a una reacción de retro-Michael que ocurre durante el proceso de calentamiento.

Con el conjugado **33** el resultado es similar (calles 5 y 6) y también se observa la formación de una pequeña proporción de una banda adicional correspondiente al oligonucleótido de doble cadena, que se puede explicar en base a una rotura parcial del enlace disulfuro.

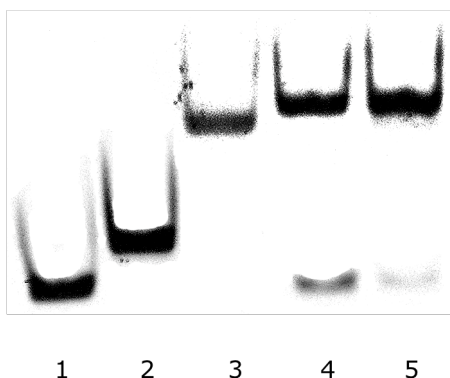
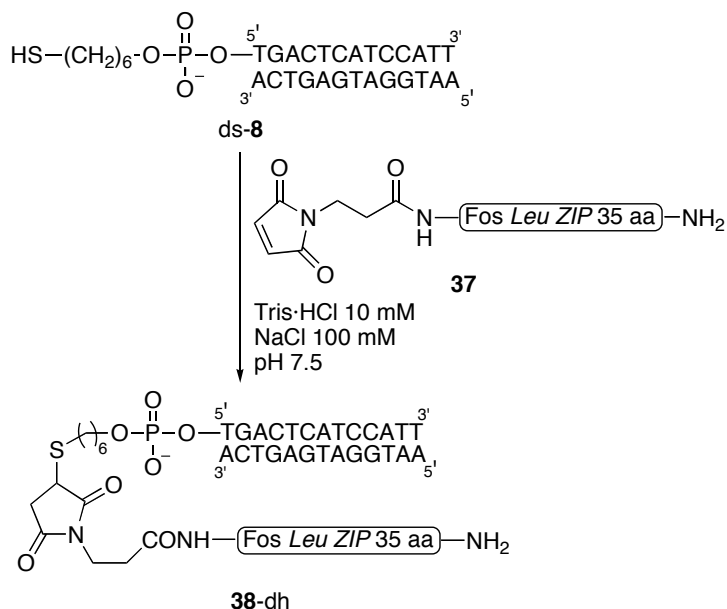
Como cabía esperar, los conjugados **35** y **38**, que contienen el péptido de 35 aa, migran más lentamente que los anteriores, debido a la mayor longitud de la cadena peptídica (calles 7 y 9). Los procesos de hibridación con la cadena complementaria dieron lugar a bandas superiores, que deben corresponder a los híbridos de doble cadena deseados (calles 8 y 10). En el caso del sistema con el maleimido aromático (calle 8) observamos de nuevo la aparición de una banda adicional que migra igual que el oligonucleótido de 13 bases de cadena doble. Sin embargo, esta reacción lateral no se produce (se observó que se producía después de un período de tiempo más largo) en el caso del híbrido con el grupo maleimido no aromático (calle 10). Este resultado es coherente con el hecho de que este conjugado (**38**) es más estable y probablemente experimenta con mayor dificultad la reacción de retroMichael.



**Figura 62.** PAGE 15%. Calle 1: **8** (~400 nM), calle 2: **8-dh** (~200 nM), calle 3: **34** (~500 nM), calle 4: **34-dh** (~200 nM), calle 5: **33** (~500 nM), calle 6: **33-dh** (~200 nM), calle 7: **35** (~500 nM), calle 8: **35-dh** (~200 nM), calle 9: **38** (~500 nM), calle 10: **38-dh** (~200 nM).

A continuación, decidimos investigar la posibilidad de preparar los híbridos oligonucleótido-péptido de doble cadena invirtiendo el proceso de ensamblaje, es decir, llevando a cabo la hibridación de las cadenas oligonucleotídicas antes de la conjugación con el péptido. Para realizar el ensayo se mezcló el oligonucleótido **8** unido a su complementario

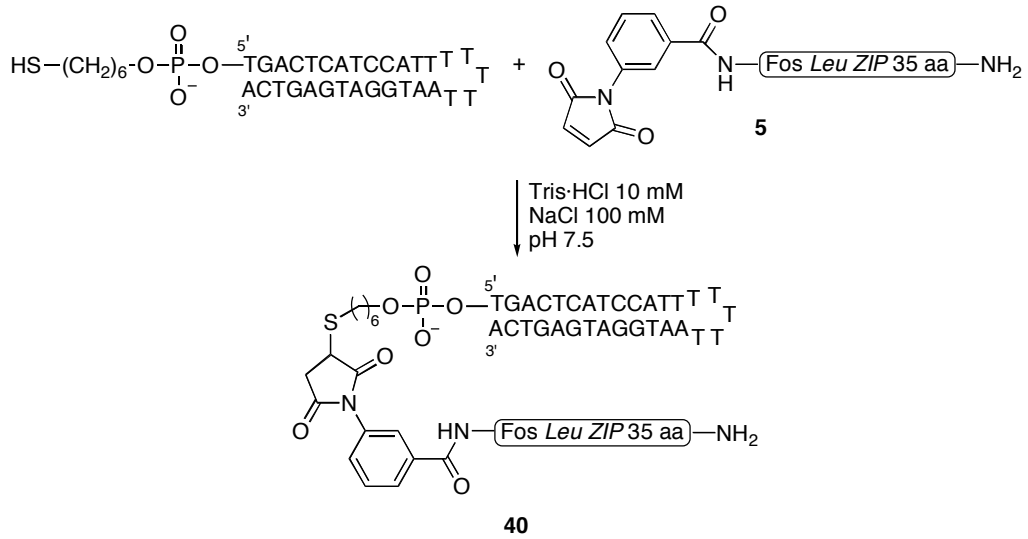
(**8**-dh, concentración 25  $\mu\text{M}$ ) con 3 equiv del péptido maleimido **37** en un tampón conteniendo Tris·HCl 10 mM y NaCl 100 mM a pH 7.5 (Esquema 27). En la electroforesis puede observarse que la reacción da lugar al conjugado esperado **38**-dh (Figura 63) de una forma limpia. Este resultado indica que la metodología, que tiene escasos precedentes,<sup>131</sup> puede ser adecuada para preparar este tipo de conjugados entre ADN de doble hebra y derivados peptídicos.



**Figura 63.** PAGE 15%. Calle 1: **8** (~200 nM), calle 2: **8**-dh (~100 nM), calle 3: **38** (~200 nM), calle 4: **38**-dh (~100 nM), calle 5: crudo de reacción para la obtención de **38**-dh (~200 nM) siguiendo el proceso indicado en el Esquema 27.

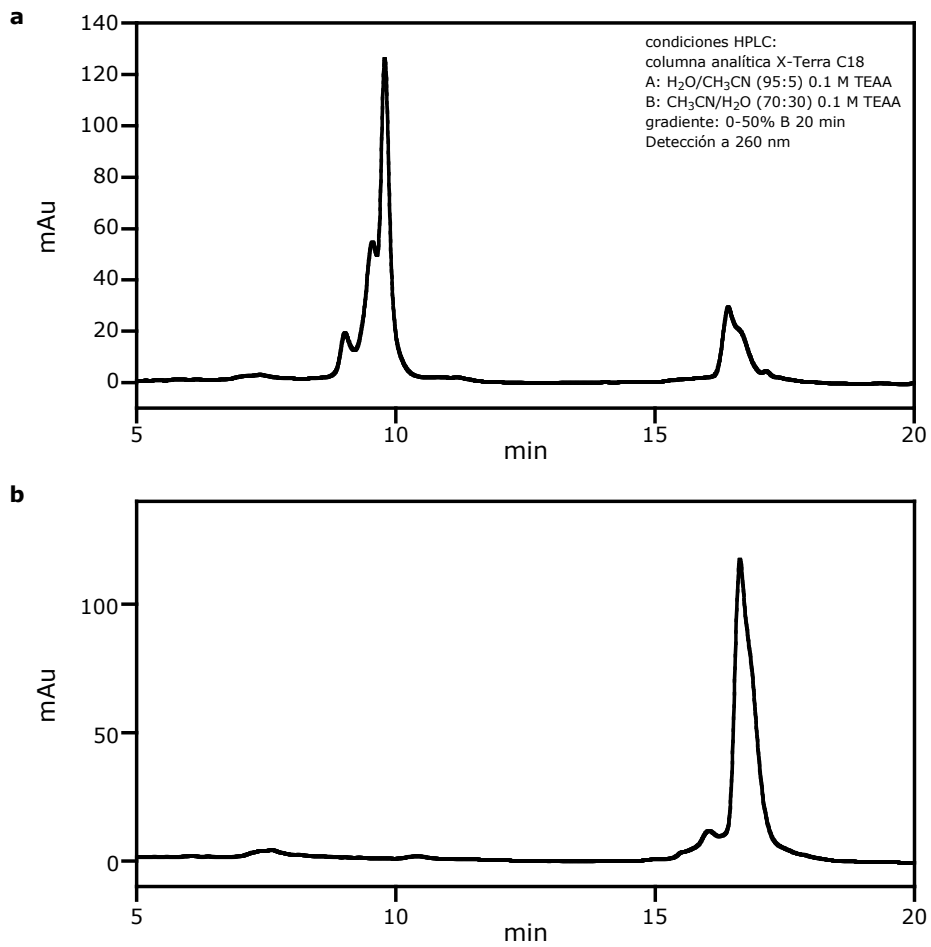
Asimismo, se llevó a cabo la reacción de conjugación entre el péptido maleimido **5** (concentración 150  $\mu\text{M}$ ) y un oligonucleótido en horquilla (concentración 50  $\mu\text{M}$ ), tal y como se indica en el Esquema 28:

<sup>131</sup> a) Se ha publicado la síntesis de un conjugado entre un oligonucleótido en horquilla y un dodecapéptido: Zanta, M. A.; Belguise-Valladier, P.; Behr, J. P. "Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 91. b) Véase también Stanojevic y Verdine, nota 69.



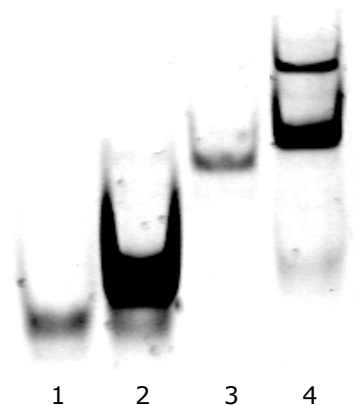
Esquema 28

En la siguiente figura se muestran los cromatogramas de HPLC correspondientes al transcurso de la reacción.



**Figura 64.** Cromatograma de HPLC después de 5 min (a) y 60 min (b) de reacción.

El compuesto que eluye a 16.6 min y que debe corresponder al híbrido **40** se purificó y en el análisis por electroforesis de poliacrilamida puede observarse una banda (calle 4) que migra más lentamente que el híbrido de cadena sencilla (calle 3) y que debe corresponder al conjugado **40**. Sin embargo, se observa una banda secundaria de migración más lenta y que quizás corresponda a un compuesto resultado de la hibridación intermolecular de dos moléculas de **40**.



**Figura 65.** PAGE al 15%: Calle 1: **8** (~500 nM), calle 2: **8**-dh (~200 nM), calle 3: **35** (~500 nM), calle 4: **40** (~200 nM).

### 1.6. Ensayos de interacción con Jun de los híbridos sintéticos preparados

Una vez sintetizados los conjugados oligonucleótido-péptido con la doble cadena de ADN, nos dispusimos a comprobar si eran capaces de llevar a cabo el reconocimiento de la región bZIP de la proteína c-Jun. La proteína utilizada en los ensayos se preparó por métodos recombinantes en los laboratorios del Prof. Lin Chen (University of Colorado at Boulder), y contiene la secuencia con la que se obtuvo la estructura cristalográfica de su complejo con el ADN en cooperación con Fos.<sup>132</sup> La secuencia es la siguiente:



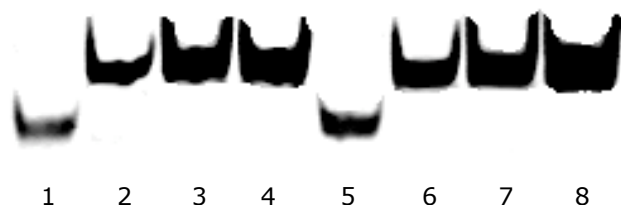
**Figura 66.** Secuencia del dominio bZIP de c-Jun (obtenida con métodos recombinantes) con la que se llevaron a cabo los ensayos.

Está bien establecido que una de las técnicas más útiles para obtener información acerca de la interacción entre proteínas y ADN consiste en realizar ensayos de desplazamiento en electroforesis en gel (EMSA, por sus siglas en inglés). El EMSA se basa en la observación de que en procesos de electroforesis en condiciones no desnaturizantes, los complejos proteína:ADN migran más lentamente que las moléculas de ADN solo, en geles de poliacrilamida o agarosa.

En nuestro caso, los estudios se llevaron a cabo a 4 °C utilizando como tampón de incubación 38 mM Tris·HCl (pH 7.5), 90 mM KCl, 1.8 mM MgCl<sub>2</sub> y 1.8 mM de AEDT. Tal como

<sup>132</sup> Glover y Harrison, *vid.* nota 80.

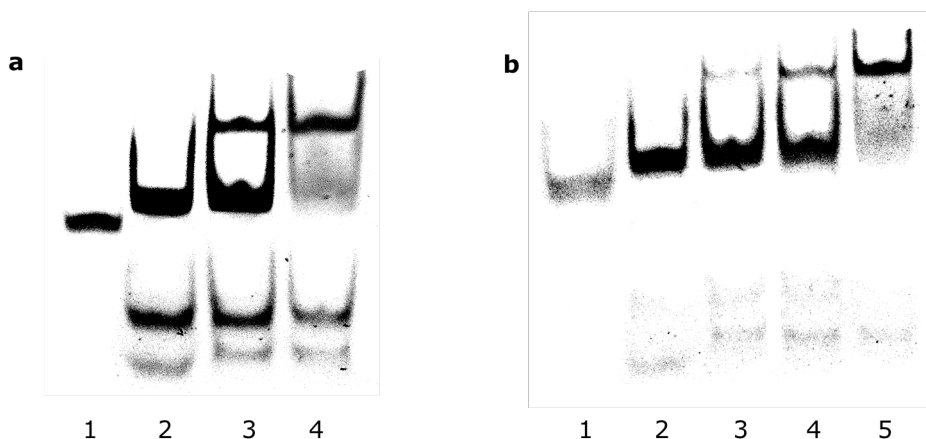
se puede observar en la Figura 67, la incubación con cantidades crecientes de c-Jun de los conjugados de doble cadena de 15 aminoácidos **33**-dh (calles 2-4) y **34**-dh (calles 6-8) no da lugar a cambios en la migración de las bandas, por lo que se puede deducir que, desafortunadamente, en estos casos no se produce interacción con la proteína.



**Figura 67.** PAGE 15%. Calle 1: **33** (~500 nM); calles 2-4: **33**-dh (~200 nM) en presencia de concentraciones crecientes de c-Jun (0, 200, 500 nM); calle 5: **34** (~500 nM); calles 6-8: **34**-dh (~200 nM) en presencia de concentraciones crecientes de c-Jun (0, 200, 500 nM).

Como cabía esperar, tampoco se observó que hubiese un reconocimiento de la proteína c-Jun cuando la incubación con estos conjugados se realizó a temperatura ambiente.

Sin embargo, cuando la incubación con la proteína c-Jun se llevó a cabo con los conjugados de doble cadena de 35 aminoácidos **35**-dh y **38**-dh a 4 °C, sí se observó en el gel de electroforesis (Figura 68) la aparición de bandas más retardadas que sin duda corresponden a la formación de un complejo con Jun.

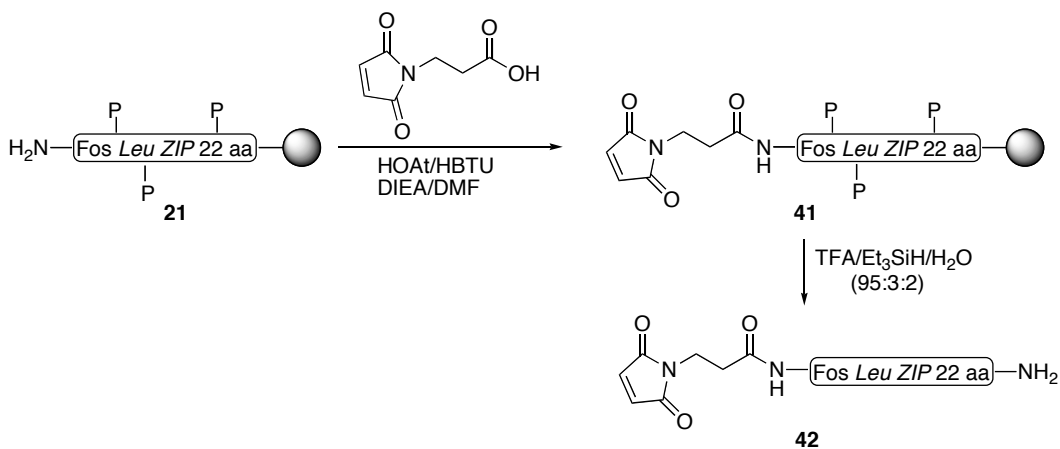


**Figura 68.** PAGE 15%. a) Calle 1: **35** (~500 nM), calles 2-4: **35**-dh (~200 nM) en presencia de concentraciones crecientes de c-Jun (0, 200, 500 nM). b) Calle 1: **38** (~400 nM), calles 2-5: **38**-dh (~100 nM) en presencia de concentraciones crecientes de c-Jun (0, 100, 200, 500 nM).

Dado que el híbrido **35**-dh –que tiene el grupo maleimidobenzoílo como conector entre la parte peptídica y la oligonucleotídica-, es más lábil y se descompone parcialmente (véase página 87) decidimos llevar a cabo los estudios siguientes con el híbrido **38**-dh, que aparentemente es más estable.

También realizamos algunos ensayos para comprobar la posibilidad de utilizar híbridos con cadenas peptídicas intermedias en tamaño entre la de 35 aa y la de 15 aa. En concreto, decidimos preparar un híbrido con una parte peptídica de 22 aminoácidos. Para ello, se acopló en el extremo N-terminal de la resina previamente sintetizada **21** (página 70) un

grupo maleimido unido a un etilo y después se desprotegió por tratamiento del soporte con la mezcla TFA/Et<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O (95:3:2, 300 μL/10 mg de resina, 2 horas).



Esquema 29

El cromatograma de HPLC del residuo obtenido confirmó la presencia de un producto mayoritario cuyo análisis por espectrometría de MALDI-TOF confirmó la identidad del producto como el péptido esperado **42**: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>112</sub>H<sub>184</sub>N<sub>33</sub>O<sub>45</sub> 2712.9, encontrada 2713.1.

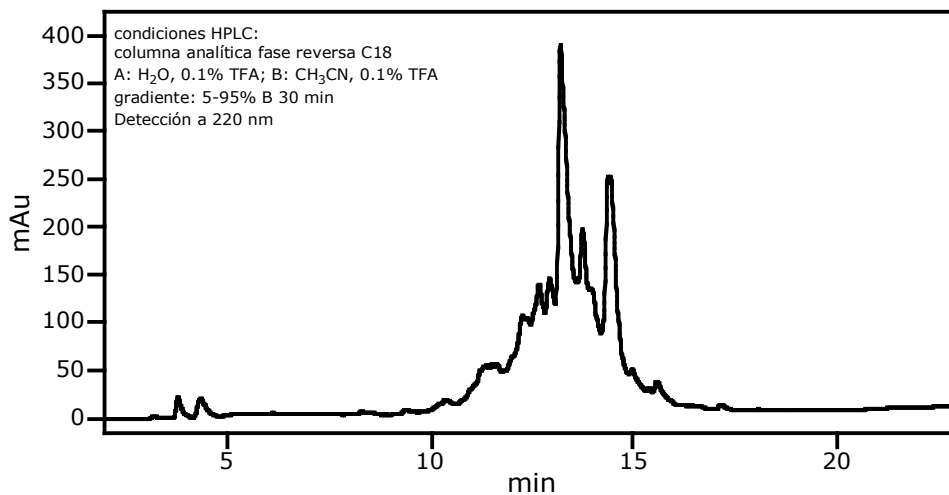
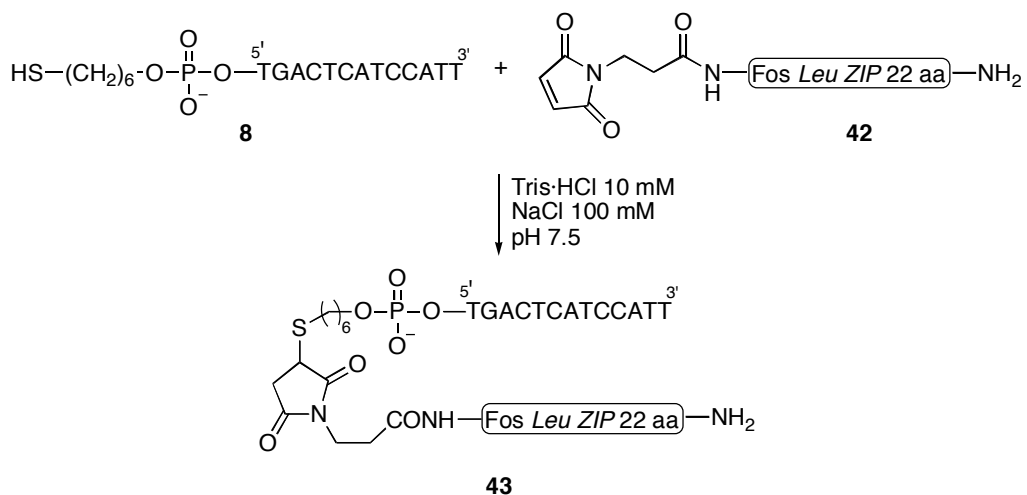


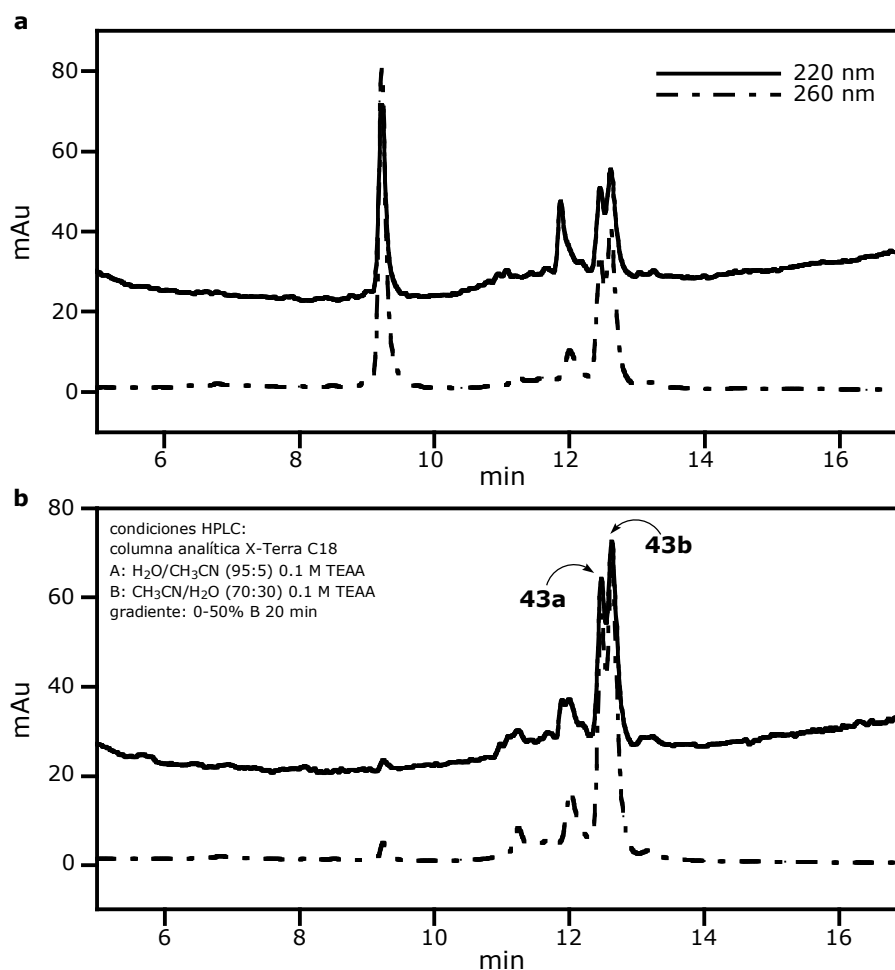
Figura 69. Cromatograma de HPLC del crudo de desprotección para la obtención de **42**.

La conjugación entre el oligonucleótido tior **8** y el péptido **42** purificado se llevó a cabo en las condiciones estándar: tampón Tris·HCl 10 mM y NaCl 100 mM a pH 7.5.



Esquema 30

En la Figura 70 se muestran los cromatogramas correspondientes al transcurso de la reacción.



**Figura 70.** Cromatogramas de HPLC correspondientes al transcurso de la reacción después de 5 min (a) y 30 min (b).

Curiosamente, se observa la aparición de un doble pico con un tiempo de retención mayor que el del péptido, cuya absorbancia aumenta tras la desaparición del oligonucleótido de partida y cuyo espectro de UV (Figura 71) es característico de un conjugado oligonucleótido-péptido. Los compuestos que eluyen a 12.5 min y a 12.6 min se purificaron separadamente y se identificaron por espectrometría de MALDI-TOF como los híbridos **43a** ( $[MH]^+$  calculada para  $C_{244}H_{359}N_{75}O_{126}P_{13}S_1$  6793.8, encontrada 6791.2, 14% de rendimiento) y **43b** ( $[MH]^+$  calculada para  $C_{244}H_{359}N_{75}O_{126}P_{13}S_1$  6793.8, encontrada 6792.2, 29% de rendimiento).

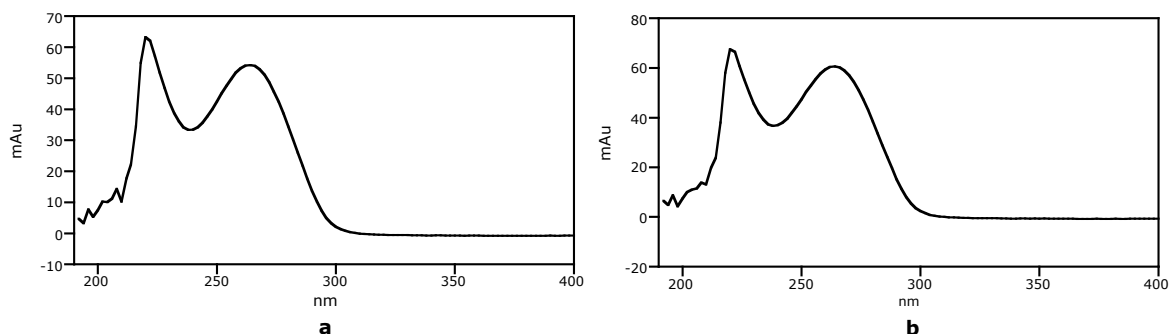


Figura 71. Espectro de UV del compuesto que eluye a 12.5 min (a) y a 12.6 min (b).

Tras llevar a cabo la hibridación con el oligonucleótido complementario de los conjugados **43a** y **43b**, se realizaron los experimentos de EMSA con los híbridos de doble cadena obtenidos y se comprobó que no existía interacción con Jun. En la siguiente figura se muestran los híbridos de cadena sencilla y sus correspondientes híbridos de cadena doble incubados con cantidades crecientes de la proteína.

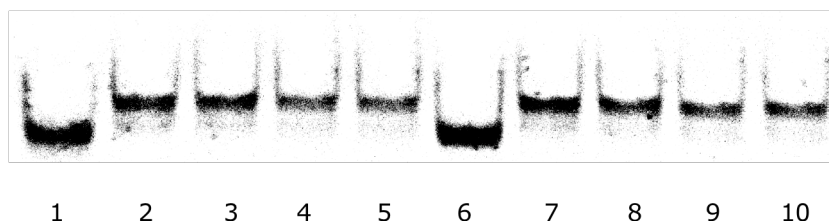
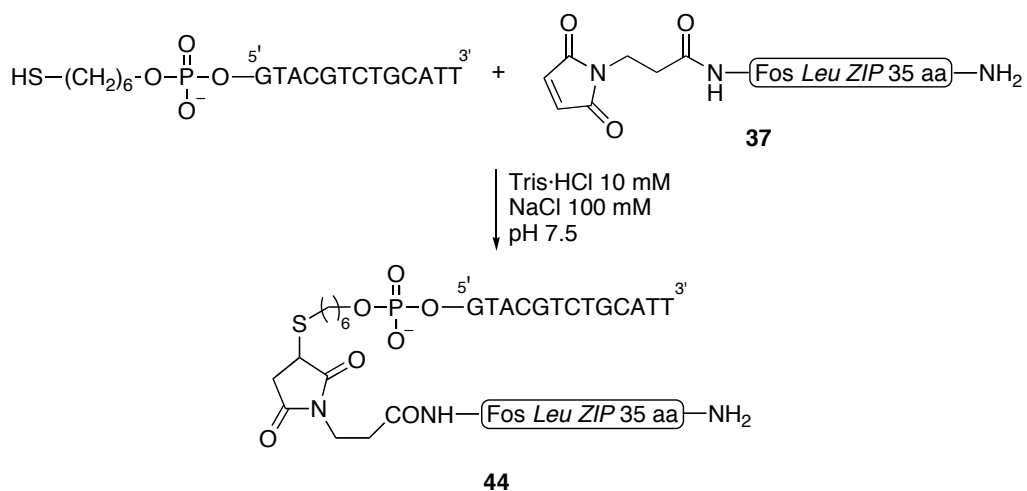


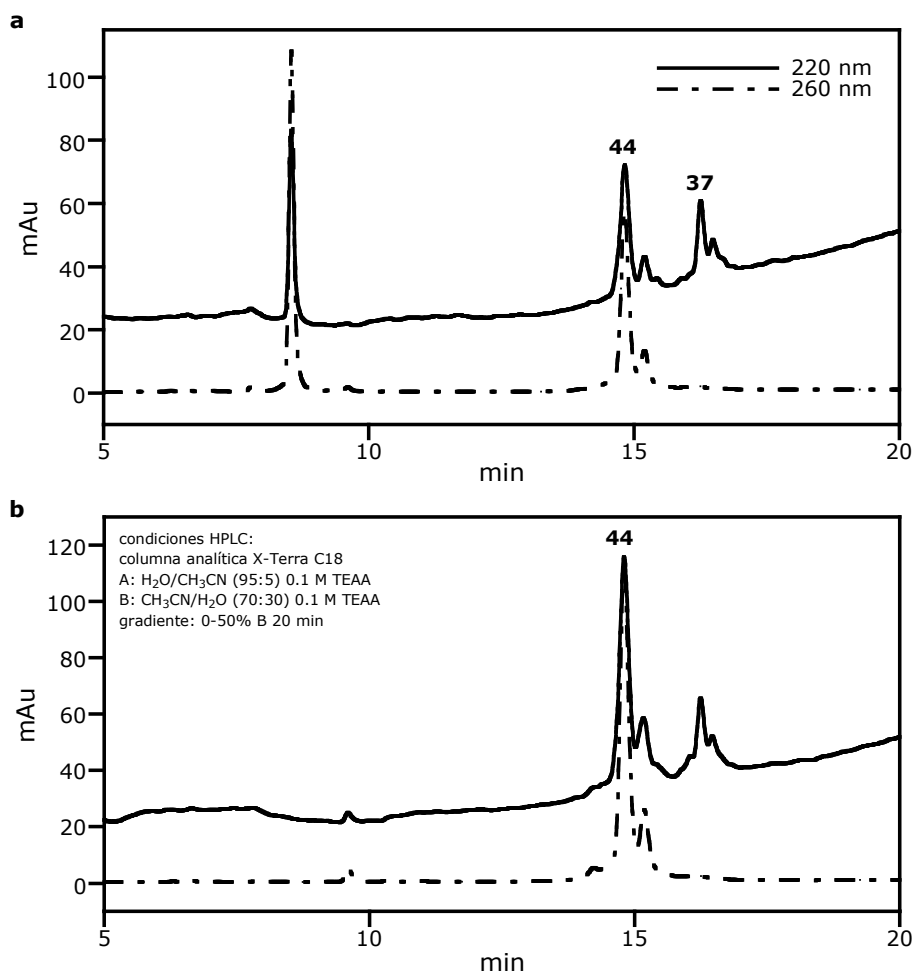
Figura 72. PAGE 15%. Calle 1: **43a** (~400 nM), calles 2-5: **43a**-dh (~100 nM) en presencia de concentraciones crecientes de c-Jun (0, 100, 200, 500 nM), calle 6: **43b** (~400 nM), calles 7-10: **43b**-dh (~100 nM) en presencia de concentraciones crecientes de c-Jun (0, 100, 200, 500 nM).

Así pues, de los híbridos ensayados son los que tienen 35 aminoácidos (**35**-dh y **38**-dh) los únicos que por el momento han dado lugar a la formación de complejos con Jun. Se procedió entonces a estudiar con más detalle esta complejación utilizando distintos sistemas control. Primero se preparó un conjugado análogo a **38**-dh, pero cuya parte oligonucleotídica no contuviese la secuencia diana de reconocimiento de Jun. Para ello, se llevó a cabo la conjugación del oligonucleótido tiol indicado en el Esquema 31 (cuya secuencia se eligió arbitrariamente) y el péptido **37** en las condiciones habituales.



Esquema 31

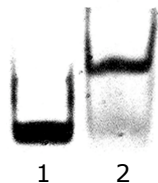
Como se puede observar en el cromatograma de HPLC, después de 30 min de reacción, el oligonucleótido de partida desaparece completamente.



**Figura 73.** Cromatogramas de HPLC correspondientes al transcurso de la reacción para la obtención de **44** después de 5 min (a) y 10 min (b).

El compuesto que eluye a 14.8 min se purificó y se identificó como el híbrido esperado **44** por espectrometría de MALDI-TOF:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{312}H_{475}N_{95}O_{149}P_{13}S_1$  8375.6, encontrada 8365.7 (38% de rendimiento).

El conjugado **44** se hibridó con su oligonucleótido complementario en las condiciones previamente descritas, y con el conjugado de doble cadena resultante se realizó el ensayo de interacción con Jun. En contra de lo que esperábamos y como se puede deducir del experimento EMSA realizado (Figura 74), observamos la aparición de una banda con un retardo similar al que veíamos en el caso del híbrido **38**-dh (que tenía la secuencia consenso de unión de Jun).



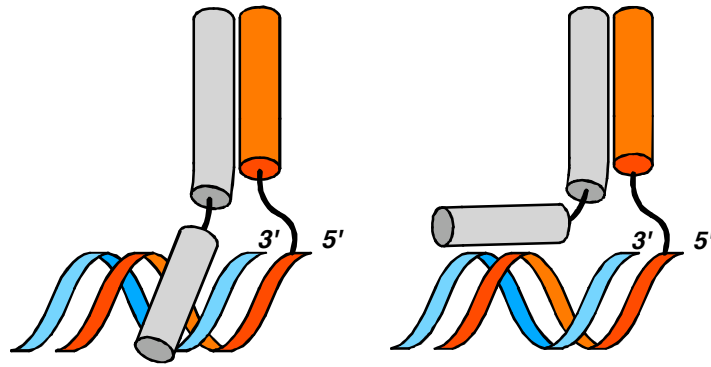
**Figura 74.** PAGE 15%. Calle 1: **44**-dh (~100 nM), calles 2: **44**-dh (~100 nM) y c-Jun (~500 nM).

La observación de la formación de un complejo con el híbrido que contiene un ADN de secuencia aleatoria puede explicarse asumiendo que la región básica de Jun está contactando electrostáticamente con la superficie del ADN, generando una fuerza atractiva que ayuda a estabilizar el complejo. Esto no resulta tan sorprendente si se tienen en cuenta estudios que demuestran que las proteínas bZIP diméricas pueden reconocer con una afinidad relativamente alta secuencias consenso con una sola mitad de la secuencia diana, lo que indica que una de las regiones básicas interacciona con el ADN de manera inespecífica.<sup>133</sup>

Si bien habría que cuantificar la afinidad relativa de los híbridos **44**-dh y **38**-dh por Jun, los datos de electroforesis realizados sugieren que éstas no son muy diferentes, quizás un poco mayor en el caso del híbrido **38**-dh. Esto es indicativo de que quizás la interacción de los híbridos con Jun también conlleva un reconocimiento entre la región básica y la cadena fosfatídica (Figura 75b), en lugar de una inserción en el surco mayor de dicha región (Figura 75a), aunque para que esta conclusión sea definitiva serán necesarios nuevos estudios. Es probable que el diseño no esté apropiadamente ajustado como para que tal región prefiera insertarse en el surco mayor.

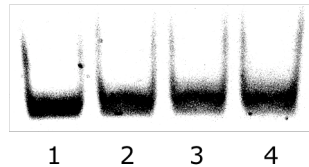
---

<sup>133</sup> a) Hollenbeck, J. J.; Oakley, M. G. "GCN4 binds with high affinity to DNA sequences containing a single consensus half site" *Biochemistry* **2000**, *39*, 6380. b) Chan, I.-S.; Fedorova, A. V.; Shin, J. A. "The GCN4 bZIP targets noncognate gene regulatory sequences: quantitative investigation of binding at full and half sites" *Biochemistry* **2007**, *46*, 1663.



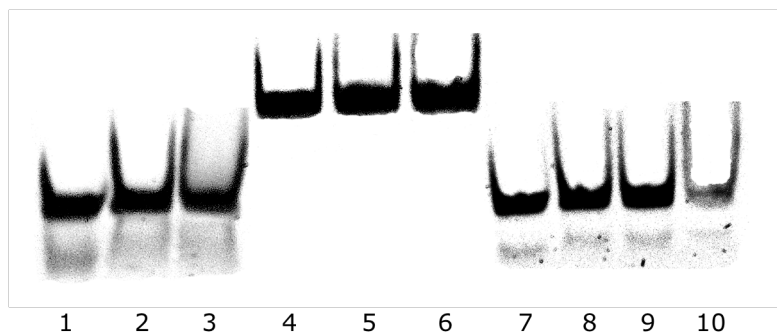
**Figura 75.** Representación esquemática de la interacción específica (a) e inespecífica (b) del complejo formado por Jun y el conjugado oligonucleótido-péptido.

Particularmente interesante resultó la comprobación de que cuando se llevan a cabo los experimentos de interacción de c-Jun con el conjugado **38** -de cadena sencilla- no se observan bandas indicativas de la formación de complejo (Figura 76). Este dato confirma que **es necesario un ADN de doble hebra para que tenga lugar la interacción**. Si, como parece, la interacción ocurre con la cadena fosfatídica -y no con la zona expuesta por las bases en el surco mayor-, el hecho de que se produzca interacción cuando el ADN está como doble hebra y no como simple podría explicarse por una mejor distribución y preorientación de los grupos fosfato en el primer caso, como consecuencia de la mayor rigidez de la estructura helicoidal.



**Figura 76.** PAGE 15%. Calle 1-5: **38** (~100 nM) en presencia de concentraciones crecientes de c-Jun (0, 100, 200, 500 nM).

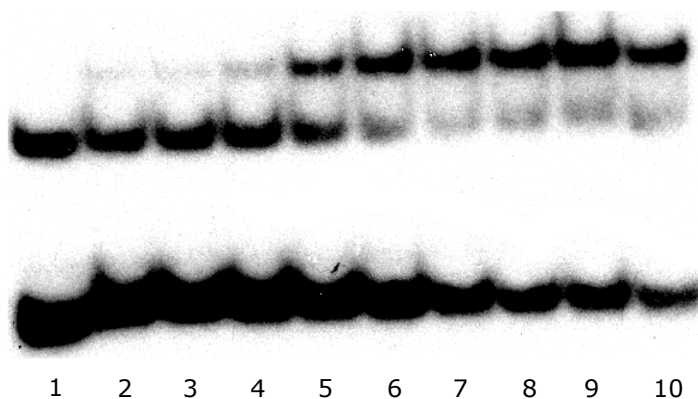
También llevamos a cabo otros experimentos control para evaluar las relaciones estructura-interacción del híbrido **38**-dh. Uno de estos ensayos indicó que si se elimina la parte peptídica del híbrido, el oligonucleótido de doble cadena resultante no es capaz de secuestrar a Jun (Figura 77, calles 1-3). Por otro lado y como cabría esperar, el reconocimiento es selectivo para c-Jun, ya que no observamos bandas de complejación cuando el híbrido **38**-dh se incubó, por ejemplo, en presencia de concentraciones crecientes de c-Fos (calles 4-6). Tampoco se observó la formación de complejos cuando se adicionó c-Jun a una mezcla 1:1 del oligonucleótido de doble cadena (resultado de anelar **8** con su oligonucleótido complementario) y el péptido de 35 aminoácidos derivado de la cremallera de leucinas de c-Fos **3** (calles 7-10).



**Figura 77.** PAGE 15%. Calles 1-3: ds-**8** (~100 nM) en presencia de concentraciones crecientes de c-Jun (0, 200, 500 nM); calles 4-6: **38**-dh (~200 nM) en presencia de concentraciones crecientes de c-Fos (0, 200, 500 nM); calles 7-9: ds-**8** (~100 nM) y **3** (~100 nM) en presencia de concentraciones crecientes de c-Jun (0, 100, 200, 500 nM).

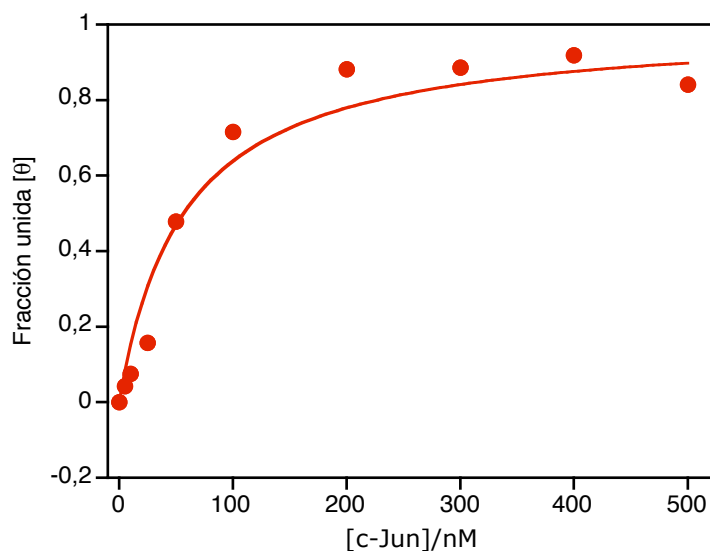
Se puede concluir, por tanto, que **el conjugado diseñado es capaz de capturar a la proteína Jun de forma selectiva y que es necesaria, para que se produzca el reconocimiento, la presencia tanto de la parte peptídica de cremallera de leucinas como de la parte oligonucleotídica en forma de doble cadena.**

A continuación, se realizaron estudios de valoración para cuantificar la afinidad de la interacción entre **38**-dh y c-Jun. Con el fin de tener una sensibilidad de detección apropiada para cuantificar las bandas que se observan en la electroforesis, estos ensayos se realizaron marcando con  $^{32}\text{P}$  el extremo 5' el oligonucleótido complementario al conjugado de cadena sencilla **38** antes de realizar la hibridación con la cadena complementaria. En la siguiente figura se muestra una valoración detallada de la interacción del híbrido de doble cadena **38**-dh marcado con  $^{32}\text{P}$  radiactivo y la proteína c-Jun. La incubación se realizó a 4 °C con cantidades crecientes de la proteína.



**Figura 78.** PAGE 15%. Calles 1-10:  $^{32}\text{P}$ -**38**-dh (~90 pM) en presencia de concentraciones crecientes de Jun (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 nM).

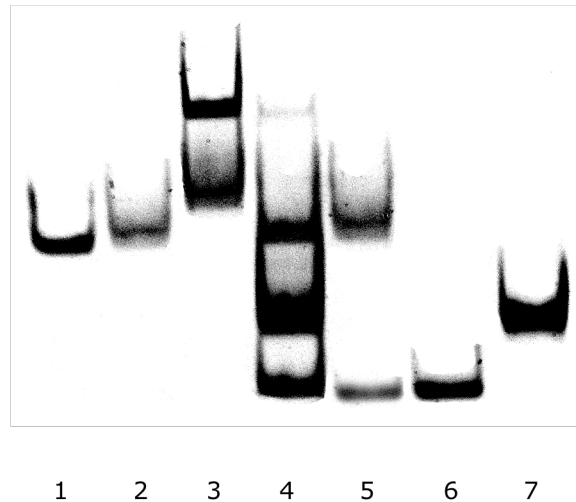
La cuantificación de la intensidad de las bandas permitió realizar un ajuste a una curva para una interacción 1:1 y de ahí obtener una  $K_d = 56 \pm 9$  nM, indicativa de una interacción fuerte.



**Figura 79.** Valoración por EMSA de **38-dh**: representación gráfica de los datos ajustados a la ecuación  $\theta = P_T / (P_T + K_d)$ , donde  $P_T$  es la concentración total de c-Jun y  $K_d$  es la constante de disociación.

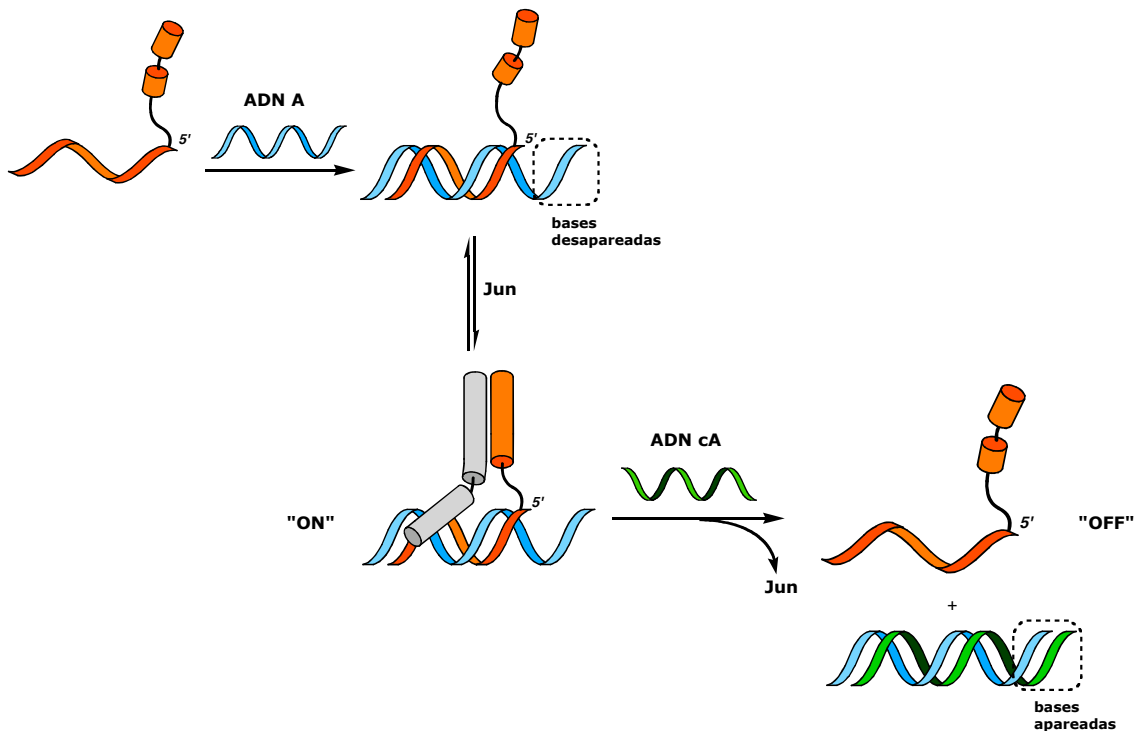
Tomando como base la mayor capacidad de unión a Jun del híbrido de cadena doble **38-dh** con respecto al precursor de cadena sencilla **38**, contemplamos la posibilidad de utilizar oligonucleótidos externos de cadena sencilla con secuencias complementarias a la del conjugado **38** como agentes capaces de activar *in situ* la capacidad que tiene el sistema para bloquear Jun.

Como se muestra en el EMSA de la Figura 80, la adición de un oligonucleótido de 18 bases (**A** = 5'-CGCGCAATGGATGAGTCA-3'), que en su secuencia contiene la complementaria a la existente en el híbrido **38**, a una mezcla 1:1 de c-Jun y del híbrido **38** promovió la formación del complejo deseado (calle 3). Como cabía esperar, cuando el oligonucleótido que se añade no posee la secuencia complementaria (**B** = 5'-CGCGCATCTTAGCTGCGT-3'), dicha complejación no tiene lugar (calle 5). Además, la presencia de una extensión de 5 bases en el caso del oligonucleótido **A** (subrayadas en la leyenda de la Figura 80) permitió desactivar el complejo al añadir un ligero exceso de un oligonucleótido complementario adecuado (**cA**) (calle 4).



**Figura 80.** Page 15%. Calle 1: **38** (~100 nM); calle 2: **38** (~100 nM), Jun (~500 nM); calle 3: misma mezcla que en calle 2 más oligonucleótido **A** 5'-CGCGCAATGGATGAGTCA-3' (~100 nM); calle 4: misma mezcla que en calle 3 más oligonucleótido **cA** 5'-TGACTCATCCATTGCGCG-3' (~200 nM); calle 5: **38** (~100 nM), Jun (~500 nM), oligonucleótido **B** 5'-CGCGCATCTTAGCTGCGT-3' (~100 nM); calle 6 (control): oligonucleótido **A** (~200 nM); calle 7: oligonucleótido **A** + oligonucleótido **cA** (~100 nM).

Estos experimentos ponen de manifiesto el potencial de esta estrategia para lograr un **control temporal externo (ON-OFF)** sobre la capacidad de unión de estos híbridos al factor de transcripción Jun mediante oligonucleótidos convenientemente diseñados.

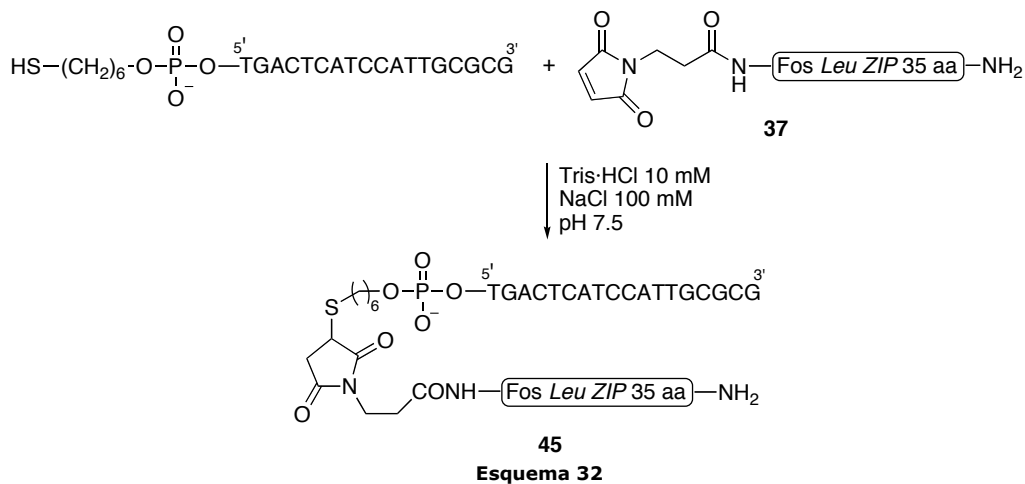


**Figura 81.** Representación esquemática de la activación y desactivación del conjugado oligonucleótido-péptido a Jun mediante el uso de ADNs de cadena sencilla.

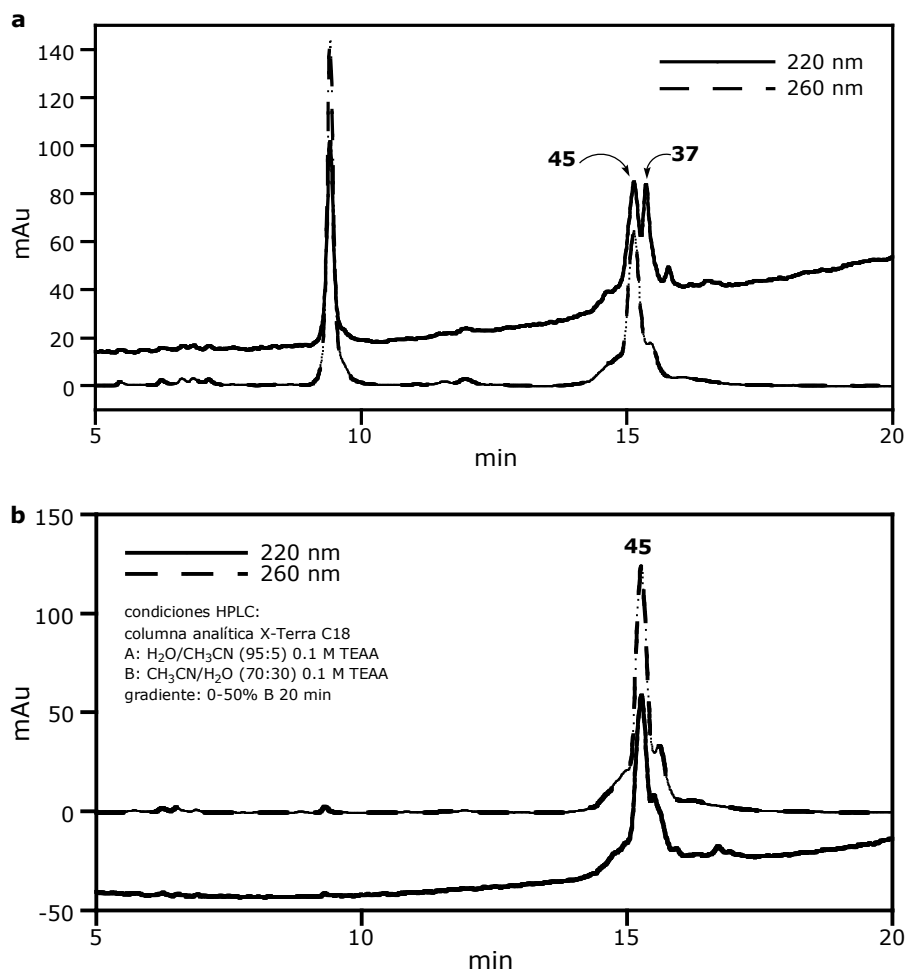
Debido a que en algunos experimentos de electroforesis, como por ejemplo al realizar la valoración, observamos que el híbrido de doble cadena **38-dh** que contiene 13 pares de bases experimenta una deshibridación parcial, decidimos sintetizar conjugados con una cadena oligonucleotídica más larga, que por tanto generen dobles hélices más estables.

### 1.7. Síntesis de conjugados oligonucleótido-péptido con una parte oligonucleotídica más larga

En primer lugar, se sintetizó un conjugado con la misma parte peptídica que el híbrido **38** estudiado en el apartado anterior (35 aminoácidos y con un grupo etilmaleimido en su extremo N-terminal) y con una parte oligonucleotídica que consta de 18 bases. El acoplamiento se realizó en las mismas condiciones descritas anteriormente.

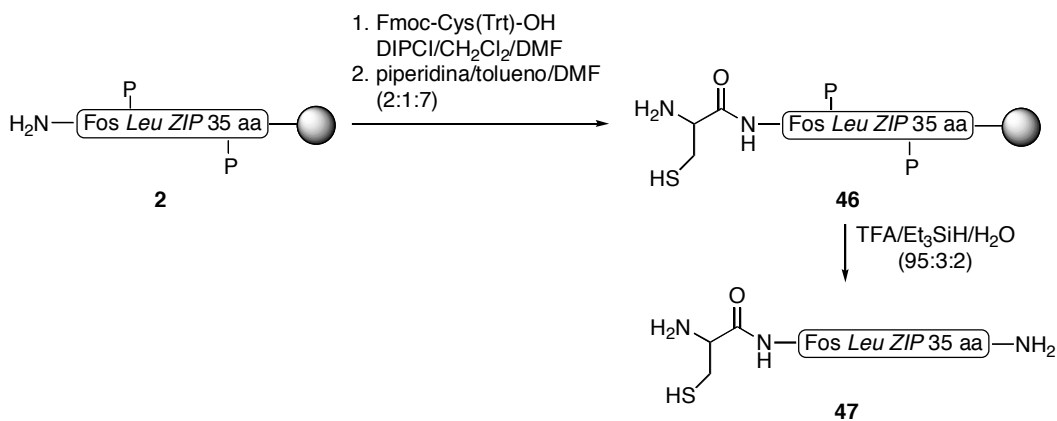


En el cromatograma de HPLC se puede observar la aparición de un compuesto cuyo espectro de UV es característico de un conjugado oligonucleótido-péptido. Tras la desaparición total del oligonucleótido de partida ( $t_R = 9.8$  min), se purificó el compuesto que eluye a 15.3 min, que se identificó como el híbrido buscado **45** por espectrometría de MALDI-TOF:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{359}H_{535}N_{114}O_{178}P_{18}S_1$  9887.3, hallada 9883.5 (57% de rendimiento).



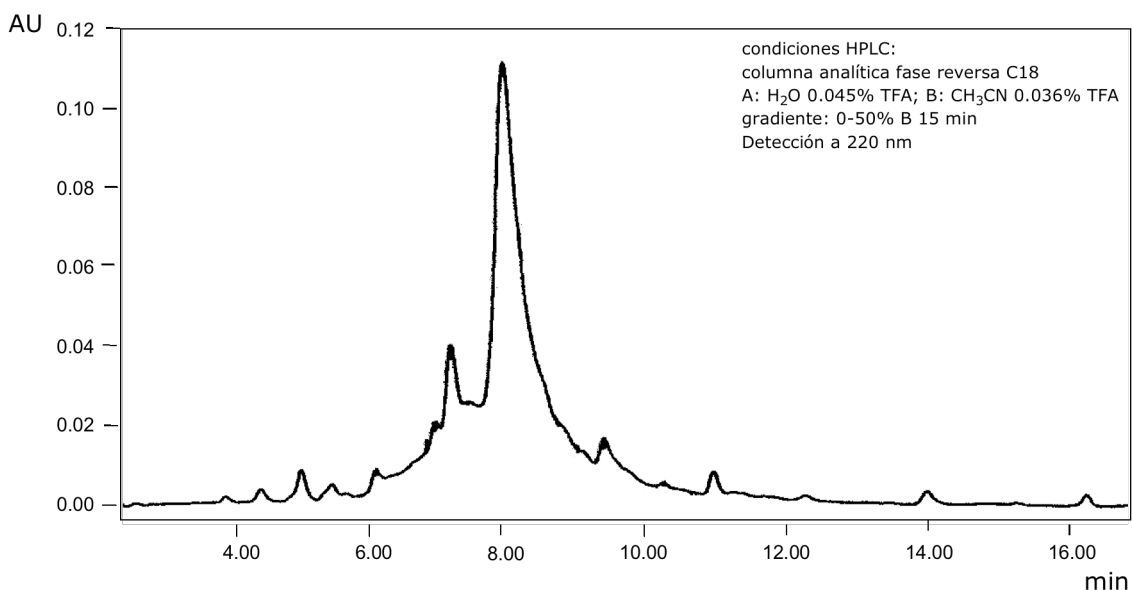
**Figura 82.** Cromatograma de HPLC correspondiente a la conjugación para la obtención de **46** después de 5 min de reacción (a) y después de 30 min (b).

De forma análoga, se sintetizó un híbrido similar, pero con un enlace disulfuro como conector entre la parte peptídica y oligonucleotídica. Para ello, primero la resina peptídica de 35 aminoácidos **2** se modificó incorporando una cisteína en el extremo N-terminal. La desprotección del péptido y separación del soporte se realizó por tratamiento de la resina con la mezcla TFA/Et<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O (95:3:2, 300 µL/10 mg de resina, 2 horas).



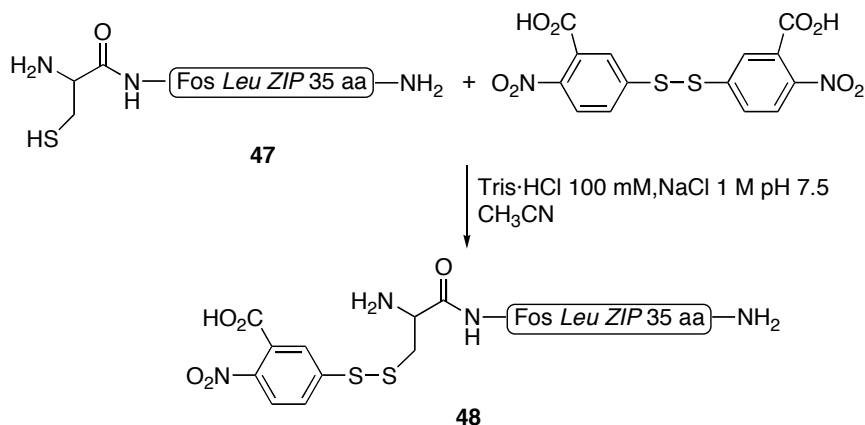
**Esquema 33**

En la Figura 83 se muestra el cromatograma de HPLC correspondiente al péptido **47**, cuyo análisis por espectrometría de MALDI-TOF confirmó su identidad:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{175}H_{300}N_{51}O_{65}S_1$  4190.7, encontrada 4190.2.



**Figura 83.** Cromatograma de HPLC del crudo de desprotección de la peptidilresina **46**.

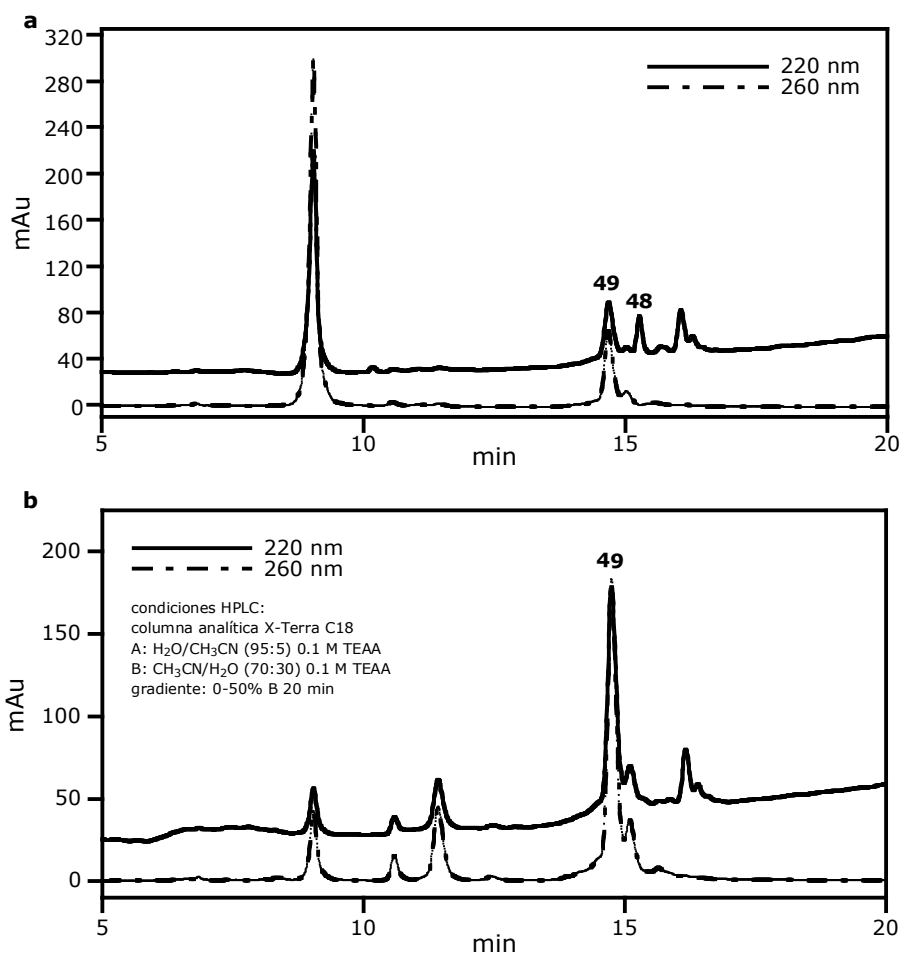
El péptido **47** se purificó y a continuación se activó la cisteína en el extremo N-terminal mediante el acoplamiento con el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) en una disolución de Tris·HCl 100mM, NaCl 1 M pH 7.5 y  $CH_3CN$ .



**Esquema 34**

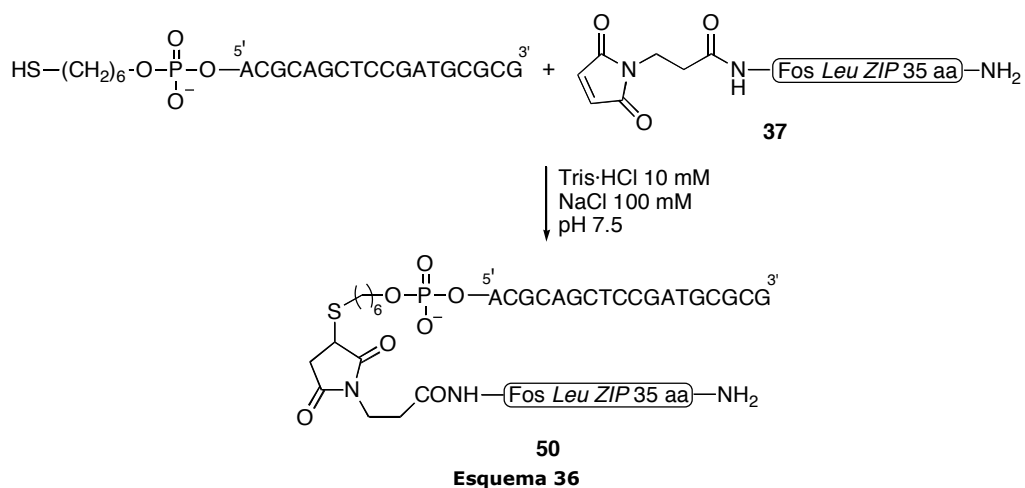
La reacción fue inmediata (se observó una coloración amarilla intensa) y por cromatografía de HPLC se puede observar, después de 5 min, la total transformación del péptido de partida en un compuesto que se purificó, se liofilizó y se identificó como el péptido **48** por ESI-TOF:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{182}H_{303}N_{52}O_{69}S_2$  4387.9, encontrada 4386 (rendimiento aproximado del 24%).



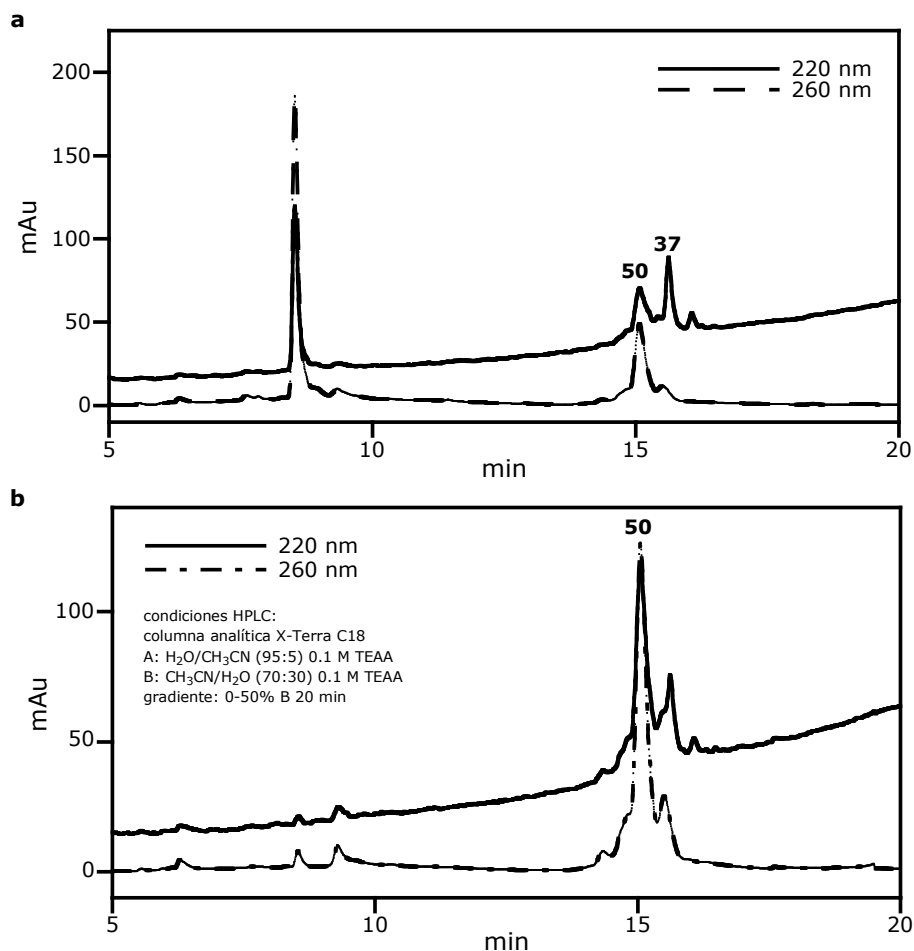


**Figura 85.** Cromatogramas de HPLC de la reacción de conjugación al cabo de 5 min (a) y al cabo de 30 min (b).

Como en el caso de los híbridos con una cadena de 13 nucleótidos, también preparamos un híbrido análogo a **45**-dh, pero con un oligonucleótido que no contuviese la secuencia consenso de unión a Jun. Para la obtención del precursor de cadena sencilla se hizo reaccionar el oligonucleótido-tiol indicado en el Esquema 36 (en una concentración 50  $\mu$ M) con tres equivalentes de péptido maleimido **37**, en tampón conteniendo Tris·HCl 10 mM, NaCl 100 mM a pH 7.5.

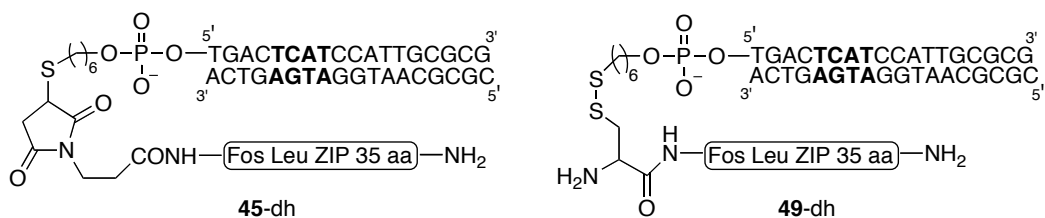


En la Figura 86 se muestran los cromatogramas de HPLC correspondientes al seguimiento de la reacción. El compuesto que eluye a 15.1 min se purificó, se liofilizó y se caracterizó por espectrometría de MALDI-TOF:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{358}H_{532}N_{121}O_{175}P_{18}S_1$  9920.6, encontrada 9909.6 (38% de rendimiento).



**Figura 86.** Cromatogramas de HPLC para la obtención del híbrido **50** después de 5 min (a) y 30 min (b) de reacción.

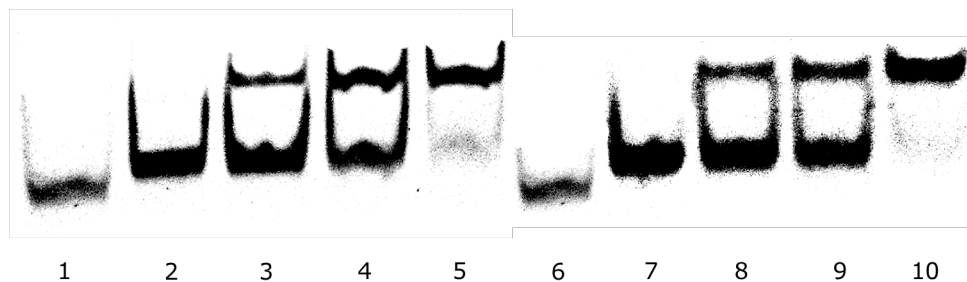
A continuación se prepararon los conjugados de cadena doble **45-dh** y **49-dh**. Para ello, se mezclaron cantidades equimoleculares de los conjugados de cadena sencilla **45** y **49** con su oligonucleótido complementario en tampón fosfato 10 mM conteniendo NaCl 100 mM a pH 7.5. Las disoluciones resultantes se calentaron a 90 °C durante 10 min y se dejaron enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.



**Figura 87.** Conjugados oligonucleótido-péptido de doble cadena.

### 1.8. Estudios de interacción con Jun

Disponiendo de los conjugados, se llevaron a cabo experimentos de EMSA en presencia de Jun con los híbridos **45**-dh y **49**-dh. El análisis de las electroforesis muestra que en ambos casos la incubación a 4 °C de estos conjugados de cadena doble con cantidades crecientes de la proteína c-Jun da lugar a la aparición de una banda más retardada que debe corresponder a los correspondientes complejos con la proteína.



**Figura 88.** PAGE 15%. Calle 1: **45** (~100 nM), calles 2-5: **45**-dh en presencia de concentraciones crecientes de c-Jun (0, 100, 200, 500 nM), calle 6: **49** (~100 nM), calles 7-10: **49**-dh en presencia de concentraciones crecientes de c-Jun (0, 100, 200, 500 nM).

El conjugado **50**, que posee una secuencia oligonucleotídica aleatoria, se hibridó con su oligonucleótido complementario en las condiciones habituales y se llevó a cabo el ensayo de interacción con la proteína c-Jun con el conjugado de doble cadena resultante. En la Figura 89 se muestra el resultado del experimento de EMSA en el que se compara la incubación con la proteína a 4 °C del híbrido con la secuencia de unión de c-Jun (calles 1 y 2) y del híbrido sin la secuencia de unión (calles 3 y 4).

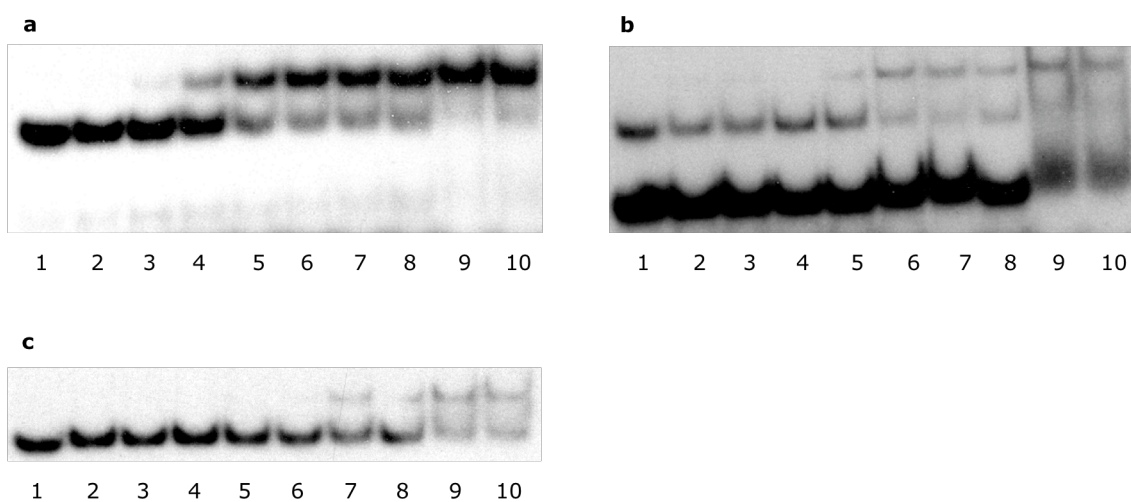


**Figura 89.** PAGE 15%. Calle 1: **45**-dh (~100 nM); calle 2: **45**-dh (~100 nM), c-Jun (~500 nM); calle 3: **50**-dh (~100 nM); calle 4: **50**-dh (~100 nM), c-Jun (~500 nM).

Como se puede observar, en ambos casos se forma una banda de complejación similar entre el conjugado y la proteína. Estos experimentos de electroforesis no permiten extraer conclusiones definitivas sobre las posibles diferencias de afinidad, debido a la necesidad de utilizar cantidades grandes del conjugado (~100 nM) para poder revelarlo.

Para obtener datos más exactos de afinidad, se hicieron experimentos de valoración usando híbridos de doble cadena marcados radiactivamente, lo que permite manejar cantidades mucho menores. En la siguiente figura se muestran las electroforesis correspondientes a valoraciones de la interacción de los híbridos **46**-dh, **49**-dh y **50**-dh con la proteína, a 4 °C. En el caso del híbrido con el conector maleimido (Figura 90a), a diferencia de lo que ocurría en el caso del análogo de 13 bases, (Figura 78, página 98), casi no se observan bandas secundarias debidas a la deshibridación del ADN. Sin duda, la mayor longitud de la cadena oligonucleotídica aumenta su estabilidad como doble cadena. En el

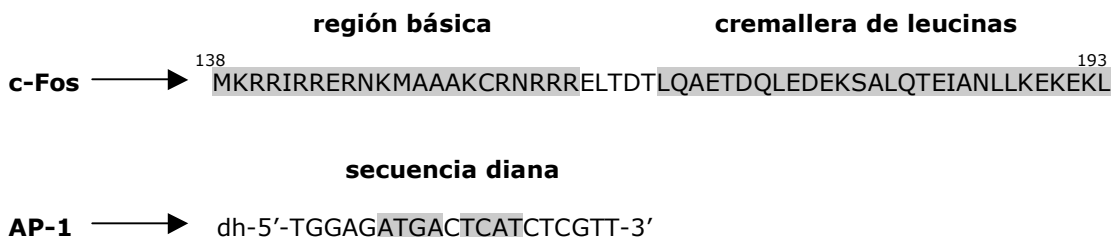
caso del conjugado disulfuro **49**-dh (Figura 90b), se observa una banda muy intensa correspondiente a la parte oligonucleotídica de doble cadena sin péptido. Esto es debido a que se produce la ruptura del enlace disulfuro debido a la presencia de DTT en el tampón kinasa utilizado en el marcaje con  $^{32}\text{P}$  radiactivo (véase Parte Experimental). Cuando se hizo la valoración con el híbrido que no posee la secuencia de unión de Jun (Figura 90c), se deduce una menor constante de asociación con la proteína que en el caso del híbrido **45**-dh. Estos datos sugieren que, al menos en este caso, la secuencia del oligo influye en el proceso de reconocimiento, y apuntan a una interacción específica entre la región básica de Jun y la secuencia diana TCAT. Será necesario hacer nuevos estudios, como por ejemplo mutaciones unitarias en esta secuencia, para obtener conclusiones definitivas.



**Figura 90.** PAGE 15%. a) calles 1-10:  $^{32}\text{P}$ -**45**-dh ( $\sim 90$  pM) y c-Jun (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 nM). b) calles 1-10:  $^{32}\text{P}$ -**49**-dh ( $\sim 90$  pM) y c-Jun (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 nM). c) calles 1-10:  $^{32}\text{P}$ -**50**-dh ( $\sim 90$  pM) y c-Jun (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 nM).

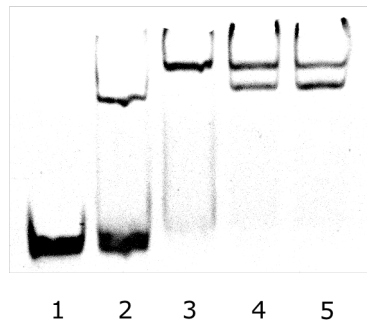
### 1.9. Estudios de desplazamiento de los complejos entre Jun-Jun y Fos-Jun con su secuencia consenso de ADN

Disponiendo de agentes capaces de interaccionar y atrapar Jun de forma selectiva, nos planteamos realizar estudios para comprobar si dichos agentes serían capaces de competir de forma eficiente con la complejación de los dímeros Jun-Jun y Fos-Jun con su secuencia diana de ADN. Las secuencias de la proteína c-Fos y del oligonucleótido de doble cadena "AP-1" que se utilizaron, se muestran a continuación:



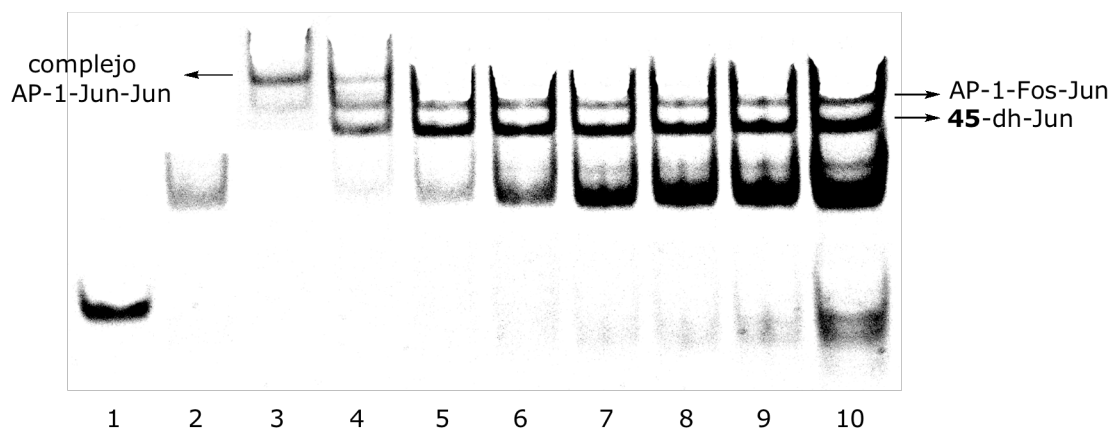
**Figura 91.** Secuencias de la proteína c-Fos y del ADN incluyendo el sitio de unión AP-1 utilizadas en los ensayos de inhibición

En el siguiente gel de electroforesis se muestra el resultado de la incubación del ADN AP-1 con c-Fos (calle 2), con c-Jun (calle 3) y con ambas proteínas (calles 4 y 5). Puede observarse que el homodímero de Fos da lugar a una interacción muy débil (la mayor parte del ADN permanece sin complejarse), mientras que el homodímero de Jun y el heterodímero de Fos y Jun dan lugar a interacciones más fuertes. Como se puede observar, cuando están presentes ambas proteínas, interaccionan con el ADN tanto el homodímero de Jun como el heterodímero Fos-Jun, aunque se añada un exceso de Fos (calle 5), y por eso se observan dos bandas de retardo.



**Figura 92.** PAGE 15%. Calle 1: AP-1 (~50 nM); calle 2: AP-1 (~50 nM), c-Fos (~200 nM); calle 3: AP-1 (~50 nM), c-Jun (~200 nM); calle 4: AP-1 (~50 nM), c-Fos (~200 nM), c-Jun (~200 nM); calle 5: AP-1 (~50 nM), c-Fos (~400 nM), c-Jun (~200 nM).

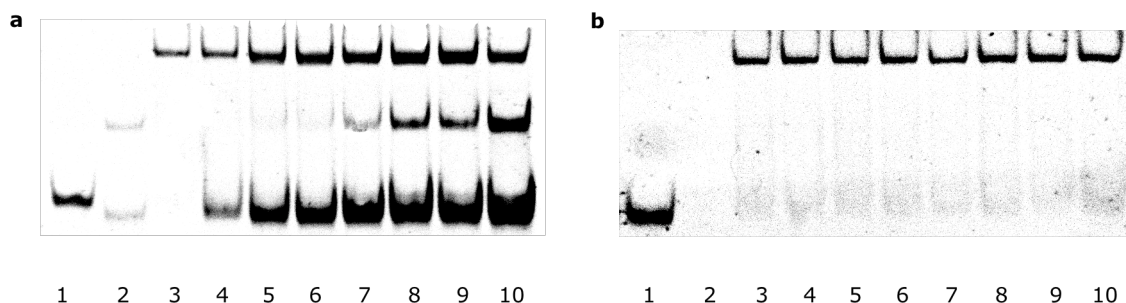
Cuando el complejo previamente formado entre Fos y Jun y el ADN de doble cadena AP-1 se incubó con cantidades crecientes del híbrido de doble cadena **45**-dh, se observó la desaparición de la banda del complejo Jun-Jun-ADN, dato indicativo de que el híbrido es capaz de desplazar de forma efectiva el dímero Jun-Jun del ADN. Estos primeros experimentos parecen indicar que, sin embargo, no es capaz de romper el complejo Fos-Jun-ADN, lo que es coherente con su supuesta mayor estabilidad.



**Figura 93.** PAGE 15%. Calle 1: AP-1 (~50 nM), calle 2: **45**-dh (~100 nM), Calles 3-10: AP-1 (~50 nM), c-Fos (~400 nM) y c-Jun (~400 nM) en presencia de cantidades crecientes de **45**-dh (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 nM).

Para poder obtener datos cualitativos relativos sobre el origen de las propiedades del complejo **45**-dh para inhibir la capacidad de Jun para unirse a su secuencia consenso de ADN, se realizaron experimentos de control con cada uno de los componentes del híbrido (el ADN de doble cadena y el péptido). Cuando se llevó a cabo la incubación del complejo Jun-Jun-AP-1 con cantidades crecientes del oligonucleótido **8** anelado a su oligonucleótido

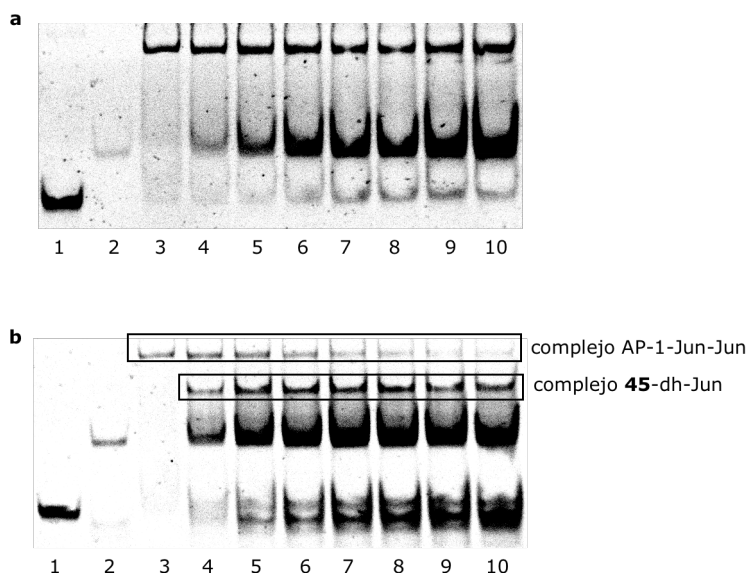
complementario se observó que la banda correspondiente al complejo Jun-ADN permanece intacta, incluso al añadir un gran exceso del oligonucleótido. Análogamente, cuando se llevó a cabo la incubación del complejo Jun-ADN con cantidades crecientes del péptido **37**, precursor del híbrido **45**, tampoco se observó la desaparición de la banda correspondiente al complejo.



**Figura 94.** a) PAGE 15%. Calle 1: AP-1 (~50 nM), calle 2: **8**-dh (~100 nM), calles 3-10: AP-1 (~50 nM) y Jun (~400 nM) en presencia de cantidades crecientes de **8**-dh (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 nM). b) PAGE 15%. Calle 1: AP-1 (~50 nM), calle 2: **37** (~100 nM), Calles 3-10: AP-1 (~50 nM) y Jun (~400 nM) en presencia de cantidades crecientes de **37** (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 nM).

Estos datos confirman que las propiedades interferentes del híbrido **45**-dh se deben a la combinación de la acción de sus dos componentes, pues cada uno por separado no es capaz de romper la unión de Jun a su secuencia diana.

Como se puede observar en la Figura 95, el híbrido **45**, con la cadena de ADN sin anelar a su complementaria, tampoco es capaz de desplazar el complejo Jun-Jun-ADN, mientras que el híbrido **45**-dh, que ya contiene la cadena doble, sí es capaz de desplazarlo.



**Figura 95.** a) PAGE 15%. Calle 1: AP-1 (~50 nM), calle 2: **45** (~100 nM), calles 3-10: AP-1 (~50 nM) y Jun (~400 nM) en presencia de cantidades crecientes de **45** (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 nM). b) PAGE 15%. Calle 1: AP-1 (~50 nM), calle 2: **45**-dh (~100 nM), Calles 3-10: AP-1 (~50 nM) y Jun (~400 nM) en presencia de cantidades crecientes de **45**-dh (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 nM).

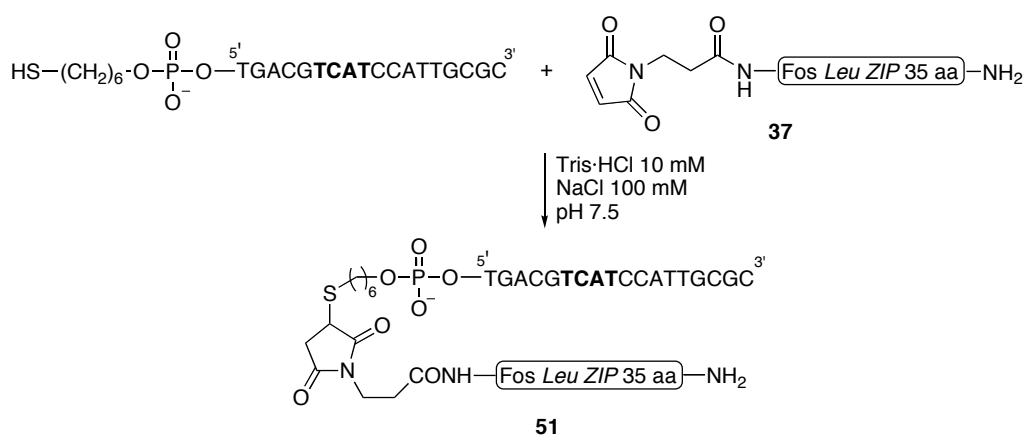
Los datos de desplazamiento de la unión Jun-Jun-ADN por parte del híbrido **45**-dh confirman la viabilidad de esta estrategia de inhibición de Jun, y sus ventajas sobre estrategias basadas sólo en los ADNs cebo (decoy) o en secuencias peptídicas. Es esperable que de la misma forma que se puede conmutar la unión de los híbridos a Jun, también sea posible controlar la complejación de Jun con su secuencia diana AP-1 utilizando oligonucleótidos externos.

### 1.10. Conjugados oligonucleótido-peptido con mayor separación entre la secuencia TCAT y la zona de unión del péptido

Los datos disponibles hasta el momento sobre la interacción de nuestros híbridos con Jun indican que en la complejación la región básica de esta proteína podría estar interaccionando no específicamente con los fosfatos, en lugar de insertarse en el surco, aunque aún no se puede extraer una conclusión definitiva. Si esto fuera así, sería importante comprobar si una modificación en la distancia de separación entre el extremo 5' del ADN (donde se realiza la conexión al péptido) y la secuencia consenso de Jun (TCAT) permitiría una inserción más eficiente de la región básica en el surco y por tanto una mayor constante de asociación. La inspección del modelo cualitativo de ordenador del complejo Fos-Jun con el ADN, en el que se ha truncado la región básica de Fos (página 54) sugirió que sería posible introducir 1 ó 2 bases espaciadoras más entre la secuencia de consenso y el extremo del ADN.

Por ello, se decidió preparar los híbridos **51** y **52**, que poseen la secuencia TCAT en la parte oligonucleotídica separada 1 y 2 bases espaciadoras más, respectivamente, del extremo de unión a la parte peptídica que en los conjugados estudiados hasta el momento.

En ambos casos, la síntesis se realizó mezclando los correspondientes oligonucleótidos-tiol de partida con 3 equivalentes del péptido maleimido **37** en un tampón formado por Tris·HCl 10 mM, NaCl 100 mM a pH 7.5.

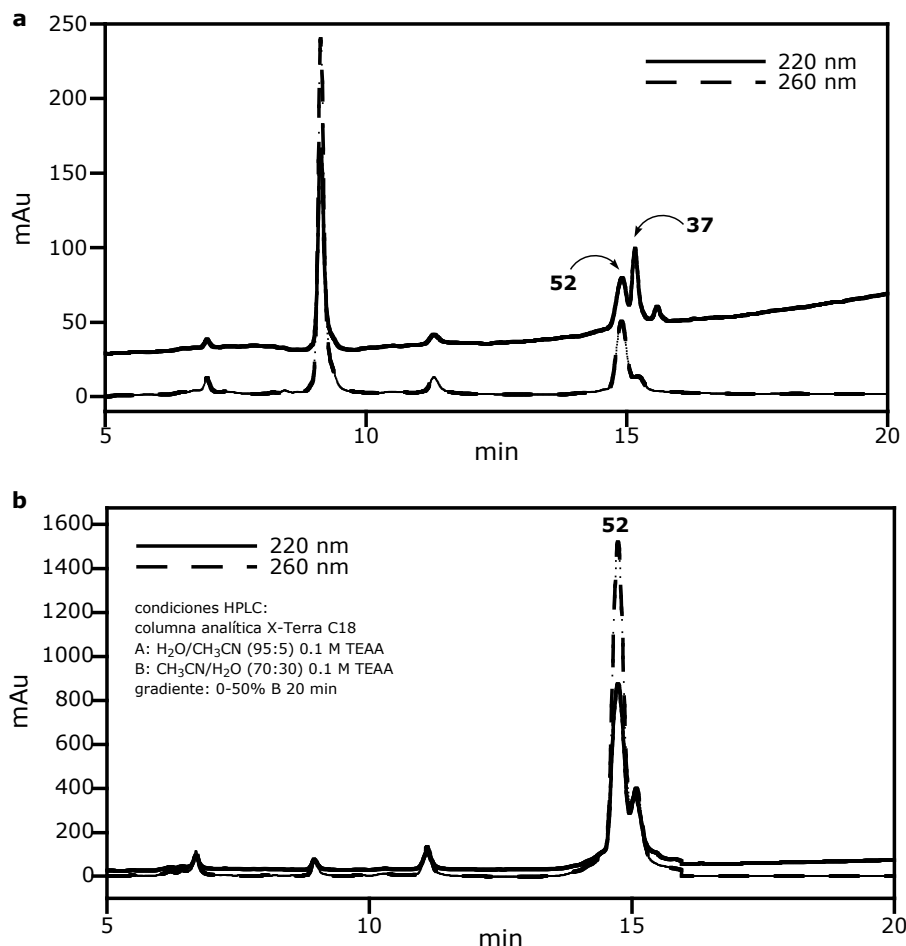


**Esquema 37**

A continuación se muestran los cromatogramas de HPLC indicando la evolución de la reacción. Después de 30 min se observa la formación mayoritaria de un compuesto nuevo con un tiempo de retención de 14.9 min, que se purificó y liofilizó, obteniéndose con un

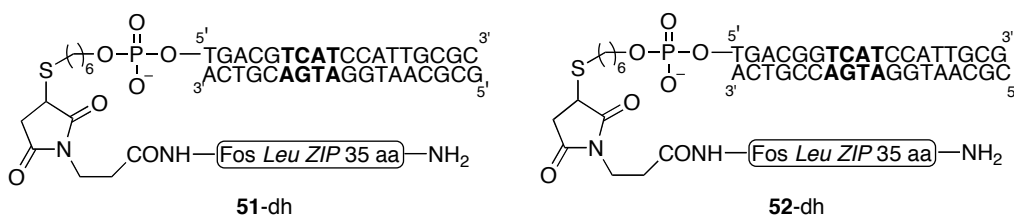


En la siguiente figura se muestran los cromatogramas de HPLC correspondientes al seguimiento de la reacción. Después de 30 min de reacción se observa la formación mayoritaria de un nuevo compuesto con un tiempo de retención de 14.7 min, que se purificó y liofilizó, obteniéndose con un 50% de rendimiento. Hasta el momento, no hemos logrado su caracterización por espectrometría de masas.



**Figura 97.** Cromatogramas de HPLC de la reacción de conjugación tras 5 min (a) y 30 min (b) de reacción.

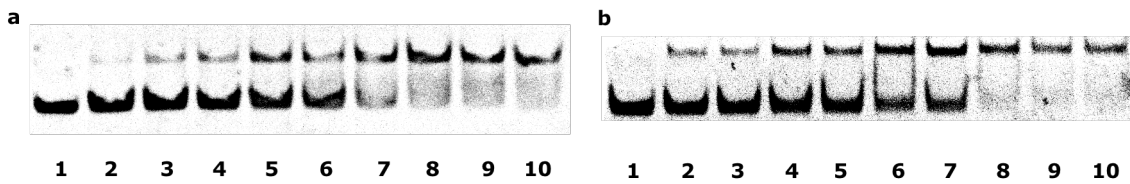
Se obtuvieron después los correspondientes conjugados de doble cadena **51-dh** y **52-dh**, utilizando los procedimientos estándar de hibridación con oligonucleótidos complementarios.



**Figura 98.** Conjugados oligonucleótido-peptídico de doble cadena **51-dh** y **52-dh**.

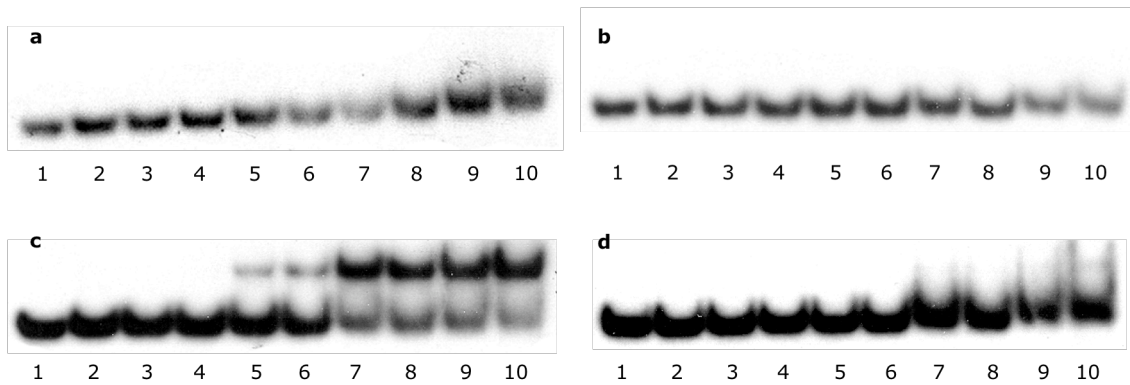
A continuación, se procedió a evaluar la capacidad de interacción de estos nuevos híbridos con la proteína c-Jun. Para ello se llevaron a cabo experimentos de valoración de EMSA, en los que los híbridos **51-dh** y **52-dh** se incubaron a 4 °C con cantidades crecientes de c-Jun. Como se puede deducir de las valoraciones por electroforesis, el híbrido con 5

bases espaciadoras entre el extremo 5' y la secuencia TCAT (Figura 99a) tiene aparentemente una ligera mayor afinidad por la proteína que el híbrido con 6 bases espaciadoras (Figura 99b).



**Figura 99.** a) PAGE 15%. Calles 1-10: **51**-dh (~50 nM) en presencia de cantidades crecientes de c-Jun (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 nM). b) PAGE 15%. Calles 1-10: **52**-dh (~50 nM) en presencia de cantidades crecientes de c-Jun (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 nM).

Se llevaron a cabo asimismo experimentos de EMSA a temperatura ambiente. El resultado de los geles de electroforesis indica que en estas condiciones sólo el híbrido **51**-dh logra interactuar con la proteína.



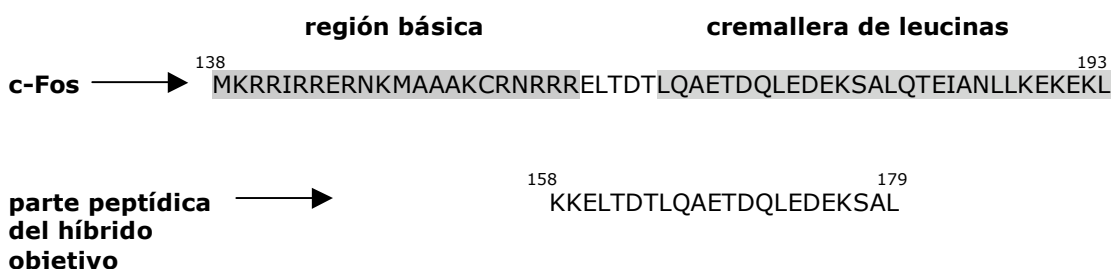
**Figura 100.** PAGE 15% T amb. a) Calles 1-10: <sup>32</sup>P-**45**-dh (~90 pM) y c-Jun (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 nM). b) Calles 1-10: <sup>32</sup>P-**50**-dh (~90 pM) y c-Jun (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 nM). c) Calles 1-10: <sup>32</sup>P-**51**-dh (~90 pM) y c-Jun (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 nM). d) Calles 1-10: <sup>32</sup>P-**52**-dh (~90 pM) y c-Jun (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 nM).

Este dato de nuevo indica que la secuencia del oligonucleótido influye en la interacción. Será necesario realizar experimentos con la secuencia consenso TCAT del híbrido **51**-dh mutada en una base, para determinar si dicha secuencia es o no clave en el reconocimiento.

## 2. Síntesis lineal de un conjugado oligonucleótido-péptido diseñado para interactuar con Jun

### 2.1. Objetivo, diseño y planteamiento

Paralelamente al trabajo descrito hasta el momento y como se señaló en la sección anterior (apartado 1.2), también decidimos estudiar conjugados oligonucleótido-péptido preparados mediante métodos de síntesis divergente (lineal) en fase sólida. En este caso, el péptido estaría unido a través de su extremo N-terminal al extremo 3' del oligonucleótido. Tomando como base la estructura de rayos X de c-Fos y c-Jun unidos a AP-1,<sup>134</sup> decidimos que la parte peptídica estaría constituida por la siguiente secuencia de aminoácidos derivada de c-Fos.



**Figura 101.** Comparación de la secuencia peptídica del híbrido objetivo con la secuencia de la proteína natural.

Como se ha explicado anteriormente, cuando se lleva a cabo la síntesis de un conjugado oligonucleótido-péptido siguiendo una estrategia de síntesis lineal, es preciso utilizar grupos protectores especiales. Dada la no disponibilidad comercial de la arginina protegida adecuadamente, se decidió su sustitución por lisina.

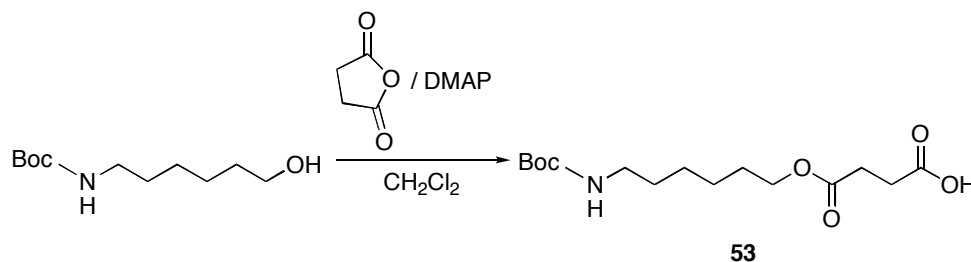
La parte oligonucleotídica estaría formada por 15 ó 16 nucleótidos desde la guanina 16 ó 17 en 3', incluyendo el sitio de unión de Jun.

### 2.2. Síntesis

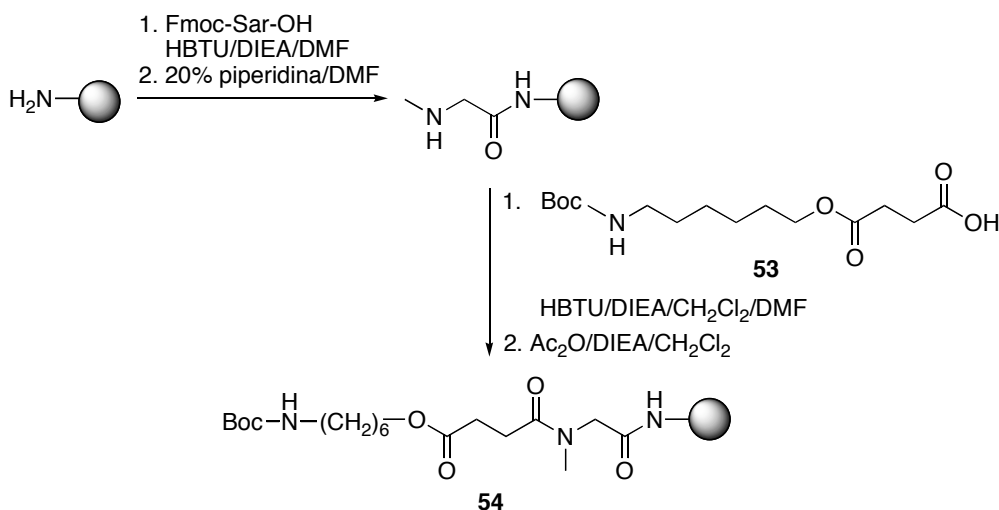
En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis del péptido utilizando el grupo Boc para la protección temporal de los aminoácidos. Los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales y el espaciador que une el soporte al primer aminoácido son lábiles en medio básico. De esta forma, los tratamientos en medio ácido para la desprotección del grupo Boc se realizan en ausencia del oligonucleótido, y la eliminación de los grupos protectores de los aminoácidos y la separación del soporte sólido se realizan al mismo tiempo que la desprotección de las nucleobases.

<sup>134</sup> Glover y Harrison, *vid.* nota 80.

La síntesis se realizó sobre un soporte sólido de PEG-PS<sup>135</sup> con una carga teórica inicial de 0.21 mmol/g. El espaciador entre el soporte sólido y el péptido se obtuvo por reacción de 6-(Boc-amino)-1-hexanol con anhídrido succínico y DMAP en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y posterior lavado con tampón fosfato a pH 5.<sup>136</sup>



Sobre el soporte sólido se acopló en primer lugar la Fmoc-sarcosina por tratamiento de la resina con el aminoácido previamente mezclado con HBTU en DMF/DIEA. Tras desproteger el grupo Fmoc, se acopló el ácido **53** previamente activado con HBTU en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF/DIEA.

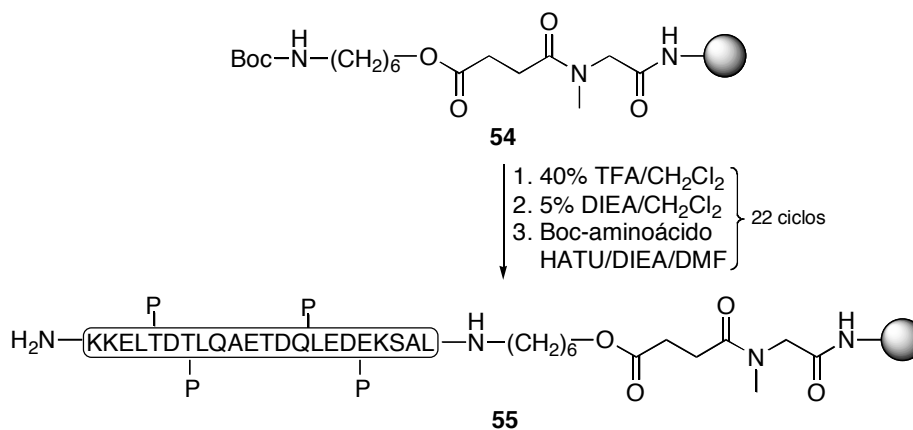


Los acoplamientos se comprobaron con los tests TNBSA y cloranilo. Después se trató la resina con anhídrido acético y DIEA para acetilar los grupos amino libres. El grupo Boc se desprotegió por tratamiento con TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Tras neutralizar la resina con DIEA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se llevaron a cabo los acoplamientos en DMF/DIEA mezclando la resina con el Boc-aminoácido correspondiente, previamente activado con HATU, y se siguieron mediante el test TNBS. Los aminoácidos se incorporaron con grupos protectores lábiles en medio básico.<sup>137</sup>

<sup>135</sup> de la Torre *et al*, *vid.* nota 108b.

<sup>136</sup> Miyoshi, K.; Huang, T.; Itakura, K. "Solid-phase synthesis of polynucleotides. III. Synthesis of polynucleotides with defined sequences by the block coupling phosphotriester method" *Nuc. Acids Res.* **1980**, *8*, 5491.

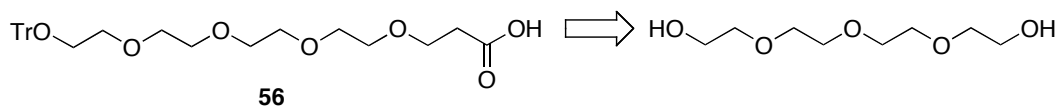
<sup>137</sup> Asp(O<sup>t</sup>Fm), Glu(O<sup>t</sup>Fm), Lys(Tfa), Ser(Ac).



Esquema 41

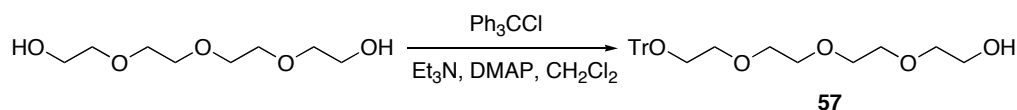
Después de los acoplamientos de treonina fue necesario tratar la resina con anhídrido acético y DIEA para acetilar los grupos hidroxilo libres y protegerlos para la posterior síntesis del oligonucleótido.

A continuación sintetizamos la molécula **56**, que servirá como conector entre la parte peptídica y la oligonucleotídica.



Esquema 42

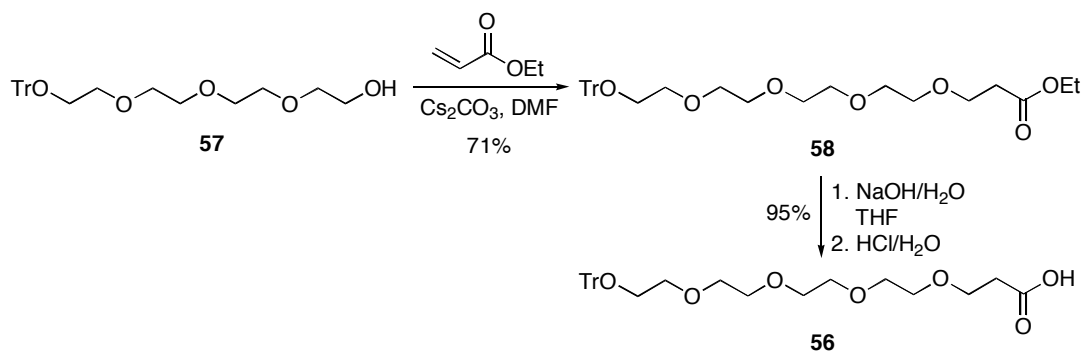
El tetraetilenglicol se monoprotegió por reacción con cloruro de tritilo con trietilamina y DMAP como bases, obteniéndose el compuesto **57** como un aceite marrón con un 25% de rendimiento.



Esquema 43

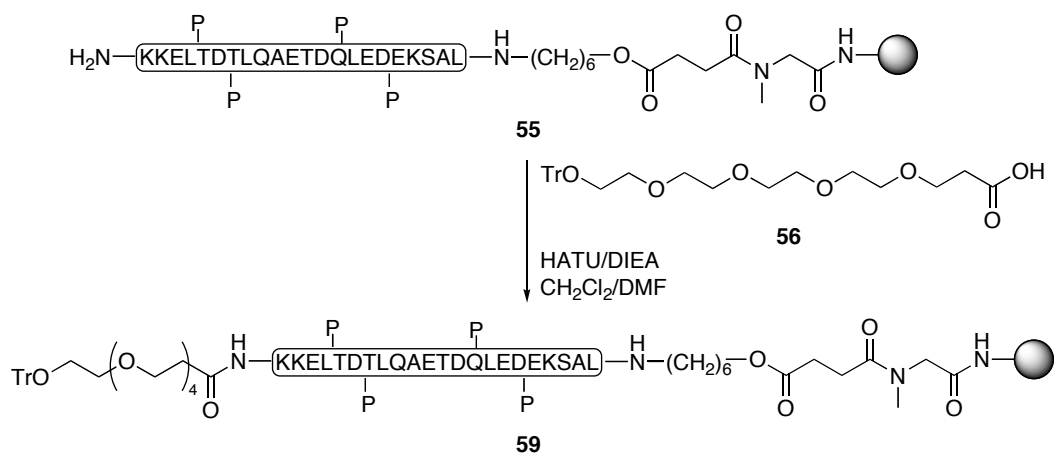
El compuesto **57** se hizo reaccionar con acrilato de etilo usando carbonato de cesio como base y así se obtuvo el compuesto **58** con un rendimiento del 71%.

Este éster se hidrolizó por tratamiento con una disolución acuosa de hidróxido sódico, seguido de acidificación para dar el compuesto **56** (95% de rendimiento).



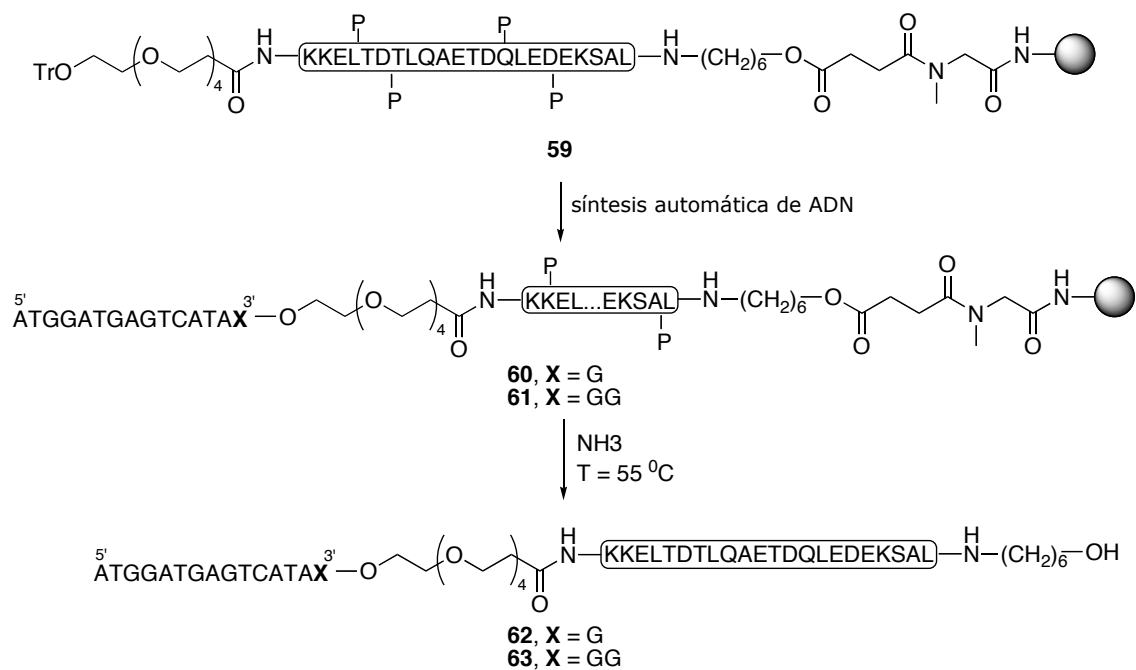
Esquema 44

El acoplamiento del compuesto sintetizado a la resina peptídica se llevó a cabo mezclando la peptidilresina **55** con el conector **56** previamente activado con HATU en DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DIEA, y el acoplamiento se comprobó mediante el test TNBSA.



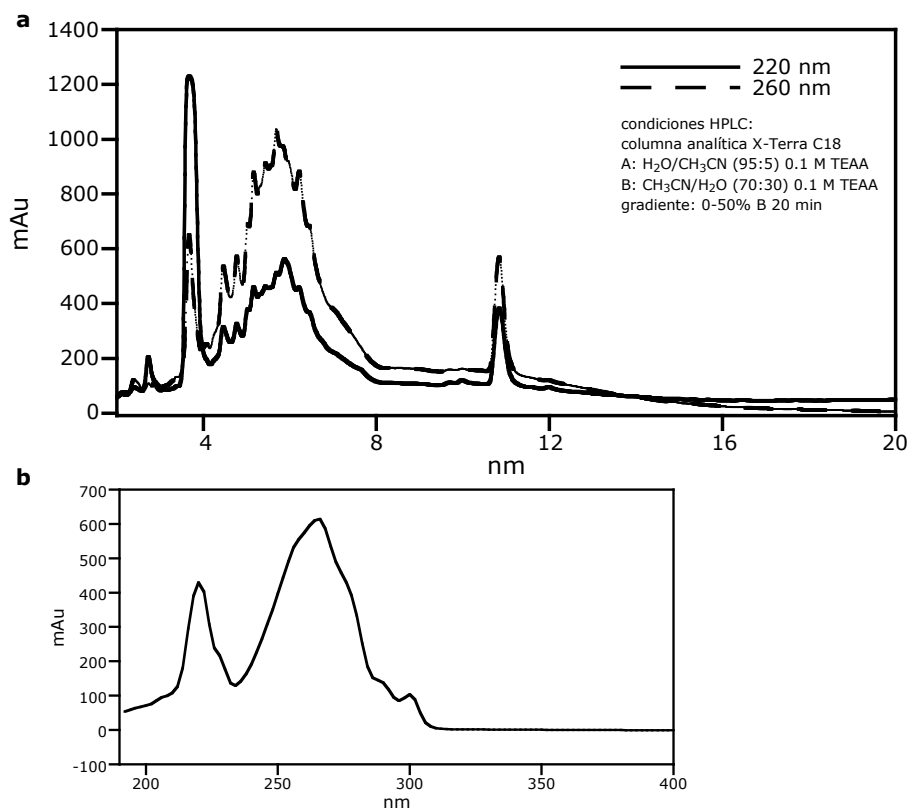
Esquema 45

A continuación, se procedió a acoplar la parte oligonucleotídica sobre el soporte peptídico **59**. Para ello se utilizó un sintetizador de ADN y 2-cianoetilfosforamiditos estándar en escala 1  $\mu$ mol. Se usó un programa ligeramente modificado, de forma que los tiempos de acoplamiento, acetilación, oxidación y destrilación fuesen más largos (véase Parte Experimental). La resina obtenida se desprotegió por tratamiento con amoníaco concentrado a 55  $^{\circ}$ C durante 12 h.

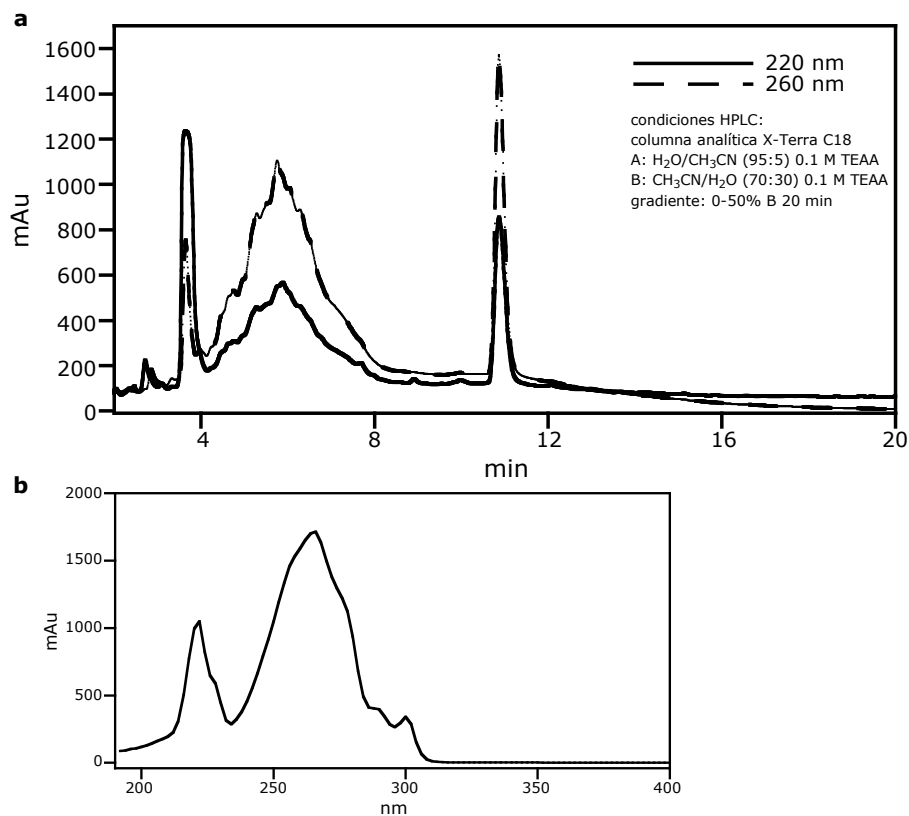


Esquema 46

Los residuos obtenidos se filtraron y se concentraron a sequedad. En la siguiente figura se muestran los cromatogramas correspondientes a los crudos de desprotección para la obtención de **62** y **63**. Se purificaron los compuestos que eluyen a 10.9 min y cuyos espectros de UV tienen máximos a 220 y 260 nm. Desafortunadamente, hasta el momento no hemos conseguido la identificación por espectrometría de masas de los compuestos obtenidos, por lo que aunque su espectro de UV tiene características de conjugado oligonucleótido-péptido, aún no tenemos confirmación de su estructura.



**Figura 102.** a) Cromatograma de HPLC correspondiente a la desprotección de la resina **60**. b) Espectro de UV del compuesto que eluye a 10.8 min.



**Figura 103.** a) Cromatograma de HPLC correspondiente a la desprotección de la resina **61**. b) Espectro de UV del compuesto que eluye a 10.8 min.

### 3. Conjugados oligonucleótido-péptido cuya dimerización puede controlarse mediante oligonucleótidos externos

#### 3.1. Objetivo

Como se ha comentado en la parte introductoria de esta memoria (página 14), la actividad de los factores de transcripción está perfectamente regulada y, en muchos casos, dicha regulación está controlada por la acción de estímulos externos. Estos estímulos determinan el lugar y momento de la activación de los factores de transcripción o, en su caso, con qué otras proteínas han de interactuar.

Los derivados oligonucleotídicos presentan características muy adecuadas para inducir procesos de autoensamblaje de forma controlada, debido a la codificación subyacente en el apareamiento Watson-Crick de las bases. En los últimos años, estas características han propiciado su utilización para la preparación de una gran variedad de sistemas supramoleculares y nanoestructuras funcionales basadas en el ADN.<sup>138</sup>

Nosotros pensamos que dichas propiedades supramoleculares del ADN podrían permitir la preparación de nuevos tipos de sistemas supramoleculares con capacidad para interactuar con secuencias específicas del genoma de forma controlable. Aprovechando la experiencia adquirida con nuestro trabajo previamente descrito, pensamos que sería interesante estudiar la **viabilidad de obtener conjugados oligonucleótido-péptido cuya afinidad por el ADN pudiera conmutarse de forma codificada mediante la adición de hebras externas de ADN**. Concretamente, la idea consiste en conjugar péptidos derivados de la región básica del factor de transcripción bZIP GCN4 a determinados oligonucleótidos, de tal forma que el híbrido resultante sólo pueda interactuar con su ADN diana cuando se añada un tercer oligonucleótido que sea capaz de inducir la dimerización de los péptidos favoreciendo la formación de una estructura conocida como "three way junction" (Figura 104).

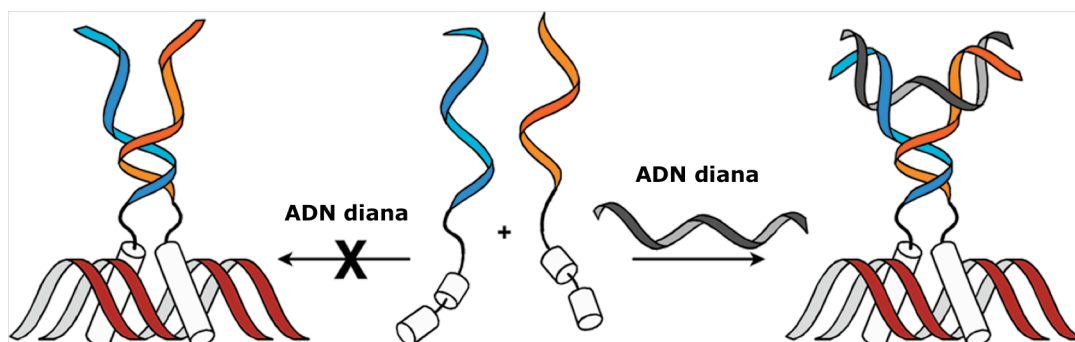


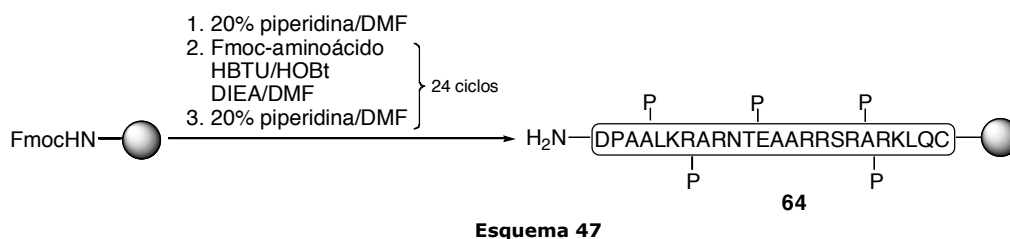
Figura 104. Representación esquemática del objetivo.

<sup>138</sup> a) Melkko, S.; Scheuermann, J.; Dumelin, C. E.; Neri, D. "Encoded self-assembly chemical libraries" *Nature Biotechnol.* **2004**, *22*, 568. b) Sprinz, K. I.; Tagore, D. M.; Hamilton, A. D. "Self-assembly of bivalent protein-binding agents based on oligonucleotide-linked organic fragments" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3908.

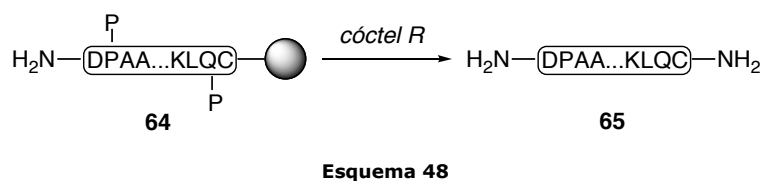




Para la obtención del péptido objetivo se utilizaron las condiciones estándar de síntesis de péptidos en fase sólida sobre una resina Rink-MBHA amida con una carga teórica inicial de 0.46 mmol/g. Los acoplamientos se llevaron a cabo en DMF/DIEA mezclando la resina con el aminoácido correspondiente, activado previamente con la mezcla HBTU/HOBt (Esquema 47), y se siguieron mediante el test TNBSA de pequeñas alícuotas de la resina lavadas con metanol. Los aminoácidos se incorporaron con los grupos protectores estándar para la síntesis en fase sólida Fmoc/<sup>t</sup>Bu.<sup>145</sup>



La desprotección y separación del péptido de la resina se realizó usando TFA y una mezcla estándar de capturadores de cationes: *cóctel R* (TFA/EDT/anisol/tioanisol 90:3:2:5, 300 µL/10 mg de resina, 3 horas).<sup>146</sup>



El análisis por HPLC de fase reversa del residuo obtenido dio lugar al cromatograma que se muestra en la Figura 108. Una vez purificado y liofilizado, se identificó mediante análisis por masas ESI-TOF como el péptido **65**: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>111</sub>H<sub>202</sub>N<sub>47</sub>O<sub>32</sub>S<sub>1</sub> 2739.2, encontrada 2737.

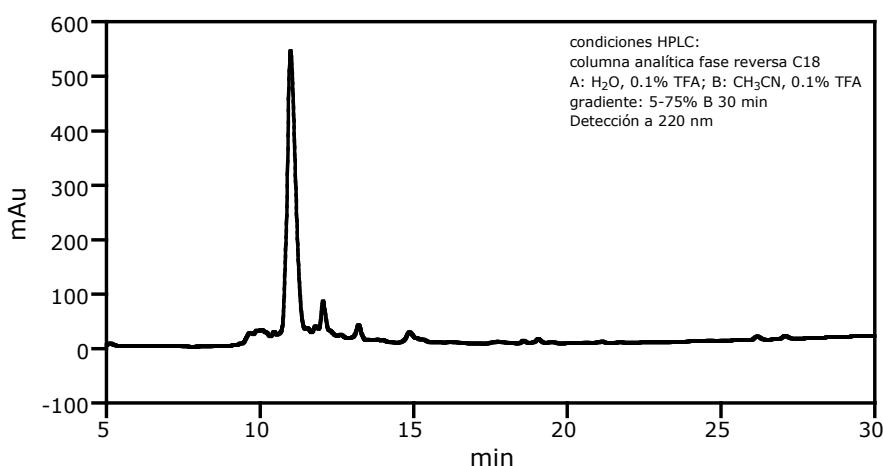
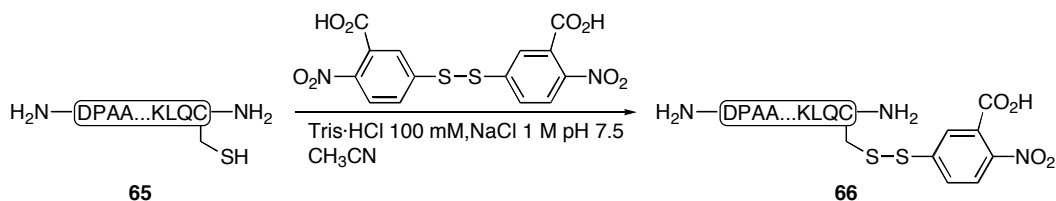


Figura 108. Cromatograma de HPLC del crudo de desprotección para la obtención de **65**.

<sup>145</sup> Asn(Trt), Arg(Pmc), Asp(<sup>t</sup>Bu), Cys(Trt), Gln(Trt), Glu(<sup>t</sup>Bu), Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu), Thr(<sup>t</sup>Bu).

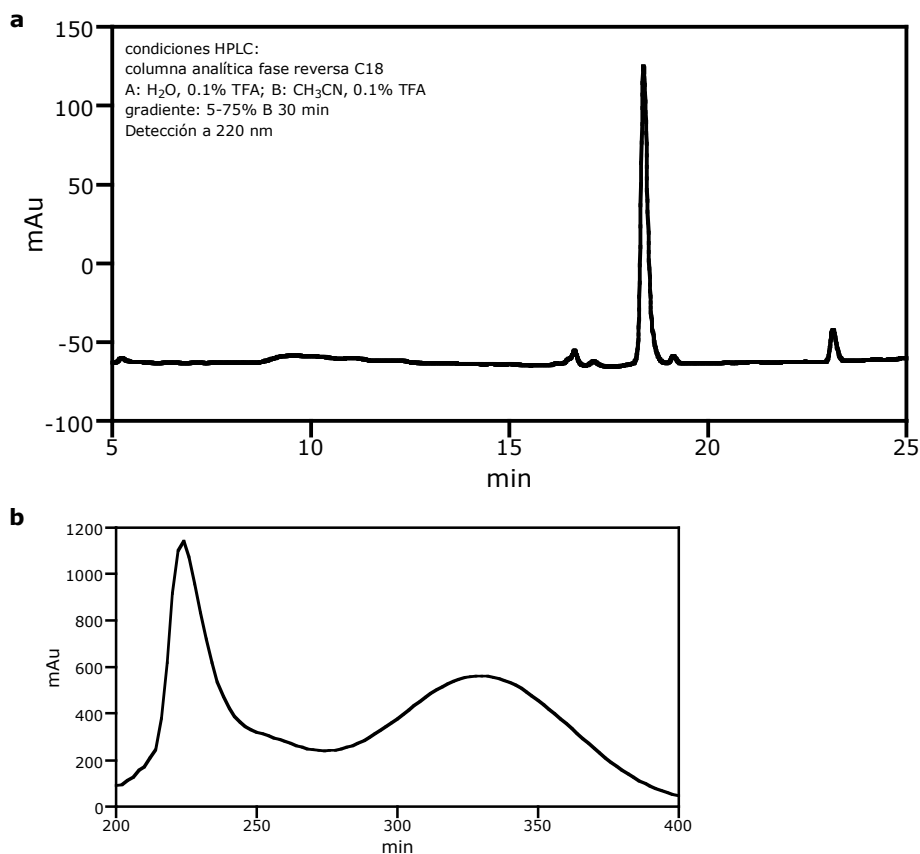
<sup>146</sup> a) *Peptide Synthesis Protocols 1994* Ed.: Pennington, M. W. Human Press, Totowa, Nueva Jersey, cap. 5. b) Albercio, F.; Kneib-Cordonier, N.; Biancalana, S.; Gera, L.; Masada, R. I.; Hudson, D.; Barany, G. "Preparation and application of the 5-(4-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric acid (PAL) handle for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions" *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3730.

La cisteína en el extremo C-terminal se activó mediante el acoplamiento del ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) en una disolución de Tris·HCl 100mM, NaCl 1 M pH 7.5 y CH<sub>3</sub>CN.



**Esquema 49**

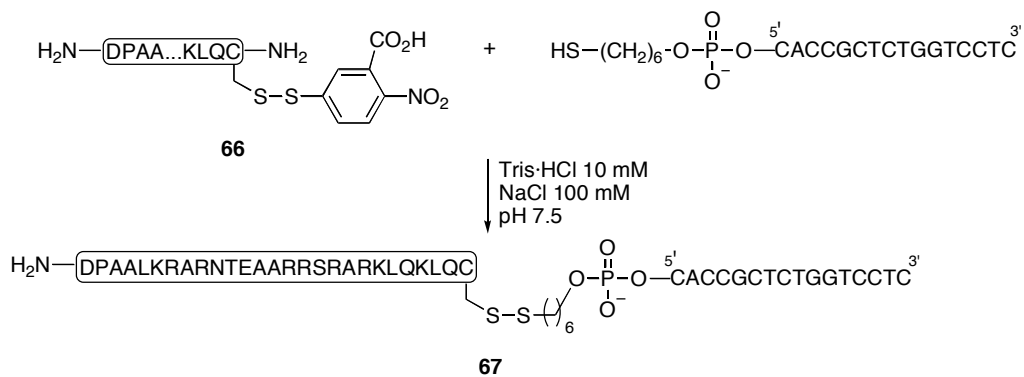
La reacción fue inmediata (se observó una coloración amarilla intensa) y por cromatografía de HPLC se puede observar, después de 5 min, la transformación total del péptido de partida en un compuesto que se purificó, se liofilizó y se identificó como el péptido **66** por espectrometría de masas de ESI-TOF:  $[MH]^+$  calculada para C<sub>118</sub>H<sub>205</sub>N<sub>48</sub>O<sub>36</sub>S<sub>2</sub> 2936.4, encontrada 2935 (73% de rendimiento).



**Figura 109.** a) Cromatograma de HPLC del crudo de reacción correspondiente a la obtención de **66**. b) Espectro de UV del compuesto **66**.

A continuación, se procedió a llevar a cabo las reacciones de conjugación con los oligonucleótidos correspondientes, cuyas secuencias se eligieron de modo que fuesen apropiadas para la formación de un cruce Y de tipo 3H.<sup>147</sup>

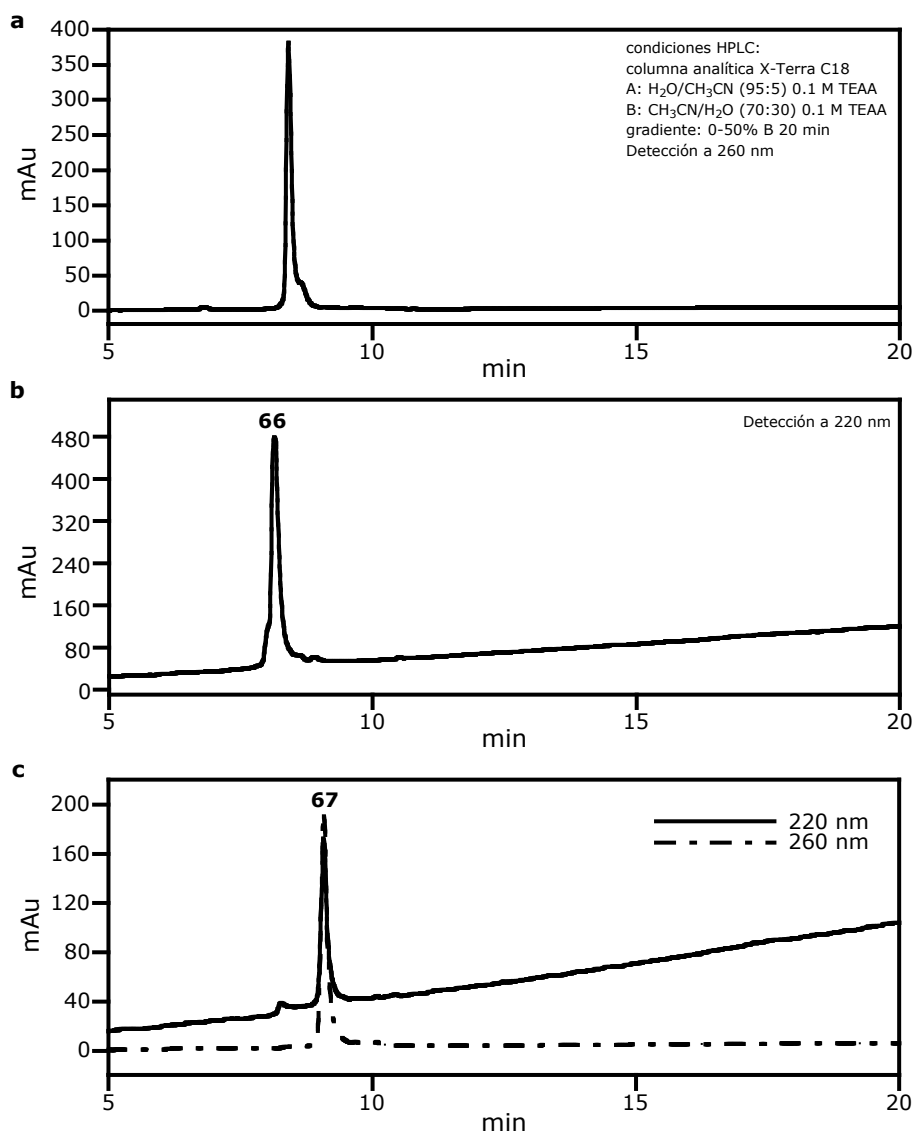
El péptido **66**, en exceso, se hizo reaccionar con un oligonucleótido con un fosforamidito modificador tiol en su extremo 5', tal como se indica en el siguiente esquema.



Esquema 50

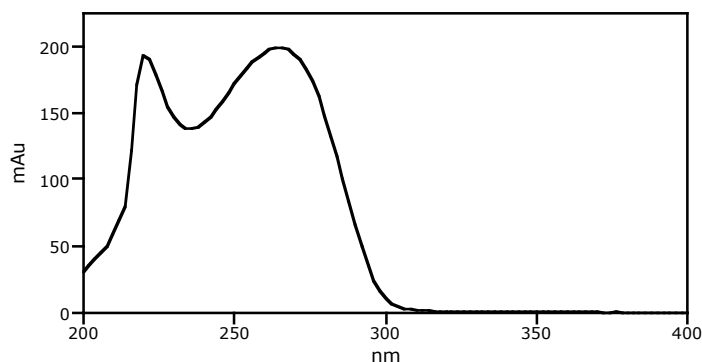
La reacción transcurrió muy rápidamente, observándose una coloración amarilla intensa de forma inmediata y, por cromatografía de HPLC, se comprobó la desaparición total del oligonucleótido de partida después de 5 min de reacción (Figura 110).

<sup>147</sup> Zhong, M.; Rashes, M. S.; Leontis, N. B.; Kallenbach, N. R. "Effects of unpaired bases on the conformation and stability of three-arm DNA junctions" *Biochemistry* **1994**, *33*, 3660.



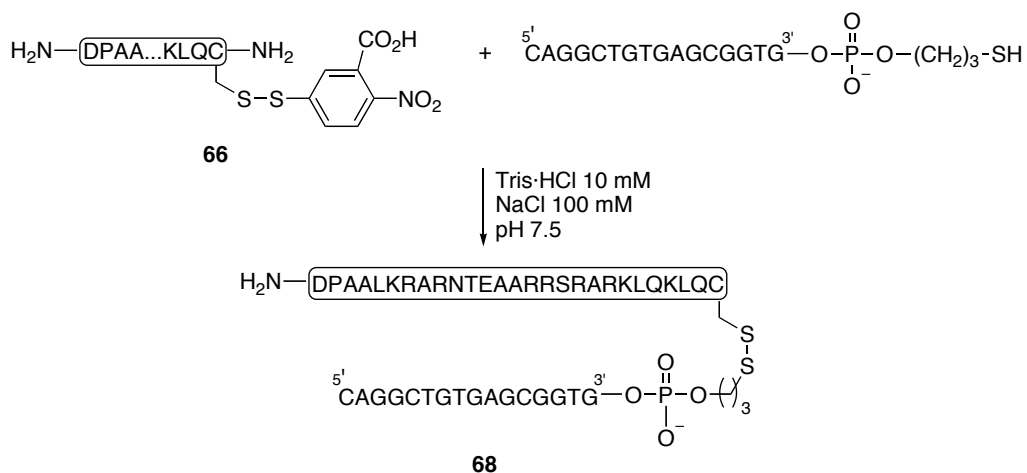
**Figura 110.** Cromatogramas de HPLC del oligonucleótido tiol de partida (a), del péptido **66** (b) y del crudo de reacción al cabo de 5 min.

El compuesto que eluye a 9.1 min y cuyo espectro de UV se muestra en la siguiente figura se purificó, liofilizó e identificó como el híbrido **67** mediante MALDI-TOF: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>269</sub>H<sub>410</sub>N<sub>99</sub>O<sub>132</sub>P<sub>16</sub>S<sub>2</sub> 7703.1, encontrada 7695.2 (50% de rendimiento).



**Figura 111.** Espectro de UV del compuesto **67**.

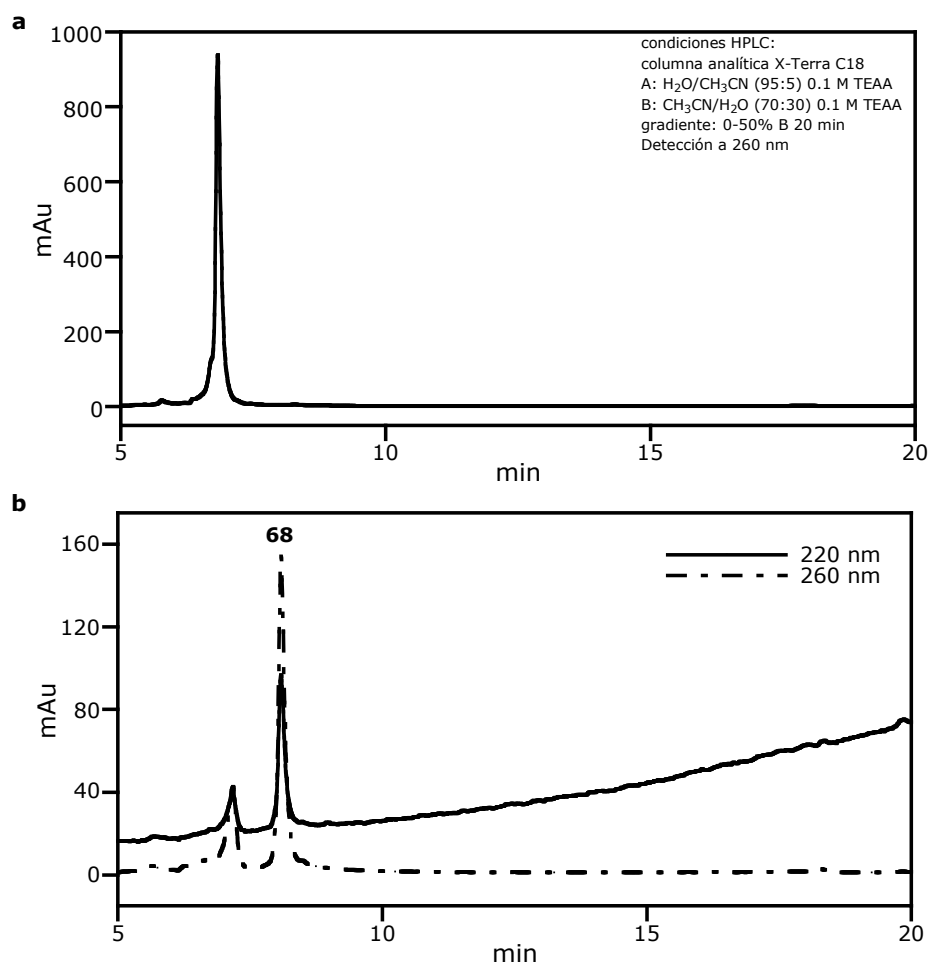
De forma análoga, el péptido **66** se hizo reaccionar con un oligonucleótido que incorpora un fosoramidito modificador tiol en su extremo 3':



Esquema 51

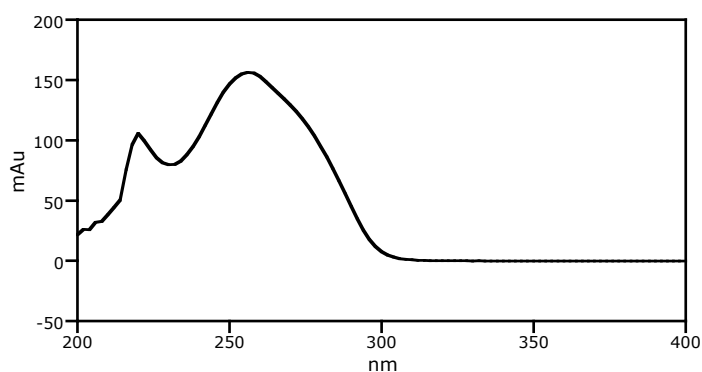
También en este caso la reacción transcurrió rápidamente, observándose por cromatografía de HPLC la desaparición total del oligo después de 5 min de reacción.

Cabe destacar la gran rapidez de estas conjugaciones, sobre todo si se comparan con el mismo tipo de reacción cuando se utilizaban péptidos derivados de la región rica en leucinas de Fos (apartado 1.4 de la sección anterior). Probablemente, esta mayor reactividad esté relacionada con la mayor carga positiva de la región peptídica, que conlleva una interacción electrostática previa a la reacción entre el oligonucleótido y el péptido.



**Figura 112.** Cromatogramas de HPLC correspondientes al oligonucleótido de partida (a) y al crudo de reacción después de 5 min.

En la siguiente figura se muestra el espectro de UV del compuesto que eluye a 8.1 min:



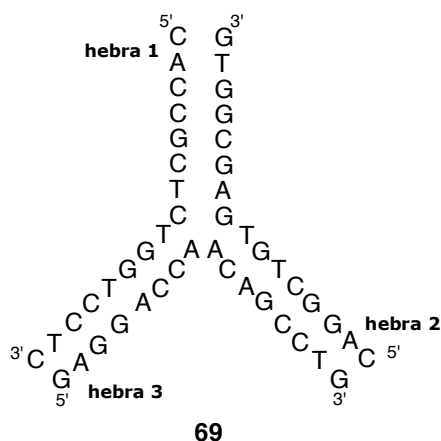
**Figura 113.** Espectro de UV del compuesto **68**.

Como el compuesto que se forma en la reacción eluye con un tiempo de retención similar al del péptido **66**, añadimos oligonucleótido tiol de partida hasta que dejó de consumirse (1.5 equiv más).

El compuesto que eluye a 8.1 min se purificó, se liofilizó y se identificó por espectrometría de masas MALDI-TOF como el conjugado oligonucleótido-péptido **68** (40% de rendimiento):  $[MH]^+$  calculada para  $C_{269}H_{405}N_{102}O_{133}P_{16}S_2$  7870.4, hallada 7867.7.

### 3.5. Estudios de formación del cruce 3H

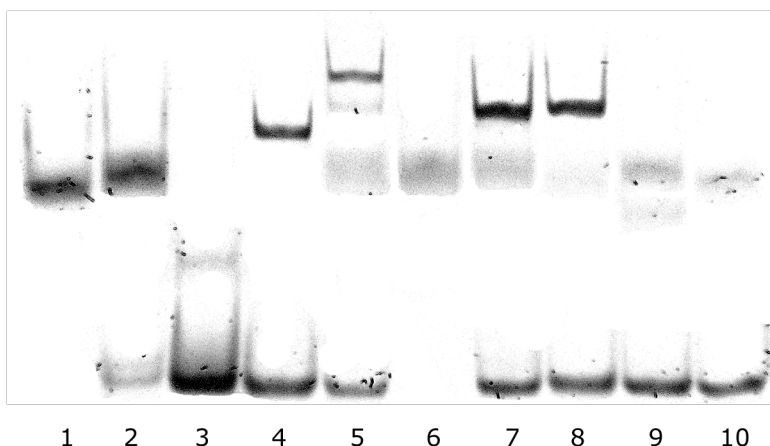
En primer lugar, decidimos comprobar la viabilidad de la formación del cruce en forma de Y con las partes oligonucleotídicas de los híbridos. Para formar estos complejos, es esencial que las hebras que lo formen interactúen con la estequiometría adecuada. En el siguiente esquema se representa el cruce de tipo 3H que queremos obtener.



Esquema 52

Para ello se mezclaron cantidades estequiométricas de las tres hebras de ADN en tampón Tris·HCl 50 mM (pH 7.5) con NaCl 100 mM. La disolución resultante se calentó a 90 °C durante 5 min, se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente y después se enfrió a 4 °C. El análisis de la formación del complejo se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, cuyo resultado se muestra en la Figura 114. En la calle 7 se observa una banda que debe corresponder a la estructura deseada de tipo 3H, ya que migra más lentamente que las hebras de ADN por separado (calles 1-3) y que el complejo formado por dos de las hebras (calle 4). Se incluyen dos calles control correspondientes a un oligonucleótido de 22 bases de doble cadena y un oligonucleótido de 30 bases de cadena sencilla.





**Figura 115.** PAGE 15%. Calle 1: **67** (~450 nM); calle 2: **68** (~450 nM); calle 3: **hebra 3** (~225 nM); calle 4: **69** (~112 nM); calle 5: **70** (~112 nM); calle 6: **67** (~112 nM), **68** (~112 nM), calle 7: **68** (~112 nM), **hebra 1** (~112 nM), **hebra 3** (~112 nM); calle 8: **67** (~112 nM), **hebra 2** (~112 nM), **hebra 3**; calle 9: **68** (~112 nM), **hebra 3** (~112 nM); calle 10: **67** (~112 nM), **hebra 3** (~112 nM).

Estos datos indican que somos capaces de dimerizar de forma eficiente los péptidos utilizando un oligonucleótido externo.

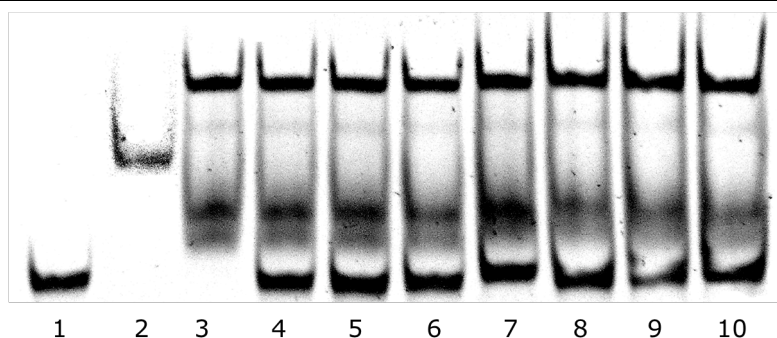
### 3.6. Estudios de interacción con ADNs

Una vez obtenido el complejo **70**, procedimos a realizar un estudio preliminar sobre si sería capaz de interactuar con un ADN conteniendo la secuencia diana de unión del dímero de las regiones básicas de GCN4. Los oligonucleótidos de doble cadena utilizados se prepararon a partir de sus correspondientes oligonucleótidos de cadena sencilla, cuyas secuencias se muestran en la siguiente tabla:

ADNs	SECUENCIAS
1 1C	5'-TGGAGATGACTCATCTCGTT-3' 3'-ACCTCTACTGAGTAGAGCAA-5'
2 2C	5'-TGGAGATGACGTCATCTCGT-3' 3'-ACCTCTACTGCGAGTAGAGCA-5'
3 3C	5'-TGGAGATGACGCTCATCTCG-3' 3'-ACCTCTACTGCGAGTAGAGC-5'
4 4C	5'-GCAGATGACCGGTCATCGC-3' 3'-CGTCTACTGGCGCAGTAGCG-5'

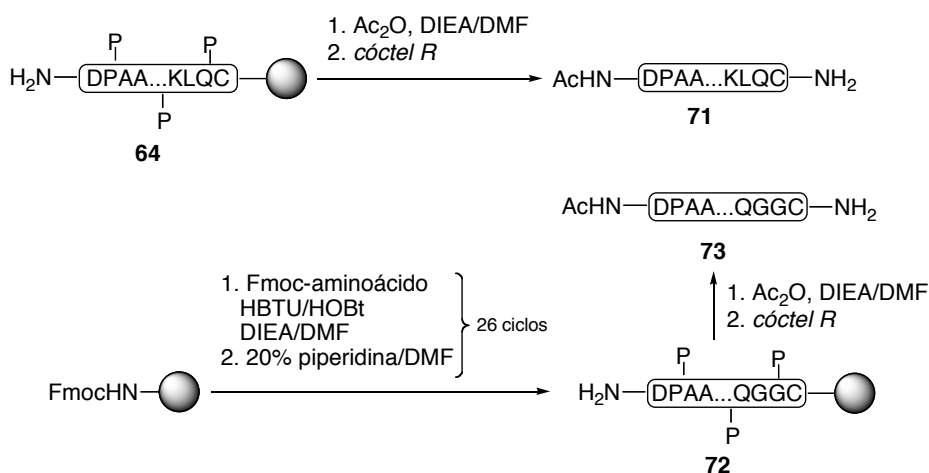
**Tabla 1.** Oligonucleótidos que se utilizarán en los estudios. Se destacan los sitios de unión AP-1.

Para realizar los ensayos se llevaron a cabo experimentos de EMSA a 4 °C utilizando como tampón de incubación 38 mM Tris·HCl (pH 7.5), 90 mM KCl, 1.8 mM MgCl<sub>2</sub> y 1.8 mM de AEDT. Desafortunadamente, como se puede observar en la Figura 116 no se observa la formación de bandas que pudiesen corresponder al complejo deseado con ninguno de los ADNs utilizados (calles 4-7). Utilizando concentraciones superiores de sales (180 mM de KCl y 3.6 mM de MgCl<sub>2</sub>), tampoco se observaron bandas retardadas.

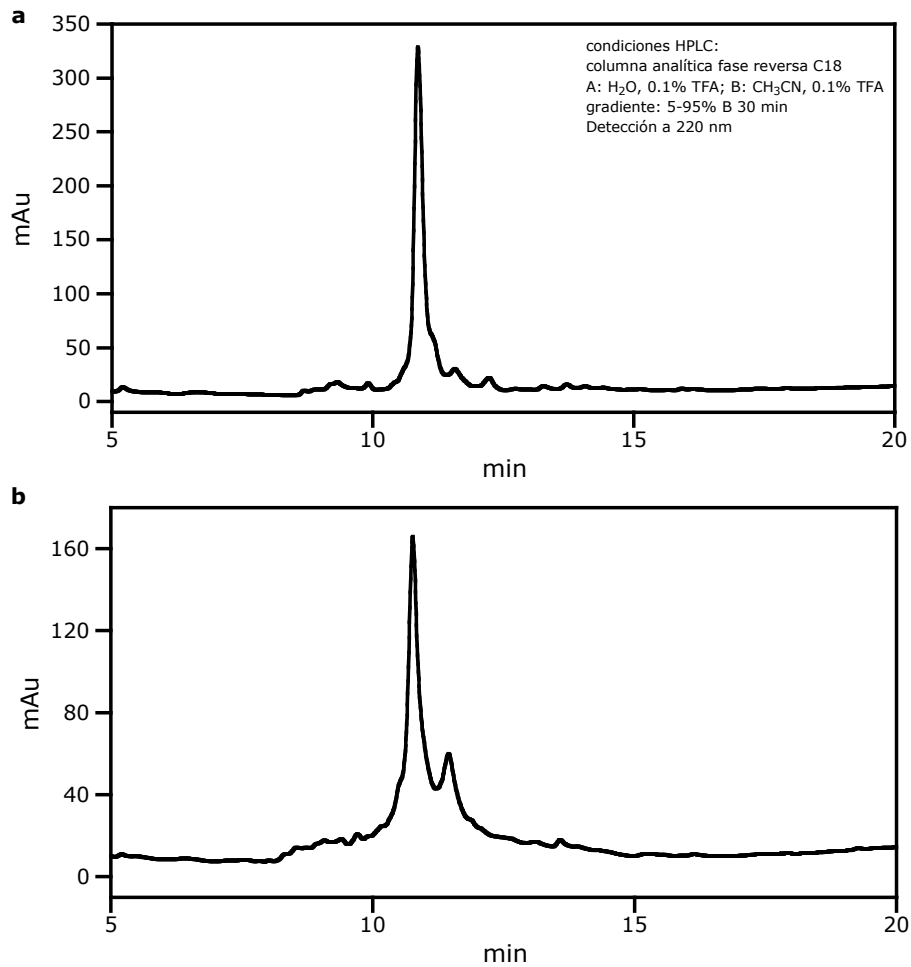


**Figura 116.** PAGE 15%. Calle 1: ADN **3/3C** (~50 nM); calle 2: **69** (~500 nM); calle 3: **70** (~500 nM); calle 4: **70** (~500 nM), **1/1C** (~50 nM); calle 5: **70** (~500 nM), **2/2C** (~50 nM); calle 6: **70** (~500 nM), **3/3C** (~50 nM); calle 7: **70** (~500 nM), **4/4C** (~50 nM); calles 8-10: igual que calles 5-7, pero con el doble de concentración de KCl y MgCl<sub>2</sub>.

Dado que los espaciadores entre la parte oligonucleotídica y peptídica de los híbridos sintetizados tienen diferentes longitudes (el híbrido **67** tiene una cadena de 6 carbonos, mientras que el híbrido **68** tiene una cadena de 3 carbonos), decidimos aumentar en 2 aminoácidos la parte peptídica del híbrido con el espaciador menor, siguiendo el mismo protocolo descrito para la síntesis de la peptidilresina **64**. Asimismo, se acetiló el extremo N-terminal de los péptidos por tratamiento de las resinas con una disolución de anhídrido acético en DMF. La desprotección de las resinas se llevó a cabo de igual forma que en el caso de la resina **64**.

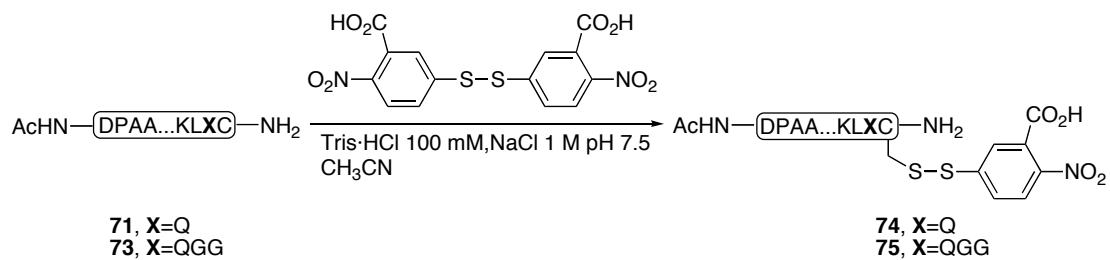


El análisis por HPLC de fase reversa de los residuos obtenidos dio lugar a los cromatogramas que se muestran en la Figura 117. Una vez purificados y liofilizados, se identificaron mediante espectrometría de masas de ESI-TOF:  $[MH]^+$  calculada para **71** C<sub>113</sub>H<sub>204</sub>N<sub>47</sub>O<sub>33</sub>S<sub>1</sub> 2781.2, encontrada 2779.6,  $[MH]^+$  calculada para **73** C<sub>117</sub>H<sub>210</sub>N<sub>49</sub>O<sub>35</sub>S<sub>1</sub> 2895.3, encontrada 2893.2.



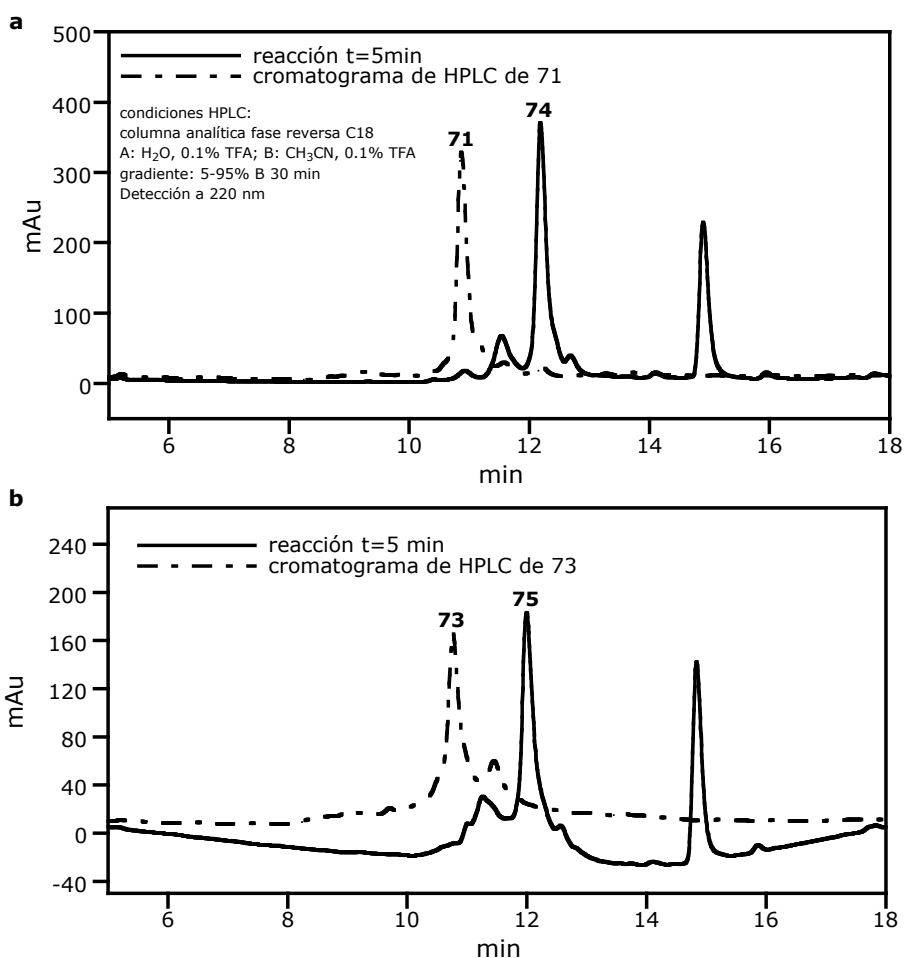
**Figura 117.** Cromatogramas de HPLC de los residuos obtenidos para los péptidos **71** (a) y **73** (b).

Los péptidos obtenidos se hicieron reaccionar con el reactivo de Ellman en una disolución de Tris·HCl 100 mM, NaCl 1 M pH 7.5 y CH<sub>3</sub>CN para obtener los correspondientes péptidos con un grupo tiol activado en su extremo C-terminal:



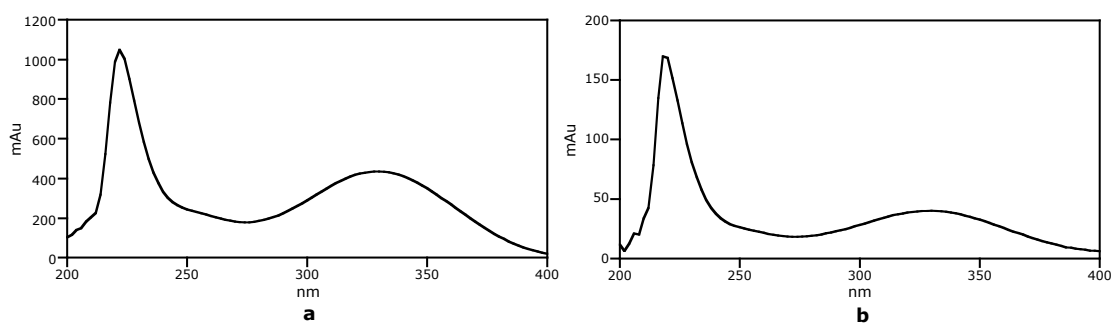
**Esquema 55**

En ambos casos la reacción fue inmediata y por cromatografía de HPLC se puede observar, después de 5 min, la completa desaparición de los péptidos de partida.



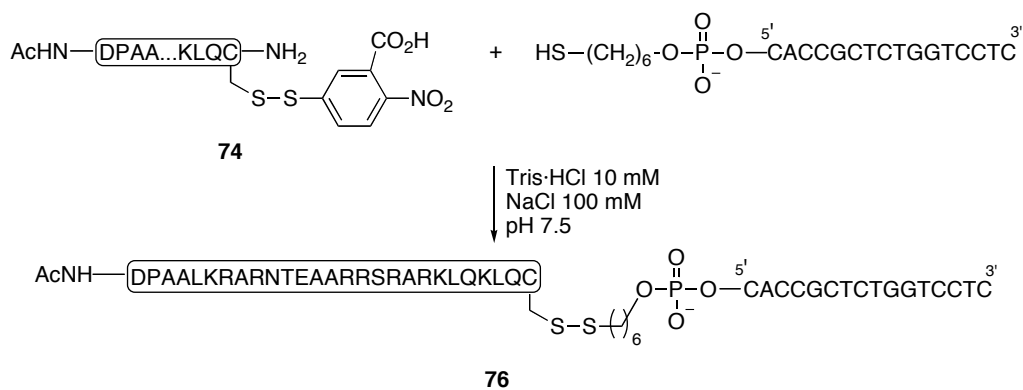
**Figura 118.** Cromatogramas de reacción para la obtención de los péptidos **74** (a) y **75** (b).

Los compuestos con tiempos de retención 12.2 min y 12.0 min se purificaron, liofilizaron e identificaron como los péptidos esperados **74** y **75** mediante ESI-TOF:  $[MH]^+$  calculada para **74**  $C_{120}H_{207}N_{48}O_{38}S_2$  2978.4, encontrada 2976.4;  $[MH]^+$  calculada para **75**  $C_{124}H_{213}N_{49}O_{39}S_2$  3092.5, encontrada 3090.5.



**Figura 119.** Espectros de UV de los péptidos **74** (a) y **75** (b).

La obtención de los conjugados oligonucleótido-péptido se llevó a cabo de la misma forma que en el caso descrito anteriormente para los conjugados **67** y **68**. El péptido **74** se hizo reaccionar con el oligonucleótido con un fosoramidito modificador tiol en 5':



Esquema 56

La reacción transcurrió muy rápidamente: se observó una coloración amarilla intensa de forma inmediata y, por cromatografía de HPLC, se comprobó la desaparición total del oligonucleótido de partida después de 5 min de reacción.

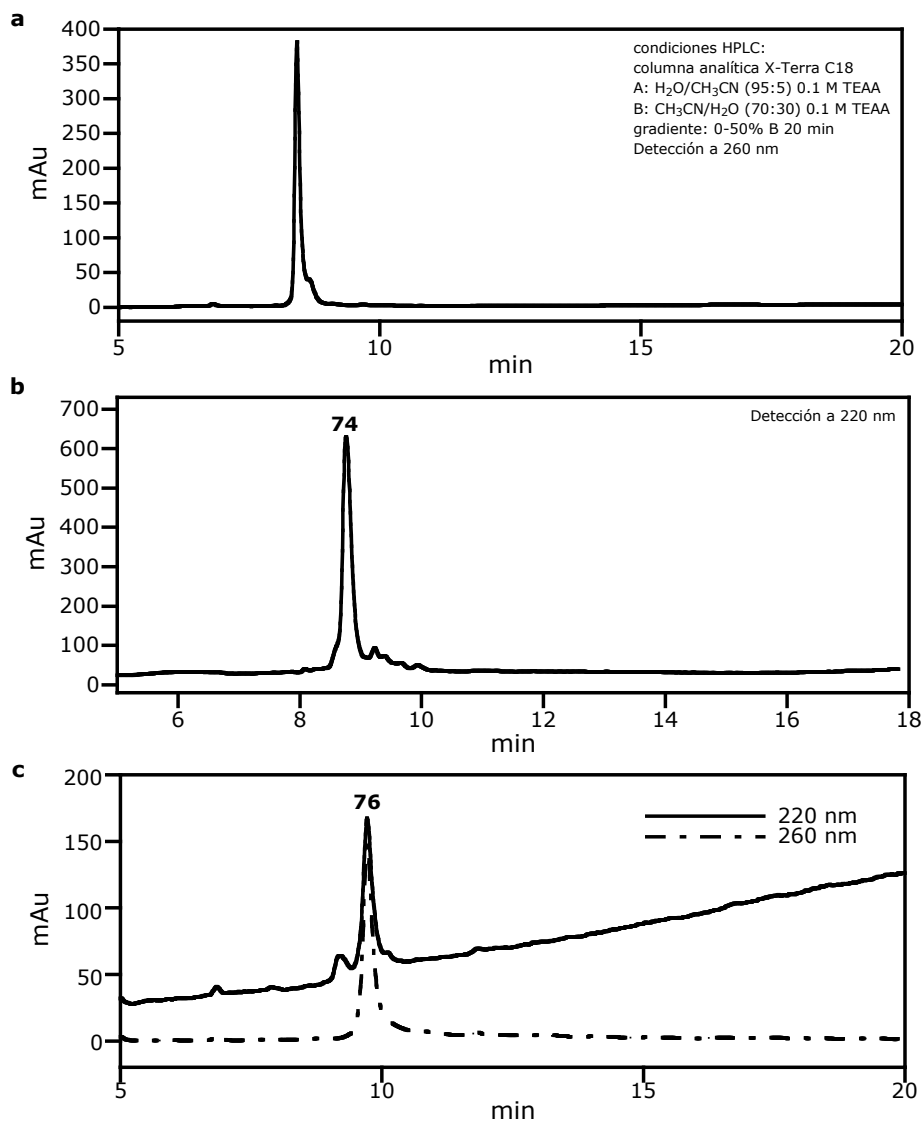
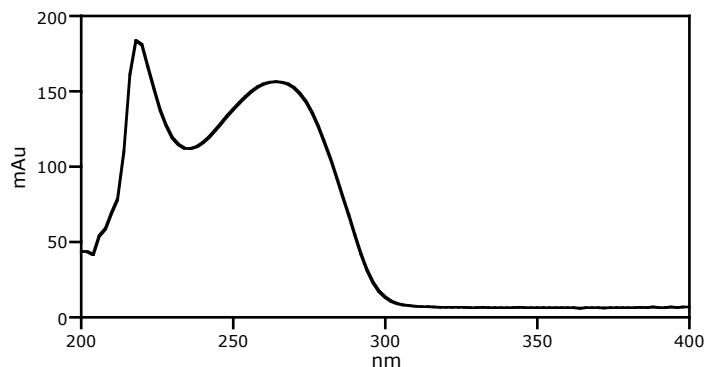


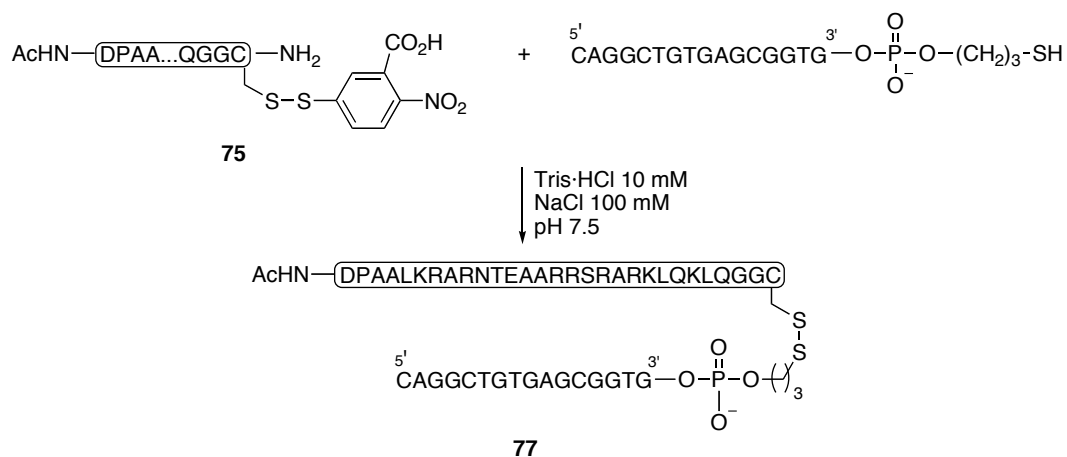
Figura 120. Cromatogramas de HPLC del oligonucleótido de partida (a), del péptido **74** (b) y de la reacción después de 5 min.

El compuesto que eluye a 9.7 min y cuyo espectro de UV se muestra en la siguiente figura se purificó, liofilizó e identificó como el híbrido **76** (33% de rendimiento) por espectrometría de MALDI-TOF:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{271}H_{414}N_{99}O_{133}P_{16}S_2$  7746.3, encontrada 7742.9.



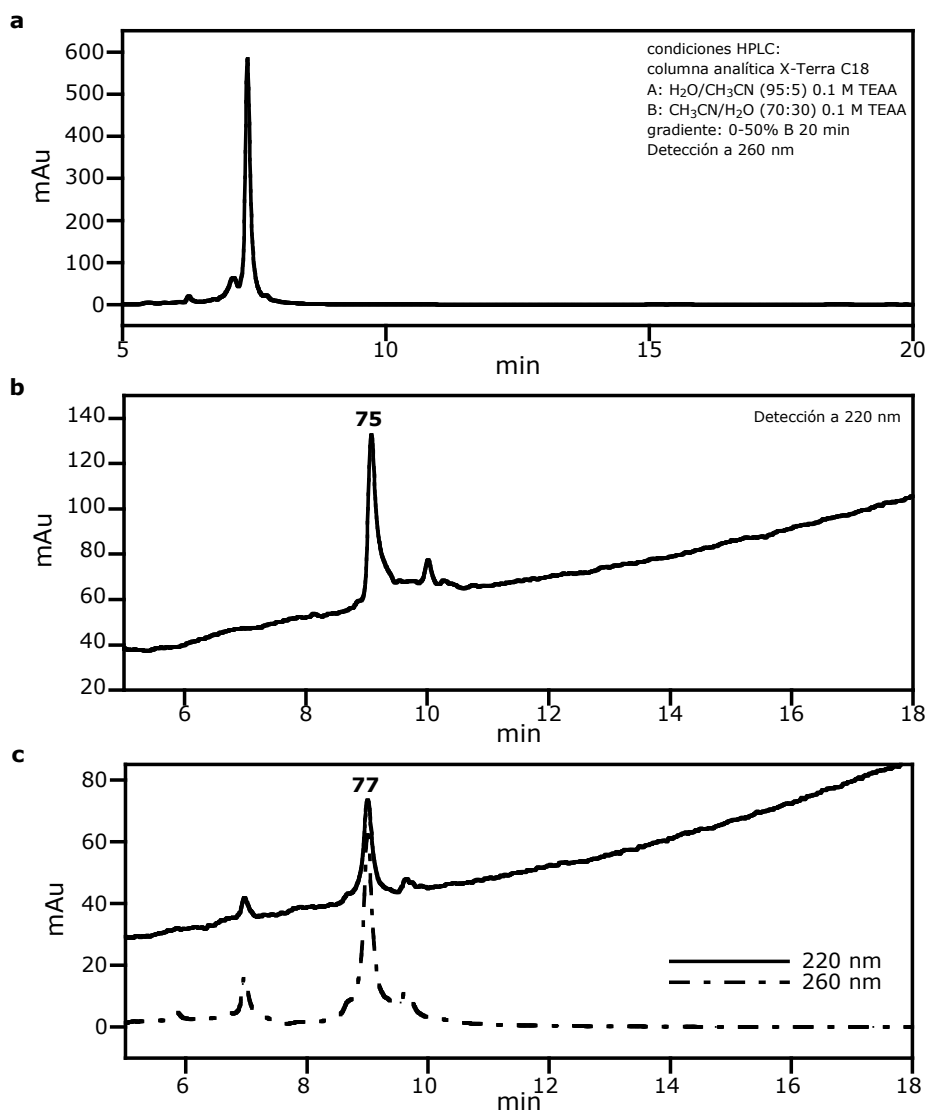
**Figura 121.** Espectro de UV del compuesto que eluye a 9.7 min.

El péptido **75** se hizo reaccionar con el oligonucleótido con un fosoramidito modificador en 3':



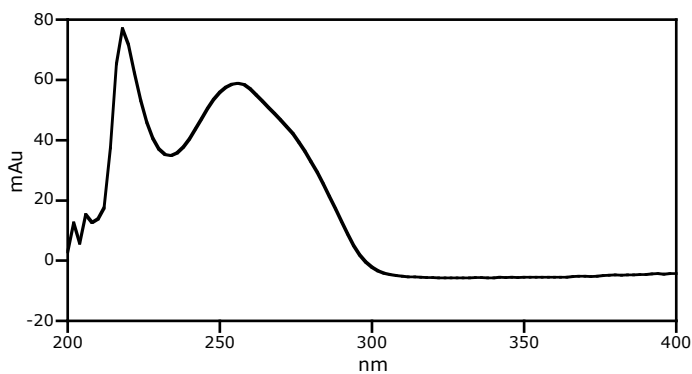
**Esquema 57**

El análisis mediante cromatografía de HPLC permitió comprobar la desaparición total del oligonucleótido de partida después de 5 min de reacción.



**Figura 122.** Cromatograma de HPLC del oligonucleótido de partida (a), del péptido **75** (b) y de la reacción después de 5 min (c).

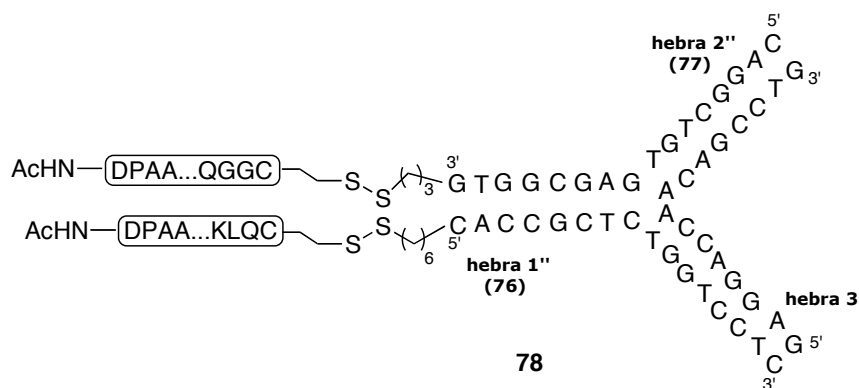
Dado que el nuevo compuesto, cuyo espectro de UV se muestra en la siguiente figura, eluye con un tiempo de retención similar al del péptido **75**, añadimos oligonucleótido tiol de partida hasta que dejó de consumirse (1.5 equiv más).



**Figura 123.** Espectro de UV del compuesto que eluye a 8.9 min.

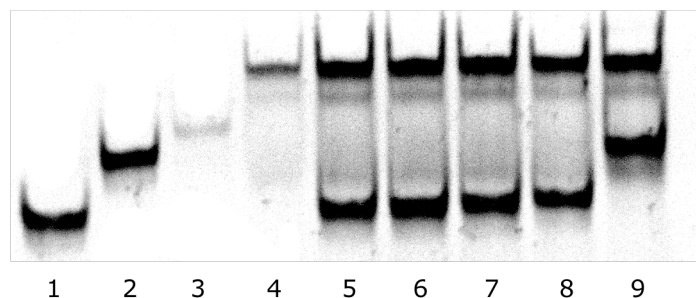
El compuesto que eluye a 8.9 min se purificó, se liofilizó y se identificó por masas MALDI-TOF como el conjugado oligonucleótido-péptido **77**:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{275}H_{415}N_{104}O_{136}P_{16}S_2$  8027.7, hallada 8023.5.

Disponiendo de estos nuevos híbridos procedimos a la síntesis de la estructura supramolecular en forma de Y con los conjugados oligonucleótido-péptido sintetizados (Esquema 58). Para ello, se mezclaron cantidades estequiométricas de los tres componentes en tampón Tris·HCl 50 mM (pH 7.5) con NaCl 100 mM. Se calentó la disolución resultante a 90 °C durante 5 min, se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente y después se enfrió a 4 °C.



**Esquema 58**

En el siguiente gel de electroforesis (Figura 124) se observa la banda correspondiente a la formación del complejo **78** (calle 4). Asimismo, se muestra el resultado de los experimentos de EMSA llevados a cabo con este complejo y con los ADNs de doble cadena señalados en la tabla 1 (calles 5-8). Desafortunadamente, tampoco en este caso hemos observado la formación de bandas de retardo que pudieran indicar una interacción con el ADN diana.



**Figura 124.** PAGE 15% Calle 1: ADN 3/3C (~50 nM); calle 2: ADN 5/5C (ds-5'-GCAGATGACCGCGTCGCGTCATCGC, ~50 nM); calle 3: **69** (~250 nM); calle 4: **78** (~250 nM); calle 5: **78** (~250 nM), 1/1C (~50 nM); calle 6: **78** (~250 nM), 2/2C (~50 nM); calle 7: **78** (~250 nM), 3/3C (~50 nM); calle 8: **78** (~250 nM), 4/4C (~50 nM); calle 9: **78** (~250 nM), 5/5C (~50 nM).

Una posible explicación de la falta de interacción de los dímeros con el ADN diana radicaría en que debido a su estructura básica (cargada positivamente), la región básica del híbrido estaría formando un fuerte complejo intramolecular con la zona nucleotídica, lo que impediría su disponibilidad para interactuar con el ADN externo. Es probable que utilizando un conector más rígido, tipo poliprolina, entre el oligonucleótido y el péptido, o utilizando

péptidos derivados de factores de transcripción menos básicos podamos ser capaces de resolver el problema.

**Por el momento nuestros estudios han permitido comprobar la viabilidad de realizar dimerizaciones de péptidos de forma codificada por un ADN externo.** En estos momentos, en el grupo continúan las investigaciones para tratar de resolver el aspecto funcional de los sistemas supramoleculares obtenidos.

## **V. PARTE EXPERIMENTAL**



## 1. General

### 1.1. Materiales y métodos

Para la síntesis de péptidos, los aminoácidos utilizados, los reactivos de acoplamiento y las resinas provienen de las casas comerciales *Bachem*, *Novabiochem*, *Applied Biosystems* y *GL Biochem (Shanghai) Ltd.*

Los fosforamiditos y reactivos auxiliares empleados en la síntesis de los oligonucleótidos indicados son de *Applied Biosystems* y *Glen Research*.

El resto de oligonucleótidos de cadena sencilla provienen de *Thermo Fisher Scientific* y se emplearon sin mayor purificación.

Las reacciones para la obtención de moléculas pequeñas se llevaron a cabo en atmósfera de Ar (*Ar C-50*, pureza mínima 99.999%), utilizando agitación magnética. Los disolventes se secaron cuando fue requerido por destilación bajo atmósfera de Ar sobre el agente de secado adecuado, siguiendo los procedimientos descritos en el manual de Perrin.<sup>148</sup> Las fases orgánicas de las operaciones de extracción se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida en un rotavapor.

### 1.2. Técnicas y aparatos

El seguimiento de las reacciones para la obtención de moléculas pequeñas se efectuó por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice de tipo 60  $F_{254}$ , de un espesor de capa de 0.2 mm (*Merck*) sobre soporte de aluminio. El análisis de la capa fina se llevó a cabo con una lámpara de UV a 254 nm y por revelado con calor de los cromatofolios previamente tratados con disolución de una de las siguientes disoluciones reveladoras:

*Ce/Mo*: 200 mg de nitrato cérico amónico + 9.6 g de molibdato amónico + 11.2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ .

*Ninhidrina*: 2% ninhidrina en EtOH.

La purificación de los compuestos se llevó a cabo por cromatografía en columna a presión reducida utilizando como fase estacionaria gel de sílice de tipo 60 con un tamaño de partícula de 0.04-0.063 mm (230-400 mesh, *Merck*), empleando como eluyentes mezclas de EtOAc/hexano.

Los espectros de RMN se registraron a 25 °C en un *Bruker DPX-50* (250.13 MHz para  $^1\text{H}$  y 62.89 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Los desplazamientos químicos están expresados en unidades de ppm respecto a la señal del TMS y las constantes de acoplamiento en Hz.

Los espectros de masas de ESI se realizaron en un *Bruker Microtof* o en un *LC/MSD VL* de *Agilent* y los MALDI en un *Bruker Autoflex*.

---

<sup>148</sup> Perrin, D.D.; Amarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals* **1996**, Butterworth-Heinemann, Woburn, MA (E.E.U.U.).

Los oligonucleótidos se sintetizaron, cuando así se indica, en un sintetizador de ADN de *Applied Biosystems* modelo 392.

Para la síntesis automática de péptidos se empleó un sintetizador de *Applied Biosystems* modelo 430A.

La cromatografía de HPLC se llevó a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard Serial 1100 provisto de un detector de diodos utilizando las columnas analíticas *Merck LiChrospher WP 300 RP-18* (5  $\mu\text{m}$ ), *Júpiter WP-300 RP-18* (5  $\mu\text{m}$ ), *Waters XTerra MSC<sub>18</sub>* (2.5  $\mu\text{m}$ ), o la semipreparativa *Nucleosil 120-10 C<sub>18</sub> 250x8* para la purificación de péptidos. Las fases móviles empleadas y las longitudes de onda de detección se especifican en cada caso.

Para la centrifugación de las muestras se utilizó una microcentrífuga *Eppendorf 5415C* no refrigerada.

Las medidas de pH se realizaron en un pHmetro *InoLab pH Level 2*.

Las liofilizaciones se llevaron a cabo en un liofilizador *ThermoSavant Modulyo D* acoplado a una bomba *Edwards RV* de alto vacío.

El agua empleada se utilizó desionizada y purificada en un sistema *Millipore Milli-Q RG*.

Las estructuras de Rayos X utilizadas para la construcción de modelos se obtuvieron del servidor del Protein Data Bank.<sup>149</sup> Los modelos se construyeron con el módulo *Builder* del programa *InsightII* y las representaciones gráficas se hicieron con el programa *WebLab Viewer Pro*.

### **1.3. Ensayos cualitativos para la determinación de aminas libres en la síntesis peptídica en fase sólida**

Los ensayos colorimétricos, en los que alícuotas de la resina se mezclan con disoluciones previamente preparadas, sirven para indicar la presencia o ausencia de determinados grupos funcionales en la resina en función del cambio de color de la resina o de la disolución.<sup>150</sup> A continuación se describen los ensayos mencionados en esta memoria.

#### Test de Kaiser<sup>151</sup>

Permite detectar la presencia de aminas primarias en la resina. Para llevar a cabo el ensayo se preparan las siguientes disoluciones:

*Disolución A:* 40 g de fenol se añaden sobre 10 mL de EtOH. La mezcla se calienta hasta la total disolución del fenol. Una disolución de 65 mg de KCN en 100 mL de H<sub>2</sub>O se añade sobre 100 mL de piridina, previamente destilada sobre ninhidrina. Ambas disoluciones se agitan durante 45 min con Amberlita MB-3, se filtran y se mezclan.

*Disolución B:* 2.5 g de ninhidrina en 50 mL de EtOH. La disolución se conserva en ausencia de luz.

---

<sup>149</sup> La dirección del *Protein Data Bank* es [www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb).

<sup>150</sup> Vázquez, J.; Qushair, G.; Albericio, F. "Qualitative colorimetric tests for solid-phase synthesis" *Methods Enzymol.* **2003**, 369, 21.

<sup>151</sup> Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides" *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595.

Una pequeña alícuota de la resina se transfiere a un tubo de ensayo, se lava con MeOH y se seca. Se añaden 3 gotas de cada una de las disoluciones A y B y se calienta el tubo a 100 °C durante 3 min.

Una coloración amarilla o naranja de la disolución y el color natural de la resina indican la ausencia de aminas primarias y, por tanto, un grado de acoplamiento satisfactorio (ensayo negativo). Una coloración azul oscura o morada de la disolución y de la resina indica la presencia de aminas primarias (ensayo positivo). Es conveniente realizar paralelamente un blanco para comparar las coloraciones.

#### Test NF-31

Se trata de un ensayo muy sensible para determinar la presencia de aminas primarias y secundarias.

El NF-31 se prepara en un procedimiento en tres pasos:

2.0 g del colorante Disperso Rojo 1 y 47 mg de  $[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]$  se disuelven en 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /tolueno (1:1) y la disolución se agita a 40 °C. Se añade lentamente una disolución de 2.64 mL de etildiazoacetato en 13 mL de tolueno y se deja reaccionar toda la noche. La mezcla de reacción se concentra a sequedad y a continuación se añaden 50 mL de HOAc al 10% en un baño de hielo. La mezcla se adsorbe en gel de sílice y se purifica por cromatografía en columna.

1 g del producto purificado en el paso anterior y 870 mg de KOH se disuelven en 60 mL de MeOH/tolueno (15:1). La disolución se agita y se lleva a reflujo (85 °C) durante 90 min. La reacción se deja enfriar y se observa un precipitado rojo. Se concentra hasta un volumen de 10 mL. Se añaden 10 mL de HCl al 10% y 25 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . El precipitado se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , la fase orgánica se lava con  $\text{H}_2\text{O}$  y se seca sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. La mezcla se filtra y el filtrado se concentra y se purifica por cromatografía en columna.

500 mg del producto obtenido y 178 mg de *p*-nitrofenol se disuelven en 26 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se añaden 22 mL de piridina. Sobre esta disolución a -15 °C se añade lentamente una disolución de 222  $\mu\text{L}$  de  $\text{POCl}_3$  en 2 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se deja reaccionar toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lava con una disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y salmuera y se seca sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. El producto se concentra y se purifica por cromatografía en columna.

Para llevar a cabo el ensayo una pequeña alícuota de resina se lava con MeOH y se transfiere a un tubo *ependorf*. Se añaden 200  $\mu\text{L}$  de disolución 0.002 M de NF-31 en acetonitrilo. El tubo se calienta a 70 °C durante 8 min. La resina se lava con MeOH (x3), DMF (x3) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (x3). La coloración roja de las bolas de resina indica la presencia de aminas, mientras que el color natural de las bolas de resina implica un test negativo.

#### Test TNBSA (ácido trinitrobenzenosulfónico)

Este test permite detectar la presencia de aminas primarias y secundarias. Una pequeña alícuota de la resina se lava con MeOH, se transfiere a un tubo *ependorf* y se suspende en DMF. Se añade una gota de una disolución de TNBSA (1% en DMF) y una gota de disolución de DIEA (10% en DMF) y la solución se deja 5 min a temperatura ambiente. Después de

lavar abundantemente con DMF, si la resina presenta un color rojo o naranja, el ensayo es positivo, mientras que si no se colorea, el ensayo es negativo.

#### Test del cloranilo

Este ensayo se utiliza para detectar la presencia de aminas secundarias. Se prepara una disolución saturada de cloranilo (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona) en tolueno. Una pequeña alícuota de resina lavada con MeOH se transfiere a un tubo de ensayo. Se adicionan 200  $\mu$ L de acetona y 50  $\mu$ L de la disolución de cloranilo y se agita a temperatura ambiente 5 min. Una coloración azul o verde de la disolución indica la presencia de aminas secundarias. El ensayo negativo implica una coloración amarilla, ámbar o marrón.

### **1.4. Desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos y desanclaje de la resina en la síntesis de péptidos**

Estas dos operaciones se realizan en una única etapa, bien durante la síntesis para comprobar la pureza del péptido sintetizado hasta el momento, bien finalizada la misma.

El procedimiento se lleva a cabo de la siguiente forma:

Una alícuota de la resina se seca con Et<sub>2</sub>O. Por cada 30 mg de resina se añade 1 mL de una mezcla de TFA y otros reactivos capturadores de carbocationes indicados en cada caso. La mezcla se agita durante 2 h a temperatura ambiente.

La suspensión se filtra para separar la resina de la mezcla de desprotección. Los filtrados se añaden sobre Et<sub>2</sub>O enfriado a -78 °C (10 volúmenes de Et<sub>2</sub>O por cada volumen de mezcla) para que precipite el péptido.

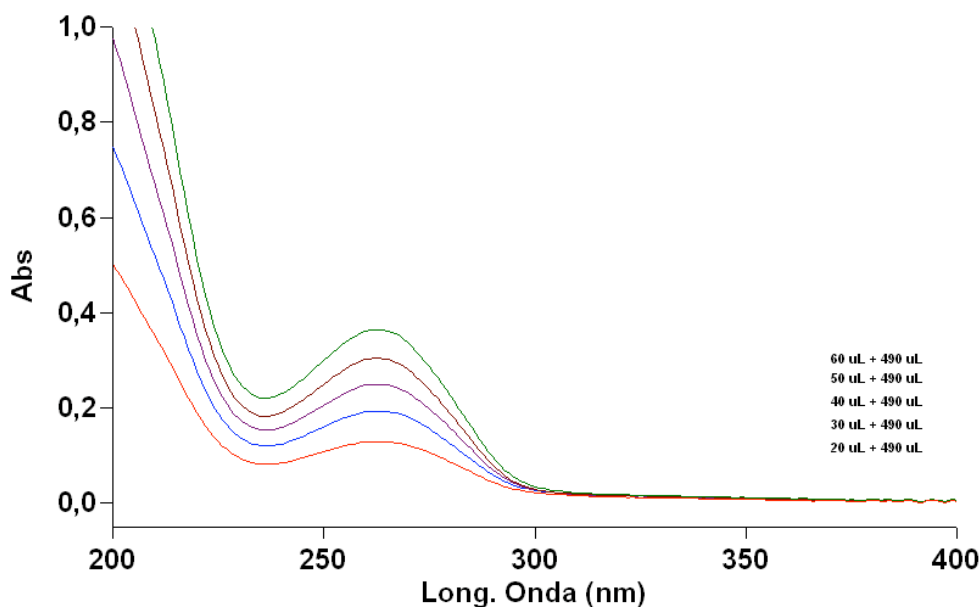
La suspensión del péptido en Et<sub>2</sub>O se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 5 min y se separa a continuación el sobrenadante.

El péptido se lava con Et<sub>2</sub>O y se repite dos veces el paso anterior.

El sólido obtenido se seca bajo una corriente de Ar y se disuelve en H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (1:1) para su análisis por cromatografía de HPLC en fase reversa.

### **1.5. Determinación de las concentraciones de las disoluciones de oligonucleótidos y conjugados oligonucleótido-péptido mediante espectroscopia de UV**

La medida de concentración de las disoluciones de oligonucleótidos y conjugados oligonucleótido-péptido de cadena sencilla se realizó mediante espectroscopia de UV a temperatura ambiente en H<sub>2</sub>O Milli-Q. Para ello se tomaron distintos volúmenes de la disolución madre y se añadieron sobre la cubeta hasta un volumen final determinado. En la Figura 125 se representa una serie de espectros de UV obtenidos al añadir los volúmenes indicados en cada caso (20, 30, 40, 50 y 60  $\mu$ L) en volumen final de 500  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O para el conjugado oligonucleótido-péptido **33**.



**Figura 125.** Determinación de la concentración de un conjugado oligonucleótido-péptido de cadena sencilla.

El cálculo de concentración se efectuó mediante la resolución de la ecuación de Lambert-Beer:

$$[ ] = 10^6 A (V_0 + V) / (\epsilon / V) \mu\text{molL}^{-1}$$

donde **A** es la absorbancia de la disolución, **V<sub>0</sub>** es el volumen inicial (en  $\mu\text{L}$ ), **V** es el volumen de la disolución madre que se va adicionando (en  $\mu\text{L}$ ) y cuya concentración quiere determinarse,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción y **l** es el paso óptico de la cubeta (1 cm).

Dado que los péptidos utilizados no poseen ningún cromóforo, los coeficientes de extinción de los conjugados oligonucleótido-péptido son los del oligonucleótido correspondiente.

La determinación de los coeficientes de extinción de los oligonucleótidos de cadena sencilla se realizó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\epsilon_{260 \text{ nm}} = [(n^\circ \text{ A} \times 15.4) + (n^\circ \text{ T} \times 8.8) + (n^\circ \text{ G} \times 11.7) + (n^\circ \text{ C} \times 7.3)] \times 0.9 (\mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ mL}).$$

La formación de los oligonucleótidos y de los híbridos oligonucleótido-péptido de doble cadena se realizó mezclando cantidades equimoleculares de cada uno de los correspondientes oligómeros complementarios de cadena sencilla, calentando las mezclas a 90 °C durante 10 min, y dejando alcanzar lentamente temperatura ambiente para permitir la formación de la doble hélice de concentración conocida.

## 1.6. Experimentos de electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis es una técnica que permite la separación de sustancias bajo la acción de un campo eléctrico. Las moléculas se hacen pasar a través de un gel, desplazándose a distintas velocidades en función de la relación entre su carga y su masa. La velocidad también está determinada por el tamaño de poro y por la diferencia de potencial aplicada.

Los geles de poliacrilamida son polímeros de acrilamida obtenidos mediante polimerización radicalaria en presencia del agente de entrecruzamiento *N,N'*-metilenbisacrilamida. La proporción de *N,N'*-metilenbisacrilamida determinará su tamaño de poro y las propiedades físicas del gel, que se comportará como una matriz semisólida. Normalmente, se añade persulfato amónico como iniciador de la reacción y *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina (TEMED) como estabilizador de radicales.

En nuestro caso, hemos utilizado la técnica de electroforesis para la caracterización cualitativa y, en algún caso, purificación, de conjugados oligonucleótido-péptido, así como para llevar a cabo experimentos de retardo (EMSA) que permitan comprobar la unión de los híbridos a proteínas o a otras moléculas de ADN, debido a la menor movilidad de los complejos con respecto a los híbridos.

#### Preparación de los geles de poliacrilamida

En los experimentos en los que se utilizaron geles desnaturizantes del 8% de poliacrilamida se procedió según se indica a continuación. En un vaso de precipitados se mezclaron 33.7 g de urea, 37.5 mL de protogel (mezcla 19:1 de acrilamida:*N,N'*-metilenbisacrilamida), 7,5 mL de TBE 10x y H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen de 75 mL. La mezcla se agitó con agitación magnética hasta que la disolución se volvió incolora y cuando alcanzó de nuevo la temperatura ambiente (se produjo un enfriamiento), se añadieron 40 µL de TEMED y 500 µL de persulfato amónico al 10%. La mezcla se agitó brevemente y se introdujo entre las placas (16.5 x 28 cm, de *C.B.S. Scientific Company*), colocándose después el molde para formar los pocillos en los que se cargarán las muestras.

En la mayoría de los experimentos se utilizaron geles no desnaturizantes al 15% de poliacrilamida. Su preparación se llevó a cabo de la siguiente forma: en un matraz erlenmeyer se mezclaron 5.97 mL de H<sub>2</sub>O, 1.2 mL de TBE 5x, 4.74 mL de protogel (mezcla 19:1 de acrilamida:*N,N'*-metilenbisacrilamida), 8 µL de TEMED y 80 µL de persulfato amónico al 10%. La mezcla se agitó brevemente y se introdujo entre las placas (10 x 8 cm, de la casa comercial *Bio-Rad*), colocándose en último lugar el molde para los pocillos en los que se cargarán las muestras.

La composición del TBE 10x es: 0.89 M de base Tris, 0.89 M de ácido bórico, 20 mM de AEDT pH 8.0.

#### Marcaje de los oligonucleótidos con <sup>32</sup>P y formación del ADN de doble cadena

En el caso de los experimentos de electroforesis que se realizaron con oligonucleótidos marcados radiactivamente con <sup>32</sup>P en 5' se siguió el siguiente protocolo de marcaje y anelación.

Se prepararon disoluciones de las hebras de cadena sencilla de concentración 10 µM. A continuación, se prepararon las siguientes disoluciones:

- disolución de marcaje: 1µL de la disolución 10 µM de oligonucleótido de cadena sencilla que se desea marcar + 1 µL de tampón quinasa 10x + 3.5 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q + 4 µL de <sup>32</sup>γ-ATP (5000 Ci/mmol) + 0.5 µL de T-4 polinucleótido quinasa. La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 h y después se calentó a 90 °C durante 10 min para inactivar el enzima.

La T-4 polinucleótido quinasa es el enzima encargado de la transferencia del grupo fosfato del  $^{32}\gamma$ -ATP al extremo 5' del oligonucleótido. La concentración de la quinasa es de 5-10 unidades/ $\mu$ L y la composición del tampón quinasa 1x es: 40 mM Tris·HCl (pH 7.5), 10 mM de  $MgCl_2$  y 5 mM de DTT. Tanto el enzima como el tampón son de *Promega*.

- disolución de cadena complementaria: 2  $\mu$ L de la hebra complementaria 10  $\mu$ M + 1  $\mu$ L de tampón quinasa 10x + 7  $\mu$ L de  $H_2O$ .

Las dos disoluciones se mezclaron y la mezcla se calentó a 90 °C durante 10 min, dejándose enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

#### Preparación e incubación de muestras, desarrollo de los geles y detección

En los experimentos en los que se utilizaron PAGE al 8% en condiciones desnaturizantes, las muestras (0.1-0.5 O. D.) se disolvieron en 10  $\mu$ L de  $H_2O$  y se mezclaron con 10  $\mu$ L de tampón de carga (colorante 2xNaOH BPB). Estos geles se desarrollaron a temperatura ambiente aplicando una diferencia de potencial de 500 V durante 5 h con tampón TBE 0.5x. Se tiñeron con una disolución de 20 mg del colorante *Stains-all* de *Fluka* en 30 mL de formamida y  $H_2O$  hasta un volumen de 200 mL durante 30 min.

En cuanto a los geles de electroforesis al 15% en condiciones no desnaturizantes, el tampón de carga contenía los ADNs de cadena sencilla, los ADNs de doble hebra o los conjugados oligonucleótido-péptido de cadena sencilla o doble (en concentraciones 50 nM-500 nM, según se indica en cada caso) y 38 mM de Tris (pH 7.5), 90 mM de KCl, 1.8 mM de  $MgCl_2$ , 1.8 mM de AEDT y 9% de glicerol. Estos geles se desarrollaron a la temperatura especificada aplicando una diferencia de potencial de 140 V durante 60 min en una disolución de TBE 0.5x. Se tiñeron con una disolución de 5  $\mu$ L de *SYBR Gold* de *Molecular Probes* en 50 mL de TBE 1x y se visualizaron con un transiluminador *UVP* de  $\lambda = 302$  nm.

Para realizar los experimentos de EMSA se utilizaron este último tipo de geles. Las reacciones de incubación se llevaron a cabo con los conjugados oligonucleótido-péptido de doble cadena (~100 nM) en una mezcla conteniendo 38 mM de Tris (pH 7.5), 90 mM de KCl, 1.8 mM de  $MgCl_2$ , 1.8 mM de AEDT, 9% de glicerol, 0.11 mg/mL de BSA (seroalbúmina bovina) y 2.2% de NP-40 (octiltoxipolietoxietanol). Las incubaciones se llevaron a cabo durante 30 min (a 4 °C o temperatura ambiente). Los geles se desarrollaron a la temperatura especificada aplicando una diferencia de potencial de 140 V durante 70 min en una disolución de TBE 0.5x. La tinción se realizó de igual manera que en el caso anterior. Cuando los experimentos de EMSA se realizaron con oligonucleótidos marcados con  $^{32}P$ , se utilizó el mismo tampón de carga, pero con concentraciones de los oligonucleótidos de doble cadena o híbridos de doble cadena de ~90 pM. En este caso, después de desarrollar los geles, estos se fijaron por tratamiento con una disolución al 33% de MeOH y 10% de AcOH, se secaron y se autorrevelaron en una placa fotográfica a -80 °C.



los procedimientos generales (pág. 146) y se analizaron por cromatografía de HPLC en fase reversa y espectrometría de MALDI-TOF.

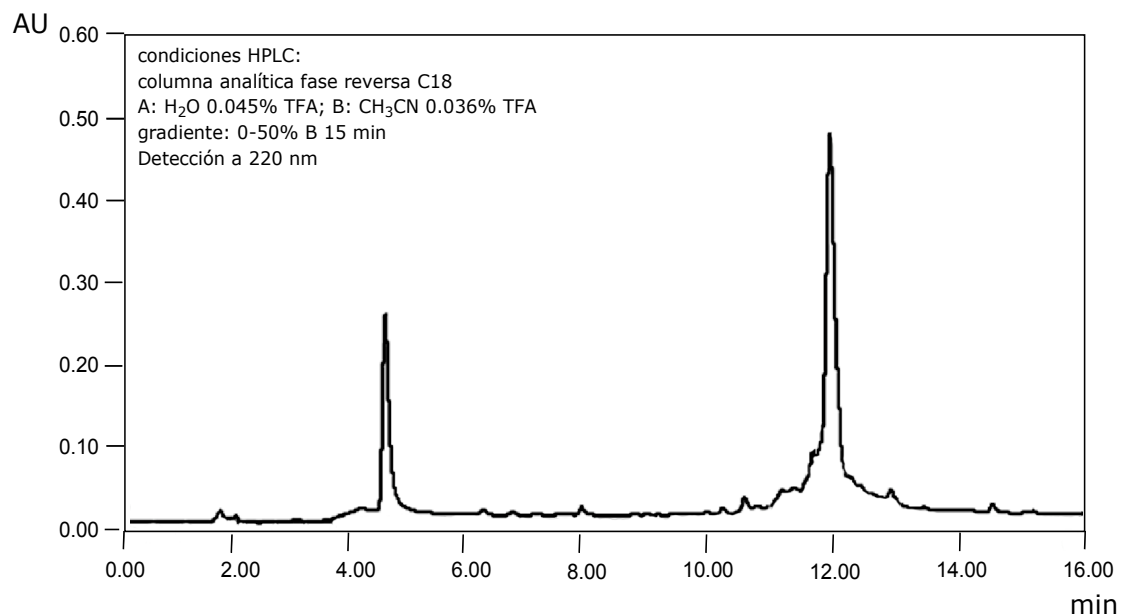
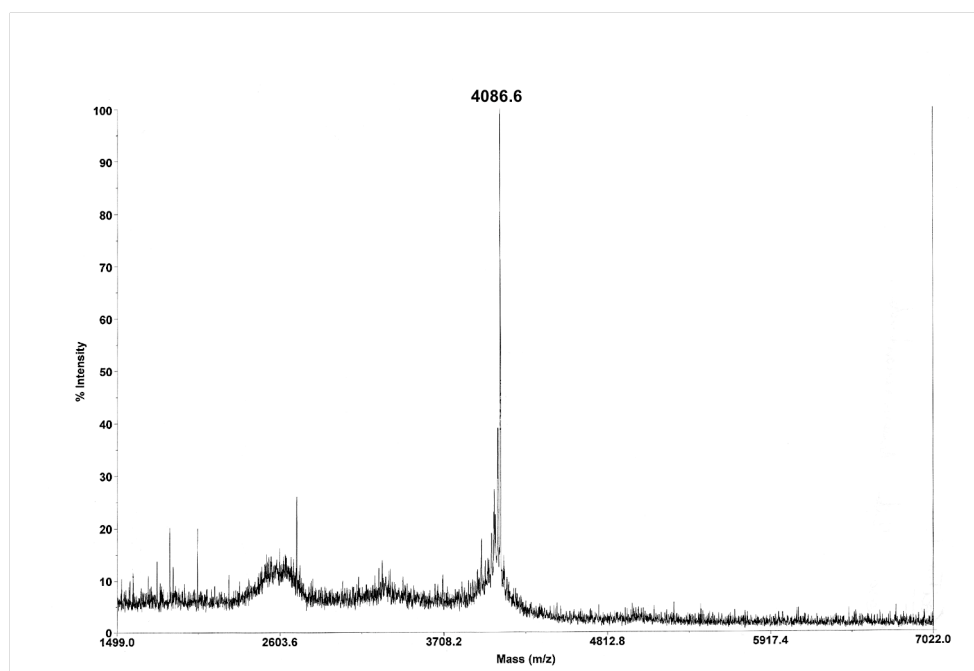
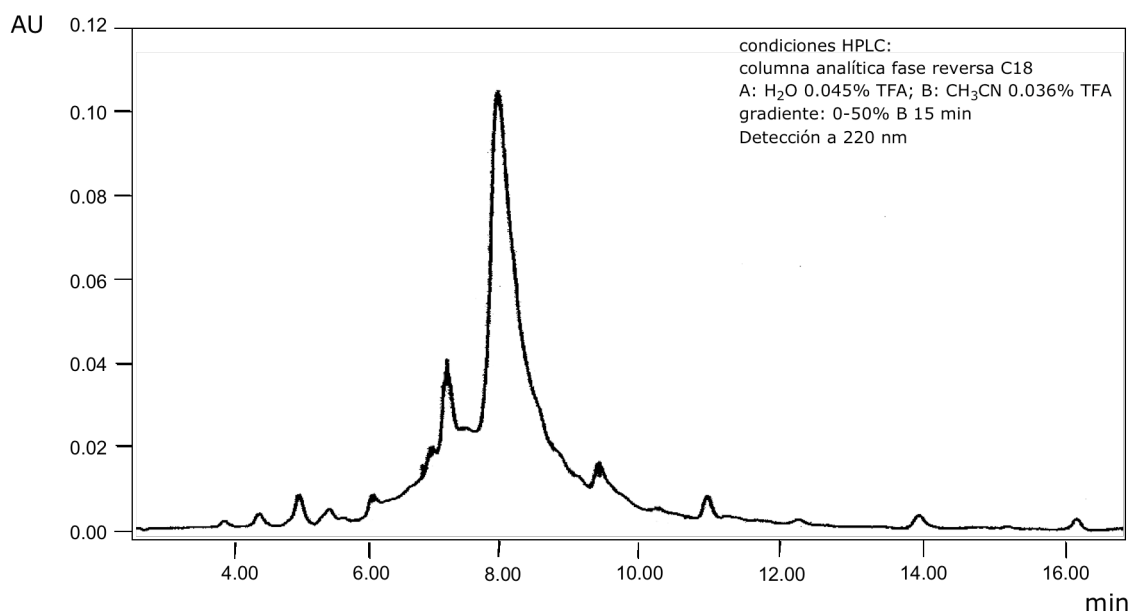


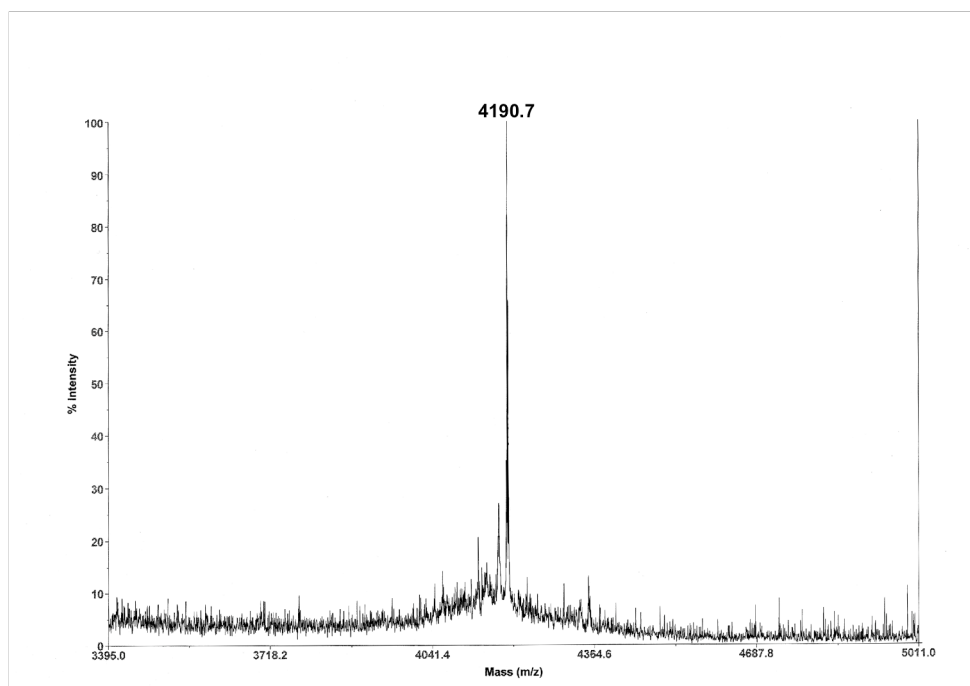
Figura 126. Cromatograma de HPLC del residuo obtenido para el péptido **3**.



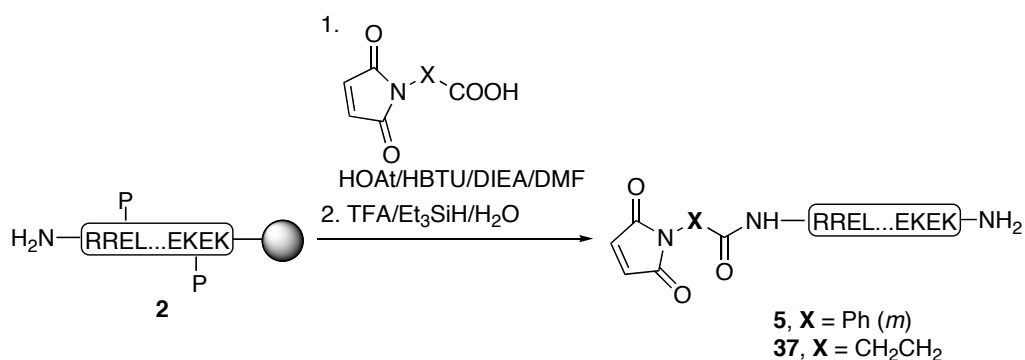
**EM-MALDI-TOF** para el péptido **3**: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>172</sub>H<sub>295</sub>N<sub>50</sub>O<sub>64</sub>: 4087.6, encontrada: 4086.6.



**Figura 127.** Cromatograma de HPLC del residuo obtenido para el péptido **11**.

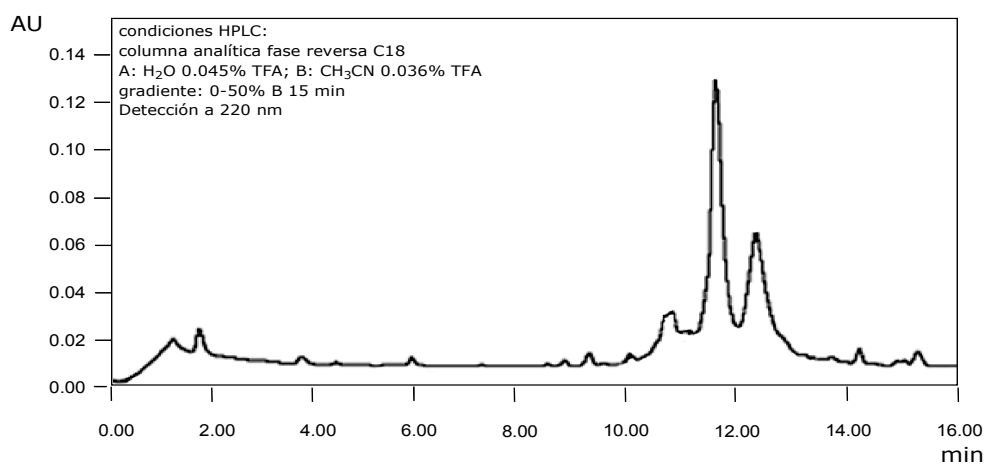


**EM-MALDI-TOF** para el péptido **11**:  $[MH]^+$  calculada para C<sub>175</sub>H<sub>300</sub>N<sub>51</sub>O<sub>65</sub>S<sub>1</sub>: 4190.7, encontrada: 4190.2.

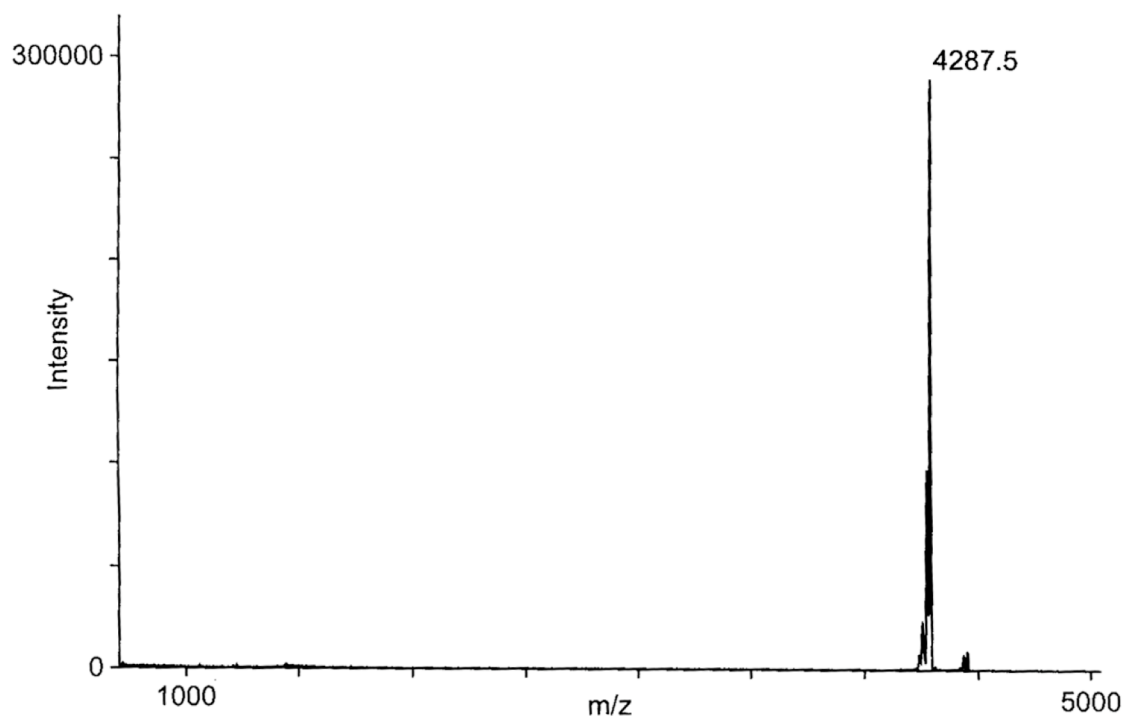
Síntesis de los péptidos-maleimido **5** y **37**

Dos alícuotas de la peptidilresina **2** (50 mg cada una, ~0.01 mmol) se suspendieron en DMF y las mezclas se agitaron durante 30 min. En una de ellas se acopló el ácido *m*-N-maleimido benzoico (11.0 mg, 0.05 mmol, 5 equiv) por tratamiento con HOAt (6.8 mg, 0.05 mmol, 5 equiv), HBTU (19.0 mg, 0.05 mmol, 5 equiv) y DIEA (17  $\mu$ L, 0.1 mmol, 10 equiv). En la otra alícuota se acopló de manera análoga la N-maleoílo- $\beta$ -alanina (8.5 mg, 0.05 mmol, 5 equiv). En ambos casos, la mezcla resultante se agitó durante 60 min y a continuación se lavó la resina con DMF (3 x 5 min) y Et<sub>2</sub>O (2 x 5 min), se secó y se desprotegió por tratamiento con TFA/Et<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O (95:3:2, 1.25 mL, 2 h). Los péptidos obtenidos se purificaron por cromatografía de HPLC en fase reversa, se liofilizaron y analizaron por espectrometría de masas.

Péptido **5** [6.3 mg, ~16% de rendimiento].

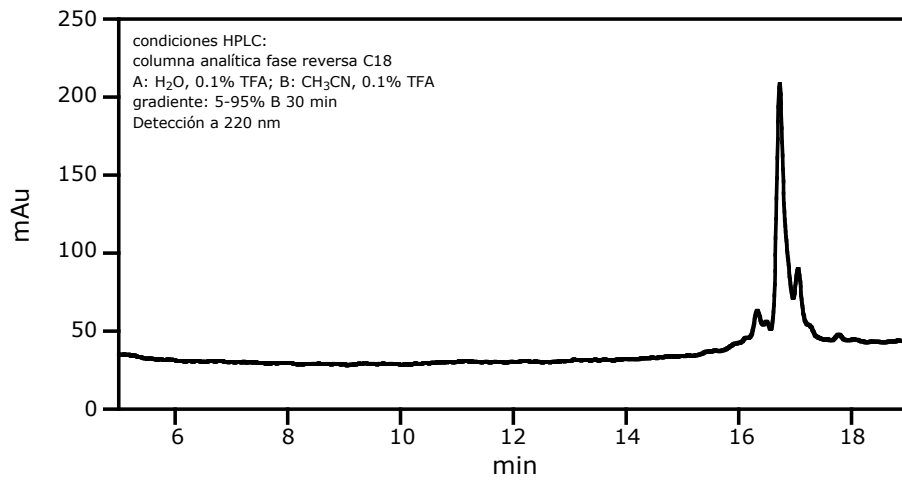


**Figura 128.** Cromatograma de HPLC del crudo de reacción del péptido **5**.

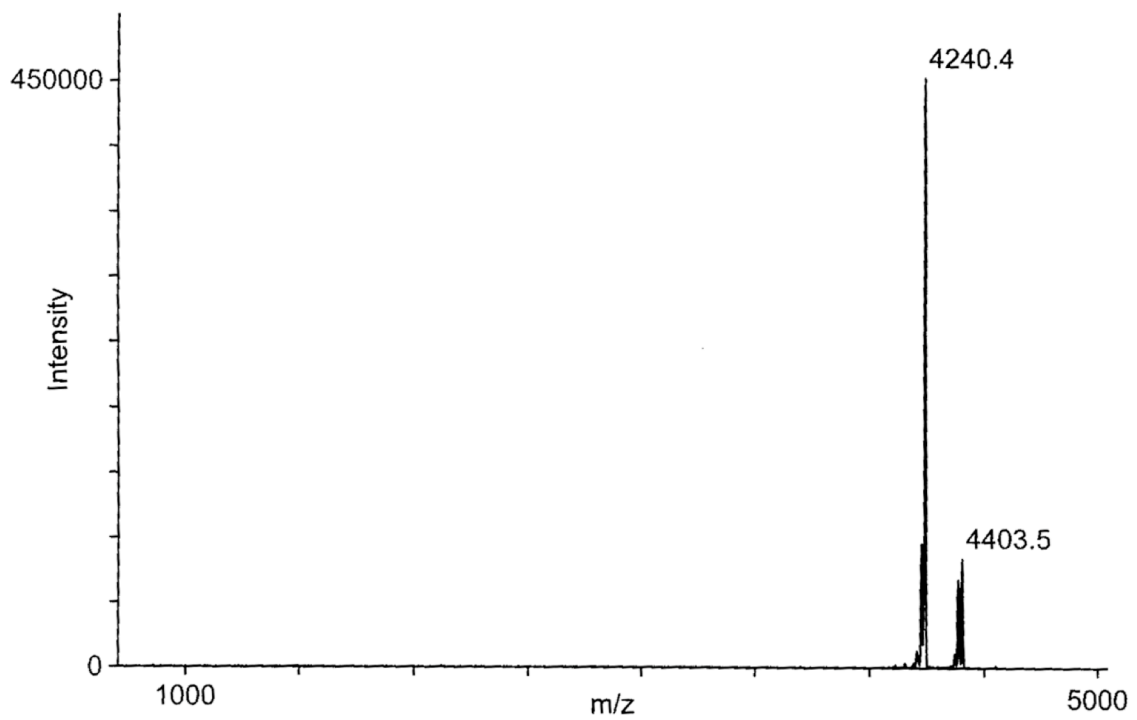


**EM-MALDI-TOF** para el péptido **5**:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{183}H_{300}N_{51}O_{67}$  4286.8, encontrada 4287.5.

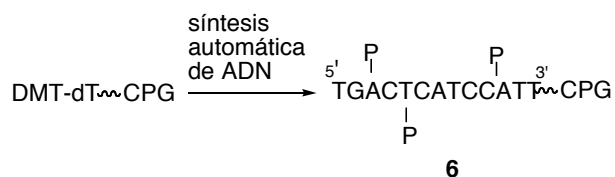
Péptido **37** [4.7 mg, ~12% de rendimiento].



**Figura 129.** Cromatograma de HPLC para el crudo de reacción del péptido **37**.



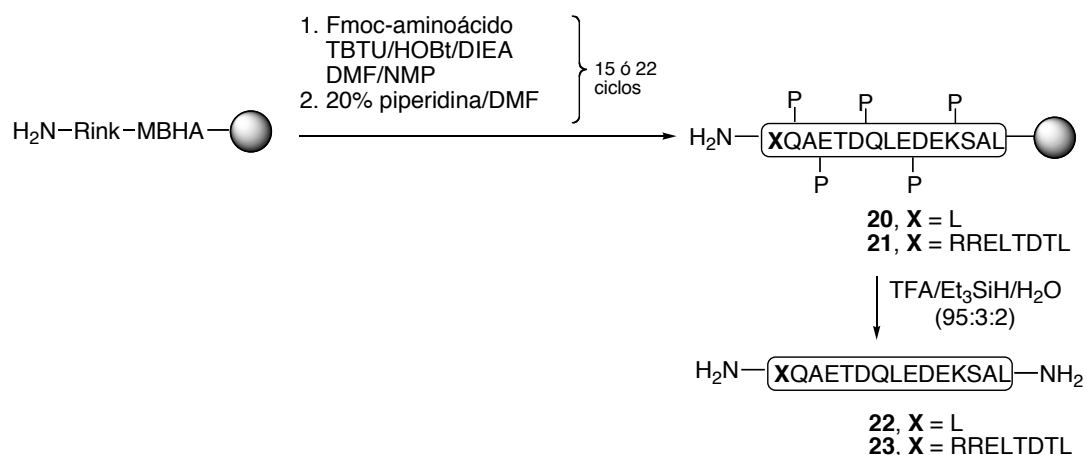
**EM-MALDI-TOF** para el péptido **37**:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{179}H_{300}N_{51}O_{67}$  4238.7, encontrada 4240.4.

**Síntesis automática del oligonucleótido 6**

La síntesis del oligonucleótido **6** se llevó a cabo en un sintetizador automático de ADN utilizando 2-cianoetilfosforamiditos estándar, protegidos en su extremo 5' con DMTr y en las nucleobases con benzoílo (A y C) e isobutirilo (G). La elongación del oligonucleótido se llevó a cabo en un soporte de bolas de vidrio (35 mg, ~1  $\mu\text{mol}$ ) que incorpora el primer nucleósido protegido. Los acoplamientos se llevaron a cabo en atmósfera de Ar con 0.02 mmol (20 equiv) del fosforamidito. En la siguiente tabla se muestra el ciclo de síntesis seguido hasta obtener la secuencia deseada.

OPERACIÓN	REACTIVO/DISOLVENTE	TIEMPO	REPETICIÓN
Lavado	CH <sub>3</sub> CN	10 s	1
Destritilación	2% TCA en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	11 s	4
Lavado	CH <sub>3</sub> CN	15 s	2
Secado	Argón	5 s	1
Acoplamiento	0.1 M fosforamidito/0.4 M tetrazol en CH <sub>3</sub> CN	30 s	1
Acetilación	Ac <sub>2</sub> O/lutidina/THF (1:1:8) 0.1 M N-metilimidazol	20 s	1
Oxidación	0.05 M I <sub>2</sub> en THF/H <sub>2</sub> O/piridina (7:2:1)	30 s	1
Lavado	CH <sub>3</sub> CN	10 s	4
Secado	Argón	5 s	1



Síntesis automática de los péptidos **22** y **23**

La síntesis automática de las peptidilresinas **20** y **21** se realizó en un sintetizador de péptidos utilizando como soporte sólido una resina Rink amida MBHA con una carga teórica inicial de 0.66 mmol/g (152 mg, ~0.1 mmol). Los acoplamientos se llevaron a cabo con los Fmoc-aminoácidos protegidos en sus cadenas laterales (1 mmol, 10 equiv), previamente activados con TBTU/HOBt (0.5 M en DMF) y la base DIEA (2 M en N-metilpirrolidona). La desprotección del grupo Fmoc se llevó a cabo con piperidina (20% en NMP) y los lavados, con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y NMP. Una vez completado el ciclo de síntesis, pequeñas alícuotas de las resinas **2** y **10** se desprotegieron por tratamiento con la mezcla TFA/Et<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O como se indica en los procedimientos generales (pág. 146) y se analizaron por cromatografía de HPLC en fase reversa y espectrometría de MALDI-TOF.

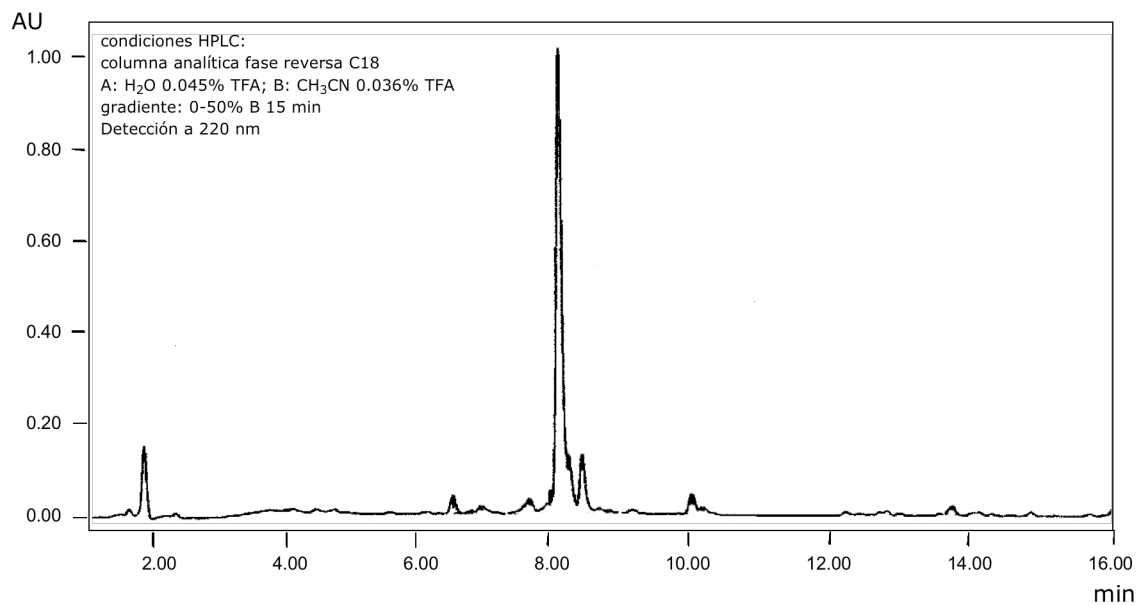
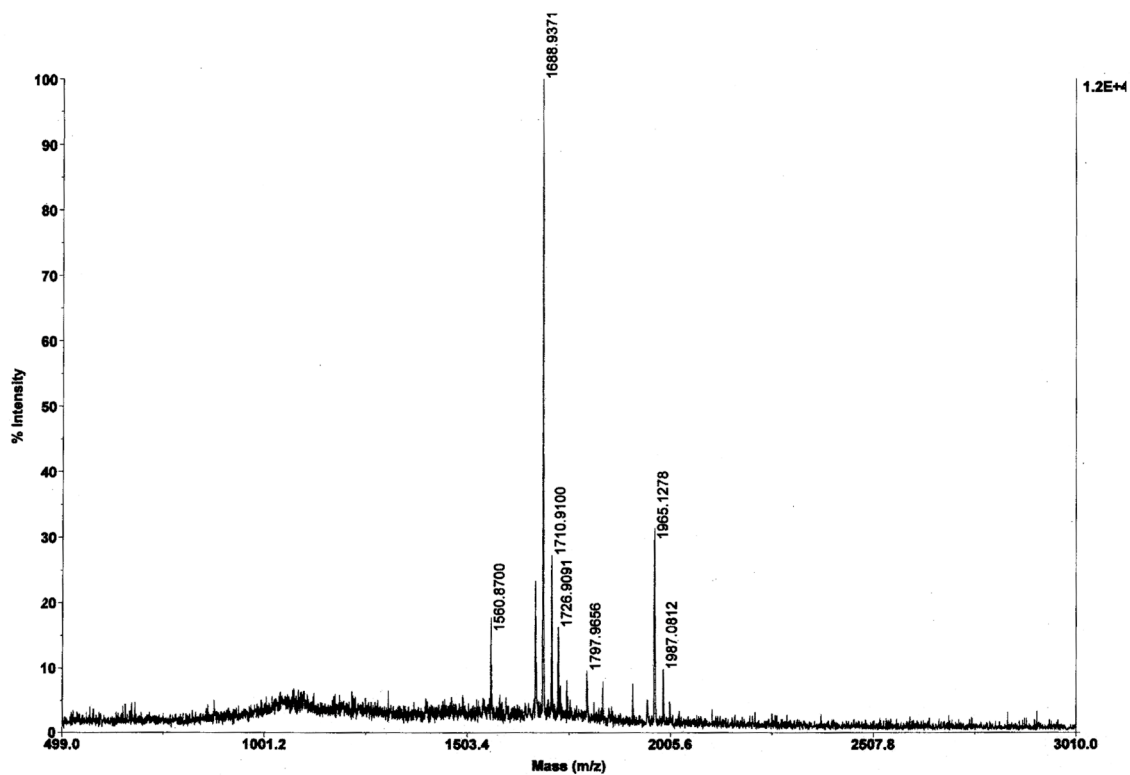
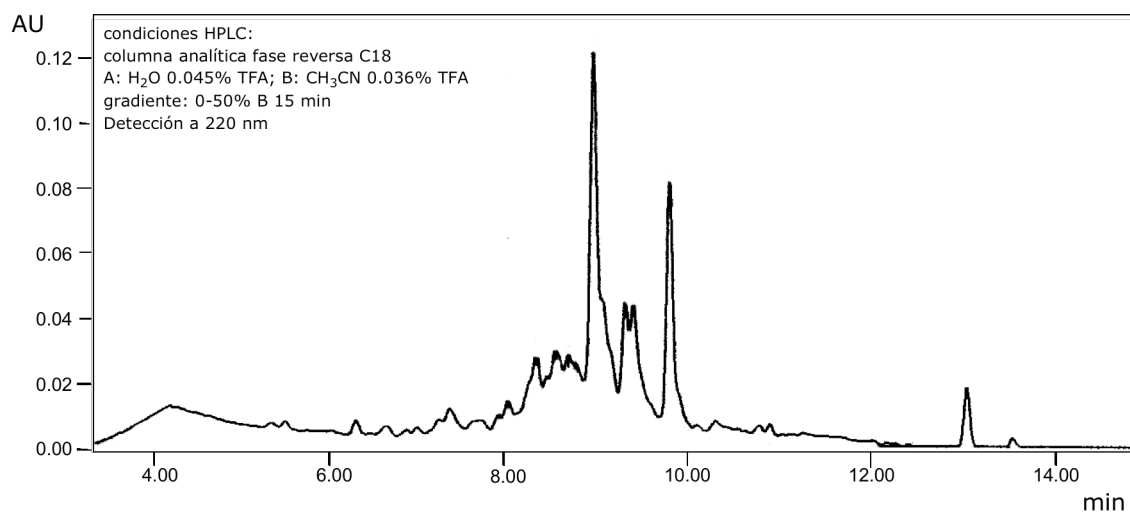


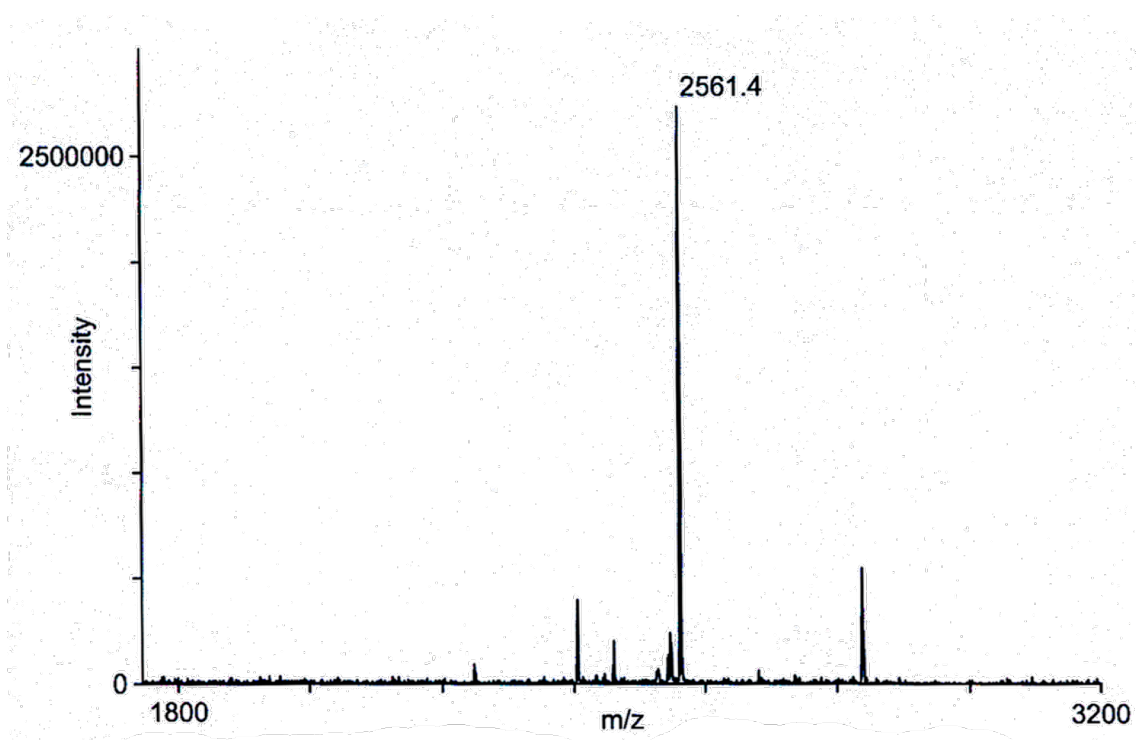
Figura 130. Cromatograma de HPLC del residuo obtenido para el péptido **22**.



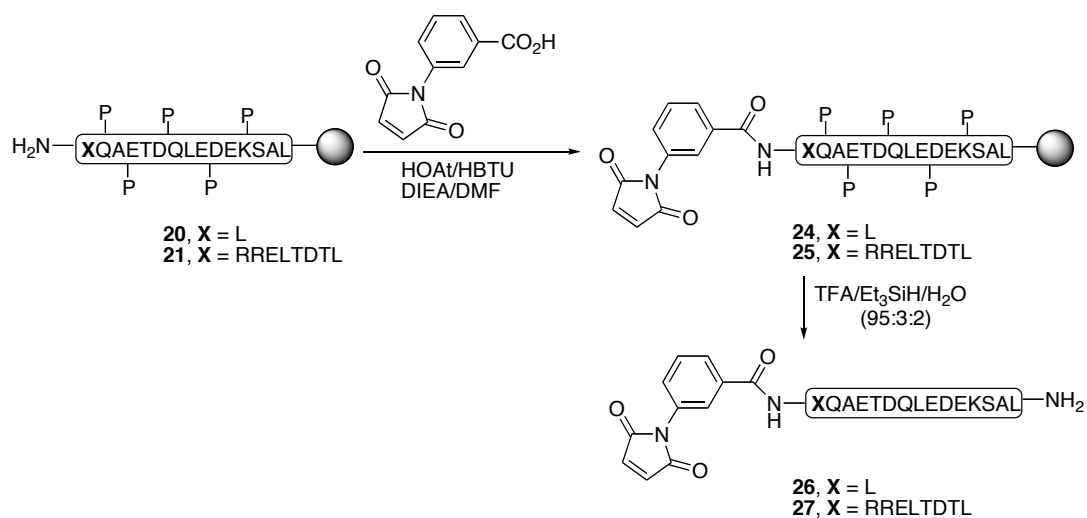
**EM-MALDI-TOF** para el péptido **22**:  $[MH]^+$  calculada para C<sub>70</sub>H<sub>118</sub>N<sub>19</sub>O<sub>29</sub> 1689.8, encontrada 1688.9.



**Figura 131.** Cromatograma de HPLC del residuo obtenido para el péptido **23**.



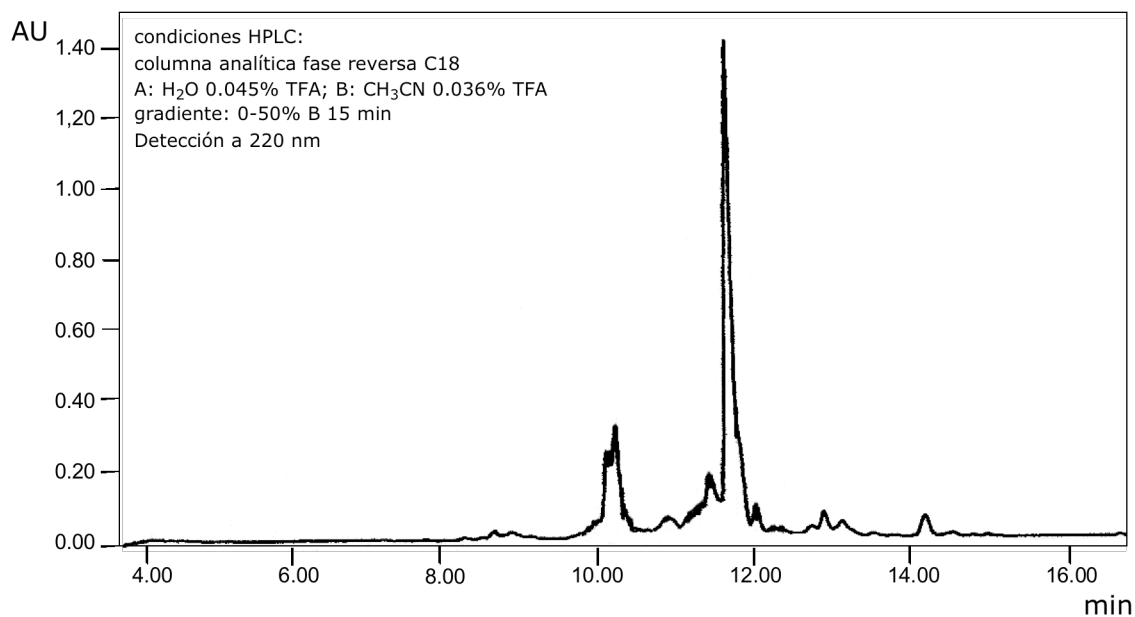
**EM-MALDI-TOF** para el péptido **23**:  $[MH]^+$  calculada para C<sub>105</sub>H<sub>179</sub>N<sub>32</sub>O<sub>42</sub> 2561.8, encontrada 2561.4.

Síntesis de los péptidos-maleimido **26** y **27**

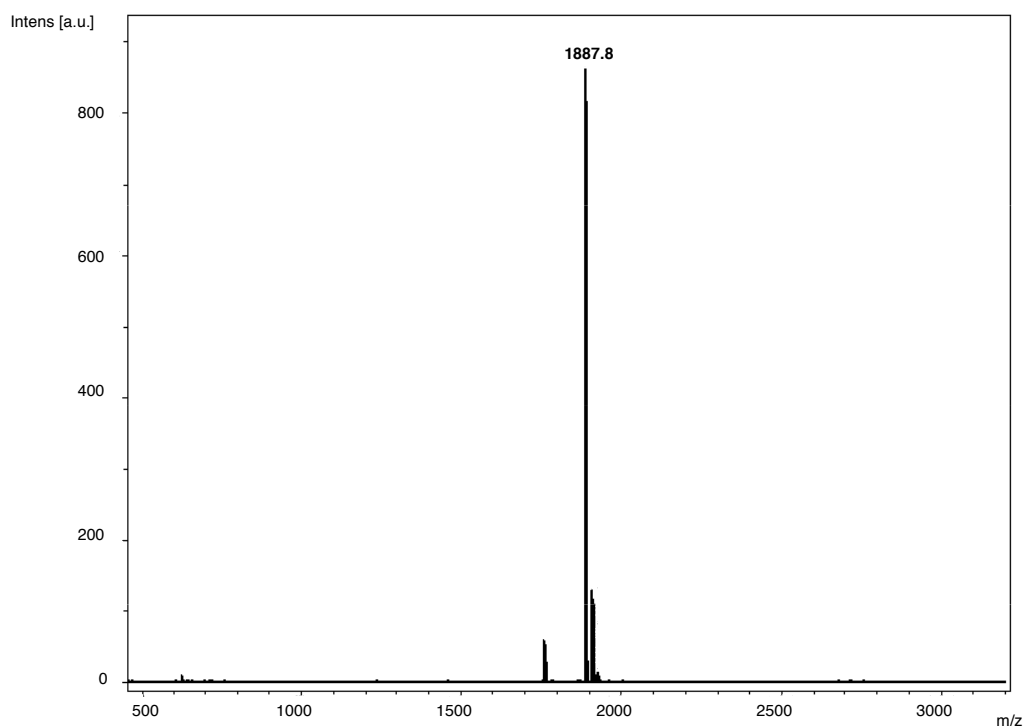
El procedimiento experimental seguido se ejemplifica para la síntesis de **26**.

Una alícuota de la resina **20** (80 mg, ~0.03 mmol) se suspendió en DMF y se agitó durante 30 min. A continuación se acopló el ácido *m*-N-maleimido benzoico (36.5 mg, 0.15 mmol, 5 equiv) por tratamiento con HOAt (22.7 mg, 0.15 mmol, 5 equiv), HBTU (63.2 mg, 0.15 mmol, 5 equiv) y DIEA (57  $\mu\text{L}$ , 0.3 mmol, 10 equiv) en DMF (0.6 mL). La mezcla resultante se agitó durante 60 min y a continuación se lavó la resina con DMF (3 x 5 min) y Et<sub>2</sub>O (2 x 5 min), se secó y se desprotegió por tratamiento con TFA/Et<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O (95:3:2, 2 mL, 2 h). Los péptidos obtenidos se purificaron por cromatografía de HPLC en fase reversa, se liofilizaron y analizaron por espectrometría de masas.

Péptido **26** [11.3 mg, ~20% de rendimiento].

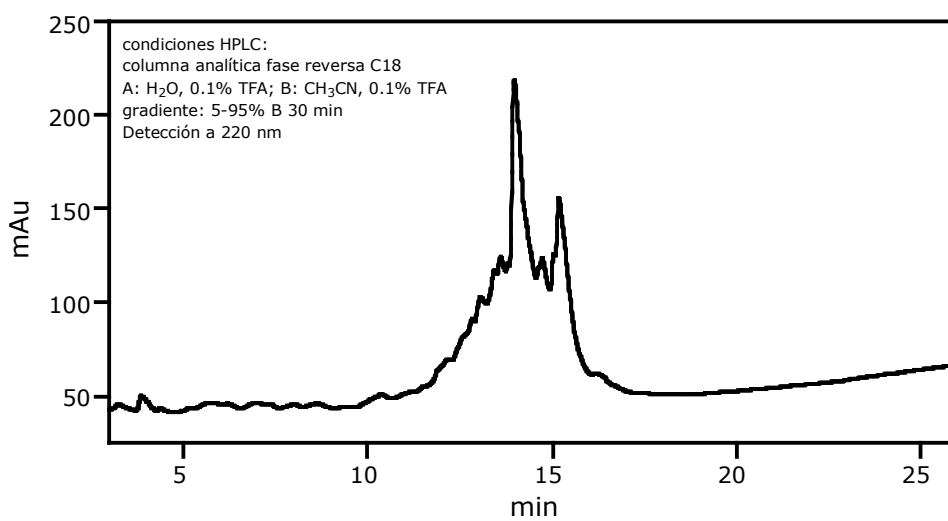


**Figura 132.** Cromatograma de HPLC del crudo de reacción para la obtención del péptido **26**.

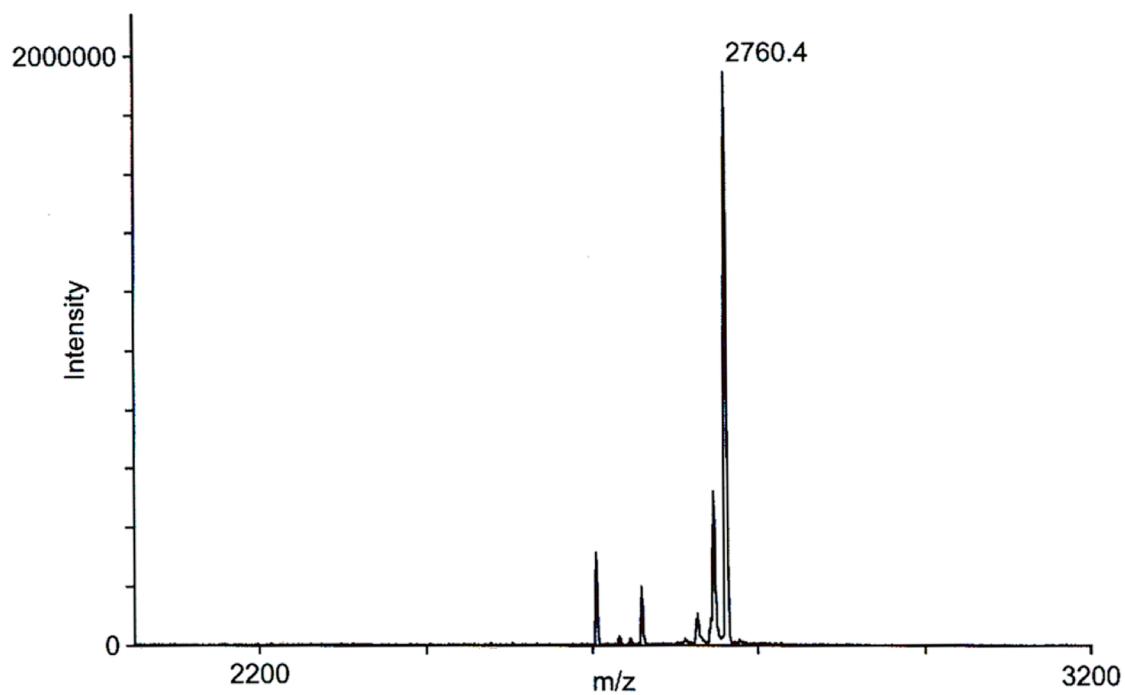


**EM-MALDI-TOF** para el péptido **26**:  $[MH]^+$  calculada para C<sub>81</sub>H<sub>123</sub>N<sub>20</sub>O<sub>32</sub> 1889.0, encontrada 1887.8.

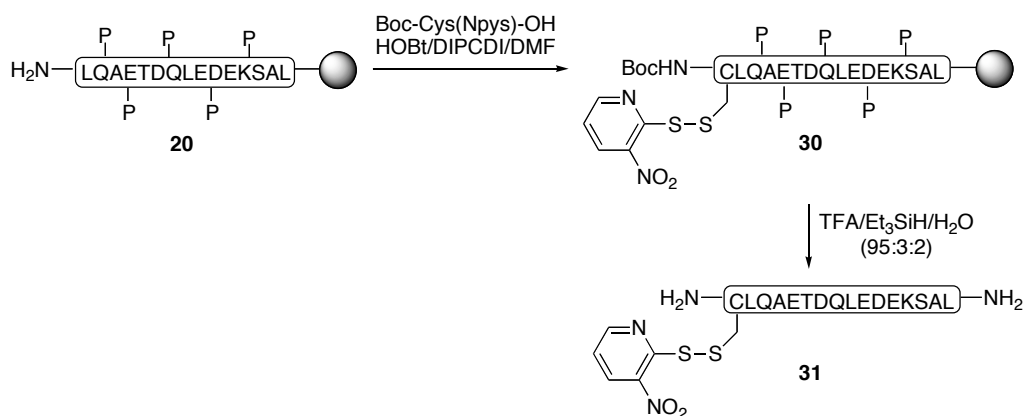
Péptido **27** [9.1 mg, ~11% de rendimiento].



**Figura 133.** Cromatograma de HPLC del crudo de reacción para la obtención de **27**.

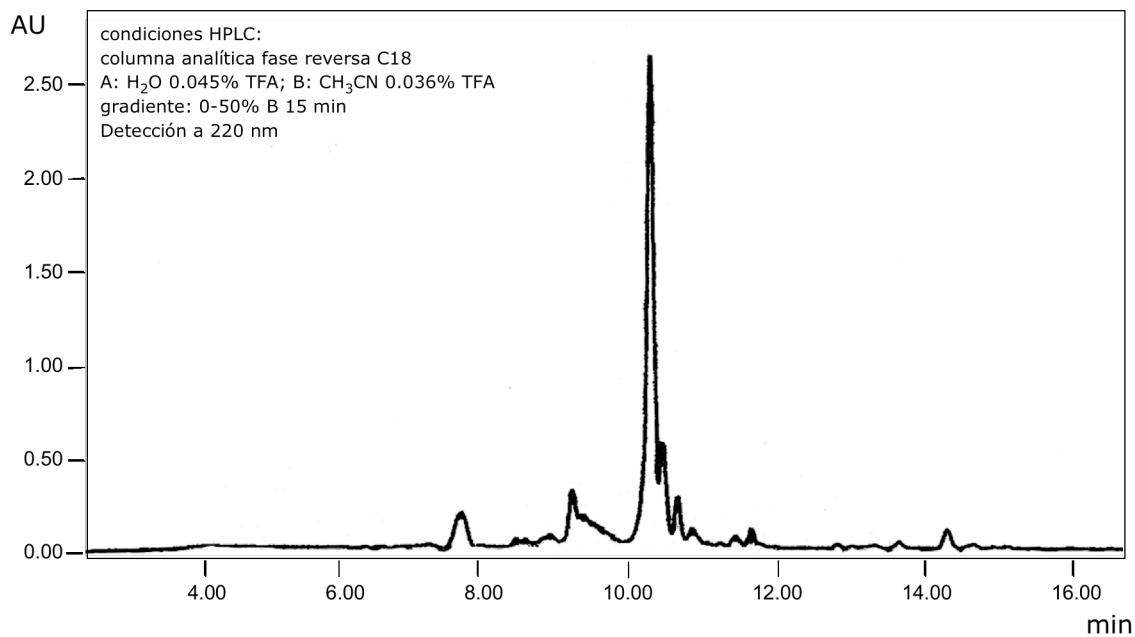


**EM-MALDI-TOF** para el péptido **27**:  $[MH]^+$  calculada para C<sub>116</sub>H<sub>184</sub>N<sub>33</sub>O<sub>45</sub> 2761.0, encontrada 2760.4.

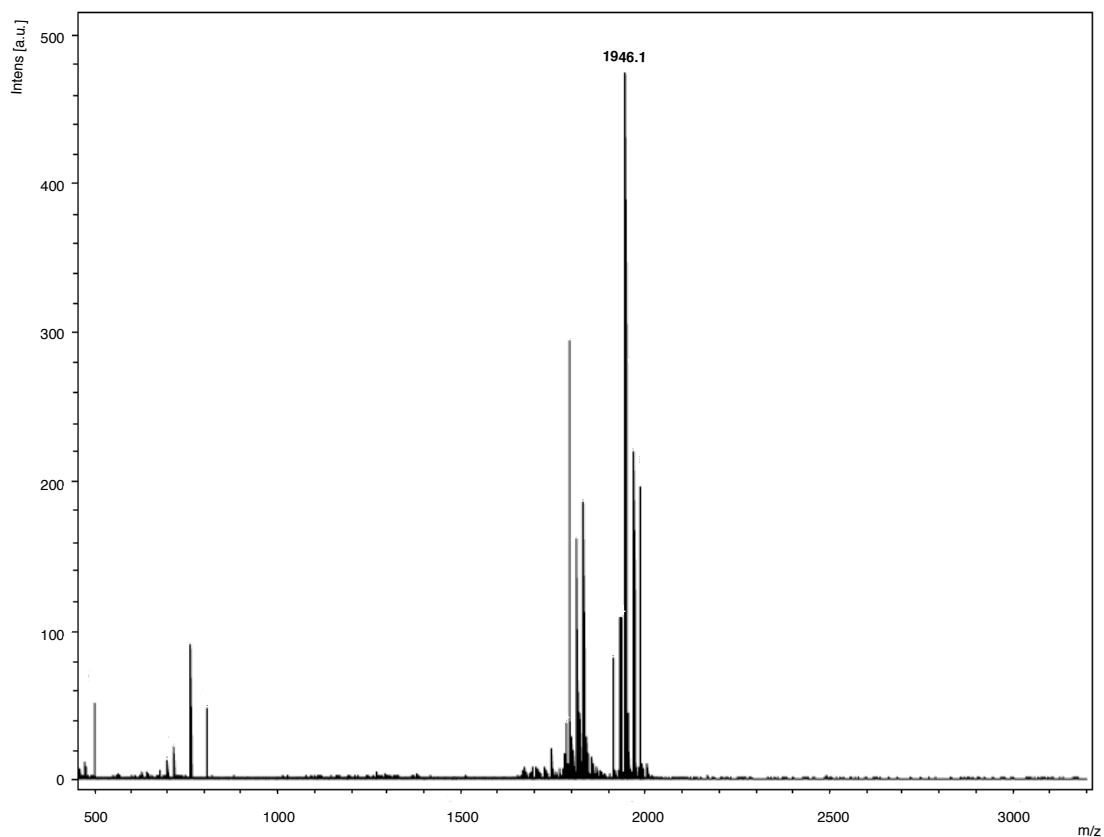
Síntesis del péptido **31**

Una suspensión de la peptidilresina **20** (80 mg, ~0.03 mmol) en DMF se agitó durante 30 min y, tras filtrar la resina, se adicionó una disolución de Boc-Cys(Npys) (62.6 mg, 0.15 mmol, 5 equiv), previamente activado con HOBt (22.5 mg, 0.15 mmol, 5 equiv) y DIPCDI (26 µL, 0.15 mmol, 5 equiv) en DMF (0.6 mL). La mezcla resultante se agitó durante 60 min y a continuación se lavó la resina con DMF (3 x 5 min) y Et<sub>2</sub>O (2 x 5 min), se secó y se desprotegió por tratamiento con TFA/Et<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O (95:3:2, 2 mL, 2 h). El péptido obtenido se purificó por cromatografía de HPLC en fase reversa, se liofilizó y se analizó por espectrometría de masas.

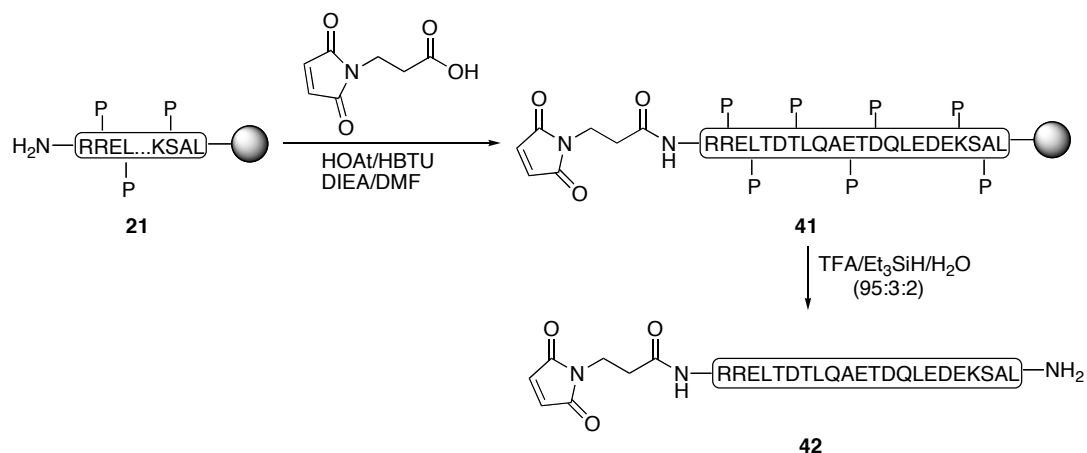
Péptido **31** [7.0 mg, ~12% de rendimiento].



**Figura 134.** Cromatograma de HPLC del crudo de reacción para la obtención de **31**.

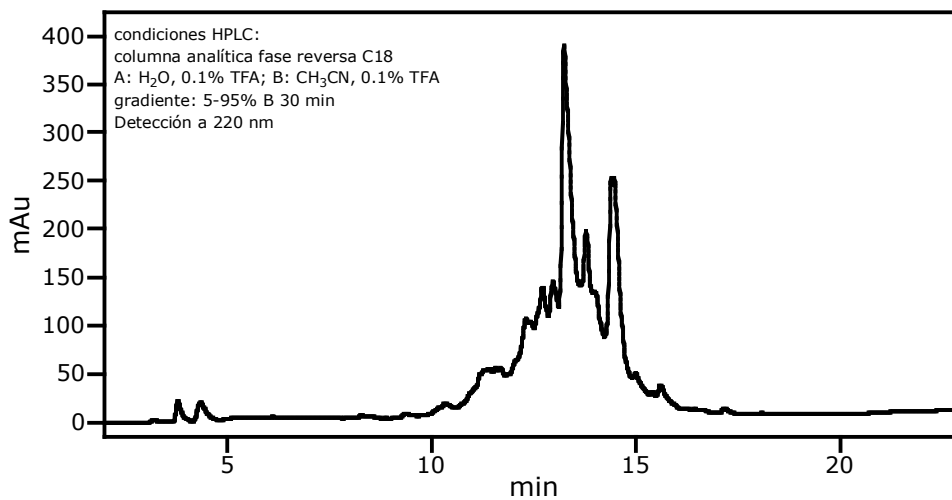


**EM-MALDI-TOF** para el péptido **31**:  $[MH]^+$  calculada para C<sub>81</sub>H<sub>123</sub>N<sub>20</sub>O<sub>32</sub> 1946.1, encontrada 1946.2.

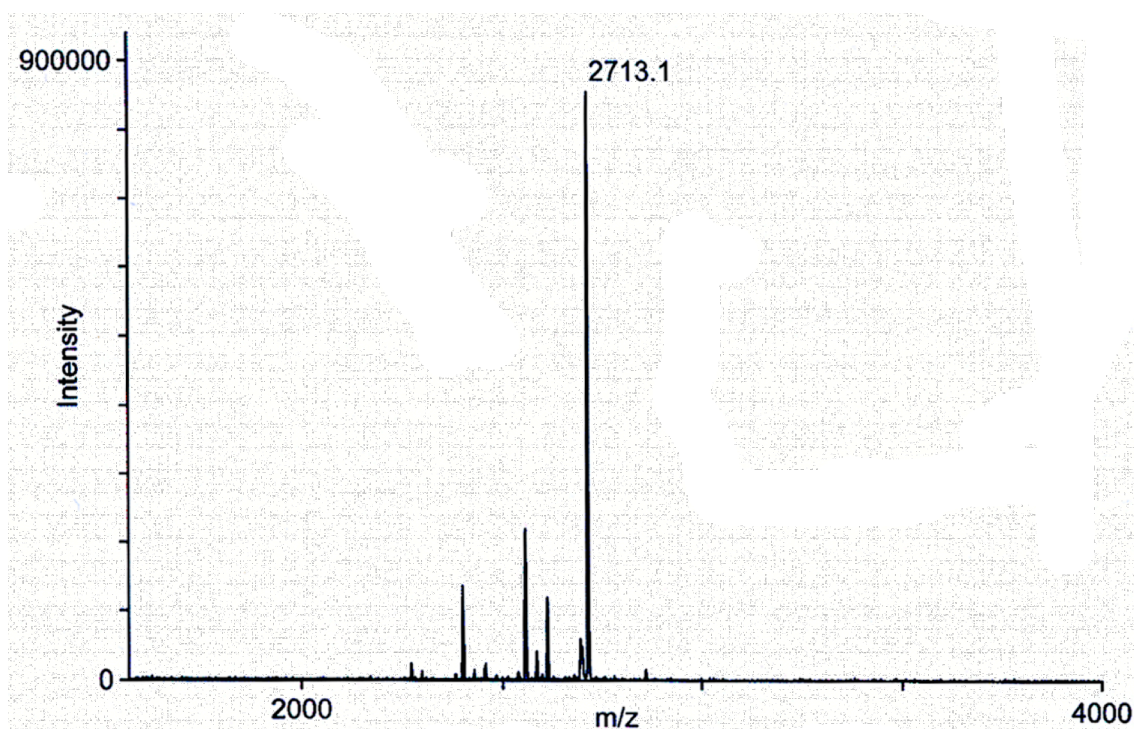
Síntesis del péptido-maleimido **42**

Una alícuota de la resina **21** (50 mg, ~0.014 mmol) se suspendió en DMF y se agitó durante 30 min. A continuación, se acopló la N-maleoílo-β-alanina (11.8 mg, 0.07 mmol, 5 equiv) por tratamiento con HOAt (9.5 mg, 0.07 mmol, 5 equiv), HBTU (26.6 mg, 0.07 mmol, 5 equiv) y DIEA (24 μL, 0.14 mmol, 10 equiv) en DMF (0.6 mL). La mezcla resultante se agitó durante 60 min y a continuación se lavó la resina con DMF (3 x 5 min) y Et<sub>2</sub>O (2 x 5 min), se secó y se desprotegió por tratamiento con TFA/Et<sub>3</sub>SiH/H<sub>2</sub>O (95:3:2, 2 mL, 2 h). El péptido obtenido se purificó por cromatografía de HPLC en fase reversa, se liofilizó y se analizó por espectrometría de masas.

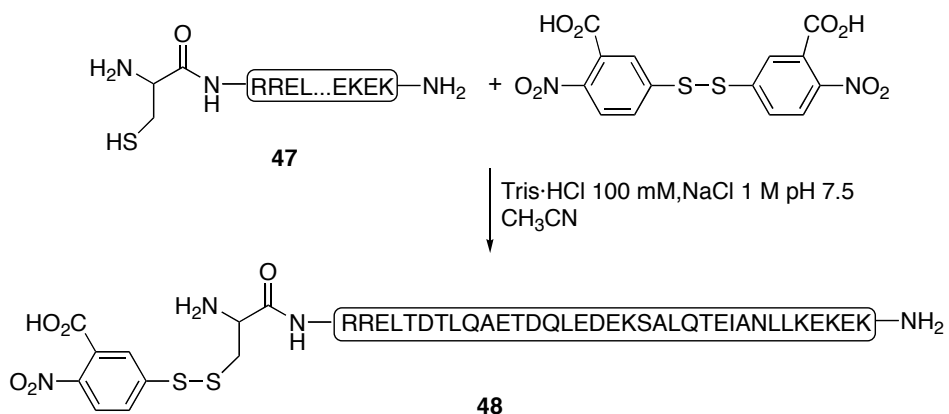
Péptido **42** [4.2 mg, ~11% de rendimiento].



**Figura 135.** Cromatograma de HPLC del crudo de reacción para la obtención del péptido **42**.



**EM-MALDI-TOF** para el péptido **42**:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{112}H_{184}N_{33}O_{45}$  2712.9, encontrada 2713.1.

Síntesis del péptido **48**

Sobre una disolución del péptido **47** (3.5 mg,  $8.4 \times 10^{-4}$  mmol) en tampón Tris·HCl 100 mM, NaCl 1 M (200  $\mu$ L, pH=7.5) se añadió una disolución de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) [0.7 mg; 88  $\mu$ L de una disolución 8 mg/mL en tampón Tris·HCl 100 mM, NaCl 1 M pH 7.5/CH<sub>3</sub>CN (6:4);  $1.7 \times 10^{-3}$  mmol, 2 equiv]. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 min, comprobándose por RP-HPLC la desaparición total del producto de partida y la aparición de un nuevo compuesto que se purificó, liofilizó e identificó como el péptido **48** por espectrometría de masas.

Péptido **48** [0.88 mg, ~24% de rendimiento].

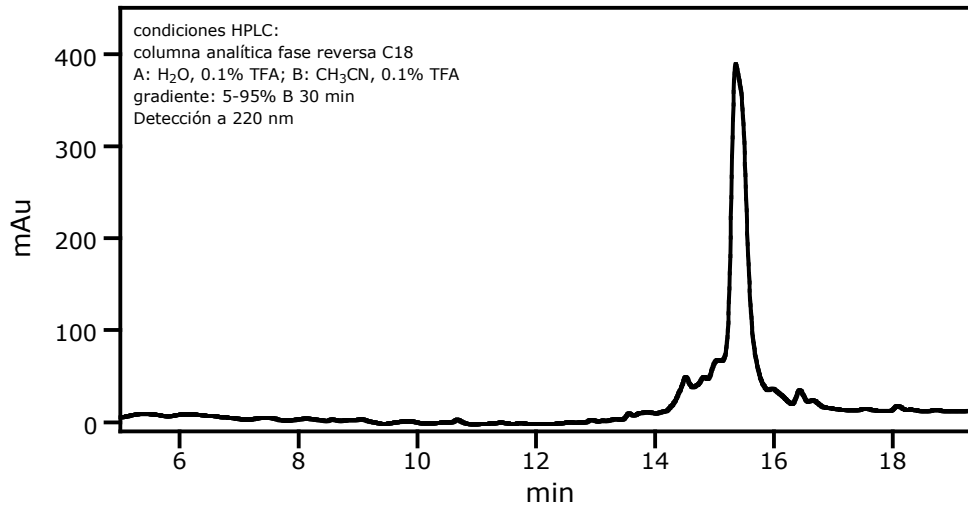
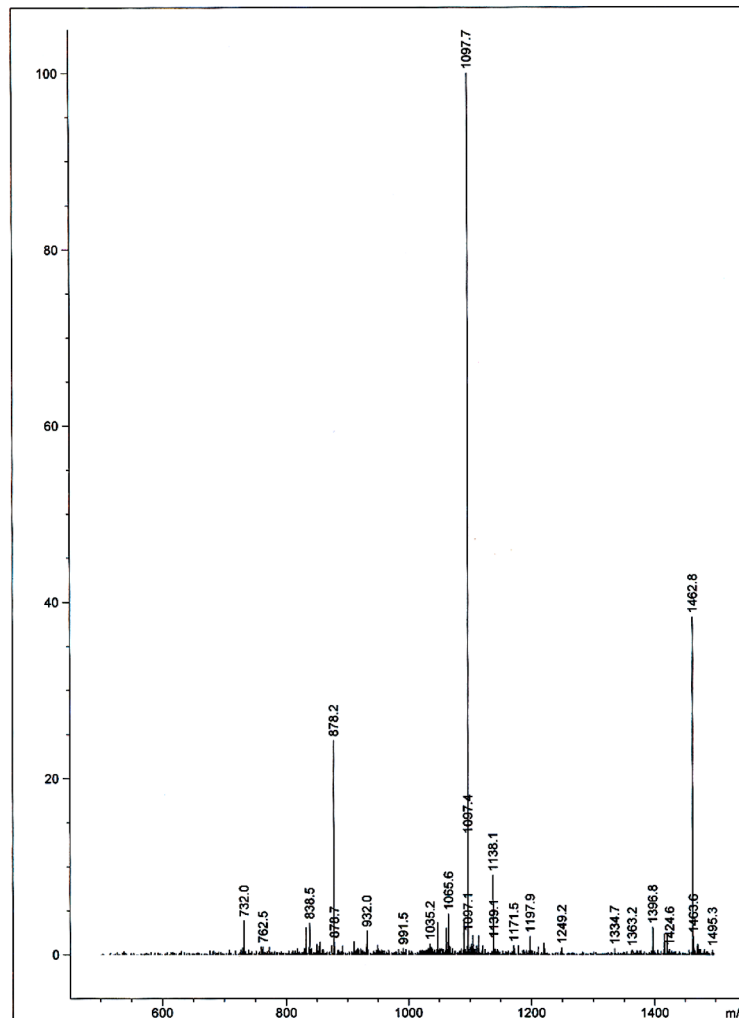


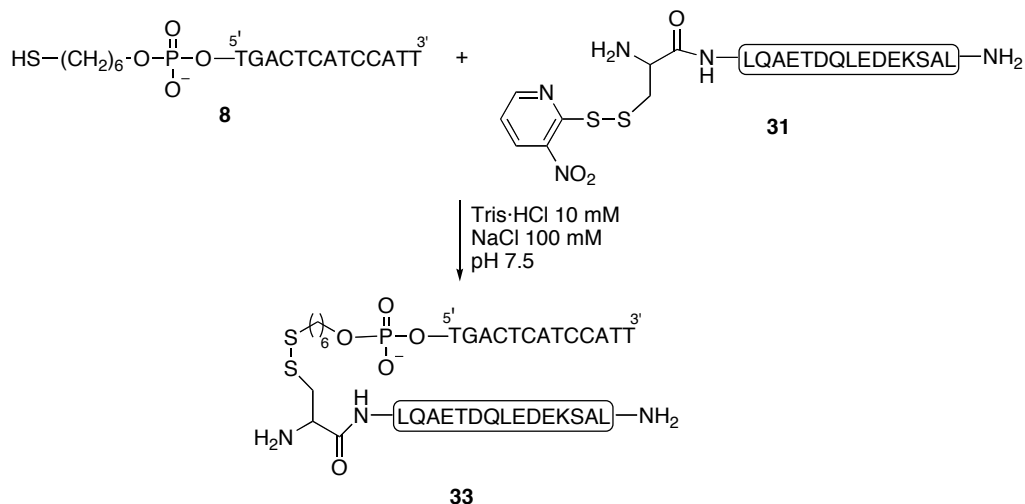
Figura 136. Cromatograma de HPLC correspondiente a la obtención de **48**.



**EM-ESI-TOF** para el péptido **48**: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>182</sub>H<sub>303</sub>N<sub>52</sub>O<sub>69</sub>S<sub>2</sub> 4387.9, encontrada 4386.

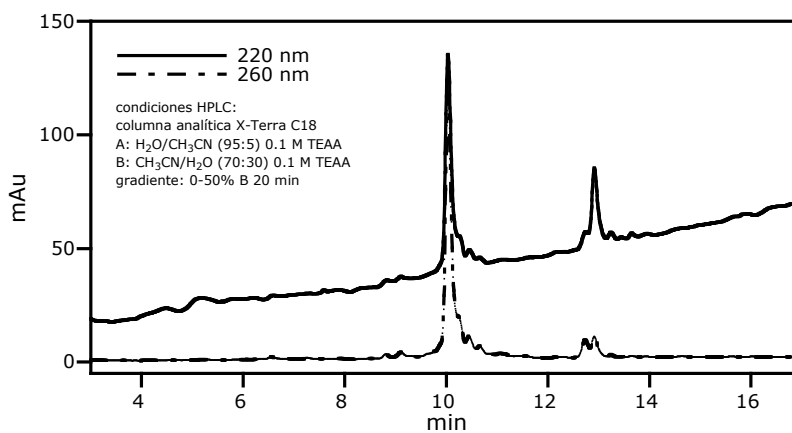
### Síntesis de los conjugados oligonucleótido-péptido **33** y **34**

El procedimiento experimental es idéntico para la obtención de los híbridos **33** y **34**. A continuación, se ilustra para el conjugado **33**.

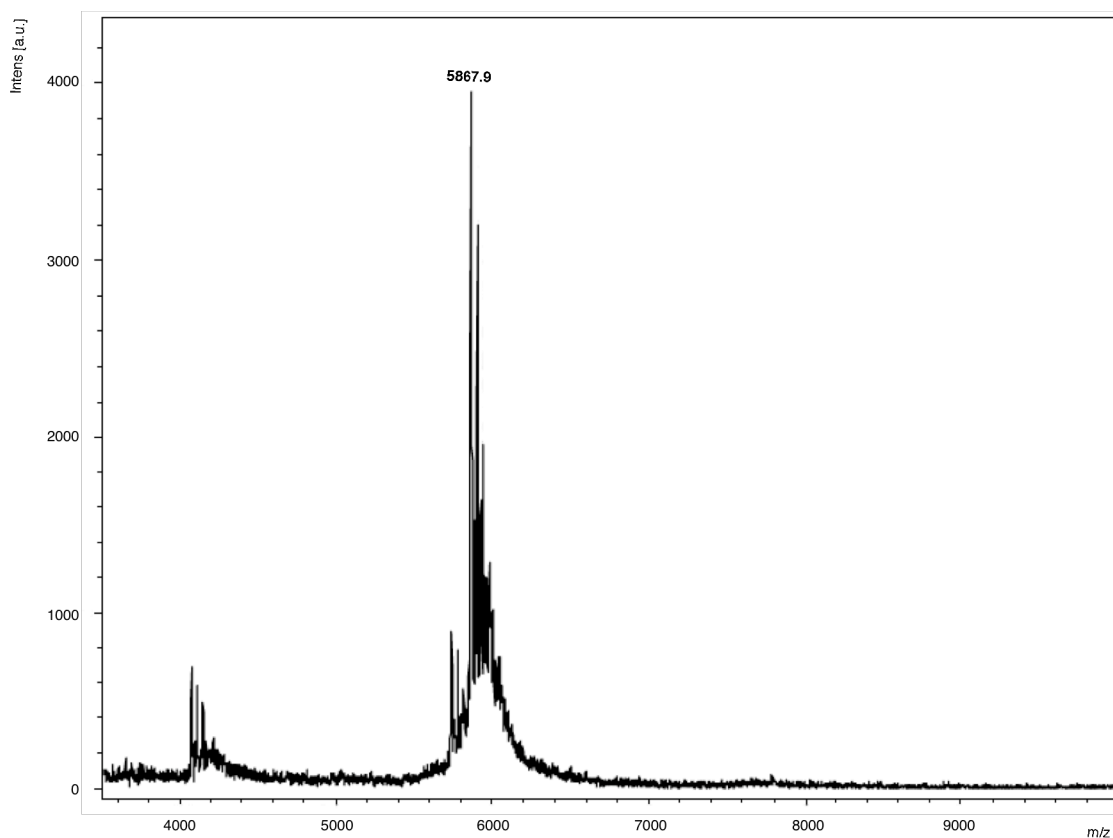


En un vial de 1 mL se agitó una mezcla del oligonucleótido-tiol **8** (40.8 µg, 0.01 µmol) y del péptido **31** (97.3 µg, 0.05 µmol, 5 equiv) en tampón Tris·HCl 10 mM, NaCl 100 mM (200 µL, pH=7.5). Después de 30 min se comprobó por RP-PHLC la total desaparición del oligonucleótido-tiol de partida y la aparición de un nuevo compuesto que se purificó, se liofilizó y se identificó como el conjugado oligonucleótido-péptido **33** por espectrometría de masas.

Conjugado oligonucleótido-péptido **33** [32.9 µg, ~56% de rendimiento].

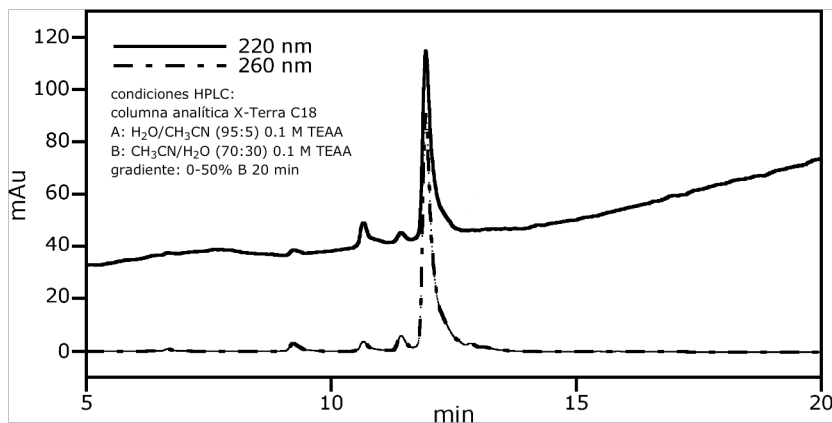
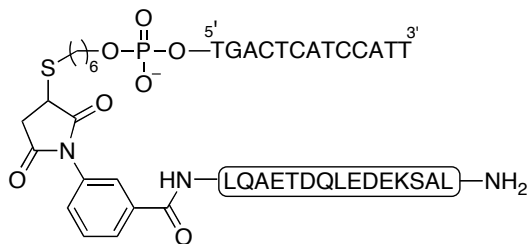


**Figura 137.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **33** después de 30 min de reacción.

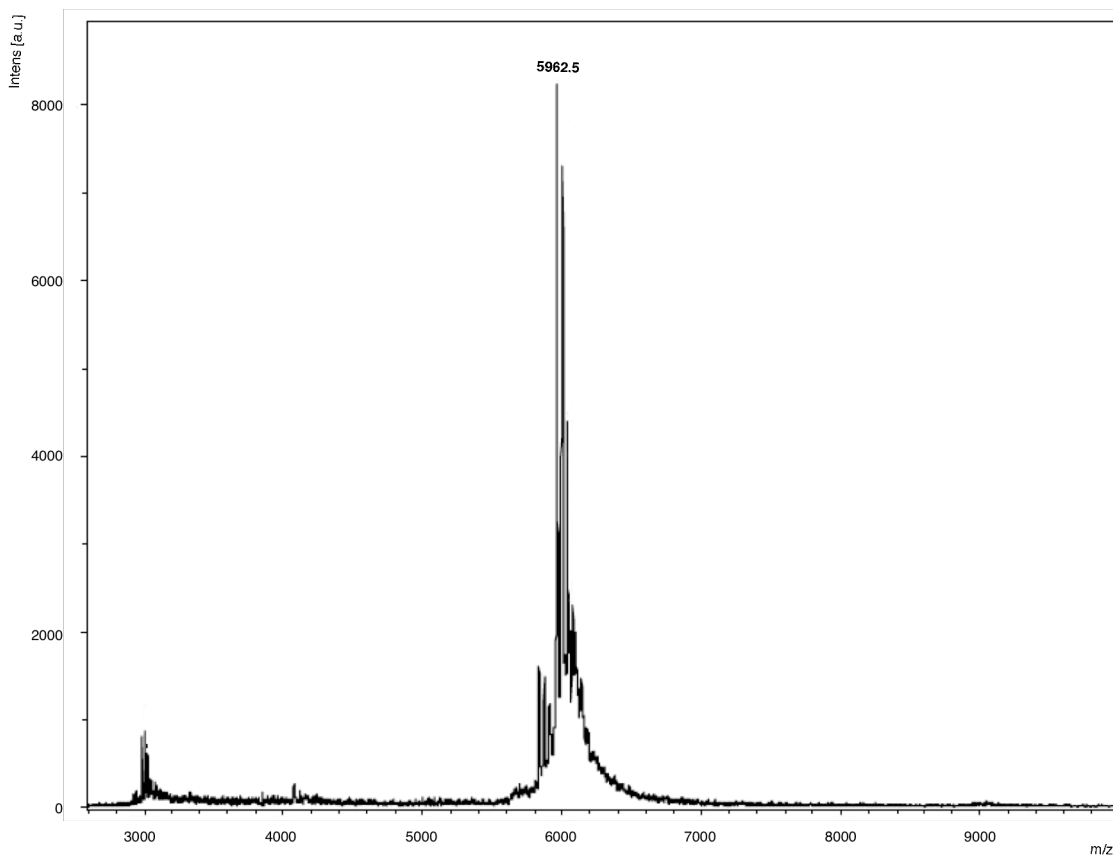


**EM-MALDI-TOF** para **33**: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>213</sub>H<sub>297</sub>N<sub>62</sub>O<sub>113</sub>P<sub>13</sub>S<sub>1</sub> 5967.9, encontrada 5962.5.

Conjugado oligonucleótido-péptido **34** [33.4  $\mu\text{g}$ ,  $\sim 56\%$  de rendimiento].



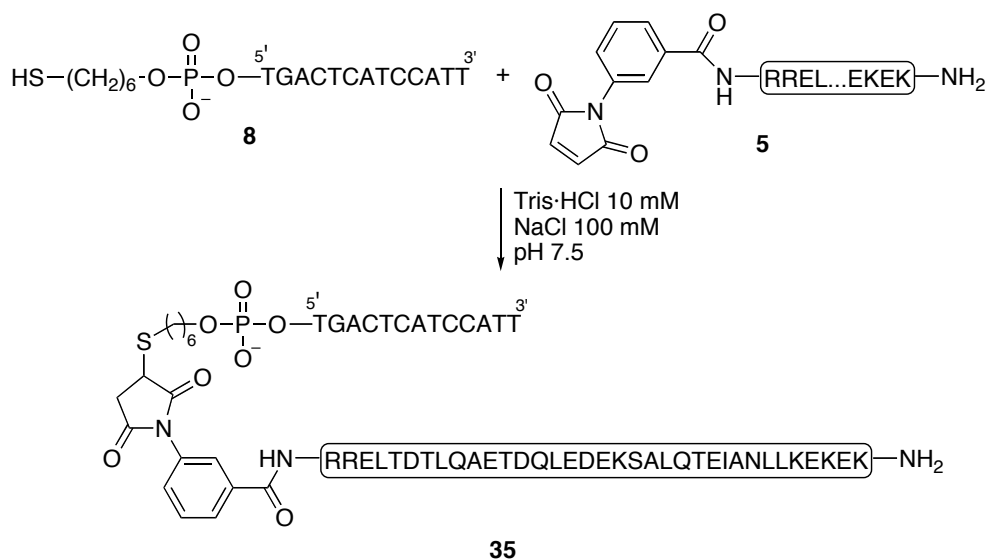
**Figura 138.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **34** después de 30 min de reacción.



**EM-MALDI-TOF** para **34**:  $[\text{MH}]^+$  calculada para  $\text{C}_{213}\text{H}_{297}\text{N}_{62}\text{O}_{113}\text{P}_{13}\text{S}_1$  5967.9, encontrada 5962.5.

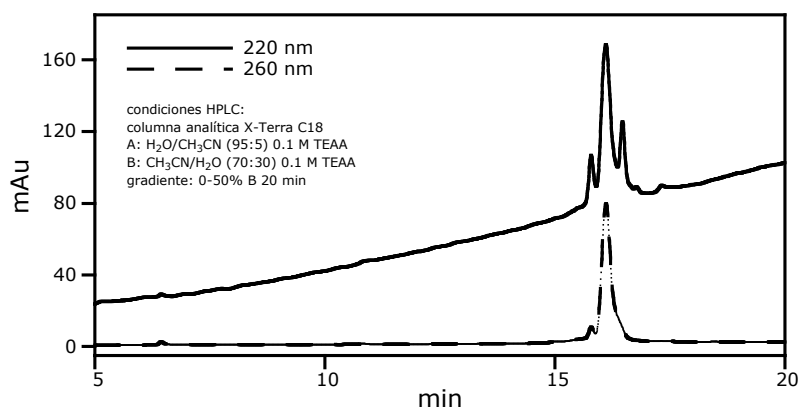
## Síntesis de los conjugados oligonucleótido-péptido **35**, **38**, **43**, **44**, **45**, **49**, **50**, **51** y **52**

El procedimiento experimental se ilustra para el conjugado **35** y es idéntico para el resto de los híbridos. Para los híbridos **38**, **44**, **45**, **50**, **51** y **52** se utilizó el péptido **37** como producto de partida. Para el híbrido **43**, se usó el péptido **42** y para el conjugado **49**, el péptido **48**.

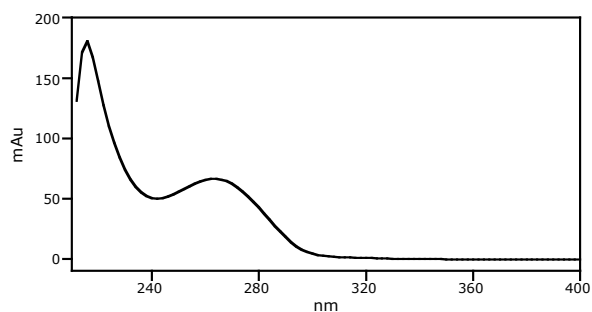


En un vial de 1 mL se agitó una mezcla del oligonucleótido-tiol **8** (40.8 µg, 0.01 µmol) y del péptido **5** (127.2 µg, 0.03 µmol, 3 equiv) en tampón Tris·HCl 10 mM, NaCl 100 mM (200 µL, pH=7.5). Después de 30 min se comprobó por RP-PHLC la total desaparición del oligonucleótido-tiol de partida y la aparición de un nuevo compuesto que se purificó, se liofilizó y se identificó como el conjugado-oligonucleótido péptido **35** por espectrometría de masas.

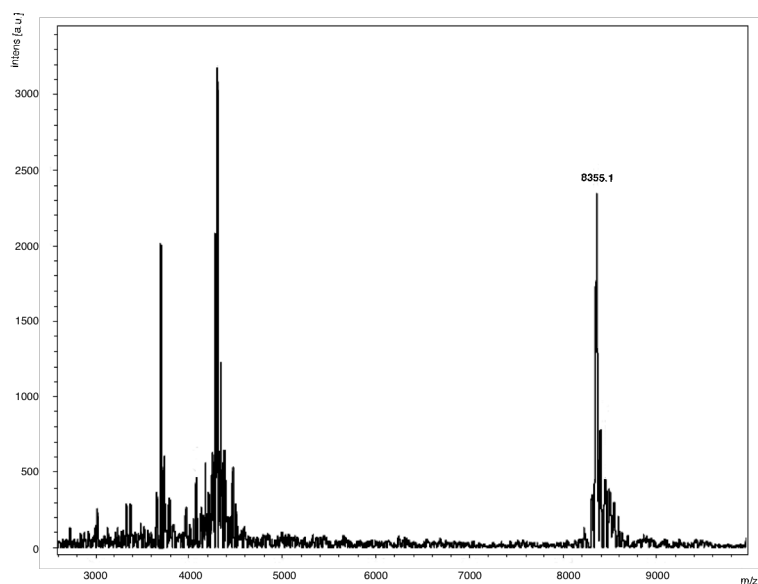
Conjugado-oligonucleótido péptido **35** [40.1 µg, ~48% de rendimiento].



**Figura 139.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **35** después de 30 min.

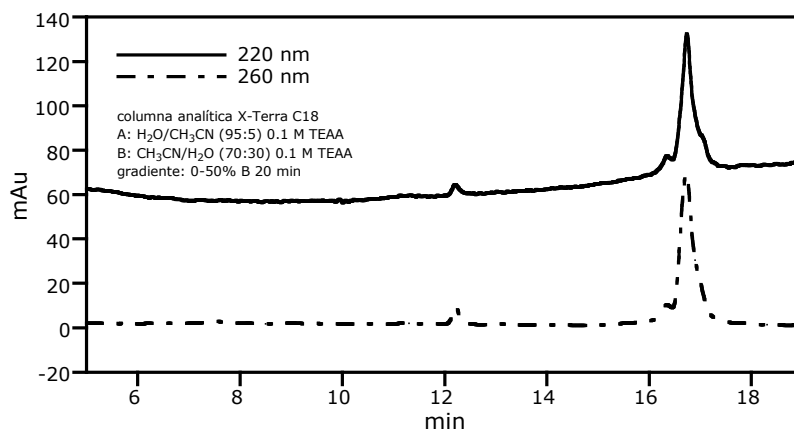
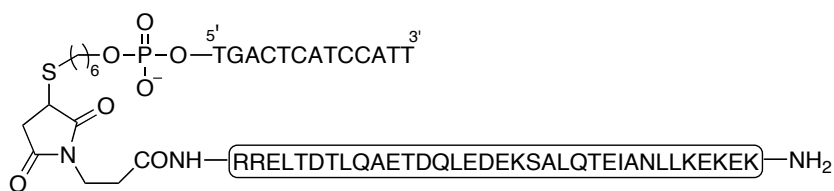


**Figura 140.** Espectro de UV del conjugado **35**.

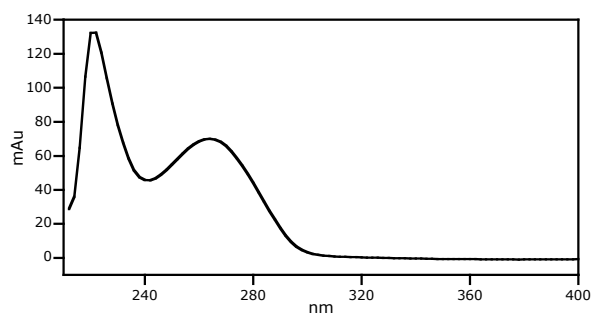


**EM-MALDI-TOF** para el conjugado **35**:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{315}H_{474}N_{93}O_{148}P_{13}S_1$  8365.4, encontrada 8355.1.

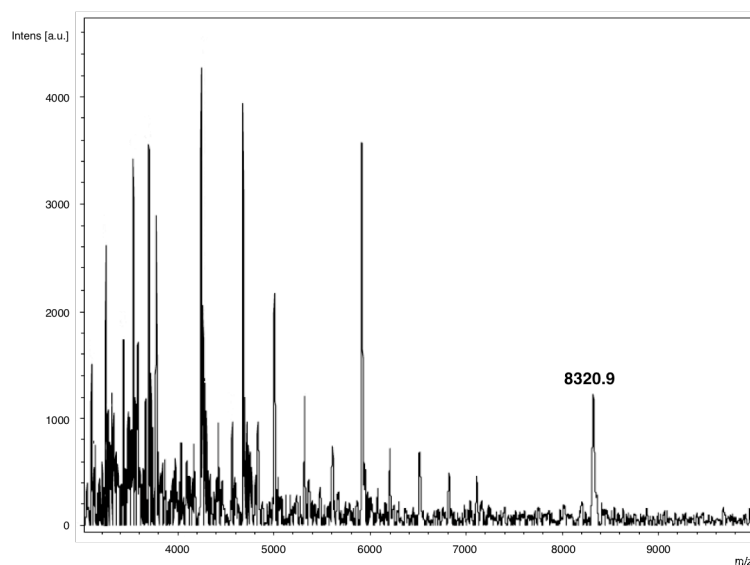
Conjugado-oligonucleótido péptido **38** [ 54.1 µg, ~65% de rendimiento].



**Figura 141.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **38** después de 30 min.

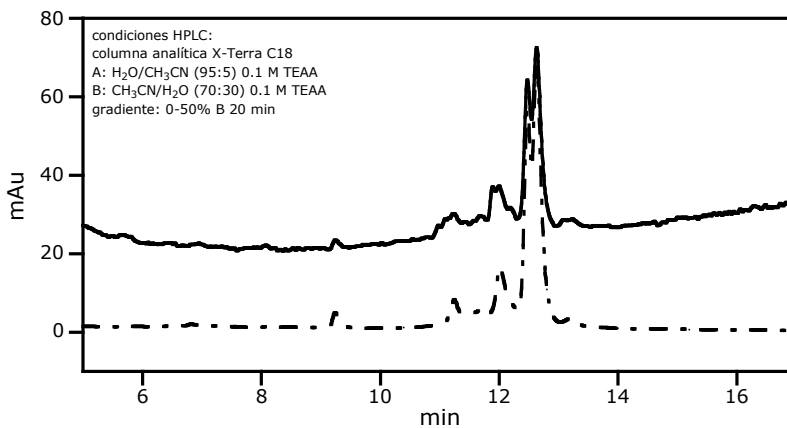
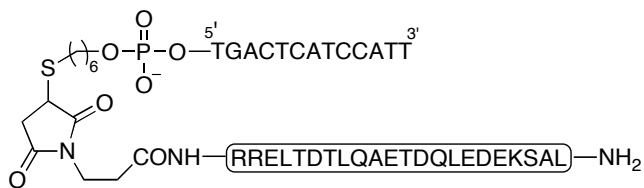


**Figura 142.** Espectro de UV del conjugado **38**.

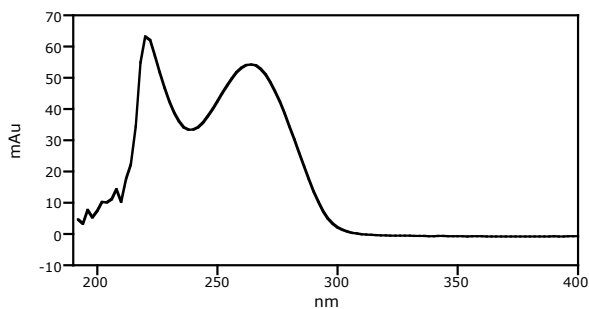


**EM-MALDI-TOF** para el conjugado **38**:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{311}H_{474}N_{93}O_{148}P_{13}S_1$  8317.7, encontrada 8320.9.

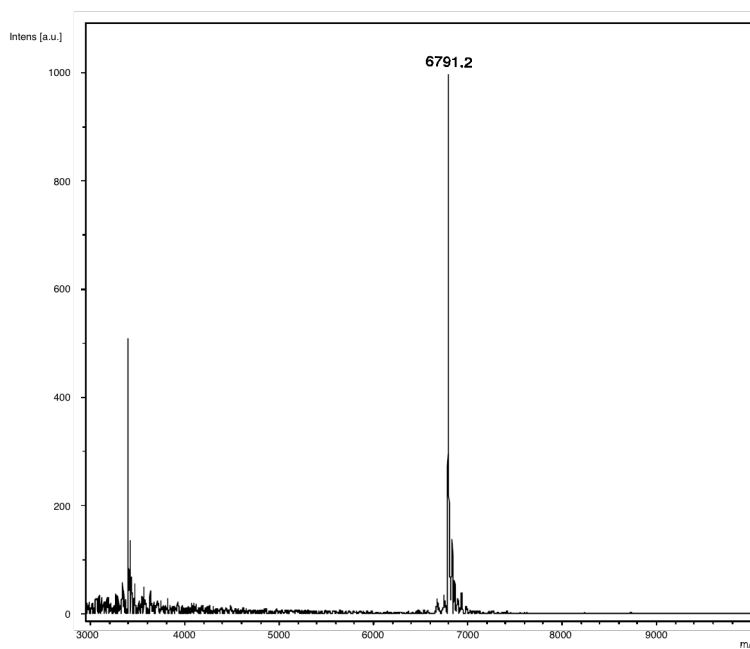
Conjugado-oligonucleótido péptido **43**



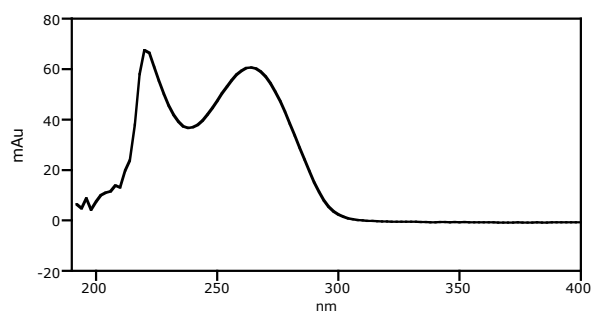
**Figura 143.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **43** después de 30 min.



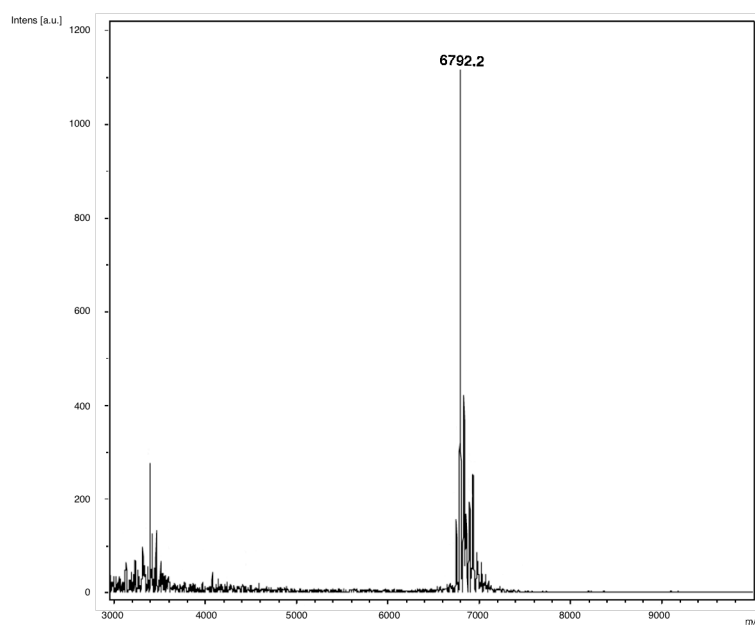
**Figura 144.** Espectro de UV del compuesto **43a**.



**EM-MALDI-TOF** para el conjugado **43a**:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{244}H_{359}N_{75}O_{126}P_{13}S_1$  6793.8, encontrada 6791.2. [9,5  $\mu$ g, ~14% de rendimiento].

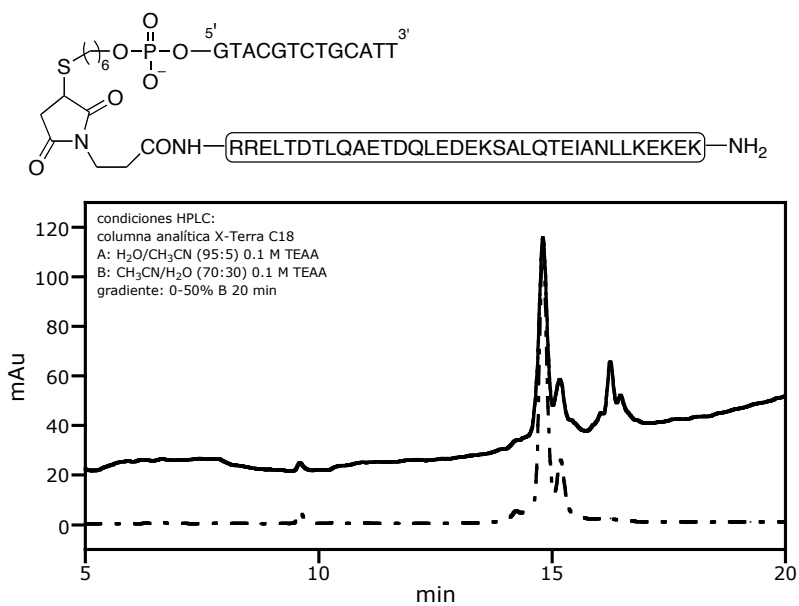


**Figura 145.** Espectro de UV del compuesto **43b**.

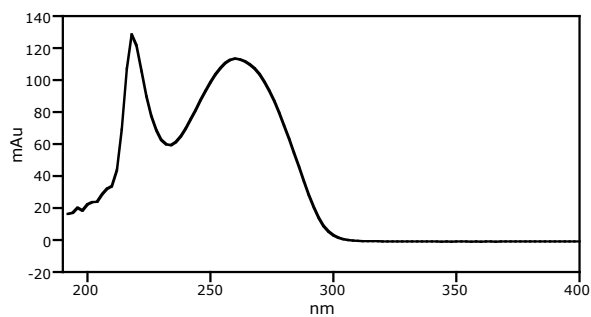


**EM-MALDI-TOF** para el conjugado **43b**:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{244}H_{359}N_{75}O_{126}P_{13}S_1$  6793.8, encontrada 6792.2 [19.7  $\mu$ g, ~29% de rendimiento].

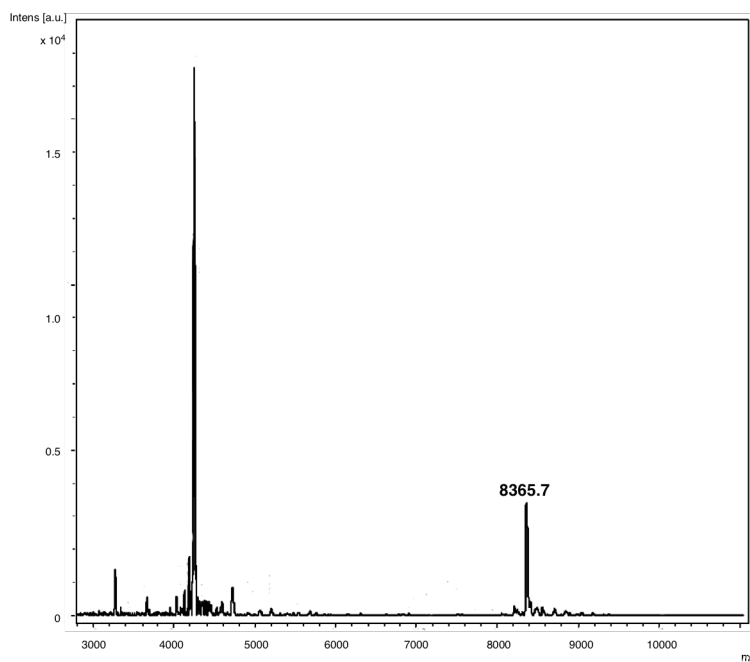
Conjugado-oligonucleótido péptido **44** [44.6  $\mu\text{g}$ , ~38% de rendimiento].



**Figura 146.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **44** después de 30 min de reacción.



**Figura 147.** Espectro de UV del compuesto **44**.



**EM-MALDI-TOF** para el conjugado **44**:  $[\text{MH}]^+$  calculada para  $\text{C}_{312}\text{H}_{475}\text{N}_{95}\text{O}_{149}\text{P}_{13}\text{S}_1$  8375.6, encontrada 8365.7.

Conjugado-oligonucleótido péptido **45** [56.3 µg, ~57% de rendimiento]

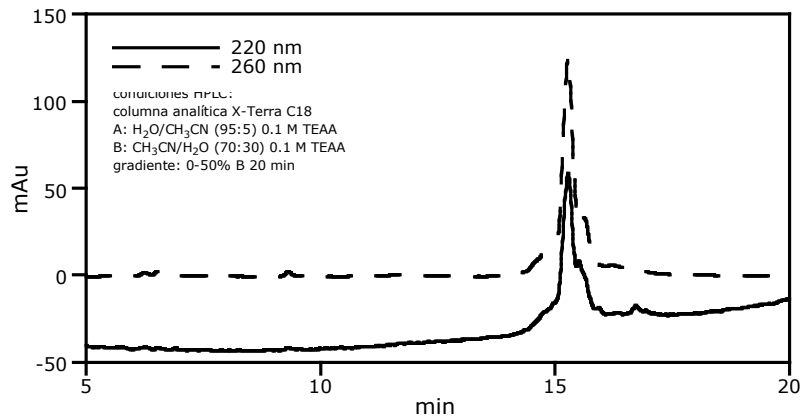
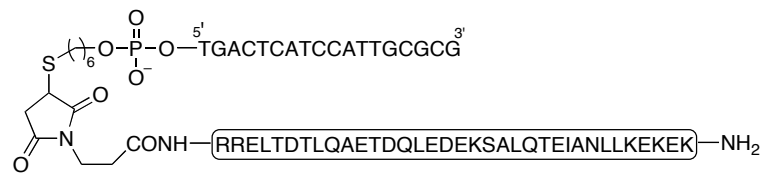


Figura 148. Cromatograma de HPLC para la obtención de **45** después de 30 min.

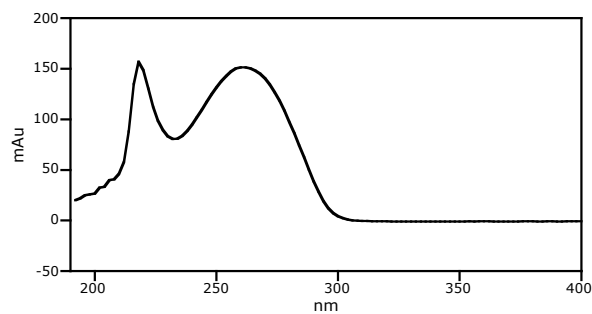
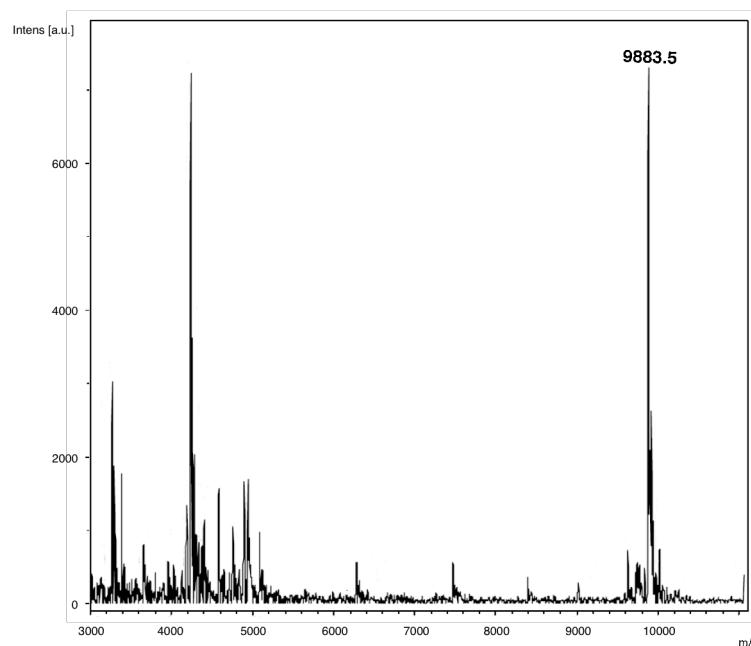
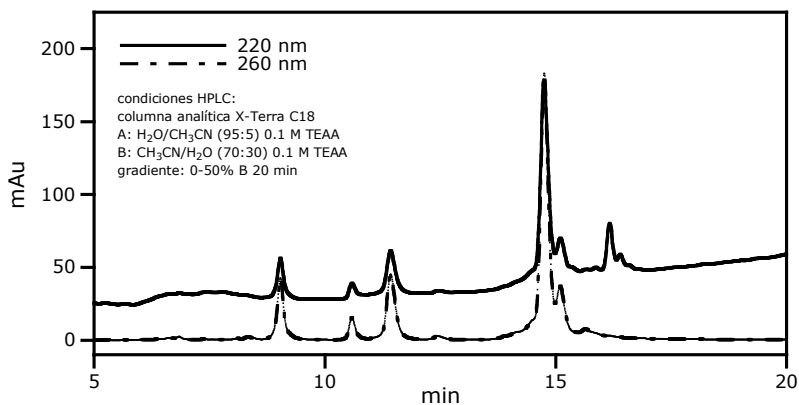
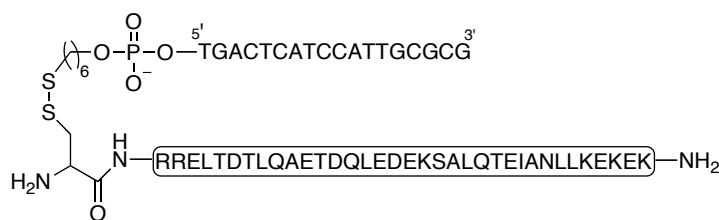


Figura 149. Espectro de UV del conjugado **45**.

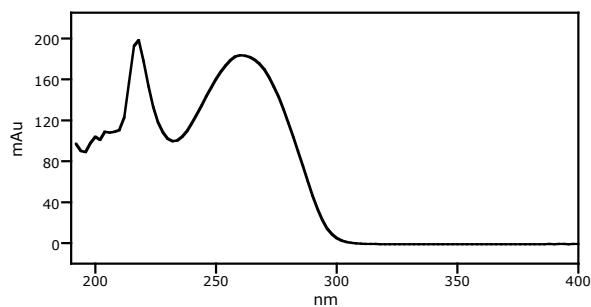


EM-MALDI-TOF para el conjugado **45**: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>359</sub>H<sub>535</sub>N<sub>114</sub>O<sub>178</sub>P<sub>18</sub>S<sub>1</sub> 9887.3, encontrada 9883.5.

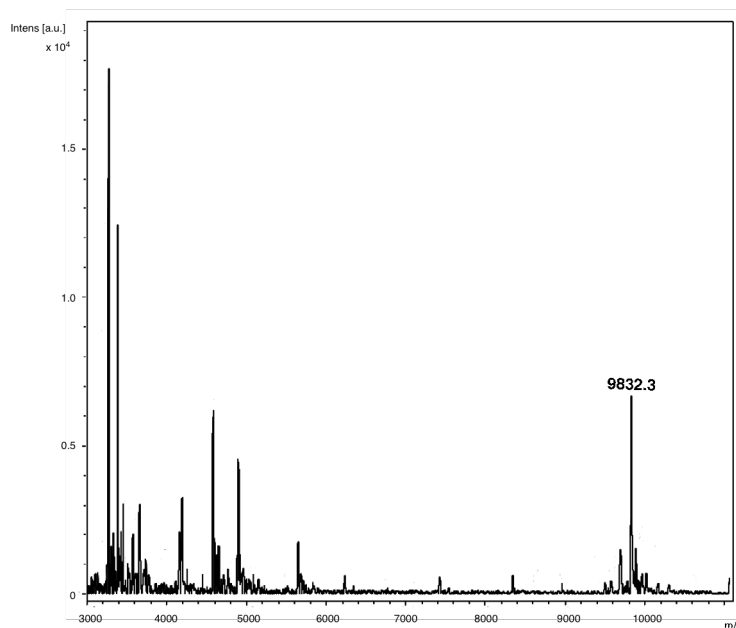
Conjugado-oligonucleótido péptido **49** [47.2 µg, ~53% de rendimiento].



**Figura 150.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **49** después de 30 min.

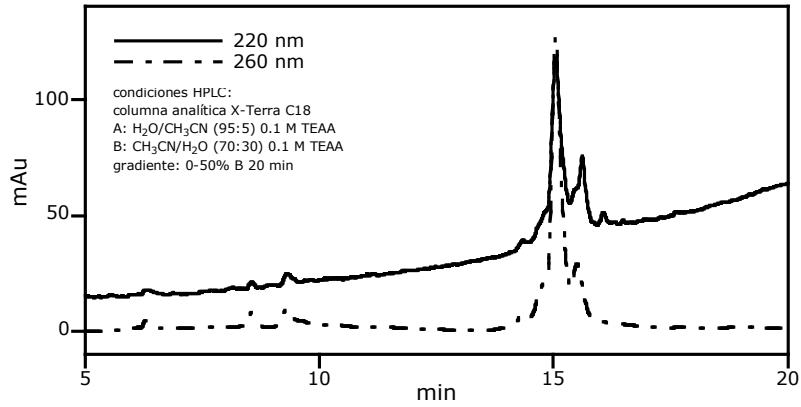
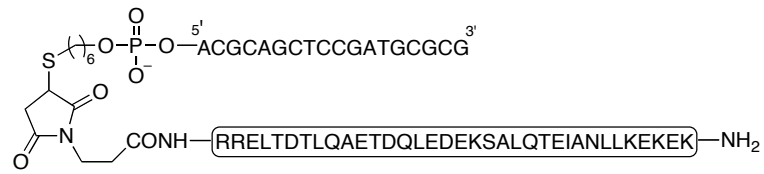


**Figura 151.** Espectro de UV del conjugado **49**.

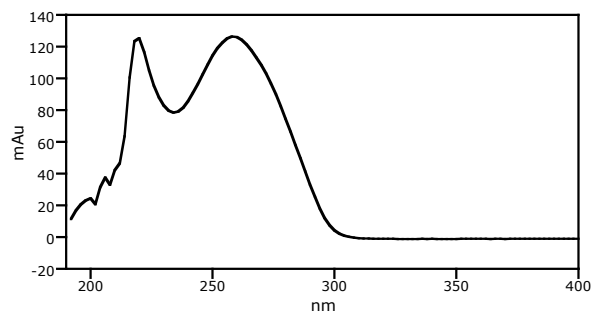


**EM-MALDI-TOF** para el conjugado **49**:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{355}H_{533}N_{114}O_{176}P_{18}S_2$  9837.3, encontrada 9832.3.

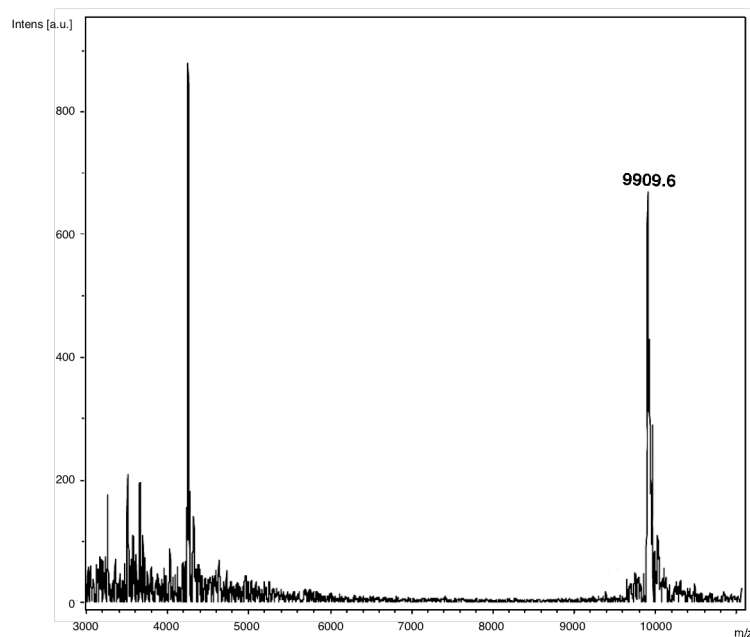
Conjugado-oligonucleótido péptido **50** [37.7  $\mu\text{g}$ ,  $\sim 38\%$  de rendimiento].



**Figura 152.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **50** después de 30 min.

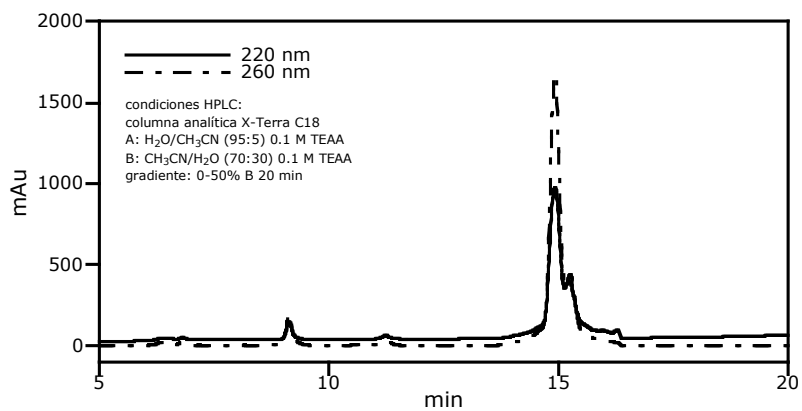
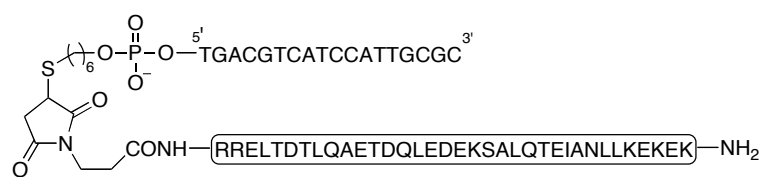


**Figura 153.** Espectro de UV del conjugado **50**.

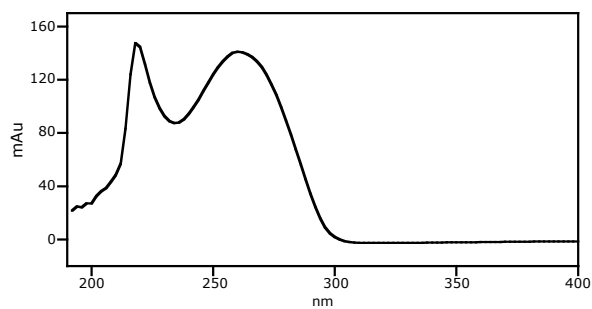


**EM-MALDI-TOF** para el conjugado **50**:  $[\text{MH}]^+$  calculada para  $\text{C}_{358}\text{H}_{532}\text{N}_{121}\text{O}_{175}\text{P}_{18}\text{S}_1$   
9909.6.

Conjugado-oligonucleótido péptido **51** [51.1 µg, ~50% de rendimiento].

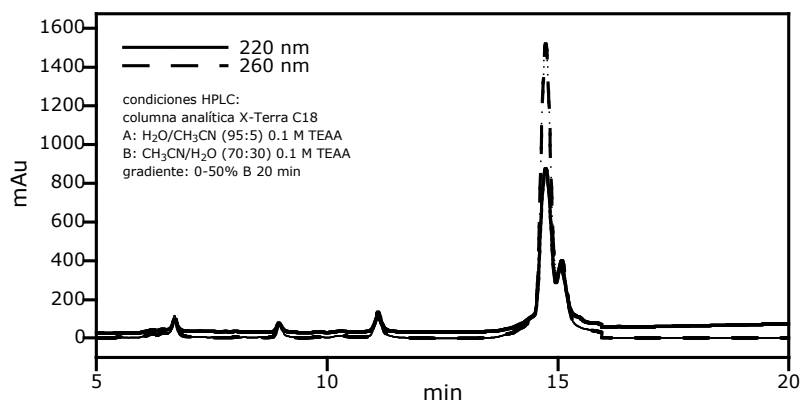
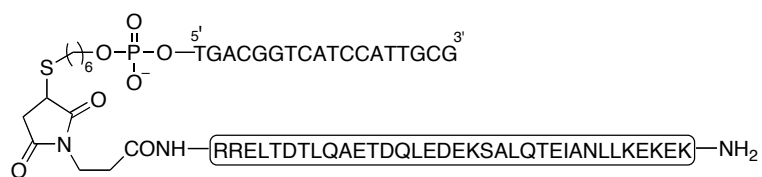


**Figura 154.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **51** después de 30 min.

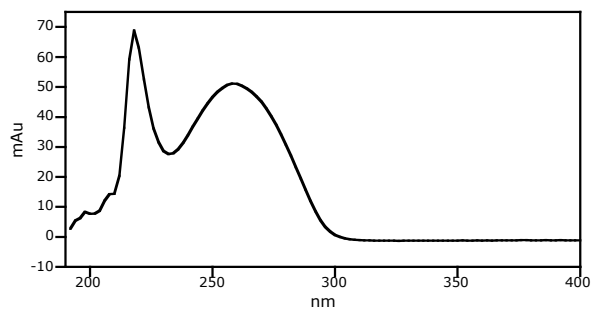


**Figura 155.** Espectro de UV del conjugado **51**.

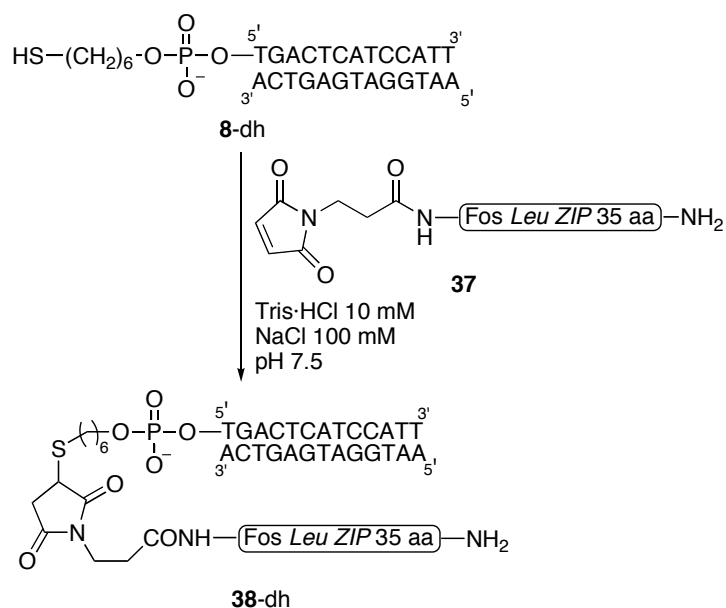
Conjugado-oligonucleótido péptido **52** [52.7  $\mu\text{g}$ ,  $\sim 50\%$  de rendimiento].



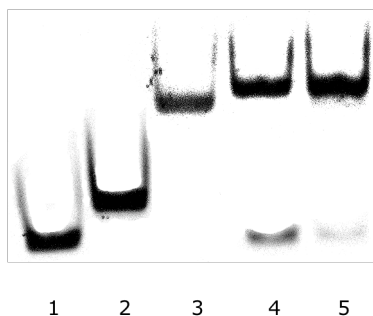
**Figura 156.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **52** después de 30 min.



**Figura 157.** Espectro de UV del conjugado **52**.

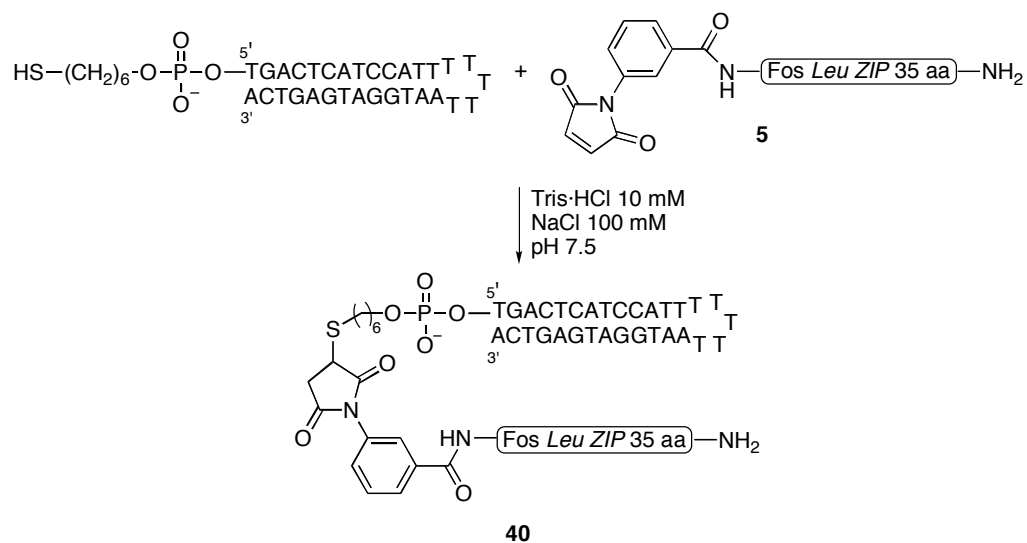
Síntesis del conjugado oligonucleótido-péptido **38-dh** a partir de **8-dh**

En un vial de 1 mL se agitó una mezcla del oligonucleótido-tiol **8** anelado a su cadena complementaria (20.3  $\mu\text{g}$ ,  $2.5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{mol}$ ) y del péptido **37** (31.8  $\mu\text{g}$ ,  $7.5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{mol}$ , 3 equiv) en tampón Tris·HCl 10 mM, NaCl 100 mM (100  $\mu\text{L}$ , pH=7.5). Después de 30 min se comprobó por gel de electroforesis de poliácridamida la formación del conjugado.

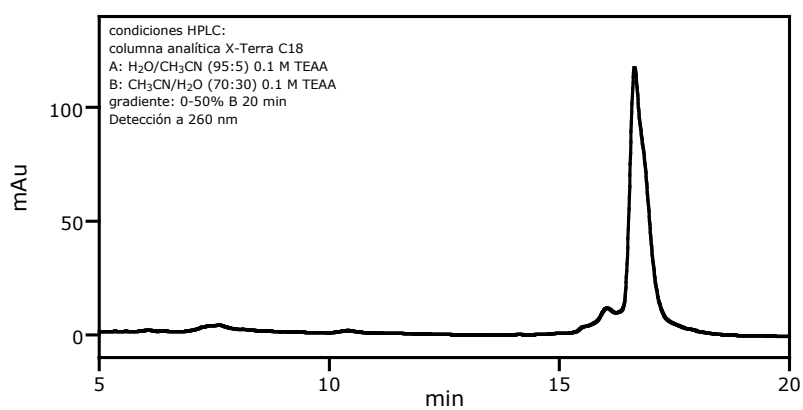


**Figura 158.** PAGE 15%. Calle 1: **8** (~200 nM), calle 2: **8-dh** (~100 nM), calle 3: **38** (~200 nM), calle 4: **38-dh** (~100 nM), calle 5: crudo de reacción para la obtención de **38-dh** a partir de **8-dh** (~200 nM).

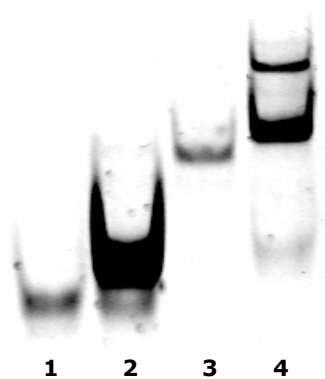
### Síntesis del conjugado oligonucleótido-péptido 40



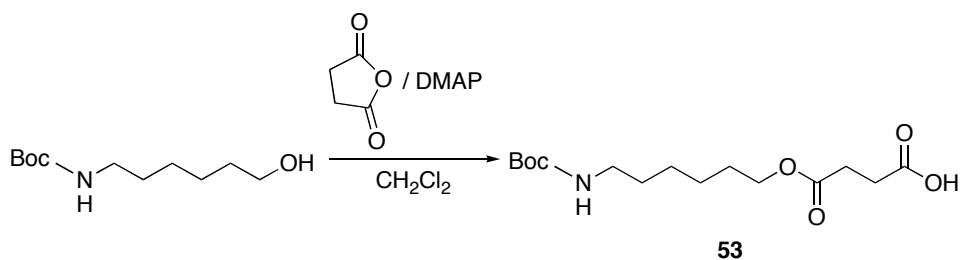
En un vial de 1 mL se agitó una mezcla del oligonucleótido-tiol en horquilla (96.9 µg, 0.01 µmol) y del péptido **5** (127.2 µg, 0.03 µmol, 3 equiv) en tampón Tris·HCl 10 mM, NaCl 100 mM (200 µL, pH=7.5). Después de 30 min se comprobó por RP-PHLC la total desaparición del oligonucleótido-tiol de partida y la aparición de un nuevo compuesto, que se purificó y caracterizó por electroforesis en gel de poliacrilamida.



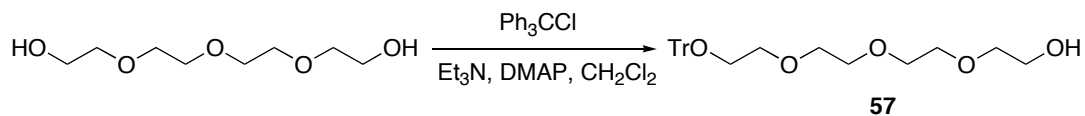
**Figura 160.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **40** después de 30 min.



**Figura 159.** PAGE al 15%: Calle 1: **8** (~500 nM), calle 2: **8**-dh (~200 nM), calle 3: **35** (~500 nM), calle 4: **40** (~200 nM).

**Síntesis de ácido 3-[(6-(Boc-amino)hexiloxi)carbonil] propanoico (53)**

En un matraz de fondo redondo se disolvió el 6-(Boc-amino)1-hexanol (65 mg, 0.3 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL). Sobre esta disolución se añadió el anhídrido succínico (95 mg, 0.45 mmol) y la DMAP (55 mg, 0.45 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. A continuación, se vertió sobre una disolución tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.1 M, pH=5.5) y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron, obteniéndose el compuesto **53**, que se utilizó en la siguiente etapa sin mayor purificación.

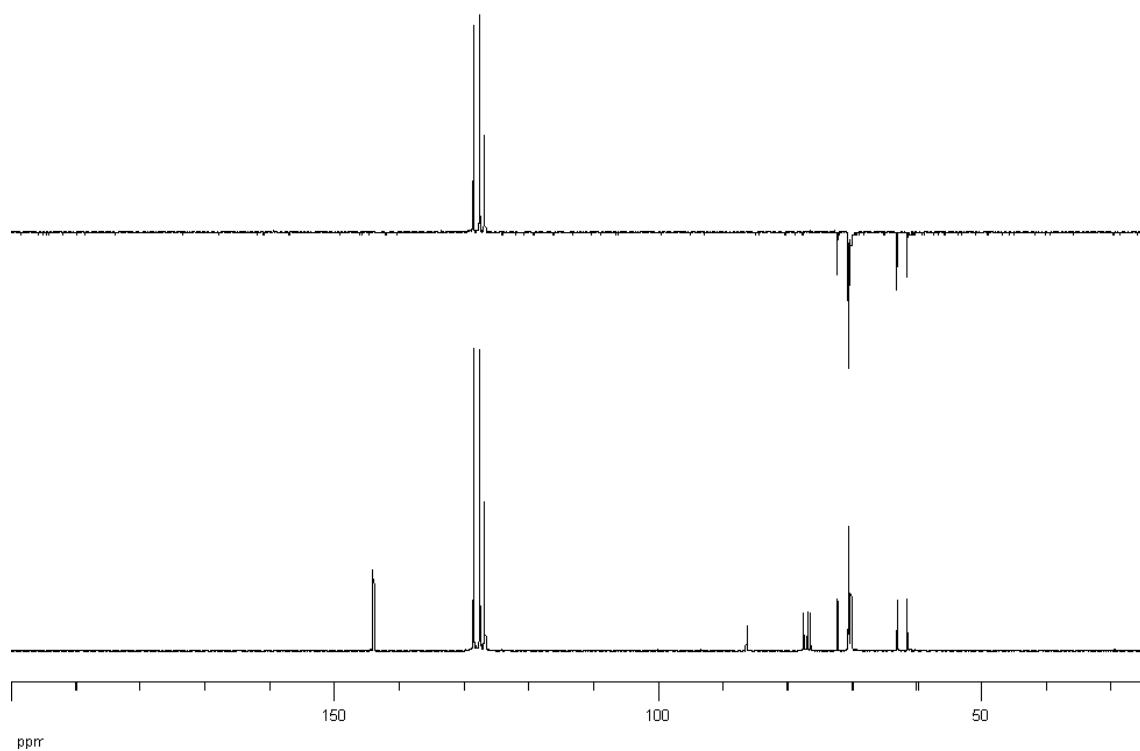
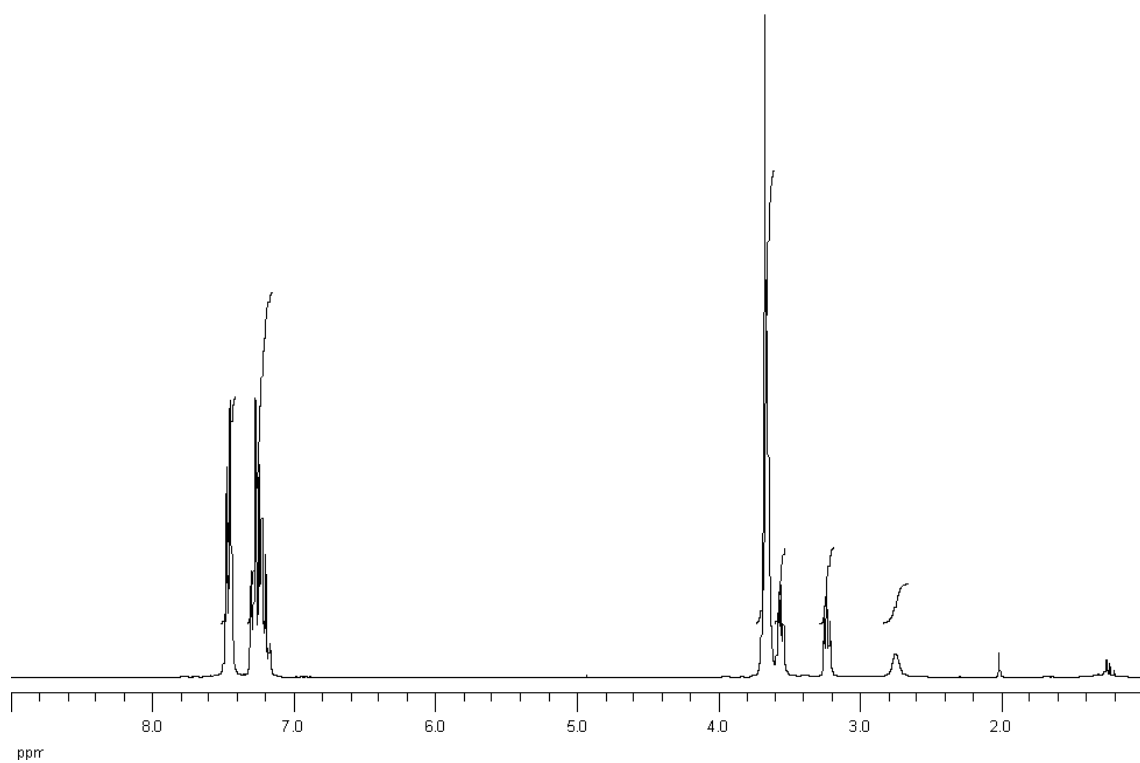
**Síntesis de 1,1,1-trifenil-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ol (57)**

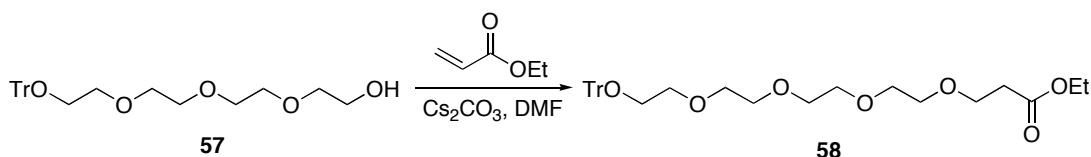
En un matraz de fondo redondo se disolvió el tetraetilenglicol (2 mL, 11.6 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 mL). Sobre la disolución se añadió cloruro de tritilo (1.61 g, 5.8 mmol), DMAP (71 mg, 0.58 mmol) y trietilamina (0.8 mL, 5.8 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$ . Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (15%  $\text{EtOAc}/15\% \text{CH}_2\text{Cl}_2/ \text{hexano}$ ), obteniéndose **57** como un aceite marrón (1.27 g, 25% de rendimiento).

**RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ ):** 7.46 (m, 6H), 7.30-7.20 (m, 9H), 3.66 (m, 12H), 3.56 (m, 2H), 3.26 (t, 2H,  $J=5.1$  Hz), 2.75 (s, 1H).

**RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ ):** 143.9 (3xC), 128.5 (6xCH), 127.6(6xCH), 126.8 (3xCH), 86.4 (C), 72.3 ( $\text{CH}_2$ ), 70.6 ( $\text{CH}_2$ ), 70.5 (3x $\text{CH}_2$ ), 70.2 ( $\text{CH}_2$ ), 63.2 ( $\text{CH}_2$ ), 61.5 ( $\text{CH}_2$ ).

**EMAR (ESI-TOF):** calculada para  $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{Na}_1\text{O}_5$  459.2142, encontrada 459.2157.



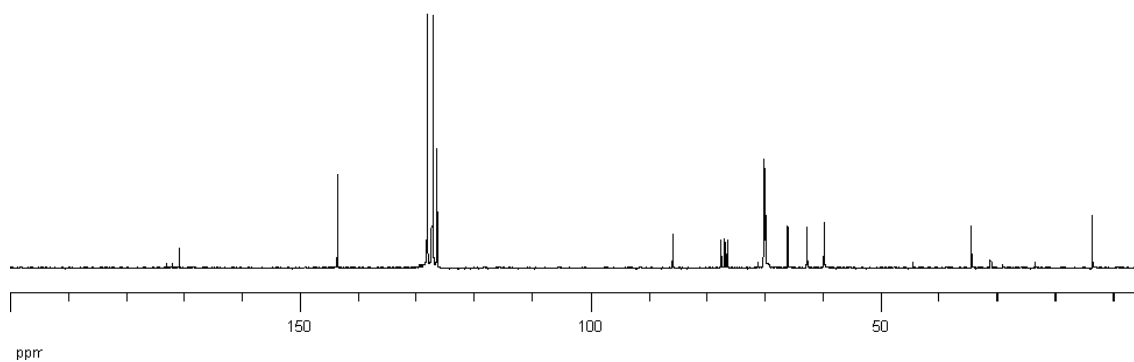
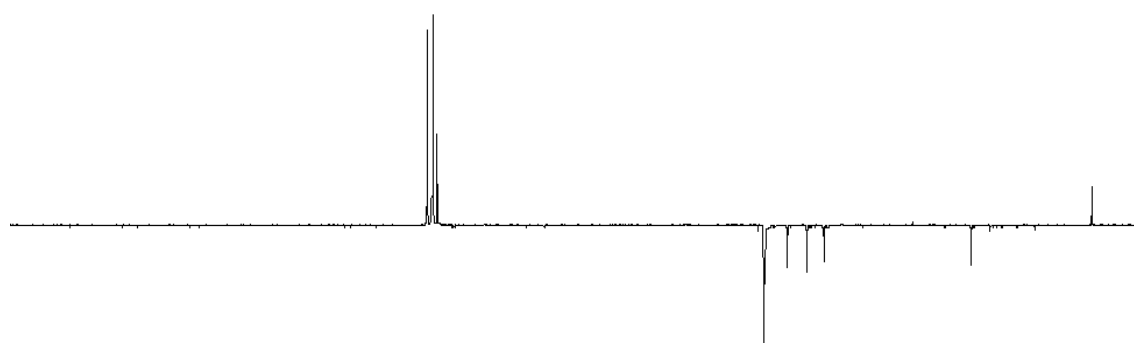
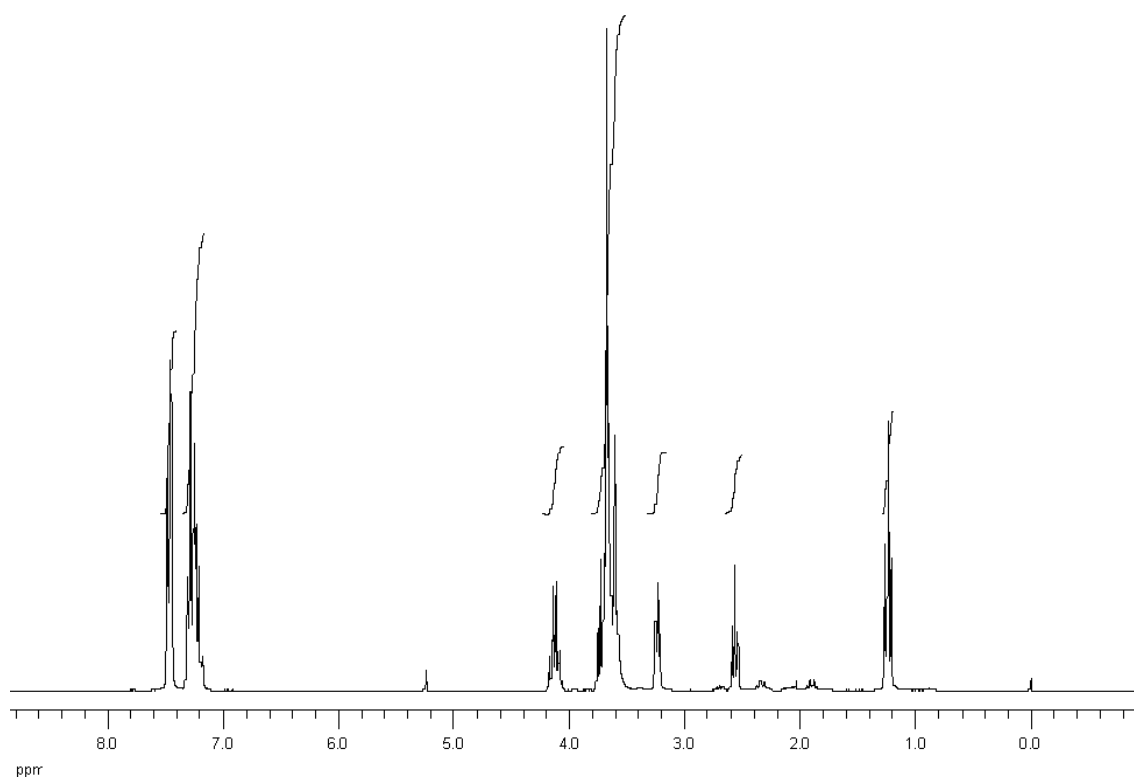
**Síntesis de 1,1,1-trifenil-2,5,8,11,14-pentaoxaheptadecan-17-oato de etilo (58)**

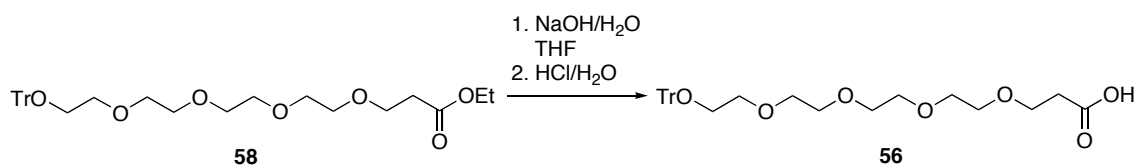
En un matraz de fondo redondo se disolvió el compuesto **57** (490 mg, 1.12 mmol) en DMF (5 mL), se añadió carbonato de cesio (456 mg, 1.40 mmol) y la suspensión resultante se agitó durante 15 min. A continuación se añadió el acrilato de etilo lentamente (244  $\mu$ L, 2.25 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. Después se añadió más acrilato de etilo (244  $\mu$ L, 2.25 mmol), se agitó durante 10 h y la mezcla se vertió sobre una disolución saturada de NaCl (aq). Después se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (15% EtOAc/15%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / hexano), obteniéndose el compuesto **58** como un aceite marrón (425 mg, 71% de rendimiento).

**RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ ):** 7.47 (m, 6H), 7.32-7.12 (m, 9H), 4.13 (q, 2H,  $J=7.0$ ), 3.73-3.59 (m, 16H), 3.23 (t, 2H,  $J=5.2$ ), 2.56 (t, 2H,  $J=6.5$ ), 1.24 (t, 2H,  $J=7.0$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ ):** 170.9 (C), 143.6 (3xC), 128.2 (6xCH), 127.2 (6xCH), 126.4 (3xCH), 86.0 (C), 70.3 ( $\text{CH}_2$ ), 70.2 (2x $\text{CH}_2$ ), 70.0 ( $\text{CH}_2$ ), 69.9 ( $\text{CH}_2$ ), 66.1 ( $\text{CH}_2$ ), 62.8 ( $\text{CH}_2$ ), 59.8 ( $\text{CH}_2$ ), 34.5 ( $\text{CH}_2$ ), 13.7 ( $\text{CH}_3$ ).

**EMAR (ESI-TOF):** calculada para  $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{Na}_1\text{O}_7$  559.2666, encontrada 559.2661.



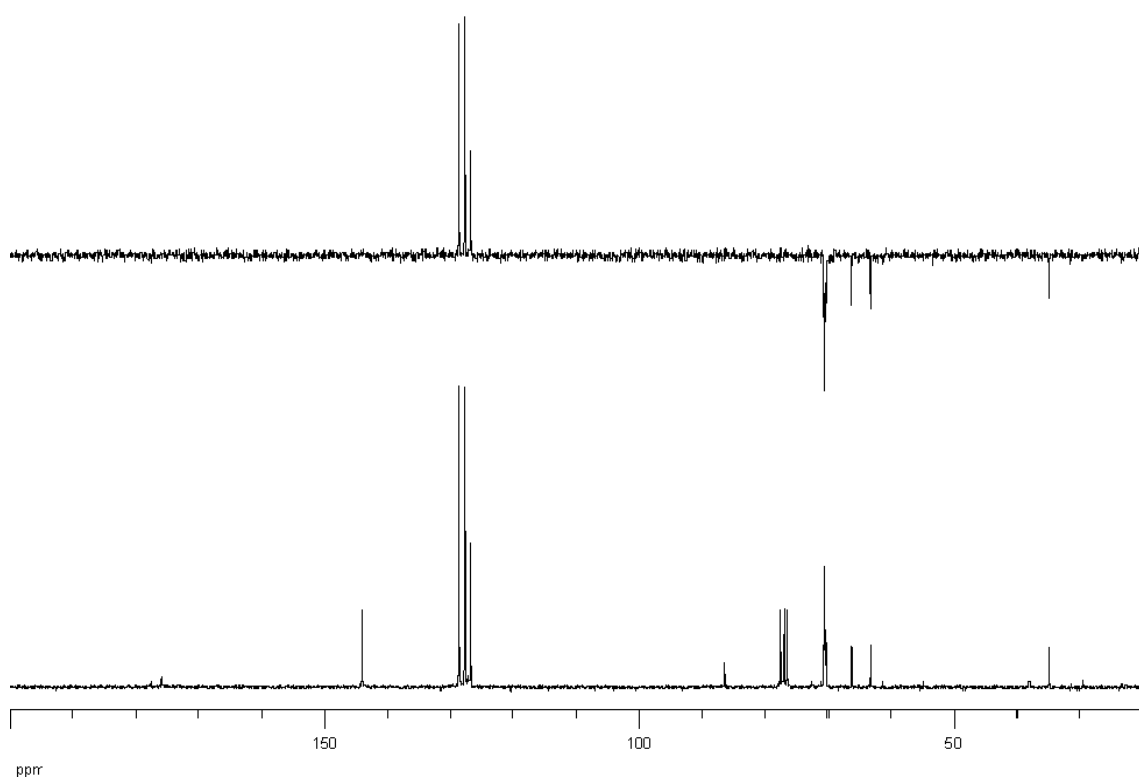
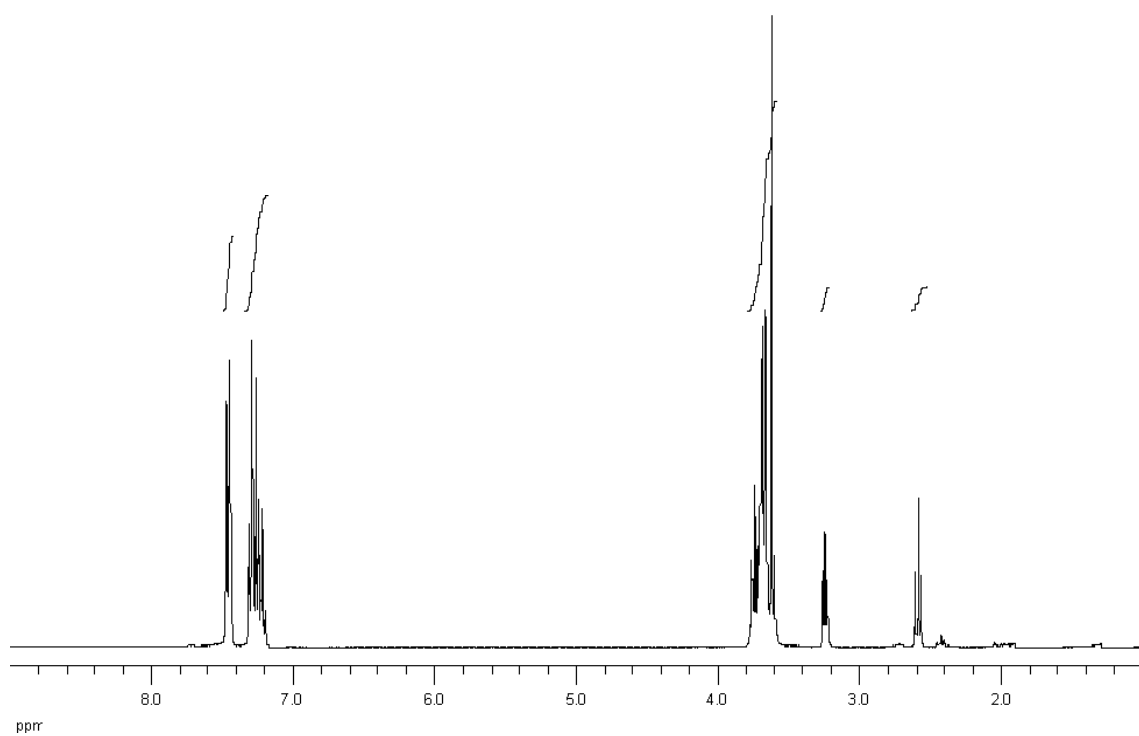
**Síntesis de ácido 1,1,1-trifenil-2,5,8,11,14-pentaoxaheptadecan-17-oico (56)**

El compuesto **58** (225 mg, 0.42 mmol) se disolvió en THF (4.2 mL) y se trató con una disolución acuosa de NaOH (2.1 mL, 0.5 M) durante 2 h. Después se acidificó con HCl acuoso (10%) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los extractos orgánicos combinados se secaron, filtraron y concentraron para dar el producto **56** como un aceite marrón (202 mg, 95% de rendimiento).

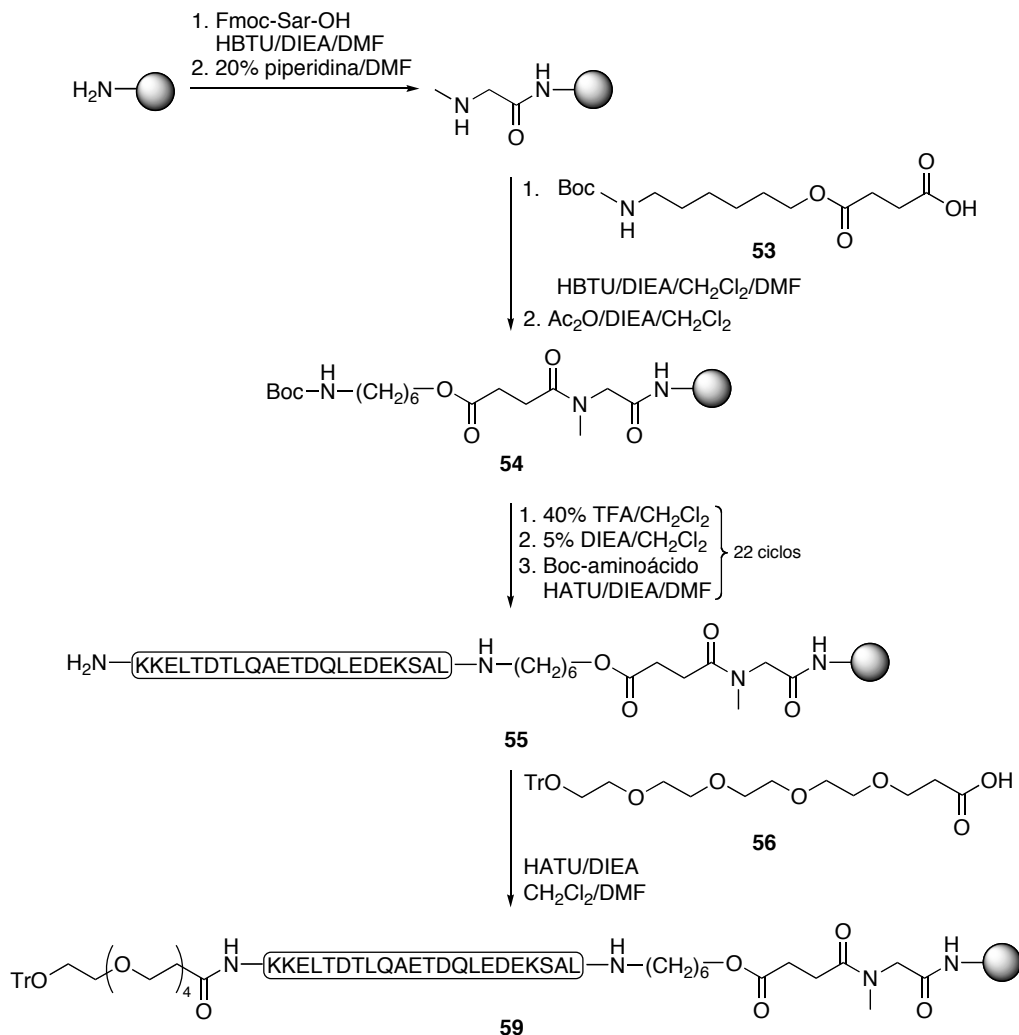
**RMN <sup>1</sup>H δ (CD<sub>3</sub>Cl):** 7.46 (m, 6H), 7.31-7.22 (m, 9H), 3.74-3.62 (m, 16H), 3.24 (t, 2H, *J*=5.1), 2.59 (t, 2H, *J*=5.1).

**RMN <sup>13</sup>C δ (CD<sub>3</sub>Cl):** 175.8 (C), 144.0 (3xC), 128.6 (6xCH), 127.7 (6xCH), 126.8 (3xCH), 88.5 (C), 70.7 (CH<sub>2</sub>), 70.5 (4xCH<sub>2</sub>), 70.3 (CH<sub>2</sub>), 70.2 (CH<sub>2</sub>), 66.3 (CH<sub>2</sub>), 63.1 (CH<sub>2</sub>), 34.8 (CH<sub>2</sub>).

**EMAR (ESI-TOF):** calculada para C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>Na<sub>1</sub>O<sub>7</sub> 531.2353, encontrada 531.2370.



## Síntesis de la peptidilresina 59

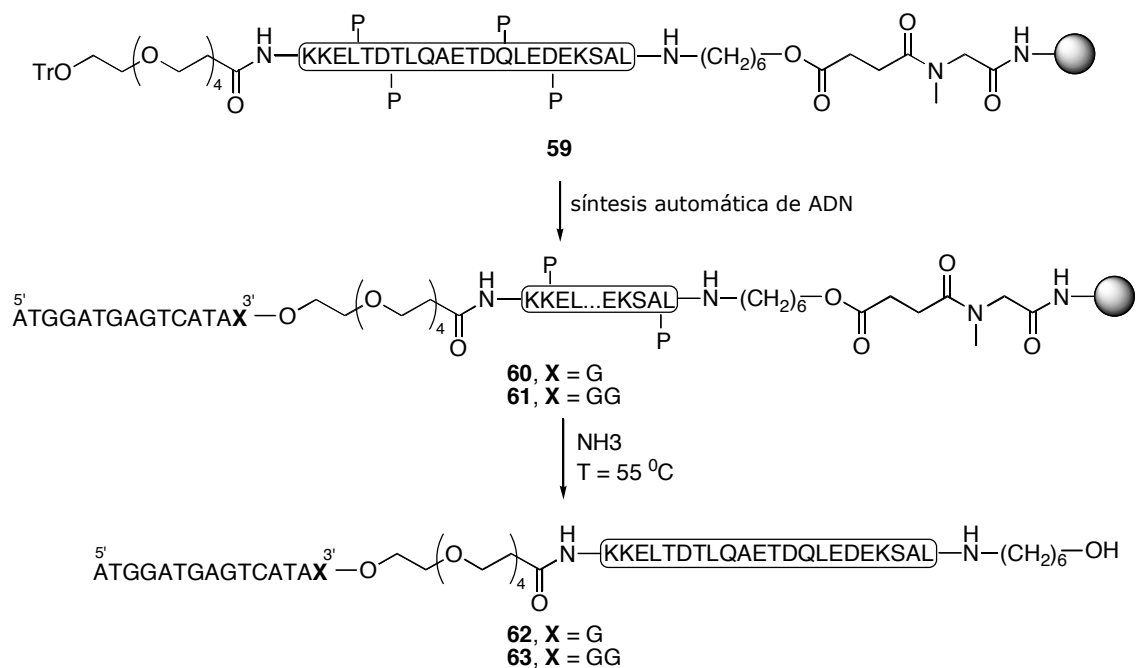


En una jeringa desechable provista de un filtro de polipropileno, la resina PEG-PS x HCl con una carga teórica inicial de 0.21 mmol/g (476 mg, ~0.1 mmol) se suspendió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se neutralizó por tratamiento con 5% DIEA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durante 10 min. Después se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 2 min) y con DMF (1 x 2 min) y se añadió la Fmoc-Sar-OH (156 mg, 0.5 mmol, 5 equiv) disuelta en DMF y los agentes de acoplamiento HBTU (190 mg, 0.5 mmol, 5 equiv) y DIEA (174 µL, 1 mmol, 10 equiv). La mezcla se agitó durante 30 min, se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 min), se desprotegió por tratamiento con 20% piperidina/DMF durante 15 min y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 min). A continuación se añadió sobre la resina el compuesto **53** (95 mg, 0.3 mmol, 3 equiv) disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, previamente activado con HBTU (114 mg, 0.3 mmol, 3 equiv) y DIEA (105 µL, 0.6 mmol, 6 equiv) en DMF. La suspensión se agitó durante 60 min y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 min). Sobre la resina suspendida en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se añadió Ac<sub>2</sub>O (95 µL, 1 mmol, 10 equiv) y DIEA (87 µL, 0.5 mmol, 5 equiv), la mezcla se agitó durante 15 min y la resina se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 min). Para llevar a cabo los acoplamientos, en primer

lugar se eliminó el grupo Boc por tratamiento de la resina con 40% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durante 20 min, se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 min), se neutralizó por tratamiento con 5% DIEA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 min). Después se disolvió el Boc-aminoácido correspondiente en DMF, se añadió HATU (152 mg, 0.4 mmol, 4 equiv) y DIEA (105 µL, 0.6 mmol, 6 equiv) y tras 3 min de activación la mezcla se añadió sobre la resina. La suspensión resultante se agitó durante 60 min y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 min). El ciclo se repitió hasta obtener la secuencia deseada.

Posteriormente, sobre una alícuota de la resina **55** (~0.02 mmol) se añadió el compuesto **56** (41 mg, 0.08 mmol, 4 equiv) disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, previamente activado con HATU (30 mg, 0.08 mmol, 4 equiv) y DIEA (21 µL, 0.12 mmol, 6 equiv) en DMF. La mezcla se añadió sobre la resina, se agitó durante 60 min y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 min).

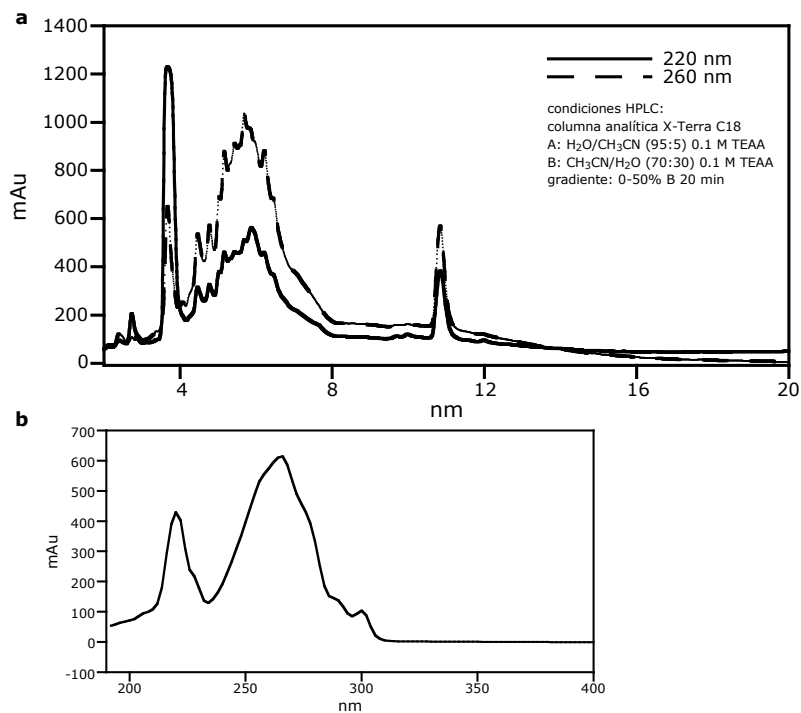
## Síntesis de los conjugados 62 y 63



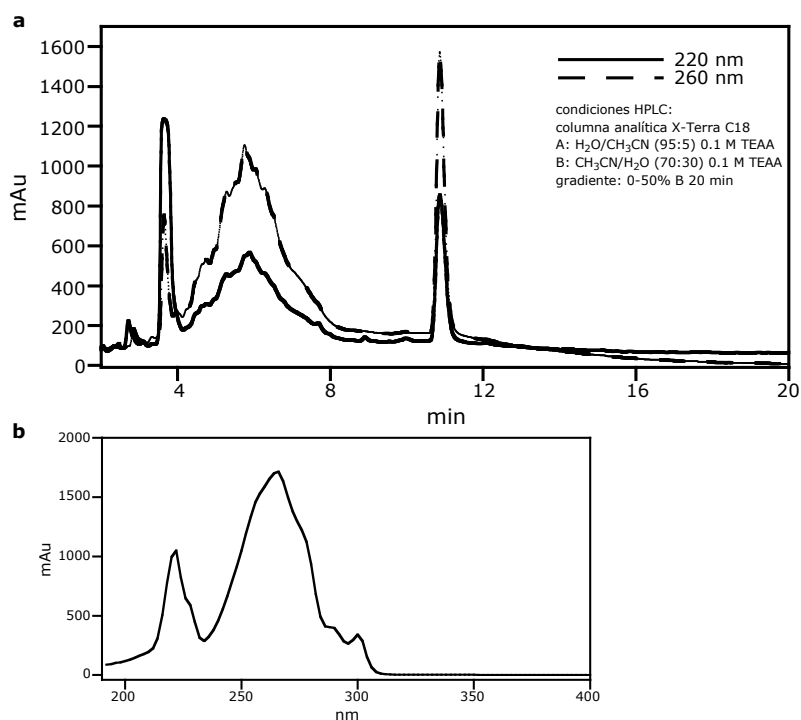
La incorporación de la parte oligonucleotídica se llevó a cabo en un sintetizador automático de ADN sobre la peptidilresina **59** utilizando 2-cianoetilfosforamiditos estándar, protegidos en su extremo 5' con DMTr y en las nucleobases con benzoílo (A y C) e isobutirilo (G). Los acoplamiento se llevaron a cabo en atmósfera de Ar con 0.02 mmol (20 equiv) del fosforamidito. En la siguiente tabla se muestra el ciclo de síntesis seguido hasta obtener la secuencia deseada.

OPERACIÓN	REACTIVO/DISOLVENTE	TIEMPO	REPETICIÓN
Lavado	CH <sub>3</sub> CN	10 s	1
Destritilación	2% TCA en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30 s	4
Lavado	CH <sub>3</sub> CN	15 s	2
Secado	Argón	5 s	1
Acoplamiento	0.1 M fosforamidito/0.4 M tetrazol en CH <sub>3</sub> CN	300 s	1
Acetilación	Ac <sub>2</sub> O/lutidina/THF (1:1:8) 0.1 M N-metilimidazol	60 s	1
Oxidación	0.05 M I <sub>2</sub> en THF/H <sub>2</sub> O/piridina (7:2:1)	60 s	1
Lavado	CH <sub>3</sub> CN	10 s	4
Secado	Argón	5 s	1

Los conjugados oligonucleótido-péptido se desprotegeron y separaron del soporte sólido por tratamiento con amoníaco concentrado a 55 °C durante 12 h. Los híbridos obtenidos se analizaron por cromatografía de HPLC en fase reversa.

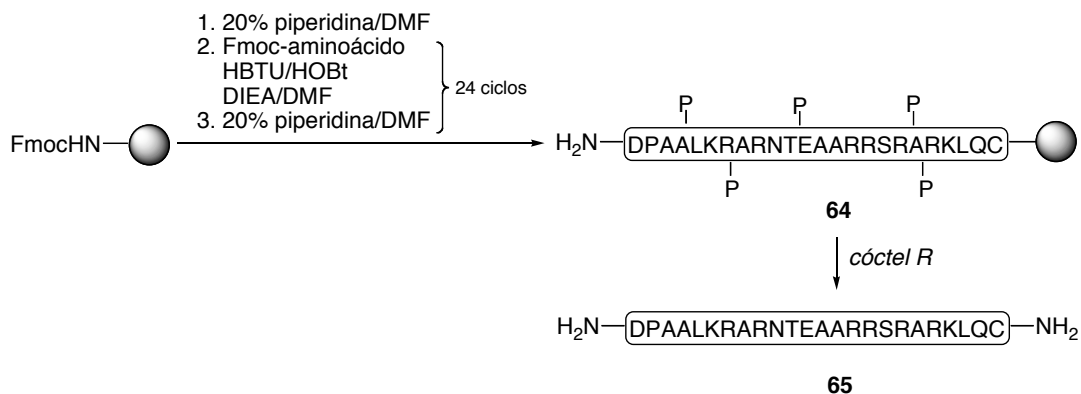


**Figura 160.** a) Cromatograma de HPLC correspondiente a la desprotección de la resina **60**. b) Espectro de UV del compuesto que eluye a 10.8 min.



**Figura 161.** a) Cromatograma de HPLC correspondiente a la desprotección de la resina **61**. b) Espectro de UV del compuesto que eluye a 10.8 min.

## Síntesis del péptido 65



En una jeringa provista de un filtro de polipropileno, la resina Rink amida MBHA con una carga teórica inicial de 0.46 mmol/g (210 mg, ~0.1 mmol) se suspendió en DMF y se agitó durante 30 min. La resina se desprotegió por tratamiento con 20% piperidina/DMF durante 15 min y se lavó con DMF (3 x 5 min). Para llevar a cabo los acoplamientos, se disolvió el correspondiente aminoácido (0.4 mmol, 4 equiv) en DMF y se añadió HBTU (152 mg, 0.4 mmol, 4 equiv), HOBt (54 mg, 0.4 mmol, 4 equiv) y DIEA (103  $\mu$ L, 0.6 mmol, 6 equiv). La mezcla se agitó 3 min, se añadió sobre la resina, la suspensión resultante se agitó durante 60 min y la resina se lavó con DMF (3 x 5 min). El grupo Fmoc se eliminó por tratamiento con 20% piperidina/DMF durante 15 min y después la resina se lavó con DMF (3 x 5 min). El ciclo se repitió hasta obtener la secuencia deseada. La desprotección y desanclaje del péptido se llevó a cabo por tratamiento de la resina con la mezcla TFA/EDT/anisol/tioanisol (90:3:2:5) según se indica en los procedimientos generales (página 146). El residuo obtenido se purificó por cromatografía de HPLC en fase reversa, se liofilizó y se identificó como el péptido **65** por espectrometría de masas.

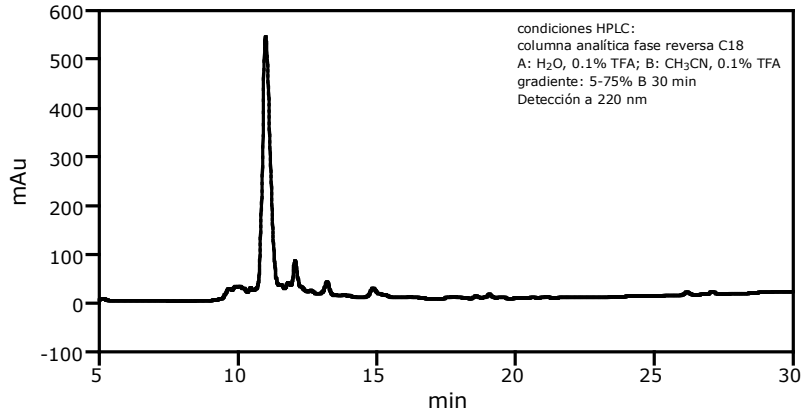
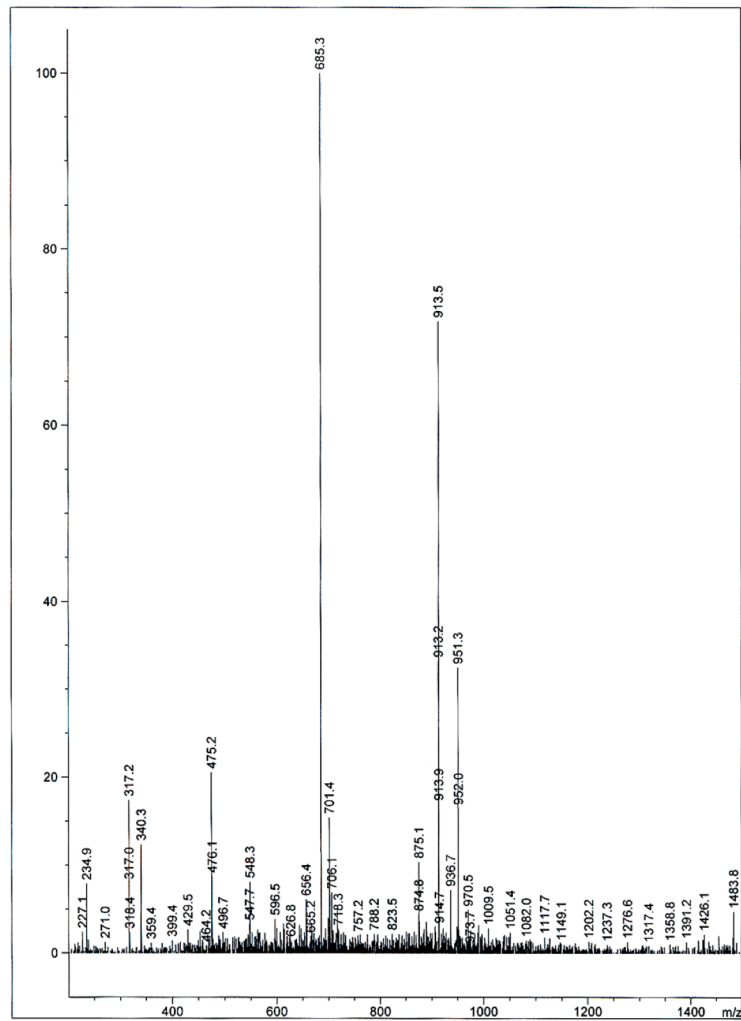
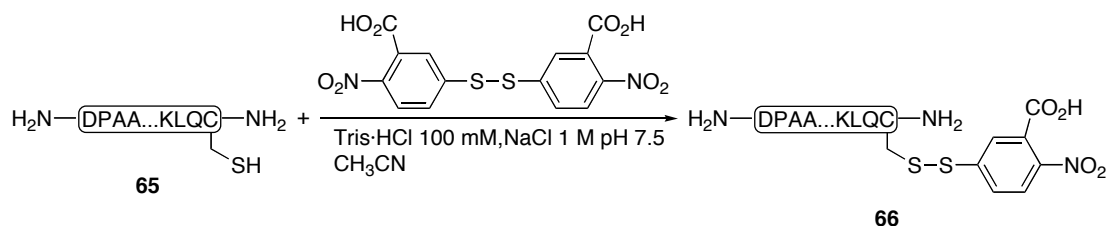


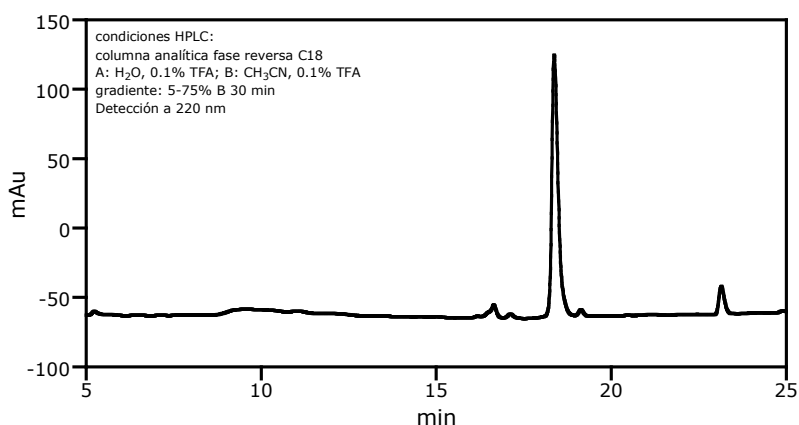
Figura 162. Cromatograma de HPLC del crudo de desprotección de **65**.



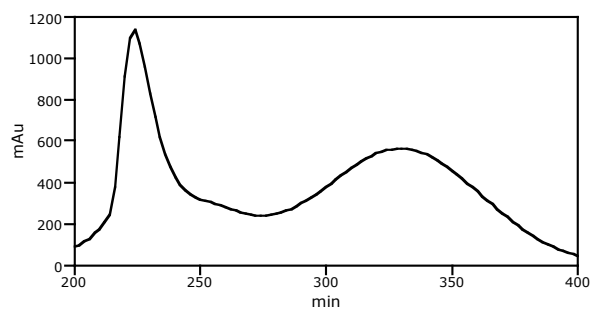
**EM-ESI-TOF** para el péptido **65**:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{111}H_{202}N_{47}O_{32}S_1$  2739.2, encontrada 2737.

Síntesis del péptido disulfuro **66**

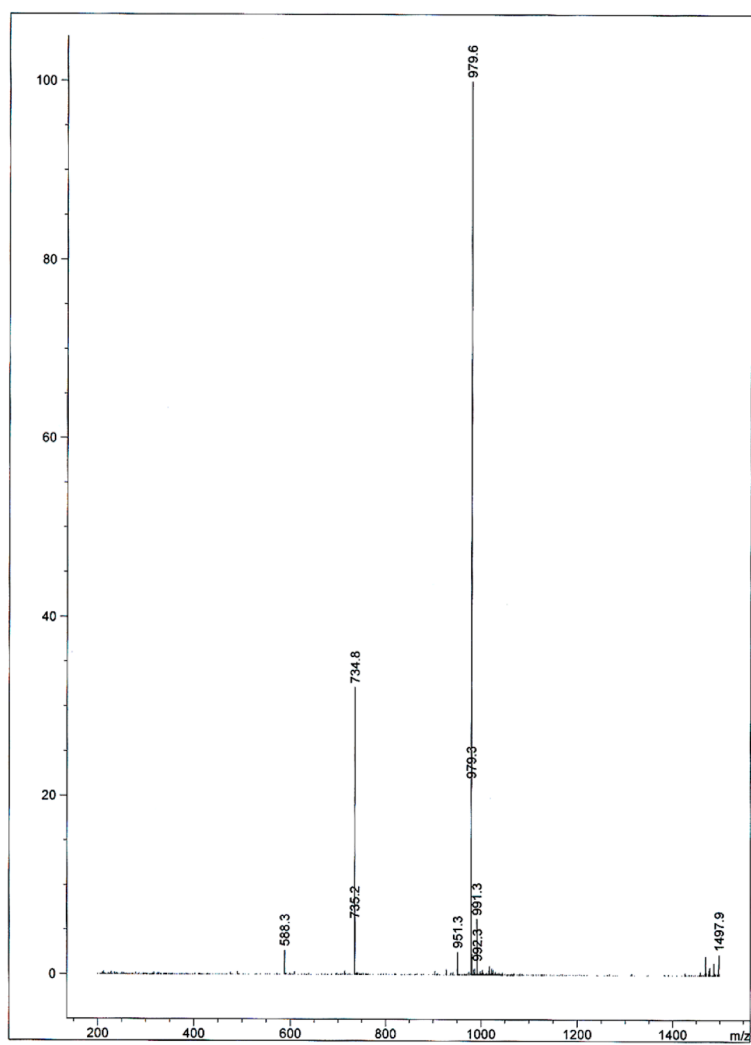
Sobre una disolución del péptido **65** (3.5 mg,  $1.2 \times 10^{-3}$  mmol) en tampón Tris·HCl 100 mM, NaCl 1 M (200  $\mu\text{L}$ , pH=7.5) se añadió una disolución de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) [0.9 mg; 112  $\mu\text{L}$  de una disolución 8 mg/mL en tampón Tris·HCl 100 mM, NaCl 1 M pH 7.5/CH<sub>3</sub>CN (6:4);  $2.4 \times 10^{-3}$  mmol, 2 equiv]. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 min y se comprobó por RP-HPLC la desaparición total del producto de partida y la aparición de un nuevo compuesto que se purificó, liofilizó e identificó como el péptido **66** por espectrometría de masas (2.5 mg, 73% de rendimiento).



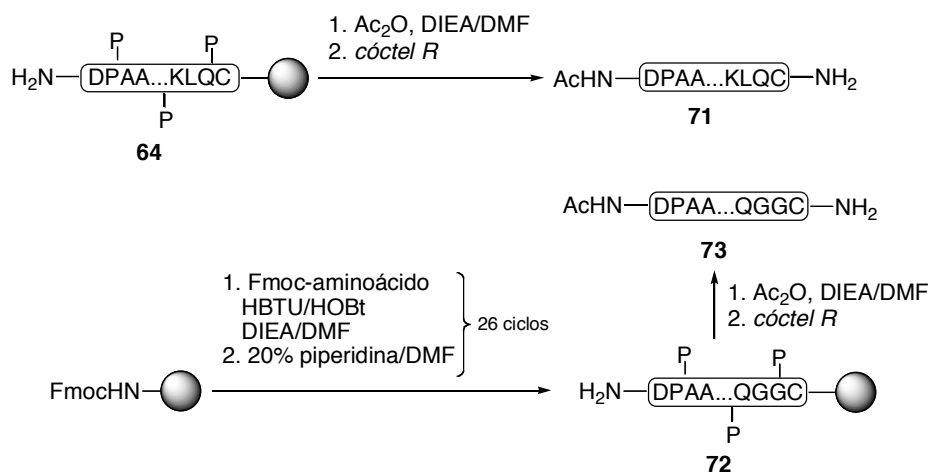
**Figura 163.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **66** después de 5 min.



**Figura 164.** Espectro de UV del péptido **66**.

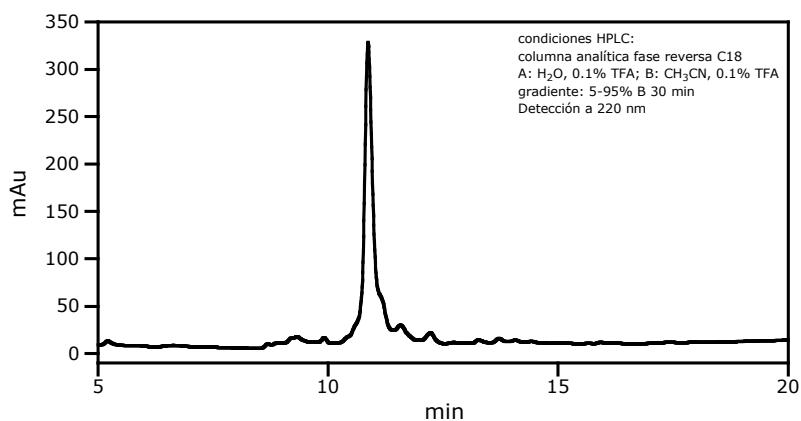


**EM-ESI-TOF** para el péptido **66**:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{118}H_{205}N_{48}O_{36}S_2$  2936.4, encontrada 2935.

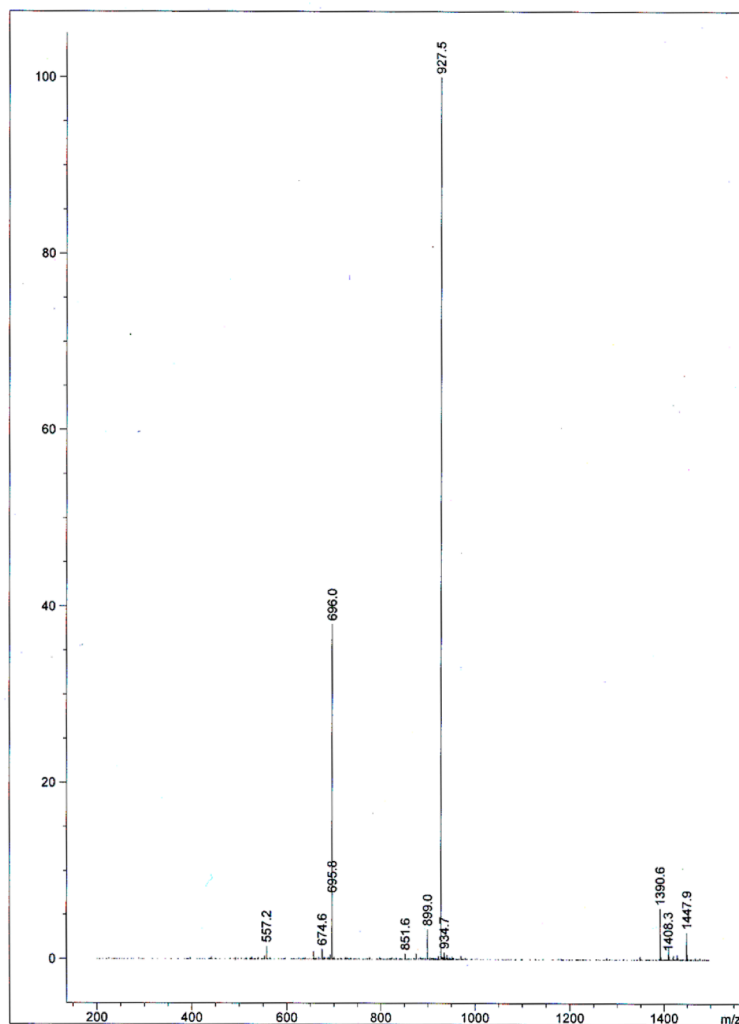
Síntesis de los péptidos acetilados **71** y **73**

Para la obtención de la resina **72** se utilizó el mismo procedimiento experimental que el empleado en la síntesis de la resina **64**. Las resinas **64** y **72** (alícuotas de  $\sim 0.02$  mmol) se acetilaron con  $\text{Ac}_2\text{O}$  ( $19 \mu\text{L}$ , 10 equiv) y DIEA ( $17 \mu\text{L}$ , 5 equiv) en DMF. Las mezclas se agitaron durante 30 min y a continuación se lavaron con DMF ( $3 \times 5$  min) y  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $2 \times 2$  min). Las resinas se secaron y desprotegieron por tratamiento con TFA/EDT/anisol/tioanisol (90:3:2:5) según se indica en los procedimientos generales (pág. 146). Los péptidos obtenidos se purificaron por cromatografía de HPLC en fase reversa, se liofilizaron y se identificaron como los péptidos **71** y **73** por espectrometría de masas.

Péptido **71**

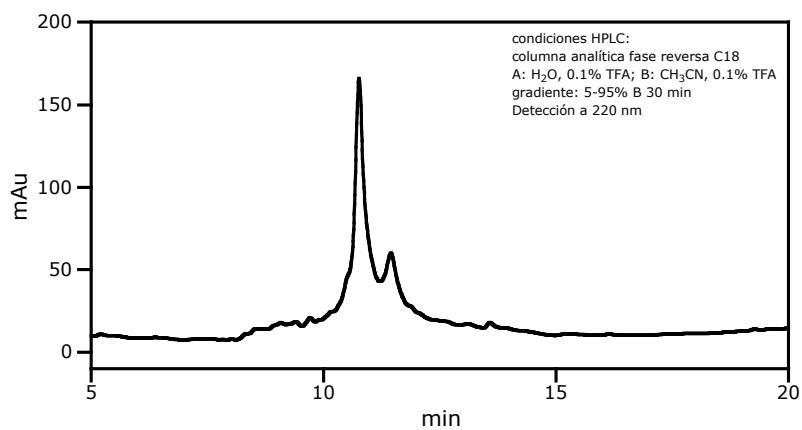


**Figura 165.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **71**.

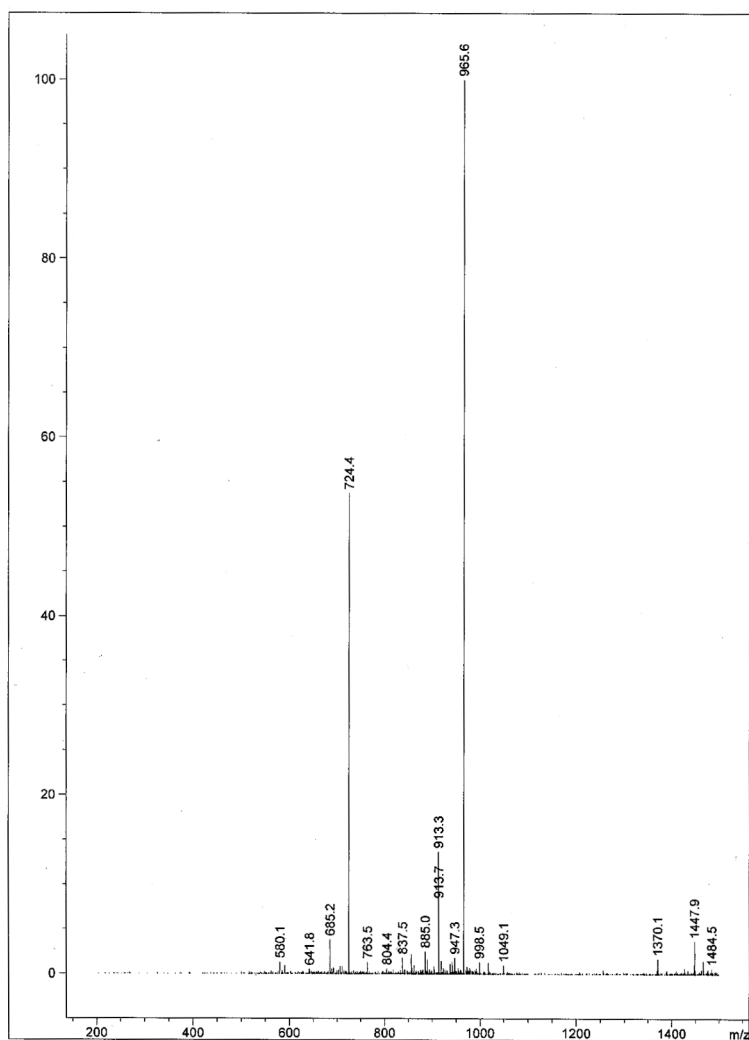


**EM-ESI-TOF** para el péptido **71**: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>113</sub>H<sub>204</sub>N<sub>47</sub>O<sub>33</sub>S<sub>1</sub> 2781.2, encontrada 2779.6.

Péptido **73**

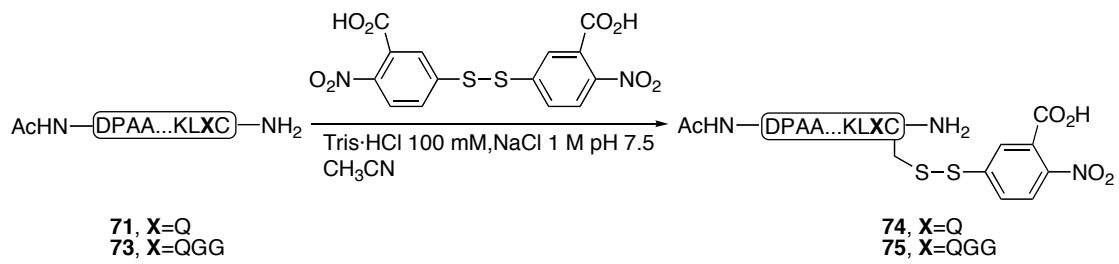


**Figura 166.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **73**.



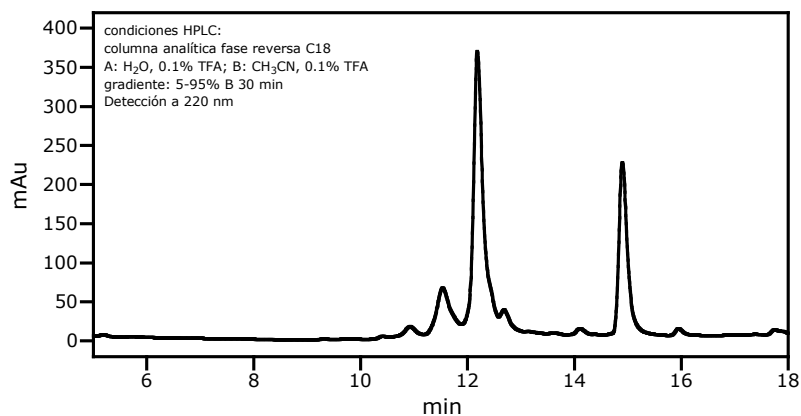
**EM-ESI-TOF** para el péptido **73**: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>117</sub>H<sub>210</sub>N<sub>49</sub>O<sub>35</sub>S<sub>1</sub> 2895.3, encontrada 2893.2.

**Síntesis de los péptidos disulfuro 74 y 75**

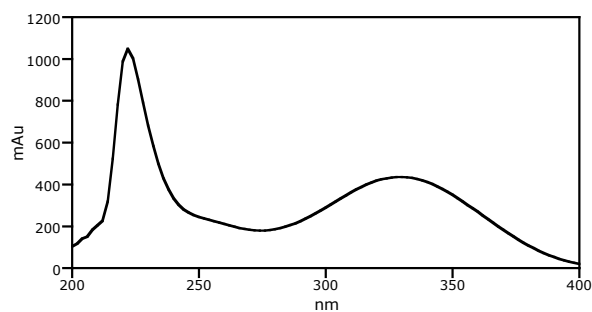


Para la obtención de los péptidos **74** y **75** se partió de los péptidos **71** y **73**, respectivamente y se siguió un procedimiento experimental idéntico al utilizado para la obtención de **66**. Después de 5 min de reacción, los productos mayoritarios se purificaron, liofilizaron e identificaron como los péptidos buscados por espectrometría de masas.

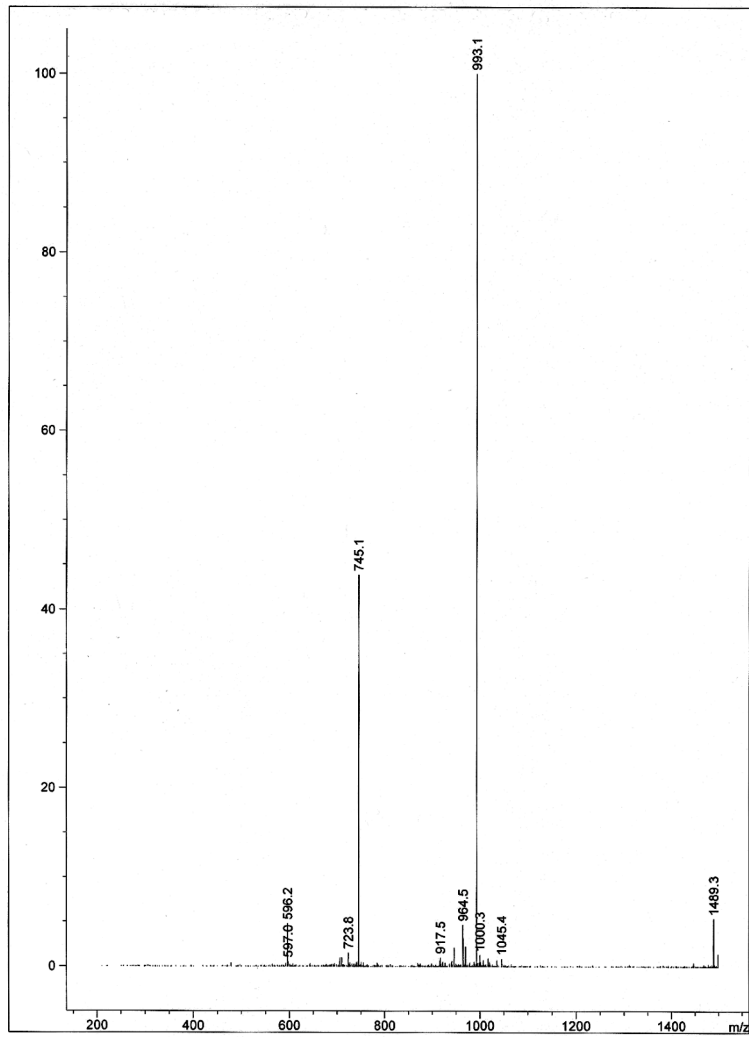
Péptido **74** [1.0 mg, ~ 46% de rendimiento].



**Figura 167.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **74** después de 5 min.

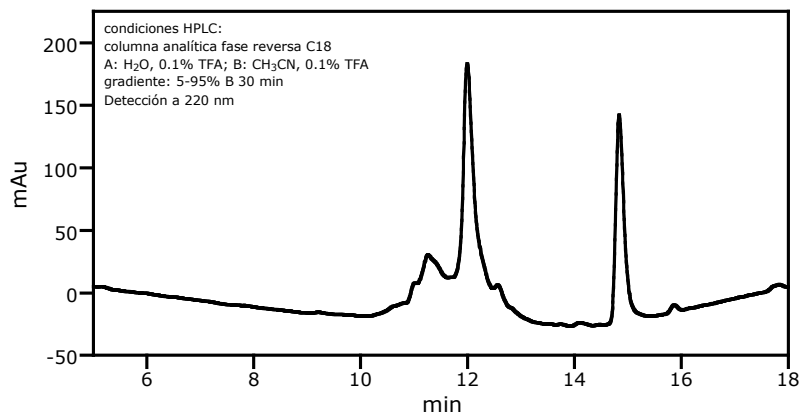


**Figura 168.** Espectro de UV del péptido **74**.



**EM-ESI-TOF** para el péptido **74**:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{120}H_{207}N_{48}O_{38}S_2$  2978.4, encontrada 2976.4.

Péptido **75** [1.2 mg, ~57% de rendimiento].



**Figura 169.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **75** después de 5 min.

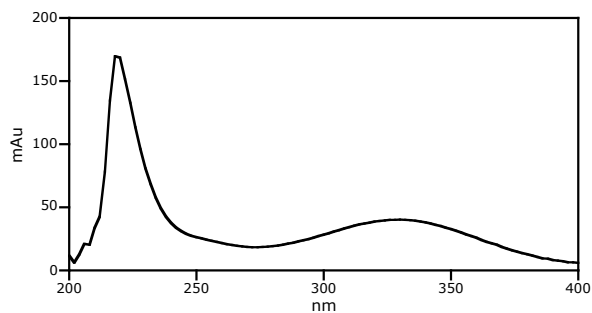
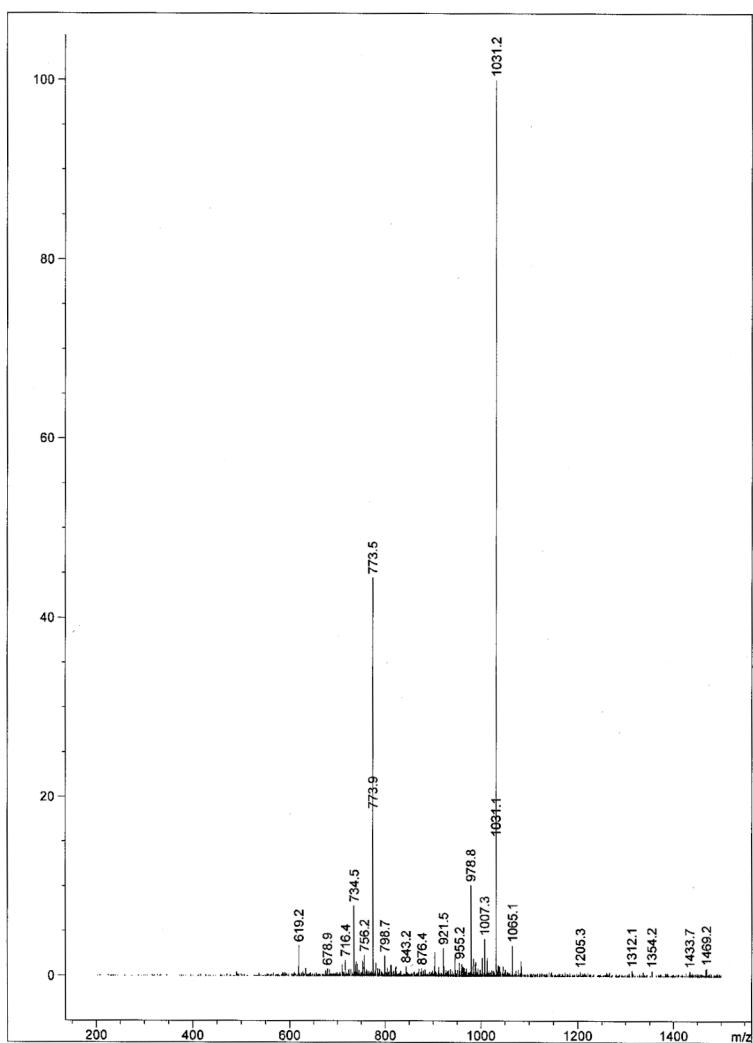


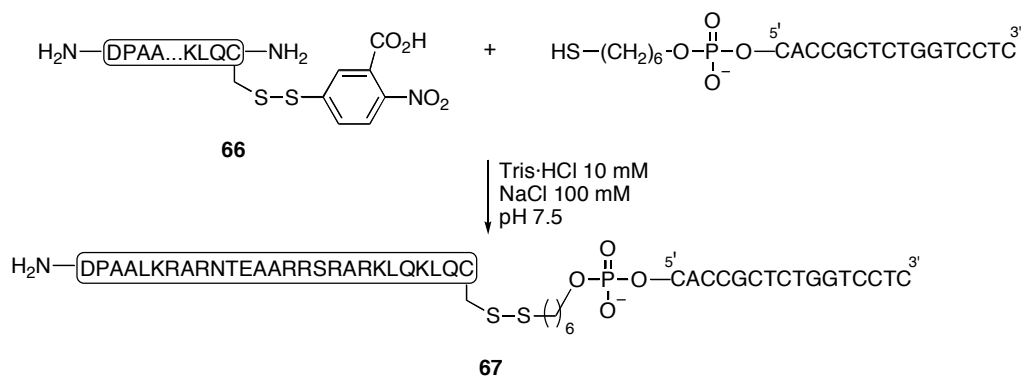
Figura 170. Espectro de UV del péptido **75**.



**EM-ESI-TOF** para el péptido **75**:  $[MH]^+$  calculada para  $C_{124}H_{213}N_{49}O_{39}S_2$  3092.5, encontrada 3090.5.

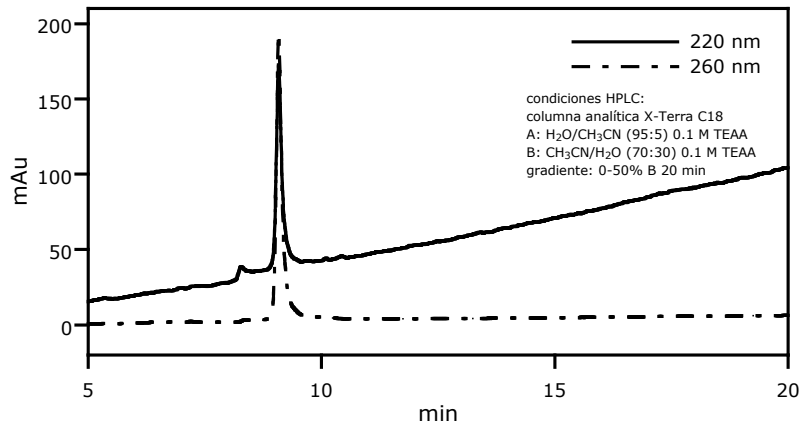
### Síntesis de los conjugados oligonucleótido-péptido **67**, **68**, **76** y **77**

Para la obtención de estos híbridos se siguió el mismo procedimiento experimental en todos los casos, que se ilustra para el híbrido **67**.

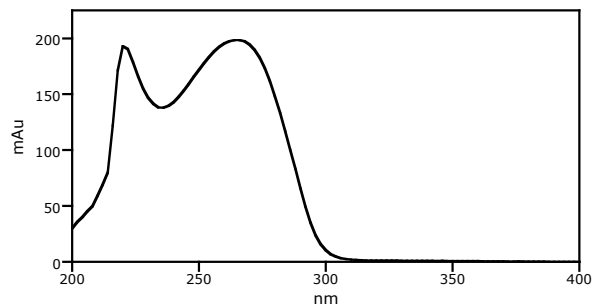


En un vial de 1 mL se agitó una mezcla del oligonucleótido-tiol (0.014  $\mu\text{mol}$ ) y del péptido **66** (123.3  $\mu\text{g}$ , 0.042  $\mu\text{mol}$ , 3 equiv) en tampón Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM (200  $\mu\text{L}$ , pH=7.5). Después de 5 min se comprobó por RP-PHLC la total desaparición del oligonucleótido-tiol de partida y la aparición de un nuevo compuesto que se purificó, se liofilizó y se identificó como el conjugado-oligonucleótido péptido **67** por espectrometría de masas.

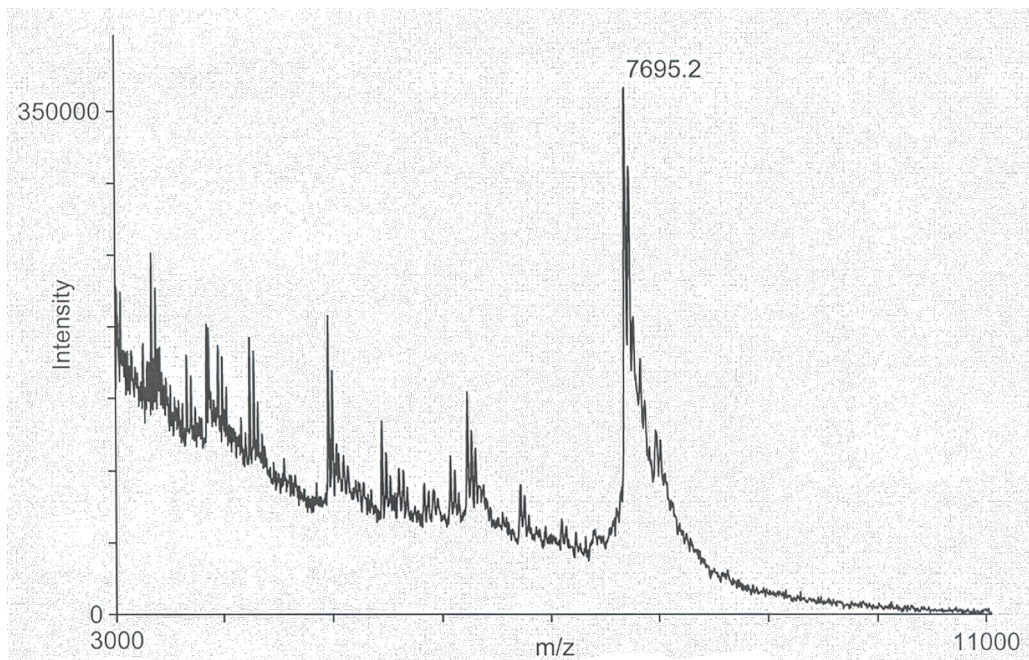
Conjugado-oligonucleótido péptido **67** [54 µg, 50% de rendimiento].



**Figura 171.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **67** después de 5 min.

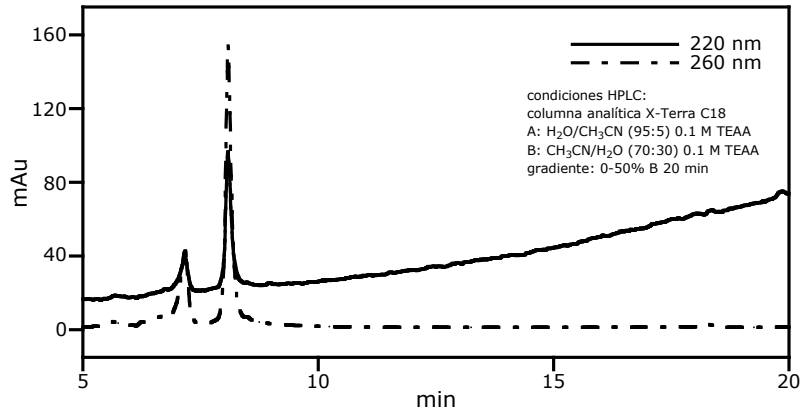
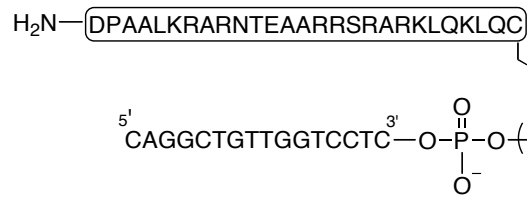


**Figura 172.** Espectro de UV del conjugado **67**.

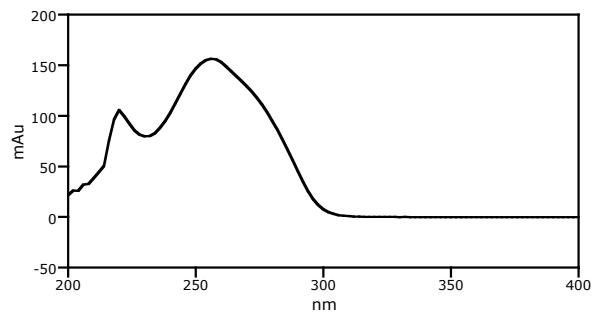


**EM-MALDI-TOF** para el conjugado **67**: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>266</sub>H<sub>410</sub>N<sub>99</sub>O<sub>132</sub>P<sub>16</sub>S<sub>2</sub> 7703.1, encontrada 7695.2.

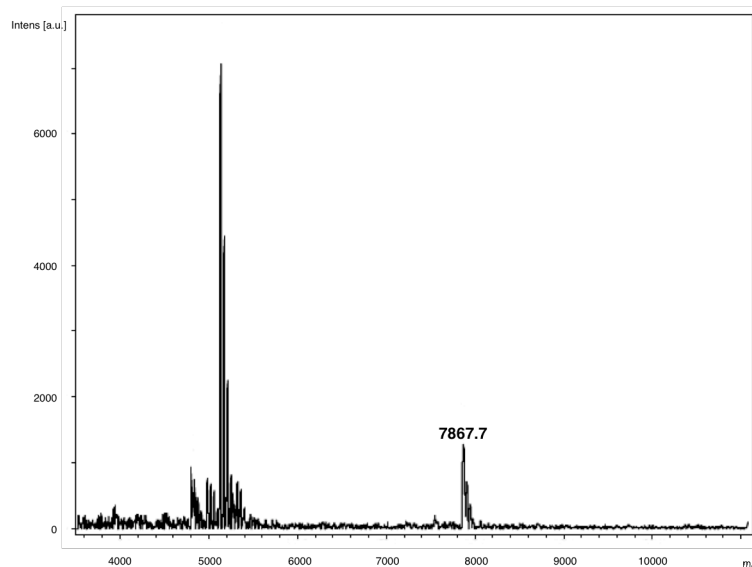
Conjugado-oligonucleótido péptido **68** [44 µg, 40% de rendimiento]



**Figura 173.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **68** después de 5 min.

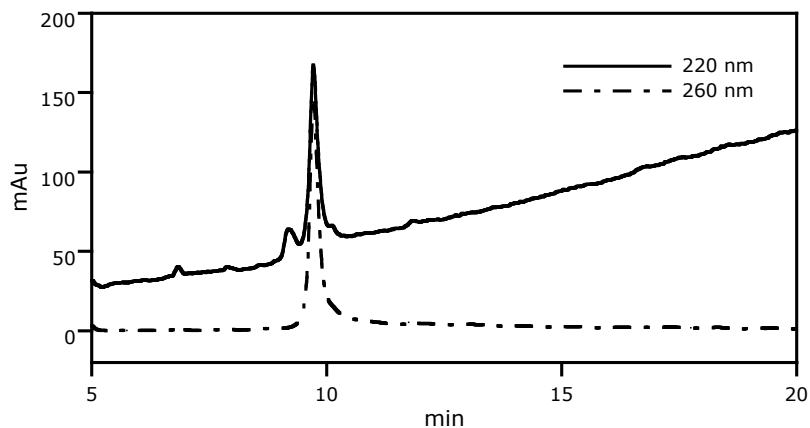
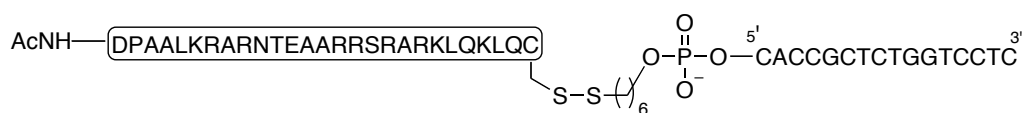


**Figura 174.** Espectro de UV del conjugado **68**.

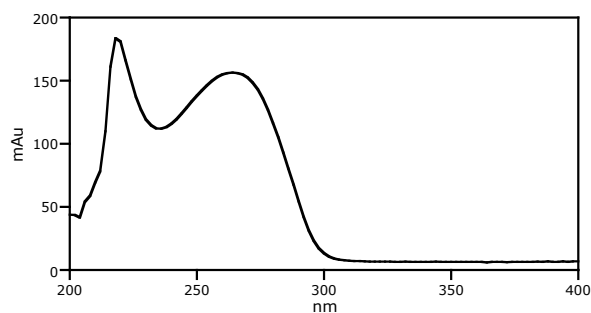


**EM-MALDI-TOF** para el conjugado **68**:  $[\text{MH}]^+$  calculada para  $\text{C}_{269}\text{H}_{405}\text{N}_{102}\text{O}_{133}\text{P}_{16}\text{S}_2$  7870.4, encontrada 7867.7.

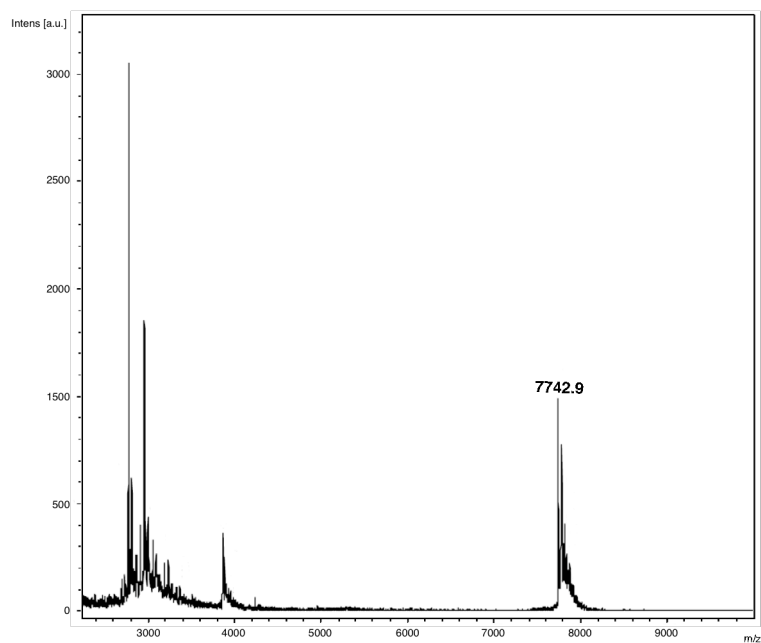
Conjugado-oligonucleótido péptido **76** [36  $\mu$ g, ~33% de rendimiento].



**Figura 175.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **76** después de 5 min. Condiciones de HPLC: columna analítica X-Terra C18, 0-50% B en 20 min [A: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (95:5), 0.1 M TEAA; B: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (70:30), 0.1 M TEAA].

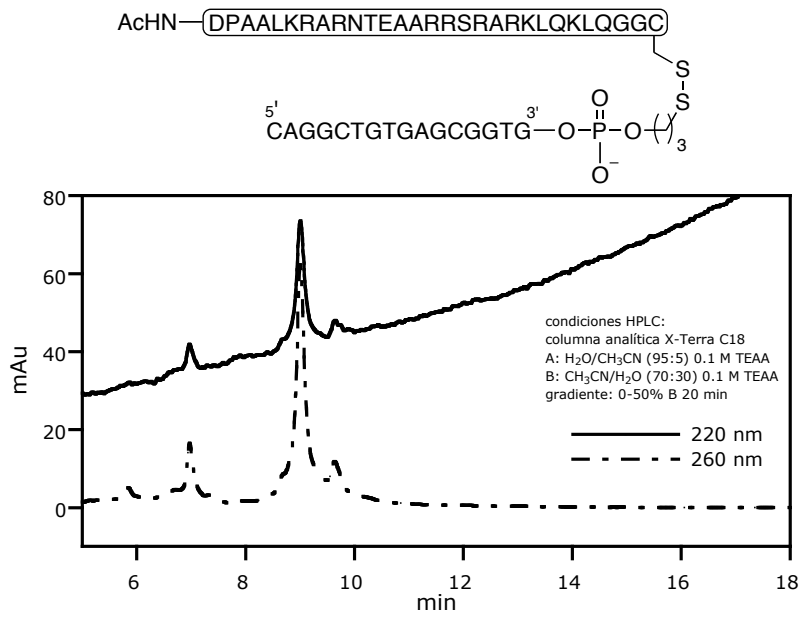


**Figura 176.** Espectro de UV del conjugado **76**.

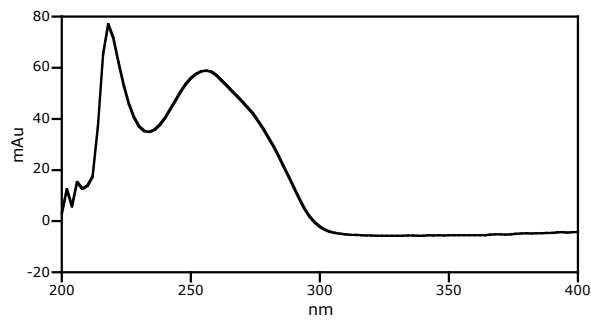


**EM-MALDI-TOF** para el conjugado **76**: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>315</sub>H<sub>474</sub>N<sub>93</sub>O<sub>148</sub>P<sub>13</sub>S<sub>1</sub> 7746.3, encontrada 7742.9.

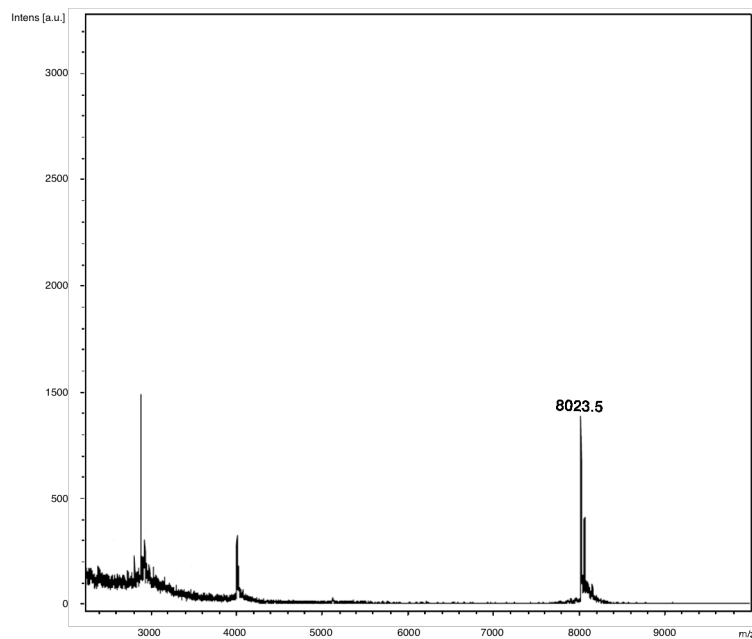
Conjugado-oligonucleótido péptido **77**.



**Figura 177.** Cromatograma de HPLC para la obtención de **77** después de 5 min.



**Figura 178.** Espectro de UV del conjugado **77**.



**EM-MALDI-TOF** para el conjugado **77**: [MH]<sup>+</sup> calculada para C<sub>275</sub>H<sub>415</sub>N<sub>104</sub>O<sub>136</sub>P<sub>16</sub>S<sub>2</sub> 8027.7, encontrada 8023.5.

## **VI. ANEXOS**



## Anexo I: Síntesis de péptidos en fase sólida

La síntesis peptídica consiste en la formación química repetida de enlaces amida con el fin de conectar funciones amina y carboxilo de  $\alpha$ -aminoácidos adyacentes. Clásicamente, la síntesis de péptidos se llevaba a cabo en disolución. La introducción de la metodología de fase sólida por Merrifield en 1963 mejoró la síntesis, haciéndola más rápida y eficiente.<sup>152</sup>

La construcción de una cadena peptídica sobre un soporte sólido tiene lugar por la adición sucesiva de  $\alpha$ -aminoácidos, de manera que se forma un nuevo enlace amida entre el grupo carboxilo activado del aminoácido y el grupo amino terminal del aminoácido unido a la resina.<sup>153</sup> Para que se puedan llevar a cabo los acoplamientos de manera efectiva, las cadenas laterales de los aminoácidos se protegen permanentemente durante toda la síntesis, utilizando grupos protectores que no se vean afectados por las condiciones de los acoplamientos. Los aminoácidos se incorporan secuencialmente en la dirección C-terminal a N-terminal con la función  $\alpha$ -amina protegida de forma temporal, así que se desprotege una vez acoplado el aminoácido para dar lugar al nuevo enlace peptídico. Al final de la síntesis se obtiene un péptido unido a la resina a través de un espaciador por su extremo C-terminal, que puede liberarse en forma de amida o de carboxilo en función del espaciador elegido. Los grupos protectores de las cadenas laterales suelen elegirse de forma que se rompan al mismo tiempo que se libera el péptido del soporte sólido.

La metodología de síntesis en fase sólida posee varias ventajas:

- facilidad para eliminar los excesos de reactivos, productos secundarios y disolventes por simple filtración y lavado del polímero que contiene el péptido en crecimiento
- posibilidad de usar exceso de reactivos, lo que permite que las reacciones de acoplamiento se completen en poco tiempo y en alto rendimiento
- posibilidad de automatización de todo el proceso sintético

La mayor limitación la constituye la acumulación de reacciones laterales o incompletas en la resina durante el crecimiento de la cadena, lo que provoca la contaminación del producto final.

Los dos principales esquemas de protección utilizados en la metodología de fase sólida de síntesis de péptidos se denominan **Boc/Bzl** y **Fmoc/<sup>t</sup>Bu**, en función de la combinación de grupos protectores que utilizan.

En la metodología **Boc/Bzl** se utiliza el grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc) para la protección temporal de la función  $\alpha$ -amino de los aminoácidos, y grupos de tipo bencilo (Bzl) para proteger las cadenas laterales.

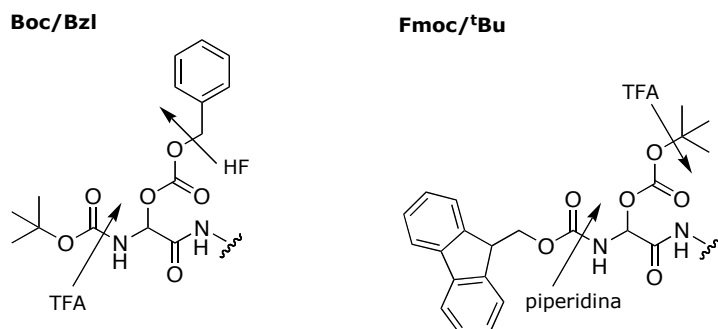
La estrategia **Fmoc/<sup>t</sup>Bu** se basa en la utilización del grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) -lábil en medio básico- para la protección del grupo  $\alpha$ -amino, y grupos protectores

<sup>152</sup> a) Merrifield, R. B. "Solid-phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide" *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149. b) Merrifield, R. B. "Solid-phase peptide synthesis (novel lecture)" *Science* **1965**, *150*, 178.

<sup>153</sup> a) Atherton, E.; Sheppard, R. C. *Solid phase peptide synthesis: a practical approach* **1989** IRL Press, Oxford. b) Albericio, F.; Lloyd-Williams, P.; Giral, E. "Métodos de síntesis peptídica" en *Péptidos en Biología y Biomedicina* **1997** Ed: Andreu, D.; Rivas, L. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, cap. 2.

sensibles al medio ácido del tipo *tert*-butilo (<sup>t</sup>Bu) para las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales.

La desprotección del grupo Boc se lleva a cabo por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) y la del Fmoc, con piperidina. La separación final del soporte sólido y desprotección simultánea de las cadenas laterales de los aminoácidos requiere condiciones ácidas fuertes: tratamiento con HF en la estrategia Boc/Bzl y TFA en la metodología Fmoc/<sup>t</sup>Bu.



**Figura 179.** Roturas de los grupos protectores en las diferentes estrategias de síntesis en fase sólida.

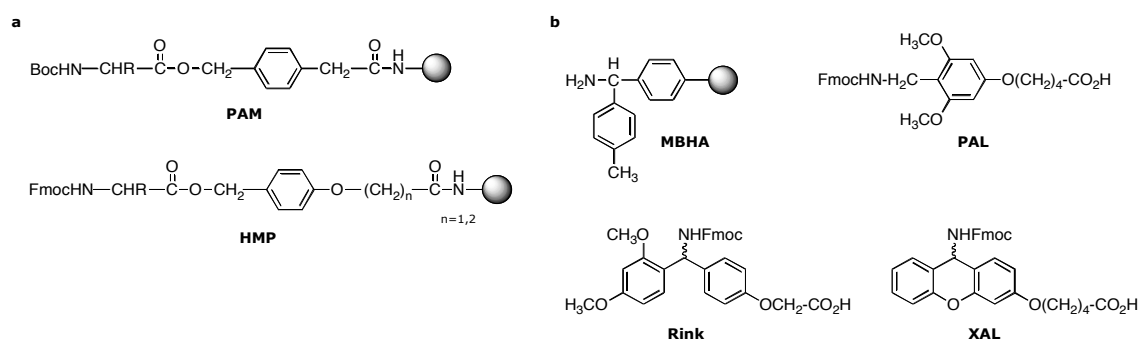
En cuanto al **soporte sólido**, se suelen utilizar resinas con tamaño pequeño de partículas y con poco entrecruzamiento entre las cadenas de polímero.<sup>154</sup> El soporte debe favorecer la difusión rápida de los reactivos y el acceso eficiente a los sustratos inmovilizados en la resina. La mayoría de los polímeros utilizados son de poliestireno o de poliamida, aunque en los últimos años se están utilizando más frecuentemente materiales basados en polietilenglicol injertado sobre poliestireno, donde se combina la hidrofobia del poliestireno con la hidrofilia del polietilenglicol.<sup>155</sup>

El **conector** o **espaciador** es un compuesto bifuncional que proporciona una unión reversible entre el soporte sólido y la cadena peptídica, además de proteger el grupo C-terminal durante el proceso de elongación de la cadena.<sup>156</sup> La elección del espaciador determina la funcionalización del grupo C-terminal en el producto final. La mayoría de los espaciadores están diseñados para liberar los péptidos en forma de ácido o amida en su extremo C-terminal. Para el primer caso, los espaciadores más comunes son los de tipo bencilo: PAM para la estrategia Boc/Bzl y HMP para la estrategia Fmoc/<sup>t</sup>Bu, que incorporan el primer aminoácido protegido. Para los péptidos que se liberan como amidas, en la estrategia Boc/Bzl se utiliza la resina MBHA, y en la Fmoc/<sup>t</sup>Bu se utilizan, principalmente, los espaciadores PAL, Rink y XAL.

<sup>154</sup> Sherrington, D. C. "Preparation, structure and morphology of polymer supports" *Chem. Comm.* **1998**, 21, 2275.

<sup>155</sup> Saplisky, S.; Chang, J. L.; Albercio, F.; Barany, G. "Preparation and applications of polyethylene glycol-polystyrene graft resin supports for solid-phase synthesis" *Reactive Polymers* **1994**, 22, 243.

<sup>156</sup> James, I. W. "Linkers for solid-phase organic synthesis" *Tetrahedron* **1999**, 55, 4855.

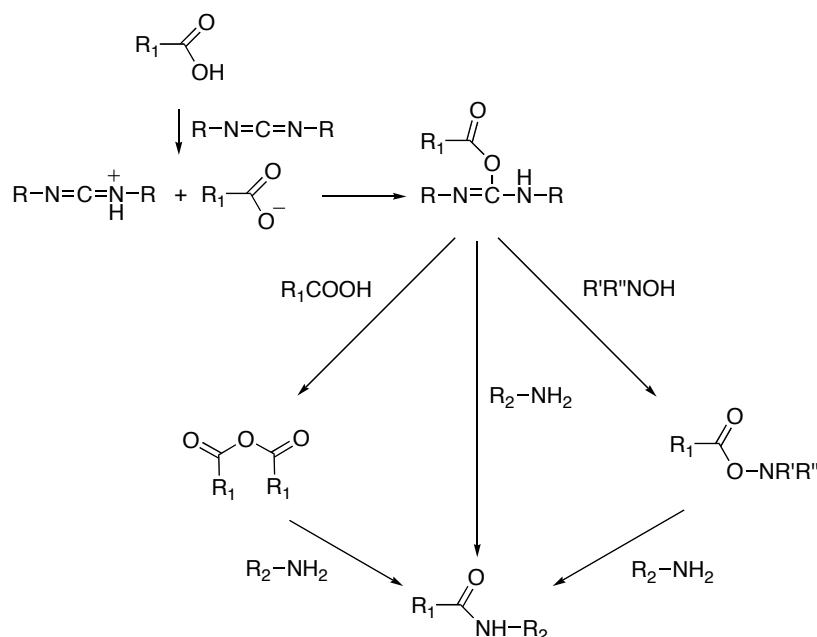


**Figura 180.** Espaciadores para la síntesis de péptidos-ácido (a) y péptidos-amina (b).

La metodología de acoplamiento puede basarse bien en la utilización de reactivos que activan *in situ* al ácido carboxílico, o bien en la utilización de especies activadas derivadas del ácido carboxílico que han sido previamente preparadas, aisladas, purificadas y caracterizadas.

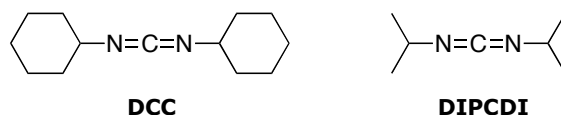
Los **reactivos de acoplamiento** más utilizados pueden dividirse en dos grupos: carbodiimidas y sales de fosonio y aminio o uronio.

**Carbodiimidas.** El mecanismo de acoplamiento (Figura 181) transcurre a través de la *O*-acilisourea, que sufre aminólisis por parte de la amina para dar la amida. Si se utiliza un segundo equivalente de ácido carboxílico, la *O*-acilisourea da lugar al anhídrido simétrico. Si la reacción se lleva a cabo en presencia de hidroxilaminas, se obtiene el correspondiente éster activo.



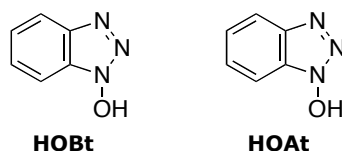
**Figura 181.** Mecanismo de formación del enlace peptídico mediante carbodiimidas.

En síntesis en fase sólida se utiliza la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en la estrategia Boc/Bzl y la *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) en la estrategia Fmoc/<sup>t</sup>Bu.



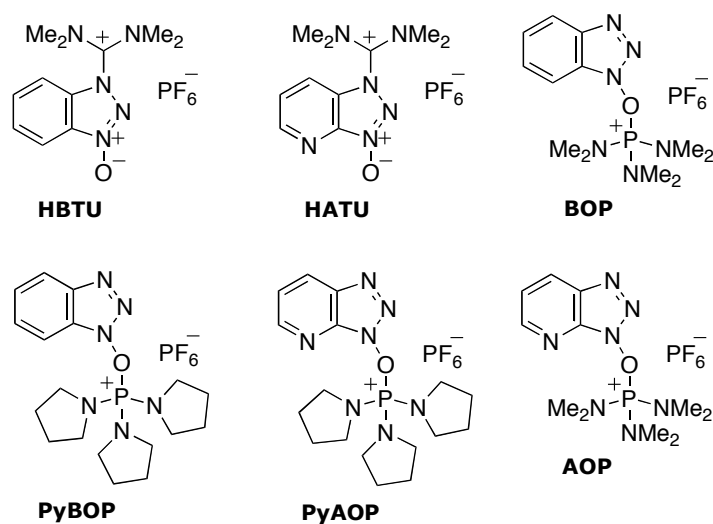
**Figura 182.** Carbodiimidas utilizadas en síntesis de péptidos en fase sólida.

Las hidroxilaminas más utilizadas son el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y el 7-aza-1-hidroxibenzotriazol (HOAt), siendo esta última más efectiva, ya que aumenta las velocidades de acoplamiento y reduce el riesgo de racemización.



**Figura 183.** Estructuras de HOBt y HOAt.

*Sales de fosfonio y de aminio o uronio.* Es uno de los métodos más utilizados, debido a su facilidad de uso y a la capacidad de llevar a cabo reacciones limpias y rápidas. Se basa en el uso de sales de fosfonio o aminio/uronio en presencia de una base. Ésta desprotona el ácido carboxílico, dando lugar al carboxilato, que ataca a la sal de fosfonio, obteniéndose el éster activo. El mecanismo de la reacción todavía no se conoce y existe controversia acerca de la existencia de una sal de acilfosfonio o amidinio intermedia. En la siguiente figura se muestran las sales más comúnmente empleadas. El HATU y el PyAOP presentan los mejores resultados en cuanto a eficiencia y ausencia de racemización.

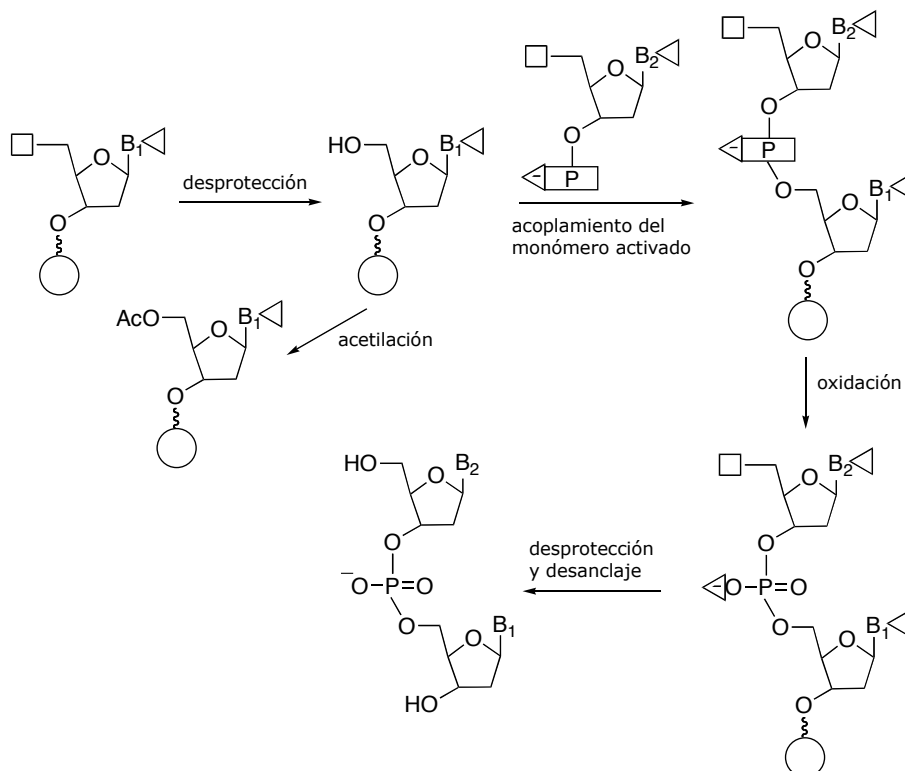


**Figura 184.** Ejemplos de sales de fosfonio y aminio o uronio.

## Anexo II: Síntesis de oligonucleótidos en fase sólida

La metodología de síntesis en fase sólida se aplicó a la síntesis de oligonucleótidos poco después de comprobar su validez y ventajas en la síntesis peptídica.

La síntesis en fase sólida de oligonucleótidos usando el método del fosforamidito sigue el proceso ilustrado esquemáticamente para un dímero en la siguiente figura.



**Figura 185.** Diagrama de la síntesis en fase sólida de un oligodeoxinucleótido.

El proceso químico básico en la elongación de la cadena oligonucleotídica implica la reacción de un mononucleótido activado en disolución y el grupo hidroxilo en 5' del oligonucleótido unido al soporte sólido. La síntesis química del ADN se lleva a cabo normalmente del extremo 3' al 5', dada la elevada reactividad del hidroxilo primario en 5'.

El nucleósido en el extremo 3' está unido a través de un espaciador al soporte sólido. En el primer paso de la síntesis se desprotege el grupo hidroxilo en 5' para llevar a cabo la unión del segundo oligonucleótido, que se añade después en exceso con el grupo hidroxilo en 5' protegido y con el grupo fosfato en 3' activado y en presencia de un catalizador para facilitar la condensación. Los grupo hidroxilo en 5' del primer nucleósido que no hayan reaccionado se acetilan. Por último, el enlace fosfórico triéster se oxida para obtener el fosfato triéster buscado. El proceso se repite hasta obtener la secuencia deseada.<sup>157</sup>

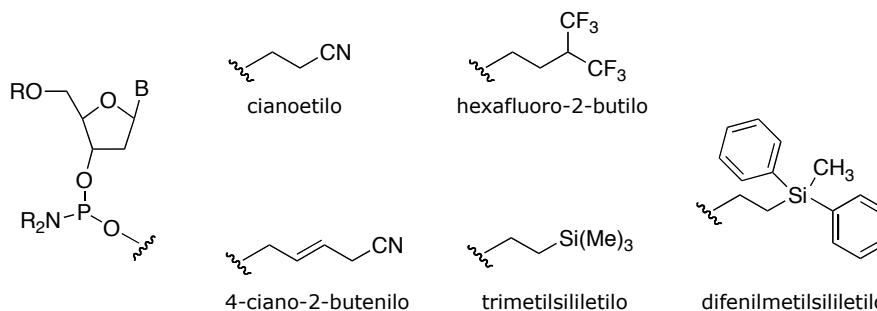
Como se puede deducir, el grupo hidroxilo en 5' debe protegerse temporalmente hasta el momento de la reacción de acoplamiento. Otros centros reactivos como los grupos amino exocíclicos -presentes en las posiciones N2, N4 y N6 de guanina, citosina y adenina,

<sup>157</sup> Brown, T. y Brown, D. J. S., *vid.* nota 120.

respectivamente- y el esqueleto aniónico fosfodiéster deben protegerse permanentemente durante la síntesis y se eliminan al separar el oligonucleótido del soporte sólido.<sup>158</sup>

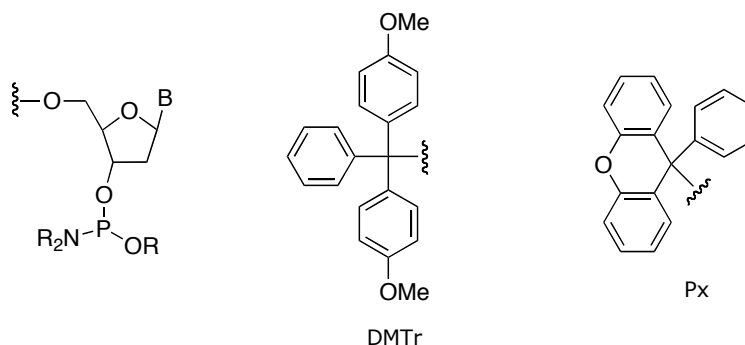
Los **grupos protectores** para las nucleobases más utilizados son el benzoílo para A y C y el isobutirilo para G.

La elección principal para los grupos protectores de los fosfatos ha sido el 2-cianoetilo, pero se han desarrollado otros protectores que se muestran a continuación:



**Figura 186.** Grupos protectores de los fosforamiditos utilizados en síntesis de oligonucleótidos.

Para la protección temporal del grupo hidroxilo en 5', se han usado fundamentalmente grupos lábiles en medio ácido: derivados del tritilo, como el 4-metoxitritilo (MmTr) y especialmente el 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr o DMT), y el pixilo (Px, 9-fenilxanten-9-ilo).



**Figura 187.** Grupos protectores del hidroxilo en 5'.

En cuanto a los **soportes sólidos**, se han utilizado soportes compuestos por sílice, poliestireno o redes poliméricas misceláneas. Entre los primeros, cabe destacar los soportes de vidrio de tamaño de poro controlado (CPG, por sus siglas en inglés), que presentan las ventajas de que la accesibilidad de los grupos funcionales no depende de la elección del disolvente orgánico, así como la posibilidad de variar la porosidad del soporte. Las resinas basadas en poliestireno no son tan adecuadas para la síntesis de oligonucleótidos, dados los disolventes orgánicos usados, aunque los resultados de solvatación se mejoran con resinas basadas en polietilenglicol injertado sobre poliestireno.

En la **activación** del monómero que se acopla al soporte sólido se han empleado en la mayoría de los casos fosforamiditos con *N,N*-diisopropilamino como grupo saliente. La protonación de dicho grupo es crítica para el acoplamiento y generalmente se utiliza el tetrazol como catalizador, lo que permite obtener tiempos de reacción muy cortos, típicamente del orden de 30 s.

<sup>158</sup> Bellon, L.; Wincott, F. "Oligonucleotide synthesis" en *Solid-phase synthesis. A practical guide*; Eds: Kates, S. A. y Albericio, F., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, cap. 12, **2000**.

La **desprotección** del oligonucleótido y su separación del soporte sólido requiere un tratamiento en medio básico; generalmente, se emplea hidróxido amónico concentrado.





