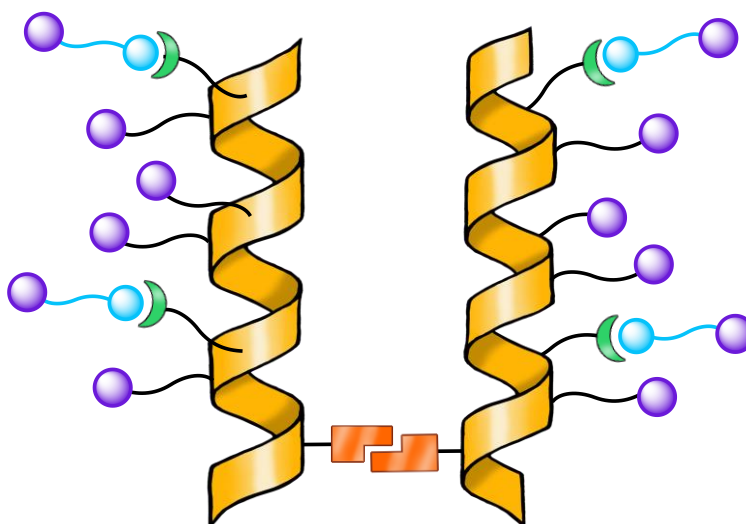


Trabajo Fin de Grado 2015/2016
Grado en Química

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Diseños Supramoleculares para Nuevas Terapias Génicas



Santiago de Compostela, julio 2016

Departamento de Química Orgánica y
Centro Singular de Investigacións en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS)

D. JUAN GRANJA GUILLÁN, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA Y D. JAVIER MONTENEGRO GARCÍA, INVESTIRGADOR RAMÓN Y CAJAL EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.

INFORMAN: que la memoria adjunta titulada "*Diseños Supramoleculares para Nuevas Terapias Génicas*" que presenta Leticia Suárez Barrigón para superar la asignatura Trabajo de Fin de Grao, perteneciente al Grao en Química ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica en el CIQUS y autorizamos su presentación en la Universidade de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide la presente autorización en Santiago de Compostela a 10 de julio de 2016.

Fdo.: D. Juan Granja Guillán

Fdo.: D. Javier Montenegro García

Fdo.: Leticia Suárez Barrigón

Índice

ABREVIATURAS	1
1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. CELL-PENETRATING PEPTIDES	5
2.2. TRANSPORTE Y MECANISMOS DE INTERNALIZACIÓN DE LOS CPPS	6
2.3. CONCEPTOS PREVIOS	9
2.3.1. <i>Las proteínas y su estructura</i>	9
2.3.2. <i>Estructura secundaria α-helicoidal</i>	11
2.3.3. <i>Enlaces disulfuro y su papel estabilizador</i>	11
2.3.4. <i>Posibles rutas de desensamblaje celular. Reducción de los enlaces S-S.</i>	12
2.3.5. <i>Síntesis peptídica en fase sólida</i>	14
2.3.6. <i>Síntesis peptídica en fase sólida mediante el método Fmoc</i>	15
3. OBJETIVOS	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. DISEÑO GENERAL DE LOS PÉPTIDOS	20
4.2. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA (SPPS), PROCEDIMIENTO GENERAL	22
4.3. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO LINEAL HP1, COMBINANDO HIDRAZIDAS E HIDROXILAMINAS	23
4.4. SÍNTESIS DE LOS PÉPTIDOS CONTENIENDO ENLACES DINÁMICOS ORTOGONALES DISULFURO E HIDROXILAMINA	24
4.4.1. <i>Protocolo para la síntesis del péptido HP3</i>	25
4.4.2. <i>Síntesis del péptido HP2</i>	27
4.4.2.1. Acoplamiento del aldehído T-Guanidinio. Síntesis de HP4	27
4.4.2.2. Desprotección del residuo cisteína. Síntesis de HP6	28
4.4.2.3. Dimerización del péptido HP6	29
4.4.3. <i>Síntesis del péptido HP3</i>	31
4.5. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA	32
4.6. PREPARACIÓN DE LAS VESÍCULAS	33
4.7. EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE POR FLUORESCENCIA EN LUVS \square HPTS/DPX	35
5. CONCLUSIONES Y FUTURO TRABAJO	37
6. PARTE EXPERIMENTAL	39
6.1. DESCRIPCIÓN GENERAL, INSTRUMENTOS Y MATERIALES	39
6.2. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA, PROCEDIMIENTO GENERAL	39
6.2.1. <i>Síntesis del péptido lineal HP1.</i>	43
6.2.2. <i>Síntesis del péptido lineal HP2.</i>	44
6.2.2.1. Acoplamiento del aldehído T-Guanidinio. Síntesis de HP4.	45
6.2.2.2. Desprotección del residuo cisteína. Síntesis de HP6.	46
6.2.2.3. Dimerización del péptido HP6.	47
6.2.3. <i>Síntesis del péptido lineal HP3.</i>	48
6.2.3.1. Acoplamiento del aldehído T-Guanidinio. Síntesis de HP5.	49
6.2.3.2. Desprotección del residuo de Cisteína. Síntesis de HP7.	50
6.3. <i>Método de preparación de las vesículas</i>	51
6.4. MÉTODO DE MEDICIÓN DE DICROÍSMO CIRCULAR	51
6.5. MÉTODO DE MEDICIÓN DEL TRANSPORTE	51

Abreviaturas

δ	desplazamiento químico (ppm)
Aa	aminoácido
Ala	Alanina
AMP	péptido antimicrobiano
Arg	Arginina
Boc	Tert-butoxicarbonilo
CPP	péptidos que penetran en células
DCM	diclorometano
DIEA	N,N'-diisopropiletilamina
DMF	N,N'-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DPX	bromuro de p-xileno-bispiridinio
MS	espectrometría de masas
eq	equivalente
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
Gly	Glicina
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
N-HBTU	hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1h-benzotriazol-1-il) dimetilamino metileno]-N-metilmetanaminio
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPTS	ácido 1,3,6-trisulfónico 8-hidroxipireno sal de trisodio
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Lys	Lysina
LUVs	vesículas unilamelares largas
Mtt	4-metiltrilito
NMM	N-metilmorfolina
Ox	oxima
PAD	Dominio peptídico pro-apoptótico
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
PTD	dominios transductores de proteínas
RMN	resonancia magnética nuclear
SPPS	síntesis en fase sólida
T-Gu	Cola de guanidinio

TFA	ácido trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TIS	triisopropilsilano
TNBS	Ácido 2,4,6-Trinitrobenceno sulfónico
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometa

1. Abstract

CPPs are short oligopeptides with variable structures that emerge as a new promising technology in gene therapy. Their physical-chemical properties can be modulated through changes in the design of the peptide backbone or through different functionalization of the amino acid residues. Therefore, supramolecular conjugation with other polymers such as DNA or RNA represents a promising alternative to viral vectors.

In this dissertation, linear amphiphilic peptides are designed to contain different and orthogonal dynamic reactive groups like oximes, hydrazones and disulfide bridges. Additionally, these peptides are designed to adopt an helical secondary structure. It was confirmed the viability of the synthetic strategy and we have been able to include the three different dynamic bonds into penetrating peptide scaffolds. These novel penetrating peptides are intended to find applications in membrane transport and drug release.

1. Resumen

Los CPPs son oligopéptidos cortos de estructura variada que se presentan como una prometedora tecnología aplicable a la terapia génica. Sus propiedades físico-químicas pueden modularse mediante cambios en el diseño de su esqueleto peptídico o la funcionalización de las cadenas laterales de sus residuos aminoácidos. Por tanto, la conjugación supramolecular con otros polímeros como el DNA o el RNA representa una alternativa a los vectores virales.

En este trabajo, se diseñan péptidos anfifílicos lineales para que contengan diferentes grupos reactivos dinámicos y ortogonales como las oximas, las hidrazonas y los puentes disulfuro. Además, estos péptidos adoptan estructuras secundarias helicoidales. Se confirmó la viabilidad de la estrategia sintética y la posibilidad de incluir tres enlaces dinámicos diferentes en la misma estructura peptídica penetrante. En futuras investigaciones, se espera encontrar aplicaciones para estos novedosos péptidos en transporte de fármacos a través de membranas lipídicas.

1. Resumo

Os CPPs son oligopéptidos curtos de estrutura variada que se presentan como unha prometedora tecnoloxía aplicable á terapia xénica. As súas propiedades físico-químicas poden modularse mediante cambios no deseño do seu esqueleto peptídico o a funcionalización das cadeas laterais dos seus residuos aminoácidos. Por tanto, a conxugación supramolecular con outros polímeros coma o DNA ou o RNA representan unha alternativa aos vectores virais.

Neste traballo, diséñanse péptidos anfifílicos lineais para que conteñan diferentes grupos reactivos dinámicos e ortogonais coma as oximas, as hidrazonas e as pontes disulfuro. Ademais, estes péptidos adoptan estruturas secundarias helicoidais. Confírmase a viabilidade da estratexia sintética e a posibilidade de incluír tres enlaces dinámicos diferentes na mesma estrutura peptídica penetrante. En futuras investigacións, espérase encontrar aplicacións para estes novedosos péptidos en transporte de fármacos a través de membranas lipídicas.

2. Introducción

En la actualidad médica, la terapia génica es un campo que no cesa de cobrar interés. Se presenta como una técnica para transportar fragmentos de DNA y RNA al interior de células diana, de tal modo que puedan sustituir a las secuencias dañadas y modificar así la expresión de proteínas alteradas. Revertir los daños derivados del mal funcionamiento de estas proteínas significará, por tanto, revertir los trastornos biológicos asociados; dando un paso más allá en el tratamiento de las enfermedades hereditarias, las enfermedades genómicas raras e incluso el cáncer.

Uno de los principales obstáculos, con el que se topan la gran mayoría de los tratamientos, es la barrera casi infranqueable que supone la membrana plasmática celular. Sin embargo, en los últimos años se han popularizado como vectores de transporte los CPPs (*cell-penetrating peptides*), péptidos sintéticos cortos, fáciles de sintetizar y caracterizar analíticamente, que son capaces además de atravesar las membranas. En muchos casos además facilitan el transporte de otros péptidos, fragmentos de RNA o DNA, nanopartículas, plásmidos o anticuerpos.¹

Otras estrategias empleadas en el transporte se basan en el empleo de vectores virales para la introducción de material genético modificado en células diana. Esta carga genética puede ser de muy diversos tipos, aunque hoy en día una de las tecnologías más prometedoras es el siRNA o RNA de silenciamiento (small interfering RNA).

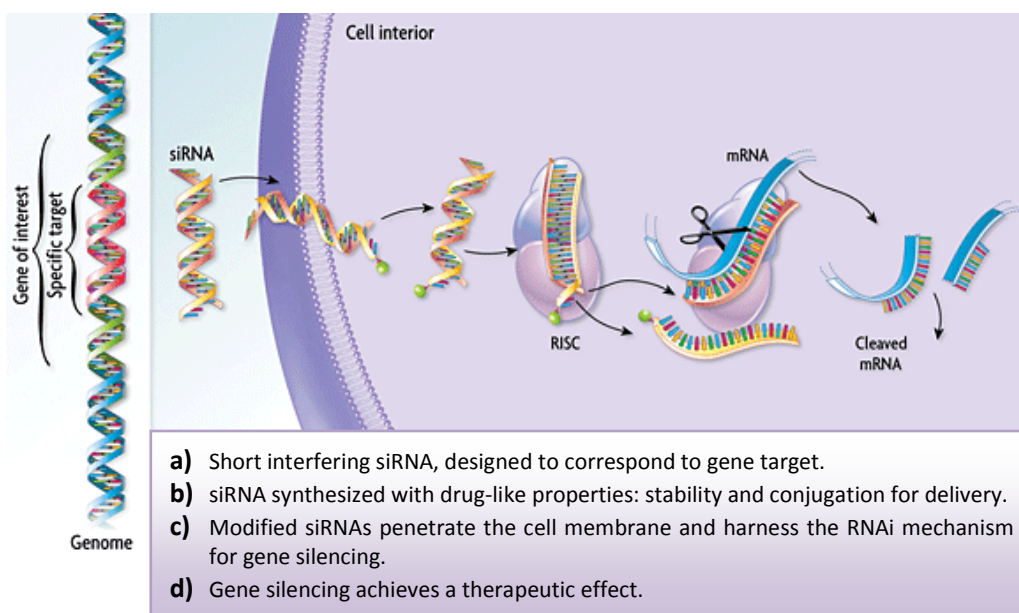


Figura 1. Mecanismo de silenciamiento de genes mediante siRNA.

El RNA de interferencia o siRNA es capaz de regular la expresión de los genes catalíticamente, ofreciendo así numerosas ventajas frente a otras terapias génicas.² Su

¹Figueiredo, I. R.; Freire, J. M.; Flores, L.; Veiga, A. S.; Castanho, M. A. R. B., Cell-penetrating peptides: A tool for effective delivery in gene-targeted therapies. *Life*, **2014**, *66*, 182-194.

²R. C. Mulligan, The basic science of gene therapy. *Science*, **1993**, *260*, 926-932.

mecanismo de acción es post-transcripcional, pues ataca al mRNA ya transcrito silenciando su actividad mediante la formación de RNA bicatenario y evitando así, que se sinteticen las proteínas que codifica. Su poder terapéutico es tal, que puede interferir en la expresión de genes importantes, tal como se ha demostrado en numerosos ensayos en modelos in vivo de cáncer, enfermedades infecciosas autoinmunes como el VIH-1, y otros trastornos genéticos.³ No obstante, los problemas asociados con la bioseguridad de los vectores virales y las propias limitaciones de los siRNA para ser internalizados en la célula, puesto que son macromoléculas altamente cargadas y sensibles a la degradación por nucleasas, ponen de manifiesto la necesidad de diseñar y desarrollar nuevos vectores capaces de mejorar su internalización.⁴

Por otro lado, los CPPs también han adquirido creciente interés en otro campo muy estudiado en la actualidad: la búsqueda de agentes antimicrobianos eficaces que combatan la resistencia de las bacterias a los antibióticos. Tal es esta resistencia, que estas “superbacterias” (bacterias resistentes a más de un fármaco, como son los enterococos resistentes a la vancomicina (VRE) o aureus resistentes a la meticilina (SARM)) pueden haber llegado a extenderse a niveles que superan nuestra capacidad para combatirlos con los medicamentos existentes a día de hoy.⁵ Una posible solución a este problema se halla en los péptidos antimicrobianos de origen natural (AMPs), pues conforman un grupo de péptidos abundantes producidos naturalmente por tejidos y células aisladas para combatir a los agentes externos al organismo. Diseñando y creando macromoléculas similares a estos péptidos se podría reducir la distancia entre la infección y la cura. Por desgracia, muy pocos de estos péptidos sintéticos han sido probados en aplicaciones clínicas y los resultados más esperanzadores se reducen únicamente a su aplicación tópica.⁵

2.1. Cell-penetrating peptides

Los péptidos penetrantes de membrana son estructuras peptídicas cortas de menos de 30 aminoácidos que facilitan el transporte de pequeñas moléculas, fragmentos de DNA o incluso macromoléculas y nanopartículas, entre otros compuestos, al interior de las células. Una gran cantidad de péptidos posee esta propiedad. La mayoría de ellos se caracteriza por poseer un elevado número de residuos de naturaleza catiónica (Lys o Arg), en muchos casos acompañados de residuos hidrofóbicos que le aportan un carácter anfipático, ya que alternan en su estructura patrones polares (formados por residuos polares y/o catiónicos) con patrones hidrofóbicos (formados por residuos apolares).

Los CPPs se pueden clasificar atendiendo a su origen, función o aplicaciones biomédicas. Sin embargo, una de las más utilizadas es la que atiende preferentemente a las propiedades fisicoquímicas del péptido. Gracias al trabajo previo de Lorents y su grupo sobre la variación de los niveles de Ca^{2+} en células de Jurkat y HeLa en función del CPP internalizado,⁶ frecuentemente se clasifican en CPPs catiónicos, CPPs anfipáticos y CPPs hidrofóbicos.

³Dyawanapelly, S., Ghodke, S. B., Vishwanathan, R., Dandekar, P., & Jain, R. RNA interference-based therapeutics: molecular platforms for infectious diseases. *J. Biomed. Nanotechnol.*, **2014**, *10*, 1998-2037.

⁴Behr, J.-P., Synthetic gene transfer vectors II: Back to the future. *Acc. Chem. Res.*, **2012**, *45*, 980–984.

⁵Rodríguez-Vázquez, N.; Ozores, H. L.; Guerra, A.; González-Freire, E.; Fuertes, A.; Panciera, M.; Priegue, J.M; Outeiral, J.; Montenegro J.; García-Fandiño, R.; Amorín, M. and Granja, J.R., Membrane-Targeted Self-Assembling Cyclic Peptide Nanotubes. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2014**, *14*, 2647-2661

⁶Lorents, A.; Kodavali, P.K.; Oskolkov, N.; Langel, U.; Hallbrink, M.; Pooga, M., Cell-penetrating peptides split into two groups based on modulation of intracellular calcium concentration. *J. Biol. Chem.*, **2012**, *287*, 16880-16889.

Así, los CCPs con carga neta positiva elevada y unos pocos residuos aminoacídicos son los denominados catiónicos. Con su pequeño tamaño son péptidos capaces de inducir un rango enorme de efectos en la célula, incluyendo cambios en la integridad de la membrana celular y la viabilidad celular. Algunos ejemplos de esta clase son el péptido VIH-TAT o las oligoargininas sintéticas.⁷ En cuanto a aquellos péptidos que contienen regiones apolares y polares, son definidos como péptidos anfipáticos, cuya anfifilicidad se extrapola de su estructura primaria. La famosa penetratina o el péptido MPG, empleado recientemente para internalizar genes estructurales del virus de la hepatitis C y mejorar así la respuesta inmune a la infección,⁸ son ejemplos de este tipo de péptidos. Por último, los CPPs hidrofóbicos, grupo no muy abundante debido a su baja solubilidad, son aquellos que contienen residuos apolares. Aún así, existen evidencias experimentales de que estos péptidos conjugados con dominios de inducción a la apoptosis (*pro-apoptotic domain*, PAD por sus siglas en inglés), son capaces de atravesar las membranas plasmáticas e inducir la muerte celular al romper la membrana de las mitocondrias.⁹

2.2. Transporte y mecanismos de internalización de los CPPs

A pesar de haber nacido como compuestos para el transporte de moléculas al interior de las células, los mecanismos de internalización de CPPs están todavía por dilucidar. Una de las razones por la que este tema es todavía motivo de controversia es la variedad de propiedades y estructuras que poseen estos péptidos, como son la carga y el tamaño de la secuencia. Como ya se mencionó, no sólo son capaces de atravesar las membranas biológicas, sino que además también pueden interactuar con una gran variedad de moléculas de la superficie de las membranas, como los lípidos de membrana o los proteoglicanos asociados a la membrana.

Los mecanismos típicamente estudiados se pueden dividir en dos grandes grupos según requieran o no el consumo de energía por parte de la célula: la translocación directa a través de la bicapa lipídica, generalmente no asociado al consumo de energía, y el transporte mediado por endocitosis, que requiere de un aporte energético.

La endocitosis, el método convencional de entrada de moléculas hidrofílicas dentro de la célula, requiere un reordenamiento de la membrana plasmática o la interacción con un receptor de membrana específico, que van seguidos por la formación de una vesícula que se libera en el citoplasma. Para que se produzca este proceso se requiere un gasto energético. Desde ese punto de vista, la maquinaria de la endocitosis, ayudada por el citoesqueleto de la célula, transporta las moléculas exógenas hacia su destrucción o su reciclaje dependiendo del marcaje que les haya sido asignado. Es poco común que los endosomas liberen su contenido en el citoplasma, por lo que este no resulta ser el mejor mecanismo de actuación de los CPPs. No obstante, la investigación respecto a las rutas endocíticas de CPPs no cesa, habiéndose descrito

⁷Futaki, S.; Nakase, I.; Tadokoro, A.; Takeuchi, T.; Jones, A.T., Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms. *Biochem. Soc. T.*, **2007**, 35, 784-787.

⁸Mehrlatifan, S.; Mirnurollahi, S. M.; Motevalli, F.; Rahimi, P.; Soleymani, S.; Bolhassani, A., The structure HCV genes delivered by MPG cell penetrating peptide are directed to enhance immune responses in mice model. *Drug Deliv.*, **2015**, 1-8.

⁹Watkins, C.L.; Brennan, P.; Fegan, C.; Takayama, K.; Nakase, I.; Futaki, S.; Jones, A. T., Cellular uptake, distribution and cytotoxicity of the hydrophobic cell penetrating peptide sequence PFVYLI linked to the proapoptotic domain peptide PAD. *J. Control. Release*, **2009**, 140, 237-244.

evidencias de que algunos péptidos conjugados con GFP o rodamina prefieren internalizarse de este modo, como la proteína transactivadora de la transcripción (TAT) del virus del VIH.¹⁰

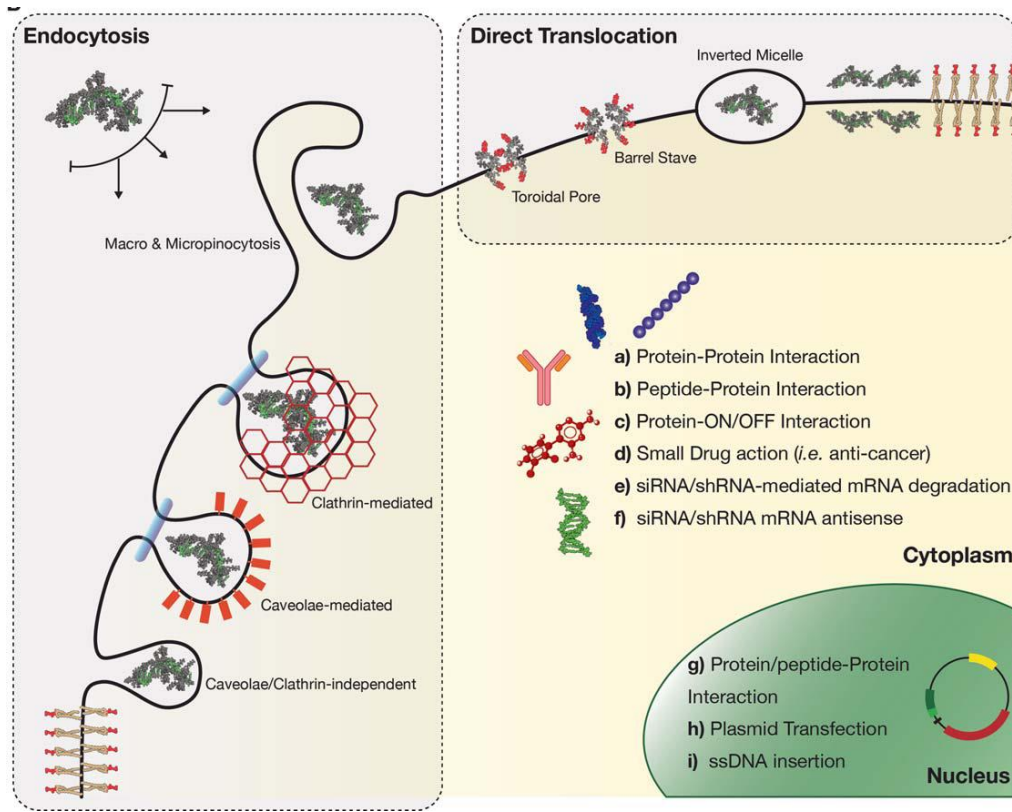


Figura 2. Mecanismos de translocación de los CPPs al interior celular y las posibles interacciones en el citoplasma y el núcleo de la célula.

EL otro método de entrada planteado es la translocación directa a través de la membrana plasmática. Este proceso no requiere de consumo energético por parte de la célula y es la ruta preferida por pequeñas moléculas hidrofílicas. Otra ventaja de la difusión directa es que no provoca daños perceptibles en la membrana. Una posible explicación de este hecho es la intervención inmediata del mecanismo reparador de la membrana, que moviliza pequeñas vesículas de fosfolípidos desde el interior celular para parchear los huecos presentes de un modo similar al que los trombocitos humanos coagulan la sangre en las inmediaciones de una herida para taponarla.

En el caso de macromoléculas muy hidrofílicas y cargadas, como es el caso de DNA, la entrada por translocación directa se hace dificultosa. Es ahí donde los CPPs juegan su rol más importante favoreciendo este mecanismo de internalización frente a la ruta endocítica. Las poliargininas, son oligopéptidos muy hidrofílicos y catiónicos que mantienen su carga positiva durante todo el rango de pH debido a la alta alcalinidad de los grupos guanidinio. Son homopolímeros pertenecientes a la familia de los PTD o dominios transductores de proteínas (*protein transduction domain*), también comúnmente llamados MTS (*membrane translocating sequences*). Su estructura es rica en residuos de Arg, lo que favorece enormemente la

¹⁰Jones S. W.; Christison, R.; Bundell K.; Voyce, C. J.; Brockbank, S. M.; Newham, P.; Lindsay, M. A. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery, *Br. J. Pharmacol.*, **2005**,145, 1093–1102.

translocación de macromoléculas poliónicas. La Lys no es tan efectiva como la Arg, pues su pK_a intrínseco se reduce (≤ 7.0) para minimizar las repulsiones entre las cargas de secuencias de polilisinias (**Figura 3**).¹¹ Ya en 1965 Ryser y Hancock demostraron que la adición de homopolímeros aminoácidos catiónicos a medios de cultivo de tejidos que contenían albúmina marcada radioisotópicamente incrementaban el transporte de la etiqueta radioactiva al interior celular.¹² Estudios más actuales sugieren que son necesarias al menos ocho cargas positivas para una internalización eficiente de CPPs.¹³

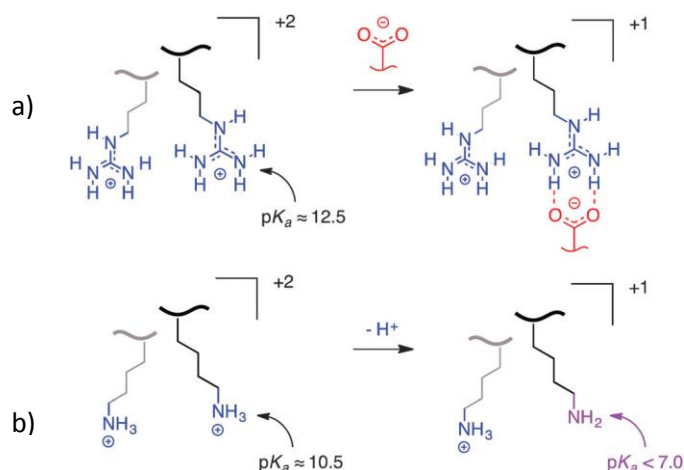


Figura 3. La estabilidad de los complejos poliónicos se consigue a través de la minimización de la repulsión de la carga proximal en los residuos de Lys y Arg. b) En el caso de la Lys, de carácter más ácido, esta reducción se consigue por la pérdida de un protón a pH cercano a 7.0. a) Sin embargo, la solución para reducir la carga neta de oligómeros con múltiples grupos guanidinio de la Arg, que es menos ácido, es mediante su unión a contraiones.¹⁴

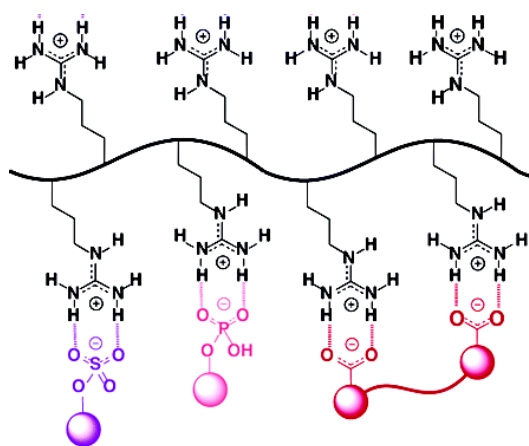


Figura 4. Ejemplos de contraiones que forman complejos termodinámicamente estables y cinéticamente inestables con los grupos guanidinio de una poliarginina. Este efecto de contraión suele llamarse coloquialmente “la magia de la arginina” (*arginine magic*).

¹¹Takeuchi, T.; Sakai, N.; Matile, S. Counterion-activated polyions as soft sensing systems in lipid bilayer membranes: From cell-penetrating peptides to DNA. *Faraday Disc.*, **2009**, *143*, 187-203.

¹²Ryser, H. J.; Hancock, R. Histone and basic polyamino acids stimulate the uptake of abumine by tumor cellsin culture. *Science*, **1965**, *150*, 501-503.

¹³El-Sayed, A.; Futaki, S.; Harashima, H., Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment. *AAPS J.*, **2009**, *11*, 13-22.

¹⁴Gasparini, G.; Bang, E-K.; Montenegro, J.; Matile, S. Celular uptake: lessons from supramolecularorganic chemistry. *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 10389-10402.

2.3. Conceptos previos

2.3.1. Las proteínas y su estructura

Los péptidos y las proteínas son biomoléculas formadas por α -aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos (enlaces amida),¹⁵ resultado de una reacción de condensación entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo ácido carboxílico de otro.

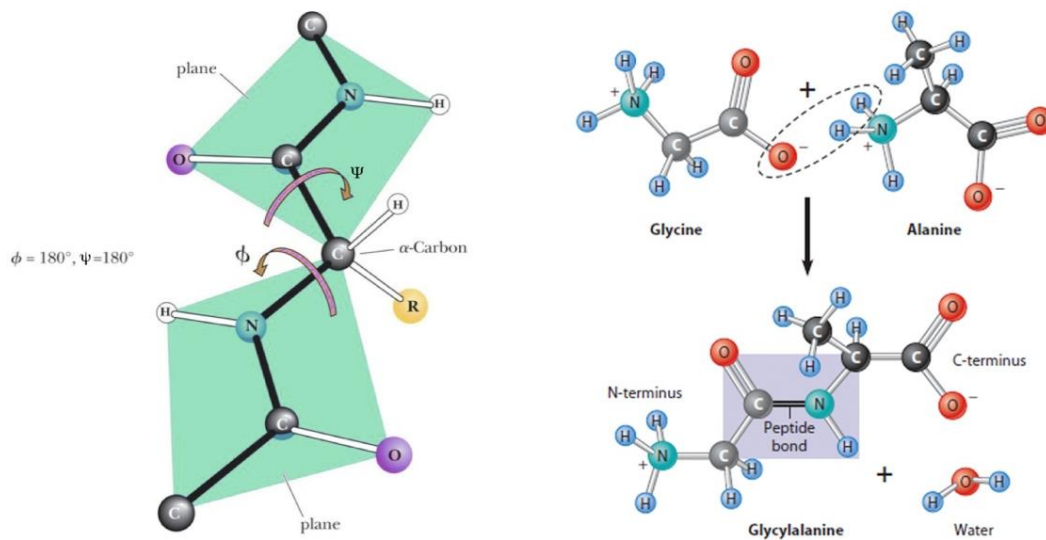


Figura 5. Izquierda: planos de los enlaces peptídicos y giros ψ y ϕ ; derecha: reacción de condensación para formar un enlace peptídico entre Gly y Ala.

El enlace peptídico tiene carácter parcial de doble enlace entre el nitrógeno y el carbono por lo que mantiene en un mismo plano a los 6 átomos implicados en la formación del enlace, como consecuencia de la deslocalización del par electrónico del Nitrógeno en el carbonilo de la amida. Esto aporta una rigidez especial a este enlace, reduciendo libertad conformacional a las rotaciones entre los enlaces en torno al carbono α . Estas rotaciones se conocen como las ψ y ϕ (Figura 5).

Los péptidos y proteínas están formados por una serie de monómeros denominados aminoácidos. Las unidades monoméricas de origen natural son α -aa, es decir, el grupo amino está unido en la posición α con respecto al grupo ácido, y además todos pertenecen a la serie L, lo que quiere decir que todos sus carbonos α tienen la misma estereoquímica y, por tanto las cadenas laterales permanecen orientadas todas en el mismo sentido. Dependiendo de la naturaleza química de las cadenas laterales se puede clasificar a los aminoácidos en: apolares (G, A, V, L, I, M, F, P, W), polares no iónicos (S, T, N, Q, Y, C), ácidos (D, E) y básicos (K, R, H). En la figura 6 aparecen todos ellos representados.

¹⁵ Fields, G. B.; Lauer-Fields, J. L.; Liu, R.; Barany, G. Principles and practice of solid-phase peptide synthesis in synthetic peptides, *Oxford University Press: New York*, 2002; 93–219.

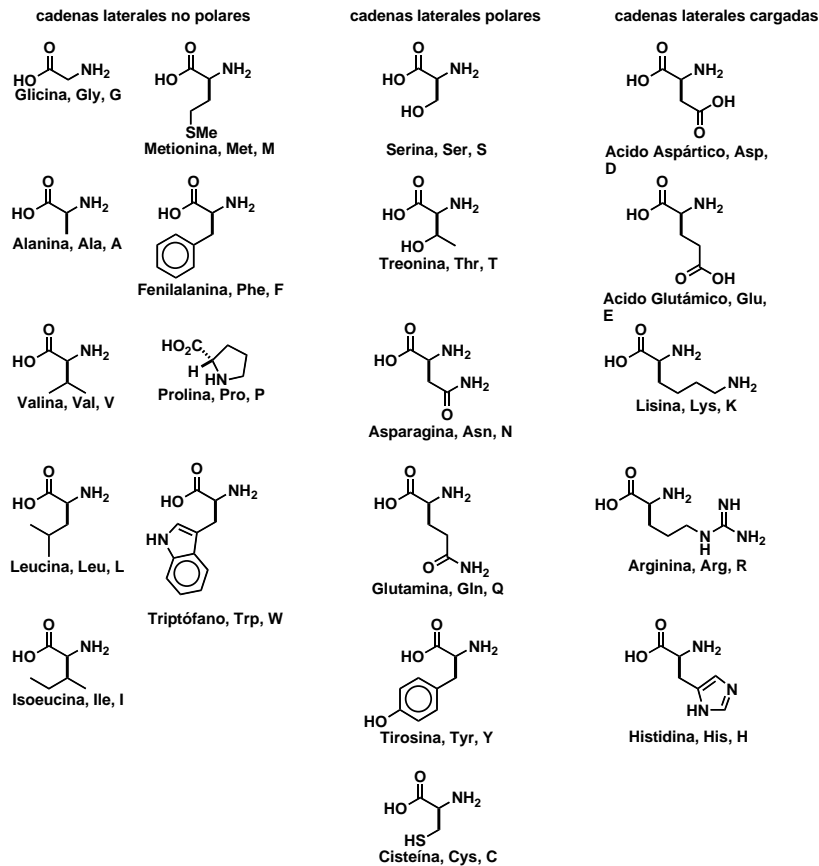


Figura 6. Estructura, nombre y código de una y tres letras de los aa más comunes.

Las proteínas se constituyen de un esqueleto polipeptídico en forma de una cadena lineal que se pliega para formar las estructuras tridimensionales más complejas. Estas influyen enormemente en su actividad biológica por lo que no solo se hace necesario conocer la estructura primaria de una proteína (su secuencia aminoacídica), sino también su estructura secundaria, terciaria e incluso cuaternaria, en el caso de que la proteína esté formada por varias subunidades.

Así, cuando la cadena polipeptídica se pliega sobre sí misma puede formar patrones del tipo: α hélice, lámina β , giros, *random coil*... Este conjunto de elementos estructural es lo que se conoce como estructura secundaria de la proteína.¹⁶ Estos elementos se caracterizan por poseer unos valores concretos de los ángulos de torsión ψ y ϕ según su dirección de giro alrededor del carbono α . La estructura terciaria hace referencia a la disposición espacial de los elementos de estructura secundaria. Algunas de las más conocidas son: el barril β , una estructura tubular formada por láminas β , estructura $\beta\beta\alpha$, formada por dos hojas β y una hélice α , etc. Por último, la estructura cuaternaria de las proteínas se presenta cuando diferentes unidades estructurales, también llamadas dominios, o diversas cadenas polipeptídicas se unen para formar una proteína multimérica más compleja y de mayor tamaño.

¹⁶ Pauling, L.; Corey, R. B. Atomic coordinates and structure factors for two helical configurations of polypeptide chains, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1951**, 37, 235-240.

2.3.2. Estructura secundaria α -helicoidal

Es importante recordar que la distribución de los residuos aminoacídicos del péptido, ya sean hidrofóbicos, hidrofílicos o cargados, es la que determina la conformación tridimensional del mismo (hélice α , lámina β , random coil...), su estado de agregación y la localización en la membrana biológica. Los péptidos helicoidales están estabilizados por enlaces de hidrógeno entre los oxígenos de los grupos carbonilo del enlace peptídico y los hidrógenos de las amidas que son parte del esqueleto del polipéptido. En la hélice α una vuelta contiene 3,6 aa y tiene una longitud de 5,4 Å.

Los CPPs helicoidales poseen un carácter anfifílico y presentan una cara altamente hidrofóbica, mientras que la otra puede ser catiónica, aniónica o polar. Esta conformación les permite maximizar las interacciones con la membrana plasmática.

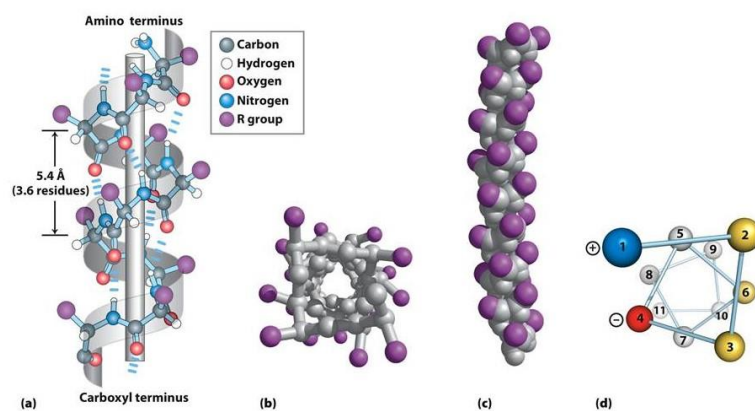


Figura 7. Características de las hélices α . Vistas lateral y superior, a) y b) en representación de palos y bolas, c) representación compacta y d) representación en roseta.

Por último, es importante mencionar, que el estudio de la estructura de los péptidos se puede determinar mediante la técnica de dicroísmo circular.^{17,18}

2.3.3. Enlaces disulfuro y su papel estabilizador

Un enlace disulfuro es un enlace covalente resultado de la reacción entre dos grupos sulfhidrilo (-SH), también llamados tiol, que se unen para formar un enlace S-S. Los grupos sulfhidrilo son característicos de la Cys y cuando dos de estos residuos reaccionan entre sí se forma un residuo de cistina. La reacción tiene lugar por oxidación de los grupos SH en presencia de oxígeno, liberándose dos protones de los residuos y quedando los dos átomos de S enlazados.

La repercusión que tiene este enlace en la estructura terciaria de las proteínas es muy importante. Tanto es así, que en muchos casos la función de las proteínas requiere del establecimiento de estos enlaces, como es el caso de los anticuerpos,¹⁹ que unen sus cadenas

¹⁷Kelly, M. S.; Jess, T. J.; Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta*, **2005**, *1751*, 119-139.

¹⁸Greenfield, Norma J. Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure. *Nat. Prot.*, **2007**, *6*, 2876-2890.

¹⁹Saerens, D.; Conrath, K.; Govaert, J.; Muyldermans, S. Disulfide Bond Introduction For General Stabilization of Immunoglobulin Heavy-Chain Variable Domains, *J. Mol. Biol.*, **2008**, *377*, 478-488.

célula de las especies reactivas de oxígeno y de los radicales libres, así como del estrés oxidativo generado en el Retículo Endoplasmático. Además su grupo tiol es de carácter nucleófilo, lo que le permite ejercer su función reductora. Los grupos tiol se mantienen en un estado de reducción a una concentración de aproximadamente 5 mM en las células animales. El glutatión reduce a cisteínas cualquier enlace disulfuro formado dentro de las proteínas citoplasmáticas, actuando como un donante de electrones.²¹

En el citosol, la concentración de GSH es relativamente alta (hasta 10 mM) y este se mantiene casi exclusivamente en su forma reducida gracias a la glutatión reductasa (GR), enzima que toma la energía del NADPH para mantener el glutatión inactivo, por lo que es muy raro que se formen enlaces disulfuro en este medio. Por tanto, sería lógico que tras la translocación directa de CPPs anfífilos cuya estructura poseyese algún puente S-S, se favoreciese la oxidación del glutatión a glutatión oxidado (GSSG) y la reducción del enlace exógeno para separar las cadenas polipeptídicas del CPP, obteniendo así residuos cisteínicos libres (grupos tiol). No obstante, el glutatión también es un indicador de los niveles de toxicidad en la célula, ya que más del 90% de este enzima se encuentra en estado reducido (GSH) y menos del 10% en estado oxidado (GSSG). Un aumento o disminución en esta proporción se considera síntoma de estrés oxidativo.²²

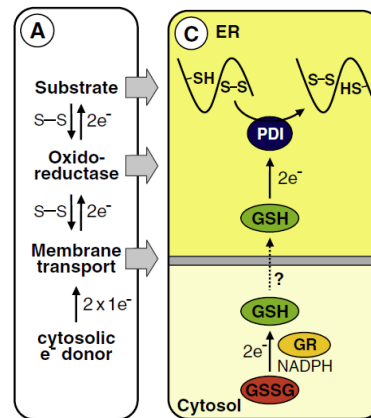


Figura 10. Esquema de la reducción de glutatión oxidado (GSSG) por la glutatión reductasa (GR), para formar glutatión reducido que será el encargado de activar la proteína disulfuro-isomerasa. Esta última es la encargada de catalizar la formación de enlaces disulfuro en el RE, de tal modo que las proteínas queden completamente plegadas y alcance su conformación final.

Recientemente se ha demostrado que el mecanismo de internalización de CPPs ricos en puentes disulfuro también depende de su tamaño, esto es, de lo larga que sea la cadena polipeptídica.²³ Así, los péptidos cortos prefieren la ruta endocítica, mientras que los péptidos más largos son transportados por translocación directa. Aquellos de tamaño medio sufren una rápida depolimerización en el citosol. Este hecho, es un factor determinante en la elección del tamaño de CPP según el destino intracelular deseado.²¹

²¹Gasparini G.; Matile S. Proetin delivery with cell-penetrating poly(disulfide)s. *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 17160 -17162.

²²Chakravarthi, S.; Jessop, C.E.; Bulleid, N. J. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO reports*, **2006**, 7, 271-275.

²³Chuard, N.; Gasparini, G.; Roux, A.; Sakai, N.; Matile, S. Cell-penetrating poly(disulfide)s: the dependence of activity, depolymerization kinetics and intracellular localization on their length. *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 64-67.

2.3.5. Síntesis peptídica en fase sólida

La síntesis orgánica en fase sólida fue desarrollada originalmente para la preparación de péptidos por R.B. Merrifield en 1963.²⁴ Esta técnica se basa en el uso de una resina, generalmente de poliestireno, en forma de pequeñas esferas que es insoluble en casi todos los disolventes. La utilización de disolventes adecuados hace que estas se solvaten (hinchén) por lo que los grupos reactivos del polímero pueden reaccionar con otras moléculas. La principal ventaja de la síntesis orgánica en fase sólida frente a la síntesis orgánica en disolución es que se puede forzar a que las reacciones sean cuantitativas en cada etapa, ya que es posible utilizar un exceso de reactivos. Gracias a ello, se pueden obviar procesos laboriosos de purificación y aislamiento de cada uno de los productos resultantes que se genera en cada etapa de la síntesis. Dicho exceso se puede eliminar fácilmente una vez finalizada la reacción por procesos simples de lavado y filtrado. Finalmente, el producto deseado se desprende del soporte, y su purificación y caracterización se llevan a cabo en disolución. En consecuencia, no hay que purificar cada intermedio sintético, lo que se traducirá en una reducción de tiempo y un aumento en la producción.

No obstante, esta técnica posee una desventaja notable. Cuando las reacciones no transcurren con rendimientos cuantitativos, esto es, cuando el residuo N-terminal de una de las muchas cadenas polipeptídicas en crecimiento adheridas a la resina se queda sin acilar después de la etapa de acoplamiento, el producto final estará contaminado por secuencias incompletas por dos motivos: a) El residuo puede ser exitosamente acoplado en el siguiente ciclo, resultando en un péptido suprimido, b) El residuo puede no ser acoplado subsecuentemente, lo que dará un péptido truncado.²⁵

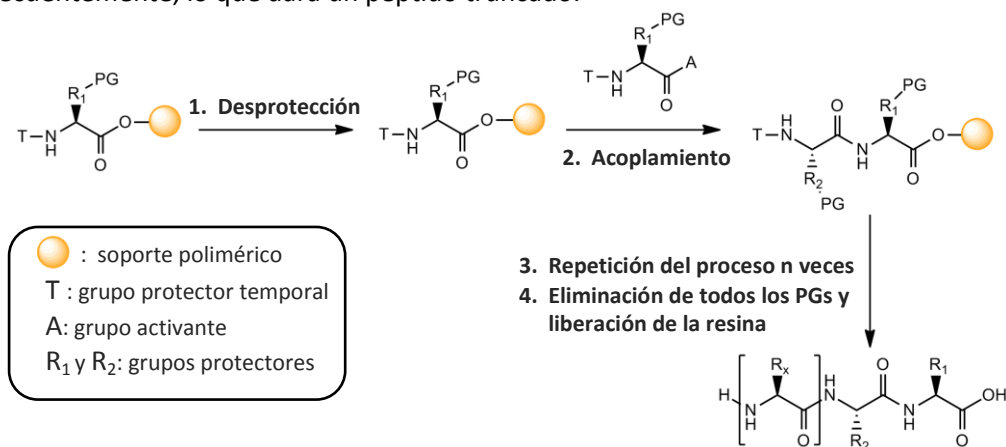


Figura 11. Esquema de la metodología para la síntesis en fase sólida. R₁ y R₂ son los grupos protectores ortogonales permanentes de las cadenas laterales de los aminoácidos a lo largo de toda la síntesis. T denota al grupo protector temporal utilizado en el extremo N-terminal.

Este problema puede subsanarse forzando a que cada etapa de acoplamiento se lleve a cabo de forma cuantitativa. Para este propósito suele usarse exceso del agente acilante,

²⁴ a) Merrifield, R. B.; *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2154. b) Merrifield, R. B., *Automated synthesis of peptides*, *Science*, **1965**, *150*, 178.

²⁵ a) Dick, F. *Acid cleavage/deprotection in Fmoc/t-Bu Solid-Phase Peptide Synthesis*. *Peptide Synthesis Protocols*, **1994**, *35*, 63-72. b) Pennington, M. W.; Byrnes, M. E. *Procedures to Improve Difficult Couplings*, *Peptide Synthesis Protocols*, **1995**, *35*, 1-16. c) Atherton, E.; Sheppard, R.C. *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, *Press: Oxford*, **1989**. d) Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giral, E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; *CRC Press: Boca Raton*, **1997**.

agentes de acoplamiento más reactivos, cambiar el disolvente e incluso repetir esta etapa más de una vez. Desafortunadamente, la síntesis tampoco puede controlarse con las técnicas utilizadas en disolución, sobre todo el RMN. Es por ello que se emplean otros métodos que permitan comprobar si la etapa no se ha completado en su totalidad con pruebas como el test de Kaiser²⁶ o el test TNBS.²⁷ El ensayo de TNBS es más fácil de realizar y de una sensibilidad casi equivalente a la del ensayo de Kaiser y solamente es utilizado para la detección de grupos amino primarios.

2.3.6. Síntesis peptídica en fase sólida mediante el método Fmoc

La metodología más empleada en la síntesis peptídica en fase sólida es la estrategia Fmoc/t-Bu²⁸ que emplea condiciones más suaves a las utilizadas en la estrategia Boc/Bzl, en la que el tratamiento continuado con TFA puede acabar por alterar los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y requiere de un tratamiento ácido fuerte, generalmente con HF al final del proceso. La capacidad del HF o del TFA para degradar las proteínas en las condiciones del desanclaje final, llevó a la introducción de un nuevo protector del grupo amino, basado en el 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), que requiere una acción de desprotección y liberación del péptido más suave. Este método utiliza una base, normalmente la piperidina (20 %) en DMF para la eliminación del grupo Fmoc, quedando el grupo amino libre y listo para acoplar un nuevo aminoácido activo. Otra ventaja es que el desanclaje del péptido de la resina y la eliminación de los grupos protectores ortogonales, solo requiere el empleo de un medio ácido, como el TFA.

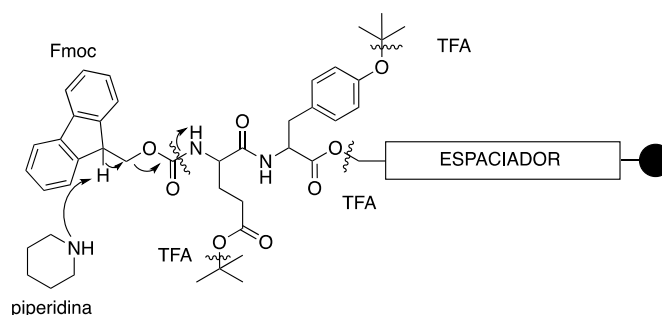


Figura 12. Reactivos y grupos protectores en la estrategia Fmoc/t-Bu. El grupo Fmoc se desprotege por tratamiento con una disolución del 20% de piperidina en DMF y las cadenas laterales se desprotegen simultáneamente a la liberación de la resina por tratamiento con el ácido trifluoroacético (TFA).

En cuanto a las resinas, la gran mayoría de ellas se pueden tratar con TFA para liberar el péptido sintetizado. De forma similar a la estrategia t-Boc, se usan dos resinas principalmente, dependiendo de la funcionalización deseada en el extremo C-terminal. La resina Wang es la más usada para péptidos con ácidos carboxílicos C-terminales, mientras que se utiliza la resina de Rink si se desea una amida C-terminal.^{29,30}

²⁶ 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*, 595-8.

²⁷ Swaminathan, K.; Sud, K. C., Rapid determination of total nitrogen in biological materials with chromic acid, *Anal. Biochem.*, **1976**, *74*, 260-2.

²⁸ Chang, W. C.; White, P. D., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University, New York, **2000**.

²⁹ Fields, G. B.; Noble, R. L.; Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl aminoacids, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.

³⁰ Alsina, J.; Albericio F., Solid-Phase synthesis of C-terminal modified peptides, *J. Pept. Sci.*, **2003**, *71*, 454-477.

La etapa clave de la síntesis de péptidos es la formación de los enlaces amida entre los aminoácidos. La formación eficiente de estos enlaces requiere la activación del grupo carboxilo, para lo que se han desarrollado diversas alternativas.³¹ El método más utilizado comúnmente se basa en la formación in situ de ésteres activos. Este método consiste en la activación del ácido en el mismo medio en el que está presente el grupo amino y sin aislar el intermedio reactivo generado. Esto permite llevar a cabo reacciones limpias y rápidas, incluso con aminoácidos de elevados impedimentos estéricos. Los reactivos encargados de la activación se denominan agentes de acoplamiento; algunos de los más utilizados se muestran en la **figura 13**.

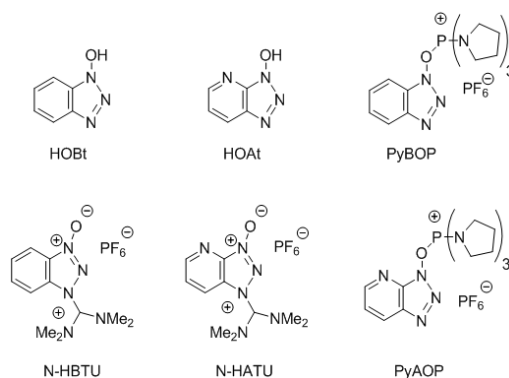


Figura 13. Los agentes de acoplamiento comúnmente utilizados en la síntesis en fase sólida.

Los distintos agentes de acoplamiento presentan diferentes reactividades. El mecanismo de la reacción de activación se ejemplifica en el siguiente esquema para el N-HBTU. En este mecanismo se genera el éster "activo" del HOBt que es el que reacciona posteriormente con la amina libre (**Figura 14**).

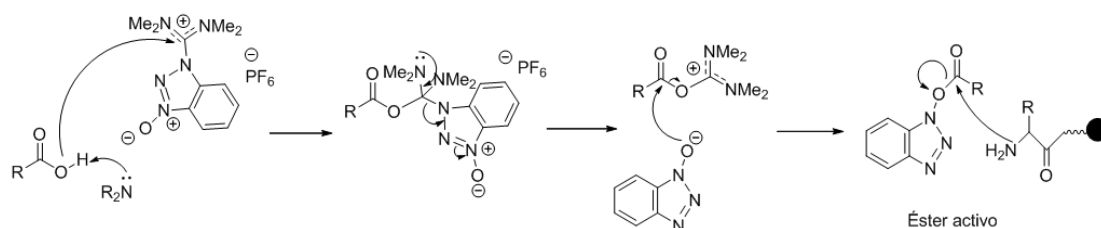


Figura 14. Mecanismo propuesto para la activación de un ácido, mediante la formación in situ del éster activo y su posterior acoplamiento con el grupo amino del aminoácido o péptido unido a la resina.

El desanclaje final de la proteína de la resina y la posterior eliminación de los grupos protectores permanentes son llevadas a cabo por el TFA en presencia de atrapadores de cationes. De este modo, el método Fmoc es ortogonal en dos direcciones, es decir, la desprotección del grupo amino y el desanclaje final de la resina.

³¹ El-Faham, A.; Albericio, F., Peptide Coupling Reagents, more than a Letter Soup, *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 6557-6602.

3. Objetivos

El propósito principal del presente proyecto es la síntesis de péptidos anfifílicos lineales dotados con grupos reactivos formados de enlaces dinámicos ortogonales, para su utilización en transporte de biopolímeros tales como DNA o RNA a través de bicapas lipídicas. De este modo, se diseñarán péptidos que contengan grupos capaces de formar oximas, hidrazonas o enlaces disulfuro. Estos péptidos de carácter lineal se han diseñado para que adopten una estructura secundaria helicoidal que favorecerá la presencia de una cara altamente hidrofóbica y una cara hidrofílica. En esta última también se encontrarán los anclajes necesarios para la formación de los enlaces dinámicos.

En primer lugar se sintetizará el péptido **HP1** (Helicoidal Peptide 1, **Figura 15**) con secuencia aminoacídica **LK_(Ox)RALK_(Hyd)RLK_(Ox)RAL**. Con esta síntesis será posible demostrar la compatibilidad de enlaces dinámicos con diferente estabilidad frente a la hidrólisis en la misma molécula peptídica. Mediante el uso de diversos grupos protectores ortogonales, será posible realizar los acoplamientos selectivamente.

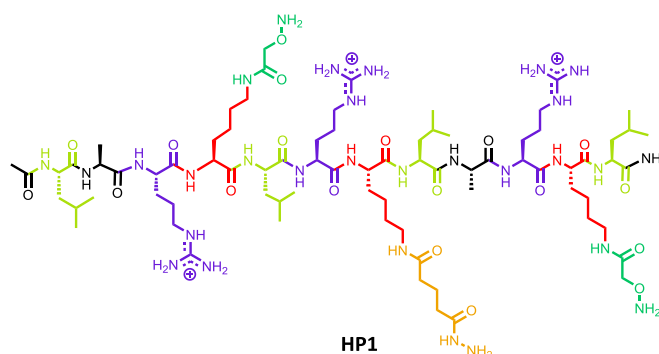


Figura 15. Representación del péptido **HP1**.

En un segundo objetivo más ambicioso se intentará incluir funciones dinámicas ortogonales dentro de un mismo esqueleto peptídico penetrante y se abordará mediante la preparación de un dímero helicoidal unido a través de un puente disulfuro. Para ello, se empleará a modo de péptido modelo uno péptido corto de 4 aminoácidos designado como **HP2** (**Figura 16**) con secuencia **K_(Ox)RCL**, con el que se comprobará la eficacia de la dimerización para poder emplear estos conocimientos en un péptido de mayor longitud: **LK_(Ox)RALRRLK_(Ox)KCL**, péptido nombrado como **HP3** (**Figura 16**). Los dímeros se presentan como potentes candidatos para el incremento del transporte a través de las bicapas lipídicas por su alto contenido en residuos catiónicos.

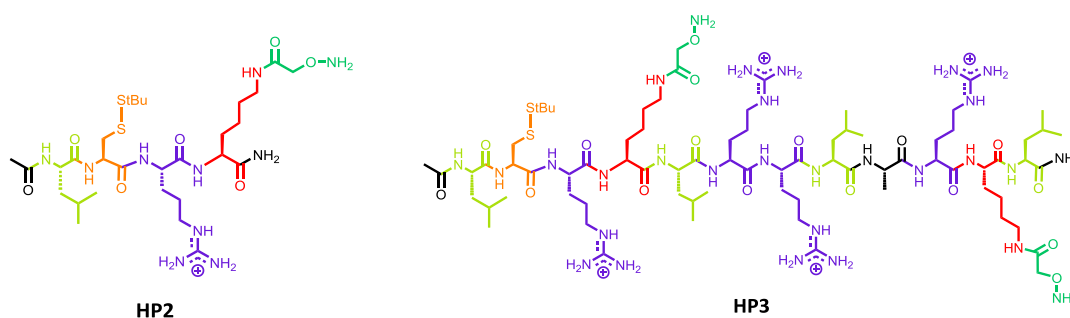


Figura 16. Representación de los péptidos **HP2** y **HP3**.

Posteriormente se estudiará la posibilidad de modificar estos péptidos a través de grupos reactivos dinámicos para incorporar nuevas funciones o propiedades que den acceso a nuevos transportadores de mayor complejidad estructural (**Figura 17**).

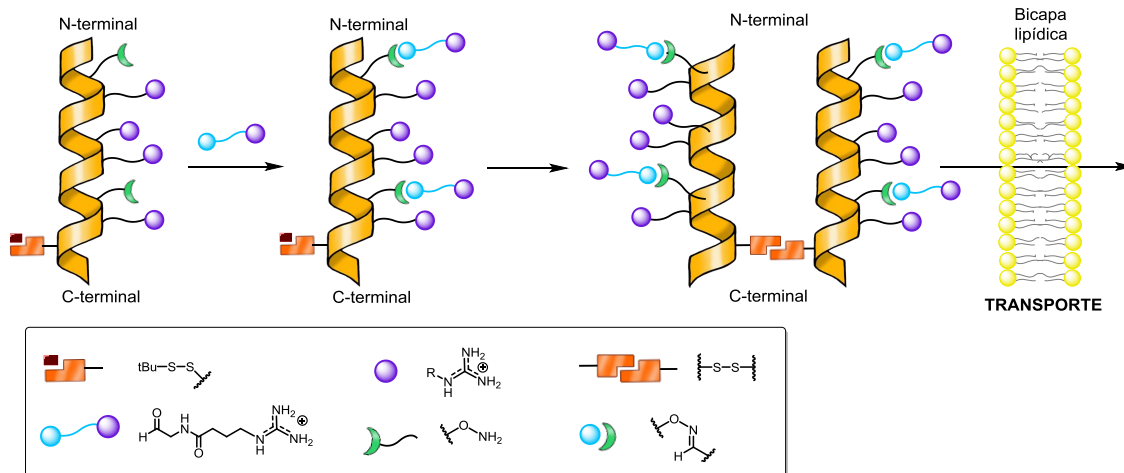


Figura 17. Representación esquemática del objetivo final de este trabajo.

Para cumplir este propósito, se acoplarán moléculas de T-Guanidinio unidas mediante enlace oxima a las hidroxilaminas libres de los péptidos **HP2** y **HP3**, obteniéndose los péptidos **HP4** y **HP5** (**Figura 18**) y seguidamente se eliminarán los grupos protectores S^tBu para obtener los péptidos **HP6** y **HP7** (**Figura 18**).

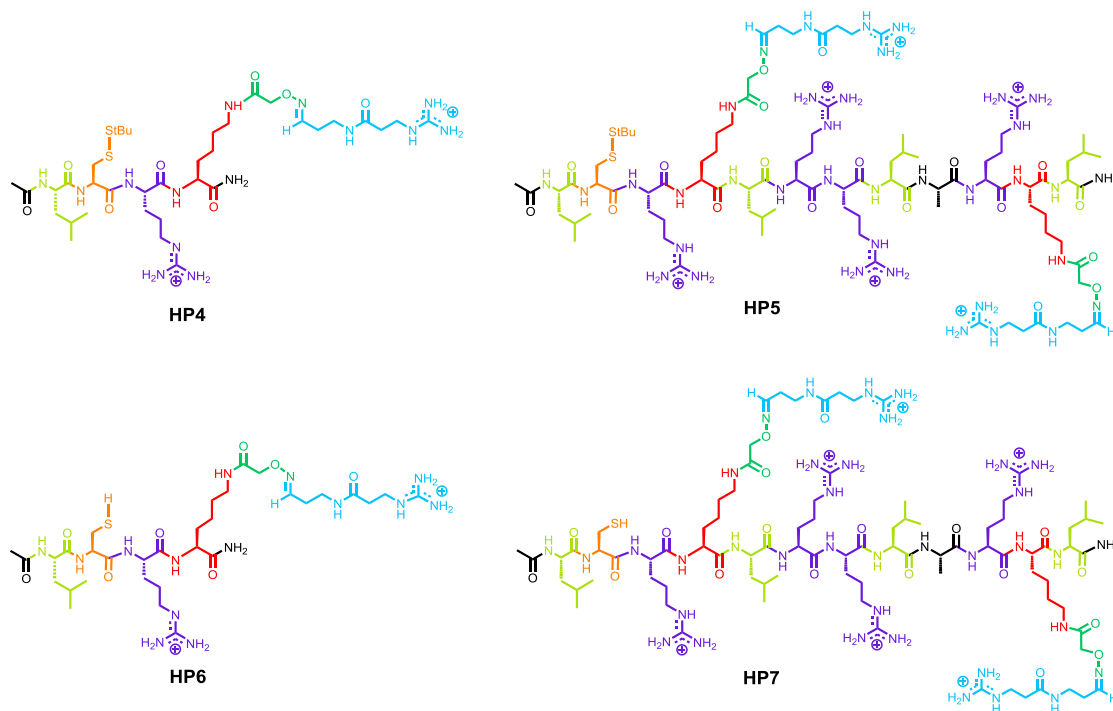


Figura 18. Representación de los péptidos **HP4**, **HP5**, **HP6** y **HP7**.

La capacidad de transporte de los péptidos **HP3** y **HP4** se estudiará en vesículas fluorogénicas, una vez que se incorporen los grupos guanidinio unidos mediante enlace oxima. Para llevar a cabo estos estudios se empleará un sistema de vesículas fluorescentes unilamelares rellenas de HPTS-DPX.

De todo el conjunto de experimentos se espera adquirir un mayor conocimiento sobre la posibilidad de sintetizar péptidos con diversos enlaces dinámicos que actúen simultáneamente, así como sobre las capacidades transportadoras de los péptidos unidos por puentes disulfuro.

4. Resultados y discusión

4.1. Diseño general de los péptidos

El diseño general de los tres péptidos anfifílicos con enlaces dinámicos sintetizados se muestra a continuación (**Figura 19**). En todos los casos se trata de moléculas que presentan tanto un carácter hidrofílico (catiónico), aportado por los residuos de Arg (pKa = 12.5) pues garantizan la protonación de los mismos a pH biológico (7.4); así como un carácter hidrofóbico aportado por los residuos de Leu y Ala. Estas estructuras serán, por tanto, idóneas para formar pares iónicos con los correspondientes fosfatos de DNA (pKa = 1) y formar complejos neutro-activos capaces de atravesar las membranas biológicas. Como elementos de anclaje para futuros acoplamiento con cadenas hidrofóbicas se tomaron las hidroxilaminas e hidrazidas. Los enlaces disulfuro también formaron parte de este singular diseño, facilitando la consecución de la estructura dimérica del compuesto final.

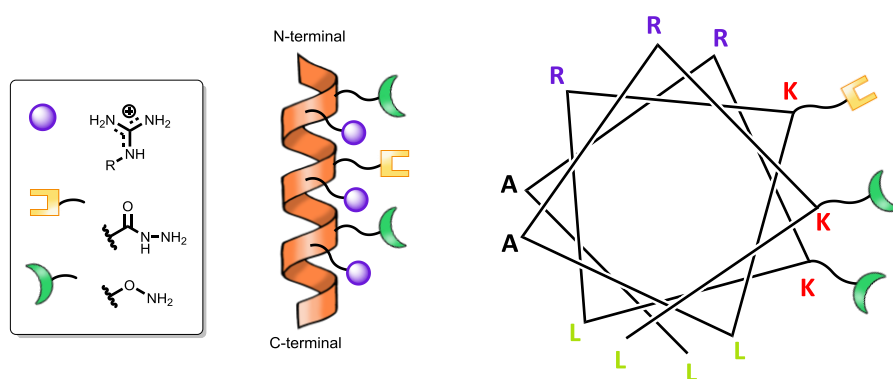


Figura 19. Diseño general del péptido transportador **HP1** con distintos anclajes para enlaces dinámicos.

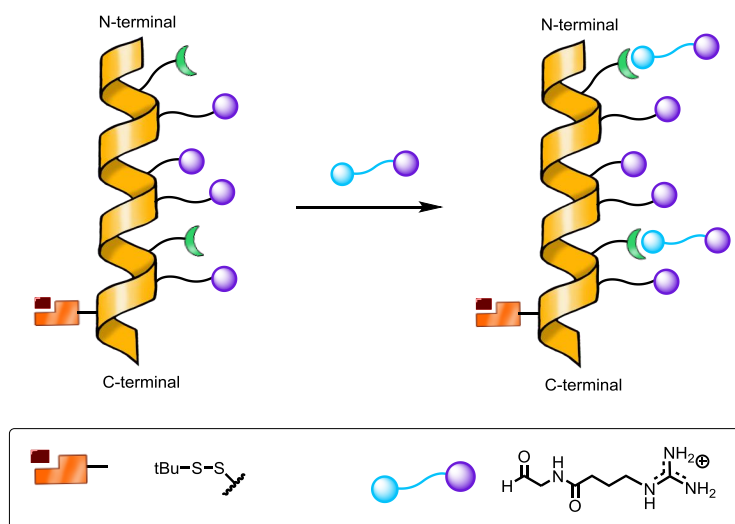


Figura 20. Reacción del péptido con el aldehído T-Guanidinio.

Como se ilustra en la **Figura 20**, el péptido diseñado permite la incorporación alternativa tanto de grupos funcionales hidrofóbicos como hidrófilos, mediante el tratamiento con

aldehídos adecuados y la correspondiente formación de enlaces oximas o hidrazonas. El potencial de estos grupos, reside en la posibilidad de una funcionalización rápida mediante la formación de enlaces covalentes reversibles (oximas) de forma que cualquier residuo hidrofílico podría ser incorporado con una síntesis rápida y sencilla. De este modo, en el caso de los grupos oxima, la solubilidad de los péptidos se vería incrementada, así como su capacidad para complejarse con más moléculas de DNA y poder incrementar el transporte de las mismas a través de vesículas fluorogénicas.

En los péptidos lineales diseñados se tuvo en cuenta que el conjunto de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos queden orientados en caras opuestas, generando estructuras helicoidales anfipáticas. La superficie hidrofóbica formaría el área de contacto con la membrana lipídica y la superficie hidrofílica con el DNA (**Figura 21**). Además el grupo O-Alquilhidroxilamina se situó en la interfase de ambas caras. El acoplamiento con un aldehído catiónico como el T-Guanidinio incrementa el carácter catiónico del diseño, aportando solubilidad al compuesto y facilitando su tratamiento.

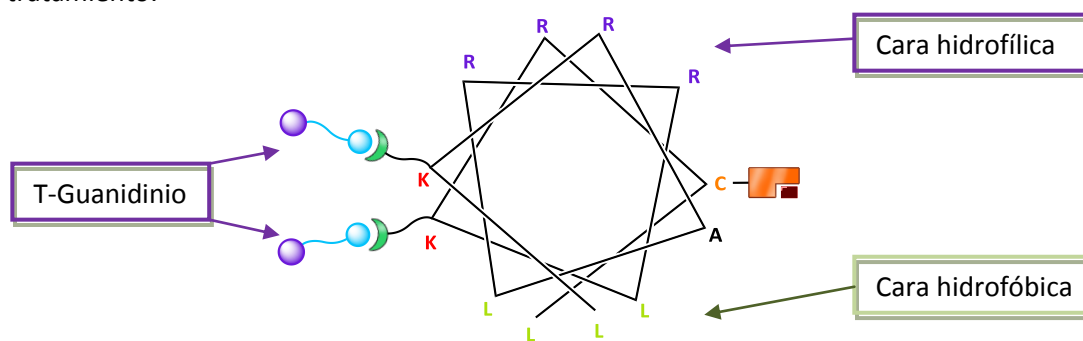


Figura 21. Representación en roseta del péptido HP5.

Por otro lado, el diseño del péptido planteado para la dimerización se muestra en la **figura 22** y la **figura 23**. La presencia de un puente disulfuro y la consiguiente dimerización del péptido dará lugar a cadenas peptídicas con elevado número de residuos catiónicos que redundará en un incremento del porcentaje de transporte de biopolímeros de interés a través de bicapas lipídicas. La gran ventaja de este método es que una vez internalizado el dímero podría ser reducido a sus monómeros tiólicos gracias a la acción del glutatión, facilitando la liberación del ácido nucleico transportado.

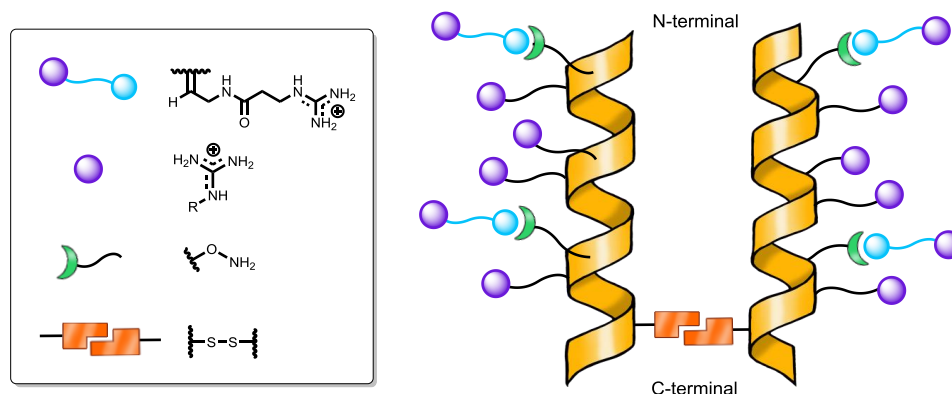


Figura 22. Representación esquemática del dímero de HP7.

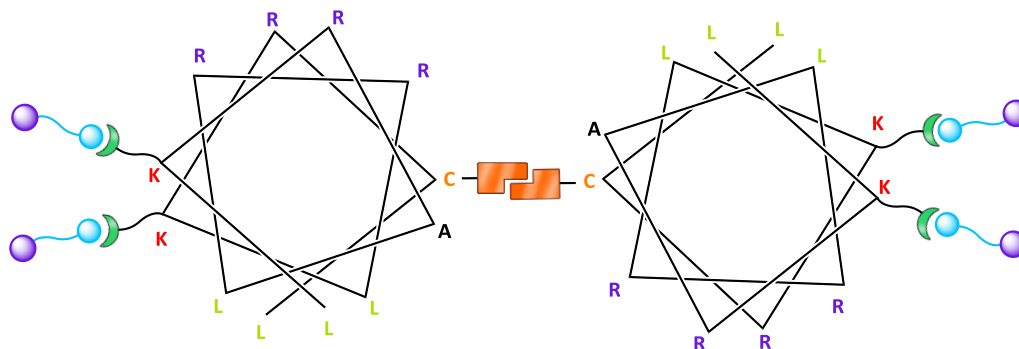


Figura 23. Representación en roseta del dímero de HP7.

4.2. Síntesis en fase sólida (SPPS), procedimiento general

En la síntesis peptídica, la resina seleccionada como soporte para el comienzo de la síntesis fue la Rink Amida (resina-(2',4'-dimetoxifenilFmoc-aminometil-fenoxi) pues se pretendía obtener los grupos amida como terminadores del péptido en el extremo carboxilo empleado en el anclaje. El primer aminoácido empleado en todos los casos fue el Fmoc-L-Leu-OH, que se unió al soporte sólido a través del grupo carboxilo. Una vez completada la secuencia deseada el péptido sintetizado se libera de la resina mediante el tratamiento con una mezcla de TFA:CH₂Cl₂:H₂O:TIS (90:5:2.5:2.5).

Los péptidos sintetizados mediante síntesis en fase sólida fueron **HP1**, **HP2** y **HP3** con secuencias **LK_(Ox)RALK_(Hyd)RLK_(Ox)RAL**, **K_(Ox)RCL**, **LK_(Ox)RALRRLK_(Ox)KCL** respectivamente.³² Para ello, se comenzó hinchando la resina en DMF y a continuación se trató con una disolución al 20% de piperidina en DMF durante 30 min para eliminar así el grupo flurenilo que posee la resina comercial. Los acoplamientos de los aminoácidos se llevaron a cabo formando *in situ* ésteres activos, proceso que requiere de la preactivación del aminoácido (4 eq) con N-HBTU (3.8 eq) disueltos en 1ml de DMF, mediante la adición de DIEA (0.13 ml, 0.195 M). Esta mezcla se agitó durante unos segundos y se vertió sobre la resina. Sobre la suspensión resultante se burbujeó una corriente de Ar a flujo constante durante 45 min. Transcurrido este tiempo la mezcla se filtró y la resina se lavó repetidas veces con DMF para eliminar el exceso de reactivos y sobre todo de DIEA, cuya presencia podría favorecer reacciones secundarias en los sucesivos acoplamientos. Después de los lavados, se comprobó la eficiencia del acoplamiento mediante un test TNBS,³³ repitiéndose el proceso en caso de no ser este cuantitativo. La siguiente desprotección del grupo amino se realizó en las mismas condiciones que la desprotección de la resina, mediante la adición de una mezcla al 20% de piperidina en DMF durante 15 min. Tras los sucesivos acoplamientos y desprotecciones llevados a cabo bajo las condiciones previamente descritas, se obtuvieron los péptidos de la longitud deseada: **HP1** con 12 aminoácidos, **HP2** con 4 y **HP3** con 12.

EL péptido de 4 aminoácidos servirá de prueba para comprobar la eficacia de la dimerización y poder así llevarla a cabo en una secuencia peptídica más larga como es la de **HP3**. Cabe destacar, que debido a la alta carga de la resina (0.71 mmol/g) fue necesario realizar

³² Los subíndices Ox e Hyd sobre la Lys se refiere a Lys que se han modificado a O-Alquilhidroxilaminas o hidrazidas, respectivamente.

³³ Kay, C.; Lorthioir, O.E.; Parr, N. J.; Congreve, M.; McKeown, S. C.; Scicinski, J. J.; Ley, S. V.; Solid-phase reaction monitoring - Chemical derivatization and off-bead analysis, *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, *71*, 110 - 118.

un *capping* después del primer acoplamiento en los péptidos **HP1** y **HP3**. De este modo, con una acetilación prematura, se interrumpe el crecimiento de las cadenas peptídicas cuyo grupo N-terminal no acopló correctamente el aminoácido. Para ello, se añadió una disolución 1:1 de 2,6-lutidina y anhídrido acético al reactor tras el acoplamiento del primer aminoácido estando la resina bien lavada. Este procedimiento también se realizó tras la consecución del acoplamiento del aminoácido número 12. De este modo añadimos sintéticamente el extremo C-terminal al péptido. La eficacia de la síntesis de cada péptido se estudió mediante la ruptura selectiva de una pequeña porción de la resina con la disolución de TFA anteriormente mencionada y el posterior análisis de la disolución final en HPLC-MS en fase reversa.

Los siguientes pasos sintéticos difieren para los dos péptidos de 12 aminoácidos **HP1** y **HP3** (y su análogo más corto **HP2**).

4.3. Síntesis del péptido lineal **HP1**, combinando hidrazidas e hidroxilaminas

En la síntesis de este péptido (**Figura 24**) fue necesario desproteger selectivamente los grupos protectores ortogonales de los residuos de Lys. De este modo, podrán acoplarse linkers de diferente naturaleza en posiciones precisas. Para ello, las Lisinas incorporadas poseían diferentes grupos protectores sobre el grupo amino de la cadena lateral: una un grupo Alloc, y otra un grupo Mtt. La primera desprotección llevada a cabo fue la del grupo -OAll (**Figura 24**, paso a). Se seleccionó una reacción catalizada por Pd(0) en presencia de un nucleófilo. Como comienzo, se generó *in situ* el catalizador a partir de una disolución de Pd(OAc)₂/PPh₃/NMM/fenilsilano en relación (0.3:1.5:10:10), y una vez esta disolución adquiere el color amarillo intenso característico del complejo de Pd(0) con ligandos trifenilfosfina se vertió sobre la resina y se agitó mecánicamente durante 12h, todo ello bajo atmósfera de Ar. Una vez terminada la reacción, la resina se lavó repetidas veces con diferentes disolventes. Este paso es de crucial importancia para evitar la aparición de productos no deseados resultado de la intervención del exceso de Pd. A continuación, se realizó el acoplamiento del linker de hidrazida. Para ello, se añadió al reactor una disolución de DIEA:HATU:N-Boc-hidrazida (24:5:4) y se dejó reaccionando 45 min.

Después de esta desprotección selectiva, se procedió con la desprotección del grupo Mtt del resto de residuos de Lys (**Figura 24**, paso b). Esta eliminación es posible mediante la adición al reactor de una disolución de DCM/HFIP/TFE/TIS (6.5:2:1:0.5) que posee un carácter ácido suave. El medio suavemente ácido favorece la eliminación selectiva de los grupos Mtt sin provocar la ruptura del péptido de la resina y sin interaccionar con el grupo hidrazida. Posteriormente se acopló el ácido[(terc-Butoxicarbonil)aminooxi] acético junto con N-HATU y DIEA para anclar los grupos hidroxilamina a las aminas libres de las Lys ahora desprotegidas. Después de cada etapa de eliminación del grupo protector y acoplamiento se analizó una porción de resina mediante HPLC-MS en fase reversa.

La última etapa del proceso sintético fue la separación del péptido del soporte sólido. La metodología comúnmente utilizada en este proceso es por medio de una disolución ácida formada por TFA, DCM, H₂O y TIS en una relación (90:5:2.5:2.5) (**Figura 24**, paso c). Para ello se empleó aproximadamente 1ml de esta disolución por cada 40 mg de resina. Después de una agitación mecánica a temperatura ambiente la mezcla se filtró y la resina se lavó con TFA. La disolución resultante se precipitó con éter etílico frío. El precipitado se purificó por HPLC en

fase reversa, usando como eluyente $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (0.1%TFA). La caracterización del péptido mediante HPLC-MS y ^1H -RMN se encuentra en la **pág. 43**.

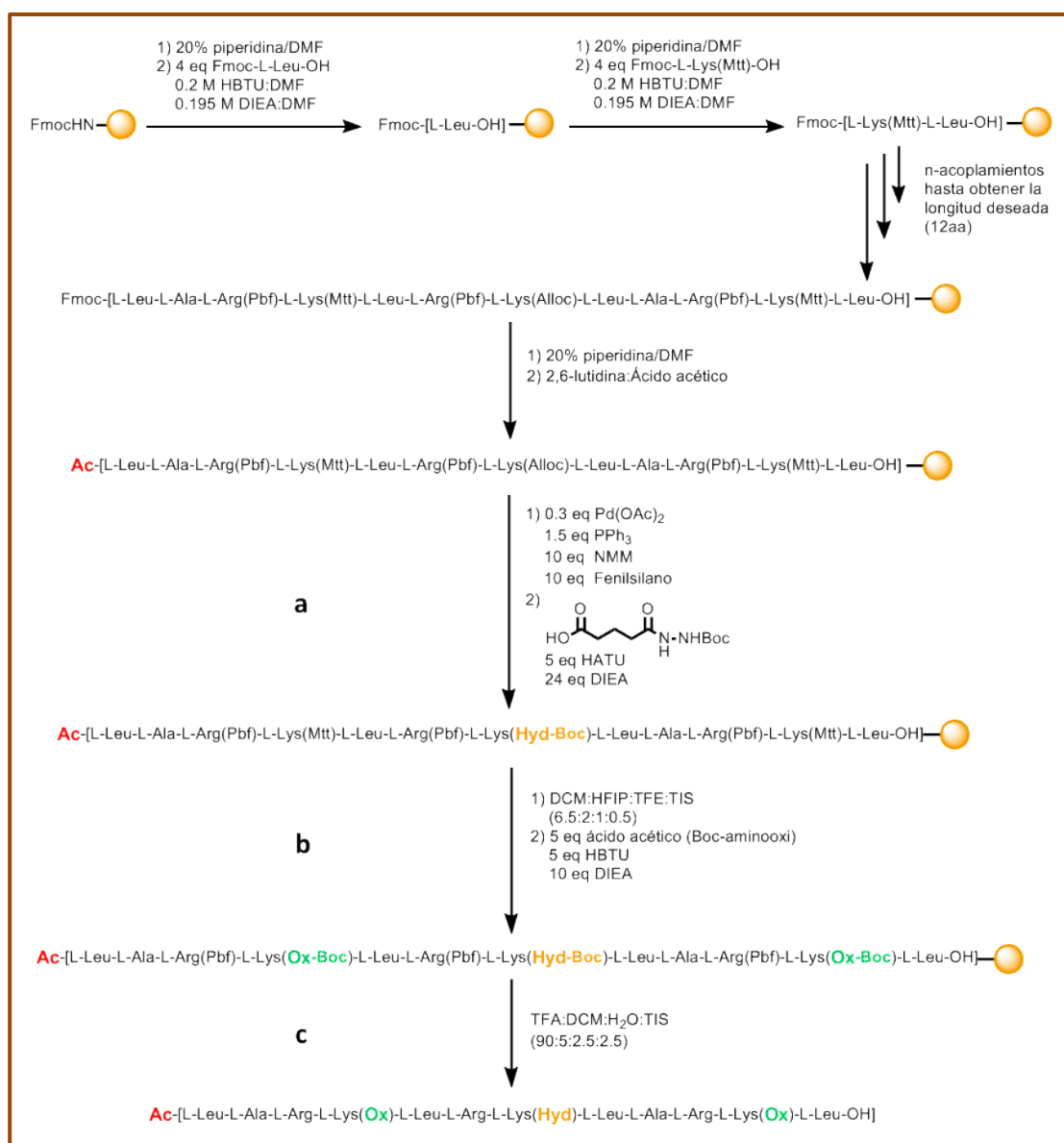


Figura 24. Esquema de la síntesis total del péptido lineal **HP1**.

4.4 Síntesis de los péptidos conteniendo enlaces dinámicos ortogonales disulfuro e hidroxilamina

Una vez comprobado que era posible la inclusión de enlaces dinámicos hidrazida e hidroxilaminas sobre el mismo esqueleto peptídico, se decidió abordar la preparación más ambiciosa que pretendía sintetizar péptidos helicoidales que contengan residuos dinámicos ortogonales del tipo disulfuro e hidroxilamina.

4.4.1. Protocolo para la síntesis del péptido HP3

En un primer momento, se preparó el péptido **HP3** con secuencia $LK_{(Ox)}RALRRLK_{(Ox)}KCL$, donde se incluían dos Lys(Mtt), residuos a los que se anclan las hidroxilaminas, y un residuo de Cys protegido con el grupo S^tBu . De este modo, sería posible formar un dímero helicoidal gracias a la desprotección del grupo S^tBu y posterior oxidación de los grupos tiol formados.

La secuencia sintética seguida fue similar a la ya descrita para **HP1**, realizando en primer lugar la síntesis del péptido lineal utilizando la metodología Fmoc/t-Bu (**Figura 25**). Seguidamente se incorporó la O-Acetilhidroxilamina en los residuos de Lys desprotegidos y tras la consiguiente purificación del péptido se trató de oxidar mediante métodos ya descritos en la bibliografía (**Figura 26**).

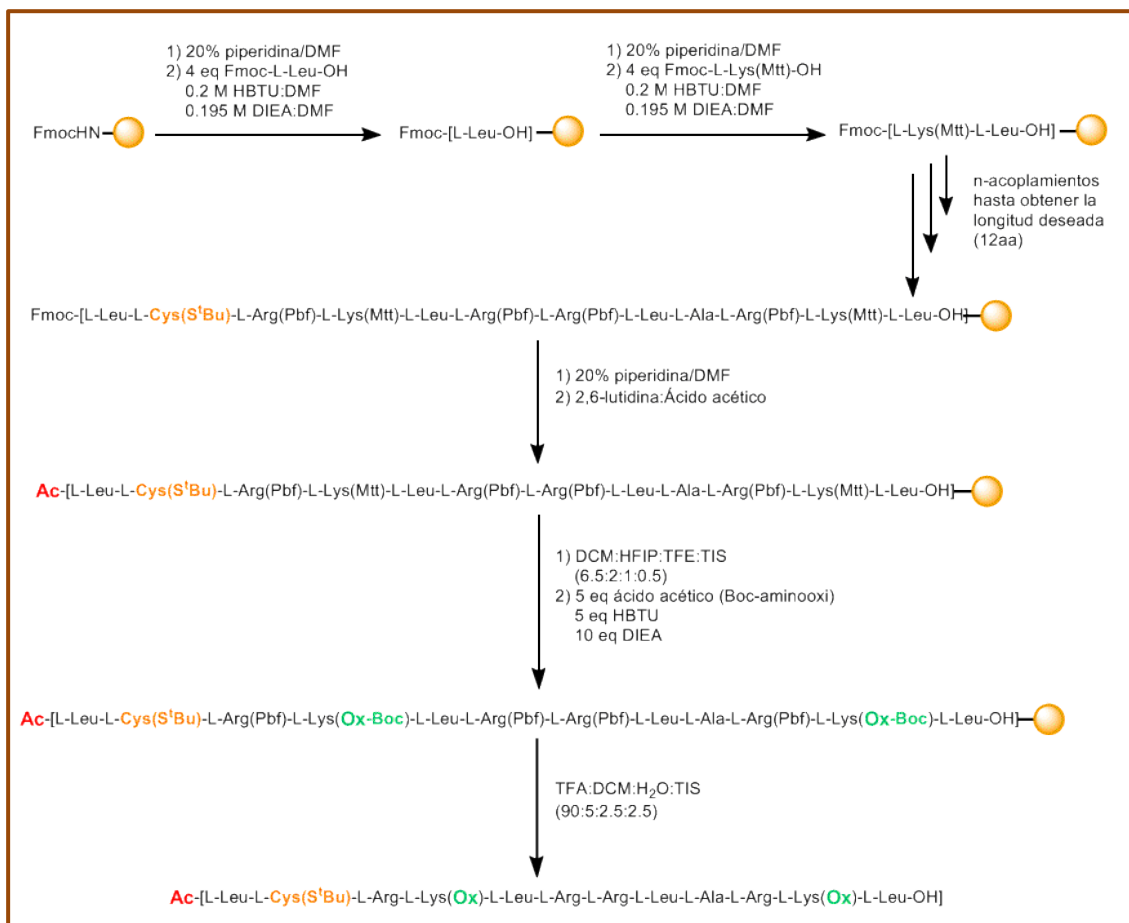


Figura 25. Esquema sintético de la síntesis de HP3.

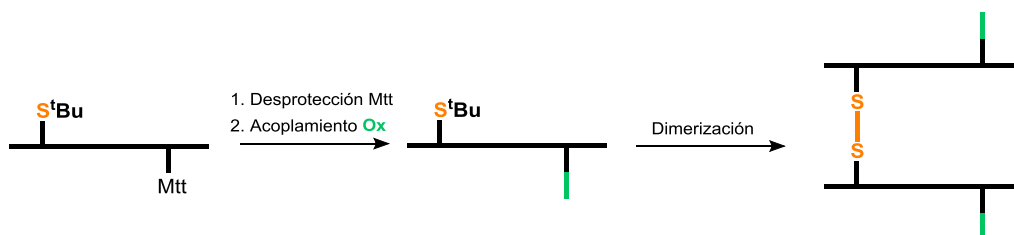


Figura 26. Esquema sencillo del protocolo empleado inicialmente para la obtención del dímero.

Sin embargo, varios intentos de dimerizar en presencia de hidroxilaminas libres condujeron a la obtención de HPLCs extremadamente complejos, de los cuales no se pudo aislar ni el producto deseado ni extraer información útil sobre los problemas encontrados. Ninguno de los picos que aparecen a tiempos de retención 17.1 min, 19.6 min y 25.4 min se corresponde con el producto de partida ni con el compuesto final (**Figura 27**). Tampoco se encontró correspondencia alguna con el resto de reactivos de la reacción. La elevada concentración del péptido tras su liberación de la resina y la baja solubilidad presentada fueron las causas de la obtención de un cromatograma con tres picos que no fueron identificados.

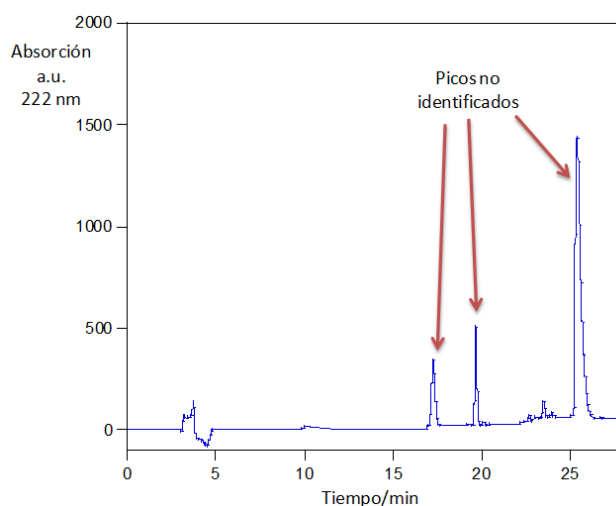


Figura 27. Cromatograma del primer intento de dimerización de **HP3**.

Por lo tanto, se decidió introducir un conector (también llamado *linker*) dinámico en los grupos hidroxilaminas previamente a la dimerización. De esta forma, se podría realizar la oxidación de los tioles sin sufrir problemas derivados de la presencia de los grupos de hidroxilamina (**Figura 28**) y se conseguiría aumentar la solubilidad del producto final (**Figura 29**).

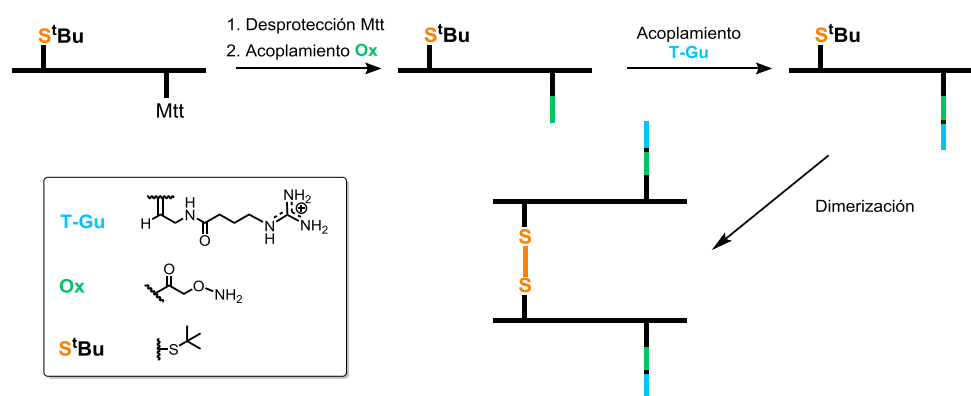


Figura 28. Nuevo protocolo de síntesis. Finalmente, fue con el que se pudo proceder con la dimerización.



Figura 29. Fotografía de las disoluciones obtenidas tras la desprotección del grupo S^tBu sin previo acoplamiento del aldehído T-Guanidinio (izquierda, protocolo inicial) y desprotección del S^tBu tras el acoplamiento del T-Guanidinio (derecha, segundo protocolo). Se observa un claro incremento en la solubilidad del péptido por la desaparición de la turbidez de la disolución final.

Antes de proseguir con este ambicioso objetivo, se decidió emplear un péptido más pequeño y sencillo para ensayar la ruta diseñada. Por lo tanto, se preparó el péptido **HP2** que permitiría ensayar las reacciones que se llevarían a cabo en el péptido más complejo de 12 aa.

4.4.2. Síntesis del péptido HP2

A continuación, se presentan los esquemas sintéticos para la síntesis de **HP2**, con secuencia $K_{(Ox)}KCL$. La síntesis en fase sólida transcurrió del modo previamente descrito en la **pág. 22** y es análogo al de **HP3**. Una vez purificado el péptido **HP2**, este se modificó mediante la adición del aldehído T-Guanidinio, según el protocolo sintético planteado en la **figura 30**.

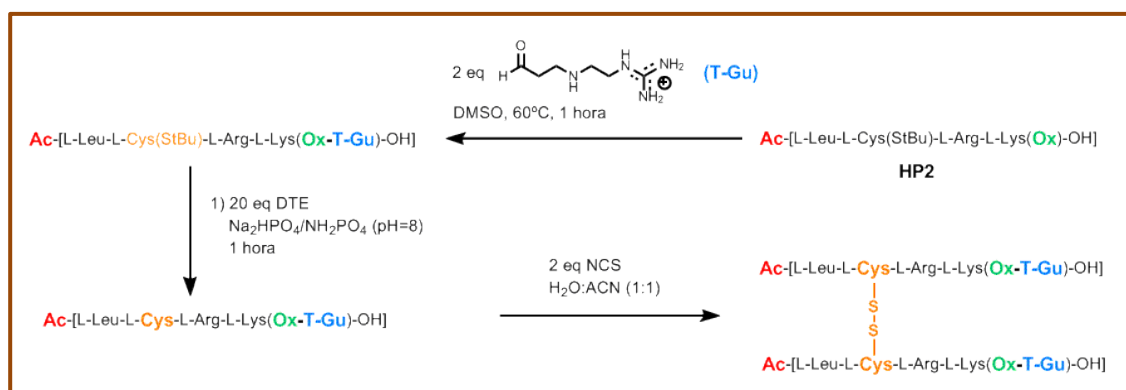


Figura 30. Esquema sintético de las reacciones llevadas a cabo con el péptido **HP2**, ya desligado de la resina y purificado, para la optimización de la dimerización.

4.4.2.1. Acoplamiento del aldehído T-Guanidinio. Síntesis de HP4

El aldehído propuesto para reaccionar con el péptido **HP2** es el T-Guanidinio (*Guanidinium tail*), que recibe este nombre por poseer un grupo guanidinio en el extremo opuesto de la cadena del aldehído. Para llevar a cabo el acoplamiento se añadieron 2 eq de T-Guanidinio por cola de hidroxilamina, sobre el péptido disuelto en DMSO, tanto en el caso de **HP2** como posteriormente, tras la optimización, en el de **HP3**. Esta mezcla se calentó a $60^{\circ}C$ y se agitó durante 1 hora.

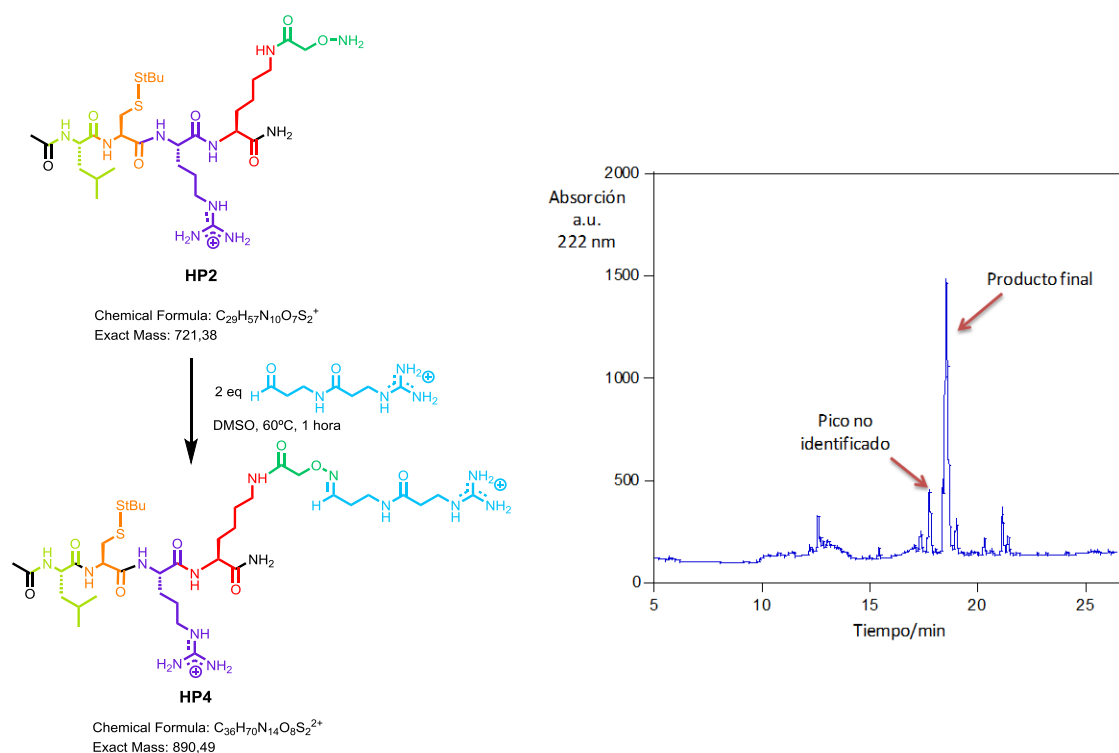


Figura 31. Reacción de acoplamiento del aldehído al péptido **HP2** y cromatograma en el que se muestra la aparición del producto final (**HP4**) y la desaparición del compuesto inicial.

La evolución de ésta se siguió en FR-HPLC [Nucleosil 100-7 C18, H_2O (0.1% TFA)/ CH_3CN (0.1% TFA), 95:5 \rightarrow 5:95 (0 \rightarrow 5 min), 95:5 \rightarrow 5:95 (5 \rightarrow 35 min), 0:100 (>35 min)]. En el cromatograma de la mezcla de reacción no se encontró rastro del producto de partida, apareciendo dos picos que presentaban una absorbancia elevada: uno a T_R 17.7 min y otro con T_R 18.5 min. La masa de este último pico coincidía con la del pico del producto del acoplamiento ($M = 890$ uma).

Con la adición del T-Guanidinio se persigue aumentar el carácter hidrofílico de la molécula y mejorar el transporte de biopolímeros en vesículas fluorogénicas. Al poseer una elevada carga catiónica, la formación de complejos neutros con moléculas polianiónicas se verá favorecida, así como la translocación a través de las bicapas lipídicas.

A pesar del bajo rendimiento de la reacción (30%), se decidió continuar con el protocolo de síntesis previamente planteado, pues el producto de partida se había consumido totalmente y la cantidad de compuesto obtenido tras la purificación era suficiente para iniciar la desprotección del residuo de Cys. Todos los datos sobre la caracterización del compuesto por HPLC-MS y 1H -RMN se encuentran en la **página 45**.

4.4.2.2. Desprotección del residuo cisteína. Síntesis de HP6

El siguiente paso fue eliminar el grupo S^tBu del residuo de Cys en **HP2**. Para ello se añadió una disolución de 20 eq de DTE en tampón Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (desoxigenado) sobre el péptido liofilizado. La mezcla se mantuvo en agitación mecánica durante 1 hora. Con la desprotección se consiguió obtener tioles libres en los residuos de Cys, siendo estos grupos susceptibles de sufrir oxidación en presencia de un agente oxidante y formar los deseados enlaces disulfuro.

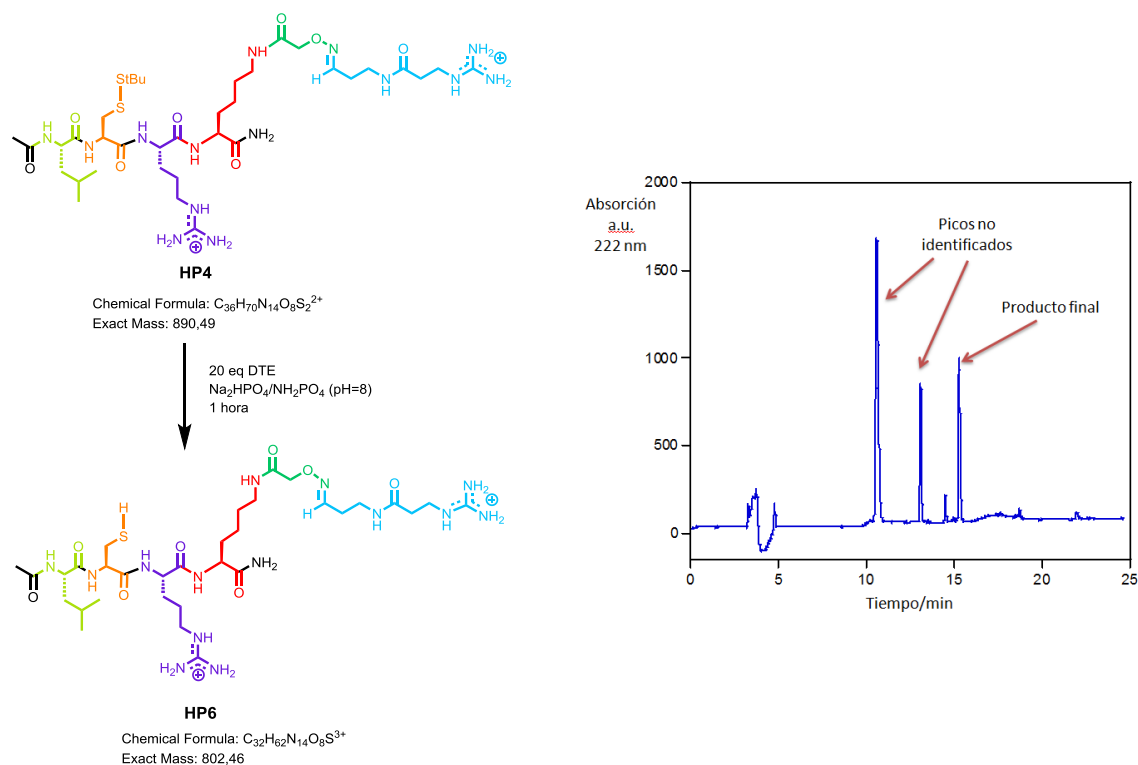


Figura 32. Reacción de desprotección del grupo S^tBu que se encuentra protegiendo al tiol del residuo de cisteína y cromatograma de seguimiento de la reacción de síntesis de **HP6**.

En la **figura 32** se muestra el cromatograma de la mezcla de reacción tras 1 hora de agitación. Este se obtuvo empleando las mismas condiciones cromatográficas que en el seguimiento de la síntesis de **HP4**. En él se pueden vislumbrar tres picos a T_R 10.5 min, T_R 13.1 min y T_R 15.3 min respectivamente. Los dos primeros no se pudieron identificar, mientras que el tercero y último se corresponde con el producto final de la desprotección del residuo de Cys. Por otro lado, es importante comentar que el pico del péptido de partida (T_R 18.5 min) había desaparecido. La asignación de los picos se llevó a cabo tomando un alícuota de cada uno de ellos y realizando un análisis en HPLC-MS. También es visible la reducción en el tiempo de retención del compuesto final con respecto al de partida. Esto es consecuencia de la reducción del carácter apolar de la molécula al eliminar el S^tBu y aparecer en su lugar un grupo tiol (más hidrofílico). El péptido no se quedará tan adherido a la fase sólida de la columna y eluirá antes. La caracterización de la molécula se complementó con estudios de 1H -RMN, donde se hace visible la desaparición de la señal singlete del S^tBu (**pág. 46**).

Gracias a que el compuesto inicial había reaccionado completamente, se optó por continuar con la síntesis del dímero.

4.4.2.3. Dimerización del péptido **HP6**³⁴

En base a que la desprotección del S^tBu fue significativa y concluyente para continuar con la dimerización de **HP6**, se procedió a preparar los reactivos para la misma. El método de oxidación utilizado emplea N-Clorosuccinimida como agente oxidante.

³⁴Postma, T. M.; Albericio, F. N-Chlorosuccinimide, an efficient peptide disulfide bond forming reagent in aqueous solution, *RSC Advances*, **2013**, *3*, 14277-14280.

De este modo, se disolvieron 2 eq de N-Clorosuccinimida en 2 ml de una mezcla 1:1 de H₂O:CH₃N y se añadieron sobre una disolución del péptido en 1:1 H₂O:CH₃N (0.5 ml), dejando reaccionar la mezcla en agitación mecánica unos 15 min.

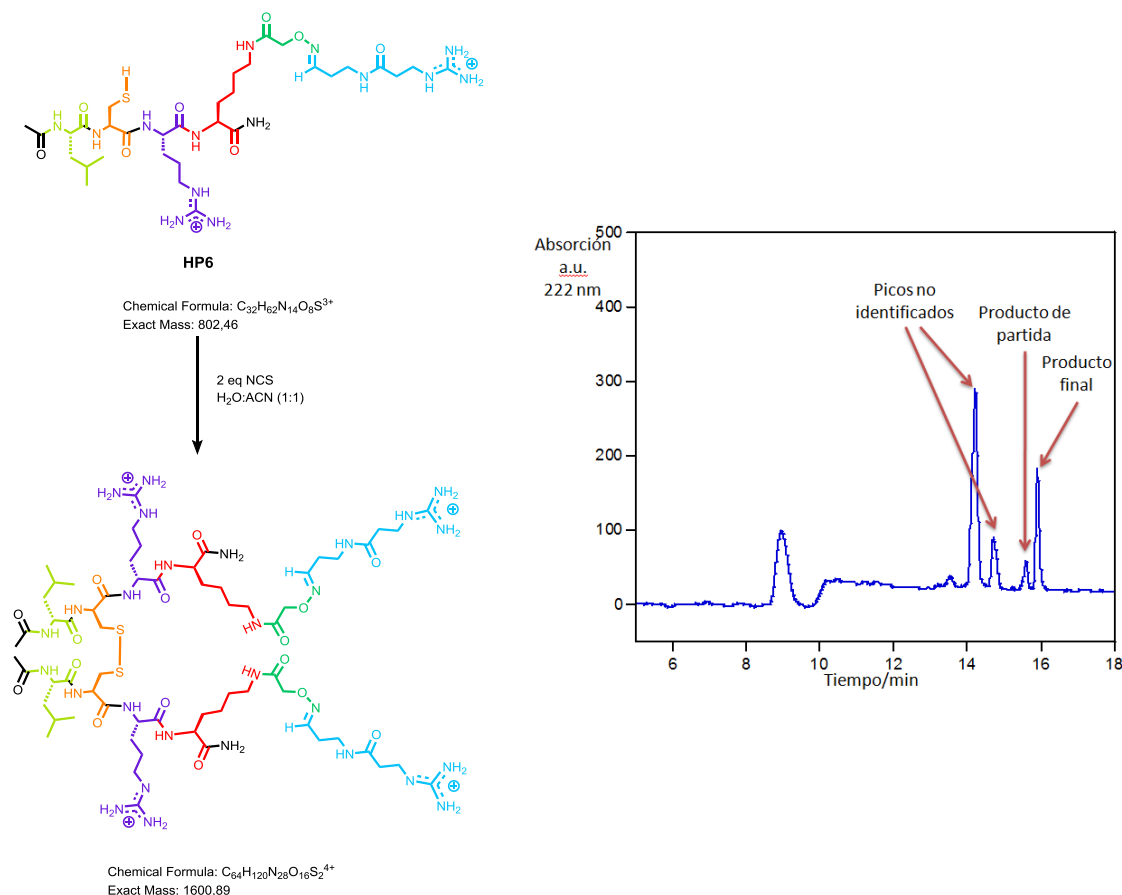


Figura 33. A la izquierda reacción de dimerización de **HP2**. A la derecha cromatograma de seguimiento de la reacción.

El proceso se siguió nuevamente mediante HPLC/MS, HPLC en fase reversa, FR-HPLC [Nucleosil 100-7 C18, H₂O (0.1% TFA)/CH₃CN (0.1% TFA), 95:5 (0→5 min), 95:5 → 5:95 (5 → 35 min), 0:100 (>35 min)], obteniéndose un cromatograma que presentaba 4 picos mayoritarios que aparecían a tiempos de retención: 14.2, 14.7, 15.6 y 15.9 min. La presencia de Acetonitrilo en el medio de reacción provoca una pequeña variación en los tiempos de retención de la sustancia de partida. Como consecuencia, todos los compuestos se eluyen antes y los tiempos de retención disminuyen. El pico a T_R 15.9 min presenta una masa que coincide con la del dímero (M = 1600 uma).

Tras la separación se tomó una alícuota de cada pico y se volvió a inyectar en HPLC-MS para obtener su espectro de masas. No se pudieron identificar los dos primeros picos, pero sí se pudo identificar el pico a T_R 15.9 min como el pico del dímero. Mientras que para el pico con T_R 15.6, se pudo comprobar que su espectro de masas se correspondía con el del monómero, producto de partida en la reacción, pues se observa la pérdida de dos unidades de masa.

Durante la separación y caracterización del producto puro se encontraron varios problemas. La separación de impurezas y producto final se hacía más ardua cuanto más diluida

se hallaba la muestra. Por otro lado, se encontró que la muestra presentaba baja ionización en ESI-MS, pues en muchos casos sólo se observaba ruido en las medidas. Es probable que esto se deba a la elevada masa del compuesto y a que la fuente de ionización empleada no posea la potencia suficiente para fragmentar su secuencia en iones más pequeños. Estos inconvenientes no facilitaron la caracterización, que no pudo ser completa, pues la cantidad de producto final no era suficiente como para poder realizar un estudio de $^1\text{H-RMN}$ concluyente. Sin embargo, sí se pudo afirmar la presencia del péptido mediante análisis en HPLC-MS (resultados y caracterización completa en la **pág. 47**).

4.4.3. Síntesis del péptido HP3

Una vez comprobada la viabilidad de la ruta sintética, se decidió abordar la más compleja preparación del dímero del péptido helicoidal **HP3**.

La síntesis en fase sólida de este péptido se desarrolló con el mismo procedimiento que para **HP1** y **HP2**, con la salvedad de que la secuencia peptídica de **HP3**, de 12 aa de longitud, posee un diseño diferente: $\text{LK}_{(\text{Ox})}\text{RALRRLK}_{(\text{Ox})}\text{KCL}$. Como se comentó con anterioridad, el protocolo sintético seguido para la dimerización de **HP3** incluía como paso previo a la desprotección del grupo S^tBu el de anclaje del linker dinámico T-Guanidinio para incrementar la solubilidad del péptido en H_2O y eliminar la presencia de grupos hidroxilamina libres.

En este caso, se pudieron realizar con éxito tanto la síntesis del péptido lineal, como la incorporación de las O-Acetilhidroxilaminas, el acoplamiento del linker T-Guanidinio (**HP5**) y la desprotección de los residuos de Cys (**HP7**). Sin embargo no se pudo obtener el dímero final, puesto que desde un primer momento, los pequeños problemas aparecidos durante la optimización de la síntesis de **HP2** se magnificaron, desencadenando en rendimientos bajos, y pérdida de compuesto, por lo que la caracterización del dímero final se hizo imposible (todos los datos sobre rendimientos y HPLCs de las reacciones se encuentran en las **págs. 48, 49 y 50**).

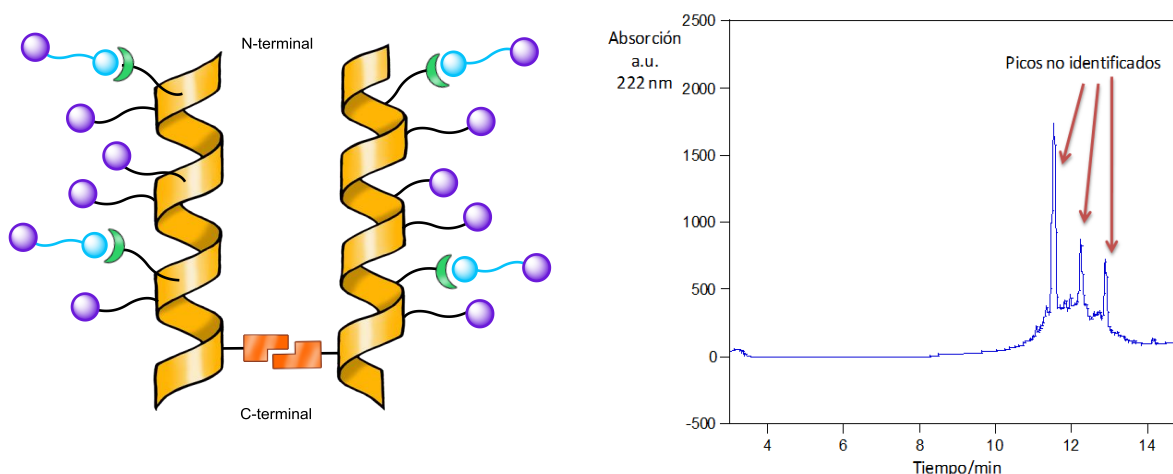


Figura 34. Cromatograma tras la reacción de dimerización para el péptido **HP7**.

4.5. Estudio de la estructura secundaria

Una vez sintetizados los péptidos deseados se procedió a realizar un estudio de su estructura secundaria mediante dicroísmo circular. Esta técnica permite conocer la estructura secundaria de los péptidos gracias al empleo de un rayo de luz circularmente polarizada. Los ensayos se realizaron en dos medios diferentes: TFE y H₂O Milli-Q. Las concentraciones finales se ajustaron a 200 μ M para ambos disolventes. Las medidas se realizan observando la variación de $[\theta]_{MRT}$ frente a diferentes longitudes de onda a distintos intervalos de temperatura (de 10°C a 60°C). Según la forma de las bandas presentadas se puede deducir el plegamiento del péptido, tal como: hélice- α , lámina- β o random coil.

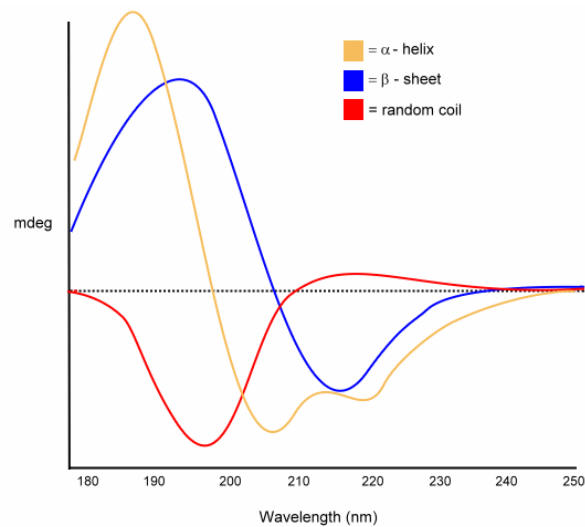


Figura 35. Interpretación de las gráficas de dicroísmo circular.

A continuación se presentan los resultados de las gráficas de dicroísmo para **HP1 (Figura 36)** y **HP3 (Figura 37)**. En todas ellas es posible observar la presencia de una banda positiva entre 180 nm y 190 nm, y dos bandas negativas a 208 nm y 222 nm aproximadamente. Esta disposición de bandas es la idónea para confirmar que ambos péptidos poseen cierto carácter helicoidal tanto en H₂O como en TFE. También es importante remarcar una pequeña pérdida de helicidad al aumentar la temperatura en agua y algo mayor en TFE, un resultado lógico puesto que el calor es un factor desnaturalizante de las proteínas, que provoca la pérdida de su conformación estructural.

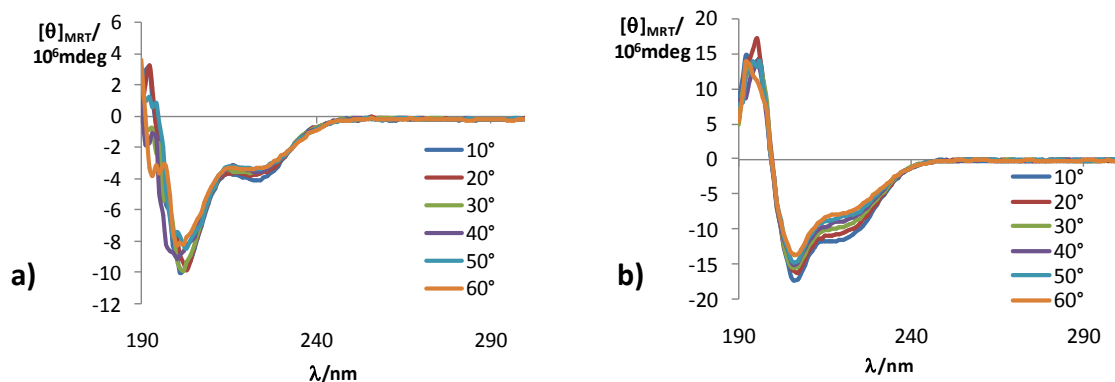


Figura 36. Gráfica de dicroísmo circular para **HP1** en a) H₂O Milli-Q y b) TFE.

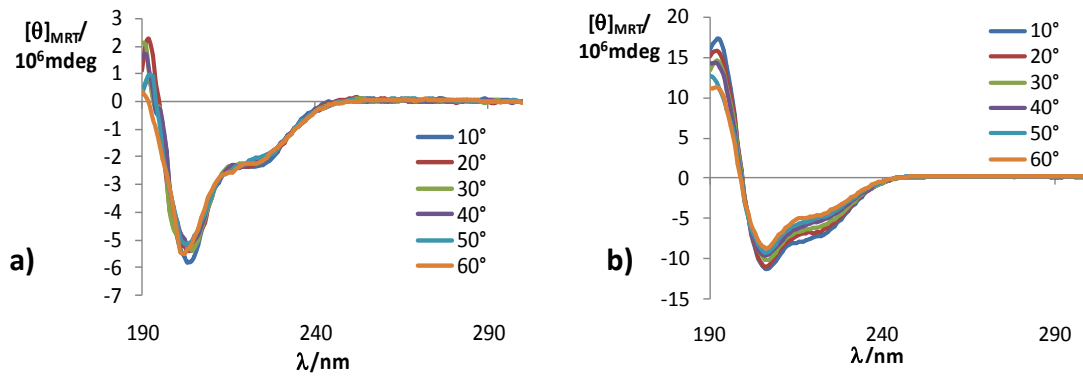


Figura 37. Gráfica de dicroísmo circular para HP3 en a) H₂O Milli-Q y b) TFE.

4.6. Preparación de las vesículas

Una vez preparados, purificados e identificados los péptidos objetivo de este trabajo, se decidió estudiar su comportamiento en vesículas. Las vesículas utilizadas para medir el transporte son vesículas largas unilamelares (LUV, *Large Unilamellar Vesicles*) cargadas con fluoróforo aniónico (HPTS) y un “quencher” o desactivante catiónico (DPX).³⁵ Para simplificar su nomenclatura se nombrarán como LUVs<DPX/HPTS.

Para su preparación se usaron los fosfolípidos (fosfatidil colina) obtenidos de la yema de huevo (*egg yolk-phosphatidylcholine*) siguiendo el método de las vesículas reversas.³⁶ Este objetivo requirió de la disolución del fosfolípido en una mezcla de MeOH/CH₃Cl 1:1 y su posterior concentración en el rotavapor para generar una película en las paredes del balón. Este se mantuvo en condiciones de alto vacío durante 12 h para asegurar la completa eliminación del disolvente en el medio. Seguidamente, se añadió la disolución acuosa tamponada (10 mM Tris, 72 mM NaCl, pH = 7.4), el HPTS y el DPX. Se observa que la disolución se torna de un color amarillo mate. Esta dispersión de vesículas resultante se congeló en N₂(l) y se descongeló (freeze-taw) unas 7 veces. Posteriormente, la mezcla se sometió a un proceso de extrusión a través de una membrana de policarbonato de 200 nm de tamaño de poro, para homogeneizar el tamaño de las vesículas. La mezcla homogeneizada se hace pasar por una columna de exclusión por tamaños (Sephadex G-25) para eliminar el exceso de fluoróforo no atrapado en el interior de las vesículas.

³⁵ Uyeiche, L.; Gagne, L.; Thurston, G.; Szoka, F. Mechanism of lipoplex gene delivery in mouse lung: binding and internalization of fluorescent lipid and DNA components. *Gene Ther.* **2001**, *8*, 828-836.

³⁶ Koltover, I. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA. Complexes related to DNA release and delivery. *Science*, **1998**, *281*, 78-81.

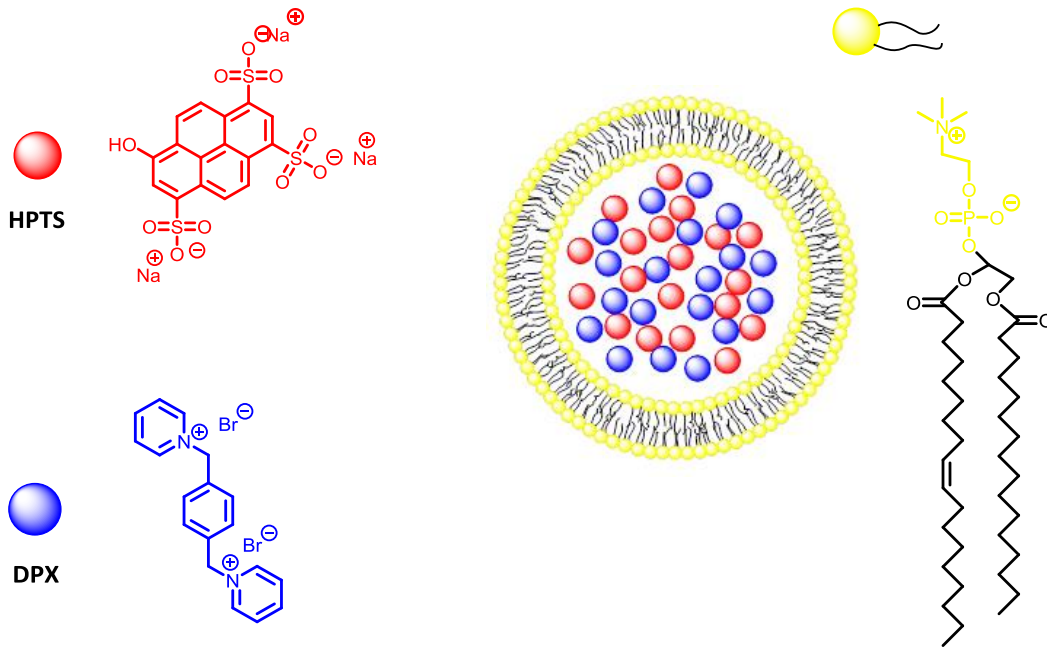


Figura 38: Formación de LUVs \subset DPX/HPTS.

Para comprobar la correcta formación de las vesículas se llevó a cabo un experimento de fluorescencia y transporte como el que se realizará en los experimentos posteriores. En una cubeta de UV se añadió una alícuota de vesículas (5 μ l) y 1980 μ l de disolución extravesicular (10 mM Tris, 107 mM NaCl, pH = 7.4). En este experimento en el que se seguirá la variación de la emisión (excitado a 413 nm y midiendo a 511 nm) de la disolución que contiene los liposomas que encapsulan al fluoróforo y su apagador, frente al tiempo (**Figura 38**). A 200 segundos se añadió el detergente (Triton-X) que libera el contenido de las vesículas separando el fluoróforo de su desactivante. En esta situación, se produjo como se esperaba, un aumento brusco de la fluorescencia que confirmó el atrapado del fluoróforo y del inhibidor en el interior de las vesículas. También se observó que la emisión durante los primeros 200 segundos no cambiaba y que por tanto los liposomas eran estables para la realización de los experimentos de transporte.

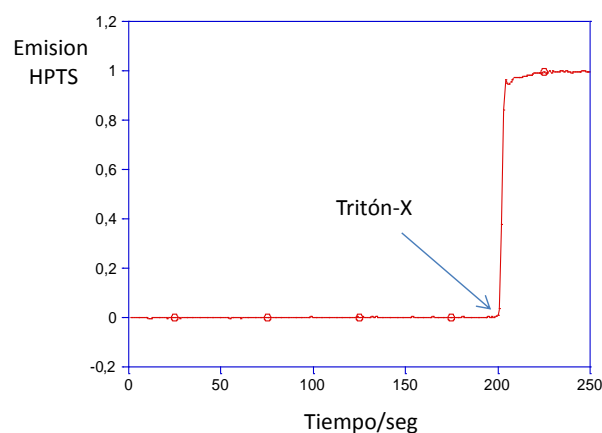


Figura 39: Gráfica que representa la emisión de fluorescencia del HPTS normalizada con respecto al tiempo. Siendo $\lambda_{em} = 511$ nm y $\lambda_{exc} = 413$ nm. Transmitiendo 200 segundos se añade el tritón-X.

4.7. Experimentos de transporte por fluorescencia en LUVS\subsetHPTS/DPX

En la **figura 40** se muestra de forma general el mecanismo propuesto para el transporte de **a)** el péptido **HP2** y **b)** el péptido **HP4**. Como se puede extraer de la imagen, de la mezcla del péptido altamente catiónico con el oligómero (DNA Herring) aniónico se forma un complejo neutro. Esta mezcla se añadió a la cubeta del fluorímetro y se mantuvo en agitación para asegurar la interacción máxima entre las moléculas. Este complejo neutro transloca la membrana, es decir, entra liberando el DNA al que se encontraba unido y vuelve a salir de las vesículas. En el proceso se extrae cierta cantidad de DPX catiónico del interior vesicular impulsado por la presión osmótica ejercida por la entrada de complejo neutro. Finalmente, la expulsión del *quencher* del interior vesicular activa al fluoróforo, produciéndose así un aumento en la señal de fluorescencia.

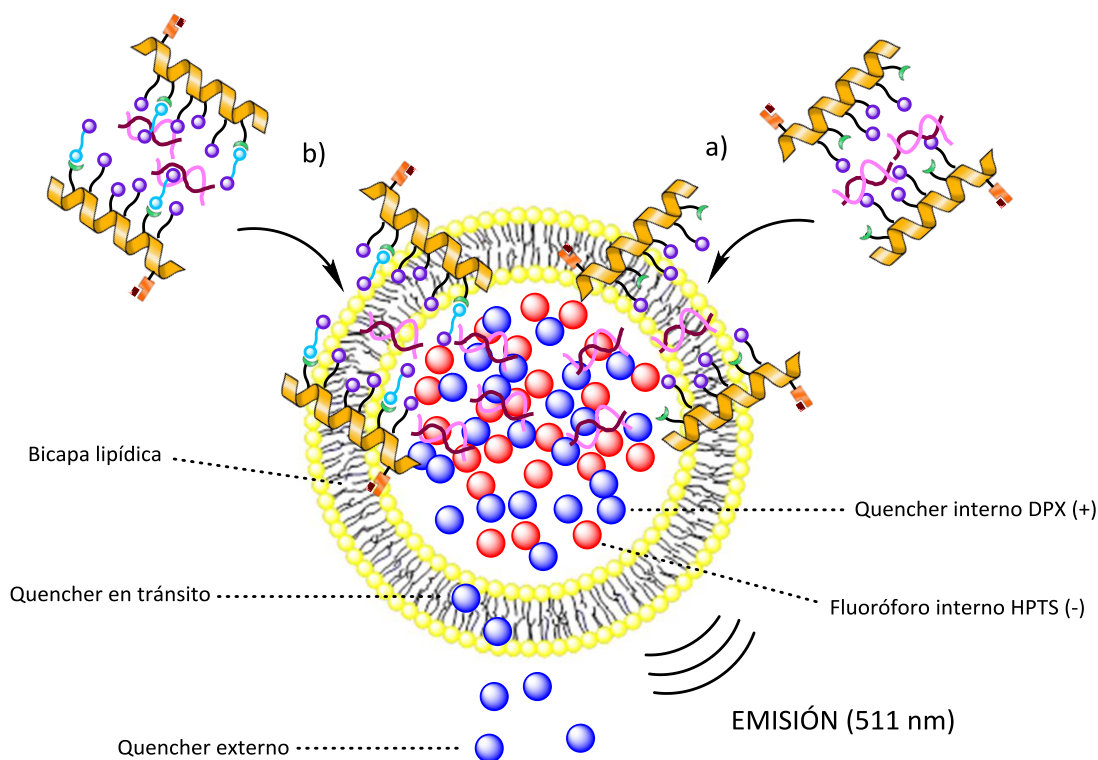


Figura 40: Esquema general del experimento de transporte en péptidos helicoidales, donde se muestran: una vesícula fluorescente, activador catiónico helicoidal, DNA, complejo neutro y el proceso de translocación y transporte.

Como objetivo de estos experimentos se encuentra el estudio del carácter transportador de los péptidos **HP3** y **HP4**.

Para realizar las mediciones de transporte (**Figura 40**) se diluyeron las vesículas en el buffer (10 mM Tris, 107 mM NaCl, pH = 7,4) a una concentración aproximada de lípido 5 mM. Las medidas se realizaron durante 250 segundos, a los 25 segundos se añadió el péptido previamente formado en DMSO. Después de esta primera adición generalmente se observa un pequeño aumento de la fluorescencia debido al propio efecto detergente del anfifilo. Una

vez estabilizada la línea base, se añadió, transcurridos 50 segundos, una concentración fija de DNA. Tras esta adicción es cuando se debe producir el transporte. Un aumento de la fluorescencia implica que el DNA se asocia con el desactivante, ocasionando la separación de este del fluoróforo y por tanto se verifica la existencia del transporte. Al estabilizarse la fluorescencia se añadió al cabo de 225 segundos el detergente Tritón-X para liberar por completo el contenido de la vesícula y poder normalizar los datos.

Para realizar correctamente estos experimentos, es de gran importancia que tanto el buffer intravesicular como el extravesicular tengan el pH correctamente ajustado al fisiológico (pH = 7.4), para poder extrapolarlos a su comportamiento con las membranas biológicas.

Las propiedades transportadoras de cada péptido se midieron a diferentes concentraciones. A pesar de que por el diseño planteado se podría pensar que los péptidos sintetizados deberían ser buenos transportadores, la realidad es que su acción tiene consecuencias totalmente contrarias. Como se muestra en la **figura 41**, tanto para el péptido **HP4** como para el péptido **HP3**, la capacidad de transporte es nula. Se observa que a medida que aumenta la concentración de la muestra su efecto detergente es todavía más importante, pues casi un 100 % de las vesículas liberó su contenido en fluoróforo, claro indicativo de que la bicapa lipídica está siendo disgregada.

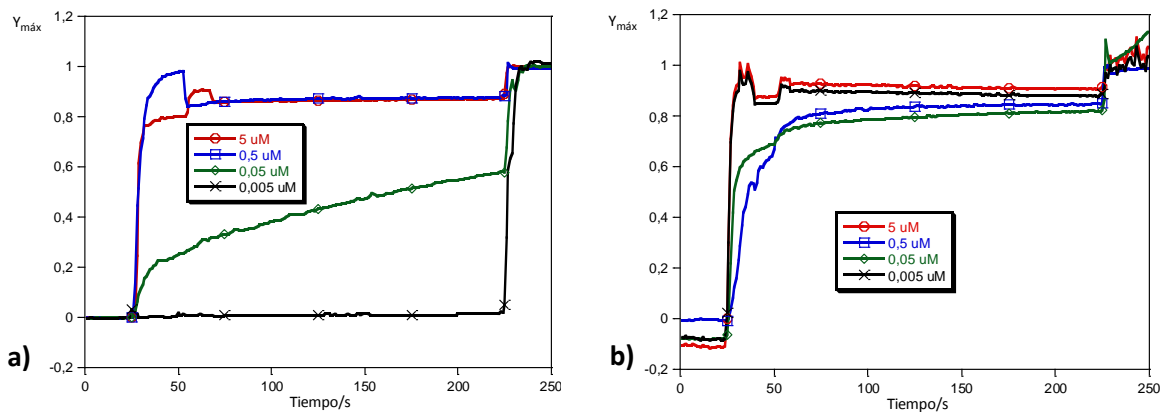


Figura 41. Gráficas obtenidas en los experimentos de transporte para **HP3** (a) y **HP4** (b).

Por tanto, todos los péptidos estudiados presentan una elevada propiedad detergente, lo que los hace inapropiados para su utilización como agentes transportadores de ácidos nucleicos. Alternativamente, estos péptidos, dado sus propiedades disgregadoras de membranas, podrían tener utilidad como agentes antimicrobianos. Esta posibilidad pretende ser estudiada en futuras investigaciones.

5. Conclusions and outlook

1. An efficient solid phase synthesis of lineal peptides with different design and sequence size was performed, as well as the reactions involving the addition of oxaamines which act as nucleophilic centres for the trapping of T-Guanidinium aldehyde and further deprotection of the S^tBu protecting group of the Cysteine residue.
2. For the first time in the research group, it has been demonstrated the compatibility of different dynamic bonds with distinct sensibilities against hydrolysis such as hidrazide and hydroxylamine functions.
3. Once again for the first time, it has been demonstrated the compatibility of three covalent orthogonal dynamic bonds in the same peptide. The route included selective deprotection and coupling reactions.
4. It was also carried out the optimization of the dimerization reaction of a lineal peptide using a disulfide bond, something also very new on the research group. The aim of this synthesis was to increase the transport of active complexes of DNA-peptide into fluorescent vesicles.
5. From data collected in the transport experiments, it can be concluded that the design of **HP2** lineal peptide was not the optimal. However, it is not discarded the idea of trying the same design for internalisation into cells, or a more likely promising work – their use as antimicrobial peptides.
6. The main aim of future work will be the optimization of each reaction done with **HP2** as a reagent, in order to increase the yield and to be able to use these conditions in bigger peptides that could form dimers.

5. Conclusiones y futuro trabajo

1. Se ha llevado a cabo eficientemente la síntesis en fase sólida (SPPS) de péptidos lineales con diferentes diseños y longitud de secuencia aminoacídica, así como todas las reacciones de acoplamiento de centros nucleofílicos tipo oxima para el anclaje del aldehído T-Guanidinio y la posterior desprotección del grupo protector S^tBu del residuo de Cisteína.
2. Por primera vez se ha demostrado en el grupo de investigación la compatibilidad de enlaces dinámicos con diferentes sensibilidades ante la hidrólisis, como las funciones hidrazida e hidroxilamina.
3. De nuevo por primera vez en el grupo de investigación se ha conseguido demostrar la compatibilidad de tres enlaces covalentes dinámicos ortogonales en el mismo péptido. La ruta sintética incluía el empleo de desprotecciones y acoplamientos selectivos.
4. También se desarrolló la optimización de la dimerización de un péptido lineal mediante el empleo de un puente disulfuro, algo también totalmente nuevo en el grupo. La finalidad del mismo era incrementar el transporte de complejos activos DNA-péptido al interior de vesículas fluorescentes, pero no pudo comprobarse esta suposición.

5. A partir de los experimentos en vesículas, se puede concluir que el diseño para el péptido lineal **HP3** no es el óptimo. Sin embargo, no se descarta probar la misma secuencia para internalización en células, o en un uso quizás más prometedor como agente antimicrobiano.
6. El objetivo de futuras investigaciones será optimizar cada reacción realizada sobre el péptido **HP2**, para incrementar los rendimientos y poder así emplear las condiciones mejoradas con el péptido de mayor longitud **HP3**.

5. Conclusión e futuro traballo

1. Levouse a cabo eficientemente a síntesis en fase sólida (SPPS) de péptidos lineais con diferentes deseños e lonxitude de secuencia aminoacídica, así como todas as reaccións de acoplamento de centros nucleofílicos tipo oxima, para a ancoraxe do aldehído T-Guanidinio e a posterior desprotección do grupo protector S^tBu do residuo de Cisteína.
2. Por primeira vez no grupo de investigación conseguíuse demostrar a compatibilidade de tres enlaces covalentes dinámicos ortogonais no mesmo péptido mediante o emprego de desproteccións e acoplamentos selectivos.
3. Tamén foi desenvolvida a optimización da dimerización dun péptido lineal mediante o emprego de unha ponte disulfuro, algo tamén totalmente novo no grupo. A finalidade do mesmo era incrementar o transporte de complexos activos DNA-péptido ao interior de vesículas fluorescentes, pero esta suposición non puido comprobarse.
4. A partir dos experimentos en vesículas, púidose concluir que o deseño para o péptido lineal HP2 non é o óptimo. Non obstante, non se descata probar a mesma secuencia para internalización en células, ou un uso quizáis máis prometedor como axente antimicrobiano.
5. O obxectivo de futuras investigación será optimizar cada reacción realizada sobre o péptido **HP2**, para incrementar os rendementos e poder así empregar as condicións melloradas co péptido de maior lonxitude **HP3**.

6. Parte experimental

6.1. Descripción general, instrumentos y materiales

El hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il) dimetilaminometileno]-N-metilmetanaminio (N-HBTU), y el hexafluorofosfato de n-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazol[4,5-b]piridin-1-il-metileno]-N-metilmetanamino (N-HATU) fueron adquiridos a GIBiochem; el tetrafluoroborato de N-[1H-Benzotriazol-1-il]-(dimetilamino)metileno]-N-metilmetano-amonio (N-TBTU), la resina Rink Amida y los α -aminoácidos Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-L-Lys(Mtt)-OH y Fmoc-L-Cys(S^tBu)-OH se compraron a Novabiochem. El ácido tert-butoxycarbonil, la piranina(HPTS) y el DPX se compraron a Sigma-Aldrich. Todos los disolventes utilizados son de calidad de síntesis o de HPLC, utilizándolos sin purificación adicional. Para la realización de la síntesis en fase sólida se utilizó DMF de grado de síntesis de péptidos. La síntesis en fase sólida se llevó a cabo manualmente. La purificación de compuestos por HPLC se realizó en un cromatógrafo Agilent 1100. Para las purificaciones en una columna preparativa se utilizó como relleno el Nucleosil 120-10-C-18. Como fase reversa se emplearon las mezclas de H₂O con un 0,1% de TFA (disolvente A) y CH₃CN con 0,1% de TFA (disolvente B). Para los análisis en LC-MS se empleó un cromatógrafo Agilent 6120 en tándem con un espectrómetro de masas. Para la caracterización de los compuestos se empleó la técnica ESI (Bruker Microtof ESI-TOF). Los espectros de RMN fueron registrados en un aparato VARIAN Mercury-300. El disolvente utilizado para disolver las muestras fue D₂O, usando la señal del TMS (δ , 0.00) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se dan en unidades de partes por millón (ppm, δ). La asignación de señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón, ¹H-RMN, se denota como: singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuadruplete (q); las demás señales fueron designadas como multiplete (m). Los experimentos de fluorescencia se realizaron en un fluorímetro Jobin Yvon Fluoromax-3 (software datamax 2.20), acoplado a un sistema de control de temperatura Wavelength Electronics LFI-3751.

6.2. Síntesis en fase sólida, procedimiento general

Para llevar a cabo la síntesis en fase sólida, se siguió el siguiente procedimiento:

Preparación de la resina:

En la síntesis se utilizó como soporte sólido la resina Rink Amida (resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi) con una carga de 0.71 mmol/g. Dicha resina precisa ser acondicionada antes de comenzar con la síntesis. Para ello, se incorporó la resina a una columna de síntesis en fase sólida sujeta en un matraz redondo de dos bocas. Seguidamente se añadió DMF y se burbujeó la mezcla a flujo constante de Ar durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se filtró a vacío, obteniendo una resina hinchada y lista para comenzar con los acoplamientos.

Proceso sintético:

Para acoplar el primer aminoácido en el soporte se emplea el mismo procedimiento que para un acoplamiento normal de un aminoácido, constituido por cuatro etapas:

- 1. Desprotección del grupo protector temporal (Fmoc):** la resina se suspendió en una disolución al 20% piperidina en DMF y se mantuvo bajo burbujeo con flujo de Ar durante 30 minutos.
- 2. Lavado:** pasado este tiempo, la resina se filtró y lavó con DMF (3 x 5 ml, 2 min). Es importante eliminar todo exceso de piperidina, para evitar posteriores desprotecciones indeseadas y reacciones secundarias.
- 3. Acoplamiento:** El aminoácido correspondiente (0.4 mmol del primer aminoácido de los péptidos lineales Fmoc-L-Leu-OH) se disolvió en una disolución en DMF que contiene N-HBTU (151.7 mg, 0.4 mmol). Seguidamente, se adicionó DIEA (130 μ L, 0.195 M, 0.6 mmol) a la disolución anterior, se agitó manualmente unos segundos y se vertió sobre la resina. La suspensión final se burbujeó con una corriente a flujo constante de Ar durante 45 min y tras ese tiempo se filtró a vacío.
- 4. Lavado:** Después de cada acoplamiento se lavó la resina con DMF (3 x 3 ml, 1 min).

En el momento que la resina está lavada y filtrada, se comprobó mediante el test TNBS que el acoplamiento se había llevado a cabo cuantitativamente y se continuó con el siguiente. En el caso de ser positivo, la resina se torna de color rojo, es decir existen grupos amino libres y por tanto se hace necesario repetir el acoplamiento con la mitad de equivalentes. Otra alternativa es la realización de un *capping* mediante la utilización de una disolución 1:1 de 2,6-lutidina (1 ml) y anhídrido acético (1 ml). Esta opción fue la escogida, ya que la elevada carga de la resina forma agregados de aminoácido que impiden el correcto acoplamiento del mismo al extremo C-terminal. La disolución se añade sobre la resina y se continúa con el procedimiento al igual que en el resto de acoplamientos.

Se continuó el proceso de repetidos acoplamientos y desprotecciones hasta obtener la longitud de péptido deseada. Este hecho fue comprobado tomando una pequeña porción de resina y efectuando una separación del péptido con cóctel de TFA y posterior precipitación. Tras un análisis rápido en HPLC-MS se corroboró el correcto crecimiento del péptido.

- 5. Acetilación:** La reacción se lleva a cabo con la adición de una disolución 1:1 de 2,6-lutidina y anhídrido acético, tal y como se comentó anteriormente.
- 6. Lavado:** después de filtrar, la resina se lavó con DMF (3 x 1 ml, 1 min).

Sin desligar este producto de la resina, se continúa eliminando los grupos protectores ortogonales, para la incorporación de los conectores covalentes dinámicos que ejercerán su función de enlaces dinámicos.

- 7. Desprotección del grupo protector de la Lys (Alloc):** en un vial se disolvió PPh₃ (19.97 mg, 1.5 eq) en 0.5 ml de DCM-HPLC y se añadió N-metilmorfolina (55 μ L, 10 eq) y fenilsilano (62 μ L). Seguidamente se adicionó esta disolución sobre la resina y se dejó desoxigenando 10 min a volumen constante bajo burbujeo de Ar. Es importante ir

añadiendo al cartucho de reacción pequeñas cantidades de DCM-HPLC, pues es difícil mantener el volumen de la disolución constante debido a la elevada volatilidad del DCM. Durante la desoxigenación también se preparó una disolución de Pd(OAc)₂ (3.36 mg, 0,3 eq) en 0.5 ml de DCM-HPLC y se dejó reposar. Finalmente se añadió esta última disolución y se burbujeó Ar otros 10 min. La suspensión resultante se dejó agitando mecánicamente toda la noche (12 h).

8. **Lavado:** tras la reacción se lavó la resina con DCM (4 x 1 ml), DIEA 2% en DMF (4 x 1 ml), sodio dietilcarbamato en DMF (4 x 1 ml) y DMF (4 x 1 ml). Cada lavado se mantuvo durante 1 min bajo corriente de Ar. Si la resina no cambia de color pardo a amarillento se deben repetir los lavados hasta que se produzca el cambio.
9. **Formación de la hidrazida:** en sendos viales se disolvieron la hidracina (98 mg, 4 eq), el N-HATU (95 mg, 2.5 eq) y la DIEA (410 µl, 24 eq) en 0.5 ml de DMF cada uno. Seguidamente se añadió en ese mismo orden cada una de las disoluciones, siendo la de DIEA la única adicionada gota a gota. Se observa que el color de la resina se vuelve más verduzco hasta un punto que se torna pardo. La suspensión final se mantiene burbujeando con una corriente a flujo constante de Ar.
10. **Lavado:** se realizaron lavados con DMF (3 x 1 ml, 1 min). La resina pierde el color pardo y recupera el amarillento.

El acoplamiento de la hidrazina se comprobó mediante un análisis en HPLC-MS. Desafortunadamente, se observó producto de partida sin hidrazina por lo que se hizo necesario repetir el procedimiento descrito en el punto VIII.

11. **Desprotección del grupo protector de la Lys (Mtt):** sobre la resina ya lavada y acondicionada en DCM-HPLC, se vertió una disolución de DCM-HPLC (1.8 ml), HFIP (400 µl), TFE (200 µl) y TIS (100 µl) y se mantuvo en agitación mecánica durante 90 min. Este proceso se repitió dos veces. Después de cada etapa de desprotección se realizaron lavados con DCM-HPLC (3 x 3 ml, 1 min). Tras la segunda desprotección y los lavados finales se llevan a cabo nuevos lavados con DMF (3 x 1 ml, 1 min). Finalmente se acondiciona la resina para un nuevo medio, añadiendo unos ml de DMF y manteniéndola bajo burbujeo de Ar durante 15 min.
12. **Formación de la O-Alquilhidroxilamina:** el ácido [terc-Butoxicarbonil]-aminooxi] acético (5 eq, 47.76 mg por cabeza de oxima) y el N-HATU (5 eq, 95.06 mg por hidroxilamina) se disolvieron en sendos viales en 0.5 ml de DMF cada uno. Seguidamente, se mezclaron y añadieron sobre la resina con los residuos de Lys libres. Sobre esta mezcla se adicionó gota a gota una disolución de DIEA (10 eq, 85,5 µl por cabeza de oxima) en DMF (0.5 ml). Se observó la aparición del color pardo en la suspensión. A través de la mezcla se burbujeó una corriente de Ar durante 45 min y posteriormente se lavó la resina con DMF (4 x 2 ml, 1 min), hasta la desaparición del color pardo y reaparición del amarillo común de la resina.

Se comprobó el acoplamiento correcto de la hidroxilamina mediante un análisis en HPLC-MS.

- 13. Rotura de la unión del péptido a la resina:** Sobre la resina en el cartucho de síntesis, se añadió una disolución de TFA (900 μ l), DCM (50 μ l), agua Milli-Q (25 μ l) y TIS (25 μ l); aproximadamente 1 mL de disolución por cada 40 mg de resina. La mezcla resultante se agitó mecánicamente durante 2 horas. Pasado ese tiempo, se filtró la resina a un matraz redondo de dos bocas limpio y seco y se lavó el cartucho de reacción con unos ml de TFA (200 μ l aproximadamente). Se observa que el filtrado es de un color rosado. Seguidamente, se concentró burbujando una corriente de Ar a través de él. Una vez se observa la disminución de volumen, el filtrado se añadió gota a gota sobre Et₂O (aproximadamente 10 ml de éter por cada 1 ml de TFA) previamente enfriado en la nevera. La suspensión del péptido en Et₂O resultante se centrifugó a 3200 rpm durante 10 min. Después se extrajo con cuidado el líquido sobrenadante y se redisolvió el sólido en agua Milli-Q. Finalmente la disolución se liofilizó hasta obtener un sólido blanquecino que se purificó por HPLC.

6.2.1. Síntesis del péptido lineal HP1.

Se sintetiza el péptido siguiendo el procedimiento indicado para péptidos lineales partiendo de 0.1 mmol de resina y después se purifica en FR-HPLC [Nucleosil 100-7 C18, H₂O (0.1% TFA)/CH₃CN (0.1% TFA), 95:5 (0 → 5 min), 95:5 → 5:95 (5 → 35 min), 0:100 (>35 min)]. T_R19.1 min. Se obtuvieron 4.3 mg (2.4%). **¹H-NMR (500 MHz, D₂O):** 4.5 - 4.3 (m, 4H); 4.3 - 4.1 (m, 10H); 3.3 - 3.1 (m, 12H); 2.3 (t, 2H); 2.2 (t, 2H); 2.0 (s, 3H); 1.9 - 1.5 (m, 42H); 1.4 - 1.2 (m, 6H); 1.0 - 0.8 (m, 24H). **MS (ESI-TOF, H₂O):** 1781 (6, [M+H]⁺); 948.2 (12, [M+2H+TFA]²⁺); 594.7 (100, [M+3H]³⁺).

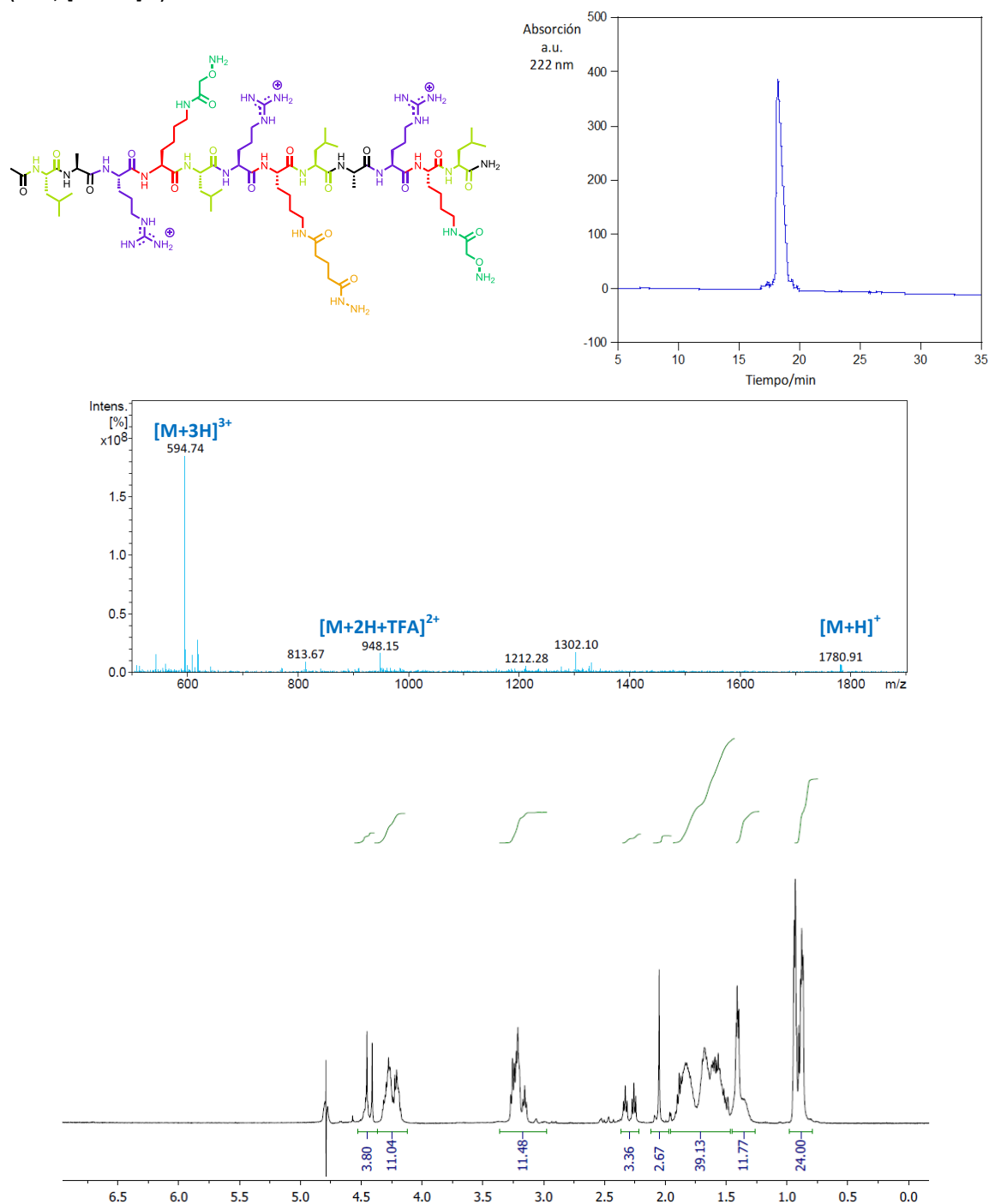


Figura 42. Imagen del compuesto. HPLC del compuesto puro. Espectro de MS y ¹H-NMR.

6.2.2. Síntesis del péptido lineal HP2.

Se sintetiza el péptido siguiendo el procedimiento indicado para péptidos lineales partiendo de 0.1mmol de resina y después se purifica en FR-HPLC [Nucleosil 100-7 C18, H₂O (0.1% TFA)/CH₃CN (0.1% TFA), 95:5 (0 → 5 min), 95:5 → 5:95 (5 → 35 min), 0:100 (>35 min)]. T_R19.8 min. Se obtuvieron 6.3 mg (9%). **¹H-NMR (500 MHz, D₂O):** 4.8(t, 1H); 4.5(s, 2H); 4.4 - 4.3 (m, 1H); 4.3 - 4.2 (m, 2H); 3.3 (t, 2H); 3.3 - 3.2 (m, 2H); 3.2 - 3.1 (m, 2H); 2.1(s, 3H); 1.9 - 1.4 (m, 13H); 1.35 (s, 9H); 1.0 - 0.8 (m, 6H). **MS (ESI-TOF, H₂O):** 721.5 (100, [M+H]⁺); 361.2 (66, [M+2H]²⁺).

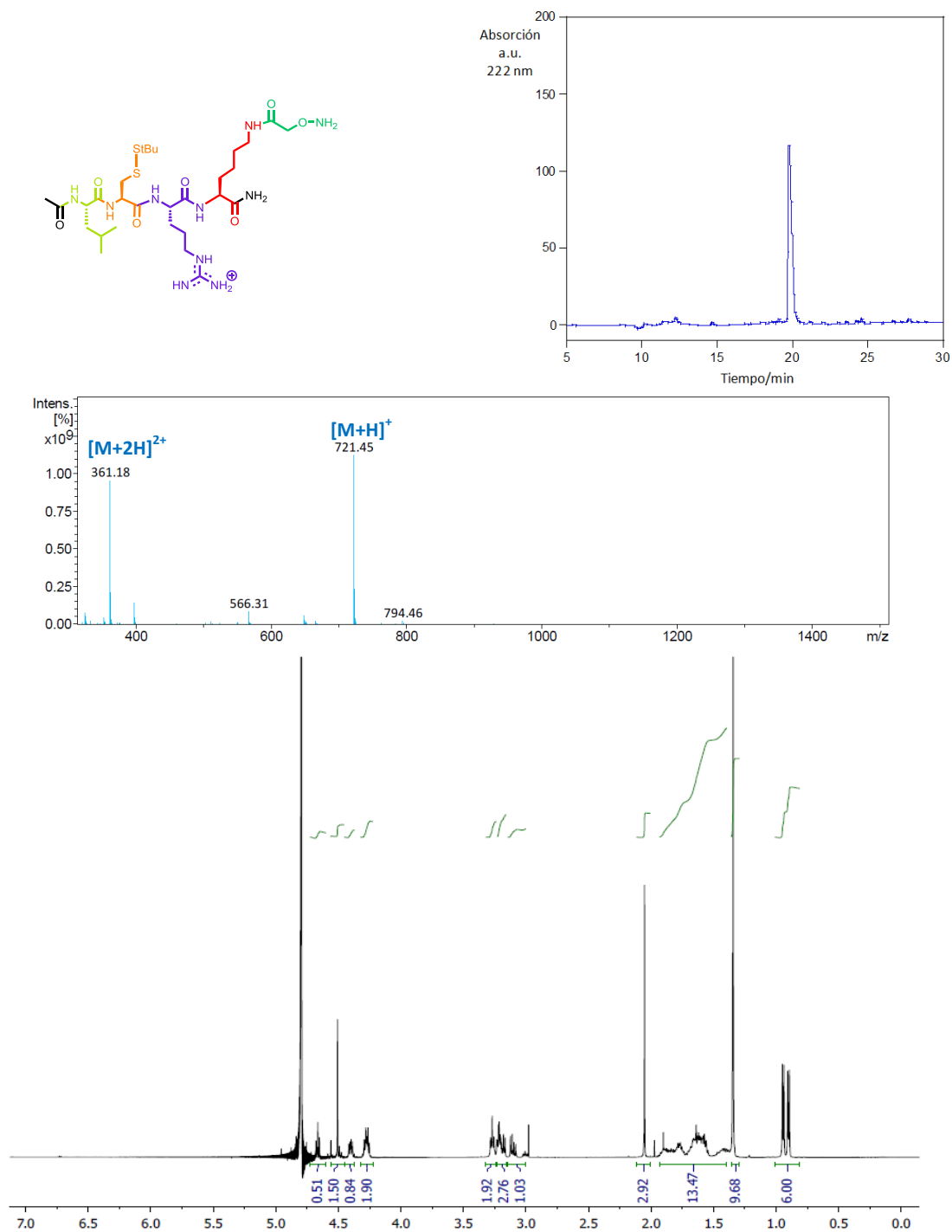


Figura 43. Imagen del compuesto. HPLC del compuesto puro. Espectro de MS y ¹H-NMR.

6.2.2.1. Acoplamiento del aldehído T-Guanidinio. Síntesis de HP4.

Sobre una disolución 50 mM del péptido cabeza en DMSO se añade el aldehído T-Guanidinio en la proporción de 2 eq por cada mol de hidroxilamina. La mezcla se calienta y agita a 60°C durante 1 hora. Después se purifica en FR-HPLC [Nucleosil 100-7 C18, H₂O (0.1% TFA)/CH₃CN (0.1% TFA), 95:5 (0 → 5 min), 95:5 → 5:95 (5 → 35 min), 0:100 (>35 min)]. T_R 17.4 min. Se obtuvieron 2.4 mg (30%). ¹H-NMR (500 MHz, D₂O): 4.7 - 4.6 (m, 1H); 4.55 (s, 2H); 4.5 (s, 2H); 4.4 - 4.2 (m, 3H); 3.5 - 3.4 (m, 4H); 3.3 - 3.0 (m, 6H); 2.7 - 2.4 (m, 4H); 2.0 (s, 3H); 1.9 - 1.4 (m, 13H), 1.3 (s, 9H); 1.0 - 0.8 (m, 6H). MS (ESI-TOF, H₂O): 889.5 (4, [M+H]⁺); 445.2 (100, [M+2H]²⁺).

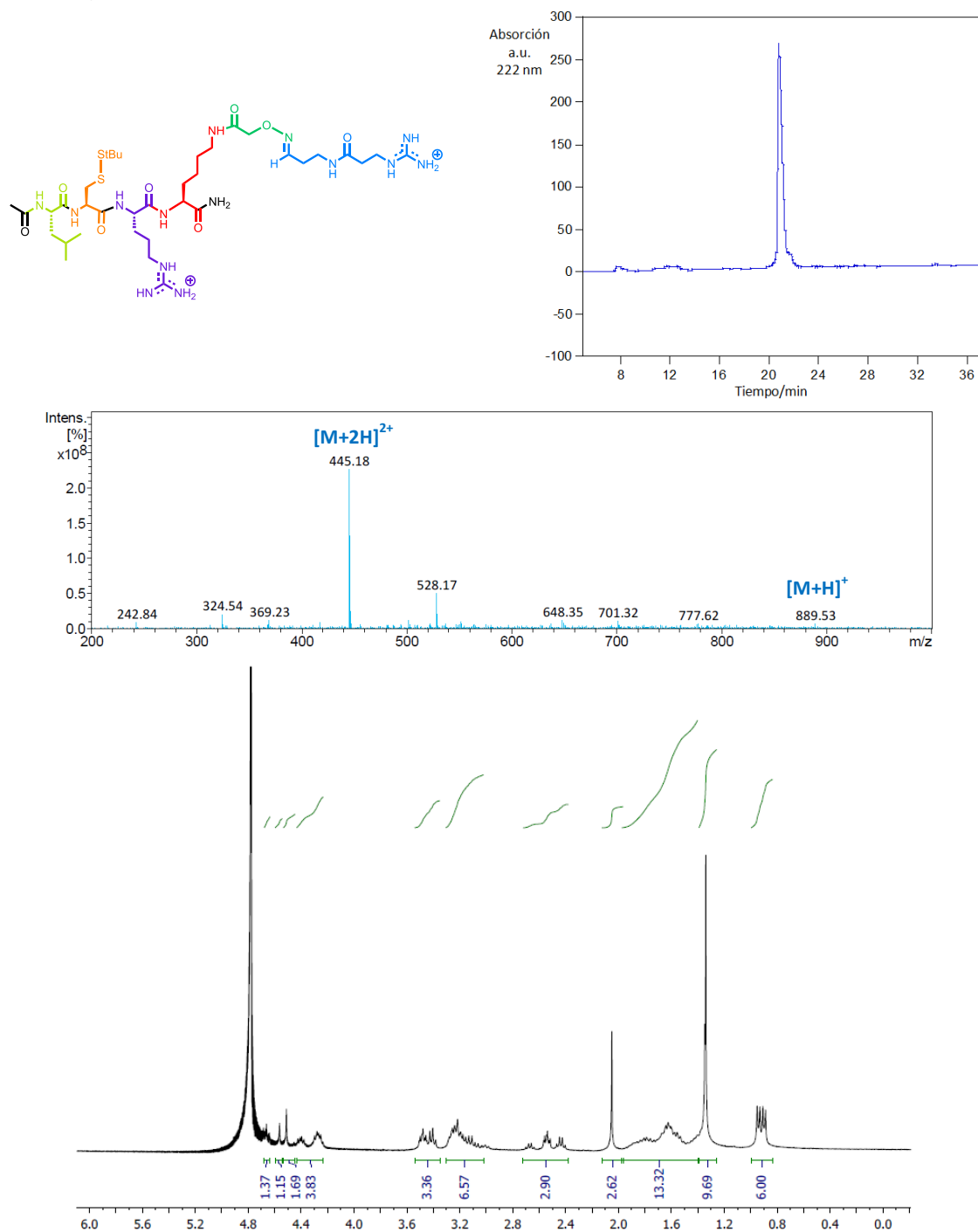


Figura 44. Imagen del compuesto. HPLC del compuesto puro. Espectro de MS y ¹H-NMR.

6.2.2.2. Desprotección del residuo cisteína. Síntesis de HP6.

Sobre 4mL de tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_2/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 100 mM se añadieron 20 eq de DTE por eq de péptido cabeza y se desoxigenó la disolución resultante bajo corriente de Ar durante 10 min. A continuación, se añadió la mezcla sobre el péptido y se mantuvo en agitación durante 1 hora y después se purifica en FR-HPLC [Nucleosil 100-7 C18, H_2O (0.1% TFA)/ CH_3CN (0.1% TFA), 95:5 (0 → 5 min), 95:5, 95:5 → 5:95 (5 → 35 min), 0:100 (>35 min)]. T_R 15.1 min. Se obtuvieron 2.0 mg (92%). **$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O):** 4.55 (s, 2H); 4.5 (s, 2H); 4.4 - 4.3 (m, 3H); 3.5 - 3.4 (m, 4H); 3.3 - 3.2 (m, 6H); 2.8 - 2.4 (m, 4H); 2.0 (s, 3H); 1.9 - 1.3 (m, 13H); 1.0 - 0.8 (m, 6H). **MS (ESI-TOF, H_2O):** 801.4 (5, $[\text{M}+\text{H}]^+$); 401.1 (100, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$).

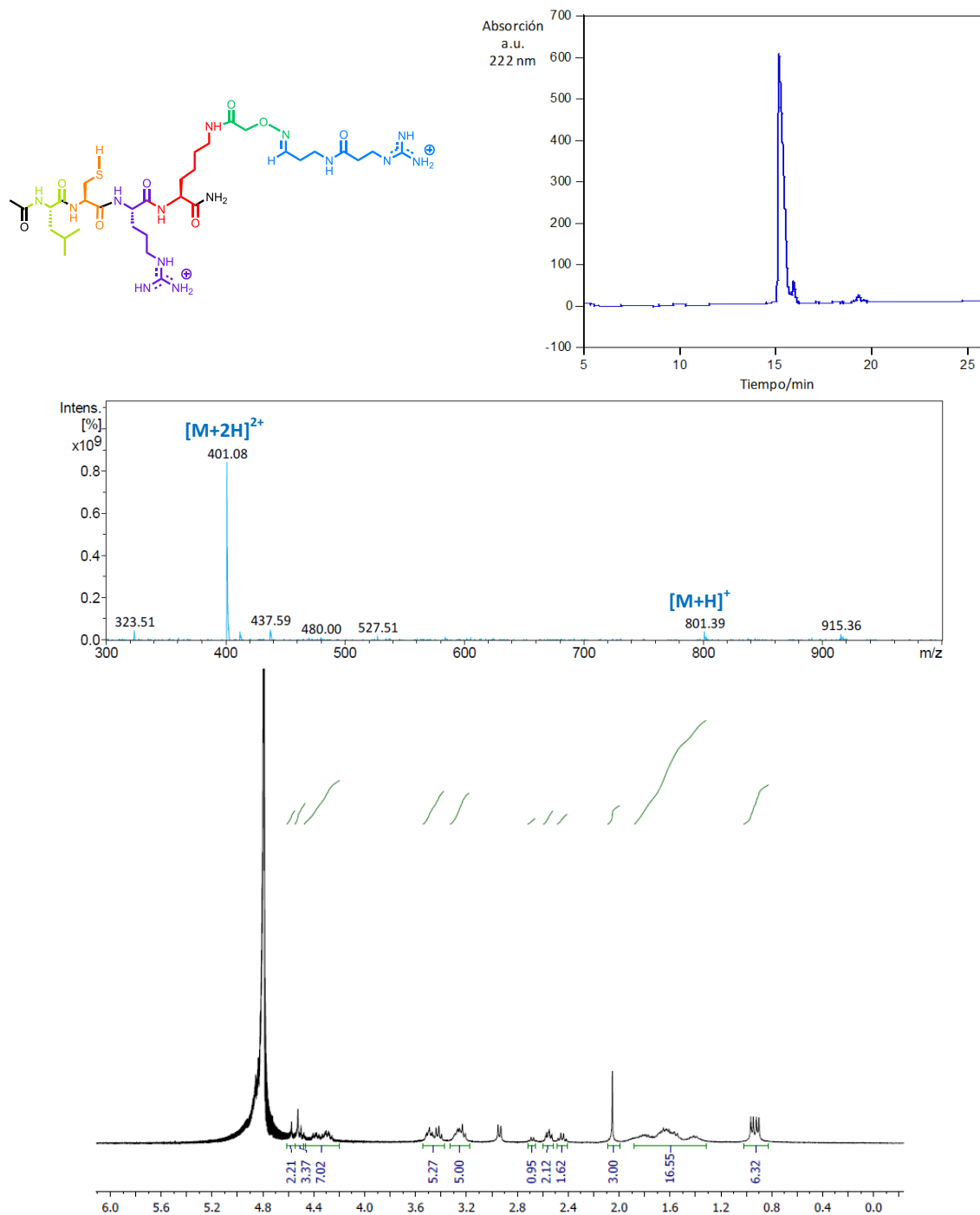


Figura 45. Imagen del compuesto. HPLC del compuesto puro. Espectro de MS y $^1\text{H-NMR}$.

6.2.2.3. Dimerización del péptido HP6.

La dimerización se lleva a cabo añadiendo una disolución 2.5 M de NCS en H₂O:ACN al péptido monómero. La mezcla resultante se mantiene en agitación mecánica durante 15 min y después se purifica en FR-HPLC [Nucleosil 100-7 C18, H₂O (0.1% TFA)/CH₃CN (0.1% TFA), 95:5 (0 → 5 min), 95:5, 95:5 → 5:95 (5 → 35 min), 0:100 (>35 min)]. T_R 15.5 min. Se obtuvo 1 mg (25%). **MS (ESI-TOF, H₂O):** 857.5 (25, [M+2H+TFA]²⁺); 800.7 (4, [M+2H]²⁺); 534.0 (80, [M+3H]³⁺); 401.0 (45, [M+4H]⁴⁺).

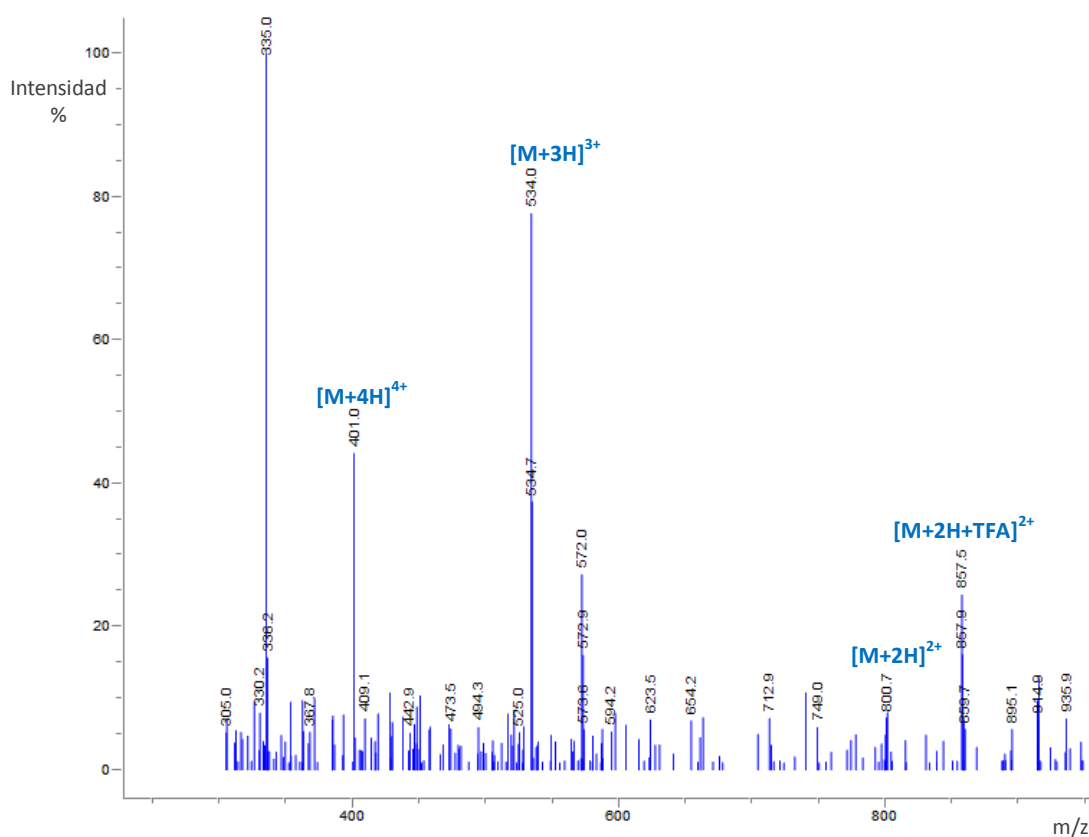
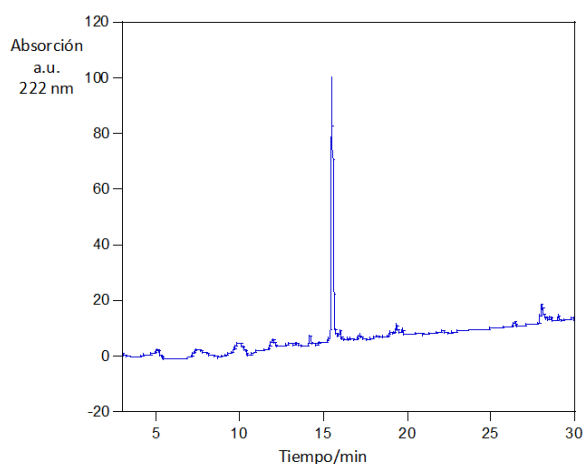
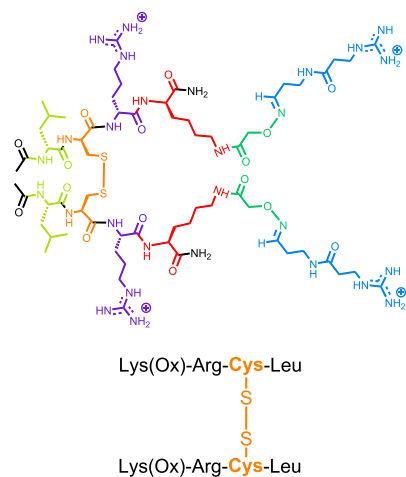


Figura 46. Imagen del compuesto. HPLC del compuesto puro. Espectro de MS.

6.2.3. Síntesis del péptido lineal HP3.

Se sintetiza el péptido siguiendo el procedimiento indicado para péptidos lineales y después se purifica en FR-HPLC [Nucleosil 100-7 C18, H₂O (0.1% TFA)/CH₃CN (0.1% TFA), 95:5 (0 → 5 min), 95:5 → 5:95 (5 → 35 min), 0:100 (>35 min)]. T_R 22.5 min. Se obtuvieron 19.9 mg (11%). ¹H-NMR (500 MHz, D₂O): 4.5 - 4.3 (m, 1H); 4.4 - 4.1 (m, 11H); 3.2 - 2.9 (m, 14H); 1.9 (s, 3H); 1.0 - 1.4 (m, 40H); 1.3 (d, 6H); 1.2 (s, 9H); 0.9 - 0.7 (m, 24H). MS (ESI-TOF, H₂O): 1801.7 (2, [M+H]⁺); 1015.3(93, [M+2H+2TFA]²⁺); 601.5 (100, [M+3H]³⁺); 451.5 (18, [M+4H]⁴⁺).

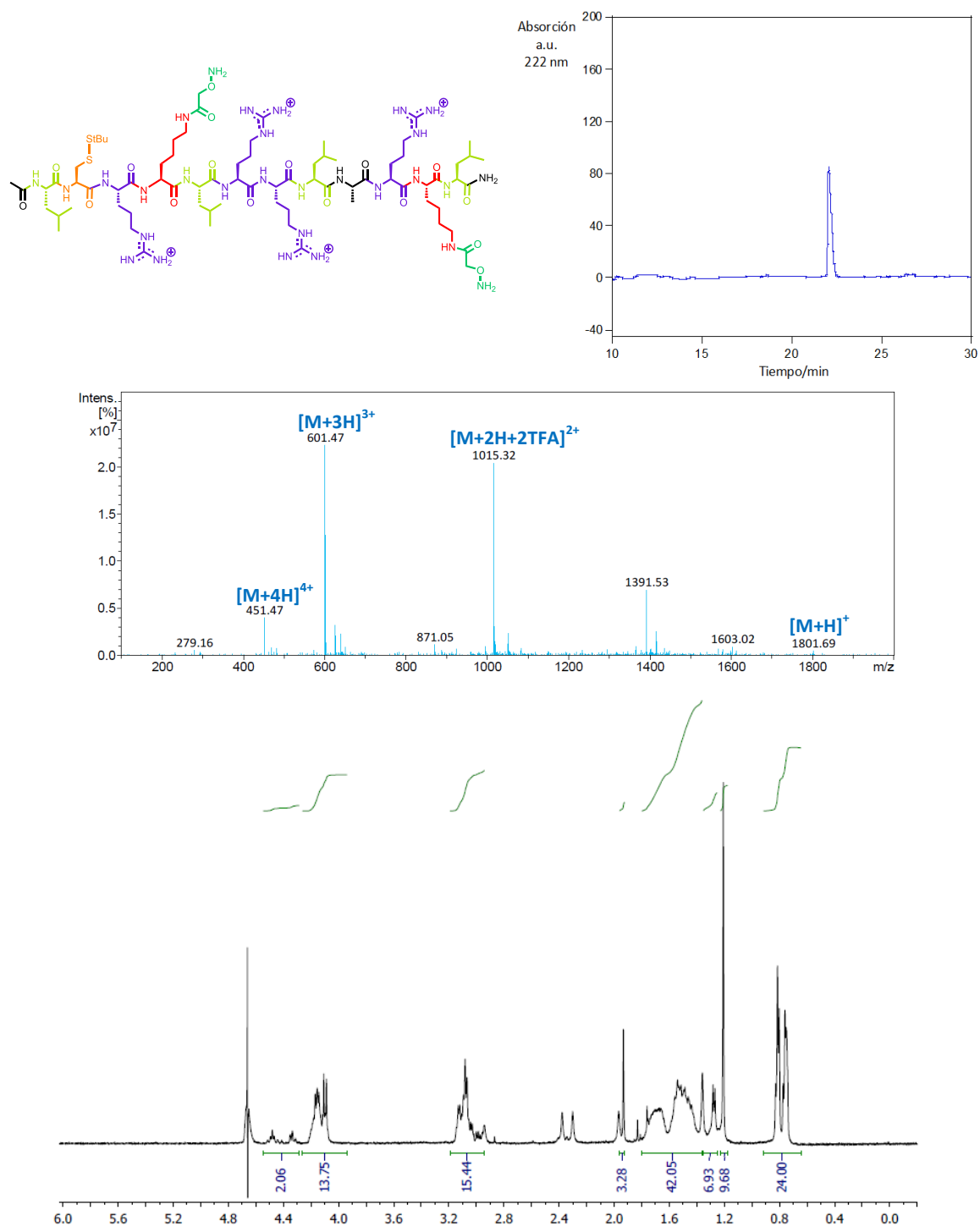


Figura 47. Imagen del compuesto. HPLC del compuesto puro. Espectro de MS y ¹H-NMR.

6.2.3.1. Acoplamiento del aldehído T-Guanidinio. Síntesis de HP5.

Se sigue el procedimiento anteriormente descrito (pág.42). Después se purifica en FR-HPLC [Nucleosil 100-7 C18, H₂O (0.1% TFA)/CH₃CN (0.1% TFA), 95:5 (0 → 5 min), 95:5 → 5:95 (5 → 35 min), 0:100 (>35 min)]. T_R 20.1 min. Se obtuvieron 5.7 mg (30%). ¹H-NMR (500 MHz, D₂O): 4.7 - 4.4 (m, 1H) ; 4.3 - 4.2 (m, 11H); 3.6 - 3.35 (m, 8H); 3.3 - 3.1 (m, 14H); 2.6 - 2.3 (m, 8H); 2.1 (s, 3H); 1.9- 1.5 (m, 40H); 1.4 (d, 6H); 1.3 (s, 9H); 1.0 - 0.8 (m, 24H). MS (ESI-TOF, H₂O): 1126.8 (18, [M+2H+TFA]²⁺); 713.7 (100, [M+3H]³⁺); 535.5 (42, [M+4H]⁴⁺).

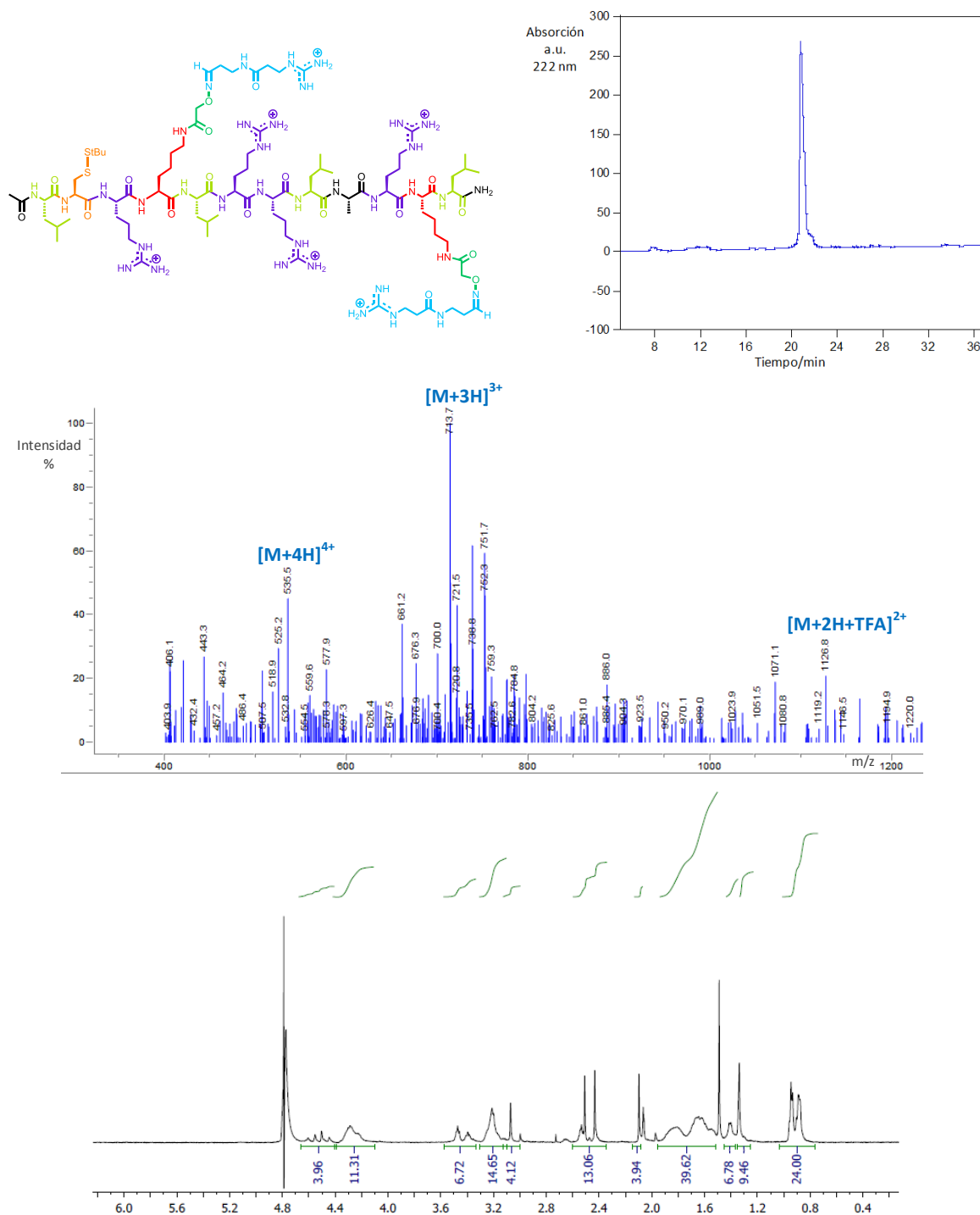


Figura 48. Imagen del compuesto. HPLC del compuesto puro. Espectro de MS y ¹H-NMR.

6.2.3.2. Desprotección del residuo cisteína. Síntesis de HP7

Se sigue el procedimiento descrito anteriormente (**pág.43**). Después se purifica en FR-HPLC [Nucleosil 100-7 C18, H₂O (0.1% TFA)/CH₃CN (0.1% TFA), 95:5 (0 → 5 min), 95:5 → 5:95 (5 → 35 min), 0:100 (>35 min)]. T_R 16.2 min. Se obtuvieron 1.0 mg (28%). **¹H-NMR (500 MHz, D₂O)**: 4.5 - 4.3 (m, 1H); 4.3 - 4.1 (m, 11H); 3.4 - 3.25 (m, 8H); 3.2 - 3.0 (m, 14H); 2.6 - 2.2 (m, 8H); 1.9 (s, 3H); 1.8 - 1.3 (m, 40H); 1.3 - 1.2 (m, 6H); 0.9 - 0.8 (m, 24H). **MS (ESI-TOF, H₂O)**: 1139.7 (25, [M+2H+2TFA]²⁺); 722.4 (100, [M+3H+TFA]³⁺); 684.3 (40, [M+3H]³⁺); 513.3 (25, [M+4H]⁴⁺).

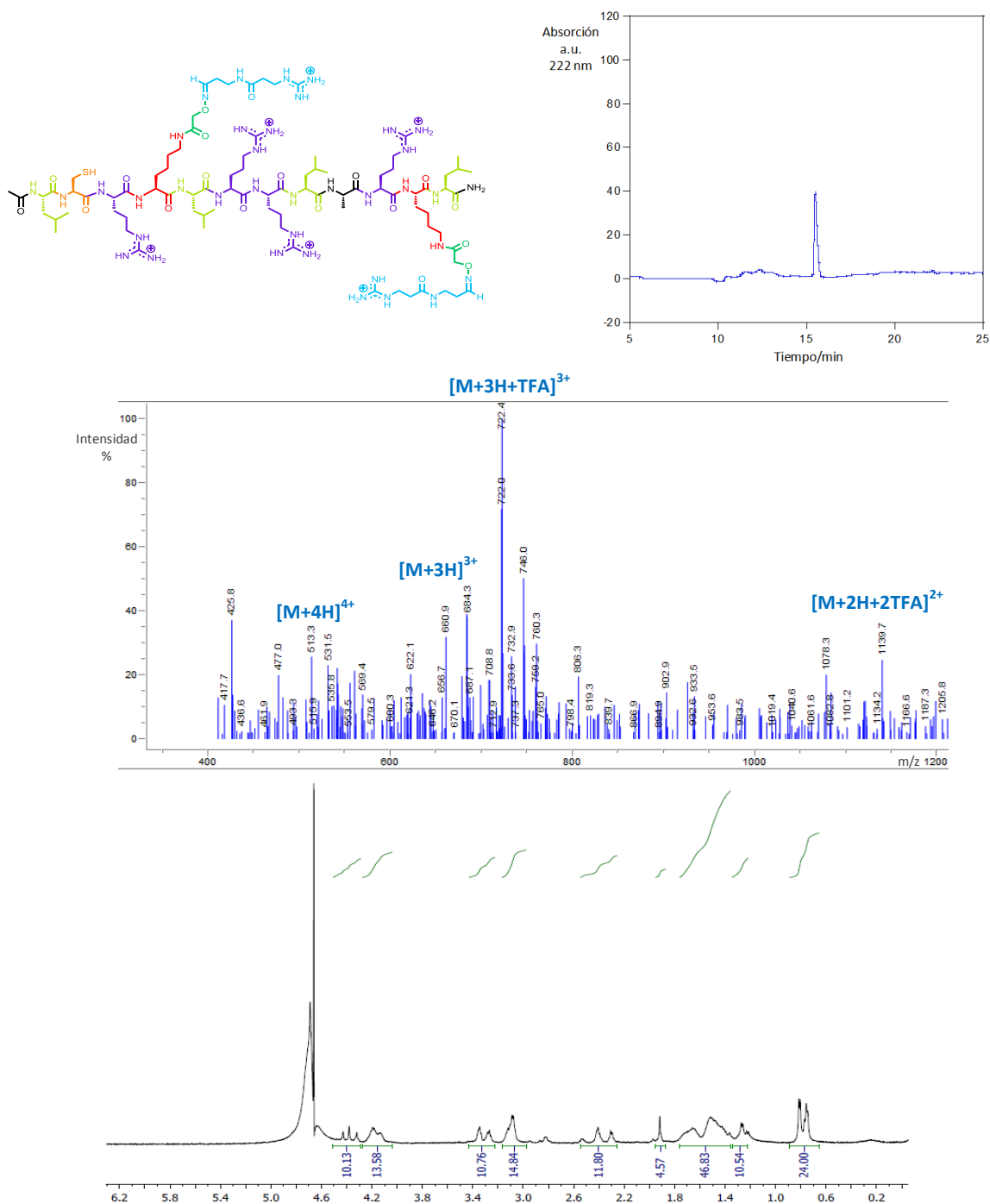


Figura 49. Imagen del compuesto. HPLC del compuesto puro. Espectro de MS y ¹H-NMR.

6.3. Método de preparación de las vesículas

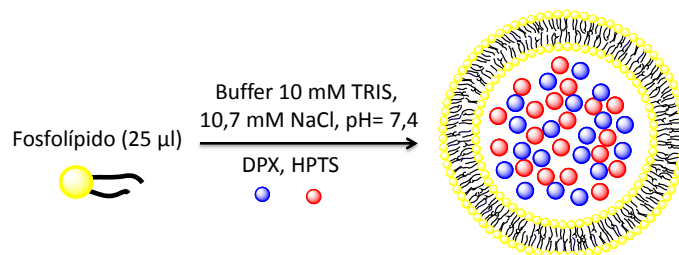


Figura 50. Esquema del método de preparación de vesículas.

En la preparación de las vesículas se pesaron 25 mg de fosfatidil colina de yema de huevo (*egg yolk-phosphatidyl choline*) en un balón de fondo redondo de 25 ml. El lípido se disuelve en 2 ml de MeOH/CH₃Cl 1:1. Seguidamente, el disolvente se evapora en el rotavapor para generar una película o "film" multilamellar adherida a las paredes del balón. Este film se mantuvo en condiciones de alto vacío durante 12 horas. Pasado este tiempo se añade 1 ml de Buffer acuoso (10 mM Tris, 72 mM NaCl, pH=7.4). Esta dispersión de vesículas se congela en nitrógeno líquido y se descongela (freeze-thaw) 7 veces. Posteriormente la mezcla se agita mecánicamente durante 30 minutos y se procede a su extrusión mediante filtración a través de una membrana de policarbonato de 200 nm de tamaño de poro. Una vez homogenizada la mezcla, las LUVsCDPX/HPTS se purifican mediante una columna de exclusión por tamaños (Sephadex G-25) usando Buffer como eluyentes (10 mM Tris, 107 mM NaCl, pH=7.4).

6.4. Método de medición de dicroísmo circular

Para la realización de las medidas de dicroísmo circular, se divide el péptido en dos fracciones y se disuelven en TFE y H₂O Milli-Q para obtener sendas disoluciones de concentración 2000 μM. De cada disolución se hace una dilución a 200 μM. Las medidas se llevan a cabo midiendo la rotación óptica a diferentes intervalos de temperatura (10°C – 60°C). Finalmente la medida del porcentaje de helicidad se calculó utilizando la Ecuación 1 y usando el mínimo que aparece a 222 nm.

$$\text{Ecuación 1: } \%hel_{222} = \frac{(\theta - 2340)}{30300} \cdot 100$$

6.5. Método de medición del transporte

Para el experimento de medida de transporte a través de fluorescencia se procede como se describe a continuación. En una cubeta de fluorescencia se diluyen LUVs C HPTS/DPX en buffer (10 mM Tris, 107mMNaCl, pH=7,4) a una concentración de lípido final (5 mM). Se mide entonces la cinética de emisión del HPTS ($\lambda_{exc} = 413$ nm y $\lambda_{em} = 511$ nm) en un total de 250 segundos. A los 25 segundos se añade el péptido variando su concentración en un rango de 50 μM a 1.5 μM. Al cabo de este tiempo, al llegar a 50 segundos se añade el ADN de Herring a una concentración fija (1.25 μg/ml) y finalmente a 225 segundos se añade el detergente Tritón-X (40 μl, 1.2 %). Los datos se normalizaron usando la **ecuación 1**.

$$\text{Ecuación 2: } I(t) = \frac{(I_t - I_0)}{(I_\infty - I_0)}$$