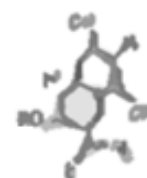
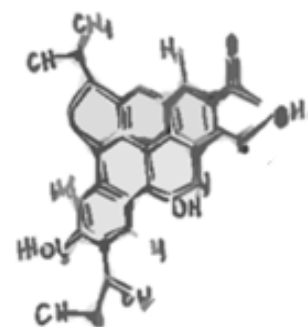
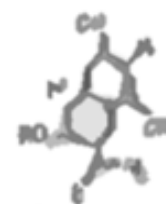


Miniaturización estructural de micelas auto-replicantes

Structural miniaturization of self-replicating micelles

Ion Turcan
Turcan



Curso académico
2024-2025

Miniaturización estructural de micelas auto-replicas

Structural miniaturization of self-replicating micelles

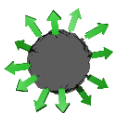
Ion Turcan Turcan

Trabajo de Fin de Grado
Curso académico 2024-2025

Santiago de Compostela

Tutor: Dr. Ignacio Insua López

Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Grupo I+D Farma (GI-1645)



Insua Lab

CiQUS

Centro Singular de Investigación
en Química Biológica e
Materiais Moleculares

Índice

I. Resumen	3
II. Abstract	4
III. Abreviaturas	5
1 Introducción	6
1.1 Propiedades y usos terapéuticos de las micelas	6
1.2 El mecanismo auto-ensamblante de los anfifilos peptídicos.....	7
1.3 Concepto de auto-catálisis y auto-replicación	8
1.4 Objetivos.....	8
2 Materiales y métodos.....	9
2.1 Síntesis de péptidos en fase sólida.....	9
2.2 Síntesis de los anfifilos peptídicos.....	9
2.3 Caracterización de péptidos y anfifilos peptídicos.....	10
2.4 Estudio cinético de la formación y micelización de los anfifilos peptídicos	10
2.5 Análisis por HPLC-MS de la reactividad de los precursores	11
2.6 Determinación de la concentración micelar crítica (CMC)	11
2.7 Caracterización de nanoestructuras mediante microscopía electrónica de barrido (STEM)12	
3 Resultados y discusión	12
3.1 Diseño del sistema	12
3.2 Obtención y caracterización de precursores y productos	13
3.3 Estudio cinético de la auto-catálisis	19
3.4 Caracterización de los ensamblados supramoleculares	23
4 Conclusiones.....	25
Bibliografía	26
Índice de figuras	29
Agradecimientos	31

I. Resumen

Actualmente, el uso de nanoestructuras con aplicación terapéutica para la administración y liberación de fármacos (e. g. sistemas micelares) está ampliamente extendido debido a sus propiedades únicas que las hacen indispensables en el ámbito biomédico y en otros diversos campos.

En este trabajo se describe el estudio sistemático de una serie de moléculas anfifílicas que forman micelas auto-replicantes, es decir, capaces de hacer copias de sí mismas. Nuestro sistema utiliza dos precursores reactivos que generan anfifilos peptídicos *in situ* capaces de ensamblar micelas que catalizan su propia síntesis, generando copias idénticas de sí mismas.

El estudio consistió en analizar de forma combinatoria una colección de precursores de distintos tamaños para, finalmente, identificar el anfifilo más pequeño necesario para la formación de micelas auto-replicantes.

Estos resultados contribuyen hacia el diseño de nanoestructuras funcionales, más allá de su uso tradicional como simples vehículos de fármacos, otorgándoles propiedades -como la auto-replicación- que puedan amplificar su efecto terapéutico.

Palabras clave: micela, péptido, auto-replicación, auto-ensamblaje, auto-catálisis.

II. Abstract

Currently, the use of nanostructures with therapeutic application for drug delivery and release (e.g. micellar systems) is widespread due to their unique properties that make them indispensable in biomedical and other fields.

In this work we describe the systematic study of a series of amphiphilic molecules that form self-replicating micelles, i.e. capable of making copies of themselves. Our system uses two reactive precursors that generate peptide amphiphiles *in situ* capable of assembling micelles that catalyse their own synthesis, generating identical copies of themselves.

The study consisted of combinatorially analysing a collection of precursors of different sizes to finally identify the smallest amphiphile necessary for the formation of self-replicating micelles.

These results contribute to the design of functional nanostructures, beyond their traditional use as simple drug vehicles, by giving them properties - such as self-replication - that can amplify their therapeutic effect.

Keywords: micelle, peptide, self-replication, self-assembly, autocatalysis.

III. Abreviaturas

2CTC	Resina de cloruro de 2-clorotritilo
Boc:	<i>Terc</i> -butiloxicarbonil
aaa:	Ácido (Boc-aminooxi)acético
DCM:	Diclorometano
ACN:	Acetonitrilo
D_H:	Diámetro hidrodinámico
CMC:	Concentración micelar crítica
DIC:	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DIPEA:	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DLS:	Dispersión dinámica de luz
DMF:	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO:	Dimetilsulfóxido
ESI:	Ionización por electrospray
Fmoc:	Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo
Glu (E):	Ácido glutámico
HBTU:	Hexafluorofosfato de O-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> tetrametiluronio
HPLC-MS:	Cromatografía líquida de alto rendimiento - espectrometría de masas
¹H-RMN:	Resonancia magnética nuclear de protón
Phe (F):	Fenilalanina
Rt:	Tiempo de retención
SPPS:	Síntesis de péptidos en fase sólida
TFA:	Ácido trifluoroacético
ThT:	Tioflavina T
TIPS:	Triisopropilsilano
nm:	Nanómetros
ppm:	Partes por millón

1 Introducción

1.1 Propiedades y usos terapéuticos de las micelas

Las micelas son dispersiones coloidales supramoleculares de tamaño nanométrico (generalmente de 10 a 100 nm) con un núcleo hidrofóbico y una corona hidrofílica en medio acuoso (*Figura 1*). Estas, están formadas por moléculas anfifílicas que, bajo ciertas condiciones de temperatura y concentración, son capaces de orientar su región hidrofóbica lejos del disolvente polar (e.g. agua) y su región hidrofílica en contacto con el medio que las rodea. La concentración micelar crítica (CMC) es la concentración mínima necesaria para que moléculas se asocien formando micelas, es decir, por debajo de la CMC, las moléculas anfifílicas se encuentran disueltas individualmente en el medio (2).

Gracias a su estabilidad estructural, a su capacidad de solubilizar fármacos y penetración tisular, los sistemas micelares han sido ampliamente utilizados con fines terapéuticos para la administración dirigida de fármacos y la mejora de su biodisponibilidad. Un claro ejemplo podría ser el uso de múltiples formulaciones micelares

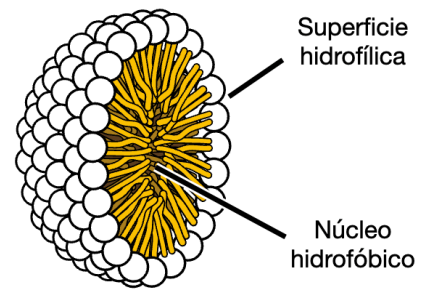


Figura 1. Estructura micela (1).

presentes en productos cosméticos donde el reducido tamaño de las micelas aporta propiedades útiles como una mejora en la absorción y extensión cutánea de sustancias activas (3).

La conjugación de distintos ligandos o marcadores en la superficie de micelas permite dirigir su acumulación a dianas específicas (*Figura 2*). Entre los múltiples ligandos empleados (e.g. azúcares, vitaminas, anticuerpos, etc.), los péptidos han destacado por la biocompatibilidad y diversas

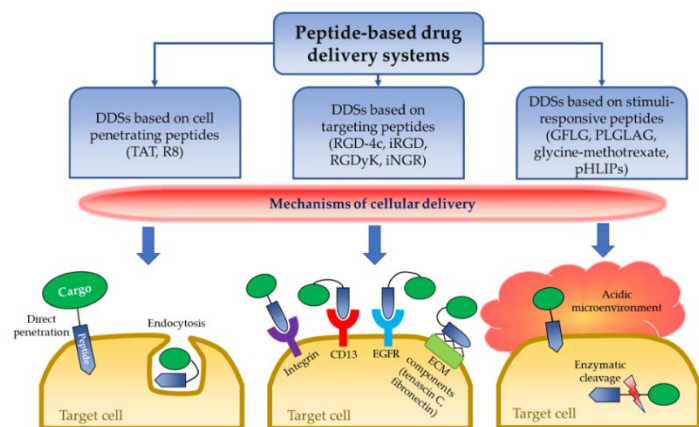


Figura 2. Esquema de dianas de unión de sistemas peptídicos (5).

funciones, como la vectorización tumoral, penetración celular y su habilidad de promover un escape endosomal/lisosomal, proceso crucial para una liberación eficaz al citosol (4, 5).

La funcionalización de los sistemas micelares con péptidos se puede realizar mediante un proceso de conjugación sobre micelas ya preformadas o bien, mediante la síntesis de anfifilos peptídicos -también llamados lipopéptidos- para su posterior auto-ensamblaje en micellas (5).

1.2 El mecanismo auto-ensamblante de los anfifilos peptídicos

Los anfifilos peptídicos son moléculas auto-ensamblantes formadas por una cadena alifática (i.e. lipídica) acoplada covalentemente a un péptido polar (*Figura 3*) (6). Estos compuestos son capaces de formar micelas -entre otras nanoestructuras- en medio acuoso; un proceso dirigido por el empaquetamiento de su región hidrofóbica. Además, una serie de fuerzas intermoleculares entre los fragmentos peptídicos, como los enlaces de hidrógeno e interacciones $\pi-\pi$, participan en la estabilidad de estas organizaciones supramoleculares. Sin embargo, en ausencia de una cadena alifática, el fragmento peptídico no es suficiente para formar estas nanoestructuras (7).

Normalmente, el fragmento peptídico contiene dos regiones: un dominio hidrofóbico inductor de láminas β que promueve el auto-ensamblaje, y una región cargada que genera estabilidad coloidal al ensamblaje (*Figura 3*) (6, 8).

En este contexto, los anfifilos peptídicos proporcionan una plataforma versátil para el diseño de pequeñas moléculas micelantes con las propiedades y funciones del péptido que incluya su estructura.

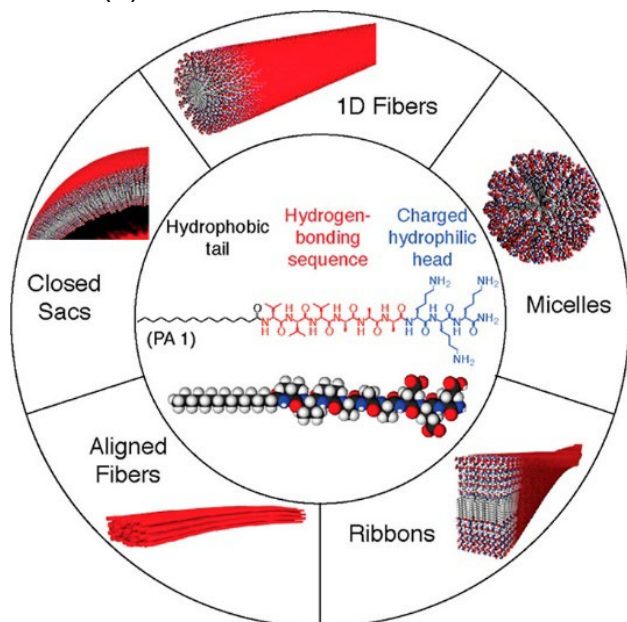


Figura 3. Estructura general de un anfifilo peptídico rodeada de las estructuras supramoleculares que puede formar (6).

1.3 Concepto de auto-catálisis y auto-replicación

La auto-catálisis es la capacidad de una reacción química de ser catalizada por su propio producto, es decir, a medida que transcurre se acelera su cinética (*Figura 4*). Ya que el producto de la reacción cataliza la formación de más producto, se puede afirmar que esta molécula hace copias de sí misma - esto es un proceso auto-replicante. Es decir, una molécula auto-replicante es capaz de catalizar su reacción de síntesis (i.e. es auto-catalítica) (9, 10).

Las reacciones autocatalíticas se caracterizan por un perfil cinético sigmoideal (*Figura 4*), indicativo de una aceleración isoterma de la reacción por el producto formado, normalmente precedida de una fase de inducción en la que aún no se ha formado suficiente producto para desencadenar la auto-catálisis (11,12). Esta fase de inducción se acorta progresivamente en presencia de cantidades incrementales del producto de reacción pre-formado (i.e. semilla o *seed* en inglés).

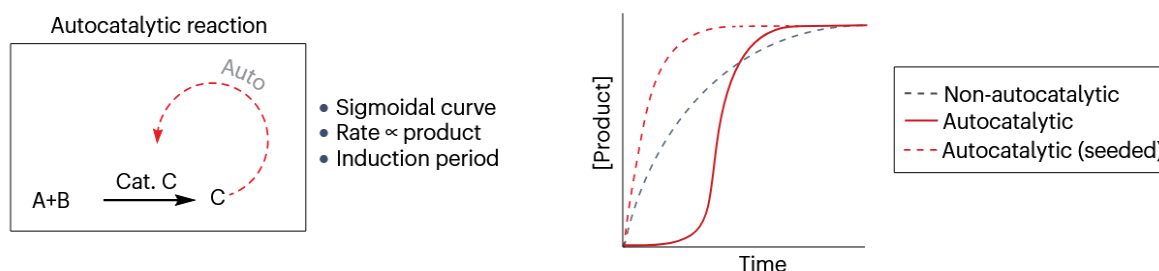


Figura 4. Comparativa de cinéticas de una reacción auto-catalítica, con (*seeded*) y sin adición de producto pre-formado, con una hipotética reacción no auto-catalítica (12).

1.4 Objetivos

El objetivo general de este trabajo es la síntesis, caracterización y el estudio sistemático de la capacidad auto-replicante de una serie de anfifilos peptídicos micelantes.

El diseño de este estudio consiste en el uso de dos precursores reactivos que generan anfifilos peptídicos que catalizan su propia síntesis mediante acumulación de sus precursores en micelas. Es decir, las micelas que forman pueden actuar como nanoreactores que aumentan la concentración local de precursores y, por tanto, de la velocidad de reacción.

2 *Materiales y métodos*

2.1 Síntesis de péptidos en fase sólida

Todos los reactivos y disolventes utilizados se adquirieron a Sigma-Aldrich, BLD Pharmatech, Abcr, Labkem, Fluorochem y Scharlau, y todos se usaron sin necesidad de purificación. El agua destilada milliQ se obtuvo de un sistema de purificación Millipore integrable 5.

Todos los péptidos fueron sintetizados manualmente usando la resina de cloruro de 2-clorotritilo (0,2-0,4 mmol) con los respectivos aminoácidos protegidos con el grupo Fmoc (1,5 equivalentes) y en presencia de HBTU (1,3 equivalentes) y DIPEA (4 equivalentes) en DMF durante 30 minutos. La desprotección del grupo Fmoc se realizó con una mezcla de 20% (v/v) de piperidina en DMF durante 30 minutos. Tras la desprotección del último grupo Fmoc, el ácido (Boc-aminooxi)acético (8 equivalentes) se acopló al extremo N-terminal del péptido en presencia de DIC (8 equivalentes) en DMF durante 10 minutos. La rotura de la resina fue posteriormente realizada con una mezcla de TFA:TIS:H₂O (95:2,5:2,5% volumen) durante 2 horas y la solución obtenida se precipitó en éter etílico enfriado. Finalmente, tras centrifugar y obtener un pellet del precipitado, este se dispersó en agua MQ filtrada y se liofilizó para así obtener los péptidos aislados como un polvo blanco y estos no requirieron de un proceso posterior de purificación. Finalmente, todos los péptidos fueron caracterizados mediante HPLC-MS y ¹H-RMN.

2.2 Síntesis de los anfifilos peptídicos

La síntesis de los anfifilos peptídicos **T₁₂FE** y **T₁₂F₂E** se llevó a cabo mediante la reacción de los correspondientes péptidos **FE** y **F₂E** con 1,5 equivalentes de dodecanal (**T₁₂**) en 1 mL de DMSO a 60°C. Tras incubación nocturna, las soluciones se precipitaron en agua ácida y se filtraron mediante gravedad. Todos los productos se caracterizaron mediante HPLC-MS.

2.3 Caracterización de péptidos y anfifilos peptídicos

Los espectros de ^1H -RMN fueron realizados en el Centro Singular de Investigación en Química Biológica y materiales moleculares de la Universidad de Santiago de Compostela (CiQUS). Estos se obtuvieron en un espectrómetro Varian a 300 MHz, con unos desplazamientos químicos (δ) indicados en ppm relativos a DMSO- d_6 ($\delta = 2,50$ ppm). Las multiplicidades de las señales de los espectros se representan con las abreviaturas: **s** (singulete), **d** (doblete), **t** (triplete), **m** (multiplete), seguido del número de protones por los que integra esa señal. Las constantes de acoplamiento (J) están medidas en Hertzios (Hz). Los espectros fueron procesados usando el software Mnova de Mestrelab Research.

El HPLC-MS analítico en fase reversa se realizó en un equipo Agilent 1260 Infinity II el cual estaba equipado con una columna Agilent SB- C_{18} estabilizada a una temperatura de 25°C y conectada a un detector de masas 6120 Quadrupole. Todos los péptidos y anfifilos peptídicos sintetizados en este trabajo fueron caracterizados utilizando el mismo método analítico para su comparación. Se usó como fase móvil H_2O destilada (disolvente A) y ACN (disolvente B) (ambos con 0,1% de TFA) a un caudal de 0,35 mL/min. El método consiste en un gradiente creciente de porcentaje de disolvente B (ACN) hasta un 75% durante 15 minutos, que fueron suficientes para separar y detectar todos los compuestos sintetizados. La detección se realizó con un detector ultravioleta-visible a 222 nm y un detector de masas de ionización por electrospray.

2.4 Estudio cinético de la formación y micelización de los anfifilos peptídicos

Para el estudio cinético de ensamblaje de los anfifilos peptídicos, se prepararon soluciones a una concentración 1 mM de los péptidos inactivos (**FE**, **F₂E**, **F₂E₂** y **F₃E₂**) con 250 μM de ThT en una solución tampón de HEPES a una concentración de 50 mM ajustado a un pH de 6,8. Posteriormente, se añadió 5 μL de una disolución de dodecanal (**T₁₂**, 10 equivalentes) a cada una de las soluciones para iniciar la reacción entre ambos precursores de los anfifilos. Todas estas mezclas fueron preparadas por triplicado con un volumen final de 200 μL y la emisión de

fluorescencia ($\text{ex} = 485 \text{ nm}$ y $\text{em} = 520 \text{ nm}$) se medió cada 30 segundos en un lector de microplacas BMG LABTECH FLUOstar Omega a 40°C con una agitación orbital a 300 rpm. Para el procesamiento de los datos, todas las muestras de ensamblaje (es decir, los perfiles sigmoidales) se normalizaron a su emisión máxima, mientras que los perfiles cinéticos planos a intensidad basal se normalizaron a la emisión máxima del anfifilo peptídico de ensamblaje intermedio ($\text{T}_{12}\text{F}_2\text{E}_2$). Los experimentos de dopaje se prepararon y se procesaron de la misma forma, con diferentes cantidades del productor preformado $\text{T}_{12}\text{F}_2\text{E}$ al inicio de la reacción (es decir, antes de la adición del aldehído).

2.5 Análisis por HPLC-MS de la reactividad de los precursores

Las muestras se prepararon y se incubaron de la misma forma que para el estudio cinético (ver 2.4), pero esta vez sin la presencia de la sonda de ThT. Las muestras con únicamente con los péptidos FE y F_2E no contienen el aldehído T_{12} , mientras que los anfifilos T_{12}FE y $\text{T}_{12}\text{F}_2\text{E}$ se analizaron tras 180 minutos después de la adición de T_{12} .

2.6 Determinación de la concentración micelar crítica (CMC)

Para la determinación de la CMC, se evaporaron $10 \mu\text{L}$ de solución de rojo Nilo $50 \mu\text{M}$ en acetona durante la noche en cada tubo eppendorf protegido de la luz. A continuación, se añadieron a estos eppendorf $500 \mu\text{L}$ de diluciones seriadas de T_{12}FE y $\text{T}_{12}\text{F}_2\text{E}$, entre 2 y $200 \mu\text{M}$ en solución tampón de HEPES 50 mM a $\text{pH} 6,8$, y las muestras se incubaron de nuevo durante toda la noche en la oscuridad. Cada concentración se preparó por triplicado. Al día siguiente, las muestras se midieron en un fluorímetro Horiba Fluoromax-3 ($\text{ex} = 550 \text{ nm}$ y $\text{em} = 570\text{-}700 \text{ nm}$) a 20°C . La CMC se calculó como la intersección entre los dos regímenes lineales encontrados para la emisión de rojo Nilo.

2.7 Caracterización de nanoestructuras mediante microscopía electrónica de barrido (STEM)

Para las imágenes de microscopía electrónica de barrido se usaron rejillas de cobre de tipo B (malla de 300) recubiertas con una capa de carbono adquiridas a Ted Pella. Las imágenes se obtuvieron en un equipo FESEM Ultra plus (Zeiss) operando a 20 kV. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido se obtuvieron mediante la preparación de las rejillas de STEM con la adición de 5 μ L de muestras de los anfifilos preparados con el mismo método que el descrito en el estudio cinético y en ausencia de la sonda de ThT. Tras 10 minutos después de añadir las muestras, se retiró el exceso y se tiñeron con una solución acuosa de ácido fosfotúngstico a una concentración de 1 mg/mL. Finalmente, se lavó con agua destilada tras 2 minutos de tinción. Las muestras que se prepararon para el análisis de tamaño no se tiñeron para evitar una potencial interferencia del agente de tinción. Y estas se prepararon nuevamente mediante la deposición de 5 mL de las soluciones con anfifilos preformados en solución tampón de HEPES a 50 mM y a pH 6,8. El exceso de muestra se retiró tras 1 minuto y se dejaron secar durante la noche a alto vacío.

3 Resultados y discusión

3.1 Diseño del sistema

Para conseguir un comportamiento auto-replicante en anfifilos peptídicos (APs), se requiere de una reacción eficiente para conectar dos precursores en presencia de su producto, que actúa como catalizador. Una de las estrategias descritas para generar APs en medio acuoso es la conexión de aldehídos hidrófobos con péptidos que contienen el grupo hidroxilamina, formando así los anfifilos conectados mediante un enlace oxima (*Figura 5*) (8, 12, 13).

Basándonos en esta reactividad, decidimos estudiar la reducción estructural de un AP modelo, basado en fenilalanina (F) y ácido glutámico (E), para identificar la estructura mínima necesaria para su auto-replicación (*Figura 5*).

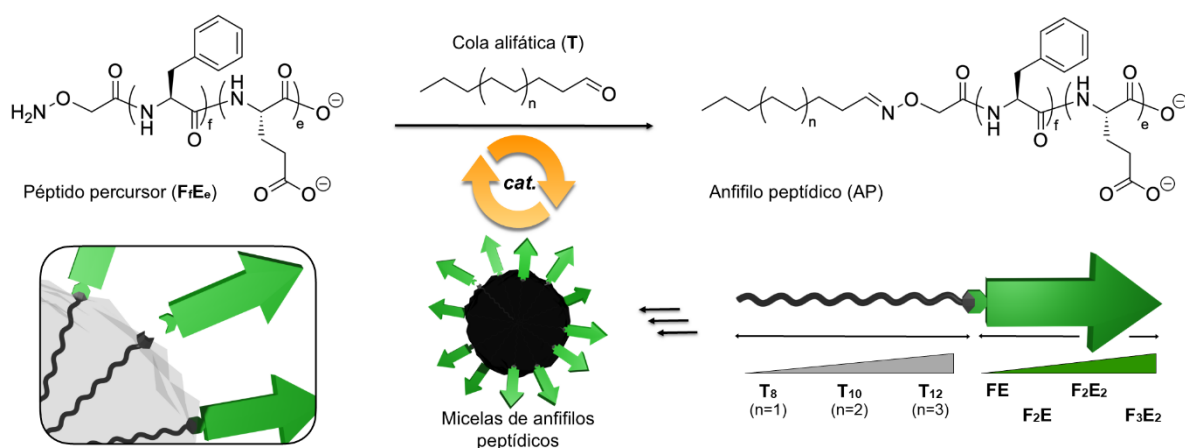


Figura 5. Esquema de reacción de péptidos precursores no ensamblantes con aldehídos alifáticos (es decir, colas) para generar productos peptídicos anfifílicos (APs). Estos pueden autoensamblar como micelas en el medio acuoso, que pueden catalizar la posterior conversión de precursores en AP, aumentando la concentración local de moléculas reactivas en la superficie anfifílica de las micelas (recuadro inferior izquierdo) (elaboración propia).

Los péptidos precursores estudiados incluyen el pentapéptido **F₃E₂**, tetrapéptido **F₂E₂**, tripéptido **F₂E** y el dipéptido **FE**. El grupo hidroxilamina (H₂N-O-) en el extremo *N*-terminal de estos péptidos condensaría con aldehídos reactivos de tamaño incremental (**T₈**, **T₁₀** y **T₁₂**), para dar lugar a un total de doce APs producto. Cada producto se denomina con los códigos combinados de aldehído y péptido precursores (e.g. **T₁₂F₂E**). Al formarse en un medio acuoso, estos APs son capaces de autoensamblarse formando micelas, que pueden catalizar la posterior conexión de precursores de péptidos y aldehídos mediante la acumulación de estos reactivos en su interfaz anfifílica (recuadro inferior izquierdo de la Figura 5).

3.2 Obtención y caracterización de precursores y productos

Todos los péptidos fueron sintetizados en fase sólida con métodos previamente descritos (12, 13) y se caracterizaron mediante ¹H-RMN y HPLC-MS. Se muestran a continuación los espectros de ¹H-RMN de los péptidos y APs, con las correspondientes masas y rendimientos obtenidos en su síntesis. También se muestra el tiempo de retención y masa correspondiente en el cromatograma del HPLC-MS de cada producto.

FE (35,1 mg, rendimiento = 47%)

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) 1,72-1,92 (m, 1H), 1,93-2,10 (m, 1H), 2,29 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,71-2,90 (m, 1H), 2,98-3,10 (m, 1H), 4,11 (s, 2H), 4,17-4,33 (m, 1H), 4,55-4,70 (m, 1H), 7,13-7,33 (m, 5H), 8,10 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 8,40 (d, J = 7,4 Hz, 1H).

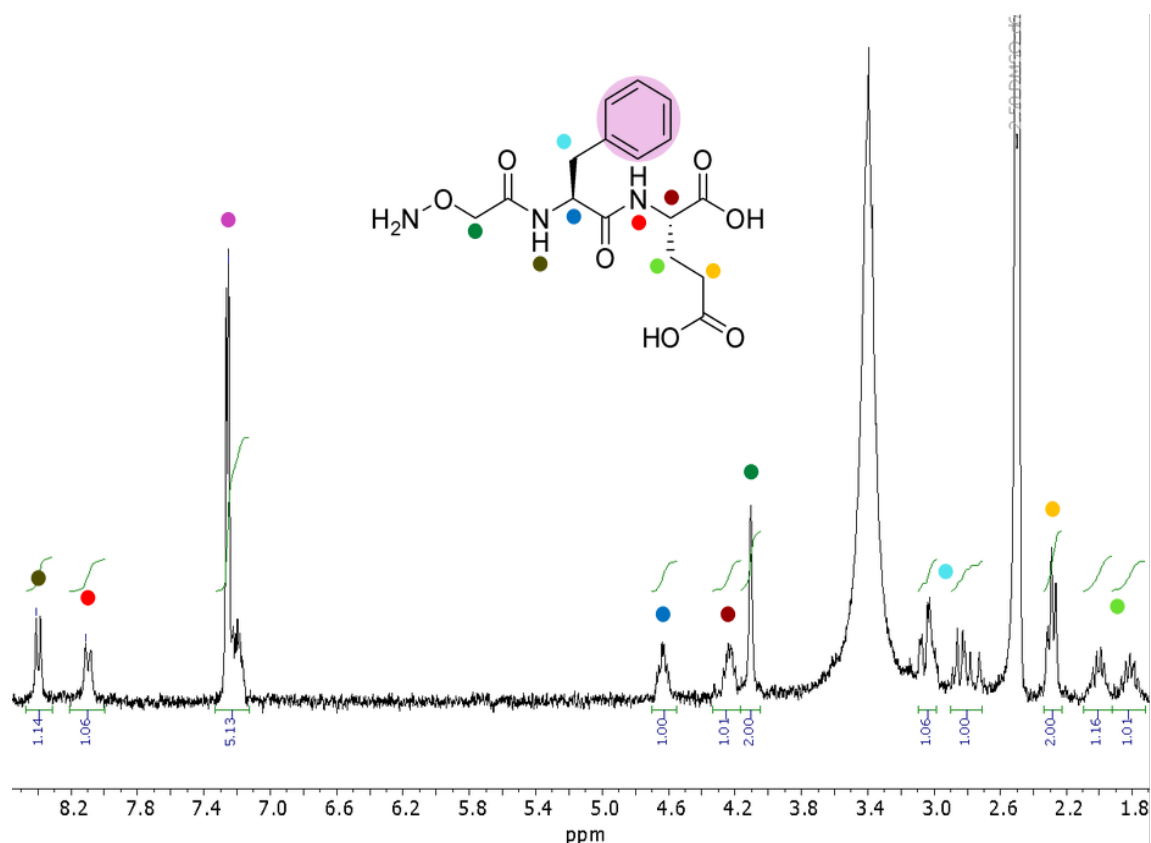


Figura 6. Espectro de ¹H-RMN del péptido FE (elaboración propia)

HPLC-MS: R_t = 7,2 min, m/z = 368,0 ([M+H]⁺).

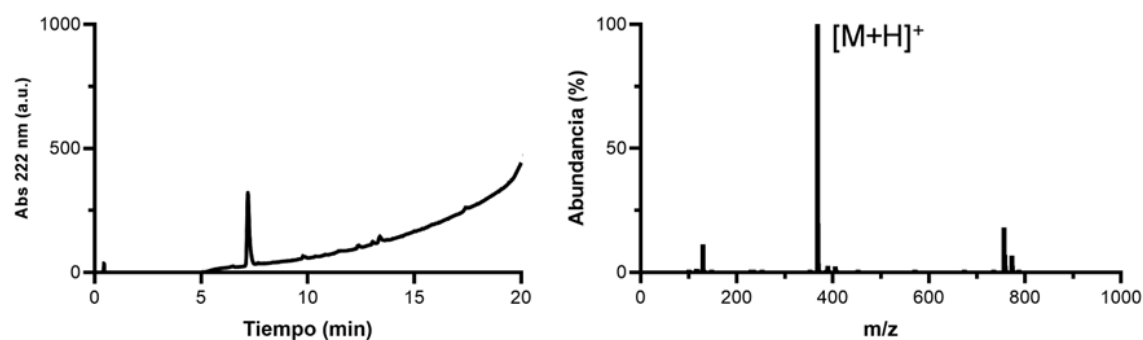


Figura 8. Cromatograma del HPLC y espectro de masas del péptido FE (elaboración propia).

F₂E (43,6 mg, rendimiento = 42%)

¹H-RMN DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) 1,71-1,91 (m, 1H), 1,92-2,14 (m, 1H), 2,29 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,69-2,86 (m, 2H), 2,94-3,11 (m, 2H), 4,12 (s, 2H), 4,20-4,30 (m, 1H), 4,51-4,64 (m, 2H), 7,13-7,30 (m, 10H), 8,07 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,30 (d, J = 7,8 Hz, 2H).

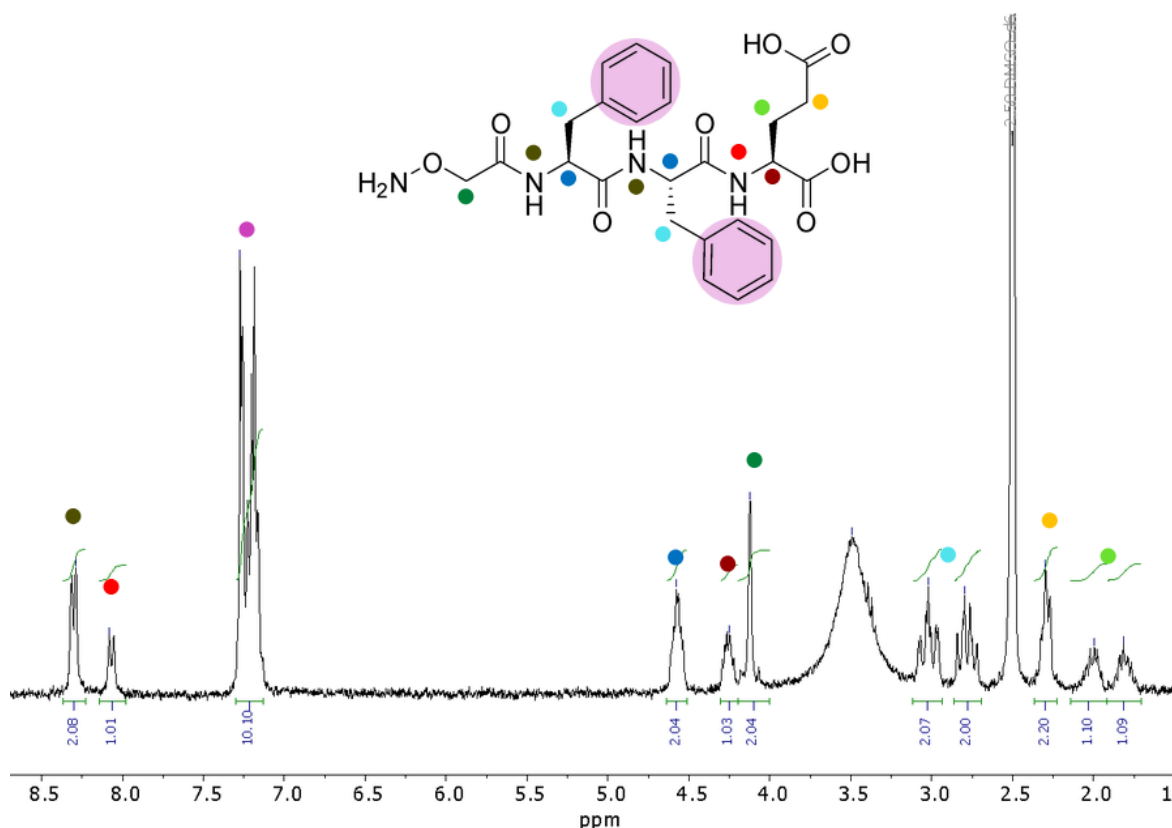


Figura 9 Espectro de ¹H-RMN del péptido F₂E (elaboración propia).

HPLC-MS: R_t = 10,0 min, m/z = 515,2 ([M+H]⁺).

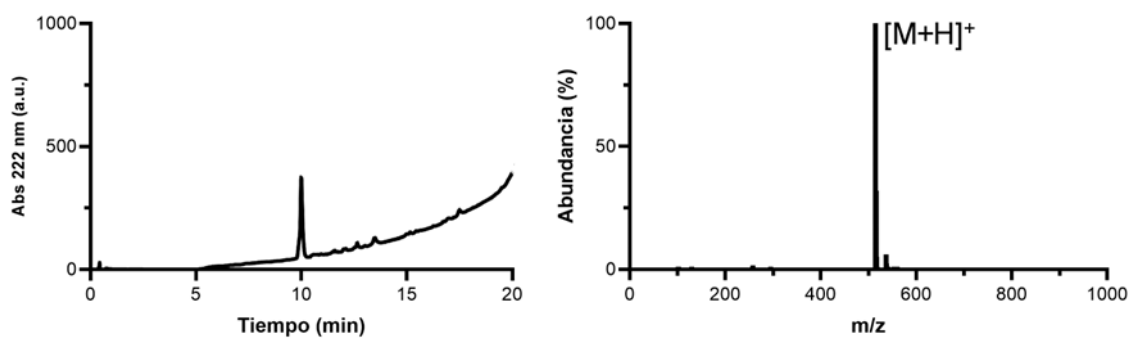


Figura 10. Cromatograma del HPLC y espectro de masas del péptido F₂E (elaboración propia).

F₂E₂ (97,6 mg, rendimiento = 76%)

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) 1,65-2,06 (m, 4H), 2,28 (t, J = 7,4 Hz, 4H), 2,68-2,88 (m, 2H), 2,89-3,09 (m, 2H), 4,08-4,39 (m, 4H), 4,51-4,65 (m, 2H), 7,14-7,30 (m, 10H), 8,06-8,37 (m, 4H).

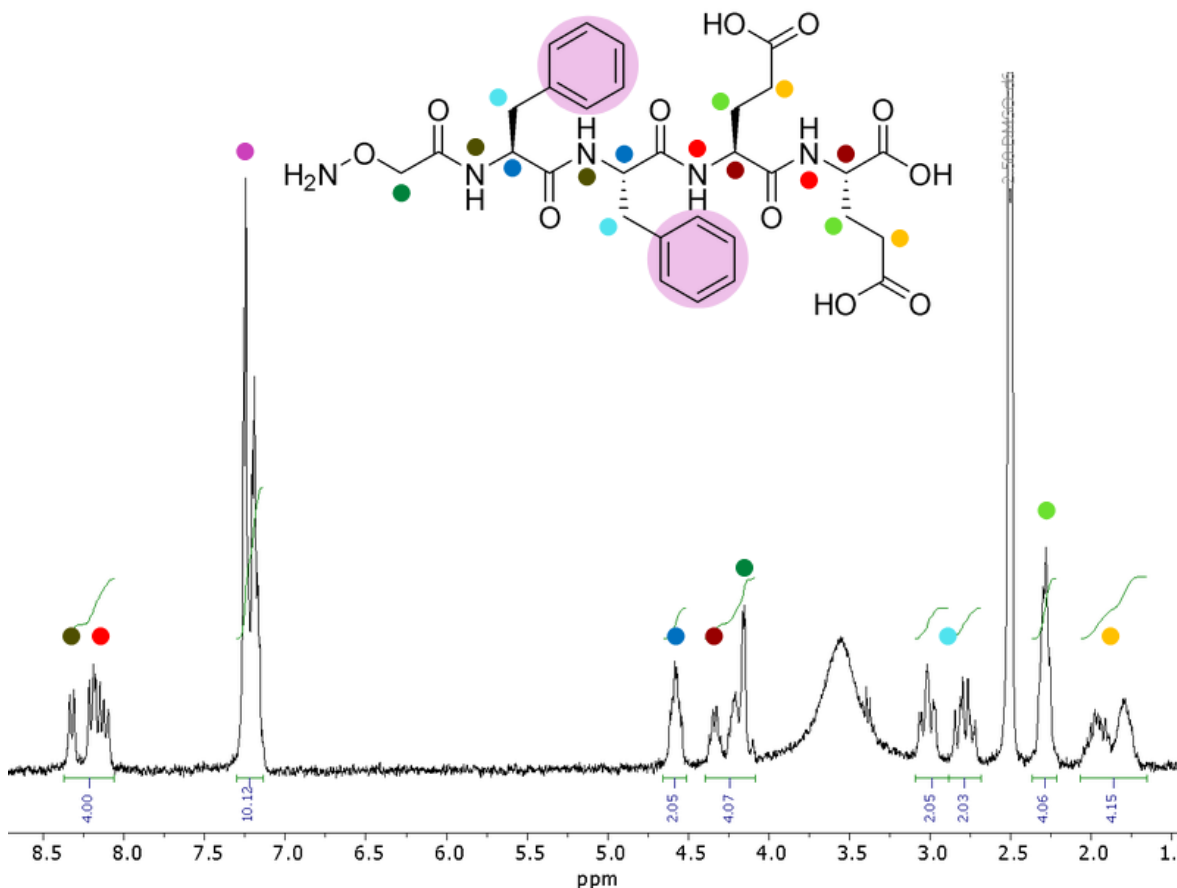


Figura 11. Espectro de ¹H-RMN del péptido F₂E₂. (elaboración propia).

HPLC-MS: R_t = 9,9 min, m/z = 644,30 ([M+H]⁺).

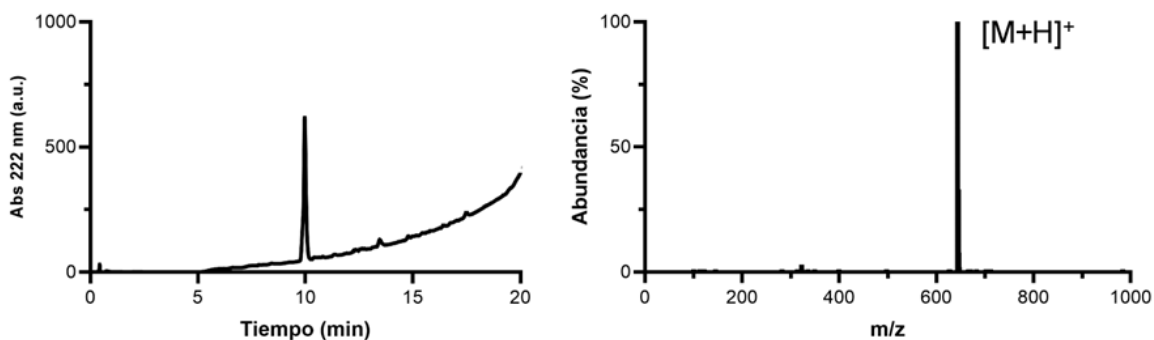


Figura 12. Cromatograma del HPLC y espectro de masas del péptido F₂E₂ (elaboración propia).

F₃E₂ (61,2 mg, rendimiento = 39%)

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) 1,71-2,03 (m, 4H), 2,27 (t, J = 7,9 Hz, 4H), 2,69-3,03 (m, 6H), 4,06-4,38 (m, 4H), 4,47-4,65 (m, 3H), 7,06-7,34 (m, 15H), 7,87-8,43 (m, 5H).

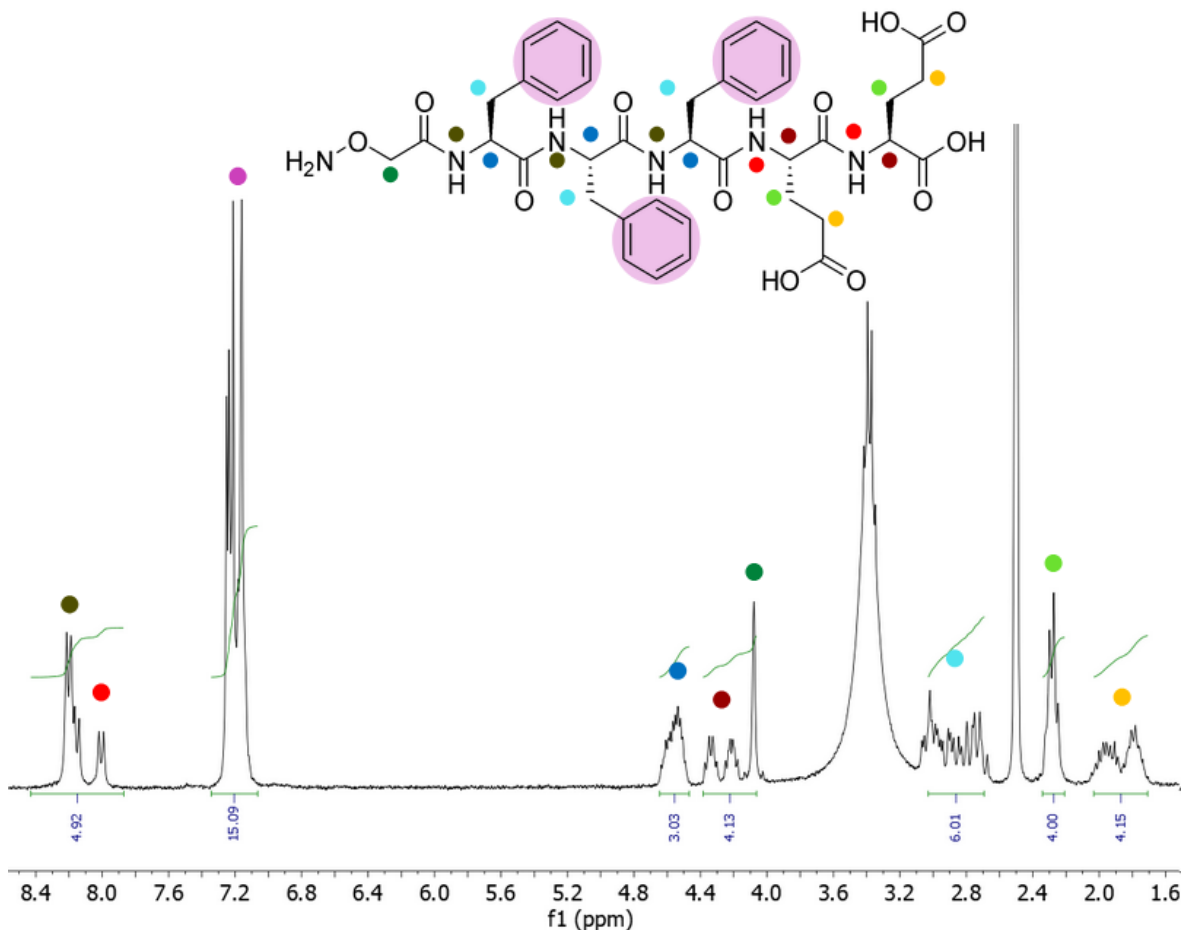


Figura 13. Espectro de ¹H-RMN del péptido F₃E₂ (elaboración propia).

HPLC-MS: R_t = 11,5 min, m/z = 791,3 ([M+H]⁺), 396,3 ([M+2H]²⁺).

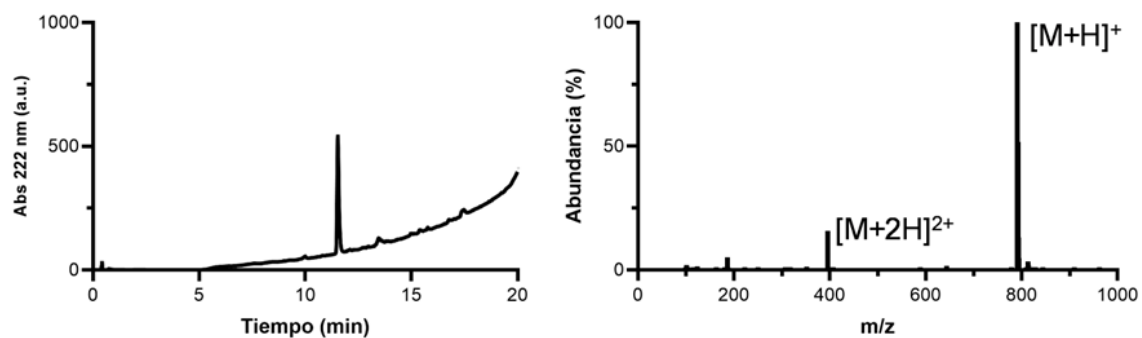


Figura 14. Cromatograma del HPLC y espectro de masas del péptido F₃E₂ (elaboración propia).

T₁₂FE (1,8 mg, rendimiento = 11%)

HPLC-MS: R_t = 17,9 min, m/z = 534,3 ([M+H]⁺).

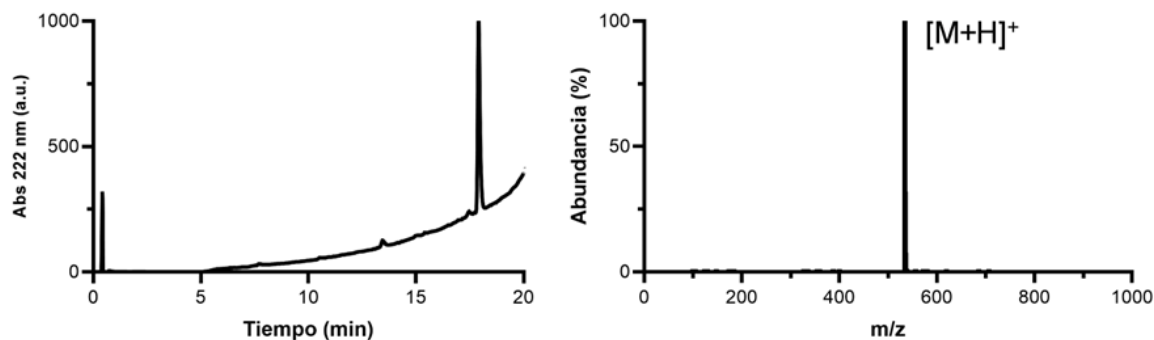


Figura 15. Cromatograma del HPLC y espectro de masas del anfifilo peptídico T₁₂FE (elaboración propia).

T₁₂F₂E (8,8 mg, rendimiento = 75%)

HPLC-MS: R_t = 19,0 min, m/z = 681,4 ([M+H]⁺).

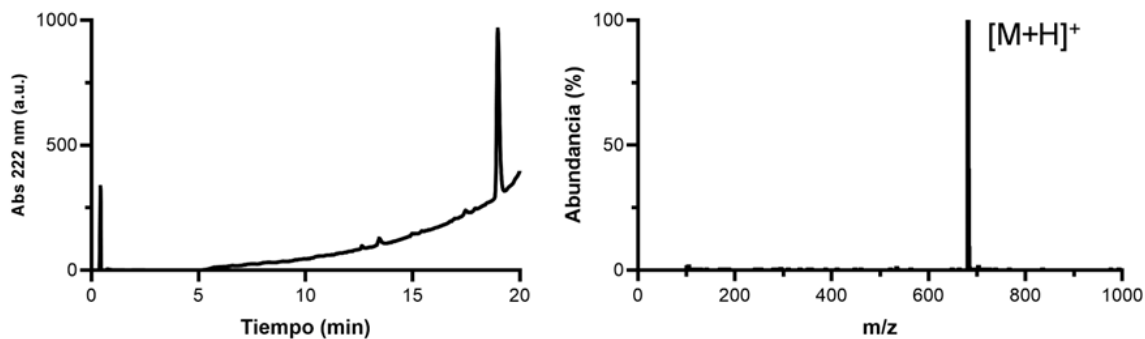


Figura 16. Cromatograma del HPLC y espectro de masas del anfifilo peptídico T₁₂F₂E (elaboración propia).

3.3 Estudio cinético de la auto-catálisis

Los péptidos sintetizados se mezclaron combinatoriamente con aldehídos comerciales para evaluar su auto-replicación (i.e. cinética auto-catalítica), utilizando octanal (T_8), decanal (T_{10}) y dodecanal (T_{12}) para evaluar la influencia de colas alifáticas más largas, y por tanto, más hidrofóbicas. Las mezclas de péptido y aldehído se incubaron en presencia de la sonda fluorescente tioflavina-T (ThT), que aumenta en emisión en presencia de micelas aniónicas (15) y nano-estructuras de APs (7, 12). Perfiles sigmoidales de emisión fluorescente serían indicativos de cinéticas auto-catalíticas, es decir, de APs auto-replicantes. Es importante indicar que la emisión de fluorescencia en estos experimentos confirma dos procesos secuenciales: la unión covalente de péptido y aldehído para formar un AP, y la posterior asociación de moléculas AP en micelas. Sin la formación de ensamblados supramoleculares (e.g. micelas), la sonda ThT no aumenta en emisión.

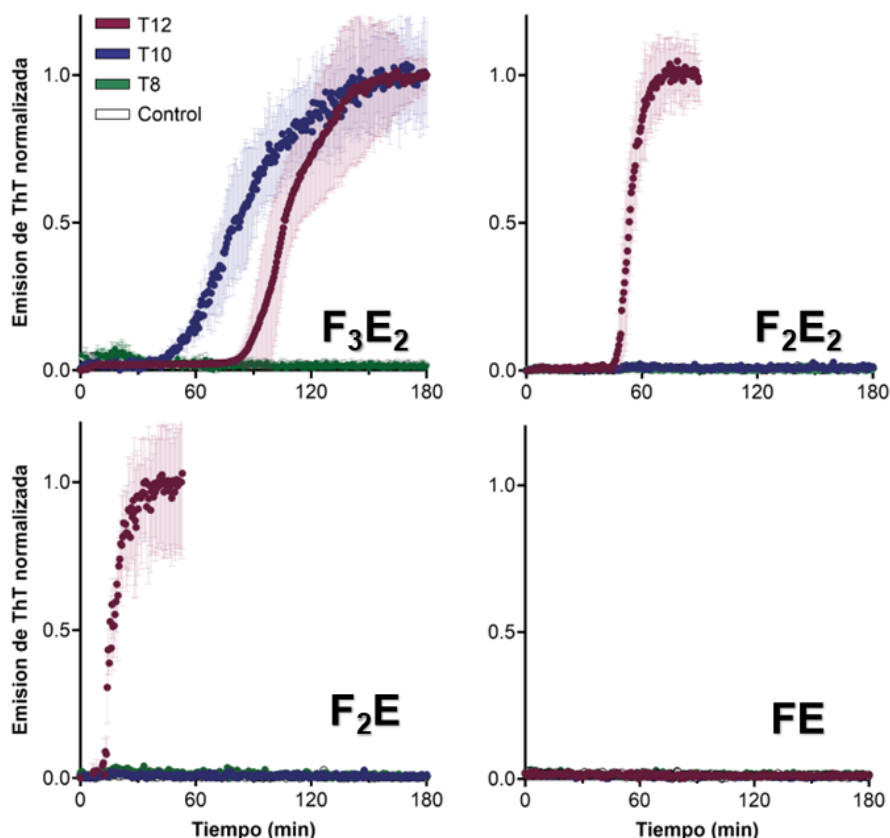


Figura 17. Cinética de emisión de ThT de mezclas de péptidos latentes (F_3E_2 , F_2E_2 , F_2E y FE) con colas aldehídicas (T_{12} , T_{10} y T_8). Las muestras control se realizaron en ausencia de cola aldehídica. Media \pm SD, $n=3$ (elaboración propia).

Como muestra la *Figura 17*, se observaron perfiles sigmoidales indicativos de auto-replicación en algunas de las combinaciones de precursores. El péptido más largo ensayado, **F₃E₂**, mostró dos perfiles de emisión sigmoidales, tanto con **T₁₂** y **T₁₀**, mientras que los análogos más cortos de **F₂E₂** y **F₂E** sólo lo hicieron con el aldehído más largo, **T₁₂**. Los dos precursores más cortos, **FE** y **T₈**, no mostraron ningún indicio de micelización (es decir, emisión ThT) en ninguna de las combinaciones ensayadas. Estas observaciones son coherentes con el hecho de que los APs más grandes e hidrófobos favorecen el auto-ensamblaje en agua, a diferencia de los APs más cortos y polares, incapaces de un empaquetamiento hidrofóbico suficiente. Curiosamente, cuanto más corto es el péptido, más corta es la fase de inducción [**F₂E** (aprox. 10 min) < **F₂E₂** (aprox. 45 min) < **F₃E₂** (aprox. 80 min) con **T₁₂**], lo que podría deberse a la mayor solubilidad y, por tanto, reactividad de los péptidos más cortos. Se pudo concluir que **T₁₂F₂E** fue la estructura AP más pequeña probada que mostraba un perfil cinético sigmoidal indicativo de una posible auto-replicación.

Para demostrar la naturaleza auto-catalítica de la síntesis de **T₁₂F₂E**, se realizaron experimentos de siembra (*seeding*) dopando una mezcla de precursores **T₁₂** y **F₂E** con producto **T₁₂F₂E** pre-formado a distintas concentraciones (*Figura 18*).

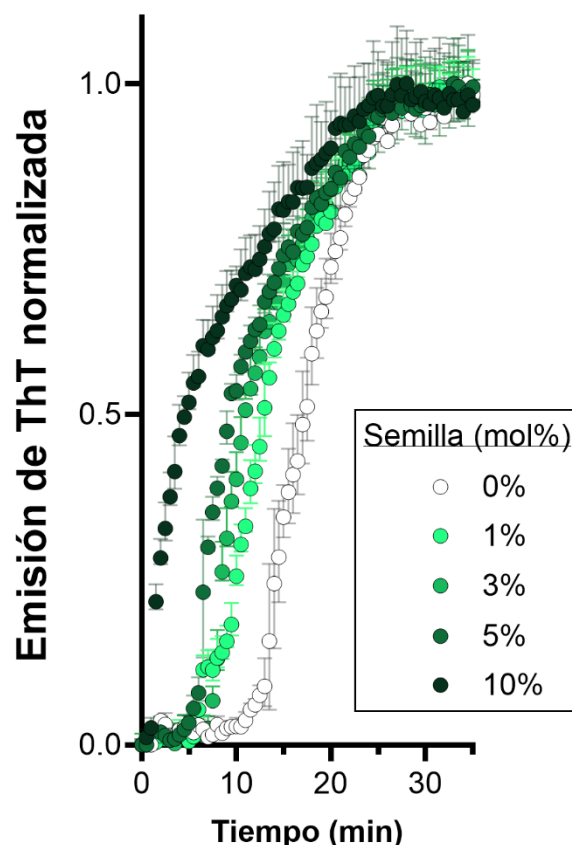


Figura 18. Cinética de emisión de tioflavina-T (ThT) de las mezclas de reacción de F_2E y T_{12} en presencia de diferentes cantidades de su producto AP, $T_{12}F_2E$ (semilla). Media \pm SD, $n = 3$ (elaboración propia).

La presencia del producto $T_{12}F_2E$ (es decir, la semilla) aceleró la producción de AP y su micelización, acortando progresivamente el tiempo de inducción con el aumento del dopaje de $T_{12}F_2E$, desde aproximadamente 10 min sin sembrar hasta casi eliminar cualquier fase de inducción con 10 mol% de semilla (Figura 18).

Una vez identificado $T_{12}F_2E$ como el AP auto-replicante mínimo dentro de la biblioteca estudiada, nos dispusimos a investigar el análogo más pequeño $T_{12}FE$ para comprender si su falta de señal de emisión (Figura 17) se debía a una falta de reactividad covalente o de micelización supramolecular; siendo estos los dos procesos secuenciales necesarios para que la sonda ThT emita fluorescencia.

Dado que la ThT informa sobre el auto-ensamblaje de anfifilos peptídicos generados *in situ*, nos propusimos a desacoplar el análisis de estos dos procesos para comprenderlos paso a paso. En primer lugar, el análisis HPLC-MS de las mezclas de reacción confirmó la conversión cuantitativa de los precursores F_2E y FE en sus correspondientes productos T_{12} (Figura 19).

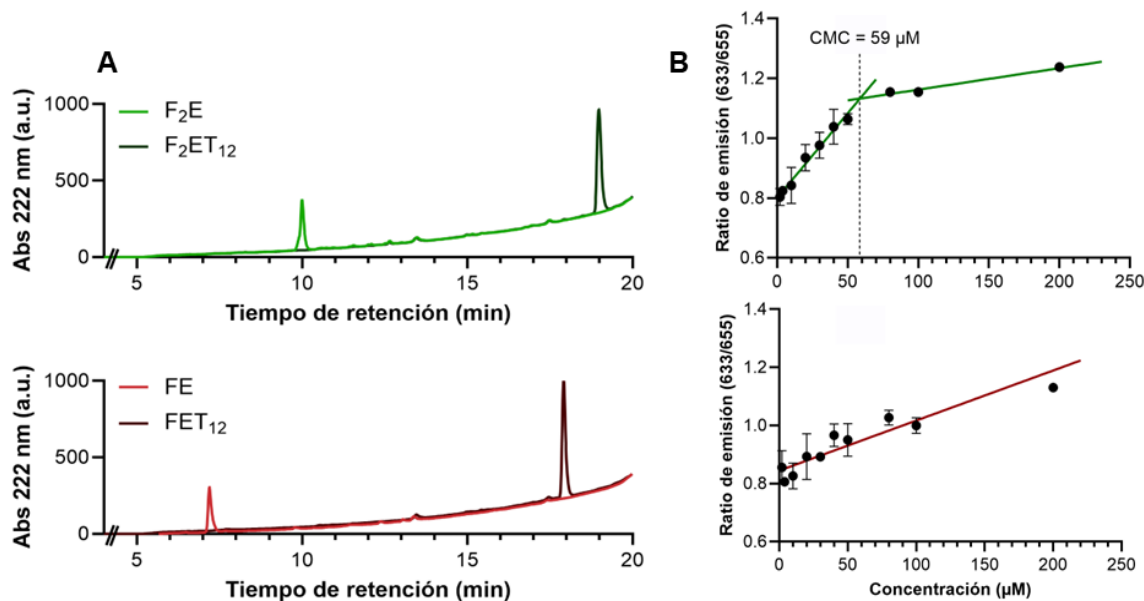


Figura 19. (A) Análisis por HPLC en fase reversa de los precursores peptídicos antes (F_2E , FE) y 180 min después ($T_{12}F_2E$, $T_{12}FE$) de la adición del aldehído reactivo T_{12} . (B) Concentración micelar crítica (CMC) de los AP calculada mediante la emisión de rojo Nilo. Media \pm DE, $n = 3$ (elaboración propia).

En segundo lugar, se estudió espectroscópicamente la concentración micelar crítica (CMC) de ambos productos PA, utilizando rojo Nilo como indicador sensible al entorno para la formación de micelas (16,17). Se utiliza el desplazamiento azul de la emisión de rojo Nilo cuando esta sonda se internaliza en entornos hidrófobos (por ejemplo, núcleos de micelas) para establecer los valores de CMC (19), controlando los máximos de emisión a 655 y 633 nm como estados en solución e internalizada en la micela, respectivamente (Figura 20).

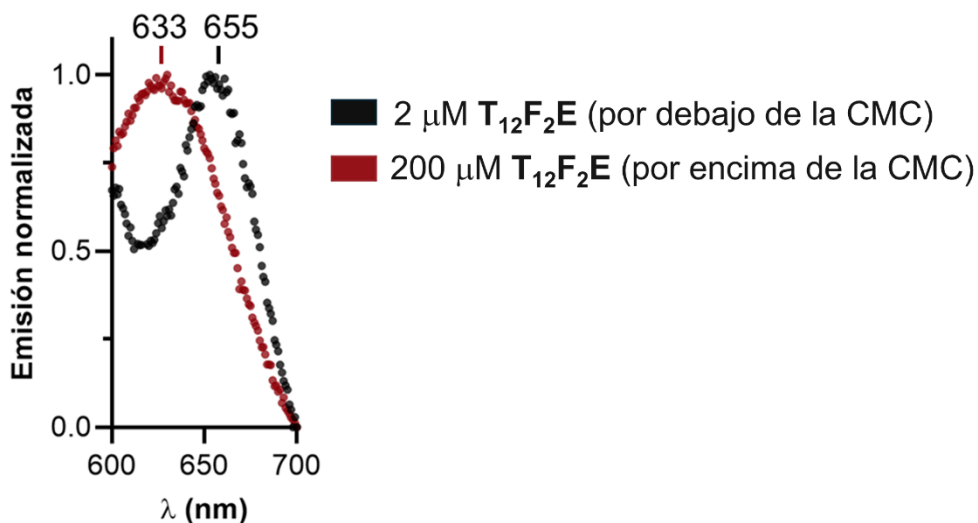


Figura 20. Emisión de fluorescencia del rojo Nilo ($ex = 550$ nm) en presencia de diferentes concentraciones de AP autoensamblante (elaboración propia).

Mientras que el **T₁₂F₂E** auto-replicante mostró una CMC de 59 μM , consistente con el bajo rango μM encontrado para otras CMCs de APs (7), el **T₁₂FE** no mostró ninguna transición de CMC en el rango de concentraciones ensayadas (*Figura 19B*). Teniendo todo esto en cuenta, estos resultados implican que mientras que **FE** puede reaccionar eficientemente para formar **T₁₂FE**, este anfifilo peptídico no puede formar micelas en solución, estableciendo un límite inferior en la miniaturización estructural de los APs con auto-replicantes.

Cabe destacar que la CMC hallada para **T₁₂F₂E** (59 μM) se ajusta perfectamente a los resultados de los experimentos de siembra (*Figura 18*), en los que valores de semilla por debajo de la CMC (por ejemplo, 5 mol% = 50 μM) siguen necesitando un tiempo de inducción para generar micelas catalíticas, mientras que las concentraciones de semilla por encima de la CMC (10 mol% = 100 μM), carecen de tiempo de inducción, habiendo pre-formado micelas auto-catalíticas desde el inicio del experimento.

Estos resultados muestran que la naturaleza auto-catalítica de los APs surge de su estado micelar ensamblado, que puede funcionar como un nanoreactor que aumenta la concentración local de precursores y, por tanto, la velocidad de reacción (*Figura 5*).

3.4 Caracterización de los ensamblados supramoleculares

Por último, decidimos estudiar las posibles nano-estructuras formadas por todos los productos de **T₁₂**, siendo este aldehído el más hidrófobo de los ensayados y, por tanto, el que más probabilidades tenía de inducir el auto-ensamblaje. Los APs pueden generar diferentes nano-ensamblajes en función de su estructura molecular y de las condiciones de ensamblaje (e.g. concentración, pH, etc.), formando principalmente micelas y nanofibras (5). Normalmente, cuanto más larga es la unidad peptídica del anfifilo peptídico, más se favorece su propagación lineal en nanofibras debido al mayor número de enlaces de H entre los esqueletos peptídicos. A diferencia de los enlaces de H direccionales, el empaquetamiento hidrófobo no direccional suele inducir la micelización de los APs con unidades peptídicas cortas.

Imitando las condiciones de los estudios cinéticos (*Figura 17*), las mezclas de

reacción de los cuatro péptidos con **T₁₂** se visualizaron mediante microscopía electrónica (*Figura 21*).

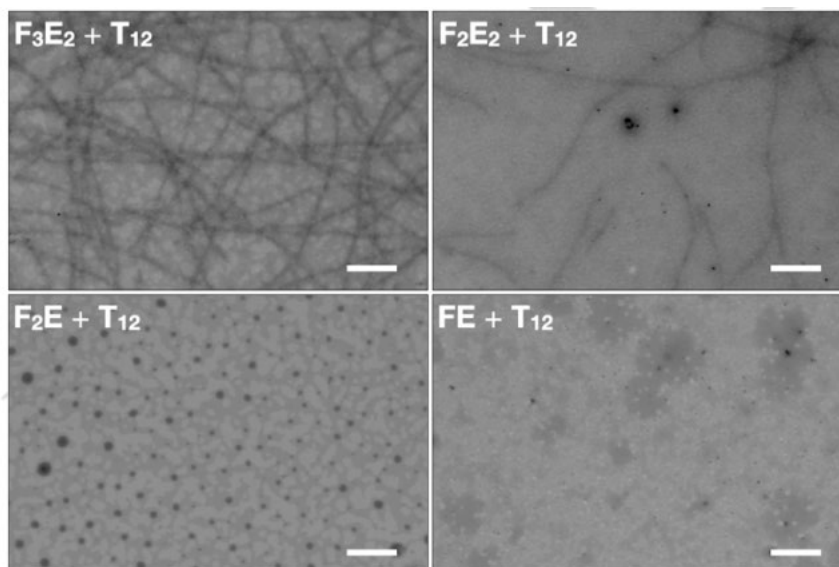


Figura 21. Imágenes representativas de microscopía electrónica de barrido-transmisión (STEM) de todas las mezclas de reacción **T₁₂**. Las muestras se tiñeron con ácido fosfotúngstico. Todas las barras de escala = 400 nm (elaboración propia).

Las imágenes mostraron que, mientras los dos péptidos más grandes, **F₃E₂** y **F₂E₂**, formaban nanofibras con **T₁₂** -el primero en mucha mayor cantidad-, **F₂E** sólo mostraba estructuras circulares parecidas a micelas ($\varnothing = 65 \pm 16$ nm, *Figura 22*).

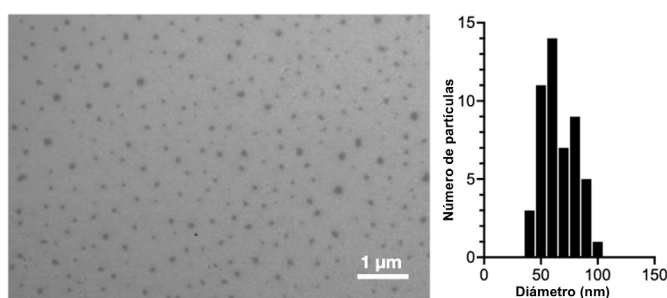


Figura 22. Micrografía electrónica sin tinción de **T₁₂F₂E** (izquierda) y distribución del tamaño de las partículas encontradas en esta imagen; $n = 50$ (derecha) (elaboración propia).

Al ser análogas en su estructura anfifílica, tanto las micelas como las nanofibras de APs (también conocidas como micelas cilíndricas) (21) pueden funcionar como catalizadores para la auto-replicación de los AP que las constituyen. No es sorprendente que el péptido más pequeño, **FE**, no mostrara ninguna nanoestructura por microscopía electrónica, lo que confirma su incapacidad para auto-ensamblarse, como sugerían todos los experimentos anteriores.

La dispersión dinámica de la luz (DLS) confirmó el tamaño de las micelas de $T_{12}F_2E$ ($D_H = 61 \pm 11$ nm, *Figura 23*), y todas las demás muestras produjeron estructuras más grandes, consistentes con nanofibras de $T_{12}F_3E_2$ y $T_{12}F_2E_2$ y agregados amorfos de $T_{12}FE$.

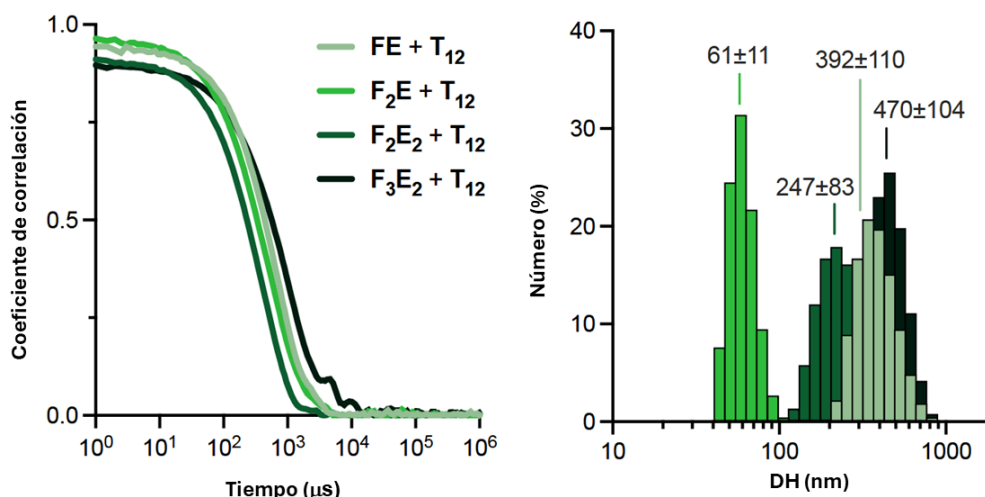


Figura 23. Correlogramas de dispersión dinámica de la luz (izquierda) y distribuciones de tamaño (derecha) de mezclas de reacción entre cada péptido latente con T_{12} (elaboración propia).

4 Conclusiones

Hemos identificado $T_{12}F_2E$ como el más pequeño anfifilo peptídico auto-replicante descrito hasta ahora, capaz de acelerar su propia síntesis a partir de dos precursores reactivos, F_2E y T_{12} , mediante micelización. Los experimentos de siembra demostraron la naturaleza auto-catalítica de este proceso, con niveles de dopaje por encima de la CMC eliminando toda fase de inducción (*Figura 18*, 10 mol%). La incapacidad del análogo más pequeño estudiado, $T_{12}FE$, para formar micelas catalíticas se ha demostrado con dos sensores de auto-ensamblaje, ThT (*Figura 17*) y rojo Nilo (*Figura 19B*), y microscopía electrónica (*Figura 21*).

Nuestros resultados muestran un límite inferior en la simplificación estructural de anfifilos peptídicos auto-replicantes. Esperamos que estos resultados guíen futuros desarrollos en biomateriales funcionales, que puedan implementar estos diseños capaces de amplificar sus propiedades por replicación molecular.

Finalmente, destacar que este trabajo ya ha superado un proceso de *peer-review*, publicado como: [I. Turcan, I. Insua *ChemSystemsChem* 2025, e202400094.](#)

Bibliografía

1. Villarreal Ruiz M. Cross-section of the different structures that phospholipids can take in aqueous solution. [Internet]. 18 de mayo de 2013 [citado el 1 de febrero de 2025]. Disponible en: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phospholipids_aqueous_solution_structures-es.svg#/media/File:Phospholipids_aqueous_solution_structures-es.svg
2. Bose A, Roy Burman D, Sikdar B, Patra P. Nanomicelles: Types, properties and applications in drug delivery. IET Nanobiotechnology [Internet]. 2021 feb. [consultado el 3 de febrero de 2025];15(1):19-27. Disponible en: <https://doi.org/10.1049/nbt2.12018>
3. Chevalier Y, Bolzinger MA. Micelles and Nanoemulsions. En: Cornier J, Keck CM, Van De Voorde M, editores. Nanocosmetics [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [consultado el 3 de febrero de 2025]. p. 47-72. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-16573-4_4
4. Chatterjee S, Kon E, Sharma P, Peer D. Endosomal escape: A bottleneck for LNP-mediated therapeutics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA [Internet]. 2024 marzo. [consultado el 3 de febrero de 2025];121(11)e2307800120. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.2307800120>
5. Berillo D, Yeskendir A, Zharkinbekov Z, Raziyeva K, Saparov A. Peptide-Based Drug Delivery Systems. Medicina [Internet]. 2021 nov. [consultado el 3 de febrero de 2025];57(11):1209. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/medicina57111209>
6. Hendricks MP, Sato K, Palmer LC, Stupp SI. Supramolecular Assembly of Peptide Amphiphiles. Acc. Chem. Res. [Internet]. 2017 oct. [consultado el 4 de febrero de 2025];50(10):2440-2448. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00297>
7. Song Z, Chen X, You X, Huang K, Dhinakar A, Gu Z, et al. Self-assembly of peptide amphiphiles for drug delivery: the role of peptide primary and secondary structures. Biomater. Sci. [Internet]. 2017 sept. [consultado el 10 de febrero de 2025];5(12):2369-2380. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C7BM00730B>
8. Booth R, Insua I, Ahmed S, Rioboo A, Montenegro J. Supramolecular fibrillation of peptide amphiphiles induces environmental responses in aqueous droplets.

- Nat. Commun. [Internet]. 2021 mayo [consultado el 10 de febrero de 2025];12(1):6421. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26681-2>
9. Adamski P, Eleveld M, Sood A, Kun Á, Szilágyi A, Czárán T, et al. From self-replication to replicator systems en route to de novo life. Nat. Rev. Chem. [Internet]. 2020 jul. [consultado el 10 de febrero de 2025];4(8):386-403. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41570-020-0196-x>
 10. Colomer I, Morrow SM, Fletcher SP. A transient self-assembling self-replicator. Nat. Commun. [Internet]. 2018 abril [consultado el 10 de febrero de 2025];9(1):2239. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04670-2>
 11. Hanopolskyi AI, Smaliak VA, Novichkov AI, Semenov SN. Autocatalysis: Kinetics, Mechanisms and Design. ChemSystemsChem [Internet]. 2021 enero [consultado del 10 de febrero de 2025];3(1):e2000026. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/syst.202000026>
 12. Howlett MG, Fletcher SP. From autocatalysis to survival of the fittest in self-reproducing lipid systems. Nat. Rev. Chem. [Internet]. 2023 agosto [consultado el 12 de febrero de 2025];7(10):673-91. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41570-023-00524-8>
 13. Kubota R, Nagao K, Tanaka W, Matsumura R, Aoyama T, Urayama K, et al. Control of seed formation allows two distinct self-sorting patterns of supramolecular nanofibers. Nat. Commun. [Internet]. 2020 ago. [consultado el 12 de febrero de 2025];11(1):4100. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17984-x>
 14. Booth R, Insua I, Bhak G, Montenegro J. Self-assembled micro-fibres by oxime connection of linear peptide amphiphiles. Org. Biomol. Chem. [Internet]. 2019 oct. [consultado el 12 de febrero de 2025];17(7):1984-1991. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C8OB02243G>
 15. Jiménez-Castells C, De La Torre BG, Andreu D, Gutiérrez-Gallego R. Neoglycopeptides: the importance of sugar core conformation in oxime-linked glycoprobes for interaction studies. Glycoconj. J. [Internet]. 2008 dic. [consultado el 12 de febrero de 2025];25(9):879-87. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10719-008-9150-8>
 16. Nguyen R, Allouche L, Buhler E, Giuseppone N. Dynamic Combinatorial Evolution within Self-Replicating Supramolecular Assemblies. Angew. Chem.

- Int. Ed. [Internet]. 2009 enero [consultado el 12 de febrero de 2025];48(6):1093-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/anie.200804602>
17. Kumar S, Singh AK, Krishnamoorthy G, Swaminathan R. Thioflavin T Displays Enhanced Fluorescence Selectively Inside Anionic Micelles and Mammalian Cells. *J. Fluoresc.* [Internet]. 2008 nov. [consultado el 12 de febrero de 2025];18(6):1199-205. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10895-008-0378-2>
18. Shi Y, Lin R, Cui H, Azevedo HS. Multifunctional Self-Assembling Peptide-Based Nanostructures for Targeted Intracellular Delivery: Design, Physicochemical Characterization, and Biological Assessment. En: Chawla K, editor. *Biomaterials for Tissue Engineering* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2018 [citado el 12 de febrero de 2025]. p. 11-26. (Methods in Molecular Biology; vol. 1758). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7741-3_2
19. Stuart MCA, Van De Pas JC, Engberts JBFN. The use of Nile Red to monitor the aggregation behavior in ternary surfactant–water–organic solvent systems. *J. of Physical Organic. Chem.* [Internet]. 2005 sept. [consultado el 12 de febrero de 2025];18(9):929-34. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/poc.919>
20. Shi Y, Ferreira DS, Banerjee J, Pickford AR, Azevedo HS. Tuning the matrix metalloproteinase-1 degradability of peptide amphiphile nanofibers through supramolecular engineering. *Biomater. Sci.* [Internet]. 2019 sept. [consultado el 12 de febrero de 2025];7(12):5132-42. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C9BM00949C>
21. Bissette AJ, Fletcher SP. Novel applications of physical autocatalysis. *Orig. Life Evol. Biosph.* [Internet]. 2015 jun. [consultado el 12 de febrero de 2025];45(1-2):21-30. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11084-015-9404-y>
22. Kahana A, Lancet D. Self-reproducing catalytic micelles as nanoscopic protocell precursors. *Nat. Rev. Chem.* [Internet]. 2021 oct. [consultado el 12 de febrero de 2025];5(12):870-878. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00329-7>
23. Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers. *Science.* [Internet]. 2001 nov. [consultado el 12 de febrero de 2025];294(5547):1684-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.1063187>

Índice de figuras

Figura 1. Estructura micela (1).....	6
Figura 2. Esquema de dianas de unión de sistemas peptídicos (5).	6
Figura 3. Estructura genera de un anfifilo peptídico rodeada de las estructuras supramoleculares que puede formar (6).....	7
Figura 4. Comparativa de cinéticas de una reacción auto-catalítica, con (seeded) y sin adicción de producto pre-formado, con una hipotética reacción no auto-catalítica (12).	8
Figura 5. Esquema de reacción de péptidos precursores no ensamblantes con aldehídos alifáticos (es decir, colas) para generar productos peptídicos anfifílicos (APs). Estos pueden autoensamblar como micelas en el medio acuoso, que pueden catalizar la posterior conversión de precursores en AP, aumentando la concentración local de moléculas reactivas en la superficie anfifílica de las micelas (recuadro inferior izquierdo) (elaboración propia).....	13
Figura 6. Espectro de ¹ H-RMN del péptido FE (elaboración propia)	14
Figura 7. Espectro de RMN- ¹ H del péptido FE.	14
Figura 8. Cromatograma del HPLC y espectro de masas del péptido FE (elaboración propia).....	14
Figura 9 Espectro de ¹ H-RMN del péptido F ₂ E (elaboración propia).....	15
Figura 10. Cromatograma del HPLC y espectro de masas del péptido F ₂ E (elaboración propia).....	15
Figura 11. Espectro de ¹ H-RMN del péptido F ₂ E ₂ . (elaboración propia).....	16
Figura 12. Cromatograma del HPLC y espectro de masas del péptido F ₂ E ₂ (elaboración propia).....	16
Figura 13. Espectro de ¹ H-RMN del péptido F ₃ E ₂ (elaboración propia).....	17
Figura 14. Cromatograma del HPLC y espectro de masas del péptido F ₃ E ₂ (elaboración propia).....	17
Figura 15. Cromatograma del HPLC y espectro de masas del anfifilo peptídico T ₁₂ FE (elaboración propia).....	18
Figura 16. Cromatograma del HPLC y espectro de masas del anfifilo peptídico T ₁₂ F ₂ E (elaboración propia).....	18
Figura 17. Cinética de emisión de ThT de mezclas de péptidos latentes (F ₃ E ₂ , F ₂ E ₂ , F ₂ E y FE) con colas aldehídicas (T ₁₂ , T ₁₀ y T ₈). Las muestras control se realizaron en ausencia de cola aldehídica. Media ± SD, n=3 (elaboración propia).	19
Figura 18. Cinética de emisión de tioflavina-T (ThT) de las mezclas de reacción de F ₂ E y T ₁₂ en presencia de diferentes cantidades de su producto AP, T ₁₂ F ₂ E (semilla). Media ±	

SD, n = 3 (elaboración propia).....	21
Figura 19. (A) Análisis por HPLC en fase reversa de los precursores peptídicos antes (F ₂ E, FE) y 180 min después (T ₁₂ F ₂ E, T ₁₂ FE) de la adición del aldehído reactivo T ₁₂ . (B) Concentración micelar crítica (CMC) de los AP calculada mediante la emisión de rojo Nilo. Media ± DE, n = 3 (elaboración propia).....	22
Figura 20. Emisión de fluorescencia del rojo Nilo (ex = 550 nm) en presencia de diferentes concentraciones de AP autoensamblante (elaboración propia).	22
Figura 21. Imágenes representativas de microscopía electrónica de barrido-transmisión (STEM) de todas las mezclas de reacción T ₁₂ . Las muestras se tiñeron con ácido fosfotúngstico. Todas las barras de escala = 400 nm (elaboración propia).	24
Figura 22. Micrografía electrónica sin tinción de T ₁₂ F ₂ E (izquierda) y distribución del tamaño de las partículas encontradas en esta imagen; n = 50 (derecha) (elaboración propia).....	24
Figura 23. Correlogramas de dispersión dinámica de la luz (izquierda) y distribuciones de tamaño (derecha) de mezclas de reacción entre cada péptido latente con T ₁₂ (elaboración propia).....	25

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mi tutor, el Dr. Ignacio Insua, por haberme acogido en el grupo y brindarme la oportunidad de adentrarme en el mundo de la investigación. También por el apoyo, confianza depositada en mí y por transmitirme la pasión por la ciencia desde el rigor.

También quería agradecerles a todos mis compañeros del Insua Lab por su apoyo y por hacer la rutina más amena. Además de sus sugerencias y discusiones realizadas en los seminarios de grupo, que han sido de gran importancia para que, tanto este proyecto como el grupo, cuente con una investigación de calidad.

Muchas gracias a todos.

Este trabajo fue financiado por la Agencia Estatal de Investigación (RYC2021-031367-I) y la Xunta de Galicia (ED431F 2023/24, ED431 C 2024/09).