



Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Químicas

**SÍNTESIS DE LOS PEPTIDOS RAF Y BOMBESINA. ESTABILIDAD DE
NANOPARTÍCULAS DE ORO CONJUGADAS CON EL PÉPTIDO RAF.**

Unidad de investigación para optar al grado de Licenciada en Química

Autor:

Carolina Andrea Fernández Reyes

Directora de la unidad de investigación

Dra. Eyleen Araya Fuentes

Santiago de Chile, 2016



**Universidad
Andrés Bello®**

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Químicas

**“SÍNTESIS DE LOS PÉPTIDOS RAF Y BOMBESINA. ESTABILIDAD DE
NANOPARTICULAS DE ORO CONJUGADAS CON EL PÉPTIDO RAF”**

CAROLINA FERNÁNDEZ REYES

Comisión evaluadora:

Prof. Dra. Marjorie Cepeda

Prof. Dra. Verónica Paredes

Santiago de Chile, 2016



**Universidad
Andrés Bello®**

ACTA DE CALIFICACIONES

NOTA DE ESCRITO DE UNIDAD DE INVESTIGACION

Con fecha de 21 de noviembre de 2016, se entregó el escrito de la Unidad de Investigación de la alumna **CAROLINA FERNÁNDEZ REYES**, RUT: 15477649-4 titulada “**SÍNTESIS DE LOS PÉPTIDOS RAF Y BOMBESINA. ESTABILIDAD DE NANOPARTICULAS DE ORO CONJUGADAS CON EL PÉPTIDO RAF**”.

Las calificaciones obtenidas por la Srta. Carolina Fernández Reyes en esta etapa son las siguientes:

Comisión Evaluadora:

Prof. Dra. Marjorie Cepeda

Prof. Dra. Verónica Paredes

Nota Final Escrito:.....

Doy fe a la veracidad de esta evaluación.

Dra. Verónica Paredes García

Directora

Programa de Licenciatura en Química



**Universidad
Andrés Bello®**

ACTA DE CALIFICACIONES

**NOTA DE PRESENTACION ORAL Y DEFENZA DE
UNIDAD DE INVESTIGACION**

Con fecha de 21 de noviembre de 2016, se realizó la presentación y defensa de la Unidad de Investigación de la alumna **CAROLINA FERNÁNDEZ REYES**, RUT: 15477649-4 titulada **“SÍNTESIS DE LOS PÉPTIDOS RAF Y BOMBESINA. ESTABILIDAD DE NANOPARTICULAS DE ORO CONJUGADAS CON EL PÉPTIDO RAF”**.

Las calificaciones obtenidas por la Srta. Carolina Fernández Reyes en esta etapa son las siguientes:

Comisión Evaluadora:	Exposición Oral	
Defensa		
Prof. Dra. Marjorie Cepeda
Prof. Dra. Verónica Paredes

Nota Final Presentación y Defensa:.....

Doy fe a la veracidad de esta evaluación.

Dra. Verónica Paredes García

Directora Programa de Licenciatura en Química

Agradecimientos

Después de todos estos años de estudio, quiero agradecer a mi familia, a mis padres que siempre me han apoyado en todo lo que emprendo con sus consejos, su tiempo para escucharme, a la oportunidad que me dieron de ser más. A mi pareja Javier, que sin su ayuda este camino se habría hecho más difícil, a Kathy Kennedy que a pesar de la distancia su apoyo ha sido incalculable. Agradecer también en forma general a mis compañeros de estudio sobre todo al grupo de nanotecnología que han estado presentes para colaborar con mi investigación también.

Además le doy gracias a la profesora Eyleen por mostrarme esta área de la química, a los profesores por sus enseñanzas y su paciencia y a todos los que estuvieron en mi camino que ayudaron de una u otra forma, las lecciones no siempre están en los textos.

Por último agradecer a los proyectos que hicieron posible esta investigación: Fondecyt Proyecto 11130494, y Fondap Proyecto 15130011.

Índice

Abreviaturas	9
Resumen	10
I. Introducción	12
1.1 Nanopartículas de Oro	12
1.2 Síntesis de nanopartículas de oro	13
1.3 Estabilidad de las AuNP	14
1.4 Potencial Zeta	15
1.5 Plasmón de Superficie	16
1.6 Plasmón Superficial y Espectroscopia UV-vis	18
1.7 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) para la caracterización de nanopartículas	18
1.8 Péptidos sintéticos como agentes terapéuticos	19
1.8.1 Uso del análogo peptídico de Raf como agente antitumoral para la terapia de cáncer	21
1.8.2 Uso de biomoléculas para el direccionamiento selectivo de las nanopartículas hacia las células tumoraes	21
1.9 Síntesis Química de Péptidos. Principios generales	22
1.9.1 Metodología de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida. Esquemas de Protección	24
1.9.2 Química Fmoc/tBu	25
1.9.3 El soporte sólido	27
1.9.4 Resinas de poliestireno	28
1.9.5 Ensamblaje de la Secuencia peptídica. Acoplamiento del primer aminoácido al soporte sólido. Espaciadores	29
1.9.6 Métodos de acoplamiento	30

1.9.7	Carbodiimidias_____	30
1.9.8	Caracterización de Péptidos Sintéticos_____	32
1.9.9	Purificación de péptidos sintéticos_____	32
1.10	Conjugación de péptidos a Polietilenglicol (PEG)_____	33
1.10.1	Propiedades del PEG_____	33
1.10.2	Peguilación en Fase Sólida._____	34
1.20	Funcionalización de nanopartículas de oro con PEG y Conjugación con péptidos bioactivos_____	35
II.	Hipótesis_____	36
III.	Objetivos_____	36
3.1	Objetivos Generales_____	36
3.2	Objetivos Específicos_____	36
IV.	Metodología_____	37
4.1	Materiales_____	37
4.1.1	Reactivos utilizados en la síntesis de péptidos Raf y Bombesina_____	37
4.1.2	Reactivos utilizados en la síntesis de AuNP-e_____	37
4.1.3	Reactivos utilizados en la funcionalización de AuNP-e con HS-PEG-COOH_____	37
4.1.4	Reactivos utilizados en la evaluación de la estabilidad del conjugado_____	38
4.2	Síntesis de péptidos en fase sólida_____	38
4.2.1	Consideraciones Generales de la Síntesis_____	38

4.2.2	Test Cualitativo de Kaiser o Ninhidrina_____	39
4.2.3	Eliminación del grupo Fmoc_____	40
4.3	Síntesis del análogo de Raf_____	42
4.3.1	Incorporación del primer aminoácido Lisina (Lys) a la resina (2-Cl-Tritilo)_____	42
4.3.2	Incorporación del segundo aminoácido Fenilalanina (Phe)_____	43
4.3.3	Liberación del péptido Raf de la resina_____	45
4.4	Síntesis de Bombesina_____	46
4.4.1	Incorporación del primer aminoácido Metionina (Met) a la resina (2-Cl-Tritilo)_____	46
4.4.2	Acoplamiento del segundo aminoácido Leucina (Leu)_____	47
4.4.3	Escisión del péptido Bombesina de la resina y eliminación de grupos protectores de las cadenas laterales_____	49
4.5	Síntesis de Nanopartículas de oro (AuNP-e)_____	50
4.6	Funcionalización de las AuNP-e con PEG y Raf_____	50
4.7	Incubación de las AuNP-PEG-Raf en medio biológico (PBS)_____	51
V.	Resultados y Discusión_____	53
5.1	Síntesis y caracterización de los péptido Raf y Bombesina_	53
5.1.1	Péptido Raf_____	53
5.1.2	Péptido Bombesina_____	55
5.2	Síntesis y caracterización de AuNP-e_____	57
5.2.1	Caracterización de AuNP-e desnudas por Espectrofotometría UV-Visible_____	57

5.2.2	Medidas de Dispersión de la Luz (DLS) de las AuNP-e	58
5.2.3	Potencial Z de las AuNP-e	59
5.2.4	Caracterización por SEM de las AuNP-e	59
5.3	Caracterización de AuNP-e conjugadas con PEG	60
5.4	Caracterización de AuNP-e conjugadas con PEG-Raf (AuNP-PEG-Raf)	61
5.5	Estabilidad de las AuNP-PEG-Raf en PBS	62
5.5.1	Espectrofotometría UV-Visible	63
5.5.2	Dispersión de la luz (DLS)	64
5.5.3	Potencial Z de las AuNP-PEG-Raf en PBS diferentes concentraciones	66
VI.	Conclusiones	68
VII.	Bibliografía	69

Índice de tablas

Tabla 1: Cuadro resumen eliminación grupo Fmoc_____	41
Tabla 2: Esquema de la adición del primer aminoácido Lys_____	43
Tabla 3: Esquema de la adición del segundo aminoácido Phe_____	44
Tabla 4: Carga de los aminoácidos en la síntesis de péptidos_____	45
Tabla 5: Cuadro resumen de la adición del primer aminoácido Met _____	46
Tabla 6: Esquema de la adición del segundo aminoácido Leu_____	48
Tabla 7: Incubación de las AuNP-PEG-Raf en medio salino PBS a distintostiempos_____	63
Tabla 8: Resumen de las mediciones de las disoluciones AuNP-PEG- Raf/PBS en proporciones 100:900 y 400:600 de espectroscopia UV y DLS _____	66
Tabla 9: Resumen de los potenciales medidos de AuNP-PEG-Raf en PBS en proporciones de 100:900 y 400:600 a 15 y 60 minutos de incubación_____	67

ABREVIATURAS

NP	: Nanopartícula
AuNP	: Nanopartícula de oro
DCM	: Diclorometano
DIC	: diisopropilcarbodiimida
DIEA	: Diisopropiletilamina
DLS	: <i>Dynamic light scattering</i> ; Dispersión dinámica de la luz
DMF	: Dimetilformamida
EDC	: Etilcarbodiimida
IUPAC	: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ; Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
MALDI	: Desorción e ionización por láser asistida por una matriz (del inglés: matrix-assisted Laser desorption ionización).
MS	: (del Inglés: <i>Mass spectrometry</i>)
NHS	: N-hidroxisuccinimida
PBS	: (<i>Phosphate buffered saline</i>) Tampón fosfato salino
PEG	: Polietilenglicol
RPS	: Resonancia de Plasmón Superficial
SPPS	: Síntesis en fase sólida
TFA	: Ácido trifluoroacético
Uv-Vis	: Espectroscopia Uv-Visible

Resumen

Las nanopartículas por su tamaño son especies que tienen la capacidad de penetrar en células de una manera eficiente por lo que son muy útiles como transportadores para mejorar la entrega de fármacos. Asimismo, las nanopartículas de oro pueden absorber y disipar la energía de manera local de modo tal que al ser irradiadas a una longitud de onda cercana a la resonancia de plasmón superficial, pueden provocar la liberación controlada de moléculas transportadas unidas a su superficie. De esta manera es posible producir una liberación espacial y temporalmente controlada de un fármaco en el organismo aumentando la selectividad de la acción y reduciendo los efectos secundarios.

Asimismo, es posible emplear las nanopartículas de oro como vectores para la entrega de agentes antitumorales. De esta manera a una misma nanopartícula se le puede unir un agente antitumoral y una molécula que reconozca algún receptor que se sobre exprese en una célula tumoral de manera tal de producir un direccionamiento selectivo.

Uno de los grandes desafíos en nanomedicina es el direccionamiento de las nanopartículas hacia los blancos específicos como es el caso de las células tumorales. Para lograr dirigir selectivamente las nanopartículas se emplean péptidos que se unen covalentemente a las nanopartículas.

Esta unidad de investigación se ha centrado en la síntesis de los péptidos Raf y Bombesina y en la estabilidad de nanopartículas de oro (AuNP) conjugadas con el péptido Raf como posible uso en terapia del cáncer. Este péptido análogo de Raf cumple la función de antitumoral y el otro es el péptido análogo de la Bombesina que reconoce el receptor de Bombesina el cual se sobre expresa en células tumorales. El péptido Raf se conjugó a nanopartículas de oro de 9 nm.

Para aplicaciones biológicas, las nanopartículas de oro tienen que estar recubiertas con estabilizantes polares como el Polietilenglicol (PEG) que aumenten la solubilidad acuosa estabilizando también a las partículas coloidales por interacciones electroestáticas evitando así la agregación de nanopartículas.

Es así que en este trabajo, se obtuvieron nanopartículas de oro de 9 nm que se multifuncionalizaron con un polietilenglicol bifuncional que contiene en un extremo un grupo tiol y en el otro un grupo carboxilo (HS-PEG-COOH). Una vez obtenidas las nanopartículas peguiladas se realizó la conjugación con el péptido Raf. Posteriormente, se evaluó la estabilidad del conjugado de nanopartícula con el péptido antitumoral en tampón PBS.

I.Introducción

1.1 Nanopartículas de Oro

Las nanopartículas de metales nobles y más específicamente, las nanopartículas de oro (AuNP), exhiben excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su tamaño nanométrico.¹En nanomedicina, una aplicación importante es la utilización de AuNP las cuales pueden absorber radiación electromagnética y disiparla localmente, principalmente en forma de calor, permitiendo así la destrucción selectiva de células malignas o de agregados tóxicos proteicos, esto sin afectar tejidos aledaños sanos². La capacidad de interacción de las AuNP con la radiación electromagnética se debe a la presencia de electrones en la superficie de las mismas, los cuales dependiendo de la longitud de onda incidente producen el fenómeno denominado resonancia de plasmón superficial (SPR), el cual depende del tamaño, forma y composición de la NP (Figura 1).

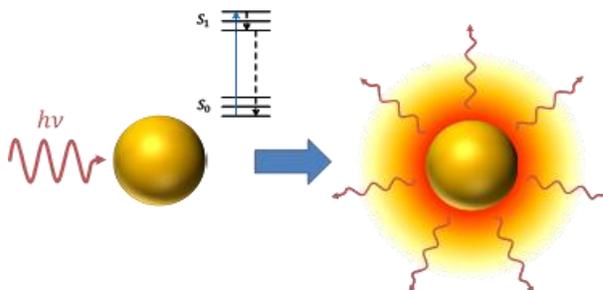


Figura 1: El efecto fototérmico en las AuNP. Luego de ser irradiada (por radiación visible o infrarroja, dependiendo de la banda plasmónica de la nanopartícula), la AuNP absorbe luz (izquierda). La absorción de energía lleva a que se produzca una transición electrónica de los electrones de superficie, desde un estado basal (S_0), a un estado excitado (S_1). La energía es disipada a zonas contiguas a la nanoestructura en forma de calor en todas direcciones (derecha)³.

Asimismo, mediante la absorción y disipación de la energía es posible producir la liberación de compuestos con actividad farmacológica en un sitio y en un momento determinado, controlando así la entrega del medicamento de manera tal de evitar efectos inespecíficos en el organismo. Las AuNP permiten también la detección de tumores, ya sea actuando como medio de contraste, o bien,

generando fenómenos de dispersión de la luz, dada su capacidad de interacción con la radiación electromagnética. De esta manera, las AuNP pueden ser empleadas para la denominada “teranosis” que consiste en el diagnóstico y la terapia en un mismo procedimiento. Además la multifuncionalización de nanopartículas con diferentes tipos de moléculas permite cumplir diferentes funciones, como reconocimiento y liberación de un determinado medicamento. ⁴

1.2 Síntesis de nanopartículas de oro.

En esta unidad de investigación se utilizó el método de síntesis de nanopartículas de oro esféricas (AuNP-e) basado en la reducción química de un sal de oro. En este método se utiliza como precursor HAuCl_4 y citrato trisódico como agente reductor y estabilizante de las nanopartículas. Como el citrato cumple todas estas funciones, se utiliza en un gran exceso.

Durante la reacción, el citrato se oxida a ácido acetondicarboxílico, sufriendo la pérdida del carboxilo adyacente al hidroxilo a través de una descarboxilación. El ácido clorhídrico proveniente del precursor es neutralizado por uno de los grupos carboxílicos del citrato. En tanto, el Au^{+3} se reduce a oro metálico (Au^0); las fuerzas de atracción de van der Waals predominan, agregándose átomo con átomo en un proceso de nucleación, o formación de nanocristales de oro (nanopartículas).

Por otra parte, se ha descrito que parte de los átomos de Au^{+3} no se reducen completamente, sino a un estado de oxidación intermedio (Au^+). Estos átomos de Au^+ se disponen sobre la superficie de la nanopartícula, la cual adquiere una carga superficial positiva. Esta carga atrae electrostáticamente moléculas de citrato, las que terminan por adsorberse sobre la superficie de la nanopartícula (Figura 2). Dos de los grupos carboxílicos del citrato contrarrestan las cargas positivas superficiales; la restante queda expuesta hacia afuera. Las partículas finalmente presentan una carga negativa, y la repulsión electrostática se hace suficiente para contrarrestar las interacciones atractivas de van der Waals. Esto explica por qué el tamaño de los cristales es controlado, quedando como

nanopartículas. Evidencia de esta explicación puede encontrarse en el trabajo de Li y colaboradores.⁵

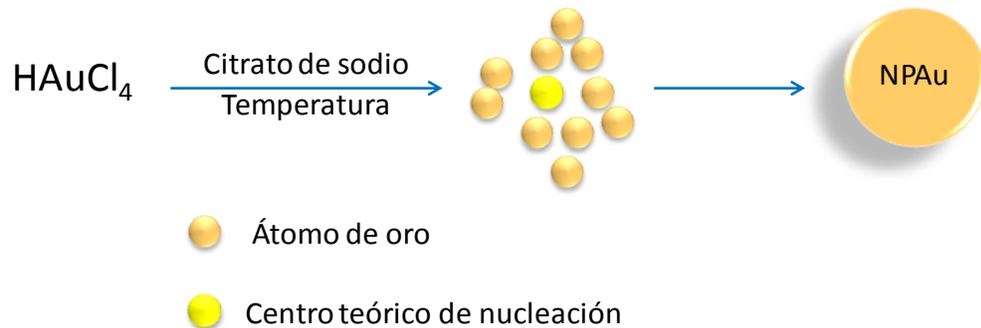


Figura 2: Centro teórico de nucleación sobre el cual se adsorberían los átomos de oro para dar origen a las AuNP-e.

1.3 Estabilidad de las AuNP

En un sistema coloidal las AuNP corresponden a la fase dispersa y el medio líquido en las que se mantienen, es la fase dispersante. Las características de las dispersiones de las AuNP son las de un coloide liófilo o liofílico. Esto significa que la dispersión es termodinámicamente inestable, a diferencia de lo que ocurre en un coloide liofílico donde la dispersión es más estable que los componentes. Esto significa que, eventualmente, se observará separación de las fases, es decir, las AuNP se agregarán o coagularán. Sin embargo, la velocidad de separación de las fases puede ser infinitamente lenta.

1.4 Potencial Zeta

En general, las partículas dispersas en un sistema acuoso adquieren una carga superficial. En el caso de las AuNP esto está dado por los átomos de oro (I) residuales que se encuentran en la superficie y por la adsorción del citrato, confiriendo a las AuNP una carga resultante negativa.⁶

La carga intrínseca de la partícula más los iones fijos adsorbidos conforman lo que se conoce como la doble capa eléctrica. El espesor de esta capa es la longitud de apantallamiento de Debye (κ^{-1}). Las cargas que quedan por dentro de esta longitud no ejercen fuerza efectiva, fenómeno denominado apantallamiento. Las cargas superficiales modifican la distribución de los iones circundantes, lo que resulta en una zona alrededor de la partícula que es eléctricamente diferente al seno de la solución (Figura 3). Esta zona puede dividirse en dos partes: la capa interior adherida fuertemente a la partícula, y que se desplaza junto con la partícula, llamada capa de Stern, y una región exterior, que se hace difusa a medida que aumenta la distancia desde la superficie. En esta región existe una frontera conceptual, más allá de la cual los iones no se mueven junto con la partícula. Esta frontera se conoce como plano de deslizamiento o plano de corte hidrodinámico (*hydrodynamic shear plane*).

El potencial zeta (ζ) es el potencial eléctrico en el plano de corte, y por lo general se expresa en milivoltios (mV). Es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción eléctrica entre las partículas que componen el coloide.

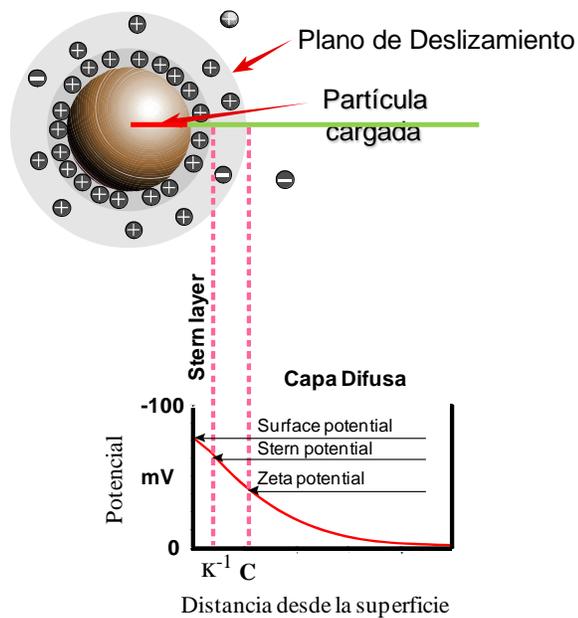


Figura 3: Potencial Zeta. El plano de corte está representado por el círculo gris, y la letra C. La línea roja representa el radio de la partícula. Sobre la línea verde, K^{-1} es la longitud de Debye, y el potencial zeta es el potencial eléctrico a la distancia C.

Su medición confirma el mecanismo de estabilización de un coloide, sea electrostático o estérico, al tiempo que es clave para el control electrostático de una dispersión coloidal. Un potencial zeta de gran magnitud se correlaciona con una alta estabilidad coloidal; las partículas con un alto potencial zeta, ya sea positivo o negativo, se repelerán unas con otras.

1.5 Plasmón de Superficie

Las disoluciones coloidales de NPs principalmente de oro, plata y cobre han llamado la atención desde hace muchos siglos debido al intenso color que éstas presentan. Esta propiedad ha sido estudiada por muchos científicos y fue Gustav Mie quien resolviendo las ecuaciones de Maxwell, con las adecuadas condiciones límites para esferas, atribuyó este color a la interacción de estas NPs con la radiación electromagnética.^{7,8}

Al interaccionar las nanopartículas metálicas con un campo electromagnético se genera una oscilación (misma frecuencia) entre los electrones de la banda de conducción del metal y la radiación electromagnética incidente (Figura 4). Esta

oscilación es conocida como resonancia de plasmón de superficie (RPS) y genera una intensa banda de absorción detectable mediante espectroscopia UV-visible, en la zona del visible.

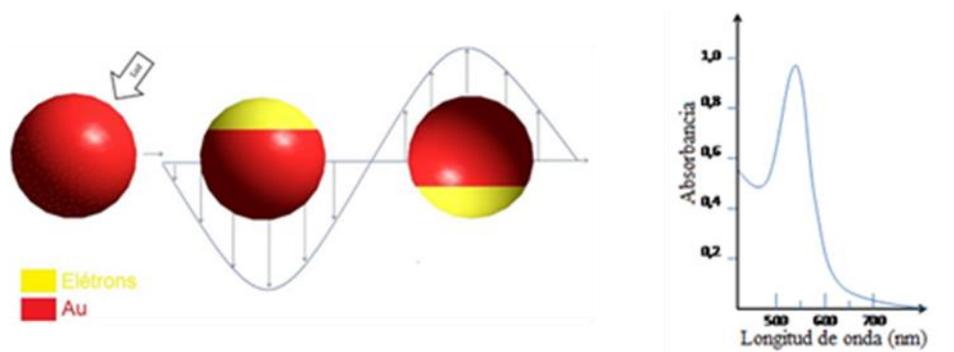


Figura 4: Esquema de la interacción de la radiación electromagnética con las NPAu. a) Un dipolo oscila en fase con el campo eléctrico de la luz incidente. b) Banda de absorción en ~520 nm como consecuencia de la oscilación del dipolo.

Como se observa en la figura 4, al interaccionar un campo electromagnético con la nanopartícula, esta última se polariza generando oscilaciones del tipo dipolar y/o multipolar. El máximo de absorbancia del RPS es dependiente del tamaño de la nanopartícula. Así, en nanopartículas con diámetros mayores a 20 nm la contribución de modos de mayor orden (dipolo, cuadrupolo, etc.) generan un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción esto debido a que las nanopartículas de mayor tamaño no pueden polarizarse homogéneamente. Para este tipo de nanopartículas el fenómeno de dispersión comienza a ser importante dentro del fenómeno global de extinción de la luz.¹⁰

Para las AuNP de diámetro menor a 20 nm sólo las contribuciones de los modos dipolares afectan al fenómeno de extinción¹⁰. En este caso, el máximo de absorbancia también se ve afectado por el tamaño de la nanopartícula. A medida que disminuye el tamaño de la nanopartícula la absorción de la RPS sufre un desplazamiento hipsocrómico.

La RPS, depende de la forma de las nanopartículas, del tamaño, de la composición del metal del cual están formadas y también de las propiedades del medio que las rodea.

Es importante destacar que la dispersión en el tamaño de las partículas reales (en oposición a las calculadas) produce un ensanchamiento en la banda de absorción al visible.

1.6 Plasmón Superficial y Espectroscopia UV-vis

Entre las técnicas más utilizadas para caracterizar a las AuNP se encuentra la espectrofotometría UV visible, la cual brinda información sobre la concentración, el tamaño y homogeneidad del tamaño de las partículas, comparando la radiación luminosa absorbida o transmitida por una solución de AuNP respecto de un blanco. De este modo, la concentración se relaciona con la absorbancia en el pico máximo de absorción, el tamaño con la posición del pico respecto al eje x correspondiente a la longitud de onda, mientras que la homogeneidad (tamaño de las NP) con el ancho de la señal. Los coloides de oro, los cuales se caracterizan por su intenso color rojo, absorben luz en la región verde-azul del espectro.⁹ Esta absorción depende de ciertos factores como el tamaño de las AuNP, su estado de agregación y de la frecuencia de RPS, característico de las partículas metálicas.¹¹ De esta manera las AuNP de 10 nm absorben a los 520 nm de longitud de onda.¹²

1.7 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) para la caracterización de nanopartículas

La dispersión dinámica de la luz (DLS) (DLS; del inglés *Dynamic light scattering*) es una técnica utilizada para medir el tamaño de las partículas (Figura5), por lo general, en la región sub-micrométrica. La DLS mide el movimiento browniano relacionándose el mismo con el tamaño de las partículas determinándose la dispersión de la luz por la interacción de la misma con las partículas. El movimiento browniano, es el movimiento aleatorio de las partículas debido a los choques dados por las moléculas del solvente que las rodean. Normalmente, la DLS tiene que ver con la medición de las partículas suspendidas en un líquido. Cuanto más grande sea la partícula, más lento será el movimiento browniano.

Las partículas más pequeñas son “chocadas” por las moléculas de disolvente y se mueven con mayor rapidez. La velocidad del movimiento browniano se define por una propiedad conocida como el coeficiente de difusión (D) siendo necesario conocer la viscosidad de la muestra.

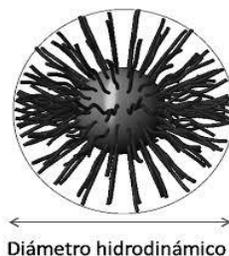


Figura 5: Representación del diámetro de una nanopartícula metálica.

1.8 Péptidos sintéticos comoagentes terapéuticos

En sentido químico, los péptidos son compuestos formados por unidades monoméricas llamadas aminoácidos, los cuales se unen entre sí mediante un enlace amídico, más conocido como peptídico. Estos aminoácidos son insolubles en disolventes no polares, pero muy solubles en agua. Existen 20 tipos de aminoácidos diferentes que son los que forman las proteínas. Todos ellos tienen como base estructural un grupo carboxílico (-COOH) y un grupo amino (-NH₂) unidos al mismo átomo de carbono denominado α , al cual también están unidos un hidrógeno y una cadena lateral específica, la que les confiere sus propiedades químicas particulares a cada aminoácido.

Los avances recientes en la proteómica así como el desarrollo de metodologías de síntesis química de péptidos han acelerado el descubrimiento de nuevos compuestos peptídicos que se han convertido en agentes terapéuticos.^{13,14}

Los péptidos presentan determinadas características que los aventaja respecto a otros productos terapéuticos.¹⁶ Por su tamaño, estos tienen mejor capacidad para llegar a los tumores y órganos que las proteínas recombinantes y anticuerpos debido a su menor tamaño.^{15,16} Si se comparan con moléculas orgánicas

pequeñas que se emplean como medicamentos convencionales, los péptidos generalmente presentan mayor eficacia, selectividad y especificidad (baja unión inespecífica a estructuras moleculares diferentes a sus blancos moleculares), ya que pueden corresponder a una pequeña región funcional de una proteína.^{17,18} Los productos de degradación son aminoácidos u otros péptidos más pequeños, por lo que minimiza el riesgo de toxicidad sistemática por interacción fármaco-fármaco¹⁹. Además, se acumulan poco en los tejidos y órganos debido a los cortos tiempos de vida media, lo cual evita el riesgo de complicaciones debido a sus metabolitos.²⁰ La mayoría de los péptidos terapéuticos se derivan de péptidos naturales y son agonistas de receptores²¹ por lo que se requiere poca cantidad y menores dosis de péptido agonista para activar el receptor de interés.

Sin embargo, los péptidos presentan desventajas para su uso como productos terapéuticos^{20, 22} debido a la baja biodisponibilidad oral. Determinada por sus propiedades físico-químicas y la baja estabilidad metabólica, lo que hace necesario su administración parenteral. Estos tienen un tiempo de vida media corta debido a que son rápidamente degradados por enzimas del sistema digestivo o del plasma sanguíneo y son rápidamente eliminados por el hígado y los riñones. También presentan poca capacidad para atravesar las barreras fisiológicas debido a su hidrofiliidad y alta flexibilidad conformacional, lo que afecta su actividad biológica *in vivo*²⁰.

Generalmente, es necesario modificar químicamente la estructura del péptido para obtener variantes optimizadas con propiedades terapéuticas mejoradas. La estrategia de optimización de un péptido terapéutico se basa en estudios cuantitativos de la relación estructura-actividad de los péptidos modificados con el objetivo de mejorar su biodisponibilidad, reducir la eliminación por el hígado y los riñones y, aumentar la resistencia a la biodegradación e incrementar la selectividad o la afinidad por su receptor o blanco biológico²⁰.

La baja estabilidad metabólica de los péptidos se ha solucionado con el desarrollo de varias estrategias que los hacen menos sensibles a la degradación enzimática en fluidos biológicos.²⁰ Entre las estrategias más utilizadas se encuentran la

introducción de D-aminoácidos¹³, la reducción del enlace amida²⁰, la introducción de aminoácidos impedidos estéricamente que hacen menos flexible el péptido²³; y la unión covalentemente al PEG (Peguilación)^{33,41} y a nanopartículas. Esta última estrategia ha sido utilizada en el presente trabajo.

1.8.1 Uso del análogo peptídico de Raf como agente antitumoral para la terapia de cáncer.

Un péptido empleado como agente antitumoral para una potencial terapia de cáncer es el denominado péptido análogo de Raf (GISNGFGFK). Este péptido inhibe la proliferación celular impidiendo la interacción entre Rb y Raf-1. Este análogo de Raf está formado por los 9 aminoácidos pertenecientes al sitio de interacción entre Raf-1 y la proteína Rb⁴.

1.8.2 Uso de biomoléculas para el direccionamiento selectivo de las nanopartículas hacia las células tumorales.

Para lograr que una nanopartícula llegue selectivamente hacia un blanco terapéutico, se pueden emplear diversas biomoléculas que pueden unirse a receptores que se encuentran sobre expresados en células tumorales. Uno de estos receptores es el de la Bombesina (BN) de secuencia CQWAVGHLM del cual hay estudios que avalan la sobreexpresión de éste en células tumorales, por ejemplo, en cáncer de próstata. Sobre este conocimiento de sobreexpresión, se han diseñado sistemas compuestos por nanopartículas de oro funcionalizadas con péptidos análogos a BN. Se comprobó que dichos sistemas aumentaban la especificidad en cuanto al reconocimiento e internalización de las NPs en células tumorales, por sobre las células control. Es más, se han construido ligandos híbridos que en su estructura llevan unidos péptidos agonistas y antagonistas

para el receptor BN, demostrando obtener una tasa aumentada de ingreso a las células, además de incrementar el tiempo de retención de las estructuras al interior celular.^{45,46}

1.9 Síntesis Química de Péptidos. Principios generales

Actualmente, la elección para la obtención de péptidos entre 5 y 50 aminoácidos es la síntesis química^{42,43,44} ya sea en fase sólida²⁵ o en fase líquida²⁶ o mediante una combinación de las dos estrategias²². La industria farmacéutica ha podido satisfacer la creciente demanda de las moléculas gracias al surgimiento de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, del inglés: Solid phase peptide synthesis)²⁵ y al desarrollo acelerado de los métodos de síntesis química.

Antes del surgimiento de la SPPS, los péptidos se sintetizaban por métodos clásicos en disolución, lo que permitía la obtención de grandes cantidades de péptidos con alta pureza, pero dichos métodos eran tediosos, lentos, y requerían de una alta especialización. Se necesitaba la purificación y la caracterización de cada intermediario peptídico protegido, lo cual se hacía muy engorroso y difícil debido a la baja solubilidad que presentan estos fragmentos²⁷. La introducción de la SPPS en 1963 por Merrifield B.²⁵ revolucionó el campo de la química de péptidos y de sus aplicaciones. Con esta metodología y su automatización, el tiempo requerido para la síntesis de péptidos disminuyó considerablemente. La SPPS consiste en acoplar covalentemente el aminoácido correspondiente al extremo C terminal de la secuencia a un soporte insoluble y alargar la cadena péptidos desde este residuo-soporte por incorporación de los restantes aminoácidos a través de pasos sucesivos de acoplamiento del aminoácido protegido y desprotección del grupo α -amino. En la Figura 6 se presenta el esquema general empleado para la SPPS. Se utiliza un sistema de protección de los grupos reactivos de los aminoácidos para lograr alta especificidad en la síntesis. Se emplea una protección temporal para el grupo α -amino, la que se elimina en cada paso de desprotección y una protección permanente para los

grupos reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos, la cual se elimina al final de la síntesis. El empleo de un exceso de reactivos garantiza la alta eficiencia de cada reacción, los reactivos no consumidos se eliminan fácilmente mediante procesos de lavados y filtraciones al vacío²⁸. Cuando se completa la secuencia peptídica, los grupos protectores de las cadenas laterales se eliminan y el péptido se separa del soporte sólido (proceso de desanclaje). Existen dos métodos generales para la SPPS, la síntesis por pasos (Figura 6) y la síntesis convergente²⁸. La síntesis por pasos es el método más eficiente para obtener péptidos que no excedan los 40 residuos. La síntesis convergente se utiliza para obtener péptidos más largos.^{19,27}

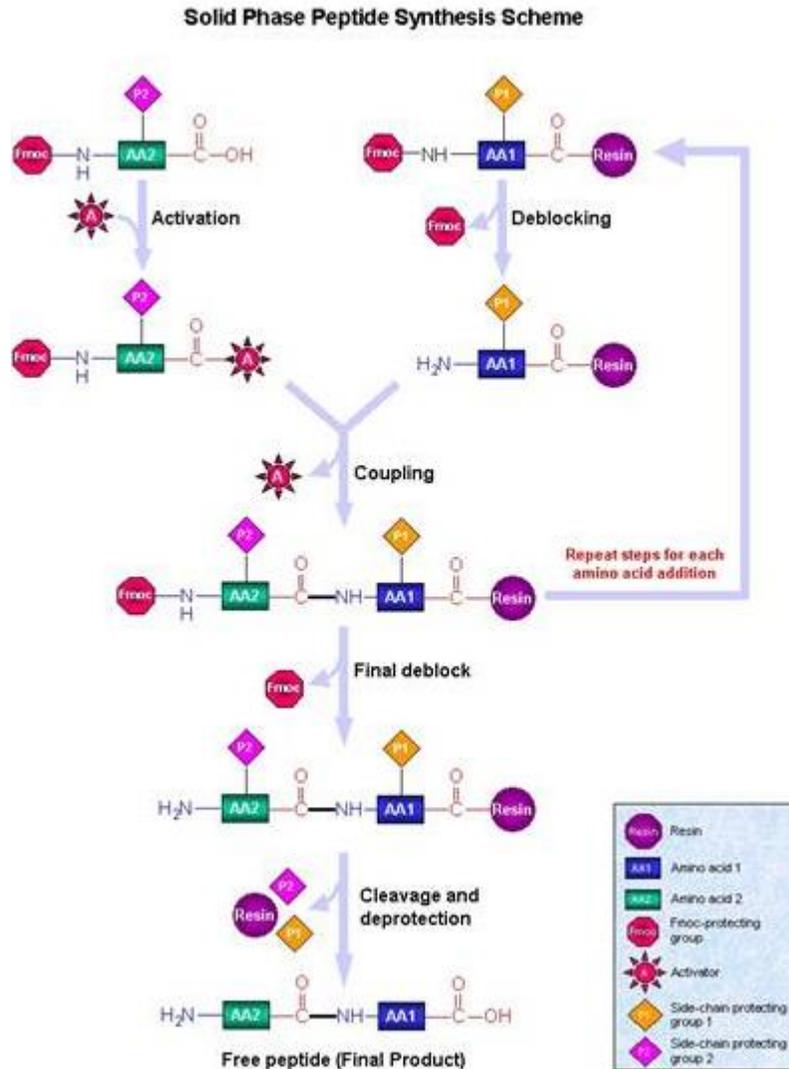


Figura 6: Esquema general de síntesis de péptidos en fase sólida.

1.9.1 Metodología de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida. Esquemas de Protección.

La selección del grupo protector del α -amino (N^α) de los aminoácidos (protección temporal) determina la selección de los grupos protectores de las cadenas laterales (protección permanente) así como del espaciador y del enlace a la resina. En la actualidad existen varios grupos N^α -protectores, los más populares son el grupo tert-butiloxycarbonilo (Boc) que es lábil en medio ácido y el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) que es lábil en medio básico (Figura 7)

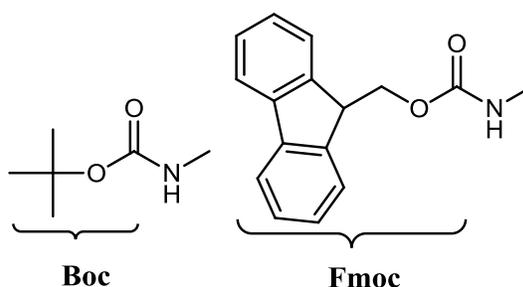


Figura 7: Grupos más utilizados para la protección temporal del grupo α -amino.
Boc (grupo tert-butiloxycarbonilo) y Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo).

Existen dos químicas generales de síntesis, la química conocida como Boc-Bencilo (Boc/Bzl)^{26,27} y la química Fmoc-tert-butilo (Fmoc/tBu)^{30,33}. En este trabajo se ha utilizado esta última estrategia.

1.9.2 Química Fmoc/tBu

La química Fmoc/tBu emergió como el ejemplo de un esquema de protección ortogonal donde la eliminación de los grupos protectores se logra en orden diferente y por diferentes mecanismos.³⁰ La química Fmoc estándar es ortogonal en dos dimensiones: eliminación del grupo Fmoc por una base y desprotección de las cadenas laterales/separación del péptido de la resina por acidólisis. La ortogonalidad puede extenderse a tres o cuatro dimensiones (Figura 8), al usar grupos protectores más especializados y espaciadores que se eliminen con el empleo de Pd^0 , luz ultravioleta, tioles, iones metálicos, hidracina u otros mecanismos^{31,32}. Debido a que los esquemas ortogonales permiten la eliminación independiente de los grupos protectores, es posible la síntesis de moléculas más complejas²⁸. Los esquemas ortogonales de protección son menos agresivos, ya que basa la desprotección selectiva en mecanismos alternativos, en lugar de velocidades de reacción²⁸

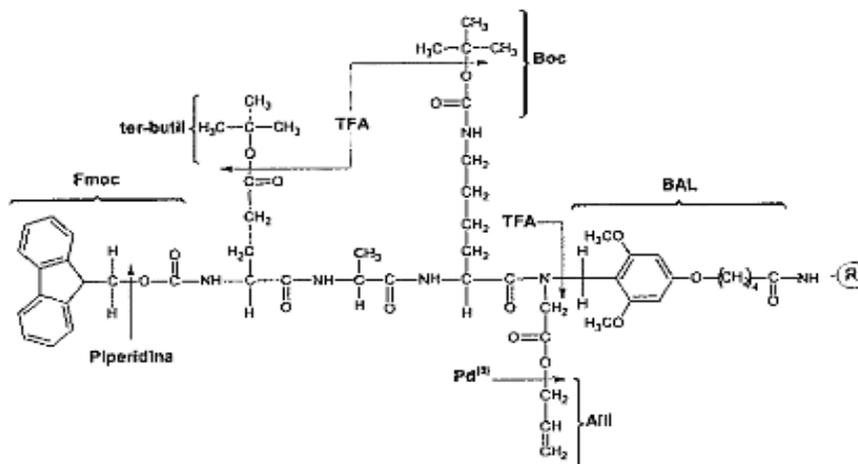


Figura 8: Esquema ortogonal triple representativo para la química Fmoc/tBu con el uso de una resina tipo BAL (del inglés: Backbone amide linker). Las flechas señalan los sitios de corte de la piperidina, el TFA y el Pd^0 para eliminar las protecciones temporales y permanentes introducidas durante la SPPS.

En la química Fmoc/tBu, el grupo protector N^α-Fmoc se elimina eficientemente por tratamiento con aminas secundarias, pero también se pueden emplear aminas primarias o terciarias. La más empleada es una disolución entre 20-50% de piperidina en dimetilformamida (DMF) o una disolución de 2% de 1,8-diazabicyclo (5,4,0)undec-7-eno (DBU) en DMF con 2% de piperidina³³. En la protección de las cadenas laterales de los aminoácidos se utiliza fundamentalmente grupos del tipo tert-butilo (uretano, éster y éter). También se emplea el grupo tritilo (Trt), el 2,2,5,7-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pme), 2,4,6-trimetoxibencilo (Tmob) y otros grupos protectores específicos²⁸. La eliminación de todos estos grupos se realiza con TFA en presencia de agentes nucleofílicos adecuados que capturan carbocationes que se generan. No es necesario el uso de ácidos fuertes como el HF líquido, ya que el tratamiento con TFA es suficiente para eliminar los grupos protectores y separar el péptido del soporte sólido. Existen otros grupos protectores, como el Acn (acetamidometilo) y el aliloxicarbonil (Alloc) que son compatibles con la técnica Fmoc, pero son estables a las condiciones del desanclaje y pueden ser eliminados antes o después del desanclaje³¹. El Alloc se elimina mediante una reacción de transferencia del grupo alilo a un nucleófilo catalizado por Pd⁰.

1.9.3 El soporte sólido

Las ventajas fundamentales de la SPPS respecto a la síntesis en disolución están dadas por la presencia de un soporte polimérico insoluble, el cual permite la fácil separación de los solventes y reactivos por simples procesos de filtración o centrifugación. Para que un soporte sólido sea útil en la SPPS debe ser inerte a todos los reactivos y disolventes utilizados en la síntesis, debe tener alta capacidad de hinchamiento, ser altamente poroso y debe ser posible su modificación química, de forma tal que el aminoácido correspondiente al extremo carboxilo del péptido pueda acoplarse al soporte por un enlace covalente. Desde la introducción del soporte de poliestireno entrecruzado con 2% divinilbenceno, se han desarrollado una gran variedad de soportes sólidos que han tenido impacto en la síntesis de secuencias peptídicas complejas y en desarrollo de la

química combinatoria y la síntesis orgánica en fase sólida. Los soportes “tipo gel”, tales como las resinas de PS, las resinas de poliacríamida y las resinas basadas en PEG, son los más empleados para la SPPS. Se caracterizan por tener los grupos funcionales uniformemente distribuidos a través de la red polimérica lo cual es importante para la síntesis de péptidos. El nivel de funcionalización del soporte puede ajustarse para lograr buena eficiencia en la síntesis y alto rendimiento final del péptido. La red polimérica es flexible y se puede expandir o contraer y acomodar el péptido en crecimiento dentro del gel. Se han propuesto y evaluado otros tipos de soportes, tales como fibras de celulosa (algodón y papel), PSaltamente poroso, vidrio de poro controlado y sílica, pero su aplicación en la SPPS no se ha generalizado.

1.9.4 Resinas de poliestireno

Los soportes sólidos basados en poliestireno (PS), (Figura 9) son los más utilizados en la SPPS. Son resinas sintéticas preparadas por copolimerización de estireno con 1-2% de divinilbenceno. Estas resinas tienen una alta estabilidad mecánica y se hinchan en disolventes no polares como tolueno y DCM. Además, pueden incluir una gran variedad de grupos funcionales. Tienen suficiente estabilidad mecánica para permitir la rápida filtración al vacío. Se pueden obtener con un grado de sustitución de 0.3 a 1.2 mmol de grupos funcionales/g de resina²⁷.

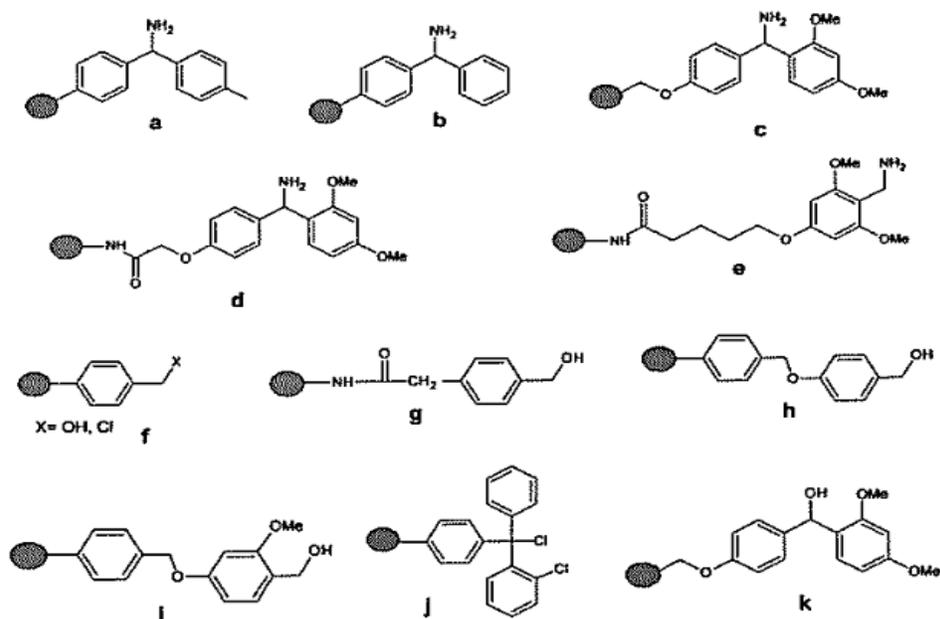


Figura 9: Resinas de PS más empleadas en SPPS (a) Resina BHA, (c,d) Resina Rinkamida, (e) Resina PAL, (f) Resina de Merrifield, (g) Resina PAM, (h,i) Resinas tipo Wang, (j) Resina Cl-Tritilo, (k) Resina Rink.

La resina Cloruro de 2-clorotritilo es una resina de poliestireno. Es ideal para péptidos con el C-terminal ácido. Se puede utilizar además para anclar imidazoles, alcoholes, fenoles, aminas, PEG-amino, hidroxilaminas. La incorporación del primer aminoácido se produce por sustitución nucleofílica lo que minimiza la racemización y la formación de DKP (Diketopiperazina). En este trabajo se ha utilizado esta resina para la síntesis de los péptidos. (Figura 10)

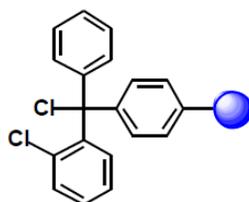


Figura 10: Resina de Cloruro de 2-clorotritilo

1.9.5 Ensamblaje de la Secuencia peptídica. Acoplamiento del primer aminoácido al soporte sólido. Espaciadores

La unión entre el péptido y la resina debe ser estable frente a los tratamientos para eliminar el grupo N^α-protector y para acoplar el aminoácido en cada ciclo de síntesis, pero a su vez debe tener una labilidad tal que permita la separación final del péptido sin que dañe la secuencia aminoacídica²⁷. El acoplamiento generalmente se logra mediante un enlace éster o amida entre el aminoácido del extremo C de la secuencia y la resina, de manera que permita la liberación del péptido con su extremo C en forma de ácido o de amida. El procedimiento más simple es acoplar el primer aminoácido directamente al soporte sólido funcionalizado o a través de un espaciador. Los espaciadores son compuestos bifuncionales que aportan mayor flexibilidad y amplían el rango de aplicación de las resinas a nuevas reacciones y disolventes. Pueden diseñarse de forma tal, que modifiquen las propiedades de la unión péptido-resina, la cual puede hacerse más o menos lábil a los reactivos en dependencia del tipo de síntesis que se va a desarrollar. Entre los espaciadores más utilizados se encuentran los de tipo BAL, el AM [ácido 4-(2,4-dimetoxibencil) fenoxiacético] y el PAL [ácido 5-(4-aminometil-3,5-dimetoxifenoxi) pentanoico]²⁷.

1.9.6 Métodos de acoplamiento

Los métodos de acoplamiento han tenido un desarrollo acelerado debido a la necesidad de preparar secuencias largas o incorporar aminoácidos no-naturales impedidos estéricamente^{27.31}. Las técnicas de acoplamiento deben ser eficientes y confiables. Se debe mantener la integridad conformacional cuando el componente carboxílico contenga un centro quiral en la posición alfa. Existen dos clases de técnicas de acoplamientos, una que requiere de la activación *in situ* del ácido carboxílico y la que emplea una especie activada que ha sido previamente preparada, aislada, purificada y caracterizada.

1.9.7 Carbodiimidas

Las carbodiimidas (Figura 11) fueron los reactivos de acoplamiento más utilizados hasta mediados de los años 80. La *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (Figura 11a) se emplea principalmente en la química Boc/Bzl. La *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) (Figura 11b) se utiliza tanto en la química Boc/Bzl como Fmoc/tBu. Para la síntesis en disolución se emplea la carbodiimida soluble 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (Figura 11c) cuya urea es soluble en mezclas de disolventes acuosos.

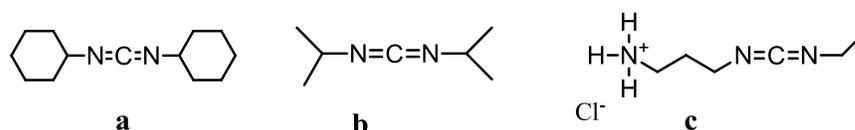


Figura 11: Estructuras de las carbodiimidas más utilizadas en síntesis de péptidos. (a) *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), (b) *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), (c) 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).

El mecanismo de activación con carbodiimida es complejo y extremadamente dependiente del disolvente empleado (Figura 12). El primer paso consiste en la transferencia de un protón, seguido por la adición del ácido carboxílico para formar la *O*-acilisourea (Figura 12-1). Este es un intermediario muy reactivo que ataca al grupo amino del aminoácido para formar la amida correspondiente. Además, puede experimentar un reordenamiento para dar la *N*-acilurea (Figura 12-2), la cual es inactiva, o atacar a otro ácido carboxílico para formar el anhídrido simétrico (Figura 12-3). La *O*-acilisourea reactiva puede enolizarse o puede formar la 5(4H)-oxazolona por una ciclización intramolecular (Figura 12-4), lo que provoca la pérdida de quiralidad. La 5(4H)-oxazolona sólo se forma si existe un enlace amida vecino al grupo carboxílico activado.

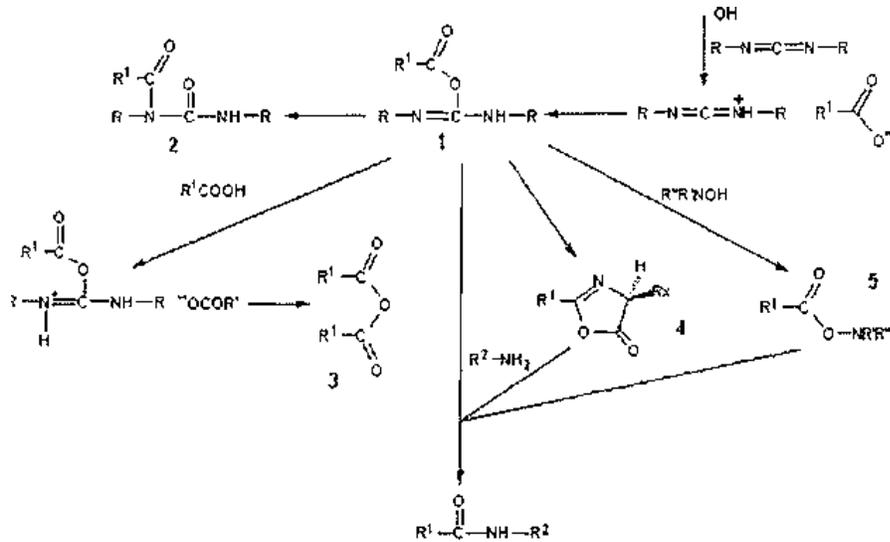


Figura 12: Mecanismo de formación del enlace amida mediante la activación por carbodiimidas. (1) O-acilisourea, (2) N-acilurea, (3) anhídrido simétrico, (4) 5(4H)-oxazolona, (5) éster activo.

Muchas de las reacciones colaterales que ocurren cuando la activación se realiza solamente con carbodiimidas se pueden evitar con la introducción de derivados de la hidroxilamina ($\text{R}'\text{R}'\text{NOH}$) en la mezcla de reacción. Estos compuestos interceptan los intermediarios muy reactivos de O-acilisourea, formando un agente acilante menos reactivo y más estable (Figura 2-5), pero que es suficientemente potente para permitir la rápida formación del enlace amida²⁷.

1.9.8 Caracterización de Péptidos Sintéticos

La metodología más empleada para determinar la pureza de los péptidos sintéticos es RP-HPLC en columnas con matriz de fase reversa C18, aunque también se pueden emplear la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de exclusión molecular y la electroforesis capilar.

La identidad de los péptidos sintéticos se determina por espectrometría de masas (MS, del Inglés: *Mass spectrometry*). Los métodos de ionización que más se han empleado para la caracterización de los péptidos sintéticos son la ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB, del Inglés: *Fast atom bombardment*), la

ionización por electronebulización (ESI, del Inglés: *Electrospray ionization*) y el MALDI. El empleo del espectrómetro de masa (MS) permite además la identificación de las impurezas peptídicas que se generan durante la síntesis, ya sea la presencia de péptidos truncados, péptidos a los que les falta uno o varios aminoácidos, péptidos protegidos que se obtienen por un proceso ineficiente de desanclaje y las modificaciones debidas a reacciones colaterales. Esta técnica es imprescindible para corroborar la ocurrencia de las modificaciones que se introducen de manera intencional en un péptido sintético con el objetivo de mejorar sus propiedades biológicas.

1.9.9 Purificación de péptidos sintéticos

La metodología generalizada para la purificación de los péptidos sintéticos es RP-HPLC en columnas con matriz de fase reversa C8 y C18. En el proceso de purificación se emplean gradientes ascendentes del disolvente orgánico (acetonitrilo o isopropanol) en la fase móvil, lo que permite una eficiente separación del péptido y sus impurezas. Se emplean ácidos como formadores de pares iónicos, como el TFA, el ácido heptafluorbutírico y el ácido acético, cuya principal función es formar un par iónico con los grupos amino

del péptido lo que mejora la resolución y evita la interacción inespecífica con los grupos silanoles de la matriz cromatográfica.

1.10 Conjugación de péptidos a Polietilenglicol (PEG)

La peguillación es una tecnología bien establecida para transformar proteínas, péptidos, oligonucleótidos y moléculas más pequeñas en compuestos con propiedades farmacológicas mejoradas respecto a la molécula sin modificar. La peguillación es un proceso por el cual una o más moléculas de PEG activado reaccionan químicamente con una biomolécula, para producir una nueva entidad

molecular con mejoradas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas⁷. Las biomoléculas modificadas con PEG muestran un incremento de la estabilidad y solubilidad, reducida eliminación renal, mayor tiempo de vida medio en sangre, mayor resistencia a la degradación proteolítica y un decrecimiento de la inmunogenicidad y antigenicidad, lo que permite el mejoramiento de las propiedades terapéuticas⁷. La peguillación puede disminuir la actividad biológica de la molécula medida en ensayos *in vitro*⁷. Sin embargo, incrementan la efectividad en los ensayos *in vivo*, con respecto a la molécula sin modificar.

1.10.1 Propiedades del PEG

El PEG es un polímero sintético polidisperso, cuya unidad monomérica lo constituye el óxido de etileno y puede ser de diverso número de unidades monoméricas. En esta memoria se empleó un PEG de masa molecular (MM) de aproximadamente 44 Da. Está compuesto por moléculas que tienen diferente número de monómeros, lo que produce una distribución gaussiana de la MM. Contiene dos grupos terminales hidroxilos que pueden ser químicamente activados o uno de ellos ser bloqueado con un grupo metóxido para obtener el PEG monofuncional. El PEG es soluble en disolventes acuosos y orgánicos, es inerte, no tóxico y no inmunogénico, la velocidad de excreción del organismo es dependiente de la talla y fue aprobado para uso en humanos⁷.

Una limitación que ha presentado el PEG es que su polidispersión hace que se obtengan poblaciones de conjugados con propiedades biológicas diferentes, que incide principalmente en el tiempo de vida medio. Además hace más compleja la caracterización del conjugado y el control de calidad necesario para aplicaciones clínicas. En la actualidad se han desarrollado metodologías para la obtención de PEG monodisperso, que permiten solucionar los problemas asociados al empleo de PEG polidisperso en la obtención de conjugados, pero sólo se han obtenido PEG con MM de hasta aproximadamente 4000 Da.

1.10.2 Peguización en Fase Sólida.

La química para la peguización de los péptidos también tiene la ventaja adicional que se puede realizar sobre la misma superficie de la AuNP, donde el grupo tiol del PEG se quimioabsorbe a la superficie de la AuNP. La unión del PEG a los grupos amino primarios (extremo N y ϵ -amino de la Lys) de los péptidos con el empleo de las metodologías de síntesis en fase sólida, ha sido anteriormente descrito^{35,36,37}. La peguización en el extremo C del péptido se realiza usualmente por la unión al soporte sólido de un aminoácido derivatizado previamente con el PEG³⁹ o por la introducción de aminoácidos especiales que permitan la introducción del PEG en fase sólida, mediante reacciones químicas específicas⁴⁰.

1.20 Funcionalización de nanopartículas de oro con PEG y conjugación con péptidos bioactivos.

Para aumentar la afinidad, manteniendo la estabilidad y evitando la interacción con proteínas, se funcionalizarán las AuNP-e con el espaciador bifuncional HS $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (HS-PEG-COOH) donde $n=100$. El HS-PEG-COOH se quimisorberá sobre la superficie de las nanopartículas debido a la fuerte interacción azufre-oro reemplazando así las moléculas de citrato. El primero se empleará para estabilizar por efecto estérico a las nanopartículas y el segundo se empleará para realizar posteriormente la reacción de conjugación con los péptidos análogo de Raf-1 y BN, mediante la reacción de acoplamiento empleando carbodiimida (EDC/NHS).

Es muy importante determinar la estabilidad de los conjugados PEG-péptidos anclados a las AuNP cuando estas se encuentran en medios de relevancia biológica como el tampón PBS medio biológico ya que estas nanopartículas se emplearán para aplicaciones biológicas.

En este trabajo se propone la multifuncionalización de AuNP-e con moléculas de PEG-Raf, péptido posee actividad antitumoral, y el péptido BN que aporta selectividad aumentando la internalización celular de las nanopartículas.

II. Hipótesis

La funcionalización de nanopartículas de oro con el espaciador HS-PEG-COOH y la conjugación con el péptido Raf permite obtener conjugados estables en PBS.

III. Objetivos

3.1 Objetivos Generales:

Multifuncionalizar AuNP-e con HS-PEG-COOH y con el péptido Raf y evaluar la estabilidad de los conjugados obtenidos en medio biológico.

3.2 Objetivos Específicos:

- 1.- Sinterizar y caracterizar los péptidos Raf y BN
- 2.- Sintetizar y caracterizar AuNP-e de aproximadamente 10 nm.
- 3.-Funcionalizar las AuNP-e con el HS-PEG-COOH y conjugarla con el péptidos Raf.
- 4.- Evaluar la estabilidad coloidal de las AuNP-PEG-Raf en un medio de relevancia biológica.

IV. Metodología

4.1 Materiales

4.1.1 Reactivos utilizados en la síntesis de péptidos Raf y Bombesina.

- Cloruro de 2-clorotritilo 200 mg,loading 1.0-1.6 mmol/g, Iris-Biotech
- DIEA (diisopropiletilamina. Sigma-Aldrich)
- Oxima (Iris-Biotech)
- DMF (dimetilformamida. Sigma-Aldrich)
- DIC (diisopropilcarbodiimida. Sigma-Aldrich)
- Ninhidrina (Merck)
- Piperidina 20% (Sigma)

- Metanol (Merck)

4.1.2 Reactivos utilizados en la síntesis de AuNP-e

- Acido tetracloroáurico monohidratado $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 99.9%, Sigma-Aldrich
- Citrato trisódicodihidratado, 99%, Sigma Aldrich
- Agua Mili-Q.

4.1.3 Reactivos utilizados en la funcionalización de AuNP-e con HS-PEG- COOH

- Nanoparticulas AuNP-e
- PEG (polietilenglicol), Sigma-Aldrich.
- Agua Mili-Q

4.1.4 Reactivos utilizados en la evaluación de la estabilidad del conjugado.

- AuNP-e
- PEG (Sigma-Aldrich).
- Citrato trisódico (Sigma-Aldrich).
- N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC), Merk
- N-Hidroxisuccinimida (NHS), Merck
- Péptido Raf completo protegido

4.2 Síntesis de péptidos en fase sólida

4.2.1 Consideraciones Generales de la Síntesis

La síntesis de los péptidos se realizó de manera manual en jeringas de polipropileno con un filtro de polietileno poroso. Para la agitación se utilizó una varilla de teflón. La eliminación de disolventes, reactivos y posibles subproductos formados durante el acoplamiento se realizaron mediante filtración. El sistema utilizado para realizar los lavados por filtración al vacío se muestra en la figura 13.



Figura 13: Imagen del equipo empleado para la síntesis manual de péptidos en fase sólida.

4.2.2 Test Cualitativo de Kaiser o Ninhidrina

El test cualitativo de ninhidrina, desarrollado por Kaiser, es el test más utilizado para determinar la presencia o la ausencia de grupos amino libres ya que se trata de un test rápido y sencillo.

Para realizar el ensayo se tomó una pequeña muestra de peptidil-resina resina seca (1-2 mg) y se colocó en un tubo de vidrio. Se añadieron 3 gotas de reactivo A y 3 gotas de reactivo B. A continuación se calentó el tubo en la estufa a 110°C

durante 3 minutos. Pasado el tiempo se enfrió y se observó la coloración que había tomado la disolución. Una coloración amarilla indica la ausencia de aminas primarias (test negativo), lo que indica que al menos el 95% de los puntos funcionales han sido bloqueados. Por el contrario, una coloración azul-verdosa (test positivo) indica la presencia de aminas primarias. En paralelo se realiza un ensayo control que contiene la misma proporción de reactivos sin presencia de peptidil-resina. Es posible, sin embargo, que algunos aminoácidos, como la serina, el ácido aspártico o la asparagina no den la coloración azul oscuro que se espera cuando existen grupos amino libres.

Los reactivos se prepararon de la manera que se detalla a continuación:

Reactivo A: se preparó una disolución en caliente de fenol (40 g) en etanol absoluto (10 mL). Por otro lado, se añadieron 2 mL de una disolución de cianuro de potasio (65 mg) en agua (100 mL) sobre 100 mL de piridina. A ambas mezclas se les añadieron 4 g de resina Amberlite MB-3 y se agitaron durante 45 minutos. Seguidamente se filtraron y se mezclaron las dos disoluciones.

Reactivo B: se preparó una disolución de Ninhidrina (2.5 g) en etanol (50 mL).

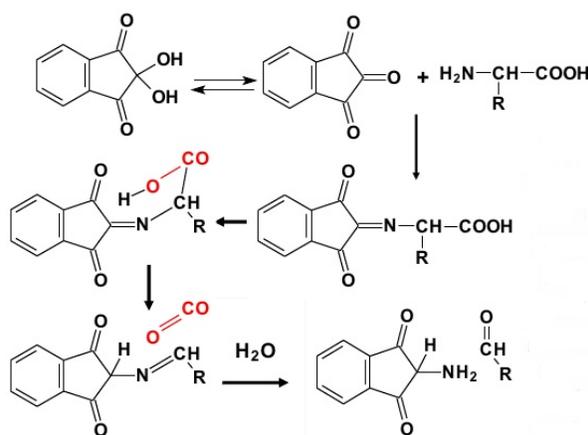


Figura 14: Mecanismo de reacción del test de Ninhidrina con un aminoácido.

4.2.3 Eliminación del grupo Fmoc

En la mayoría de los casos y de forma rutinaria se emplea la piperidina como base para liberar el grupo Fmoc y la comprobación de esto se realiza mediante test de Ninhidrina.

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo (min) x N° Repeticiones
1	Piperidina : DMF (2:8)	Eliminación Grupo Fmoc	5x2
2	DMF	Lavado (Resina)	1 x 2
3	Comprobar mediante test de Ninhidrina la presencia de grupos aminolibres (Test Positivo)		

Tabla 1: Cuadro resumen de la eliminación del grupo Fmoc

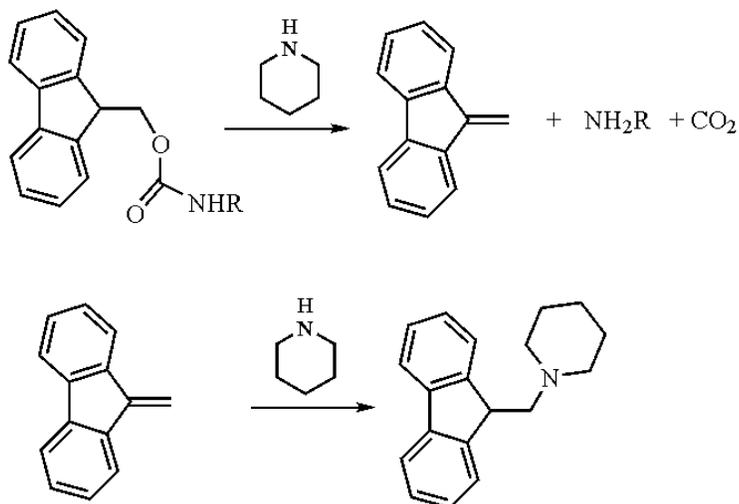


Figura 15: Mecanismo de reacción para la liberación del grupo Fmoc. (NH₂R: aminoácido)

4.3 Síntesis del análogo de Raf.

4.3.1 Incorporación del primer aminoácido Lisina (Lys) a la resina (2-Cl-Tritilo)

La resina se lavó con 3 mL DMF y 3 mL DCM ciclo que se repitió tres veces. De esta forma se hincha y se comprime la resina, respectivamente, eliminando residuos que puedan interferir en la síntesis del péptido. Se agregó el primer aminoácido Lys con protección Fmoc de acuerdo a la carga de la resina que fue de 1.0 mmol/g. Posteriormente, la Lys fue disuelta en 1 ml de DMF agregándose sobre la resina recién lavada junto con 54 µL de DIEA. Se agitó durante 5 minutos agregándole un exceso de DIEA de 340 µL más, para convertir el COOH en carboxilato. Se dejó en agitación durante 1 hora. Una vez terminada la agitación se agregó metanol para bloquear los puntos de la resina en los cuales no hubo unión con la Lys (ver tabla 2). Se procedió al lavado alternado con DMF/DCM. Se realizó test de Ninhidrina para asegurar el acople del aminoácido (color amarillo). Después de esta comprobación se realizó el lavado con 5 mL de piperidina 20% en DMF para dejar el amino α libre de la Lys acoplada y se comprobó nuevamente con test de Ninhidrina (coloración azul). Se lavó alternadamente con DMF/DCM para la eliminación de la piperidina con el grupo Fmoc. Se procedió a la adición del segundo aminoácido.

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempos
1	Fmoc-Lys, DIEA 54 µL y 340 µL exceso DIEA, MeOH 160 µL	Acoplamiento de la Lys	1 x 60 min.
2	DMF/DCM	Lavado	2 x 1 min.
3	Ninhidrina	Test de acople Lys	1 x 5 min.
4	20 % Piperidina/DMF 5 mL	Desprotección del grupo Fmoc de la Lys	2 x 5 min.
5	DMF/DCM	Lavado	2 x 1 min.
6	Ninhidrina	Verificar la presencia grupo NH ₂ libre	1 x 5 min.
7	DMF/DCM	Lavado resina	2 x 1 min.
8	Reacoplamiento segundo aminoácido		

Tabla 2: Esquema de la adición del primer aminoácido Lys

4.3.2 Incorporación del segundo aminoácido Fenilalanina (Phe)

Una vez que se desprotegió el grupo protector Fmoc del primer aminoácido (Lys) quedando en grupo amino α libre se agregó el segundo aminoácido. Se disolvió la Phe en 1 mL de DMF con 85 mg de oxima que evita la racemización y 93 μ L de Diisopropilcarbodiimida (DIC) para activar el grupo carboxílico. Se dejó en reacción durante 90 minutos. Terminada la reacción se lavó alternadamente con DMF y DCM. Se agregó solución 20% piperidina/DMF para dejar el amino- α libre de la Phe comprobándose con el test de Ninhidrina (color azul). Se lavó alternadamente con DMF/DCM para la eliminación del exceso de piperidina con el grupo Fmoc.

Etapas	Reactivos	Operación	Tiempos
1	Fmoc-Phe, oxima 85mg, 1ml DMF, 93 μ l DIC .	Acoplamiento de la Phe	1 x 90 min.
2	DMF/DCM	Lavado	2 x 1 min.
3	20 % Piperidina/DMF 5 mL	Desprotección del grupo Fmoc de la Phe	2 x 5 min.
4	Ninhidrina	Verificar la presencia grupo NH ₂ libre	1 x 5 min.
5	DMF/DCM	Lavado resina	2 x 1 min.
6	Reacoplamiento tercer aminoácido		

Tabla 3: Esquema de la adición del segundo aminoácido Phe.

Esta secuencia se repite hasta completar la elongación final del péptido Raf usando las cantidades de aminoácidos como se muestra en la tabla 4.

Raf: $\text{H}_2\text{N-Gly-Ile-Ser-Asn-Gly-Phe-Gly-Phe-Lys-OH}$

Aminoácido	Lys	Phe	Gly	Phe	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly
Carga de aa en mg	93,7	77,5	178,3	232,4	178,3	358,0	230,0	212,0	178,3

Tabla 4: Carga de los aminoácidos en la síntesis del péptido

4.3.3 Liberación del péptido Raf de la resina.

La liberación del péptido de la resina se realizó en una sola etapa en medio ácido. El desanclaje final del péptido de la resina se llevó a cabo con Ácido Trifluoroacético (TFA) en una mezcla al 1% TFA/DCM.

La resina se lavó con porciones de 5 mL de la mezcla ácida durante un minuto repitiendo estos lavados durante 7 veces (figura 16).

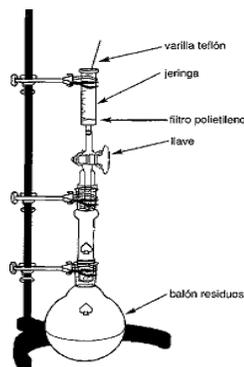


Figura 16: Esquema de lavado para escindir el péptido de la resina, mediante la adición de una solución de 1 % TFA/DCM.

Una vez terminado este procedimiento se llevó el balón al rotovapor para eliminar el DCM. Al péptido crudo se agregaron 6 mL de una solución de 10% ACN/H₂O. Una vez disuelto el péptido la solución es congelada en N₂ líquido para su posterior liofilización y caracterización.

4.4 Síntesis de Bombesina

4.4.1 Incorporación del primer aminoácido Metionina (Met) a la resina (2-Cl-Tritilo).

La resina se lavó con 3 mL DMF y 3 mL DCM ciclo que se repitió tres veces. De esta forma se hincha y se comprime la resina, respectivamente, eliminando residuos que puedan interferir en la síntesis del péptido. Se agregó el primer aminoácido Met con protección Fmoc de acuerdo a la carga de la resina que fue de 1.0 mmol/g. Posteriormente, la Met fue disuelta en 1 ml de DMF agregándose sobre la resina recién lavada junto con 54 µL de DIEA. Se agitó durante 5 minutos agregándole un exceso de DIEA de 340 µL más, para convertir el COOH en carboxilato. Se dejó en agitación durante 1 hora. Una vez terminada la agitación se agregó metanol para bloquear los puntos de la resina en los cuales no hubo unión con la Met (ver tabla 5). Se procedió al lavado alternado con DMF/DCM. Se realizó test de Ninhidrina para asegurar el acople del aminoácido (color amarillo).

Etapas	Reactivos	Operación	Tiempos
1	Fmoc-Met, DIEA 54 µL y 340 µL exceso DIEA, MeOH 160 µL	Acoplamiento de la Met	1 x 60 min.
2	DMF/DCM	Lavado	2 x 1 min.

3	Ninhidrina	Test de acople Met	1 x 5 min.
4	20 % Piperidina/DMF 5 mL	Desprotección del grupo Fmoc de la Met	2 x 5 min.
5	DMF/DCM	Lavado	2 x 1 min.
6	Ninhidrina	Verificar la presencia grupo NH ₂ libre	1 x 5 min.
7	DMF/DCM	Lavado resina	2 x 1 min.
8	Reacoplamiento segundo aminoácido		

Tabla 5: Cuadro resumen de la adición del primer aminoácido Met

Después de esta comprobación se realizó el lavado con 5 mL de piperidina 20% en DMF para dejar el amino α libre de la Met acoplada y se comprobó nuevamente con el test de Ninhidrina (coloración azul). Se lavó alternadamente con DMF/DCM para la eliminación de la piperidina con el grupo Fmoc. Se procedió a la adición del segundo aminoácido.

4.4.2 Acoplamiento del segundo aminoácido Leucina (Leu).

Una vez que se ha desprotegido el grupo protector Fmoc del primer aminoácido (Met) quedando el grupo amino α libre se agregó el segundo aminoácido. Se disolvió la Leu en 1 mL de DMF con 85 mg de oxima que evita la racemización y 93 μ L de DIC para activar el grupo carboxílico. Se dejó reaccionando durante 60

minutos. Terminada la reacción se lavó alternadamente con DMF y DCM. Se agregó solución 20% piperidina/DMF para dejar el amino- α libre de la Leu comprobándose con el test de Ninhidrina (color azul). Se lavó alternadamente con DMF/DCM para la eliminación del exceso de piperidina y el grupo Fmoc (ver tabla 6).

Etapas	Reactivos	Operación	Tiempos
1	Fmoc-Leu, oxima 85 mg, 1ml DMF, 93 μ l DIC .	Acoplamiento de la Leu	1 x 60 min.
2	DMF/DCM	Lavado	2 x 1 min.
3	20 % Piperidina/DMF 5 mL	Desprotección del grupo Fmoc de la Leu	2 x 5 min.
4	Ninhidrina	Verificar la presencia grupo NH ₂ libre	1 x 5 min.
5	DMF/DCM	Lavado resina	2 x 1 min.
6	Reacoplamiento tercer aminoácido		

Tabla 6: Esquema de la adición del segundo aminoácido Leu.

El procedimiento de incorporación del resto de los aminoácidos se repitió hasta completar la secuencia del péptido; **H₂N-Cys-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-OH**

4.4.3 Escisión del péptido Bombesina de la resina y eliminación de grupos protectores de las cadenas laterales.

Una vez sintetizado el péptido, éste se encuentra unido aún al soporte sólido y con las cadenas laterales protegidas. La liberación del péptido de la resina y de los grupos protectores se realizó en una sola etapa en medio ácido en presencia de capturadores de carbocationes dependiendo del tipo de grupos protectores presentes en la cadena. El desanclaje final del péptido de la resina y la posterior eliminación de los grupos protectores permanentes son llevadas a cabo con una solución de Ácido Trifluoroacético (TFA), Triisopropilsilano (TIS) y agua Mili-Q, en proporción TFA-H₂O-TIS (95:2,5:2,5), (ver figura 17).

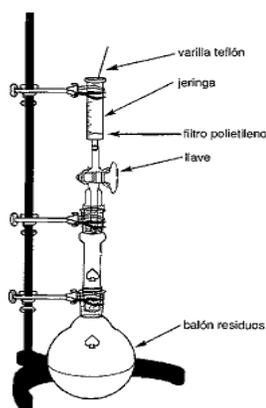


Figura 17: Imagen de la desprotección del péptido Bombesina con TFA-H₂O-TIS (95:2,5:2,5).

Para liberar el péptido de la resina y de los grupos protectores, se trata la resina con porciones de 10 mL de la mezcla ácida, lavando 3 veces la resina. La solución obtenida fue dividida en tres tubos falcón con 20 mL de éter frío.

Los tubos falcón se centrifugaron a 3.500 rpm durante 5 minutos eliminado posteriormente el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 20 mL éter frío. La solución se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el sólido fue disuelto en una mezcla de acetonitrilo-agua al 10% en acetonitrilo. La solución fue congelada con N₂ líquido, liofilizada y guardada a -18 °C para su posterior caracterización.

4.5 Síntesis de Nanopartículas de oro (AuNP-e)

Para la síntesis de nanopartículas es necesario lavar todo el material de vidrio con agua regia (HNO₃: HCl) en proporción (1:3)

Se preparó una solución acuosa de 50 ml de 1 mM de HAuCl₄ (HAuCl₄·H₂O, PM 339,79) la cual fue calentada aproximadamente por 10 minutos hasta alcanzar un reflujo constante. 10 ml de una solución de citrato trisódico dihidratado (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, PM 294,10) de concentración 38.8 mM fue adicionado rápidamente a la solución de tetracloroaúrico, previamente calentada a una temperatura entre 50 y 60°C. La solución se mantuvo a reflujo por aproximadamente 30 minutos hasta que se tornó de color rojo oscuro (figura 18). Posteriormente, la solución fue enfriada a temperatura ambiente y se ajustó a un pH 8,5 se pasa a través de un filtro de nitrocelulosa de 0,45 µm para luego almacenarla a 4°C.



Figura 18: Solución nanopartículas de oro (10 nm)

4.6 Funcionalización de las AuNP-e con PEG y Raf

Para funcionalizar las AuNP-e se preparó una solución de citrato 1,2 mM. Se colocó 1 mL de AuNP-e y 100 μ L de PEG. Se agitó y se dejó reaccionar por 48 horas. Pasado este tiempo se centrifugó a 13.500 rpm por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante (exceso de PEG). En un *ependorf* se agregó 0,25 mg de EDC en 0,5 mL de citrato 1,2 mM y en otro *ependorf* 0,184 mg de NHS en 0,5 mL de citrato 1,2 mM. Se homogenizó y se agregó en ese orden al precipitado obtenido anteriormente en la centrifugación, obteniendo 1 mL de AuNP-e funcionalizadas con PEG más el EDC y NHS. Se centrifugó por 15 minutos a 13.500 rpm por 15 minutos. Retiramos el sobrenadante (exceso de EDC y NHS). Se tomaron 1,48 mg del péptido Raf protegido en 0,1 mL de DMF, completando con 0,9 mL de citrato y se resuspendió el precipitado anterior centrifugando a 3.500 rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante (exceso de péptido) y se resuspendió en la solución de citrato (1 mL). Con este procedimiento tenemos funcionalizada la nanopartícula como AuNP-PEG-RAF (Figura 19).

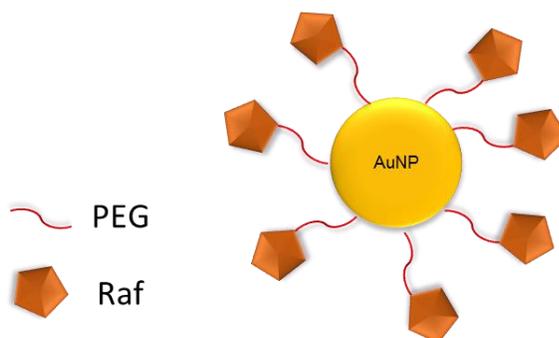


Figura 19: Esquema representativo de nanopartículas de oro recubiertas con PEG-Raf.

4.7 Incubación de las AuNP-PEG-Raf en medio biológico (PBS)

Se preparó una solución de PBS 100 mL de concentración 0,01M. Obteniendo así un medio salino correspondiente a un pH 7,4 que simula la fuerza iónica y pH del plasma.

Se tomaron dos *eppendorf* para preparar dos disoluciones. La primera se hace con 100 μ L de AuNP-PEG-Raf completando con 900 μ L de la solución de PBS y la segunda disolución se preparó con 400 μ L de AuNP-PEG-Raf y 600 μ L de PBS.

Ambas soluciones fueron homogenizadas y al cabo de 15 minutos se les midió el diámetro de las nanopartículas AuNP-PEG-Raf por DLS y el potencial Z para evaluar la carga de la nanopartícula con el objetivo de estudiar la estabilidad de la nanopartícula AuNP-PEG-Raf en medio salino (PBS).

Al cabo de 1 hora nuevamente se midió el radio hidrodinámico por DLS y la carga mediante el potencial Z para evaluar la estabilidad de las nanopartículas AuNP-PEG-Raf en el medio.

V. Resultados y Discusión

5.1 Síntesis y caracterización de los péptido Raf y Bombesina:

5.1.1 Péptido Raf

La síntesis de los péptidos se llevó a cabo en fase sólida siguiendo la estrategia Fmoc/tBu, usando como resina la Cloruro 2-clorotritilo con un grado de funcionalización de 1 mmol/gramo. Se ensambló el péptido hasta completar la secuencia completa como se muestra en la Figura 20. La eliminación del grupo protector Fmoc/tBu, se eliminó eficientemente tratándolo con una solución al 20% de piperidina en DMF. Para la eliminación de todos estos grupos protectores y escisión de los péptidos de la resina se utilizó TFA. El tratamiento con TFA al 1% en DCM fue suficiente para separar el péptido del soporte sólido.

Para el péptido Raf cuya secuencia se muestra en la figura 18, el rendimiento teórico utilizando 0,2 g de resina con $1,0 \times 10^{-3}$ g de carga y 1423 g/mol de masa molar para este péptido fue de 0,2846 g y los gramos experimentales obtenidos fueron de 0,1273 g, dando un rendimiento para el péptido Raf de un 44.7%.

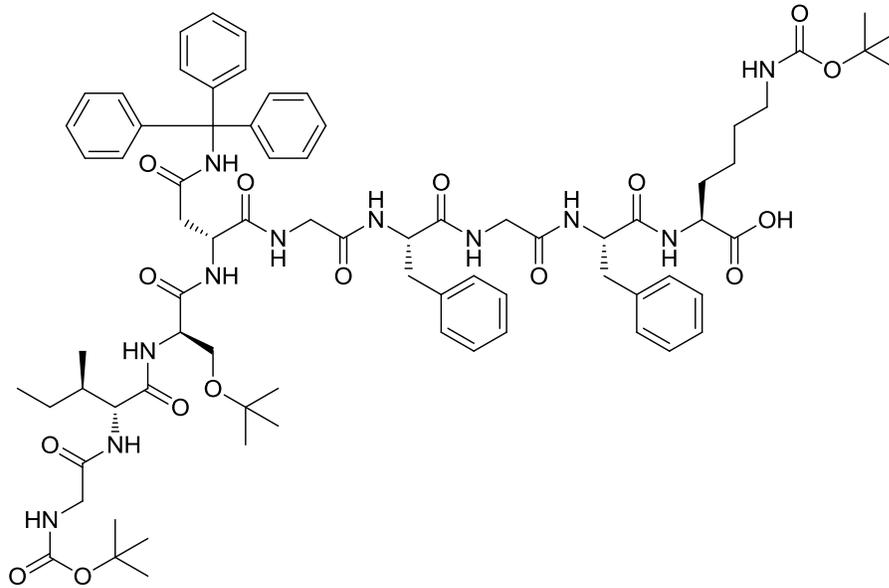
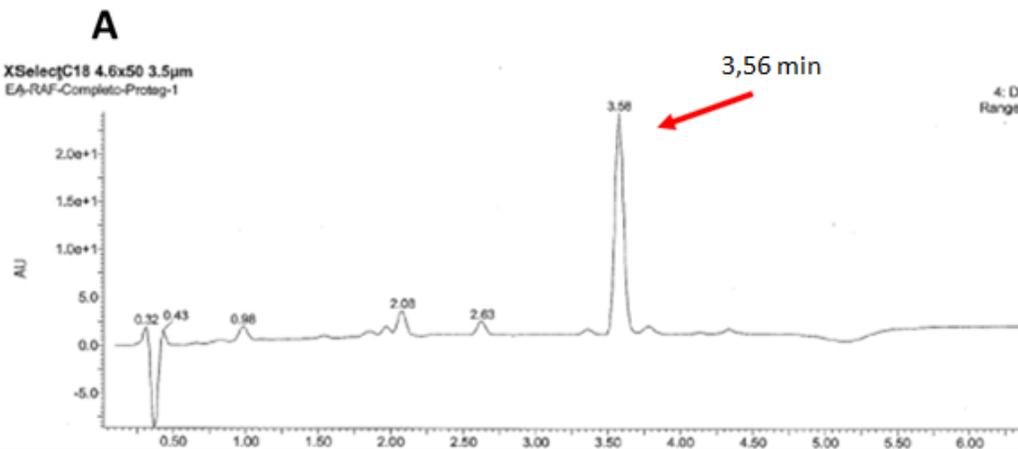


Figura20: Estructura de la secuencia peptídica deRaf protegido en sus cadenas laterales.

El péptido Raf fue caracterizado mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC acoplado a un detector de masas (HPLC-MS). En la Figura 21 se muestra el cromatograma del péptido Raf después de la escisión de la resina. En el espectro del producto mayoritario que posee un tiempo de retención de 3,54 min posee un espectro (Figura 21-B) que se corresponde a la masa del péptido Raf protegido en sus cadenas laterales donde se observa el ion molecular M^+ correspondiente 1424. Se puede observar además la m/z correspondiente al $(M+2H)^+/2$ a 713. La pureza del péptido Raf fue de un 95,8 %.



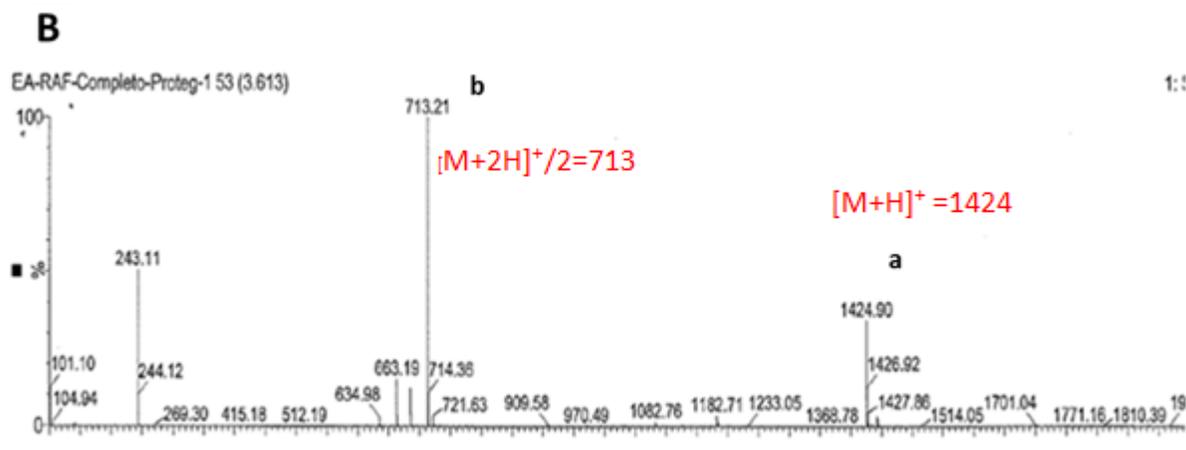


Figura 21: Cromatograma de HPLC-MS correspondiente al péptido Raf protegido. A: Rf del péptido Raf a 3,56 min. B: Masas correspondiente a M+ 1424 y pico **b** correspondiente al $(M+2H)^+/2$ a 713. Los HPLC-MS fueron obtenidos en el laboratorio de péptidos de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

5.1.2 Péptido Bombesina

Para el péptido Bombesina cuya secuencia se muestra en la figura 22, el rendimiento teórico, para 0.2 g de resina con una carga de ésta de 1.0×10^{-3} g y la masa molar de Bombesina 1043 g/mol es de 0.2086 g y la cantidad de gramos experimentales obtenidos fueron de: 0.1152g dando un rendimiento total del péptido Bombesina del 55,2%

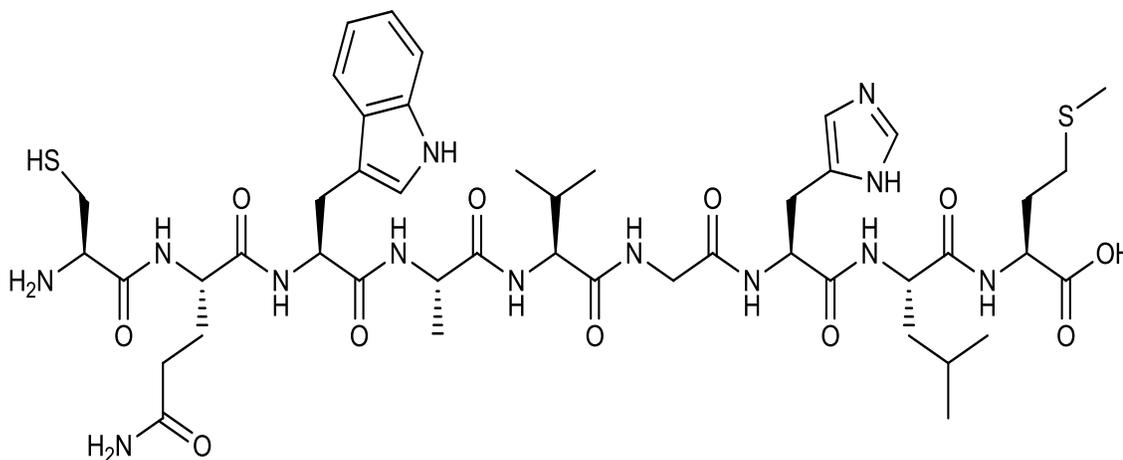
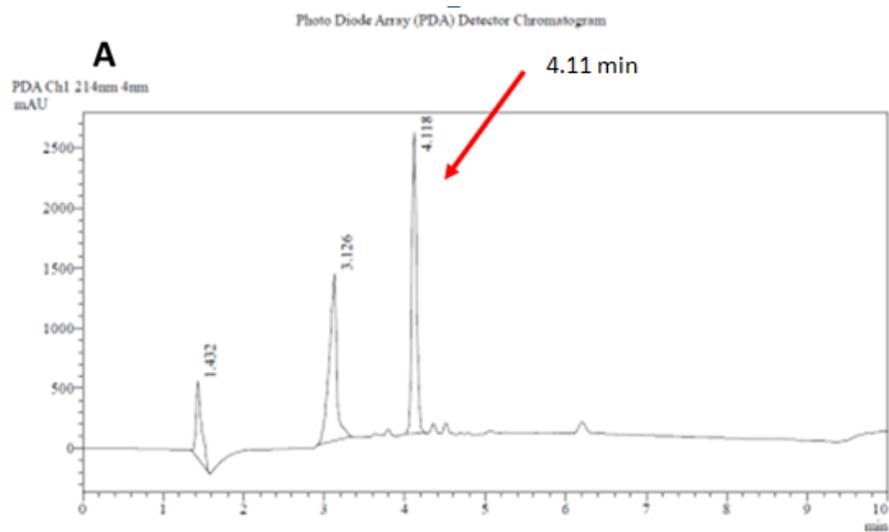


Figura 22: Estructura y secuencia peptídica de la Bombesina

Los péptidos fueron caracterizados mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC acoplado a un detector de masas (HPLC-MS). En la Figura 23 se muestra el cromatograma del péptido Bombesina después de la escisión de la resina y la eliminación completa de los grupos protectores.

El pico a del espectro de masas corresponde a la masa del péptido Bombesina. Se puede observar el ion molecular M^+ correspondiente 1044 y el pico b con una masa de 523 correspondiente al $(M+2H)^+/2$.



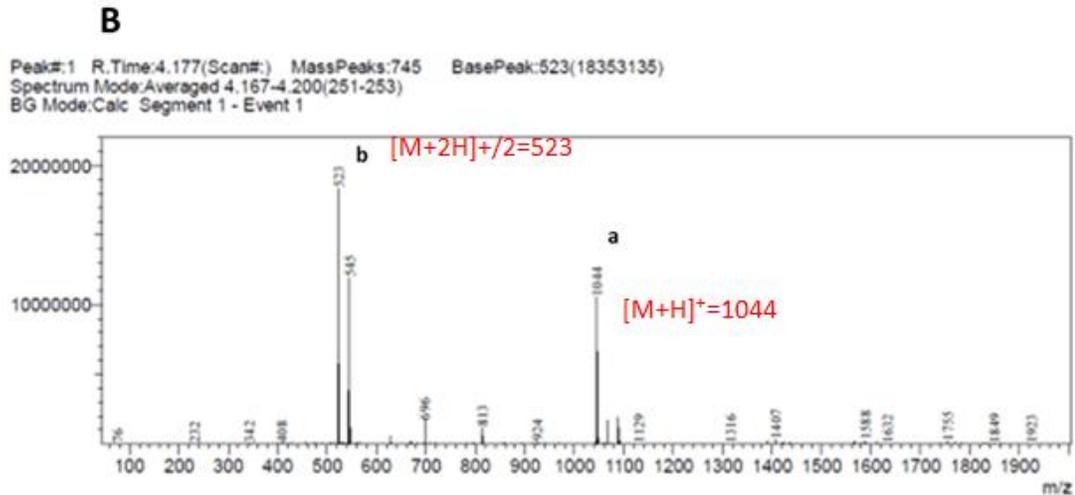


Figura 23: Cromatograma de HPLC-MS correspondiente al péptido Bombesina. **A:** cromatografía del péptido Bombesina a 4,118 min. **B:** peak **a** de 1044 correspondiente al M^+ y el pico **ba** 523 correspondiente al $(M+2H)^+/2$. Los HPLC-MS fueron obtenidos en el laboratorio de péptidos de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

5.2 Síntesis y caracterización de AuNP-e

Para la síntesis de nanopartículas se utiliza el método de síntesis basado en la reducción química de un complejo de oro, ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) con citrato de sodio, es una adaptación del método publicado por John Turkevich, Peter Cooper Stevenson y James Hillier en el año 1951.¹⁴ Se comienza con HAuCl_4 y citrato trisódico como agente reductor, estabilizante y agente tamponante de pH de las NPs. Como el citrato cumple todas esas funciones, debe estar en un gran exceso. Las AuNP-e estabilizadas en citrato fueron sintetizadas según se ha detallado en sección 4.5).

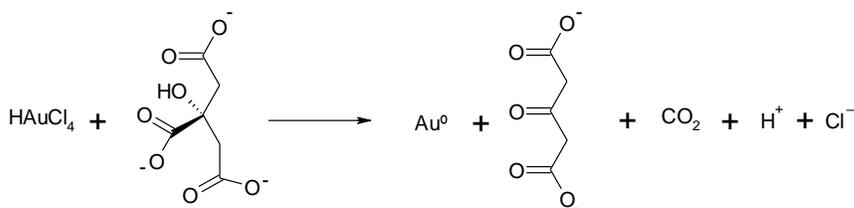


Figura 24: Reacción general de reducción del oro con citrato

En la reacción, el citrato se oxida a ácido acetondicarboxílico, sufriendo la pérdida del carboxilo adyacente al hidroxilo; este último se elimina como CO_2 . El ácido clorhídrico es neutralizado por uno de los grupos carboxílicos del citrato. En tanto, el Au^{+3} se reduce a oro metálico Au^0 ; las fuerzas de atracción de Van der Waals predominan, agregándose átomo por átomo en un proceso de nucleación, o formación de nanopartículas.

5.2.1 Caracterización de AuNP-e desnudas por Espectrofotometría UV-Visible

Las AuNP-e obtenidas por el método de Levy⁴³ mostraron una longitud de onda de absorción máxima a los 520nm, lo cual indica que el tamaño de las AuNP-e se encuentran en un rango de tamaño de alrededor de los 10nm (Figura 25).

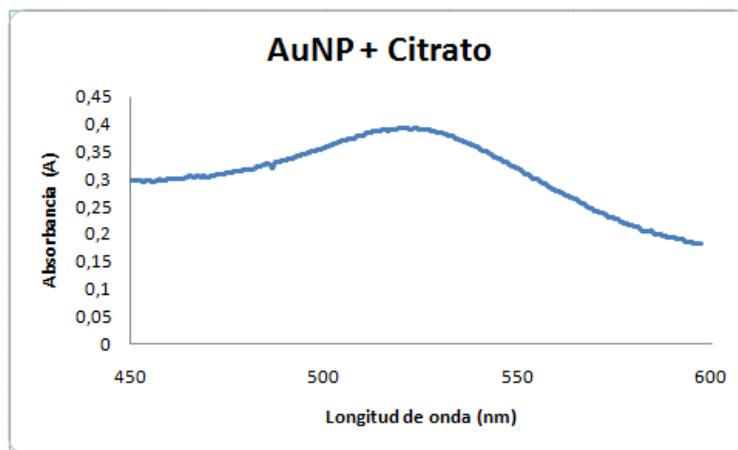


Figura 25: Espectro de absorción de una dispersión de AuNP-e estabilizadas en citrato.

5.2.2 Medidas de Dispersión de la Luz(DLS) de las AuNP-e.

En los análisis de DLS (Figura 26) se observa que las AuNP-e presentan un diámetro hidrodinámico aproximadamente de 9 nm. Esto se debe a que en las

medidas de DLS el tamaño de las AuNP-e considera todo lo que se encuentra unido a la superficie, en este caso, corresponde a los iones citratos quienes se encuentran adsorbidos a la superficie de la NP, (comparar el tamaño con SEM (*Scanning Electron Microscope*)), en las que sólo se pueden percibir el metal de la NP. En DLS, se determina el tamaño hidrodinámico de las partículas en suspensión mediante fluctuaciones de la luz dispersadas por el coloide.

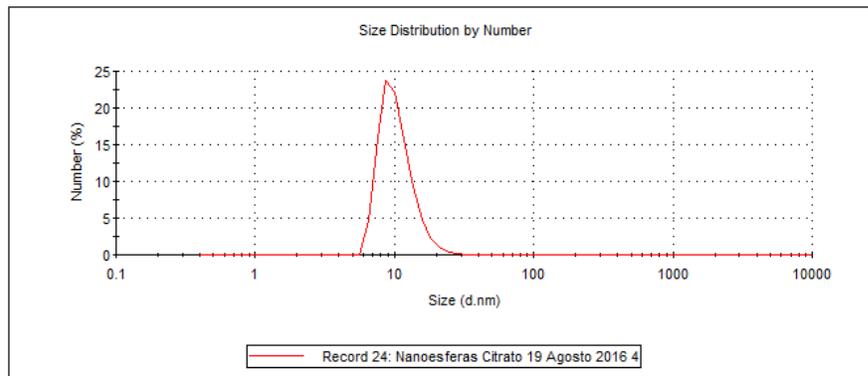


Figura 26: Distribución de tamaño de las AuNP-e en citrato obtenida por Dispersión dinámica de la luz (DLS). Diámetro obtenido 9 nm con un Pdl: 0,4

5.2.3 Potencial Z de las AuNP-e

En el gráfico observado de potencial zeta se observa un valor de -40,2 mV (Figura 27). Este potencial negativo se debe a la presencia de iones citrato en la superficie de la nanopartícula. El valor de pH a la que fue realizada esta medición fue a pH=8,5

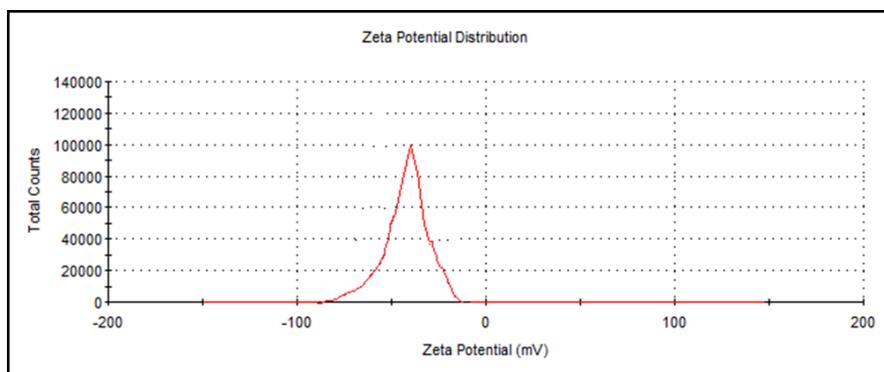


Figura 27: Potencial zeta de AuNP-e en citrato a pH= 8,5. Valor de $-40,2 \pm 15.3$ mV.

5.2.4 Caracterización por SEM de las AuNP-e

En la imagen de STEM (*Scanning Electron Microscope*) (Figura 28) muestra una micrografía de las AuNPs obtenidas. No se observaron AuNP-e agregadas, sino más bien una gran agrupación de éstas. El tamaño promedio de las mismas fue de $9 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$.

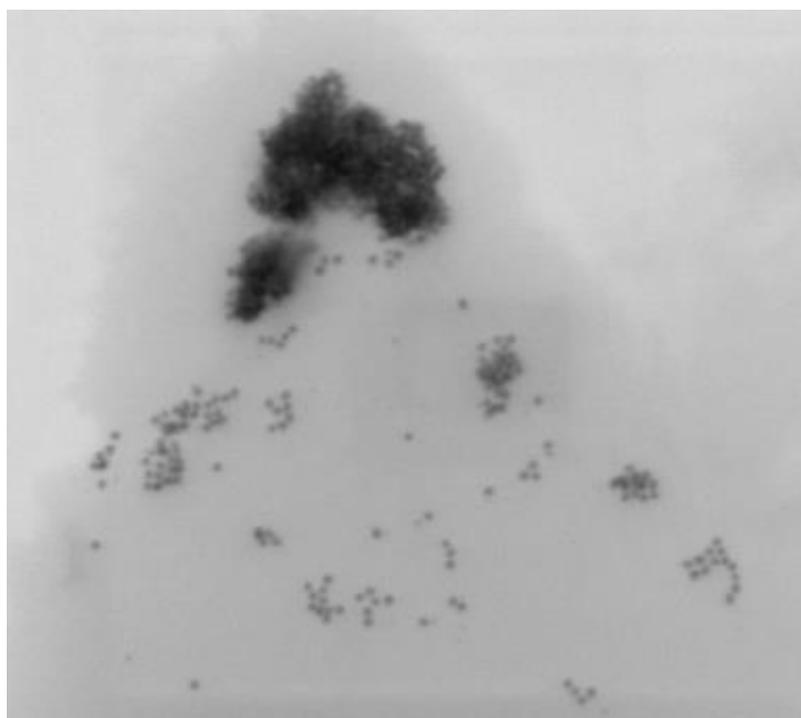


Figura 28: Micrografía de SEM de las AuNP-e estabilizadas en citrato. Tamaño promedio 9 ± 2 nm.

5.3 Caracterización de AuNP-e conjugadas con PEG

Caracterización por Espectrofotometría UV-vis.

Una vez obtenidas las AuNP-e las mismas se funcionalizaron con HS-PEG-COOH de PM=5000. Para ello se mezclaron las AuNP-e con una solución acuosa de HS-PEG-COOH y se incubaron a temperatura ambiente. En este proceso se produce la quemisorción de los grupos tioles sobre la superficie de las nanopartículas produciéndose el desplazamiento de las moléculas de citrato. Para las AuNP-e funcionalizadas con PEG se observó un desplazamiento batocrómico desde 520 a 523 nm (Figura 29). El resultado es esperable ya que las AuNP unidas al PEG cambian el índice de refracción produciendo un cambio en el máximo del plasmón superficial.

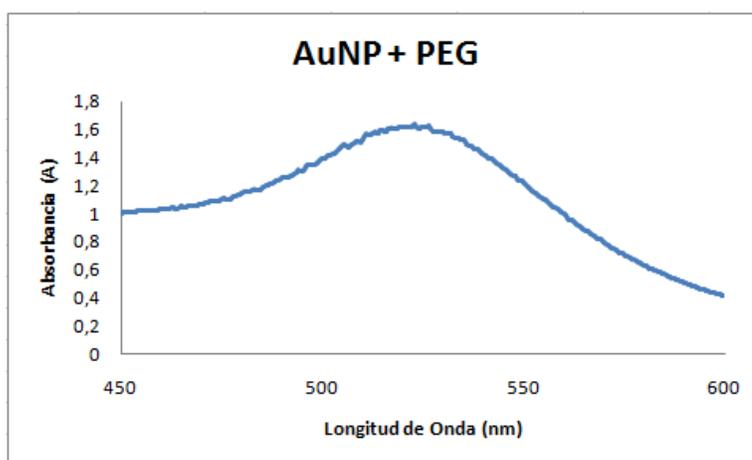


Figura 29: Espectro de absorción de una dispersión de AuNP-e conjugadas con PEG a una $\lambda_{\text{máx}}=523$ nm.

5.4 Caracterización de AuNP-e conjugadas con PEG-Raf (AuNP-PEG-Raf)

Una vez obtenidas las AuNP multifuncionalizadas con HS-PEG-COOH se realizó la conjugación con el análogo de Raf mediante la reacción de EDC/NHS para obtener el conjugado AuNP-PEG-Raf. En este caso se produjo un desplazamiento batocrómico debido al aumento del diámetro de la nanopartícula llegando a los 526 nm cuando está completamente unido al péptido (Figura 30). Asimismo se produce un ensanchamiento de la banda plasmónica la que podría correlacionarse con un cierto grado de agregación de las nanopartículas.

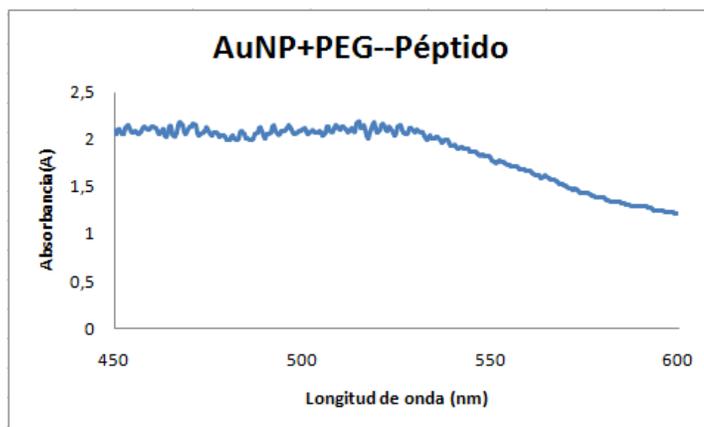


Figura 30: Espectro de absorción de AuNP-e conjugadas con PEG activado y funcionalizadas con el péptido Raf a $\lambda_{\text{máx}} = 526$ nm.

Asimismo, las AuNP-PEG-Raf fueron observadas por STEM observándose que el promedio de tamaños fue de $9 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ (Figura 31).

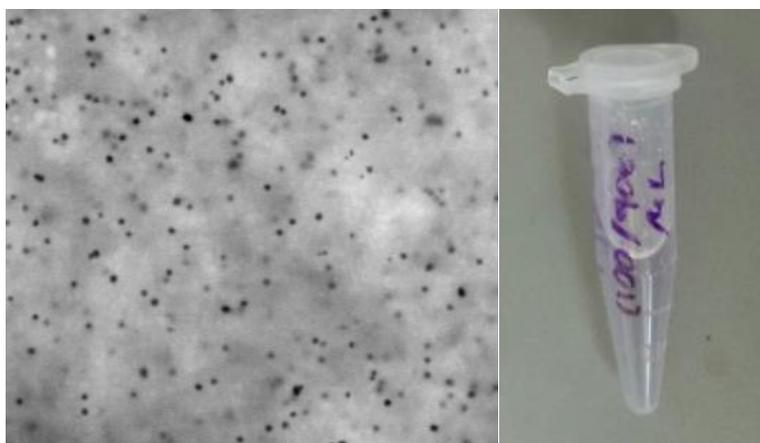


Figura 31: Micrografía de STEM AuNP-PEG-Raf $9 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$.

5.5 Estabilidad de las AuNP-PEG-Raf en PBS

Para estudiar la estabilidad de las nanopartículas conjugadas con el péptido Raf se preparó una solución de PBS obteniendo así un medio salino correspondiente a un pH 7,4 que simula la fuerza iónica y pH del plasma.

Se incubaron en PBS nanopartículas AuNP-PEG-Raf a distintas proporciones a) 100 μL de nanopartículas funcionalizada con 900 μL de medio salino y otra disolución b) 400 μL de nanopartículas funcionalizada con 600 μL del mismo medio salino durante 15 minutos y 60 minutos. Se determinó la absorción máxima

de las soluciones mediante espectroscopia de UV-visible, el diámetro hidrodinámico por DLS y el potencial Z para los tiempos indicados (tabla 7) para evaluar el efecto que tiene el medio sobre el tamaño y la carga de la nanopartícula dando con esto un indicio de la estabilidad de la nanopartícula AuNP-PEG-Raf en este medio biológico.

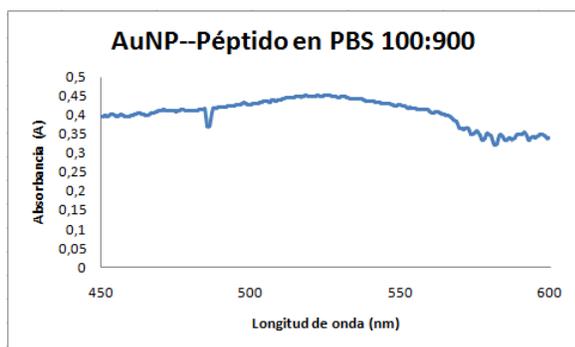
Solución de AuNP-PEG-Raf en medio salino PBS	PBS pH 7,4 AuNP-PEG-Raf/PBS	Tiempo de incubación (minutos)	
		15	60
AuNP-PEG-Raf	100:900	15	60
AuNP-PEG-Raf	400:600	15	60

Tabla 7: Incubación de AuNP-PEG-Raf en medio salino PBS a distintos tiempos.

5.5.1 Espectrofotometría UV-Visible.

Para las AuNP-PEG-Raf incubadas en PBS se pudo observar una absorbancia máxima de 526 nm (Figura 32) para ambas mezclas señaladas en la tabla 8. El resultado estaría indicando que el sistema AuNP-PEG-Raf en PBS es estable en primera instancia, ya que presenta un valor muy próximo al de AuNP-PEG-Raf en citrato, indicando que son estables en el medio. Este resultado fue obtenido a las 24 horas de preparada la muestra.

A



B

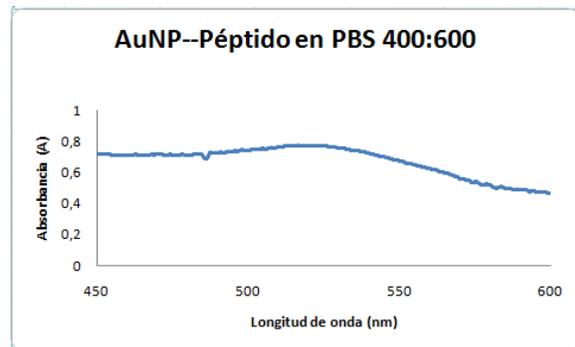


Figura 32: Espectro de absorción de una dispersión de AuNP-PEG-Raf en PBS en una concentración **A) 100:900** y **B) 400:600** a $\lambda_{\text{máx}} = 526 \text{ nm}$

5.5.2 Dispersión dinámica de la luz (DLS).

a) AuNP-PEG-Raf en PBS a una proporción de 100:900

Para evaluar la estabilidad coloidal de las nanopartículas se determinaron los diámetros hidrodinámicos de las AuNP-PEG-Raf en PBS a dos diferentes proporciones a 15 y 60 minutos a temperatura ambiente.

A la primera medida a los 15 minutos el DLS muestra un tamaño de nanopartícula de 12 nm de diámetro (Figura 33).

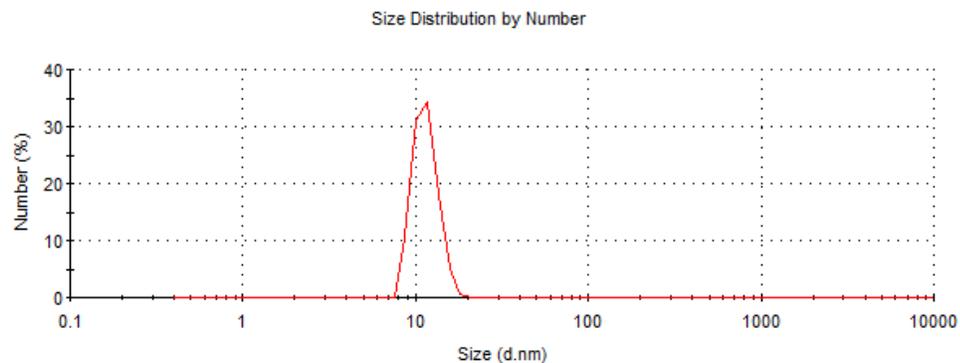


Figura 33: Primera medición. Distribución de tamaño de las AuNP-PEG-Raf en PBS a una proporción de 100:900 con 15 minutos de incubación. Diámetro obtenido 12 nm con un Pdl: 1.00

En la segunda medida a los 60 minutos el DLS muestra un tamaño de nanopartícula de 64 nm de diámetro (Figura 34).

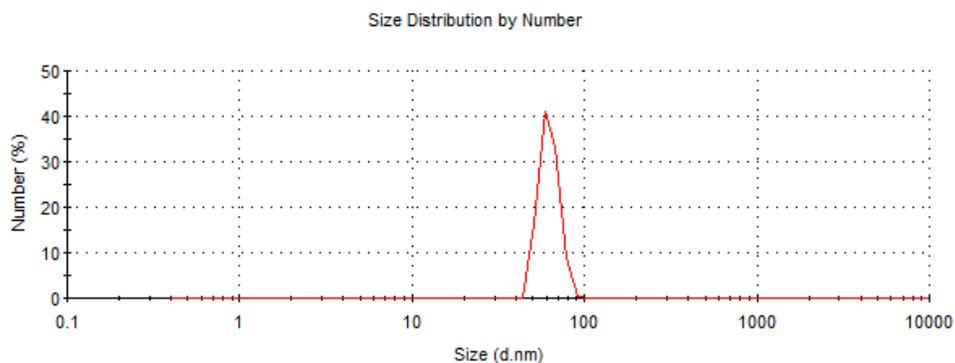


Figura 34: Segunda medida. Distribución de tamaño de las AuNP-PEG-Raf en PBS a una proporción de 100:900 con 60 minutos de incubación. Diámetro obtenido 64 nm con un Pdl: 0.031

Tal como se detalla en las figuras 33 y 34 puede observarse que existe agregación de las nanopartículas AuNP-PEG-Raf en el medio salino ya que el diámetro promedio aumenta de 12 a 64 nm.

b) AuNP-PEG-Raf en PBS a una proporción de 400:600

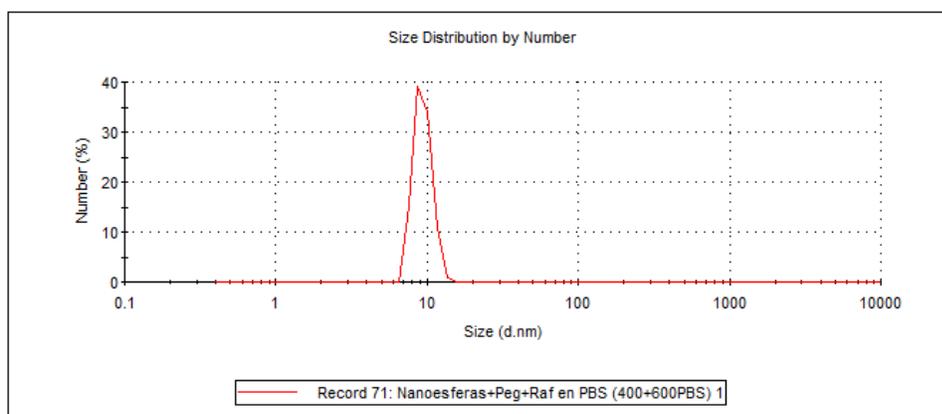


Figura 35: Primera medición. Distribución de tamaño de las AuNP-PEG-Raf en PBS a una proporción de 400:600 con 15 minutos de incubación. Diámetro obtenido 10 nm con un Pdl: 1.00

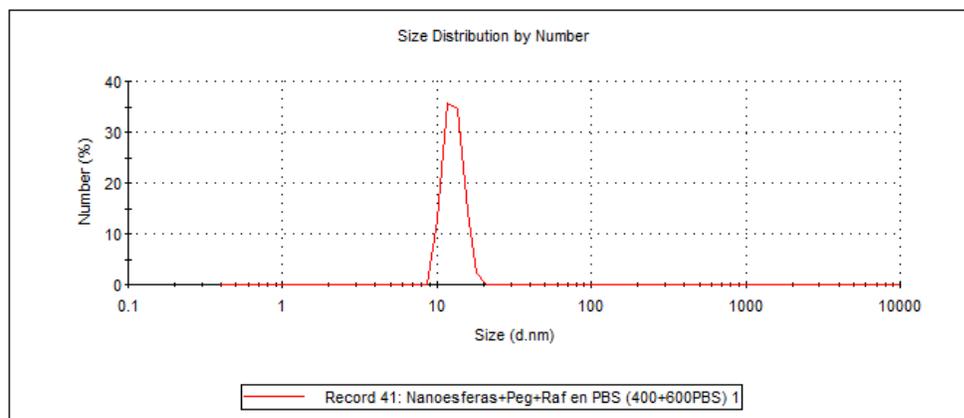


Figura 36: Segunda medida. Distribución de tamaño de las AuNP-PEG-Raf en PBS a una proporción de 400:600 con 60 minutos de incubación. Diámetro obtenido 14 nm con un Pdl: 1.00

Comparando los resultados de DLS de las Figuras 31 y 32 correspondientes a la dilución de sistema AuNP-PEG-Raf en PBS en una concentración 100:900; y las Figuras 34 y 35 del mismo sistema, pero en una dilución 400:600 se puede observar que existe un aumento de diámetro de 12 a 64 y 10 a 14 nm respectivamente, cuando el tiempo de incubación es mayor (60 minutos), indicando que la estabilidad del medio se pierde. Por lo cual el sistema AuNP-PEG-Raf en PBS no es favorable.

Observando los resultados de ambas disoluciones y a medida que transcurre el tiempo de incubación (tabla 8) podemos concluir que existe agregación en el medio salino. Cuando la proporción de PBS disminuyese observó que el aumento del diámetro no es tan drástico como cuando se encuentra en una proporción mayor.

AuNP-PEG-Raf en PBS (relación nanopartícula:PBS)	Espectroscopia UV-vis (nm) 24 horas	1° medición DLS (nm) 15 minutos	2° medición DLS (nm) 60 minutos
100:900	526	12	64

400:600	526	10	14
----------------	-----	----	----

Tabla 8: Resumen de las mediciones de las disoluciones AuNP-PEG-Raf/PBS 100:900 y 400:600 de espectroscopia UV y DLS.

5.5.3 Potencial Z de las AuNP-PEG-Raf en PBS diferentes concentraciones.

En la tabla 9 puede observarse que las nanopartículas poseen un potencial zeta negativo lo cual puede explicarse por la carga neta del péptido (que es negativa a pH=7.4 ya que el punto isoeléctrico es de 4,77). Al reducir la concentración de PBS (400:600) el potencial zeta se hace mayor en valor absoluto a los 15 minutos de la incubación. En cambio a 1 hora de la incubación los valores absolutos de los potenciales zeta se hacen menores posiblemente debido a la agregación de las nanopartículas. La fuerza iónica favorece las interacciones hidrofóbicas de las cadenas protectoras del péptido Raf provocando la agregación, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos por DLS (Figuras 31-35).

AuNP funcionalizada en PBS (relación nanopartículas :PBS)	1° medición Potencial Z (mV) 15 minutos	2°medición Potencial Z (mV) 60 minutos
100:900	-39.9	-35.5
400:600	-52.4	-37.9

Tabla 9: Resumen de los potenciales Z medidos de AuNP-PEG-Raf en PBS enproporcionese de 100:900 y 400:600a 15 y 60 minutos de incubación.

VI. Conclusiones

- Se sintetizó los péptidos Raf y Bombesinas siguiendo la técnica Fmoc/tBu, obteniendo un rendimiento de péptidos de 44.7% y 55.2% respectivamente, lo que se encuentra dentro de rangos esperados.
- Se sintetizaron AuNP-e siguiendo la metodología descrita y se le realizaron pruebas de DLS, potencial Z y SEM consiguiendo un diámetro acorde a la técnica empleada.
- Durante la conjugación de la AuNP-e con el espaciador PEG y el péptido Raf, se fueron realizando pruebas de UV-visible en cada etapa de conjugación, obteniendo un corrimiento esperado en la curva de absorbancia por la adición del espaciador y del péptido con su consecuente alargamiento, lo que concuerda con lo reportado en literatura.
- Se realizó la evaluación de la estabilidad coloidal de las nanoesferas conjugadas con PEG y el péptido Raf a diferentes concentraciones y a diferente tiempo en un medio de PBS. Las mediciones tanto de DLS como

del potencial z, concluyeron que el sistema pierde estabilidad. La fuerza iónica favorece las interacciones hidrofóbicas de las cadenas protectoras del péptido Raf provocando la agregación de las nanopartículas.

- Las nanopartículas se hacen más hidrofóbicas en el medio estudiado al estar conjugadas con el grupo protector Fmoc, lo que conlleva a la agregación de las mismas.
- Las perspectivas a futuro es realizar la conjugación de la Bombesina y del Raf desprotegido para ver el comportamiento de estos péptidos en medios de relevancia biológica.

VII. Bibliografía

1. Choi, J., Yang, J., Park, J., Kim, E., Suh, JS, Huh, YM, Haam, S(2011). Specific Near-IR Absorption Imaging of Glioblastomas Using Integrin-Targeting Gold Nanorods. *Adv. Funct. Mater.* 21, 1082.
2. Araya E, y cols. (2008)“Gold Nanoparticles and Microwave Irradiation Inhibit Beta-Amyloid Amyloidogenesis”, *Nanoscale research letters* 3,11 435.
3. Guerrero, E., et al., (2014)*Gold nanoparticles for photothermally-controlled drug release Nanomedicine* (Lond).
4. Hosta-Rigau L, y cols.(2010).“Multifunctionalized Gold Nanoparticles with Peptides Targeted to Gastrin-releasing Peptide Receptor of a Tumour Cell Line.” *BioconjugateChem.* 21, 6, 1070–1078
5. Li GT, Lauer M, Schulz M, Boettcher C, Li FT, Fuhrhop JH.(2003). Spherical and planar gold(0) nanoparticles with a rigid gold(I)-anion or a fluid gold(0)-acetone surface. *Langmuir*;19(16):6483–6491.

6. Shipway A.N., Lahav M., Gabai R., Willnerl.(2000). Investigations into the electrostatically induced aggregation of Au nanoparticles. *Langmuir*. 16, 8789-8795
7. Aroca RF. (2006)The interaction of light with nanoscopic metal particles and molecules on smooth reflecting surfaces. En: Surface-enhanced vibrational spectroscopy. Chichester, Inglaterra. John Wiley & Sons; p. 35–71
8. Mie G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* (1908);25(3):377–445. Traducción al inglés disponible desde: <http://diogenes.iwt.uni-bremen.de/vt/laser/papers/RAE-LT1873-1976-Mie-1908-translation.pdf>
9. Shipway A.N., Lahav M., Gabai R., (2003). Willnerl.:Investigations into the electrostatically induced aggregation of Au nanoparticles. *Langmuir*. 16, 8789-8795
10. Daniel MC, Astruc D.(2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev*;104(1):293–346.
11. Sartor M.:(2003). Dynamic light scattering to determine the radius of small beads in Brownian motion in a solution. University of California San Diego. 1-21
12. Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A.:(1998). High-performance liquid chromatography. Crawfordsville : Thomson Learning. *Principles of instrumental analysis*. 725–767
13. Lien, S. y Lowman, H. B. (2003). Therapeutic peptides. *Trends Biotechnoh* 21, 556-562.
14. Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J. y Khrestchatisky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov. Today* 15, 40-56.
15. McGregor, D. P. (2008). Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Curr Opin. Pharmacol* 8, 616-619. Ladner, R. C, Sato, A. K.,

- Gorzelay, J. y de Souza M. (2004). Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov. Today* 9, 525-529.
16. Hummel, G., Reineke, U. y Reimer, U. (2006). Translating peptides into small molecules. *Mol. Biosyst.* 2, 499-508.
 17. Marx, V. (2005). Watching Peptide Drugs Grow Up. *Chew. Eng. News* 83,17-24.
 18. Loffet, A. (2002). Peptides as drugs: is there a market? *J. Pept. Sci.* 8, 1-7.
 19. Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J. y Khrestchatisky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov. Today* 15, 40-56.
 20. Hiuby, V. J. (2002). Designing peptide receptor agonists and antagonists. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 847-858.
 21. Ayoub, M. y Sheidegger, D. (2006). Peptide chugs, overcoming the challenges, a growing business. *Chim. Oggi / Chew. Today* 24,46-48.
 22. Reissmann, S. y Imkof, D.(2004). Development of conformationally restricted analogues of bradykinin and somatostatin using constrained amino acids and different types of cyclization. *CurrMed. Chem.* 11,2823-2844."
 23. Amblard, M., Fehrentz, J. A., Martinez, J. y Subra, G. (2006). Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis. *Mol Biotechnol* 33, 239-254.
 24. Meixfield, B. (1986). Solid phase synthesis. *Science* 232, 341-347.
 25. Okada, Y. (2001). Synthesis of Peptides by Solution Methods. *Curr. Org. Chem.* 5, 1-43.
 26. Lloyd-Williams P, Albericio F y Giralt E (1997). Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins.
 27. Barany, G. y Yokum, T. S. (2000). Strategy in Solid-Phase Peptide. *EnSolid-Phase Synthesis. A Practical Guide.* Marcel Dekker, Inc., New York. 79-102.

28. Biuckdorfer, T., Marder, O. y Albericio, F. (). From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. *Curr Pharm Biotechnol* 5, 29-43.
29. Atherton, E., Fox, H., Harkiss, D., Logan, C. J., Sheppard, R. C. y Williams, B. J. (1978). A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 537-539.
30. Fields, G. B., Tian, Z. y Barany, G. (1992). Principles and practice of solid phase peptide synthesis. *EnSynthetic peptides: A User's Guide*. H.F. Freeman, New York. 77-183.
31. Jensen, K. J., Alsina, J., Songster, M. F. V. J., Albericio, F. y Barany, G. (1998). Backbone Amide Linker (BAL) Strategy for Solid-Phase Synthesis of C-Terminal-Modified and Cyclic Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 5441-5452.
32. Fields, G. B. y Noble, R. L. (1990). Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 35, 161-214.
33. Jam, A. y Jain, S. K. U (2008). PEGylation: an approach for drug delivery. A review. *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 25, 403-447.
34. Bailón, P. y Won, C. Y. (2009). PEG-modified biopharmaceuticals. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6, 1-16.
35. Felix, A. M., Lu, Y. A. y Campbell, R. M. (1995). Pegylated peptides. IV. Enhanced biological activity of site-directed pegylated GRF analogs. *Int. J. Pept. Protein Res.* 46, 253-264.
36. Maeda, M., Kamada, H., Hojo, K., Yamamoto, Y., Nakagawa, S., Smith, T. J., Mayumi, T. y Kawasa, K. (2001). Amino acids and peptides. XXXV. Facile synthesis of laminin-related peptide-poly(ethylene glycol) hybrids by the solid phase method. *Chem. Pharm Bull. (Tokyo)* 49, 488-491.
37. Lu, Y. A. y Felix, A. M. (1993). Pegylated peptides I: Solid-phase synthesis of N-terminal-pegylated peptides using Fmoc strategy. *Pept. Res.* 6, 140-146.

38. Lu, Y. A. y Felix, A. M. (1994). Pegylated peptides. II. Solid-phase synthesis of amino-, carboxy- and side-chain pegylated peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.* 43, 127-138.
39. Jolck, R. I., Berg, R. H. y Andresen, T. L. (2010). Solid-phase synthesis of PEGylated lipopeptides using click chemistry. *Bioconjugate Chem.* 21, 807-810.
40. Levy R., Thanh N., Doty R., Hussain I., Nichols R., Schiffrin D., Brust M., Fernig D. (2004) Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles. *JACS*, 126: 10076-10084.
41. Mero, A., Clementi, C, Veronese, F. M. y Pasut, G. (2011). Covalent conjugation of poly(ethylene glycol) to proteins and peptides: strategies and methods. *Methods Mol. Biol.* 751.95-129.
42. Frechet, D., Guitton, J. D., Hennan, F., Faucher, D., Helynck, G., Monegier du, S. B., Ridoux, J. P., James-Surcouf, E. y Vuilhorgue, M. (1994). Solution structure of RP 71955, a new 21 amino acid tricyclic peptide active against HIV-1 virus. *Biochemistry* 33,42-50.
43. Andra, J., Gutschmann, T., Garidel, P. y Brandenburg, K. (2006). Mechanisms of endotoxin neutralization by synthetic cationic compounds. *J. Endotoxin. Res.* 12, 261-277.
44. Steer, D. L., Lew, R. A., Perhnutter, P., Smith, A. I. y Aguilar, M. I. (2002). Beta-amino acids: versatile peptidomimetics. *CurrMed. Chem.* 9, 811-822.
45. Dasgupta, P y cols.(2004). "Disruption of the Rb–Raf-1 Interaction Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis" *Molecular and cellular biology*, 9527.
46. Cornelius, D. y cols. "Gastrin-releasing peptide receptor expression in cervical cancer" *Oncology* 2007, 73, 340.